

ことが、PBDやCBDで明らかにされている。しかし、大脳皮質の病変分布が疾患によりある傾向をもっていれば、失語に関連する臨床像から病理像を類推できる可能性も期待される。図に示す2例の臨床診断はPick病、病理診断はいずれも典型的なCBDである。一方はnon-fluentのtranscortical motor aphasiaを呈し、前頭弁蓋を中心とした病変がある(図A, B)¹⁰⁾。他方は言語理解の障害からsensory aphasiaに至った例で、側頭葉前方に萎縮が強く(図C, D)、失語病型もそれに応じて異なる¹¹⁾。こうしてみると、進行性失語の病型から類推できるのは大脳皮質病変の分布に限られ、その根底にある病理診断を類推させる特徴を抽出するのはいまのところ困難に見える。しかし、独特の運動障害(CBD with aphasia)、運動ニューロン疾患の合併(motor neuron disease with aphasia)、人格や接触性の変化(Pick病: frontal lobe dementia with aphasia)など、失語以外の要素(PPA-plus syndrome)は病理像をも示唆する鑑別診断に役立つ場合がある⁴⁾。

大脳白質病変の関与

白質に注目してproton magnetic resonance spectroscopy(1H-MRS)を行うと、N-acetylaspartate値がPPA例ではADに比して有意に低下しており、特に左半球白質

での低下がより目立つという¹⁵⁾。この画像所見は、同部の軸索の病変がより強いことを反映しているとされる。確かにPBDやCBDでは大脳皮質病変に加えて、大脳白質にも広汎な病変がみられる場合があり(図E)、PPAの失語の成り立ちや病理像との関連を考える上で今後留意すべき点と思われる。

■ む す び

変性過程に伴う進行性失語が、ある時期比較的独立して臨床的に顕在化する場合に想定される病理学的背景は一部明らかにされつつあるが、病変の質と分布を規定している要素が何かという因子を同定するには至っていない。臨床像と病理像の関連を踏まえた上で病態を考えることが第一歩であるが、臨床像、病理像ともにheterogeneousな対象をどのようにとらえていくか、今後に残された問題である。

謝辞: 本稿をまとめるにあたり、都立松沢病院 土谷邦秋先生、東京都精神医学総合研究所 池田研二先生、秋山治彦先生、昭和大学精神科 三村 将先生、都立神経病院 水谷俊雄先生、東京都神経科学総合研究所 林 雅晴先生に貴重な資料を検索させていただく機会を与えていただきました。深謝致します。

文 献

- 1) Pick A. Ueber die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. Prager Med Wochenschr. 1892; 17: 165-7.
- 2) Assal G, Favre C, Regli F. Aphasie dégénérative. Rev Neurol. 1985; 141: 245-7.
- 3) Mesulam M-M. Slowly progressive aphasia without generalized dementia. Ann Neurol. 1982; 11: 592-8.
- 4) Mesulam M-M. Primary progressive aphasia. Ann Neurol. 2001; 49: 425-32.
- 5) Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al. Frontotemporal lobar degeneration—A consensus on clinical diagnostic criteria. Neurology. 1998; 51: 1546-54.
- 6) 櫻井靖久. 緩徐進行性失語. 老年精神医学雑誌. 1996; 7: 854-61.
- 7) Hauw J-J, Verny M, Delaère P, et al. Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. Neurosci Lett. 1990; 119: 182-6.
- 8) Tsuchiya K, Ikeda K, Uchihara T, et al. Distribution of cerebral cortical lesions in corticobasal degeneration: a clinicopathological study of five autopsy cases in Japan. Acta Neuropathol. 1997; 94: 416-24.
- 9) Uchihara T, Ikeda K, Tsuchiya K. Pick body disease and Pick syndrome. Neuropathology. 2003; 23: 318-26.
- 10) Mimura M, Oda T, Tsuchiya K, et al. Corticobasal degeneration presenting with nonfluent primary progressive aphasia: a clinicopathological study. J Neurol Sci. 2001; 183: 19-26.
- 11) Ikeda K, Akiyama H, Iritani S, et al. Corticobasal degeneration with primary progressive aphasia and accentuated cortical lesion in superior temporal gyrus: case report and review. Acta Neuropathol. 1996; 92: 534-9.
- 12) Tsuchiya K, Ozawa E, Fukushima J, et al. Rapidly progressive aphasia and motor neuron disease: a clinical, radiological, and pathological study of an autopsy case with circumscribed lobar atrophy. Acta Neuropathol. 2000; 99: 81-7.
- 13) Li F, Iseki E, Kato M, et al. An autopsy case of Alzheimer's disease presenting with primary progressive aphasia: a clinicopathological and immunohistochemical study. Neuropathology. 2000; 20: 239-45.
- 14) Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, et al. Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. Ann Neurol. 2004; 56: 399-406.
- 15) Catani, M, Piccirilli M, Cherubini A, et al. Axonal injury within language network in primary progressive aphasia. Ann Neurol. 2003; 53: 242-7.

特集 神経病理：最前線

封入体の神経病理

—蛋白沈着の疾患特徴的様式と萎縮・変性との関係—*

内原俊記**

神経疾患の形態的特徴は、蛋白の病的沈着・封入体形成と神経細胞の萎縮・変性の2つの側面に集約される。いくつかの遺伝子異常がこの両者を惹起することが知られているが、それぞれの過程や両者の関係は必ずしも明らかでない。封入体の構成蛋白の沈着過程をタウ蛋白を例に、変性における封入体の位置づけをCAGリピート病の核内封入体(NI)を例に示す。またこれらの検索に用いた多重染色法、三次元立体構築法、銀染色についても概観する。リン酸化に伴ってタウ蛋白が凝集する変性性タウオパチーとは異なり、リン酸化によらない conformational change に伴い、線維構造を欠くタウの沈着が起こり得ることを、脳梗塞と glial cytoplasmic inclusion を例に示した。タウエピトープの conformation は物理化学的環境により可逆的に変化し、この違いは疾患の種類や病変形成の時期に対応する異なる沈着様式を反映している可能性を示唆する。延長したポリグルタミン蛋白の発現は、NI形成と細胞変性の両者を惹起するが、NIを有する神経細胞の核断面積は有さないものに比して有意に大きいことが、CAGリピート病剖検脳では共通した特徴であることを示した。蛋白の病的沈着・封入体形成過程と細胞萎縮・変性過程は密接に関連しているが、必ずしも正の相関を持つとは限らない。両者をいったん独立したものとして解析した上で、その関係を改めて見直すことで、ヒト脳で起こっている病態を把握することができる。

キーワード：萎縮・変性・細胞死, conformation, 三重染色, 三次元再構成

はじめに

神経変性疾患は、進行性の神経細胞萎縮ひいては細胞死を共通の特徴とする原因・病態未解明の部分が未だに多い疾患群である。各疾患を区別する形態的特徴は、(1) 神経細胞萎縮・細胞死の時間・空間的パターン、(2) これと関連(時に独立)してみられる、病的沈着物や封入体の形成、に大まかに分けることができる。

神経変性の機序を、apoptosis 等の定型的な細胞障害パターンに還元した上で治療戦略を探る試みは研究の大きな潮流だが、異なる神経疾患にみられる細胞萎縮・細胞死の過程にかなりの共通部分があるのか、む

しろ疾患特異的部分が大部分を占めるのかは不明の部分が多い。これに対し、各種封入体の形成は疾患特異的と考えられる部分がより多く、診断上の形態的指標とされている場合も多い⁴⁹⁾が、細胞萎縮や変性とどのように関係しているかは必ずしも明らかでない。

本稿ではまず、タウ蛋白沈着の形態的側面を例に、病態との関連についてまとめる。その後、脊髄小脳変性症にみられる核内封入体を例にあげ、形態観察の技術的問題点も併せて考えてみたい。

2004年2月3日受稿

* Disease-specific patterns of protein deposition and their relation to neurodegeneration.

** 東京都神経科学総合研究所神経病理学研究部門(〒183-8526 東京都府中市武蔵台2-6) Toshiki UCHIHARA: Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan.

0001-8724/04/¥500/論文/JCLS

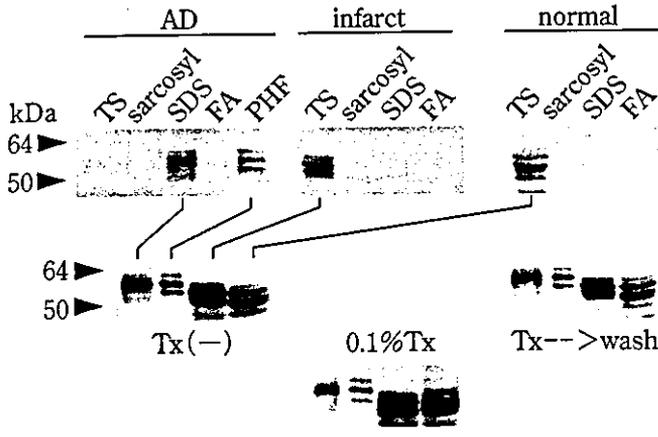


図1 脳梗塞のタウ蛋白はリン酸化を受けず、界面活性剤なしで可溶化される
 等量の凍結脳から順に Tris-buffered saline (TS), 1% sarcosyl/TS (sarcosyl), 2% SDS/TS (SDS), 蟻酸 (FA) 可溶性画分を採取し、別に採取した PHF 画分 (PHF) と泳動した。Alzheimer 病脳 (AD) では SDS 可溶性画分に集中する tau2 陽性バンドが、脳梗塞 (infarct) では正常 (normal) と同様 TS 可溶性画分であり、分子量の増加もない。これらの陽性画分に対する tau2 の反応性は界面活性剤の存在下 (0.1% Tx) で消失するが、界面活性剤暴露後洗浄する (Tx-->wash) と、再び観察される。また他の抗タウ抗体 (pool 2) に対する反応性は界面活性剤存在下 (0.1% Tx) でも保たれている (文献 54 より改変)。

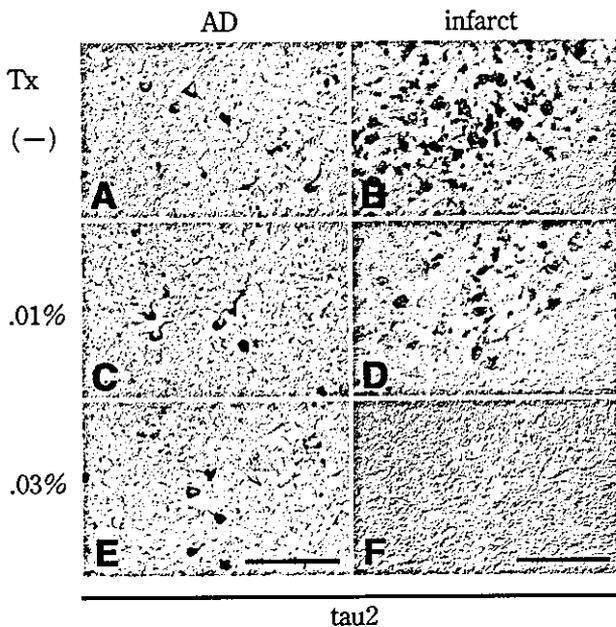


図2 固定標本上の tau2 免疫陽性像は界面活性剤により影響を受ける

Tau2 免疫原性は界面活性剤非存在下 Tx (-) では AD の神経原線維変化 (A), 脳梗塞巣のミクログリア (B) に同様に認められるが、界面活性剤の濃度が上昇するにつれミクログリアの陽性像は次第に減弱し (D), 0.03% の濃度では消失する (F)。同様の濃度では、神経原線維変化の tau2 免疫原性は保持される (C, E) [bar=100 μm (A, C, E), bar=50 μm (B, D, F), 文献 54 より改変]。

I. タウ蛋白の沈着から封入体形成まで

1. タウ蛋白の沈着と可視化の背景にある病的修飾

アルツハイマー病 (AD) のタウ蛋白は、リン酸化等の病的な修飾を受けて沈着し、神経原線維変化 (NFT) 等の疾患特異的病変を形成するとされ、固定標本の免疫組織化学的検出は容易である^{6,17)}。一方、タウ蛋白は

正常脳にも存在し immunoblot で検出可能だが、正常脳の固定標本を用いた免疫組織化学での検出は通常、困難である。正常脳に存在するタウ蛋白は immunoblot 上で Tris-可溶性画分に主に認められ、SDS 可溶性画分に主にみられる AD とはその生化学的性質が異なるが、immunoblot では両者に含まれるタウ蛋白の総量に大きな違いはないように見え、総タウ蛋白の含有量の差だけで免疫組織化学所見の陽性、陰性を説明するのは難しいように思われる (図 1)⁵⁴⁾。このことは免疫組織化学的にタウエピトープが可視化され得るには、その発現量と抗体への親和性のみでは説明できない要素があることを物語っている^{31,40)}。AD 脳のタウ蛋白はリン酸化等の病的修飾を受けて線維化し、これに伴って免疫組織化学的に可視化できるようになるとされている。とすれば正常脳に存在するタウ蛋白が免疫組織化学的に可視化し難いのは、何らかの病的修飾を欠くことと関連している可能性が考えられる。

一方、脳梗塞脳において、神経細胞は Alz50 陽性⁶¹⁾、梗塞巣周囲のミクログリアは tau2 陽性^{35,62)}となる。脳梗塞巣を immunoblot で検索すると (図 1), タウ陽性バンドは正常脳と同じ Tris 可溶性画分にみられ、その分子量も正常と区別できず AD 脳でのようなリン酸化は受けていない。同様のタウ蛋白の沈着は、multiple system atrophy (MSA) に特徴的とされる glial cytoplasmic inclusion (GCI) にも tau2 抗体を用いて明らかにできる⁴⁴⁾。

2. Reversible conformational change

それでは脳梗塞脳のミクログリアと GCI に共通してみられる tau2 エピトープの可視化に、どのような過程が関連しているだろうか。Tau2 抗体を界面活性剤存在下で反応させると、その免疫原性が immunoblot 上では消失してしまうことを見出した (図 1 中段)。固定

切片上で観察すると、これらの glia の tau2 陽性像は同様に界面活性剤存在下で同様に消失するが (図 2D, F), AD の NFT では界面活性剤に抵抗性を示し、一定の濃度までは tau2 陽性像を保持する点で、脳梗塞のミクログリアや GCIIs とは異なる (図 2C, E)^{44,54}。また界面活性剤暴露により、いったん消失した (図 3B) tau2 免疫原性は、暴露後界面活性剤を含まない緩衝液で洗浄すると、再び認められるようになる (図 3C, D)。Tau2 エピトープは、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列では 101 番目の proline 付近にあり、この proline が病的修飾に伴って serine 様の conformation²⁹⁾をとることで、tau2 抗体に対する親和性を著しく増すという⁶⁴⁾。ヒトで 101 番目の proline は、ウシタウ蛋白では Serine にあたり、ウシのタウ蛋白を抗原として作成された tau2 抗体がこの Serine そのもの、または Serine 様の conformation に強い親和性を有することも理解できる。この変化は AD でタウ蛋白のリン酸化に伴って起こるとされているが、脳梗塞^{22,54)}や MSA 脳⁴⁴⁾では、リン酸化に準じる生化学的変化は通常の immunoblot で観察する限り認められないので、タウ蛋白の修飾がリン酸化を介さずに tau2 エピトープの conformation を変化させると推測される。これらリン酸化を伴わないタウ蛋白の沈着は、タウ蛋白からなる線維構造を形成していない点ばかりでなく、他の抗タウ抗体による免疫原性が固定組織標本で見られない点でも共通しており、タウ蛋白沈着後、線維形成に至る前の初期の段階を表している可能性がある (図 4)。

タウ蛋白は、それを対象とした抗体が最も数多く作成されている分子の 1 つである。そのエピトープに対する反応性に基づいて Carmel ら⁷⁾は、タウ抗体を以下の 3 種類に分類している。

1) タウ蛋白の部分のアミノ酸一次配列によつての

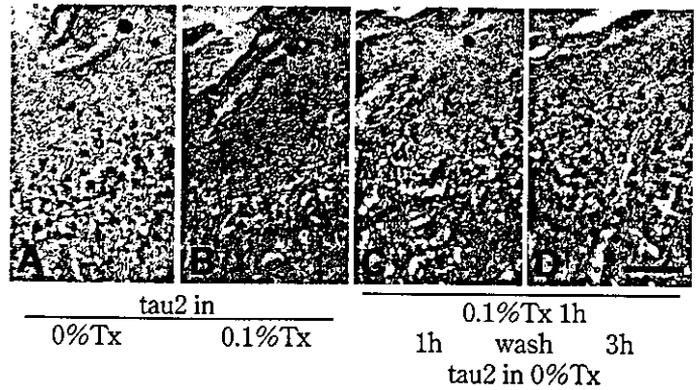


図 3 界面活性剤で消失した tau2 陽性像は洗浄後復元する

脳梗塞巣のミクログリアにみられる tau2 陽性像 (A) は、界面活性剤で preincubate すると消失する (B : 0.1%Tx) が、その後界面活性剤を含まない緩衝液で 1 時間洗浄 (C : 1h) 後、免疫染色すると再び可視化でき、3 時間の洗浄 (D : 3h) ではさらに明瞭になる (Bar=50 μm, 文献 54 より改変)。

み、その親和性が規定されている抗体。

- 2) タウ蛋白のリン酸化によって、その親和性が著しい影響を受ける抗体。
- 3) タウ蛋白の conformation (リン酸化による変化を除く) によって、その親和性が著しい影響を受ける抗体。

面白いことに、脳梗塞や MSA 脳の glia を染色する tau2 や脳梗塞の神経細胞を染色する Alz50 は、いずれも上記の 3 に分類されている。固定した脳標本で免疫組織化学的にタウ陽性像を観察する場合に、用いる抗体が上記にどのような性質を持つかを解釈に含めることが可能になるとと思われる。Josephsen らは、vimentin に対するモノクローナル抗体の 1 つが vimentin と相同性がなく、分子量も異なる amelogenin

図 4 Tau2 エピトープの conformational change

Tau2 抗体が親和性をもつエピトープは 101 番目のプロリン (P101) 付近にあり、AD ではタウ蛋白がリン酸化されるとともに、このアミノ酸が serine 様の conformation をとり、ウシタウ蛋白の相同部分 (Ser101) に類似するとされている。脳梗塞巣固定標本上のタウ蛋白は同様の conformation をとっているが、界面活性剤の存在下 (Tx+) では conformation が変化し、tau2 抗体への親和性を失う。これに対して AD の神経原線維変化では conformation の変化が起こりにくく、界面活性剤の存在下でも tau2 への親和性が保たれる点で異なる。

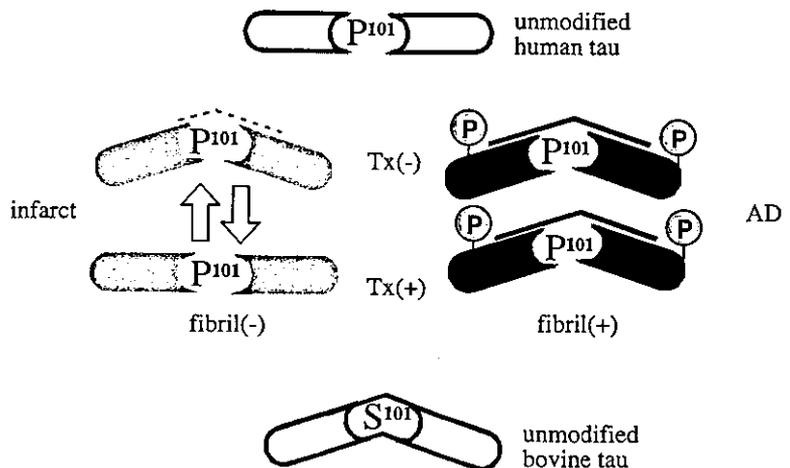
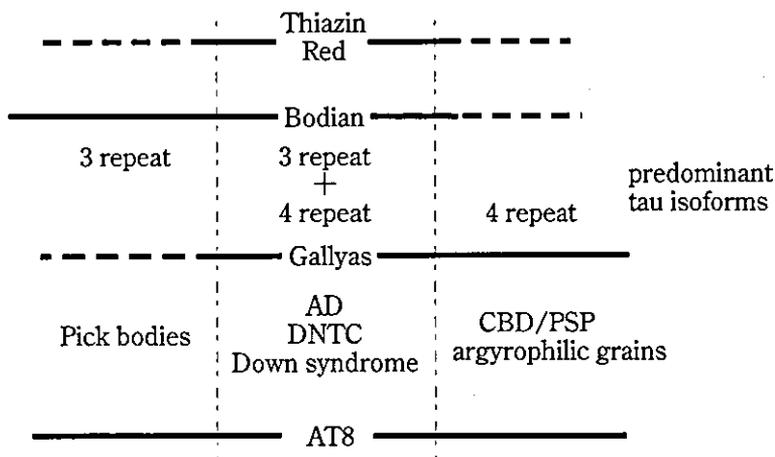


図5 変性性タウオパチーのタウ isoform による分類と染色特性の疾患による違い

4リピートタウが主に沈着する corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP), argyrophilic grains のタウ陽性構造物は Gallyas 染色により明瞭に染色されるが, Bodian 染色による染色性は乏しい。3リピートタウが主に沈着するピック小体 (Pick body) は Bodian 染色により明瞭に染色されるが, Gallyas 染色による染色性は逆に乏しい。両方の isoform が沈着する AD, diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNTC), Down syndrome では両方の染色法により明瞭に染色される。この群は沈着したタウの線維形成傾向が顕著で, これに親和性を持つ蛍光色素 thiazin red に対する親和性も顕著である。



を固定液暴露後に認識することを, 免疫電顕および Western blot で示した²⁴⁾。抗体が認識する限局したエピトープの conformation が, アミノ酸配列の全く異なる2つの分子で類似し, 固定液への暴露等によってさらに変化することを示唆している。モノクローナル抗体が限局したエピトープの conformation を認識している場合, その conformation が物理化学的条件によって変化し, 抗体に対する親和性も変化し得るのは tau や vimentin に限らず, conditional epitope と呼ぶ場合がある⁶⁵⁾。

3. 沈着から線維形成へ

免疫組織化学的に可視化されるように修飾されてタウ蛋白は沈着すると考えられるが, その沈着様式は疾患により異なり, 同じ疾患では病期によっても異なる¹⁶⁾。疾患特異的なタウエピトープを同定しようとする試みは繰り返して行われてきたが, 単一のエピトープに対する免疫組織化学のみでタウ蛋白の沈着を特徴とする病変を疾患特異的に分類しえると広く認められた方法は, 今のところ確立されていない。病変の構造を観察するために, 以前から蛍光色素 (thioflavin, Congo red, thiazin red) が用いられてきた。蛍光色素の一部は, 形成された β -sheet 構造に基づく線維構造に強い親和性を有し, 線維構造をとる老人斑や NFT を比較的明瞭に可視化することができる³²⁾。線維構造に親和性を有する蛍光色素である thiazin red (TR) と抗 PHF タウ抗体 (AT8) を用いた二重染色を行うと, リン酸化タウの沈着と線維形成の関係に疾患ごとの特徴があるかどうかを定量的に観察できる⁵⁷⁻⁵⁹⁾。大脳皮質にみられるリン酸化タウ陽性神経細胞は AD 脳, diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNTC) の大脳皮質では TR 陽性で明瞭な線維構造をとるが, 大脳皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration : CBD) では TR 陽

性神経細胞は稀で, リン酸化タウの沈着が直ちに NFT 形成に繋がるとは限らないことを示している。Banerjee らは, AD 脳海馬にみられるこのような沈着を pretangle neurons として記載し, NFT 形成の前段階と考えた³⁾。しかし CBD 脳では神経細胞内のタウ沈着が線維形成に至らないまま, とどまっている部分が多いとも解釈でき, 今後両者にみられるタウ蛋白沈着の分子機構の違いを, 線維形成に至るか否かという観点から捉え直すことを通して, タウ蛋白の沈着が NFT 形成に至る過程をヒト脳で明らかにすることが期待される。

4. 銀染色からみたタウ陽性沈着物の特徴

神経免疫組織化学は, 対象とするエピトープを限定することによってその特異性を確保しているが, 対象エピトープのみに病変を代表させ, それ以外の要素をいったん全て無視する方法論ということもできる。一方, 銀染色は病変の最初の記述の際, 抛り所とされた歴史的スタンダードであり, 病理診断を進める上でも限られたエピトープの陽性像のみを抛り所とせざるを得ない免疫組織化学とは, 異なる利点もあることを忘れるべきではない²⁾。銀染色による陽性像は一般に「嗜銀性」という言葉でひとくくりにされることが多いが, その染色機序について解明されている部分は限られている^{15,21)}。たとえば NFT を観察するのに頻用される Gallyas 染色^{14,21)}は, Bodian 染色¹⁵⁾に比して一見より多くの病変を描出しているように見え, 嗜銀性構造物を捉える感度がより高いという印象を与えることが多い²⁸⁾。しかし, リン酸化タウを含むピック小体 (Pick body : PB) は逆に Bodian 染色で良好に染色され, Gallyas 染色には染色されにくい⁴⁹⁾。とすると両染色の違いは感度の差にとどまらず, 対象とする構造物の性質をある程度反映していると考えられることができる。図

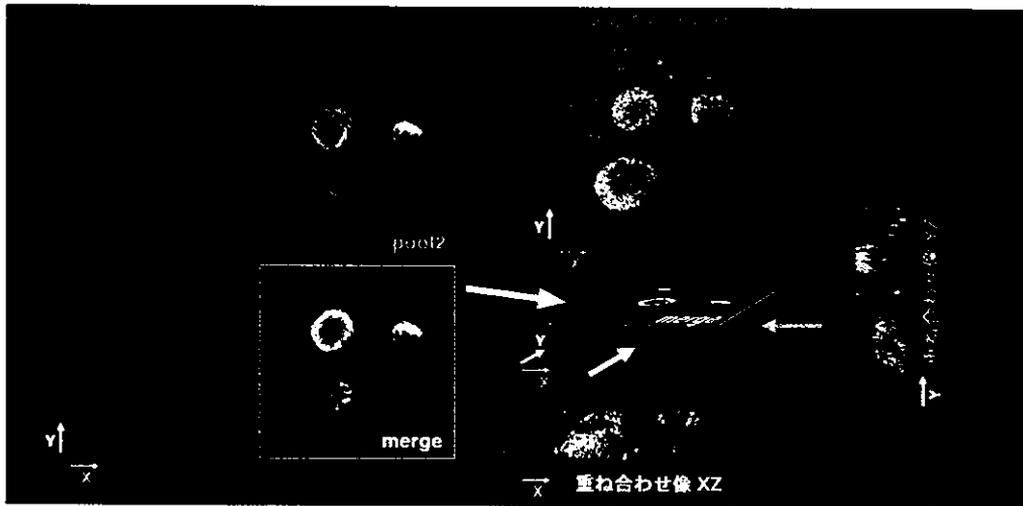


図6 三重蛍光染色によるピック小体内の異なるタウエピトープの分布と三次元再構成
3種類の異なる抗タウ抗体で蛍光三重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(緑: AT8, 赤: pool2, 青: Alz50)。リン酸化された PHF-tau に親和性を有する AT8 は、ピック小体の周辺に集積している。三重染色合成像 (merged image) を Z 軸に沿って 0.1 ミクロンごとに撮像し、183 枚を重ね三次元立体構成した。撮像軸 Z とは異なる方向 (X 軸, Y 軸) からの立体像の観察も可能である。

5 はタウ陽性構造物とする疾患の神経細胞を、Bodian 法と Gallyas 法の染色性によって大別したものである。面白いことに、4 リpeat タウの沈着が主と考えられている CBD, 進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP), argyrophilic grains では Gallyas 染色に陽性となり、Bodian 染色に染まりにくいのに対し⁵³⁾, 3 リpeat タウの沈着が主体と考えられているピック小体は、Gallyas 染色よりも Bodian 染色に陽性となりやすいという違いがある⁴⁹⁾。3 リpeat, 4 リpeat タウの両方が沈着している AD, ダウン症候群, DNTC では、両者の染色が明瞭に陽性となる。4 リpeat タウからなる沈着物に Gallyas 陽性像が、3 リpeat タウからなる沈着物に Bodian 陽性像が大まかに対応しているとすれば、これらの染色特性は説明しやすい⁴⁹⁾。今後、疾患や染色法の範囲を拡大してこの関係をさらに検討するとともに、タウ isoform に特異的抗体等を用いて¹¹⁾, 各々の銀染色の機序を対象分子の生化学的変化と対応させることができれば、別の視点から沈着様式を捉える方法となる可能性がある。

II. 立体観察と多重染色

1. 三次元的に封入体を捉える

これまでの病理形態学の多くは、薄切した二次元標本をもとに対象の形態を把握しようとするものである。蛍光多重染色を用いて、対象全体が含まれる切片を染色すると、蛍光顕微鏡で立体像を観察できる^{51,52)}。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いると、標本のある

深さに限局した範囲に対応する、光学的切片像を得ることができる。観察対象とする病変の全体にわたってこの光学的切片像を一定の間隔で撮影することができれば、三次元立体構成に用いることのできる二次元画像のシリーズを容易に得ることができる。図6左は海馬の PB をタウ蛋白の異なるエピトープを認識する3種類の抗タウ抗体を用いて多重染色したものである。これを XY 平面とした光学的連続切片を、この平面に直行する Z 軸に沿って 0.1 ミクロン間隔で 183 枚撮像して、三次元的に再構成したものが図6右である。XY 平面の解像度も 0.1 ミクロンとなっており、XYZ 方向それぞれ 0.1 ミクロンの立方体を voxel 単位とする三次元像が再構成されたことになる。画像シリーズ全体の voxel 数は $512 \times 512 \times 183 = 47,972,352$ となり、それぞれの voxel が RGB 各 8bit の 24 bit color の情報を有するため、全体のファイルサイズは約 150 MB となる。いったんコンピュータ上に画像情報が展開されると、任意の方向から対象を観察、切断して観察することが可能となる。こうして観察すると、PB 内でのタウエピトープの局在は一様でなく、抗 PHF タウ抗体である AT8 エピトープは、PB の周囲に強調される形で集積していることがわかる⁴⁹⁾。Bodian 染色で観察する PB はその周辺で嗜銀性が高く、この部分には線維状の構造物が集積しているという報告もあり³⁷⁾、特定のタウエピトープに影響を及ぼすタウ蛋白の変化と線維構造の形成、嗜銀性が関連していることが示唆される。

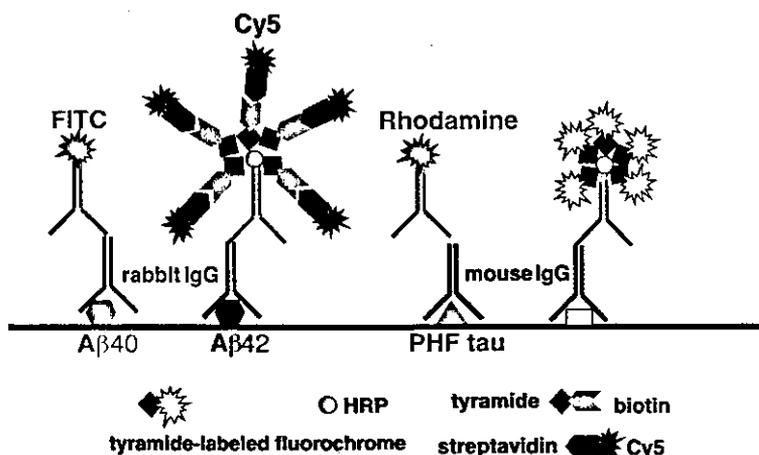


図7 tyramideを用いた、免疫蛍光増感法と多重染色への応用
 二次抗体にラベルされた horseradish peroxidase (HRP) 周囲に tyramide が集積することを利用して、蛍光シグナルを増感する。
 1) tyramide にあらかじめ biotin を結合させ、streptavidin に結合させた蛍光色素を可視化する (Aβ42-Cy5), 2) tyramide に直接蛍光色素を結合させておいて HRP を可視化する方法がある。1), 2) の方法は二次抗体までの交差がなければ共存させることができ、2つの異なるエピトープを同一標本上で増感可能である。増感により一次抗体を通常の10倍以上希釈できるので、蛍光色素をラベルした二次抗体を用いる通常の方法では希釈しない抗体のみ選択的に可視化する。この濃度差を利用すれば同じ動物種由来の2種類の一次抗体 (例えば2種類の rabbit polyclonal 抗体) であっても二重染色が可能である。

2. さらなる技術的改良

PBのように比較的小さな構造物を、上記のように比較的力価の高い抗タウ抗体を組み合わせると蛍光染色する場合、標本全体にわたって強い蛍光シグナルを得るのは容易で、三次元再構築に必要な連続像を得ることもそれほど困難ではない。しかし、対象とする構造が大きい場合は、より厚みのある切片を用いないと対象全体を観察できない。厚みのある標本を通り抜けて明瞭な画像を結ぶに十分な蛍光強度を得る必要がある場合や、用いる一次抗体の力価がそれほど高くない場合、シグナルの増感を行うことで問題を解決できる場合がある。Tyramide は過酸化水素の存在下で horseradish peroxidase 周囲に集積するという性質がある⁴⁾。あらかじめ tyramide に蛍光色素やビオチンを結合させたものを用意し、二次抗体にラベルした HRP と反応させると、シグナルを大幅に増感できる¹⁾。また tyramide でシグナルを増幅すると一次抗体をさらに10倍以上希釈できる⁵⁵⁾、この希釈された一次抗体は蛍光色素をラベルした二次抗体を用いた通常の間接蛍光抗体法では、その検出閾値を下回っているため可視化できない。この検出閾値の差を利用すると、同種動物で

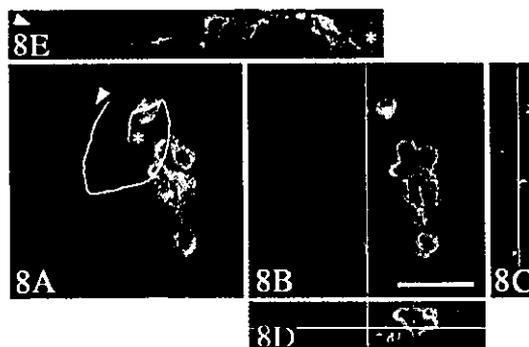


図8 アルツハイマー病脳における Aβ40, 血管, neuropil threads の三次元的関係

抗 von Willebrand factor 抗体 (青 rabbit polyclonal, biotinylated tyramide に増感し、Cy5 で可視化), 抗 Aβ40 抗体 (緑 rabbit polyclonal, FITC でラベルした二次抗体で可視化), 抗 PHF-tau 抗体 (赤 mouse monoclonal, Rhodamine でラベルした二次抗体で可視化) を用いて 50μm 厚の浮遊切片を免疫蛍光三重染色した。得られた共焦点画像 (B) を 0.3 μm ごとに取り込み、112 枚の光学的連続切片を得た。これらをコンピュータ上で再構成した (A)。再構成データからは任意の XY 切片像 B (C, D 上に白線で示した位置), XZ 切片像 D (B, C 上に赤線で示した位置), YZ 切片像 C (B, D 上に黄線で示した位置) のみならず、血管のような任意の構造物に添った断面像 E (得られた断面の位置は A 上に矢頭-星印の白線で示す) を得ることができる。血管の周囲に Aβ40 が沈着していることが明瞭に示される (文献 56 より改変)。

作成された異なる一次抗体 (例えば2種類の rabbit polyclonal 抗体) を用いる二重染色が比較的容易に可能となる¹⁹⁾。こうして実現された二重染色にさらに別種動物で作成された一次抗体 (mouse monoclonal) を組み合わせると、三重染色も容易に実現できる (図7)³⁴⁾。図8は cotton wool plaque を有する例の血管 (抗 von Willebrand factor, rabbit polyclonal, 青), Aβ40 (rabbit polyclonal, 緑), PHF-tau (AT8, mouse monoclonal, 赤) で三重染色したものである⁵⁶⁾。Polyclonal 抗体相互の cross reaction は、その一方を tyramide を用いて増感することで回避できている。さらにこの三重染色像を 0.3 ミクロン間隔で取得し、全体でミクロンに及ぶ立体構造を観察した。これらの画像情報をコンピュータ上に展開したのち、血管に沿った (図8A 白線) 断面を観察することにより、Aβ40 が血管周囲に集積していることが明確になる (図8E)。最近では、さらに蛍光

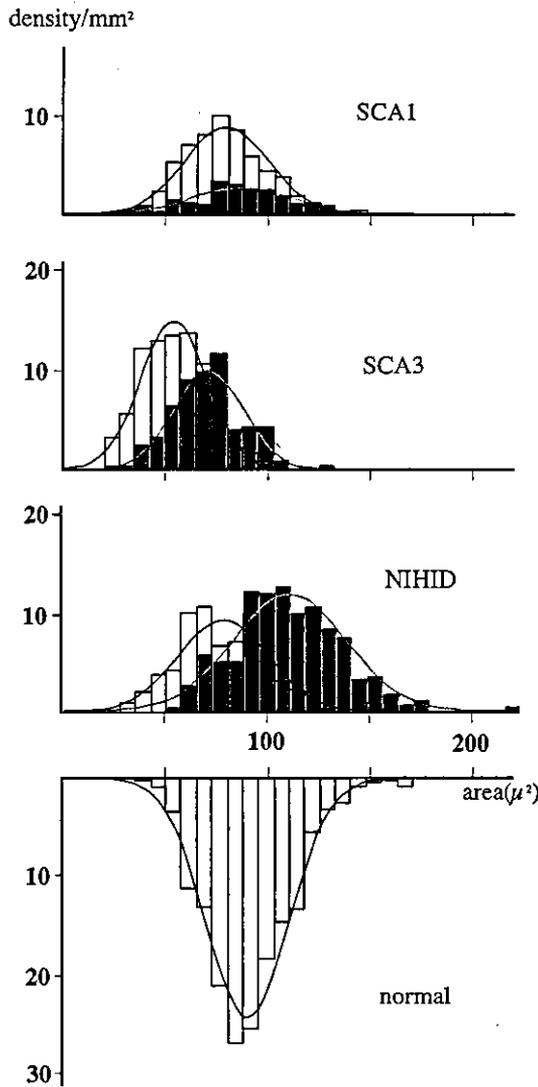


図9 核内封入体を有する神経細胞核の断面面積は有しないものに比して大きい。橋切片の神経細胞を核内にユビキチン陽性封入体(NI)を持つものと持たないものに分け、個々の細胞核の断面面積を測定した。NIを持つ群(灰色ヒストグラム)は持たない群(白抜きヒストグラム)に比していずれの疾患でも大きい点で共通していた(文献33, 50, 60より改変)。

強度の強い物質が用いられるようになっている^{5,8,23)}。画像の撮影に関しては、多光子励起によるレーザーが次第に普及してきた。レーザー光が標本の全体を貫通してしまうこれまでのシステムに比較し、三次元的に広がる空間の1点のみをpin pointで励起することが可能である。従来の方法に比して、標本のより深い位置まで励起光が到達するばかりでなく、取得する画像面以外にはレーザー光が当たらないため、退色やbackground signalが最小限におさえられ、光学的連続切片を得る上で大変有利な方法となることが期待される。

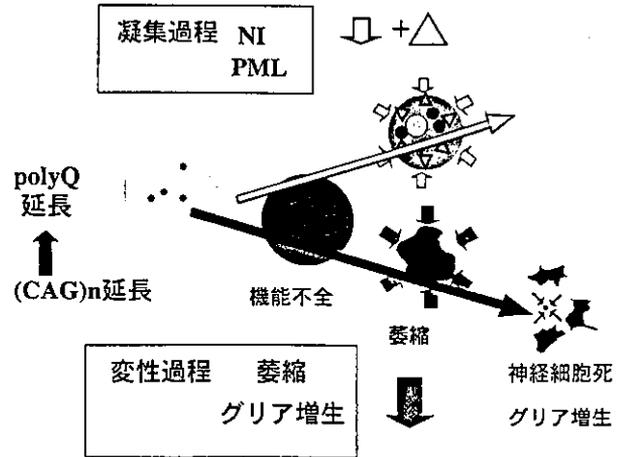


図10 CAGリピート病の封入体凝集過程と神経細胞核萎縮との関係

正常の神経細胞が次第に機能不全、萎縮(灰色矢印)を経て細胞死に至る(黒矢印)。核内封入体を有するものは萎縮の程度が軽く(白矢印)、核内のPMLbody(黒丸)は封入体の形成に伴い次第に大きくなる。あるいは萎縮に拮抗する機構が働いている(白矢頭)可能性もある。

III. 核内封入体の意義付け

1. 遺伝子学から予想された仮説

遺伝性疾患の表現型と高い確率で関連を持つ遺伝子変異が、多くの優性遺伝性の脊髄小脳変性症でも次々と報告されてきた。その翻訳領域にCAGの繰り返し配列(CAGリピート)を持ち、その繰り返しの延長が表現型と関連するという共通性を持つ一群の疾患が、CAGリピート病と総称されている。CAGリピート部の翻訳産物はグルタミンの連鎖(polyQ)となるが、これらの疾患の大部分は、神経細胞の核内にユビキチン陽性の封入体(nuclear inclusion: NI)を有することも共通しており、遺伝子異常、延長したpolyQ、NI形成を背景とする共通の変性機序がこれらの疾患には想定されている。延長したpolyQ鎖を含む遺伝子産物がNIには局在することも明らかにされ³⁸⁾、CAGリピート病ではNI形成を通じて細胞死が誘導されるのではないかという仮説が、当初支配的となった。延長したCAGリピートを持つ遺伝子断片を強制発現させると、封入体様の構造物が誘導され、細胞死も起こるとの観察が細胞や動物モデルで次々と報告された^{20,36)}。これらポリグルタミン蛋白の生理的機能について解明されている部分は限られるが、NIには延長したポリグルタミン蛋白以外にも、延長しないポリグルタミン蛋白が局在している^{30,39,47,48)}。例えば、SCA3脳にみられるNIにataxin3が局在するのはもちろんだが¹²⁾、TATA

binding protein や ataxin2 など CAG リピートに延長のない、他の正常ポリグルタミン蛋白もより低い頻度で局在する⁴⁸⁾。逆に ataxin3 はリピート部に延長がなくても SCA1, SCA2 等、他の CAG リピート病脳の NI や⁴⁸⁾ CAG リピートとは直接関係なく形成された核内封入体である Marinesco 小体に高頻度で局在する¹³⁾。延長のない ataxin3 は通常細胞質に局在するが、NI 形成に共通する過程に密接に関連して核内に移行し、NI 形成に関与するものと推察される。したがって、ataxin3 は SCA3 以外でみられる NI にも非特異的に局在し、それが SCA3 の特異的診断には結びつかない点、注意を要する。

こうして形成された NI と萎縮・変性の関係をヒト脳で検索するため、比較的封入体の出現頻度が高く、細胞の大きさがそろっている橋核神経細胞を用いて、神経細胞核の断面積と NI との関係について、これらの疾患で定量的な検索を行った(図9)。核の断面積は正常に比してこれらの疾患では有意に小さいことが SCA1³³⁾、SCA3⁵⁰⁾ や同様の NI を持つ NIHID (neuronal intranuclear hyaline inclusion disease)⁶⁰⁾ でも同様であった。しかしユビキチン陽性を指標として、NI を有する核と有さない核に分けて核の断面積を比較すると、これらの疾患全てで NI を有する群(図9 灰色ヒストグラム)の断面積は、有さない群(図9 白抜きヒストグラム)に比して有意に大きく^{33,50)}、NIHID では正常対照をも上回っていた⁶⁰⁾。同様の傾向は DRPLA 脳でも報告されており⁴⁵⁾、Huntington 病脳でも NI と変性の程度が相関しないことが知られている²⁶⁾。もし細胞萎縮・細胞死に促進的に働く機構と NI 形成が関連していれば、NI を有する細胞は萎縮がより強いことが期待される。ヒト脳での所見は逆で、NI を有する細胞の萎縮の程度はむしろ軽いことが疾患によらず共通している(図10)。またこれらの疾患では、小脳プルキンエ細胞に変性がある点でも共通している。そこで小脳プルキンエ細胞での核内封入体の有無をユビキチン、ポリグルタミン(1C2)の免疫染色標本を用いて網羅的に観察した。意外なことに、SCA1, SCA2, SCA3, DRPLA のいずれの疾患でも小脳プルキンエ細胞には NI を認めず、細胞萎縮・細胞死は NI が形成されなくても起こり得ると考えられる²⁵⁾。もし NI の形成が萎縮を軽減する方法に作用する機序と関連を持つとすると^{9,10)}、NI が形成されないプルキンエ細胞では、萎縮・変性がことさら強調されるとの解釈も可能となる。延長した CAG リピートを有する huntingtin を導入することで、NI を形成させた培養細胞では、NI 形成と細胞死は逆相関の関係にあるとする報告⁴³⁾等をふまえる

と、NI 形成と細胞萎縮・細胞死の関係は、当初の仮説では説明できない側面があることは明らかで、細胞モデル、動物モデルがヒト神経疾患の実際の病態のどの側面を反映しているのかを見極めたうえで、治療的側面を含めて今後推論を進める必要がある。

2. 関連分子の役割について (promyelocytic leukemia protein を例に)

NI の形成と細胞萎縮・細胞死は、ヒト脳では必ずしも並行して起こらないとすると、両者の関係を規定している機序は何かが問題となる。Promyelocytic leukemia protein (PML) はその発現が細胞死を惹起し得るばかりでなく^{41,63)}、NI にも局在する⁶⁶⁾ことから、NI 形成を通して細胞死につながるのではないかとの推論がされてきた。正常では微細な顆粒状の核内構造である PML body が CAG リピート病脳では、確かに次第に大きく凝集し、NI の一部に局在する⁴⁶⁾。類似のユビキチン陽性封入体で、黒質の神経細胞にみられる Marinesco 小体に注目して PML の変化をユビキチンとの関連で定量的に検討してみると、ユビキチン陽性構造物が核内で次第に大きさを増すにつれ、PML も次第に大きくなることが明らかになった²⁷⁾。Marinesco 小体の形成は老化¹⁸⁾、肝性脳症¹³⁾、筋緊張性ジストロフィー²⁷⁾等にみられるが、細胞死を伴わない点は上記の疾患で共通している。したがって PML の変化は NI の形成につれて起こる現象であり、必ずしも細胞死や細胞萎縮には関連しない場合もヒト脳ではみられる。プルキンエ細胞では PML の分布形態や大きさは、正常と比較しても有意な差がないことは SCA1, SCA2, SCA3, DRPLA に共通する所見であることも明らかにした。すなわち細胞変性は起こるが、NI は形成されないプルキンエ細胞では PML の変化もみられない。とすれば、PML の変化は NI の形成に関連し、細胞死や変性との関連については一定しないと、ヒト剖検脳の所見からは考えたほうがよさそうである。

おわりに

蛋白の発現、修飾を経て分子が沈着し、封入体が形成される過程は、疾患により様でないことを tau 蛋白の沈着を例にあげて示した。沈着したタウ蛋白の線維化を観察する手法は、Lewy 小体⁴²⁾等にも応用可能であり、今後疾患の範囲を拡大して病変の形成過程を観察していくことにより、対象蛋白の沈着様式の疾患特異性を明らかにできると思われる。

CAG リピート病に共通する病的過程を包括的に説明しえる仮説は、いまだに統一的なものがない。特に変性の根幹となる神経細胞萎縮、神経細胞死と封入体

やそれを構成する分子との関連を推論する場合は、ヒト脳での沈着様式と細胞萎縮、細胞死との関係を観察することになるが、その観察の枠組みによって、導かれる結論は大きく異なる場合があることも十分注意すべきと思われる。細胞・動物モデルが仮説から演繹的にデザインされた場合、仮説を裏付ける結果がより正しいと感じられるのは当然のことであるが、ヒト脳にみられる所見をもその仮説が説明し得るかどうかは、次元の異なる問題と考える。封入体の形成過程と細胞萎縮・変性過程が密接に関連していることは論をまたないが、より合理的な診断、治療を目指してヒト脳の病態を把握するには、両者をいったん分離して解析した上で、その関係をあらためて問い直すのも一つの姿勢ではないかと思われる。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、東京医科歯科大学脳神経機能病態学(神経内科)教授 水澤英洋先生、都立松沢病院検査科病理 土谷邦秋先生、東京都精神医学総合研究所老年精神 新井哲明先生、池田研二先生、神奈川県リハビリテーションセンター 岩淵潔先生(現山手訪問診療所)、渋谷克彦先生、柳下三郎先生、東京都神経科学総合研究所脳構造 石塚典生先生に貴重なご意見をいただきました。この場を借りて深謝いたします。

本項で用いた染色標本の大部分は、東京都神経科学総合研究所神経病理 中村綾子技術員により作成されたものです。本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金基盤(B)の支援を受けています。

文 献

- Adams JC : Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40 : 1457-1463, 1992
- Alzheimer A : Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschr Ges Neurol Psychiatrie* 4 : 356-385, 1911
- Bancher C, Brunner C, Lassman H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seiterberger F, Grundke-Iqbal I, Wisniewski HM : Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 477 : 90-99, 1989
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ : Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125 : 279-285, 1989
- Bruchez Jr. M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alvisatos AP : Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281 : 2013-2016, 1998
- Buée L, Bussièrre T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR : Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 33 : 95-130, 2000
- Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J : The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 51 : 32789-32795, 1996
- Chan WCW, Nie S : Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 281 : 2016-2018, 1998
- Cummings CJ, Mancini MA, Antalfy B, DeFranco DB, Orr HT, Zoghbi HY : Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nature Genetics* 19 : 148-154, 1998
- Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, Antalfy B, Jiang Y-H, Ciechanover A, Orr HT, Beaudet AL, Zoghbi HY : Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Cell* 24 : 879-892, 1999
- de Silva R, Lashley T, Gibb G, Hanger D, Hope A, Reid A, Bandopadhyay R, Utton M, Strand C, Jowett T, Khan N, Anderton B, Wood N, Holton J, Revesz T, Lee A : Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new sepcific monoclonal antibodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29 : 288-302, 2003
- 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 : Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol* 165 : 248-256, 2000
- Fujigasaki H, Uchihara T, Takahashi J, Matsushita H, Nakamura A, Koyano S, Iwabuchi K, Hirai S, Mizusawa H : Preferential recruitment of ataxin-3 independent of expanded polyglutamine : an immunohistochemical study on Marinesco bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71 : 518-520, 2001
- Gallyas F : Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Scient Hung* 19 : 1-8, 1971
- Gambetti P, Autilio-Gambetti L, Papasozomenos SC : Bodian's silver method stains neurofilament polypeptides. *Science* 213 : 1521-1522, 1981
- Ghoshal N, Garcia-Sierra F, Wu J, Leurgans S, Bennett DA, Berry RW, Binder LI : Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 177 : 475-493, 2002
- Goedert M, Spillantini MG, Davies SW : Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology* 8 : 619-632, 1998
- 平井俊策 : 老人性脳退行変性の組織化学—黒質の老化を中心として—。 *神経進歩* 12 : 845-849, 1968
- Hunyaday B, Krempels K, Harta G, Mezey É : Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its amplification in double immu-

- nostaining. *J Histochem Cytochem* 44 : 1353-1362, 1996
- 20) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A : Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death *in vitro* and *in vivo*. *Nature Gen* 13 : 196-202, 1996
 - 21) Iqbal K, Braak E, Braak H, Zaidi T, Grundke-Iqbal I : A silver impregnation method for labeling both Alzheimer paired helical filaments and their polypeptides separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Neurobiol Aging* 12 : 357-361, 1991
 - 22) Irving EA, Yatsushiro K, McCulloch J, Dewar D : Rapid alteration of tau in oligodendrocytes after focal ischemic injury in the rat : involvement of free radicals. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 612-622, 1997
 - 23) Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, Simon SM : Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotech* 21 : 47-51, 2003
 - 24) Josephsen K, Smith CE, Nanci A : Selective but nonspecific immunolabeling of enamel protein-associated compartments by a monoclonal antibody against vimentin. *J Histochem Cytochem* 47 : 1237-1245, 1999
 - 25) Koyano S, Iwabuchi K, Yagishita S, Kuroiwa Y, Uchihara T : Paradoxical absence of nuclear inclusion in cerebellar Purkinje cells of hereditary ataxias linked to CAG expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73 : 450-452, 2002
 - 26) Kuemmerle S, Gutekunst C-A, Klein AM, Li X-J, Li S-H, Beal MF, Hersche SM, Ferrante RJ : Huntingtin aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol* 46 : 842-849, 1999
 - 27) Kumada S, Uchihara T, Hayashi M, Nakamura A, Kikuchi E, Mizutani T, Oda M : Promyelocytic leukemia protein is redistributed during the formation of intranuclear inclusions independent of polyglutamine expansion : an immunohistochemical study on Marinesco bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 61 : 984-991, 2002
 - 28) Lamy C, Duyckaerts C, Delaère P, Payan C, Fermanian J, Poulain V, Hauw JJ : Comparison of seven staining methods for senile plaques and neurofibrillary tangles in a prospective series of 15 elderly patients. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15 : 563-578, 1989
 - 29) Lang E, Otvos L : A serine->proline change in Alzheimer's disease-associated epitope tau2 results in altered secondary structure, but phosphorylation overcomes the conformational gap. *Biochem Biophys Res Comm* 188 : 162-169, 1992
 - 30) Lieberman AP, Trojanowski JQ, Leonard DGB, Chen K-L, Bird TD, Robitaille Y, Malandrini A, Fischbeck KH : Ataxin 1 and ataxin 3 in neuronal intranuclear inclusion disease. *Ann Neurol* 46 : 271-273, 1999
 - 31) Matsuo ES, Shin R-W, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y : Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13 : 989-1002, 1994
 - 32) Mena R, Edwards P, Perez-Olvera O, Wischik CM : Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 89 : 50-56, 1995
 - 33) Nagaoka U, Uchihara T, Iwabuchi K, Konno H, Tobita M, Funata N, Yagishita S, Kato T : Attenuated nuclear shrinkage in neurones with nuclear inclusions of SCA1 brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74 : 597-601, 2003
 - 34) Nakamura A, Uchihara T : Dual enhancement of triple immunofluorescence using two antibodies from the same species. *J Neurosci Methods* 135 : 67-70, 2004
 - 35) Odawara T, Iseki E, Kosaka K, Akiyama H, Ikeda K, Yamamoto T : Investigation of tau-2 positive microglia-like cells in the subcortical nuclei of human neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett* 192 : 145-148, 1995
 - 36) Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst C-A, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure IV LS, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, Detloff PJ : Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91 : 753-763, 1997
 - 37) 小柳新策 : 電子顕微鏡による神経病理学のすすめ. 医学書院, 東京, 1992
 - 38) Paulson HL, Perez MK, Trotter Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH, Pittman RN : Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19 : 333-344, 1997
 - 39) Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM, Pittman RN : Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 143 : 1457-1470, 1998
 - 40) Pollock NJ, Wood JG : Differential sensitivity of the microtubule associated protein, tau, in Alzheimer's disease tissue to formalin fixation. *J Histochem Cytochem* 36 : 1117-1121, 1988
 - 41) Quignon F, De Bels F, Koken M, Feunteun J, Amiesen J-C, de Thé H : PML induces a novel caspase-independent death process. *Nature Gen* 20 : 259-265, 1998
 - 42) Sakamoto M, Uchihara T, Hayashi M, Nakamura A, Kikuchi E, Mizutani T, Mizusawa H, Hirai S : Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Exp Neurol* 177 : 88-94, 2002
 - 43) Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME : Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95 : 55-66, 1998
 - 44) Shibuya K, Uchihara T, Nakamura A, Ishiyama M, Yamaoka K, Yagishita S, Iwabuchi K, Kosaka K : Reversible conformational change of tau-2 epitope exposed to detergent in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 105 : 508-514, 2003
 - 45) Takahashi H, Egawa S, Piao Y-S, Hayashi S, Yamada M, Oyanagi K, Tsuji S : Neuronal nuclear alterations in dentatorubral-pallidoluysian atrophy : ultrastructural

- and morphometric studies of cerebellar granule cells. *Brain Res* 919 : 12-19, 2001
- 46) Takahashi J, Fujigasaki H, Iwabuchi K, Bruni AC, Uchihara T, El Hachimi KH, Stevanin G, Dürr A, Lebre A-S, Trotter Y, de Thé H, Tanaka J, Hauw J-J, Duyckaerts C, Brice A : PML nuclear bodies and neuronal intranuclear inclusion in polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis* 13 : 230-237, 2003
 - 47) Takahashi J, Tanaka J, Arai K, Funata N, Hattori T, Fukuda T, Fujigasaki H, Uchihara T : Recruitment of non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear aggregates of neuronal intranuclear hyaline inclusion disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60 : 369-376, 2001
 - 48) Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K : Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias-triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol (Berl)* 102 : 149-152, 2001
 - 49) Uchihara T, Ikeda K, Tsuchiya K : Pick body disease and Pick syndrome. *Neuropathology* 23 : 318-326, 2003
 - 50) Uchihara T, Iwabuchi K, Funata N, Yagishita S : Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates—a morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains-. *Exp Neurol* 178 : 124-128, 2002
 - 51) Uchihara T, Kondo H, Akiyama H, Ikeda K : Single-laser three-color immunolabeling of a histological section by laser scanning microscopy : Application to senile-plaque related structures in post-mortem human brain tissue. *J Histochem Cytochem* 43 : 103-106, 1995
 - 52) Uchihara T, Kondo H, Akiyama H, Ikeda K : White matter amyloid in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 90 : 51-56, 1995
 - 53) Uchihara T, Mizusawa H, Tsuchiya K, Kondo H, Oda T, Ikeda K : Discrepancy between tau immunoreactivity and argyrophilia by the Bodian method in neocortical neurons of corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 96 : 553-557, 1998
 - 54) Uchihara T, Nakamura A, Arai T, Ikeda K, Tsuchiya K : Microglial tau undergoes phosphorylation-independent modification after ischemia. *Glia* 45 : 180-187, 2004
 - 55) Uchihara T, Nakamura A, Nagaoka U, Yamazaki M, Mori O : Dual enhancement of double immunofluorescent signals by CARD : participation of ubiquitin during formation of neurofibrillary tangles. *Histochem Cell Biol* 114 : 447-451, 2000
 - 56) Uchihara T, Nakamura A, Nakayama H, Arima K, Ishizuka N, Mori H, Mizushima S : Triple immunofluorolabeling with two rabbit polyclonal antibodies and a mouse monoclonal antibody allowing three-dimensional analysis of cotton wool plaques in Alzheimer disease. *J Histochem Cytochem* 51 : 1201-1206, 2003
 - 57) Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O : Tau-positive neurons in corticobasal degeneration and Alzheimer disease—distinction by thiazin red and silver impregnation-. *Acta Neuropathol (Berl)* 100 : 385-389, 2000
 - 58) Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O : Evolution from pretangle neurons to neurofibrillary tangles monitored by thiazin red combined with Gallyas method and double immunofluorescence. *Acta Neuropathol (Berl)* 101 : 535-539, 2001
 - 59) Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O, Ikeda K, Tsuchiya K : Different conformation of neuronal tau deposits distinguished by double immunofluorescence with AT8 and thiazin red combined with Gallyas method. *Acta Neuropathol (Berl)* 102 : 462-466, 2001
 - 60) Uchihara T, Tanaka J, Funata N, Arai K, Hattori T : Influences of intranuclear inclusion on nuclear size—morphometric study on pontine neurons of neuronal intranuclear inclusion disease cases-. *Acta Neuropathol (Berl)* 105 : 103-108, 2003
 - 61) Uchihara T, Tsuchiya K, Kondo H, Hayama T, Ikeda K : Widespread appearance of Alz-50 immunoreactive neurons in the human brain with cerebral infarction. *Stroke* 26 : 2145-2148, 1995
 - 62) Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K : Appearance of tau-2 immunoreactivity in glial cells in human brain with cerebral infarction. *Neurosci Lett* 286 : 99-102, 2000
 - 63) Wang Z-G, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi R, Randlfi PP : PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nature Gen* 20 : 266-272, 1998
 - 64) Watanabe N, Takio K, Hasegawa M, Arai T, Titani K, Ihara Y : Tau 2 : a probe for a Ser conformation in the amino terminus of tau. *J Neurochem* 58 : 960-966, 1992
 - 65) Willingham MC : Conditional epitopes : Is your antibody always specific? *J Histochem Cytochem* 47 : 1233-1235, 1999
 - 66) Yamada M, Sato T, Shimohata T, Hayashi S, Igarashi S, Tsuji S, Takahashi H : Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *Am J Pathol* 159 : 1785-1795, 2001

Abstract

Disease-specific patterns of protein deposition and their relation to neurodegeneration

Toshiki Uchihara

from

*Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience,
2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan.*

Possible relevance of protein deposits, characteristic for some neurodegenerative disorders, were dissected into 1) how the protein is deposited to form inclusions and 2) how neurodegeneration is related to the deposits. Some genetic abnormalities linked to neurodegenerative disorder, for example pathological mutations of tau gene or pathological expansion of CAG repeat, result in these two aspects. Also summarized are technical challenges to realize enhanced multilabeling, three-dimensional reconstruction and how to interpret silver-staining methods. Deposition of protein was investigated on tau in ischemic foci or in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy that was found, in both conditions, detectable exclusively with tau2 antibody, whose epitope is not dependent on phosphorylation. This tau2 immunoreactivity was abolished in the presence of detergent (TritonX-100) but restored after washing, suggesting that conformational state of tau2 epitope is dependent on physical and chemical environment and reversible. Difference in the conformational state may distinguish different diseases or different stages of a disease. How neurodegeneration is related to deposits was investigated on CAG repeat disorders relevant to both formation of nuclear inclusions (NI) and neurodegeneration. Cross sectional area of pontine neurons with NI was found larger than that of neurons without NI in a series of CAG repeat disorders and neuronal intranuclear hyaline inclusion disease. Although protein deposition and neurodegeneration is tightly linked to each other, their correlation is not necessarily positive. Independent analyses of these two aspects may clarify their relationship to understand what is going on in human brains with neurodegenerative disorders.

(Received : February 3, 2004)

Shinkei Kenkyu no Shinpo (Advances in Neurological Sciences), Vol. 48, No. 3, pp334-345, 2004.
IGAKU-SHOIN Ltd., Tokyo, Japan.