

## 患者脳に蓄積する異常蛋白質の組織病理、生化学解析

研究分担者：長谷川成人<sup>1)</sup>

研究協力者：村山繁雄<sup>2)</sup>、小久保康昌<sup>3)</sup>、葛原茂樹<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人 東京都医学総合研究所 <sup>2)</sup> 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク

<sup>3)</sup> 三重大学 医学部 神経内科 <sup>4)</sup> 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部

### 研究要旨（10ポイント程度）

2012年に剖検となった Kii-PDC 患者 2 例の凍結脳 から胸髄と大脳皮質の細胞内異常タンパク質の病変について免疫組織、生化学解析を行った。2012-2, 2012-3 のいずれの症例においても、大脳皮質および胸髄の神経細胞にリン酸化 シヌクレインの蓄積が認められ、イムノプロット解析においても確認された。タウについては神経細胞やグリア細胞に陽性所見が認められたが、2012-2 例では血管周囲のグリア病変が目立っていたが、生化学解析から 6 種類のタウの蓄積の可能性が示唆された。一方、いずれの症例においても今回解析した組織においては TDP-43 の異常は検出できなかった。二例の症例については シヌクレインとタウの病変が臨床症状に関係している可能性が考えられる。

以下すべて 10 ポイント程度

#### A. 研究目的

三重県南部に多発する認知症-パーキンソン症候群の発症、病態形成機構を解明するため、2012年に剖検となった 2 例の患者脳、脊髄の細胞内異常タンパク質の病変を免疫組織、生化学解析に解析する。

#### B. 研究方法

免疫組織染色は、凍結脳の一部をホルマリン固定後、ビブラトーム切片を作製し、免疫組織染色を行った。生化学解析は、凍結脳からサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、イムノプロット解析した。タウに関しては、不溶性画分の一部を 6M グアニジン塩酸に可溶化、透析後にアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行い、蓄積タウのアイソフォーム構成を調べた。用いた抗体は、リン酸化タウを検出する AT8 と pS396、非リン酸化タウを検出する HT7 と T46、リン酸化  $\alpha$  シヌクレインに対する抗体 mAb PS129、リ

ン酸化 TDP-43 を検出する抗体 mAb pS409/410 である。

(倫理面への配慮)

剖検脳の免疫組織、生化学解析については東京都医学総合研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

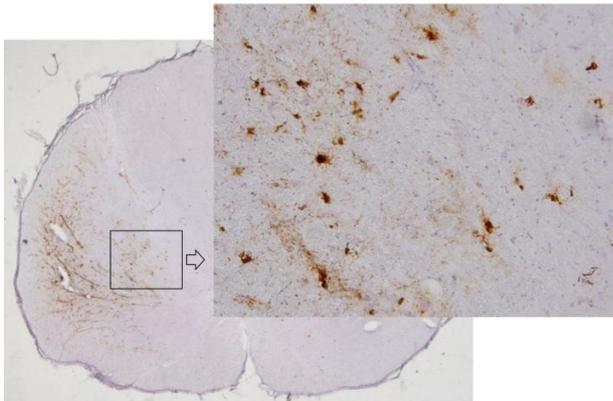
#### C. 研究結果

##### 1. 症例番号 2012-2 (PDC)の免疫組織染色

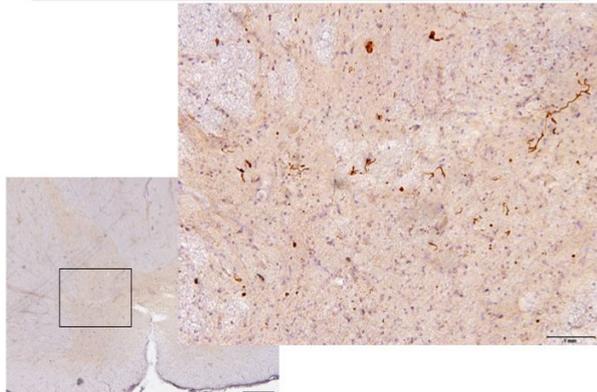
2012-2 例 (60 歳にパーキンソニズムで発症され、72 歳で亡くなられた女性、大家系の 1 員) について、側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。側頭様、胸髄とも一部の血管周囲のグリア細胞が AT8 強陽性を示し、加えて白質に astrocytic plaque 様の病変が観察された。また灰白質には神経細胞内のタウ病変(NFT)も観察された。また、多数のリン酸化 シヌクレイン陽性の皮質型レビー小体やレビー突起と思われる病変が皮質及び胸髄の灰白質に認められた。

一方、TDP-43 の異常病変は今回調べた組織においては検出できなかった。

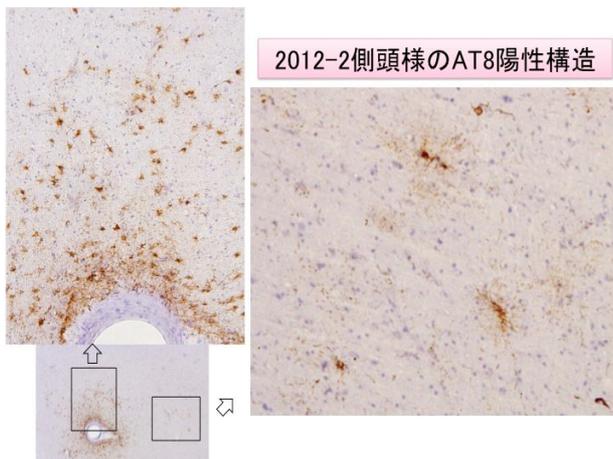
2012-2胸髄のAT8陽性構造物



2012-2胸髄のリン酸化 $\alpha$ シヌクレイン陽性構造物

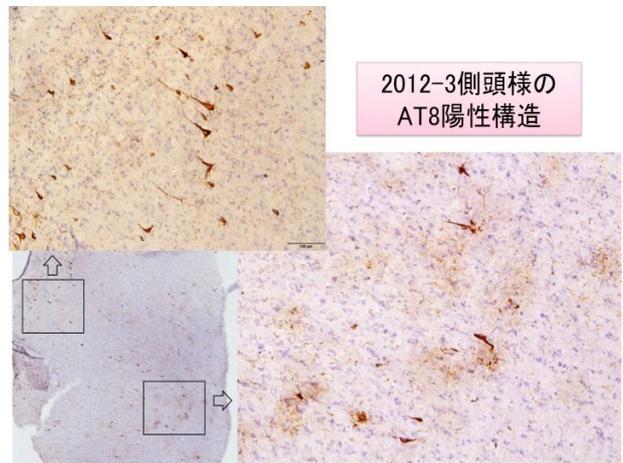


2012-2側頭様のAT8陽性構造

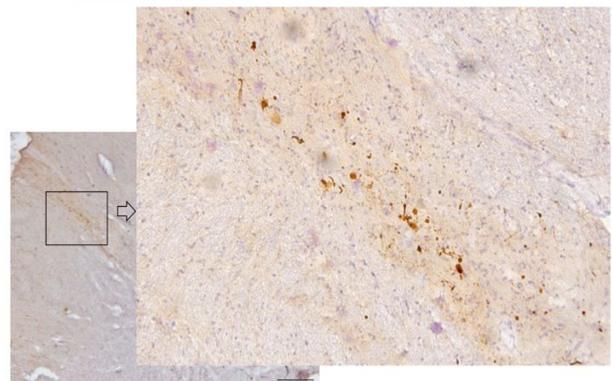


2012-2 例のような血管周囲のグリアのタウ病変は明らかではないが、側頭様の白質に astrocytic plaque 様のタウ陽性構造物が多数認められ、また神経細胞にも多数の NFT が観察された。胸髄のタウ病変はごく少数の神経細胞に認められるのみであった。一方、リン酸化 シヌクレインの病変は側頭様だけでなく、胸髄の神経細胞においても強く認められた。TDP-43 の異常所見は側頭様、胸髄のいずれにおいても検出できなかった。

2012-3側頭様のAT8陽性構造



2012-3 胸髄のpSyn (PS129)陽性構造物



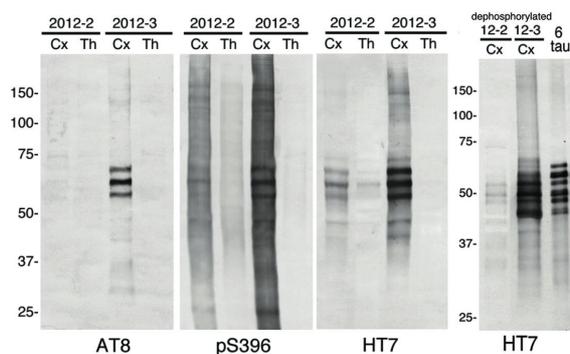
## 2. 症例番号 2012-3 (PDC)の免疫組織染色

2012-3 例 (60歳にパーキンソニズムで発症され、75歳で亡くなられた男性)について、同様に側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。

## 3. 蓄積タンパク質の生化学解析

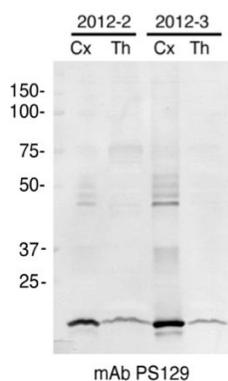
2012-2, 3 の凍結組織より、サルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、抗タウ抗体、あるいは抗リン酸化 シヌクレイン、抗 TDP-43 抗体にてイムノプロット解析を行った。その結果、2012-3 の側頭葉に AT8, HT7 で強い AD-type のリン酸化タウバンド(60, 64, 68kD のトリプレッ

ト)が観察され、2012-2 の側頭様でも HT7 で類似のバンドが検出された。また 2012-2 胸髄にも弱いながら pS396, HT7 で陽性所見が観察された。2012-2, 3 の側頭様のタウに関してはアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行ったところ、HT7 にて 3 リピータウ及び 4 リピータウと同じ移動度のタウバンドが検出された。



一方、リン酸化 シヌクレイン抗体によるイムノプロットでは、2012-2, 2012-3 のいずれの症例においても皮質に強い陽性バンドが検出され、胸髄にも弱いながら同様の陽性所見が検出された。高分子側にユビキチン化 シヌクレインと思われるバンドも検出され、そのバンドパターンは DLB のそれと似ていると思われた

不溶性  $\alpha$  Syn のイムノプロット解析



一方、リン酸化 TDP-43 のバンドは検出されなかった。

#### D. 考察

今回解析した 2 例の PDC 症例(2012-2、2012-3)

には、タウと Syn の病変が確認されたが、TDP-43 の病変は検出できなかった。いずれの症例も神経細胞だけでなく、グリア細胞、特にアストロサイト内の蓄積と思われるタウ病変が共通に観察された。一方、Syn の蓄積は神経細胞内に限られているように見えた。

生化学解析から、蓄積タウのバンドパターンは AD 型を示し、3 リピータウと 4 リピータウの両方のアソフォームの蓄積が確認された。組織病理からはアストロサイトなどのグリア細胞内のタウ蓄積が目立つことから、4 リピータウの蓄積が予想されたが、むしろ 3 リピータウのバンドが強く検出された。グリア細胞内に蓄積するタウが 3 リピータウを含むかどうかはアイソフォーム特異抗体などを用いて解析できれば明確になると思われるが、今回、3 リピータウ特異抗体(RD3), 4 リピータウ特異抗体(RD4)は、いずれもどの病変も染色せず、明らかにすることはできなかった。今後組織に様々な処理を施して、抗体のエピトープ露出した後で解析する必要があると思われる。

今回解析した組織には TDP-43 病変が認められなかった。一方、2 例とも Syn 病変が側頭様皮質だけでなく、脊髄の神経細胞にも強く検出された。またタウ病変は 2 例とも皮質に強く検出されたが、2012-3 の脊髄には病変はごくわずかであった。以上のことは、解析部位の問題もあるかもしれないが、本症例に関しては、タウと Syn の異常病変が臨床症状と関係していて、特にリン酸化 シヌクレインの神経細胞内蓄積が脊髄の主要な病変である可能性が高いと考えられた。

#### E. 結論

今回解析した二例の PDC 患者(2012-2、2012-3)の 大脳皮質、胸髄にタウ、Syn の蓄積が検出されたが、TDP-43 の蓄積は確認できなかった。いずれの症例も神経細胞だけでなく、グリア細胞、特にアストロサイト内の蓄積と思われるタウ病変が共通に観察され、リン酸化 Syn の蓄積も神

経細胞内に共通に観察された。生化学解析から、蓄積タウのバンドパターンはAD型を示し、6種類のアソフォームの蓄積が確認された。また、SynのバンドパターンはDLBのそれと同様と思われた。

**F：健康危険情報**  
**特になし**

**G：研究発表**  
(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

**1：論文発表**

1). Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama M, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A (2012). Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. **Brain** 135; 3380–3391.

**2：学会発表**

- 1) Hasegawa M, et al (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. The 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.
- 2) Nonaka T, et al (2012) Intracellular seeding model reproduces characteristic feature of affected neurons in TDP-43 proteinopathy. The 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.
- 3) Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M (2012) Inoculation of recombinant alpha-synuclein fibrils can induce alpha-synuclein pathology in wild-type mice. The 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.

**H：知的所有権の取得状況（予定を含む）**

**1：特許取得**

1) 神経変性疾患関連タンパク質の不溶性凝集体の増幅方法, 野中隆, 増田雅美, 山下万喜子, 秋山治彦, 長谷川成人,  
国際出願番号 PCT/JP2012/062794  
国際出願日 2012/05/18

**2：実用新案登録**

なし

**3：その他**

2012年9月、英国科学雑誌「Brain (ブレイン)」での論文発表について、東京都広報部よりプレスリリースすると共に、東京都医学総合研究所のホームページにて成果の概要を掲載。  
<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2012/0908.html>