

氏名(本籍)	ほしのさちこ 星野幸子(新潟県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2934号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Dystrophin 及び dystrophin 結合蛋白質, neuronal nitric oxide synthase の発現に関する研究: 実験的ラット再生筋及びヒト筋ジストロフィー骨格筋における形態学的・生化学的検討
主査	筑波大学教授 理学博士 久野節二
副査	筑波大学助教授 医学博士 永瀬宗重
副査	筑波大学助教授 博士(医学) 宮川俊平
副査	筑波大学講師 博士(医学) 飯嶋達生

論文の内容の要旨

(目的)

進行性筋ジストロフィーは、筋壊死、変性により進行性に悪化する疾患である。本研究の目的の1つはDuchenne型(DMD)とBecker型筋ジストロフィー(BMD)の組織学的診断においてCatalyzed Signal Amplification system(CSA)を用いたホルマリン固定パラフィン包埋骨格筋標本のジストロフィン(dys)染色が有用であるか否かを検討することである。また、筋ジストロフィーのようにdysやdys結合タンパク質が欠損している状況では筋再生が不十分であり、その病態の解明は治療法の開発にとって重要な問題である。このため本研究では、実験的筋壊死後の筋再生過程を組織学的に評価し、さらにdys、dys結合タンパク質及び神経性一酸化窒素合成酵素(nNOS)の発現の推移を免疫組織化学と生化学的方法により機能タンパク質の発現動態の側面から解析し、筋再生過程の物質的構造基盤を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

組織学的診断法に関する研究では、DMD/BMD患者及び疾患対照群の生検筋パラフィン切片を抗原性賦活化後、抗dys抗体(DYS1とDYS2)を使用してCSAによる免疫組織化学を行った。筋再生過程の研究では、ラットを用いてcardiotoxinによる筋壊死実験を以下のように行った。前脛骨筋にcardiotoxinを筋注し、1、3、5、7、及び10日後、さらに2、3、及び4週後に組織を採取し、凍結切片を作成して、ヘマトキシリンエオジン染色とATPase組織化学及び筋再生マーカータンパク質(デスミン、M-カドヘリン、ミオゲニン、ミオシンheavy chain developmental)の免疫組織化学を行った。また、再生過程でのdys、dys結合タンパク質(α -サルコグリカン、 β -ジストログリカン、 α 1-シントルフィン、 α -ジストロプレビン-1)及びnNOSの発現を免疫組織化学とウェスタンブロット法により解析した。

(結果)

dys陽性反応は疾患対照群の筋鞘膜であったが、DMD群では全く観察されなかった。また、DMD顕性キャリアーでは陽性及び陰性筋線維のモザイク状配列が観察された。BMD群では不連続性の陽性反応が認められた。筋再生実験では、全ての再生マーカータンパク質発現は実験後3-7日にかけて増加したが、その発現時期は概ね β -

ジストログリカン, α -サルコグリカン, ジストロフィン, α 1-シントルフィン, α -ジストロプレニン-1, nNOSの順であった。ATPase活性の観察では7日以降2 C型から2 A, 2 B及び1型への筋線維の分化が起こり, 線維径が増大することが判った。nNOS陽性染色は2 B型筋線維に優位に認められ, 筋線維の分化に伴い, 陽性線維数が増加した。28日後, 再生筋は正常筋と同様の筋線維型を示した。

(考察)

dysの免疫組織化学による筋ジストロフィーの組織診断は従来より凍結筋切片でのみ可能とされてきた。本研究ではCSAという高感度の検出技法の導入により, ホルマリン固定パラフィン切片においても凍結切片と同等の疾患の特徴的所見を再現できた。このことは今後, 本法が心筋障害合併例の生検心筋や, 死亡症例の再診断などに広く応用できることを示している。

実験的筋壊死後の再生過程におけるマーカータンパク質発現動態の解析により, 過程前半の4日間は, 筋再生細胞の活性化, 筋管細胞形成および筋原線維形成が混在する時期であり, その後は筋原線維の成熟期つまり筋線維型の分化期にあたること, そして筋再生過程は21日間程度で完了することが明らかになった。これらの観察により, 筋再生過程で起こる再生タンパク質発現の推移に関する時系列的データが示され, この観察結果を基に今後は筋ジストロフィーにおける筋変性, 壊死等の病態変化の解析が可能になると思われる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は, 高感度の免疫組織化学的技法をホルマリン固定標本のパラフィン切片に適用することにより, 従来から汎用されてきた通常の病理組織保存標本においても筋ジストロフィーの組織診断が可能であることを実証しており, 本症例の組織診断に新しい技術的進展をもたらした点で評価できる。さらに, 筋壊死動物モデルに関する筋再生過程の形態学的並びに生化学的解析から, 各種の再生関連タンパク質の時期特異的な発現動態とその相互関係を明らかにしており, 筋ジストロフィー発症後の病態変化とその機序の解明のための今後の臨床研究にとって非常に貴重な実験データを示しており, 学位論文として高く評価できる。

よって, 著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。