

REFERENCES

1. Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Nishimura T. Glial tau pathology in neurodegenerative diseases: their nature and comparison with neuronal tangles. *Neurobiol Aging* 1998; **19** (1 Suppl.): S85–91.
2. Komori T. Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease. *Brain Pathol* 1999; **9**: 663–679.
3. Akiyama H, Mori H, Saido T, Kondo H, Ikeda K, McGeer PL. Occurrence of the diffuse amyloid β -protein ($A\beta$) deposits with numerous $A\beta$ -containing glial cells in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Glia* 1999; **25**: 324–331.
4. Funato H, Yoshimura M, Yamazaki T et al. Astrocytes containing amyloid β -protein ($A\beta$)-positive granules are associated with $A\beta$ 40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am J Pathol* 1998; **152**: 983–992.
5. Thal DR, Härtig W, Schober R. Diffuse plaques in the molecular layer show intracellular $A\beta$ 8–17-immunoreactive deposits in subpial astrocytes. *Clin Neuropathol* 1999; **18**: 226–231.
6. Thal DR, Schultz C, Dehghani F, Yamaguchi H, Braak H, Braak E. Amyloid β -protein ($A\beta$)-containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated $A\beta$ deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathol* 2000; **100**: 608–617.
7. Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y. Diffuse plaques associated with astroglial amyloid β protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol* 1998; **95**: 217–222.
8. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; **82**: 239–259.
9. Umeda Y, Taniguchi S, Arima K et al. Alterations in human tau transcripts correlate with those of neurofilament in sporadic tauopathies. *Neurosci Lett* 2004; **359**: 151–154.
10. Ikeda K. Basic pathology of corticobasal degeneration. *Neuropathology* 1997; **17**: 127–133.
11. Tsuchiya K, Ikeda K, Uchihara T, Oda T, Shimada H. Distribution of cerebral cortical lesions in corticobasal degeneration: a clinicopathological study of five autopsy cases in Japan. *Acta Neuropathol* 1997; **94**: 416–424.
12. Tsuchiya K, Uchihara T, Oda T, Arima K, Ikeda K, Shimada H. Basal ganglia lesions in corticobasal degeneration differ from those in Pick's disease and progressive supranuclear palsy: a topographic neuropathological study of six autopsy cases. *Neuropathology* 1997; **17**: 208–216.
13. Komori T, Arai N, Oda M et al. Astrocytic plaques and tufts of abnormal fibers do not coexist in corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 1998; **96**: 401–408.
14. Dickson DW, Bergeron C, Chin SS et al. Office of rare diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; **61**: 935–946.
15. Wakabayashi K, Takahashi H. Pathological heterogeneity in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Neuropathology* 2004; **24**: 79–86.
16. Arima K, Uesugi H, Fujita I et al. Corticonigral degeneration with neuronal achromasia presenting with primary progressive aphasia: ultrastructural and immunocytochemical studies. *J Neurol Sci* 1994; **127**: 186–197.
17. 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**: 534–539.
18. Buee L, Delacourte A. Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol* 1999; **9**: 681–693.
19. Arai T, Ikeda K, Akiyama H et al. Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann Neurol* 2004; **55**: 72–79.
20. Banati RB, Gehrmann J, Kreutzberg GW. Glial β -amyloid precursor protein: expression in the dentate gyrus after entorhinal cortex lesion. *Neuroreport* 1994; **5**: 1359–1361.
21. Beeson JG, Shelton ER, Chan HW, Gage FH. Differential distribution of amyloid protein precursor immunoreactivity in the rat brain studied by using five different antibodies. *J Comp Neurol* 1994; **342**: 78–96.
22. Chauvet N, Apert C, Dumoulin A, Epelbaum J, Alonso G. Mab22C11 antibody to amyloid precursor protein recognizes a protein associated with specific astroglial cells of the rat central nervous system characterized by their capacity to support axonal outgrowth. *J Comp Neurol* 1997; **377**: 550–564.
23. Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004; **25**: 663–674.
24. Watabe K, Osborne D, Kim SU. Phagocytic activity of human adult astrocytes and oligodendrocytes in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 1989; **48**: 499–506.
25. Al-Ali SY, Al-Hussain SM. An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain. *J Anat* 1996; **188**: 257–262.
26. Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY. Astrocytes accumulate $A\beta$ 42 and give rise

- to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* 2003; **971**: 197–209.
27. Ikeda K, Akiyama H, Kondo H *et al*. Thorn-shaped astrocytes: possibly secondarily induced tau-positive glial fibrillary tangles. *Acta Neuropathol* 1995; **90**: 620–625.
28. Schultz C, Ghebremedhin E, Del Tredici K, Rüb U, Braak H. High prevalence of thorn-shaped astrocytes in the aged human medial temporal lobe. *Neurobiol Aging* 2004; **25**: 397–405.
29. Arai T, Ikeda K, Akiyama H *et al*. 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* 2001; **101**: 167–173.

Pharma

The Review of Medicine and Pharmacology

Medica

Volume 24

別刷

メディカルレビュー社

〒541-0046 大阪府中央区平野町1-7-3 吉田ビル TEL 06-6223-1468
〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11 イトピア湯島ビル TEL 03-3835-3041

治療薬開発

タウ病理の阻害薬

KEY WORDS

- タウ
- 凝集阻害薬

はじめに

アルツハイマー病(AD)はアミロイドβ蛋白(Aβ)からなる老人斑と異常リン酸化タウを主要構成成分とする神経原線維変化(Neurofibrillary tangle; NFT)の2つの線維性蛋白質の蓄積を特徴とする変性疾患である。第17番染色体に連鎖する前頭側頭型認知症にタウの遺伝子変異が発見されたことにより、タウの機能、発現異常が神経変性のプロセスにおける中心であることが立証され、神経細胞の変性と密接な関係にあるタウの病理を標的としたADの予防、治療の可能性が注目されている。本稿では、筆者らが発表したタウの凝集阻害薬に関する研究を中心に、タウ病理の阻害薬への応用が期待される最近の研究について概説したい。

I. タウの病理

タウの病理に関しては前章の森先生

らの詳しい解説を参照されたいが、その特徴は主に2つに集約されるといえる。1つは蓄積しているタウのほとんどすべてが「高度にリン酸化されている」という点である。タウは微小管同士を架橋することでその重合促進と安定化に働く微小管結合蛋白の一種であるが、リン酸化によってその機能が調節されている。しかしながらAD脳に蓄積するタウは通常ではみられないほど、質的にも量的にも高度にリン酸化されており、リン酸化部位は微小管結合領域をはさんだ両側に20ヶ所以上同定されている。タウのリン酸化には、複数のキナーゼ [Cyclin-dependent protein kinase-5 (CDK5), Glycogen synthase kinase-3 (GSK3), Mitogen-activated protein kinase (MAPK) など] や複数のホスファターゼの関与が示唆されている。

ADにおけるタウの病理のもう1つの特徴は、「規則正しいアミロイド線維の構造をとって蓄積している」とい

Inhibitors of tau filament formation.

Masami Masuda

Masato Hasegawa (部門長)

う点である。細胞内の線維性蛋白質の構造解析は細胞外のものに比べ遅れたが、最近その線維構造がクロス β 構造をとっていることが証明された¹⁾。このように、タウが正常とは明らかに異なる性質を獲得することが神経細胞の変性を導くと考えられ、必然的に異常リン酸化、アミロイド線維形成に対して抑制効果をもつ薬剤の探索が中心に行われている。

II. タウのリン酸化阻害

前述のようにタウの異常リン酸化は微小管結合能の低下による正常機能の障害や、自己重合による異常線維の形成をおこすと考えられており、タウの異常リン酸化の阻害によるタウオパチー治療への試みがなされている。躁うつ病の治療薬としても使用されているリチウムは、タウリン酸化酵素の1つであるGSK3を阻害する。実際に培養細胞やラットへリチウムを投与することでタウのリン酸化が低下し、その結果微小管重合能が上昇するため神経突起の伸長が観察される²⁾。NobleらはFTDP-17 (Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) 家系でみられるP301L変異タウ(4R0N)のトランスジェニックマウスに、リチウムを30日間腹腔内投与した³⁾。このマウスは脳、間脳、脳幹、脊髄にNFTが出現し、ジストニアや運動麻痺を呈するが、リチウム投与により、GSK3によるリン酸化部位Ser202, Ser396, Ser404のリン酸化の低下と、サルコシル不溶性タウ量の減少が認められ、脊髄の軸索変性の抑制が観察された。この報告ではリチウム投与が運動障害の出現よりも早い段階に行われ

たため、運動障害の回復効果については今後の報告が待たれる。またNakashimaらは、ヒトタウの最も短いアイソフォームを過剰発現するマウスにリチウムを経口で長期投与した⁴⁾。2~4週間の短期投与でタウのリン酸化の減少が観察されたが、5ヵ月の長期投与では未投与群との間に違いは認められなかった。また、タウ病変出現よりも早期にリチウムを投与することで脊髄での不溶性タウ[SDS (sodium dodecyl sulfate) 不溶、ギ酸可溶]の減少が観察されたが、タウ病変の出現し始める5ヵ月齢から投与した群では不溶性タウ、リン酸化タウとも減少は認められなかった。

これらの研究結果から、タウのリン酸化阻害薬の効果はタウ病変が現れるよりも早い段階で始めなければ効果が期待できない可能性が示唆される^{3,4)}。また、GSK3はタウ以外にも多くの蛋白質のリン酸化を担うため、GSK3の長期的な阻害はさまざまな生体機能に影響を及ぼす可能性があり、今後さらに詳細な解析が必要であろう。

III. タウの線維化阻害化合物

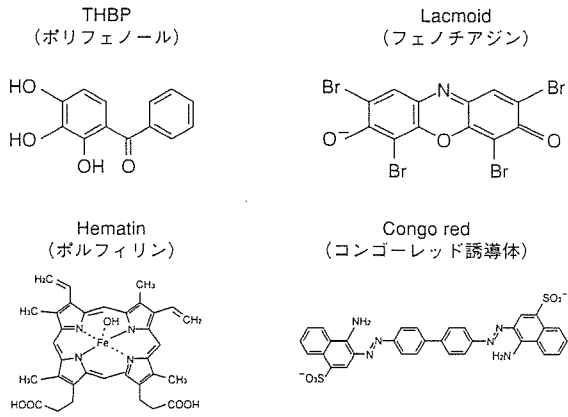
リン酸化の阻害薬が正常機能にさまざまな影響を及ぼす可能性があることから、筆者らはタウの線維形成を阻害する薬剤の探索を行っている。A β の凝集阻害や抗プリオン効果などが報告されている化合物を中心に、12系統79化合物を用いてスクリーニングと作用機序の解析を行った。タウとA β の両方の凝集に対して効果をもつ化合物がADの治療法としてより望ましく、共通の阻害機構があると考えたためである。線維化阻害効果の評価は、電子顕

微鏡観察、チオフラビンSの蛍光測定、およびサルコシル不溶性タウの定量の3種類の方法で行った。この結果、ポリフェノール、ポルフィリン、フェノチアジン、コンゴレッド誘導体の4系統31化合物がタウの線維形成阻害効果を示すことが明らかとなった(図1)^{5,6)}。そのなかには、食物に含まれるポリフェノール化合物やビタミンE、抗精神病薬として使用されるフェノチアジン系誘導体、アミロイドイメージングへの応用が期待されるBSB [1-Bromo-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl) benzene] や FSB [1-Fluoro-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl) benzene]⁷⁾が含まれる。さらに50%阻害濃度(IC₅₀)をサルコシル不溶性タウの定量により算出した結果、効果の強い化合物ではタウ20 μ Mに対して数 μ Mで効果を示すことがわかった。われわれはA β と、パーキンソン病脳で蓄積のみられる α -synucleinに対する線維化阻害効果についても同様に解析を行い、タウの線維化阻害化合物がA β や α -synucleinの凝集も阻害することを見いだした^{5,6)}。また阻害薬はタウの濃度よりも低い濃度でも効果を発揮することから、モノマーに直接結合して作用するというよりは線維化の律速段階にあるような分子に作用する可能性が高い。その仮説と一致するように、線維化阻害化合物存在下でのサルコシル可溶性画分にSDS安定なタウオリゴマーの形成が認められた(図1B)。A β や α -synucleinについても同様のオリゴマー形成が観察されることから⁸⁾、線維化阻害化合物の作用機序は線維形成の中間体と考えられる可溶性のオリゴマーに作用し安定化することでさらなる重合を抑制している可能性が示唆さ

れる(図2)。ポリフェノール系化合物の構造活性相関については、ベンゼン環上に隣り合うフェノール基を有する化合物は強い阻害効果を示すが、そうでない化合物は阻害効果を示さなかった。このことからポリフェノールが酸化してできたキノンがオリゴマーに結合し安定化している可能性がある⁸⁾が、SDS安定なオリゴマー形成との関係は明らかではない。フェノチアジン化合物では、線維化阻害効果を示すためにはフェノチアジン環の第9位の窒素原子に側鎖をもたないことが必要であり、この構造もオリゴマーへの親和性に関与すると予想され、今後治療薬を開発していくうえで参考になるであろう。フェノチアジン化合物は脂溶性も高く、抗精神病薬や、抗プリオン病薬としてすでにヒトへの投与が行われている⁹⁾。脳への移行が容易であることから、タウオパチー治療薬として比較的应用しやすい化合物と考えられ、*in vivo*モデルでの効果が期待される。

他のタウの凝集阻害薬の報告としては、ベンゾチアゾール化合物N744が β や α -synucleinには効果を示さないが、アラキドン酸の誘導するタウの凝集を阻害し¹⁰⁾、ヤツメウナギのモデルにおいてもタウの異常蓄積、細胞の変性を改善することが報告されている¹¹⁾。われわれが検討したベンゾチアゾール化合物にはタウの線維化阻害効果は認められなかったが、N744はタウのみの凝集を阻害するという点で興味深い。Pickhardtらは20万種の化合物についてスクリーニングを行い、アントラキノン系の化合物を見いだした¹²⁾。Khlistunovaらは変異を導入したタウの微小管結合領域のみを発現するモデル細胞を用いて、N-フェニルアミン

A. タウの線維化阻害効果がみられた主な化合物



B. サルコシル不溶性/可溶性タウの検出

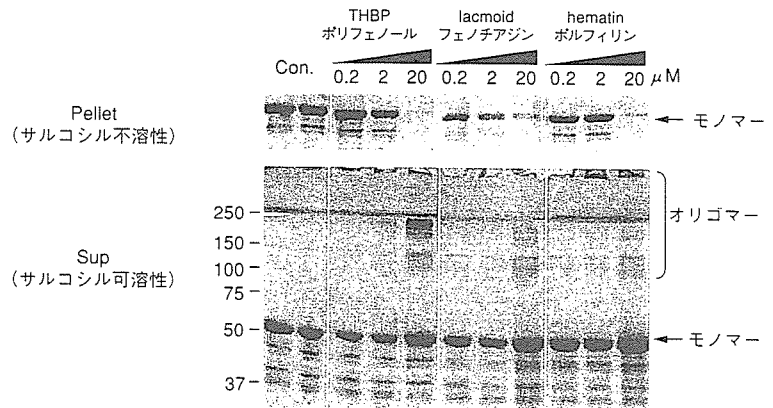


図1. 低分子化合物によるタウの線維化阻害⁵⁾⁶⁾

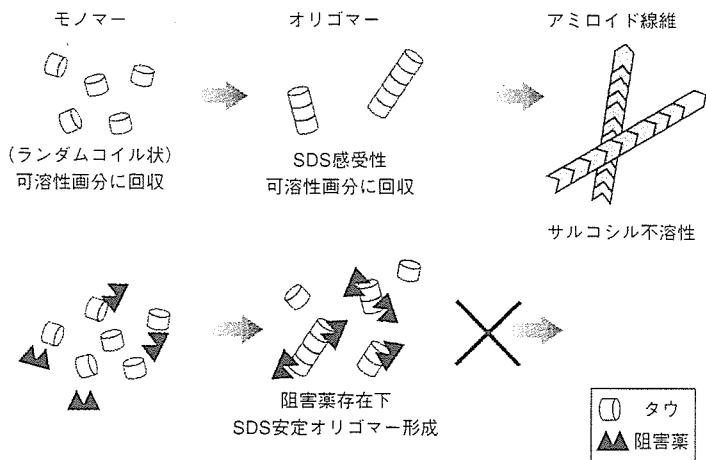


図2. タウ線維化阻害薬の阻害機構モデル

系の化合物B4D3, B1C11, B4A1が細胞内へのタウの凝集と細胞毒性を抑制できると報告した¹³⁾。この化合物は*in vitro*でタウの線維形成阻害だけでなく、線維の脱重合作用も併せもつらしい。筆者らの検討では、ポルフィリン化合物のphthalocyanine tetrasulfonateにのみタウ線維の脱重合作用が認められている⁵⁾。このような効果はタウ病理の進行している場合にも有効であると考えられ、今後*in vivo*での検討が期待される。

おわりに

今回タウ病理の阻害薬について、線維化阻害化合物の研究を中心として概説してきた。現段階ではタウの線維化阻害化合物についての報告はまだ少ないが、他の凝集蛋白(A β , プリオン, ポリグルタミン, α -synuclein)に対する報告は最近非常に多くなってきた。筆者らの検討結果から、A β やプリオンに効果をもつものは、高い確率でタウの凝集にも効果を示すことが明らかとなり、タウに効果のある化合物はさらに多く報告されることが予想される。

今後は*in vivo*タウオパチーモデルでの効果に期待したい。

文 献

- 1) Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, et al : Tau filaments from human brain and from *in vitro* assembly of recombinant protein show cross-beta structure. PNAS 100 : 9034-9038, 2003
- 2) Muroz-mntano JR, Moreno FJ, Avila J, et al : Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. FEBS Lett 411 : 183-188, 1997
- 3) Noble W, Planel E, Zehr C, et al : Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. PNAS 102 : 6990-6995, 2005
- 4) Nakashima H, Ishihara T, Suguimoto P, et al : Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. Acta Neuropathol 110 : 547-556, 2005
- 5) Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, et al : Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. J Biol Chem 280 : 7614-7623, 2005
- 6) Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, et al : Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly. Biochemistry 45 : 6085-6094, 2006
- 7) Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, et al : ¹⁸F and ¹H MRI detection of amyloid β plaques *in vivo*. Nat Neurosci 8 : 527-533, 2005
- 8) Zhu M, Rajamani S, Kaylor J, et al : The flavonoid bicalcin inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. J Biol Chem 279 : 26846-26857, 2004
- 9) Dou-Ura K, Iwaki T, Caugthy B : Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. J Virol 74 : 4894-4897, 2000
- 10) Chirita C, Necula M, Kuret J : Ligand-dependent inhibition and reversal of tau filament formation. Biochemistry 43 : 2879-2887, 2004
- 11) Hall GF, Lee S, Yao J : Neurofibrillary degeneration can be arrested in an *in vivo* cellular model of human tauopathy by application of a compound which inhibits tau filament formation *in vitro*. J Mol Neurosci 19 : 253-260, 2002
- 12) Pickhardt M, Gazova Z, von Berden M, et al : Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments *in vitro* and in cells. J Biol Chem 280 : 3628-3635, 2005
- 13) Khlistrunova I, Biernat J, Wang Y, et al : Inducible expression of tau repeat domain in cell models of tauopathy. J Biol Chem 281 : 1205-1214, 2006

前頭側頭型認知症の生化学

長谷川成人, 新井 哲明, 野中 隆
亀谷富由樹, 秋山 治彦, 池田 研二

特集

前頭側頭葉型変性症の新しい広がり

前頭側頭型認知症の生化学

長谷川成人¹⁾, 新井 哲明²⁾, 野中 隆¹⁾
 亀谷富由樹¹⁾, 秋山 治彦²⁾, 池田 研二³⁾

はじめに

前頭側頭葉型認知症 (frontotemporal dementia: FTD) の中核疾患であるピック病には、神経病理学的にピック小体を伴うものとそうでないものが存在することが知られている。また、本邦ではこの二つの疾患がほぼ同数みられることが Ikeda らにより報告されている (Ikeda & Tsuchiya, 2004)。近年、このピック小体を伴わないピック病の多くはユビキチン陽性封入体の出現を伴うこと、また運動ニューロン疾患を伴う認知症にも同様のユビキチン陽性

封入体が認められることが明らかとなってきた。主要な神経変性疾患において、神経細胞内の特徴的蛋白質封入体はその発症に関与することが遺伝学的にも証明されてきたことなどから、これらの疾患と正体不明のユビキチン陽性封入体への関心が高まっている。本稿では孤発性、及び家族性ピック病におけるタウの蓄積について概説すると共に、前頭側頭型認知症に出現する未だ構成成分不明のユビキチン陽性封入体への取り組みについて簡単に紹介する。

ピック小体を伴うピック病

ピック小体病の神経病理学的定義、及びその歴史的背景については、他の著者の詳しい総説を参照して頂くことにし、ここではピック小体病の特徴的病理構造物であるピック小体の解析について少し述べることにする。ピック小体は Alois Alzheimer によってこの疾患特有の構造物としてはじめて記載された病理構造物である。その成分は長い間不明であったが、アルツハイマー病 (AD) の神経原線維変化がタウからできていることが報告されたのをきっかけにタウ抗体による免疫染色が行われ、ピック小体も

Biochemistry of frontotemporal dementia

Masato Hasegawa

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所分子神経生物学研究チーム [〒156-8585 東京都世田谷区上北沢 2-1-8]

Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry (2-1-8, Kamikitazawa, Setagayaku, Tokyo 156-8585, Japan)

²⁾ 同 老年期精神疾患研究チーム [同]

Department of Psychogeriatric Research, Tokyo Institute of Psychiatry

³⁾ 財団法人 慈圭病院・慈圭精神医学研究所 [〒702-8508 岡山県岡山市浦安本町 100-2]

Zikei hospital (100-2, Urayasuhonmachi, Okayama-shi, Okayama 702-8508, Japan)

タウからできていることが明らかとなった (Joachim et al, 1987, Murayama et al, 1990). アルツハイマー原線維変化を染め出すリン酸化タウに対する抗体の多くがピック小体を染色することから、ピック小体として蓄積するタウもADのそれと同様に高度にリン酸化されていることが示された。一方、Delacourteらは様々な変性疾患の異常リン酸化タウのイムノプロット上のバンドパターンが疾患によって異なることを見だし、ピック病脳に蓄積するタウとAD脳に蓄積するタウの生化学的違いについて報告した (Delacourte et al, 1996). その後、特異抗体を用いた解析や二次元電気泳動による解析、また脱リン酸化して6種類のリコンビナントタウと比較する解析が行われ、ピック小体を構成するタウは主に3リピート (3R) タウであることがわかってきた (Sergeant et al, 1997, Arai et al, 2001).

ピック病脳に蓄積するタウの分子種について、最近4Rタウを主要な構成成分とするピック小体様封入体がいくつか報告されてきている。生化学の立場からすると、構成成分 (タウアイソフォームの種類) が異なるということは大きな違いを意味する。病理像と生化学が一致しない例外的なものということになるかもしれないが、それまでタウの生化学と病理像がよく相関することが示されてきていただけに、話が複雑になって混乱を生じているようにも思われる。4Rタウの蓄積を伴うピック小体様封入体については超微形態やその他の神経病理学的な詳細な解析によるきちんとした位置づけを考えるといく必要があるかもしれない。最近3Rタウと4Rタウをそれぞれ特異的に認識するモノクローナル抗体 (de Silva et al, 2003) が作製、市販されていることから、これらの抗体を用いた解析により、疾患ごとあるいは細胞の種類による蓄積タウの分子種の違いがより詳しく明らかになってくると思われる。

家族性ピック病とタウ遺伝子変異

ピック病の多くは孤発性であるが常染色体優性遺伝形式を示す家族性ピック病も知られている。オランダに Dutch family 2 (HFTD2, あるいは Schenk family) と呼ばれる大きな家族性ピック病の家系があり、その臨床病理像について古くから報告されていた。1998年、Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) におけるタウ遺伝子変異の発見がなされた時にこの家系の患者にもタウの遺伝子変異 (G272V 変異) が発見された (Hutton et al, 1998). FTDP-17 におけるタウ遺伝子変異の発見以降、家族歴のあるピック病、あるいはピック病様の臨床、病理像を示す患者に対してタウの遺伝子解析が行われ、これまで、かなりの数のタウ遺伝子のミスセンス変異 (K257T, G272V, L266V, Q336R, K369I, G389R など) がエクソン 9, 11, 12, 13 に発見されている (Kobayashi et al, 2003, Murrell et al, 1999, Neumann et al, 2001, Pickering-Brown et al, 2000, Rizzini et al, 2000, Rosso et al, 2002) (図1)。また、それらのミスセンス変異の多くはタウの微小管重合促進能や線維形成能に影響することが示されている (Hasegawa et al, 1998, Murrell et al, 1999, Pickering-Brown et al, 2000, Kobayashi et al, 2003)。

家族性のピック病と診断され、遺伝子解析の結果、タウの遺伝子変異が発見された患者の脳におけるタウの蓄積像、及びタウの分子種は、孤発性のピック病のそれとよく似ている場合が多い。病変部位にみられる病理構造物の形態は球状のものが多く、脱リン酸化前のイムノプロットのパターン (60, 64 kDa の2本バンドのパターン) も似ている。しかしながら、孤発性のピック病に蓄積するタウがリン酸化 Ser262 抗体に対して陰性なのに対し、家族性の場合には陽性を示すとする報告も見られる。また、孤発性

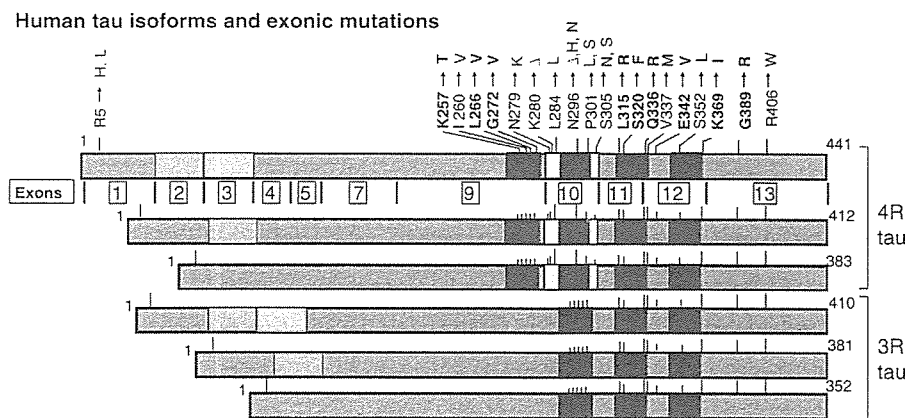


図1. FTDP-17 に発見されたタウ遺伝子のエクソン内の変異。
 家族歴のあるピック病, あるいはピック病様の臨床, 病理像を示す患者に発見された遺伝子変異を太字で示す。

ピック病のピック小体は一般に Gallyas 染色陰性であるが, 家族性の場合には陽性を示す場合が多いようである。これらは, 蓄積タウのアイソフォームやその重合様式が異なることを示唆している。実際, 技術的な問題もあるのではっきりしない部分もあるが, 脱リン酸化後のイムノブロットにおいて, 家族性ピック病の場合に 4R タウが検出される場合が多いように見える。また電子顕微鏡でみる微細構造の形態も少し異なる。先にも述べたように孤発性のピック病におけるタウが主に 3R タウであるのに対し, タウ遺伝子の変異が認められたものについては, 3R タウだけでなく 4R タウの蓄積も見られる。線維をつくるタウのアイソフォームが違えば重合様式の異なる線維が形成され, その違いが銀染色や抗体の染色の違いとなって現れてくる可能性が考えられる。

以上のように孤発性ピック病と家族性ピック病は, タウの蓄積様式に多少異なる部分もみられるが, よく似た神経病理学的特徴を有している。ピック小体病の特徴的病理構造物の主要構成成分がタウであり, 類似の病態を示す家族性ピック病でそのタウの遺伝子に変異が発見されたことは, 病気の発症機序における特徴的病理構造物の意義を考える上で重要である。

Dementia lacking distinctive histopathology (DLDH)

FTD に分類される変性疾患のうち, タウの蓄積を伴うものは, 前述のピック小体病の他に, 皮質基底核変性症, 進行性核上性麻痺, 嗜銀性顆粒認知症などがある。これらはそれぞれの疾患脳に出現するタウの特徴的病理構造物などを指標に病理学的に分類された疾患単位であり, 生化学的にみてもそれぞれ特徴的なタウの蓄積パターンを示す。

一方, タウの蓄積を伴わない FTD の症例も多くみられ, 英国では FTD 全体の 6 割程度はこのタウの蓄積を伴わない FTD とされる (Taniguchi et al, 2004)。それらの中には特にこれといった異常構造物や病理学的特徴がないため, Dementia lacking distinctive histopathology (DLDH) などと呼ばれ, 神経病理学的な位置づけが現在でも不明なものもある。この DLDH に関しては, タウの mRNA の発現がある程度みられるにも関わらず, 可溶性タウの蛋白レベルが著しく低いことから, タウの翻訳異常, あるいは mRNA の安定性の減少によるある種のタウオパチーではないかとする報告がなされた (Zhukareva et al, 2001)。われわれは,

6 症例の DLDH について生化学的解析を行い、タウ蛋白の発現レベルだけが実際に低いのか、脳萎縮の激しい症例について検討した。その結果、確かに可溶性タウの減少を確認することができたが、神経細胞の核のマーカーである NeuN も著しく減少しており、また α シヌクレインやニューロフィラメントの量もタウや NeuN ほどではないが減少が見られた (Taniguchi et al, 2004)。さらに、RT-PCR による解析でタウの mRNA もこれらの症例で減少が観察された。したがって DLDH における可溶性タウの減少はタウだけの異常ではなく、神経細胞脱落を反映したものである可能性が高いと考えられた。可溶性タウの減少をとらえて、一種のタウオパチーかもしれないという報告がでるのは、タウの蓄積がみられない FTD の家系の遺伝子解析で責任遺伝子座が 17 番染色体のタウ遺伝子と同じ位置 17q21 に連鎖が示されている背景がある。しかしながら、タウの異常蓄積を認めない FTD においては、これまでのところタウの遺伝子変異は発見されていない。したがって、この DLDH 発症の分子背景は未だ不明である。神経病理学的特徴の見出せない症例、疾患の場合、その原因を患者脳から見つけ出すことは極めて困難であり、大きな家系がある場合はその領域の連鎖解析、遺伝子解析を行っていく方法が早道かもしれない。

タウ陰性ユビキチン陽性封入体を伴う FTD

タウの異常蓄積が観察されない FTD (あるいはピック小体を伴わないピック病) には、DLDH のような特徴的病理構造物の出現を伴わない変性を示すものもあるが、多くの場合、タウ陰性のユビキチン陽性の異常蓄積構造物の出現がみられる (Ikeda & Tsuchiya, 2004, Taniguchi et al, 2004, Mackenzie et al, 2006)。それらはその出現部位や変性部位などで分類され、タウ陰性ユビキチン陽性封入体を伴うピック病 (PiD-UI, あるいは FTD-U)、運動ニュー

ロン疾患を伴う認知症 (ALS-D)、あるいは motor neuron disease inclusion dementia (MNDID) (Jackson et al, 1996) などとよばれている。Ikeda & Tsuchiya の報告によれば本邦では DLDH のような症例は極めてまれで、ピック小体を伴わないピック病例の大部分には、ユビキチン陽性封入体の蓄積が認められるという (Ikeda & Tsuchiya, 2004)。このユビキチン陽性封入体は岡本らが筋萎縮性側索硬化症の患者に初めて報告し (Okamoto et al, 1991)、続いて運動ニューロン疾患を伴う認知症 (MND-D) (=ALS-D) にも認められた病理構造物である (Okamoto et al, 1992) が、その主要構成成分は未だ明らかとなっていない。ユビキチンは細胞内でミスフォールドされた蛋白質や異常になった蛋白質に直接共有結合し、その分解に働くシグナルの役割を担う蛋白質であり、ユビキチンの結合相手はその疾患に関わる異常分子の本体である可能性が高い。アルツハイマー病脳に蓄積するタウやパーキンソン病などの α シヌクレイン/オパチー脳に蓄積する α シヌクレインがユビキチンの標的蛋白質として同定されてきた (Morishima-Kawashima et al, 1993, Hasegawa et al, 2002) ことを考えあわせても、その標的蛋白質を同定することが最も重要であることは容易に推察される。

タウ陰性ユビキチン陽性封入体の構成成分同定へのアプローチ

前述のようにタウ陰性ユビキチン陽性封入体がタウ蓄積を伴わない FTD 患者の多くに出現が見られることが確認され、また ALS-D との関連も示唆されてきたことなどから、このユビキチン陽性封入体への関心が高まっている。我々はアルツハイマー神経原線維変化や Lewy 小体の解析のときに用いた技術、手法を使えばこの構成成分を解明できる可能性があると考えて、現在このタウ陰性ユビキチン陽性封入体の解析に取り組んでいる。その実際について簡単に紹介する。

はじめに、「この正体不明の病理構造物にどう取り組むべきか」というアプローチの仕方であるが、即座に思い浮かぶのは、過去に偉大な先輩達が老人斑や神経原線維変化から A β やタウ、ユビキチンを同定してきた方法である。ひとは患者脳組織を免疫し、封入体を特異的に認識する抗体を調製し、その抗体の認識蛋白質を同定する手法であり、またもうひとは脳組織からユビキチンの染色性を指標に異常構造物を濃縮、精製し、蛋白化学的に解析するものである。前者は神経原線維変化の部分精製物、あるいは患者脳の粗抽出液を免疫し、その抗体の認識蛋白質を同定することにより、タウ、ユビキチンが同定されたという大きな成功例があるし、後者もアミロイドや神経原線維変化をコンゴレッドの染色性や抗体の反応性を指標に部分精製し、アミノ酸シーケンサーで β ペプチドやタウが同定されてきた歴史がある。そこで我々もこの二つの方法を並行して進めることにした。抗体を作製する方法では、患者脳から調

製した試料をマウスに免疫し、ハイブリドーマの培養上清を組織染色によりスクリーニングした結果、封入体を染色したクローンが一つ得られた (Arai, Nonaka et al, 未発表)。残念ながらこの反応は培養途中で消失してしまいクローンを確立するまでには至らなかったが、抗体が得られる可能性を示すものであった。蛋白化学的方法では、界面活性剤に対する不溶性の性質を利用してユビキチン陽性封入体の部分精製を進めた。A β 、タウ、 α シヌクレイン、ポリグルタミンなど、神経変性疾患脳に蓄積するほとんどすべての蛋白質は界面活性剤や各種溶媒などに対して高い抵抗性を示すことが知られていることから、同様の方法で濃縮できる可能性を考えた。実際、脳の一部を 1% Triton にて処理して、その不溶性画分をスライドガラスにスミアにしユビキチン染色を行ったところ、棍棒状の封入体が濃縮されていることが確認された (図 2)。このようにいくつかの界面活性剤を組み合わせさせて不溶性画分を調製し、同様に調製した正

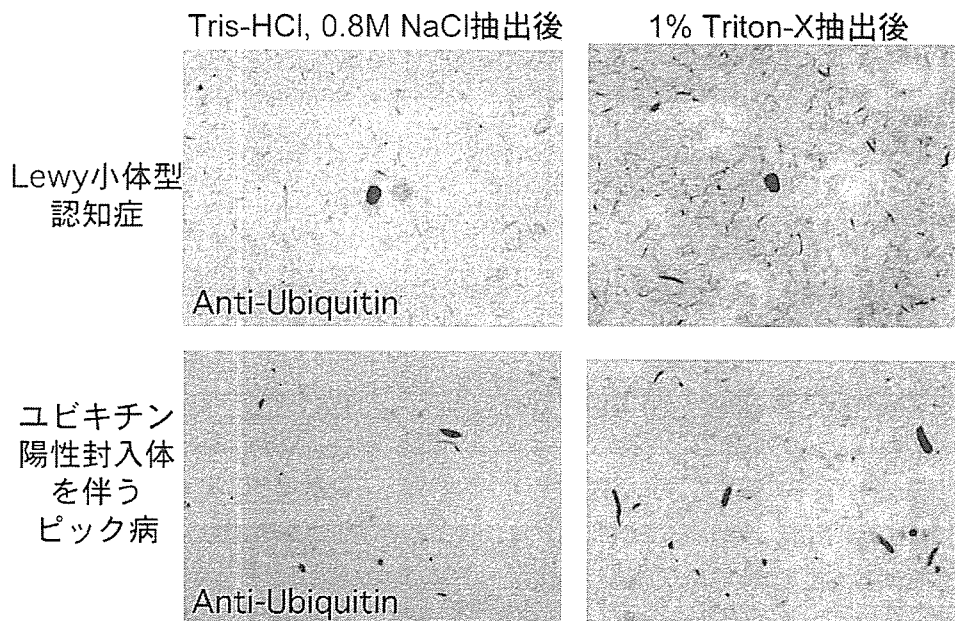


図 2. FTD (PiD-UI) 患者脳から分離したユビキチン陽性封入体の性質。非イオン性界面活性剤 Triton X 処理前後の病理構造物の抗ユビキチン抗体による免疫染色を示す。上段は Lewy 小体型認知症 (DLB) 脳から分離した Lewy 小体と Lewy neurites, 下段は、FTD (PiD-UI) 患者脳から分離したユビキチン陽性封入体。いずれも Triton X 処理による消失は見られず、他の膜成分等の減少により濃縮される傾向がみられる。

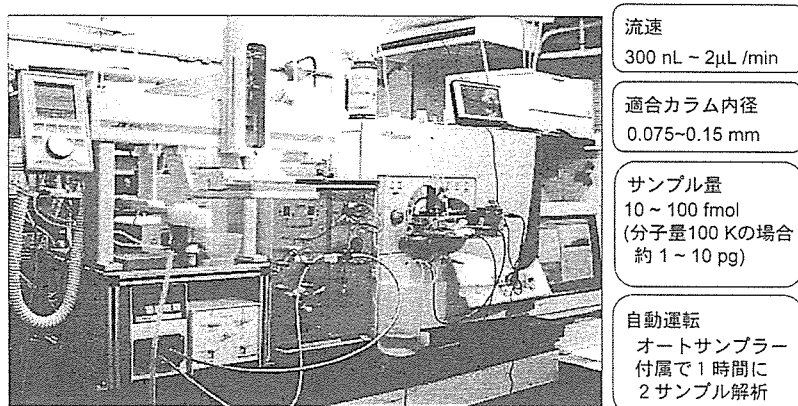
ナノフロー-HPLC /LCQ-LC/MSⁿ 解析システム

図3. 当研究室で導入しているナノフロー-HPLC を接続したイオンスプレー型質量分析装置。感度が高く、100 fmol 程度の蛋白質でも同定が可能である。それぞれの神経変性疾患に特徴的な病理構造物、あるいは共通の変化を網羅的にとらえるプロテオミクスに威力を発揮するものと期待される。

常脳(あるいは封入体のない組織)とAD, Lewy小体型認知症(DLB)の脳組織から得られた同じ画分を比較する作業を行う。なぜならば、部分精製したといっても目的の蛋白質だけが精製されてあるわけではなく、まだ多くの夾雑蛋白質がそこに混在しており、その中から目的のものを同定しなければならないからである。

蛋白質の同定はプロテオミクス的手法で現在行っている。それぞれの疾患の不溶性画分をSDS電気泳動し、蛋白染色してそのバンドの強弱を比較しながら、泳動された蛋白を網羅的に質量分析装置を用いて解析する方法である。網羅的に調べる理由は、封入体を構成している蛋白質に由来するバンドは量的に少なく、バンドとして明らかな違いが検出できない可能性があるからである。実際に、当研究室で導入しているナノフロー-HPLCを接続したイオンスプレー型質量分析装置(図3)は感度が非常に高く、100 fmol程度の蛋白質でも同定が可能であり、バンドとしては見えない量でも検出が可能である。今回、分析結果について詳しく述べることはできないが、検出されるべきものはきちんと検出することができている。すなわちAD脳からタウとA β を、DLB脳からは α シヌク

レインを比較的容易に同定することができており、正常脳やPiD-UI症例にはこれらの分子はほとんど検出されていない。この結果は当然といえば当然であるが、同じ調製の仕方ですべての疾患に特徴的なアミロイド蛋白を同定できたことになり、正体不明のユビキチン陽性封入体の構成成分もある一定の量の蓄積があれば同定できそうな期待感が高まる。また、この方法ですべての疾患の不溶性画分を網羅的に解析することにより、疾患ごとに特徴的な変化(例えばタウや α シヌクレインの蓄積に伴った変化)や変性疾患に共通の変化をとらえることにも役立つと期待される。

剖検脳の蓄積蛋白質の解析の成否は手法が確立した場合には剖検脳に蓄積している蛋白質の量で大きく左右される。このFTD(PiD-UI)、あるいはALS-Dのユビキチン陽性封入体はADの神経原線維変化やDLBのLewy小体などに比べるとはるかに少ないといった印象をうける。それがこの封入体の成分の同定を困難にしているのかもしれない。質量分析などの感度も昔に比べて桁違いに向上しており、封入体の多い症例を解析する機会に恵まれれば突破口が開けるかもしれない。

家族性前頭側頭型認知症の連鎖解析

家族性前頭側頭型認知症のある割合は第17番染色体17q21に位置するタウ遺伝子の変異によることが明らかとなっており、タウの遺伝子変異が見つかった家系の症例にはこれまでのところ例外なくタウの異常蓄積病変が報告されている。一方、前述のように同じ17q21に連鎖が示されていながら、詳細な遺伝子解析にもかかわらずタウの遺伝子変異が発見できていない、タウの異常蓄積病変がないFTDの家系が7家系報告されている。これらの家系の患者脳の病理については十分に明らかでないものもあるが、複数の家系でタウ陰性ユビキチン陽性細胞内封入体、及び核内封入体が確認されている (Rosso et al, 2001, Rademakers et al, 2002, Mackenzie et al, 2006)。最近報告されたUBC-17の家系の連鎖解析では最大LODスコア3.91が示されているが、タウ遺伝子変異は確認できず、またFISH解析でも異常は検出できないことなどから、大きな範囲でのタウ遺伝子のduplicationなどの異常についても否定的である (Mackenzie et al, 2006)。タウでないとするれば他の遺伝子の可能性を考えることになるが、連鎖が示されている領域は遺伝子が豊富に存在する領域で候補遺伝子がまだたくさんあるという。

第17番染色体以外にも連鎖が示されている家族性FTDの家系がいくつかある。ひとつは第3番染色体に連鎖が示されたFTD-3 (Brown et al, 1995) であり、この家系からは最近になってエンドソームのESCRTIII複合体の成分であるCHMP2Bのエクソン6のプライムアクセプター部位に変異が発見された (Skibinski et al, 2005)。しかしながら、このCHMP2B遺伝子の変異については、米国と英国の141例のFTD患者について遺伝子解析が行われたが変異を見つけることができなかったことから、極めて希なもので、FTDによく見ら

れる変異ではなさそうである (Cannon et al, 2006)。その他、第9番染色体9q21-q22に連鎖するFTDを伴うALS (=ALS-D) の家系 (Hosler et al, 2000) やゲノムワイドの連鎖解析で同じ9番染色体であるが新しい遺伝子座9p21.3-p13.3に連鎖が示されたALS-FTDのスキャンジニアの家系 (Morita et al, 2006) が報告されている。また、最近、家族性ALSの患者に見出されていたdynactinのp150サブユニット (遺伝子座は第2番染色体の2p13) のミスセンス変異が一人のALS患者とFTDを発症するその兄弟に見出されたということで、ALS/FTDにおけるこの遺伝子異常の関与も示唆されている (Munch et al, 2005)。Lewy小体の α シヌクレインがそうであったように、家族性疾患の原因遺伝子が発見されたことをきっかけに病理構造物の成分が明らかにされる可能性は十分にあり、今後こちらの原因遺伝子同定は注視していく必要がある。

おわりに

神経変性疾患に見られる異常病理構造物の主なものはこの20年くらいの間にその構成成分が明らかになってきた。この前頭側頭型認知症に見られるユビキチン陽性封入体は残った最後の主要な封入体といわれている。近年、神経変性疾患の患者脳内に見出される特徴的病理構造物に蓄積する蛋白質の異常が遺伝学的の裏付けでもって発症に深く関係することが示されてきたことを考えると、このユビキチン封入体の構成成分を明らかにすることが、ピック小体を伴わないピック病 (PiD-UI, FTD-U)、さらには運動ニューロン疾患を伴う認知症 (ALS-D, MNDID) の病態解明の鍵になるものと思われる。

謝 辞

本研究のために貴重な脳試料をご供与下さっ

た吉田眞理先生, 橋詰良夫先生に深謝致します。

----- 文 献 -----

1. Arai T, Ikeda K, Akiyama H et al (2001) Distinct isoforms of tau aggregated in neurons and glial cells in brains of patients with Pick's disease, corticobasal degeneration and supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 101: 167-173.
2. Brown J, Ashworth A, Gydesen S, Sorensen A, Rossor M, Hardy J, Collinge J (1995) Familial non-specific dementia maps to chromosome 3. *Hum Mol Genet* 4: 1625-1628.
3. Cannon A, Baker M, Boeve B, Josephs K, Knopman D, Petersen R, Parisi J, Dickison D, Adamson J, Snowden J, Neary D, Mann D, Hutton M, Pickering-Brown SM (2006) CHMP2B mutations are not a common cause of frontotemporal lobar degeneration. *Neurosci Lett* Jan 20; [Epub ahead of print]
4. Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N et al (1996) Specific pathological tau protein variants characterise Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 159-168.
5. 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, Lees A (2003) Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29: 288-302.
6. Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M (1998) Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 437: 207-210.
7. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T (2002) Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem* 277: 49071-49076.
8. Hosler B, Siddique T, Sapp PC et al (2000) Linkage of familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with Frontotemporal Dementia to chromosome 9q21-22. *JAMA* 284: 1664-1669.
9. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P et al (1998) Coding and 5' splice mutations in tau associated with inherited dementia (FTDP-17). *Nature* 393: 702-705.
10. Joachim CL, Morris JH, Kosik KS, Selkoe DJ (1987) Tau antisera recognize neurofibrillary tangles in a range of neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 22: 514-520.
11. Ikeda K, Tsuchiya K (2004) Motor neuron disease group accompanied by inclusions of unidentified protein signaled by ubiquitin. *Neuropathology* 24: 117-124.
12. Kobayashi T, Ota S, Tanaka K, Ito Y, Hasegawa M, Umeda Y, Motoi Y, Takanashi M, Yasuhara M, Anno M, Mizuno Y, Mori H (2003) A novel L266V mutation of the tau gene causes frontotemporal dementia with a unique tau pathology. *Ann Neurol* 53: 133-137.
13. Mackenzie IR, Baker M, West G, Woulfe J, Qadi N, Gass J, Cannon A, Adamson J, Feldman H, Lindholm C, Melquist S, Pettman R, Sadovnick AD, Dwosh E, Whiteheart SW, Hutton M, Pickering-Brown SM (2006) A family with tau-negative frontotemporal dementia and neuronal intranuclear inclusions linked to chromosome 17. *Brain*. Jan 9; [Epub ahead of print]
14. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1993) Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10: 1151-1160.
15. Morita M, Al-Chalabi A, Andersen PM, Hosler B, Sapp P, Englund E, Mitchell JE, Habgood JJ, de Belleruche J, Xi J, Jongjaroenprasert W, Horvitz HR, Gunnarsson LG, Brown RH Jr. A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology*. 2006 Jan 18; [Epub ahead of print]
16. Munch C, Rosenbohm A, Sperfeld AD, Uttner I, Reske S, Krause BJ, Sedlmeier R, Meyer T, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC (2005) Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann Neurol* 58: 777-780.
17. Murayama S, Mori H, Ihara Y, Tomonaga M (1990) Immunocytochemical and ultrastructural studies of Pick's disease. *Ann Neurol* 27: 394-405.
18. Murrell JR, Spillantini MG, Zolo P, Guazelli M, Smith MJ, Hasegawa M, Redi F, Crowther RA, Pierri P, Ghetti B, Goedert M (1999) Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 1207-1226.
19. Neumann M, Schulz-Schaeffer W, Crowther RA, Smith MJ, Spillantini MG, Goedert M (2001) Kretzschmar HA. Pick's disease associated with the novel tau gene mutation K369I. *Ann Neurol* 50: 503-513.

20. Okamoto K, Hirai S, Yamazaki T, Sun XY, Nakazato Y (1991) New ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the extra-motor cortices in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 129 : 233-236.
21. Okamoto K, Murakami N, Kusaka H, Yoshida M, Hashizume Y, Nakazato Y, Matsubara E, Hirai S (1992) Ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the extramotor cortices of presenile dementia patients with motor neuron disease. *J Neurol* 239 : 426-430.
22. Pickering-Brown SM, Baker M, Yen S-H, Liu W-K, Hasegawa M, Cairns NJ, Lantos PL, Rossor M, Iwatsubo T, Davies Y, Allsop D, Furlong R, Owen F, Hardy J, Mann DMA, Hutton M (2000) Pick's disease is associated with mutations in the tau gene. *Ann Neurol* 48 : 859-867.
23. Rademakers R, Cruts M, Dermaut B, Sleegers K, Rosso SM, Van den Broeck M, Backhovens H, van Swieten J, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2002) Tau negative frontal lobe dementia at 17q21: significant finemapping of the candidate region to a 4.8 cM interval. *Mol Psychiatry* 7 : 1064-1074.
24. Rizzini C, Goedert M, Hodges J, Smith MJ, Jakes R, Hills R, Xuereb RH, Crowther RA, Spillantini MG (2000) Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 : 990-1001.
25. Rosso SM, van Herpen E, Deelen W, Kamphorst W, Severijne L-A, Willemsen R, Ravid R, Niermeijer MF, Dooijes D, Smith MJ, Goedert M, Heutink P, van Swieten JC (2002) A novel tau mutation, S320F, causes a tauopathy with inclusions similar to those in Pick's disease. *Ann Neurol* 51 : 373-576.
26. Rosso SM, Kamphorst W, de Graaf B, Willemsen R, Ravid R, Niermeijer MF, Spillantini MG, Heutink P, van Swieten JC (2001) Familial frontotemporal dementia with ubiquitin-positive inclusions is linked to chromosome 17q21-22. *Brain* 124 : 1948-1957.
27. Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Wattez A, Delacourte A (1997) Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett* 412 : 578-582.
28. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sorensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37 : 806-808.
29. Taniguchi S, McDonagh AM, Pickering-Brown SM, Umeda Y, Iwatsubo T, Hasegawa M and Mann DMA (2004) The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration with respect to the cytological and biochemical characteristics of tau protein. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30 : 1-18.
30. Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Van Deerlin VMD et al (2001) Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 49 : 165-175.

Biochemistry of frontotemporal dementia

Masato Hasegawa

Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry

Frontotemporal dementia (FTD) is a clinical syndrome arising from the degeneration of the frontal and temporal lobes of the brain. Genetic analysis of familial FTD cases demonstrated that a proportion of FTD resulted from mutations in the tau gene on chromosome 17. So far, all FTD cases with tau gene mutations have shown tau pathology in the affected region of the brains, suggesting a close link between tau mutations and the filamentous tau inclusions. However, no tau pathology has been detected in about 60% of FTD cases. In the FTD cases without tau pathology, unique tau-negative, ubiquitin-positive inclusions have been reported and the presence of the inclusions is becoming increasingly recognized as the most common subtype of FTD. Identification of the ubiquitin-target protein in the inclusion bodies in FTD patients may play a key role in the elucidation of the pathogenesis of FTD and may establish a new proteinopathy.

Address correspondence to Dr. Masato Hasegawa, Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry (2-1-8, Kamikitazawa, Setagayaku, Tokyo 156-8585, Japan)

A Ganglioside-induced Toxic Soluble A β Assembly ITS ENHANCED FORMATION FROM A β BEARING THE ARCTIC MUTATION*

Received for publication, June 29, 2006, and in revised form, November 27, 2006. Published, JBC Papers in Press, November 29, 2006, DOI 10.1074/jbc.M606202200

Naoki Yamamoto^{‡5}, Etsuro Matsubara[‡], Sumihiro Maeda^{¶1}, Hirohisa Minagawa[‡], Akihiko Takashima^{¶1},
Wakako Maruyama^{¶1}, Makoto Michikawa[‡], and Katsuhiko Yanagisawa^{‡1}

From the Departments of [‡]Alzheimer's Disease Research and [¶]Geriatric Medicine, National Institute for Longevity Sciences, National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu 474-8522, Japan, the ⁵Japan Society for the Promotion of Sciences, Tokyo 102-8472, Japan, and the [¶]Laboratory for Alzheimer's Disease, RIKEN Brain Science Institute, Wako 351-0198, Japan

The mechanism underlying plaque-independent neuronal death in Alzheimer disease (AD), which is probably responsible for early cognitive decline in AD patients, remains unclarified. Here, we show that a toxic soluble A β assembly (TA β) is formed in the presence of liposomes containing GM1 ganglioside more rapidly and to a greater extent from a hereditary variant-type ("Arctic") A β than from wild-type A β . TA β is also formed from soluble A β through incubation with natural neuronal membranes prepared from aged mouse brains in a GM1 ganglioside-dependent manner. An oligomer-specific antibody (anti-Oligo) significantly suppresses TA β toxicity. Biophysical and structural analyses by atomic force microscopy and size exclusion chromatography revealed that TA β is spherical with diameters of 10–20 nm and molecular masses of 200–300 kDa. TA β induces neuronal death, which is abrogated by the small interfering RNA-mediated knockdown of nerve growth factor receptors, including TrkA and p75 neurotrophin receptor. Our results suggest that soluble A β assemblies, such as TA β , can cause plaque-independent neuronal death that favorably occurs in nerve growth factor-dependent neurons in the cholinergic basal forebrain in AD.

The poor correlation between amyloid load in the brain and the degree of neurological deficits in patients with Alzheimer disease (AD)² (1) or animal models of AD (2, 3) argues against amyloid fibrils being the primary toxic A β species. Recently, soluble A β assemblies, also referred to as A β oligomers (4), protofibrils (5, 6), or A β -derived diffusible ligands (7), have attracted attention because of their potency to impair neuronal function or induce neuritic degeneration (7–13). Several possi-

bilities have been proposed in regard to the toxicities of soluble A β assemblies (e.g. the binding of assemblies to target molecules on neuronal membranes (7, 14) and the ubiquitous disruption of the plasma membrane in association with the perturbation of ionic homeostasis (15)). It is also noteworthy that neurotoxicities induced by soluble A β assemblies are mediated, at least in part, by the activation of signal transduction pathways, including those involving Src family kinases, extracellular signal-regulated kinase, or sphingomyelinases (7, 11, 16, 17). Notably, the level of soluble A β assemblies increases in the brain and cerebrospinal fluid of AD patients (18, 19, 20, 21, 22), and oligomer-specific immunoreactivity is readily observed in the AD brain (23). Furthermore, the inhibition of long term potentiation and the impairment of cognitive function *in vivo* can be induced by natural A β oligomers (9, 24) or a specific A β assembly called A β *56, which has recently been isolated from Tg2576 mice (expressing a human amyloid precursor protein variant-linked familial AD) (25). Additionally, recent studies using AD mouse models revealed that soluble A β assemblies may play a role in the induction of tau pathology (26) and that the genetic deletion of β -secretase, which is responsible for A β production, rescues temporal memory deficit in conjunction with the suppression of the increase in the levels of cerebral A β -derived diffusible ligands (27). These lines of evidence indicate the pathological relevance of these soluble A β assemblies in AD development. However, it remains to be elucidated how these assemblies are formed *in vivo*.

Several mutations within the A β sequence have been reported to be responsible for the development of familial AD and hereditary cerebral amyloid angiopathy (28–32). Among these mutations, the Arctic mutation, unlike other mutations, accelerates the development of clinical and neuropathological features indistinguishable from those of sporadic AD, although it does not increase A β 42 level or A β 42/A β 40 ratio (30). The pathological features induced by the Arctic mutation, including predominant A β deposition in the brain parenchyma, have also been confirmed in transgenic mice (33). Notably, A β bearing the Arctic mutation shows a propensity to form neurotoxic nonamyloid assemblies, including protofibrils, amyloid pores, and small nonfibrillar assemblies (13, 30, 34). Thus, researchers have focused on the Arctic mutation in terms of the mechanisms underlying the formation of soluble and insoluble A β assemblies.

In regard to the assembly of wild-type and hereditary variant-type A β s, we have recently observed that Arctic-type A β , unlike other hereditary variant-type A β s (*i.e.* Dutch-type, Italian-type,

* This study was supported by Grant-in-aid for Scientific Research on Priority Areas 1700220004, Research on Pathomechanisms of Brain Disorders, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Alzheimer's Disease Research, National Institute for Longevity Sciences, National Center for Geriatrics and Gerontology, 36-3 Gengo, Morioka, Obu 474-8522, Japan. Tel.: 81-562-44-5651 (ext. 5002); Fax: 81-562-44-6594; E-mail: katsuhiko@nils.go.jp.

² The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; TA β , toxic soluble A β assembly; NGF, nerve growth factor; LDH, lactate dehydrogenase; siRNA, small interfering RNA; AFM, atomic force microscopy; GM1, Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Ac- α 2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1-ceramide; ThT, thioflavin-T; NTR, neurotrophin receptor.

and Flemish-type A β s), preferably assembles in the presence of GM1 ganglioside, as does wild-type A β (35, 36). We also reported that GM1 ganglioside level increases in synaptosomes prepared from aged, human apolipoprotein E4 knock-in mice (37). Thus, it is possible that an alteration in the expression or distribution of GM1 ganglioside is the background to the assembly and deposition of A β in the brain parenchyma. This possibility has been supported by findings of recent studies as follows: 1) GM1 ganglioside level increases in membrane microdomains isolated from the frontal cortex but not from the temporal cortex, reflecting earlier and later stages of AD pathology, respectively (38), and 2) GM1 ganglioside level also increases in amyloid-positive nerve terminals obtained from the AD cortex (39).

In this study, we aimed to characterize the toxicity of assemblies formed from Arctic-type A β in the presence of GM1 ganglioside. We found that a toxic soluble A β assembly (TA β) is formed more rapidly and to a greater extent from Arctic-type A β in the presence of GM1 ganglioside than from wild-type A β . Furthermore, our results suggest that TA β induces nerve growth factor (NGF) receptor-mediated neuronal death. Thus, we propose that soluble A β assemblies, such as TA β , are responsible for plaque-independent neuronal death that favorably occurs in NGF-dependent neurons in AD.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Seed-free A β Solutions and Liposomes—Synthetic wild-type A β (A β 40) and Arctic-type A β (A β 40) (Peptide Institute, Osaka, Japan) were dissolved in 0.02% ammonia solution at 500 μ M. To obtain seed-free A β solutions, the prepared solutions were centrifuged at 540,000 \times *g* for 3 h using an Optima TL ultracentrifuge (Beckman) to remove undissolved peptides that can act as preexisting seeds. The supernatant was collected and stored in aliquots at -80°C until use. Immediately before use, the aliquots were thawed and diluted with Tris-buffered saline (150 mM NaCl and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). To prepare liposomes, cholesterol (Sigma), sphingomyelin (Sigma), and GM1 ganglioside (Matreya LLC) were dissolved in chloroform/methanol at a molar lipid ratio of 50:50:0, 45:45:10, 42.5:42.5:15, or 40:40:20. The mixtures were stored at -80°C until use. Immediately before use, the lipids were resuspended in Tris-buffered saline at a ganglioside concentration of 2.5 mM, and the suspension was subjected to freezing and thawing and sonication.

Cell Culture—Cerebral cortical neurons were prepared from embryonic day 17 Sprague-Dawley rats and cultured in a serum-free medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture and N2 supplement. Rat pheochromocytoma PC12 (PC12) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (Invitrogen) and 5% fetal bovine serum (Invitrogen). For their differentiation, PC12 cells were plated on 2-cm² poly-L-lysine-coated (10 mg/ml) dishes at a density of 20,000 cells/cm² and cultured for 6 days in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 100 ng/ml NGF (PC12N) (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel). Human neuroblastoma SH-SY5Y (SY5Y) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 medium supplemented with

A Ganglioside-induced Toxic Soluble A β Assembly

10% fetal bovine serum. All of the cells were cultured in humidified 5% CO₂ at 37 $^{\circ}\text{C}$.

A β Incubation in the Presence of GM1 Ganglioside—A seed-free A β solution was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 50 μ M, unless otherwise indicated, in the presence or absence of GM1 ganglioside-containing liposomes, as previously reported (40). The concentration of GM1 ganglioside in the incubation mixtures was 500 μ M, and the molar ratio of GM1 ganglioside in the liposomes varied, as indicated in each figure.

ThT Assay—A β solutions were incubated in the presence of liposomes at 50 μ M and 37 $^{\circ}\text{C}$ for various durations. The ThT fluorescence intensity of the incubation mixtures was determined using a spectrofluorophotometer (RF-5300PC) (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The optimum fluorescence intensity of amyloid fibrils was measured at excitation and emission wavelengths of 446 and 490 nm, respectively, with the reaction mixture (1.0 ml) containing 5 μ M ThT and 50 mM glycine-NaOH at pH 8.5. The fluorescence intensity was measured immediately after preparing the mixture.

LDH Release Assay—The LDH assay was performed on medium using an LDH assay toxicity kit (Promega, Madison, WI). The degree of LDH release in each sample was assessed by measuring absorbance at 490 nm using an Emax precision microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Background absorbances, as assessed using cell-free wells, were subtracted from the absorbances of each test sample. Absorbances measured from three wells were averaged, and the percentage degree of LDH release was calculated by dividing the absorbance measured from each test sample following treatment with 1% Triton X-100 to induce the release of intracellular LDH according to instructions provided by the manufacturer.

Electron and Atomic Force Microscopies—For electron microscopy, the samples were diluted with distilled water and spread onto carbon-coated grids. The grids were negatively stained with 2% uranyl acetate and examined under a JEM-2000EX transmission electron microscope (Tokyo, Japan) with an acceleration voltage of 100 kV. Atomic force microscopy (AFM) assessment was performed as described elsewhere (41). Briefly, the samples were dropped onto a freshly cleaved mica. After leaving them to stand for 3 min and then washing with water, the samples were assessed in a solution using a Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) set in the tapping mode (42). OMCL-TR400PSA (Olympus, Japan) was used as a cantilever. The resonant frequency was \sim 9 kHz.

Size Exclusion Chromatography—The molecular mass of TA β was determined using a Superose 12 size exclusion column (1 \times 30 cm; GE Healthcare) equilibrated with phosphate-buffered saline (pH 7.4) at a flow rate of 0.5 ml/min. Thirty-five fractions were collected and analyzed by dot blotting using anti-Oligo.

Preparation of Synaptosomes—Synaptosomes were prepared as previously described (43). A hippocampus or a whole brain minus the hippocampus was homogenized in 0.32 M sucrose buffer containing 0.25 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 580 \times *g* for 8 min. The supernatant was centrifuged at 145,000 \times *g* for 20 min. The resulting pellet was suspended in 0.32 M sucrose buffer without EDTA and layered over Ficoll in sucrose buffer. Following centrifugation at 87,000 \times *g* for 30