

された。

また、神経細胞内における A $\beta$ 42C 末端免疫活性の出現とタウの異常蓄積は、独立した病理プロセスであると考えられた。神経原線維変化やピック球などのタウ異常構造にしばしば A $\beta$ 42C 末端免疫活性が認められるのは、神経細胞内に生じたそれら線維性異常構造の上に A $\beta$ 42C 末端免疫活性を有するフラグメントが二次的に沈着するためであろうと推察された。

この A $\beta$ 42C 末端免疫活性が A $\beta$ 1-42 のフラグメントによるものか、あるいは三次構造が類似した他の分子のエピトープを認識しているのかは、今後さらに検討を加える必要がある。

## E. 結論

アルツハイマー病脳における神経細胞の変性機序をタウの異常を伴う病理プロセスのみで説明することはできず、現状ではまだ、多様な可能性を考慮に入れた網羅的な検討が必要であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Oda T, Tsuchiya K, Kosaka K, Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases, **J Neuroimmunol** 124:83-92, 2002

Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Tsuchiya K, Pick-body-like inclusions in corticobasal degeneration differ from Pick bodies in Pick's disease, **Acta Neuropathol** 103:115-118, 2002

Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL, Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid  $\beta$ -protein(A $\beta$ ) deposition, **Brain Res** 902:277-281, 2001

Akiyama H, Kondo H, Tanno E, Ikeda K, Amyloid  $\beta$ -protein granules in glial cells in Alzheimer's disease brain. In: Tanaka C (eds): Neuroscientific Basis of Dementia, pp225-228, Birkhauser, Basel, 2001

Akiyama H, Neurons. In: Rogers J (ed): Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Diseases: Basic and Clinical Research. Birkhauser, Basel, pp225-236, 2001

Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL, Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of  $\beta$ -amyloid peptide, **Neurosci Lett** 297:97-100, 2001

Hino H, Akiyama H, Iseki E, Kato M, Kondo H, Ikeda K, Kosaka K, Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in rat and human brain tissues, **Neurosci Lett** 297:105-108, 2001

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Tsuchiya K, Yagishita S, Takamatsu J, Intracellular processing of aggregated tau differs between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy, **NeuroReport** 12:935-938, 2001

Togo T, Iseki E, Marui W, Akiyama H, Ueda K, Kosaka K Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies, **J Neurol Sci** 184:71-75, 2001

Uchihara T, Sato T, Suzuki H, Ikeda K, Akiyama K, Takatori T, Bunina body in frontal lobe dementia without clinical manifestations of motor neuron disease, **Acta Neuropathol** 101:281-284, 2001

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Shikamoto Y, Tsuchiya T, Yagishita S, Beach T, Rogers J, Schwab C, McGeer PL, Distinct isoforms of tau aggregated in neurons and glial cells in brains of patients with Pick's disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy, **Acta Neuropathol** 101:167-173, 2001

Schwab C, Akiyama H, Familial British Dementia: new evidence in the labyrinth of tangles and plaques? **NeuroScience News** 4(2):22-29, 2001

Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T, Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A $\beta$ 42 labeling, **J Alz Dis** 3:231-239, 2001

### 2. 学会発表

Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL, Inverse association of neprilysin immunoreactivity with A $\beta$  deposition in the cerebral cortex, 31th Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 10-15, 2001, San Diego, CA, USA

秋山治彦, 近藤ひろみ, 新井哲明, 加藤雅紀, 織田辰郎, 土谷邦秋, 池田研二, Familial British Dementia アミロイド前駆蛋白質(BRI)の大脳皮質における発現, 第20回日本痴呆学会, 10月4-5日, 2001, 津

秋山治彦, 都甲崇, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 丹野瑛子, 新井哲明, 池田研二, 井関栄三, 加藤雅紀, 織田辰郎, 土谷邦秋, アルツハイマー型痴呆脳海馬に認められるTリンパ球の表現型について, 第42回日本神経病理学会, 5月24-26日, 2001, 東京

秋山治彦, 大脳皮質における neprilysin の分布とアルツハイマー病変との関連, 第42回日本神経学会, 5月11-13日, 2001, 東京

## 細胞内A $\beta$ 陽性構造の電子顕微鏡的検討

分担研究者 卷淵 隆夫 国立療養所犀潟病院、臨床研究部長

共同研究者 田平 武 国立療養所中部病院、長寿医療研究センター長

崔 得華 理化学研究所脳科学研究センター、アルツハイマー病研究グループ

研究要旨 アルツハイマー病の神経細胞内にも存在するとされるアミロイドの存在様式を検討する目的で、Abeta42の免疫組織化学の切片を戻し電顕により検討した。光顕でAbeta42陽性であった細胞は、免疫戻し電顕では小型神経細胞、星膠細胞、ミクログリア、血管内皮細胞など、多様であった。Abeta42陽性の細胞内小器官としては、大きな顆粒として認められるのでリソゾーム、リポフィスチン、ミトコンドリアなどが考えられたが、抗原性の賦活化のため超微形態の保存が悪く、抗原の移動も考えられたので細部は不明である。神経細胞内にアミロイドフィラメントの形成は認めなかった。

### A. 研究目的

近年、老人斑の構成要素であるアミロイドが細胞外の組織間隙のみでなく、細胞内にも存在する可能性が生化学的、免疫組織化学的に報告された。プレセニリン1 (PS1) トランスジェニックマウス及び人アルツハイマー病の脳を抗 $\beta$ アミロイド42 (Abeta42) 抗体で蛍光染色して共焦点顕微鏡で観察した研究(崔ら)では、大脳皮質の一部の神経細胞がAbeta42に陽性である。

我々は昨年、PS1トランスジェニックマウスの海馬神経細胞内に抗Abeta42抗体に陽性である超微構造を免疫戻し電顕(pre-embedding method)で検討した。今年度は人アルツハイマー病の大脳皮質について検討した。

### B. 研究方法

4%paraformaldehyde固定した人アルツハイマー病の脳よりピラトーム切片を作成した。抗原性の賦活化を行った後、抗Abeta42抗体を用いて浮遊法で免疫組織化学染色を行い、DABで発色させた。2.5%glutaraldehydeで後固定し、細切して電子顕微鏡用小片を切出し、1%osmium oxideで固定した。先に作成しておいたエポンブロックを押し付けて切片がしなわないようにしてエポン包埋した(図1-1)。トリミングをしてから電顕ミクロトームで超薄切片を作成した後、残りのエポンブロックを光学顕微鏡の透過光で観察して(図1-2)、陽性細胞の位置を確認しながら、電子染色してない超薄切片を電子顕微鏡で観察し、DAB

陽性構造の超微形態を検討した。

### C. 研究結果

①超薄した後、残りのエポンブロックの面を透過光を用いて光学顕微鏡で観察すると、多くの老人斑の他に、一部の細胞や多数の小顆粒状の陽性構造が認められた(図1-2)。

②これらの細胞や構造を、電子染色してない超薄切片を用いて、位置を対応させながら電子顕微鏡で観察すると、一部の小型神経細胞(図2-1, 2-2)、星膠細胞、ミクログリア、血管内皮細胞などであった。しかし、DABで陽性である部位に特に電子密度の増加は明らかでなかった。

③わずかにDAB陽性の傾向のある細胞内小器官は、大きな顆粒様の構造として認められ(図2-2)、抗原性の賦活化のため超微形態の保存が悪く細部は不明であったが、リソゾーム、リポフィスチン、ミトコンドリアなどが考えられた。粗面小胞体やゴルジ装置はその大きさからは否定的であった。神経細胞の胞体内にはアミロイドフィラメントの形成は認められなかった。

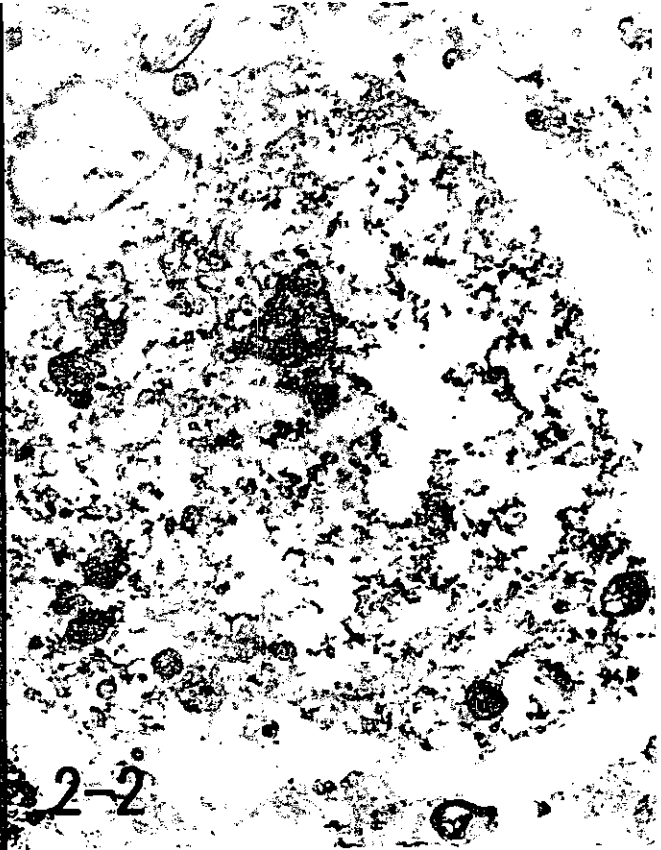
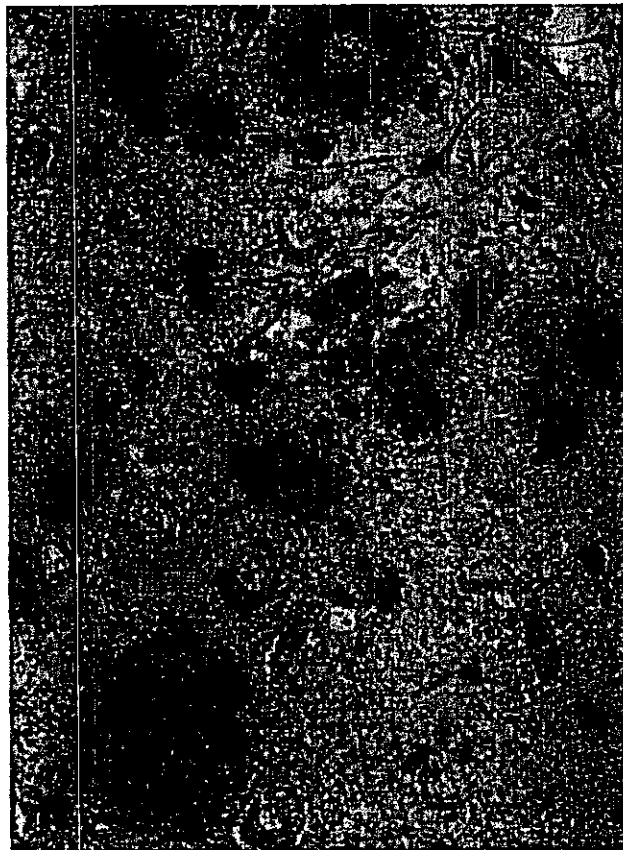
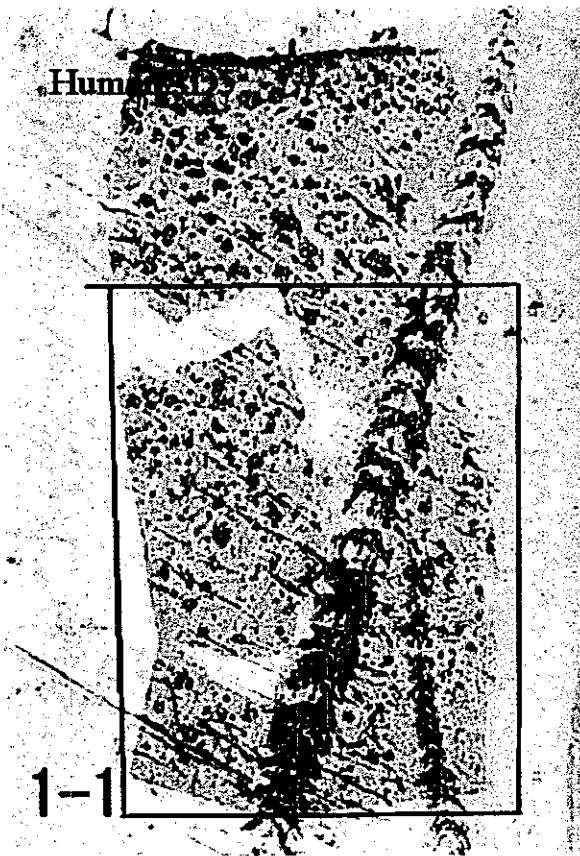
### D. 考察

①DABに陽性なものは、一部の小型神経細胞、星膠細胞、ミクログリア、血管内皮細胞など、多様な細胞や組織構造が考えられた。しかし明らかなDABの電子密度増加として認められなかったことは、切片が厚いため抗体の浸透が切片の表面のみに留まり、切片の中央深部に至らなかった可能性も考えられた。

②DAB陽性の部位の電子顕微鏡的超微形態は、多様な細胞内小器官が考えられたが、標本作製中に抗原が細胞内で移動した可能性も考えられた。

#### E. 結論

人アルツハイマー病の脳皮質の一部の神経細胞の胞体内には、Abeta42がフィラメントを形成しない状態で存在するが、その詳細な局在は別の方法での検討が必要である。



研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Overexpression of presenilin-2 enhances apoptotic death of cultured cortical neurons. Ann New York Academy Sci, vol 920, The Molecular Basis of Dementia, pp241-244	2000		Araki W, Yuasa K, Takeda S, Shirotani K, Takahashi K, <u>Tabira T</u>
Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. Arch Neurol 58: 383-387	2001		Poorkaj P, Grossman M, Steinbart E, Payami H, Sadovnick A, Nochlin D, <u>Tabira T</u> , Trojanowski JQ, Borson S, Galasko D, Reich S, Quinn B, Schellenberg G, Bird TD
Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10 +11-splice site in the tau gene. Ann Neurol 50: 117-120	2001		Miyamoto K, Kowalska A, Hasegawa M, <u>Tabira T</u> , Takahashi K, Araki W, Akiguchi I, Ikemoto A
Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. Neurosci Lett 307:9-12	2001		Tanahashi H, <u>Tabira T</u>
Clioquinol's return: cautions from Japan. (letter to the editor) SCIENCE Vol. 292. 22. P.2251	2001		<u>Tabira T</u>
Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A42 labeling. J Alzheimer Dis 3:231-239	2001		Chui DH, Dobo E, <u>Makifuchi T</u> , <u>Akiyama H</u> , Kawakatsu S, Checler F, Araki W, Takahashi K, <u>Tabira T</u>
Genetic analysis in patients with familial and sporadic frontotemporal dementia: Two tau mutations in only familial cases and no association with apolipoprotein ε4. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 12:387-392	2001		Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, <u>Tabira T</u>

<p>Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. <i>Am J Pathol</i> 158:2165-2175</p>	<p>2001</p>		<p>Mann DMA, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T, &amp; Familial Alzheimer's Disease Study Group (Arango J, Bird T, Van Broeckhoven C, Brooks W, Brown R, Cairns N, Cras P, Ellison D, Haltia M, Li K, Jorgensen A, Krill J, Lantos P, Lippa C, Martins R, Nochlin D, Pollen D, Rosenberg C, Rossor M, Tabira T).</p>
<p>Proapoptotic effect of presenilin 2 (PS2) overexpression is associated with down-regulation of Bcl-2 in cultured neurons. <i>J Neurochem</i> 79:1161-1168</p>	<p>2001</p>		<p>Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirohara K, Takahashi K, Tabira T</p>
<p>Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. <i>Exp Neurol</i> 165: 248-56</p>	<p>2000</p>		<p>Fujigasaki H, Uchihara T, Koyano S, Iwabuchi K, Yagishita S, Makifuchi T, Nakamura A, Ishida K, Toru S, Hirai S, Ishikawa K, Tanabe T, Mizusawa H</p>
<p>Increased production of beta-amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress by an aberrant spliced form of presenilin 2. <i>J Biol Chem</i> 276: 2108-14</p>	<p>2001</p>		<p>Sato N, Imaizumi K, Manabe T, Taniguchi M, Hitomi J, Katayama T, Yoneda T, Morihara T, Yasuda Y, Takagi T, Kudo T, Tsuda T, Itoyama Y, Makifuchi T, Fraser PE, St George-Hyslop P, Tohyama M</p>
<p>Fractal analysis of senile plaque observed in various animal species. <i>Neurosci Lett</i> 297: 195-8</p>	<p>2001</p>		<p>Nakayama H, Kiatipattanasakul W, Nakamura S, Miyawaki K, Kikuta F, Uchida K, Kuroki K, Makifuchi T, Yoshikawa Y, Doi K</p>
<p>Cytoplasmic and nuclear polyglutamine aggregates in SCA6 Purkinje cells. <i>Neurology</i> 56: 1753-6</p>	<p>2001</p>		<p>Ishikawa K, Owada K, Ishida K, Fujigasaki H, Shun Li M, Tsunemi T, Ohkoshi N, Toru S,</p>

<p>A quantitative study on the expression of synapsin II and N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein in schizophrenic patients. <i>Neurosci Lett</i> 305: 185-8</p>	<p>2001</p>		<p>Mizutani T, Hayashi M, Arai N, Hasegawa K, Kawanami T, Kato T, <u>Makifuchi T</u>, Shoji S, Tanabe T, Mizusawa H.</p>
<p>Progressive supranuclear palsy on Guam. <i>Acta Neuropathol (Berl)</i> 102: 510-4</p>	<p>2001</p>		<p>Imai C, Sugai T, Iritani S, Niizato K, Nakamura R, <u>Makifuchi T</u>, Kakita A, Takahashi H, Nawa H</p>
<p>Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid <math>\beta</math>-protein(A<math>\beta</math>) deposition, <i>Brain Res</i> 902:277-281</p>	<p>2001</p>		<p>Yamazaki M, <u>Makifuchi T</u>, Chen KM, Mori O, Katayama Y, Takahashi H, Oyanagi K</p>
<p>Amyloid <math>\beta</math>-protein granules in glial cells in Alzheimer's disease brain. In: Tanaka C (eds): <i>Neuroscientific Basis of Dementia</i>, pp225-228, Birkhauser, Basel</p>	<p>2001</p>		<p><u>Akiyama H</u>, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL</p>
<p>Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease: Basic and Clinical Research. Birkhauser, Basel, pp225-236</p>	<p>2001</p>		<p><u>Akiyama H</u>, Neurons. In: Rogers J (ed)</p>
<p>Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of <math>\beta</math>-amyloid peptide. <i>Neurosci Lett</i> 297:97-100</p>	<p>2001</p>		<p>Yasojima K, <u>Akiyama H</u>, McGeer EG, McGeer PL</p>
<p>Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in rat and human brain tissues. <i>Neurosci Lett</i> 297:105-108</p>	<p>2001</p>		<p>Hino H, <u>Akiyama H</u>, Iseki E, Kato M, Kondo H, Ikeda K, Kosaka K</p>
<p>Intracellular processing of aggregated tau differs between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. <i>NeuroReport</i> 12:935-938</p>	<p>2001</p>		<p>Arai T, Ikeda K, <u>Akiyama H</u>, Tsuchiya K, Yagishita S, Takamatsu J</p>
<p>Glial involvement in the degeneration</p>			

process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. J Neurol Sci 184:71-75	2001		Togo T, Iseki E, Marui W, Akiyama H, Ueda K, Kosaka K
Bunina body in frontal lobe dementia without clinical manifestations of motor neuron disease. Acta Neuropathol 101:281-284	2001		Uchihara T, Sato T, Suzuki H, Ikeda K, Akiyama K, Takatori T
Distinct isoforms of tau aggregated in neurons and glial cells in brains of patients with Pick's disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. Acta Neuropathol 101:167-173	2001		Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Shikamoto Y, Tsuchiya T, Yagishita S, Beach T, Rogers J, Schwab C, McGeer PL
Familial British Dementia: new evidence in the labyrinth of tangles and plaques? NeuroScience News 4(2):22-29	2001		Schwab C, Akiyama H,
Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. J Neuroimmunol 124:83-92	2002		Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Oda T, Tsuchiya K, Kosaka K
Pick-body-like inclusions in corticobasal degeneration differ from Pick bodies in Pick's disease. Acta Neuropathol 103:115-118	2002		Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Tsuchiya K