

## 神経変性疾患と蓄積する蛋白について 新しい変性蛋白 (TDP-43) を含めて

(財) 東京都医学研究機構 東京都精神医学総合研究所  
老年期精神疾患研究チーム

羽賀千恵、新井哲明、秋山治彦

神経変性疾患とは、中枢神経系の神経細胞が徐々に変性して細胞死に陥る進行性疾患をさす。アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) や、パーキンソン病 (Parkinson's disease : PD)、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) などがよく知られているが、それ以外にも多数の疾患がある。この十数年の間に分子生物学的な研究の発展により、家族性に発病する神経変性疾患において原因遺伝子の同定が進んだ。例えば、ハンチントン病ではハンチンチンという蛋白質、家族性 AD ではアミロイド前駆体蛋白 (APP) やプレセリニンという蛋白質の遺伝子異常が見出された。また、神経変性疾患の脳や脊髄に疾患特異的に蓄積する蛋白質の同定も進んだ。AD ではアミロイドβ蛋白質 (Aβ) とタウ、PD ではα-シヌクレインが異常蓄積することが明らかになり、これらを検出することが病理診断において重要な意味を持つようになった。さらに、タウの遺伝子異常がパーキンソニズムを伴う家族性前頭側頭型認知症 (FTDP-17) の一部を、α-シヌクレインの遺伝子異常が家族性 PD を引き起こすことから、これらの異常蓄積蛋白質は神経変性疾患の病因・病態において、本質的な役割を果たしていると考えられるようになった。今日、タウやα-シヌクレインが異常蓄積する変性疾患群は、それぞれタウオパチー (tauopathy)、シヌクレイノパチー (α-synucleinopathy) と総称されている。しかし、研究が進むにつれて、個々の疾患に特異的であると思われていた蛋白質が、しばしば他の神経変性疾患に蓄積していることもわかってきた。これらの知見は、個々の神経変性疾患症例を評価するにあたり、従来の神経解剖学的な病変分布に加えて、異常蓄積している蛋白質の種類、量などを明らかにすることが重要であることを示している。将来、異常蛋白質蓄積を解消して疾患の進行を止める治療法が開発されると考えられるが、診断の最も重要な目的が適切な治療法選択にあるとすれば、神経変性疾患の分類自体を見直す必要が出てくるかも知れない。

### 1) タウオパチー (tauopathy) について

タウは微小管結合蛋白質のひとつで、微小管の形成を促進し安定化する働きを持っている。AD やその他のタウオパチー脳に蓄積したタウは、多くの部位で異常なリン酸化が生じるとともに、凝集して線維状の構造をとるといった特徴がある。タウオパチーに属する疾患には、AD に加え、神経原線維型老年認知症 (tangle only dementia)、嗜銀顆粒病 (grain disease)、進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy : PSP と略)、皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration : CBD と略)、ピック病 (Pick's disease) や、FTDP-17 のうちタウ遺伝子異常によって引き起こされるものなどが挙げられる (表 1)。

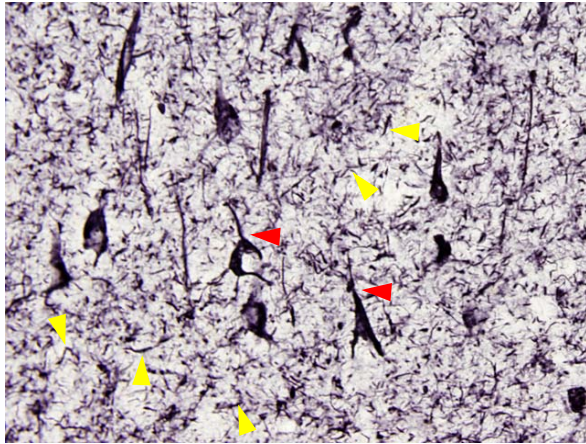
AD をはじめ多くの疾患で、タウは神経細胞の細胞体や神経突起に蓄積し、神経原線維変化 : neurofibrillary tangle (NFT と略す) や neuropil thread と呼ばれる形態をとることが多いが (図 1a)、ピック病では球状の蓄積を示し、ピック球と呼ばれる (図 1b)。一方、CBD や PSP などでは、タウはグリア細胞にも蓄積し、アストロサイトの場合は tuft-shaped astrocyte (図 1c)、astrocytic plaque (図 1d) など、オリゴデンドロサイトの場合は coiled body (図 1e)、argyrophilic thread (図 1f) など様々な形態をとる。

タウはエクソン-2、-3 と-10 のスプライシングによって計 6 種類の isoform が生じるが、エクソン-10 のスプライシングの違いにより、微小管結合部位の繰り返し配列が 3 つある 3 リピート (R) タウと 4 つある 4 リピート (R) タウとに大別される。異常蓄積するタウの isoform は変性疾患によって異なることが知られている。AD などの NFT では 6 種類すべての isoform が蓄積するのに対して、PSP や CBD では 4R タウが、ピック病では 3R タウが蓄積する。

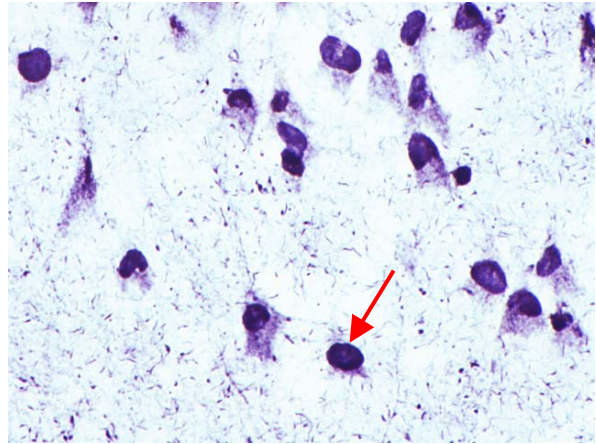


図1 タウ免疫染色

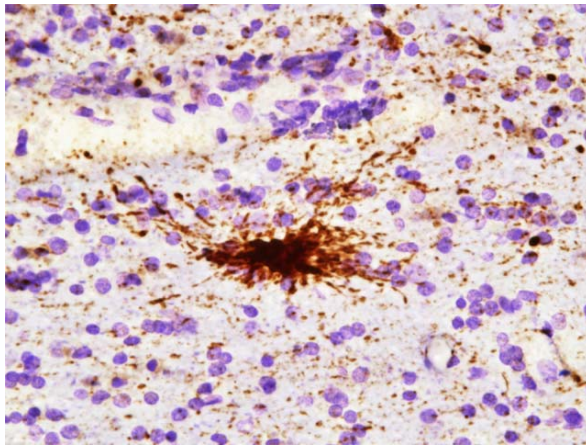
使用抗体 (図 1a~1f) : 抗 PHF タウマウスモノクローナル抗体 (AT-8)



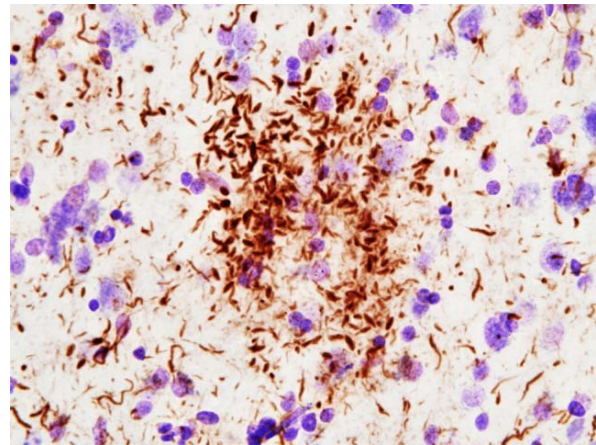
1a : アルツハイマー病 (AD) の新皮質第 V 層の神経原線維変化▲と neuropil threads▲



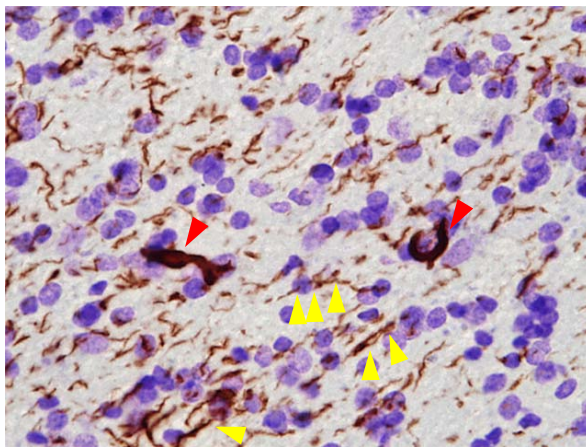
1b : ピック病 大脳皮質海馬のピック球↑



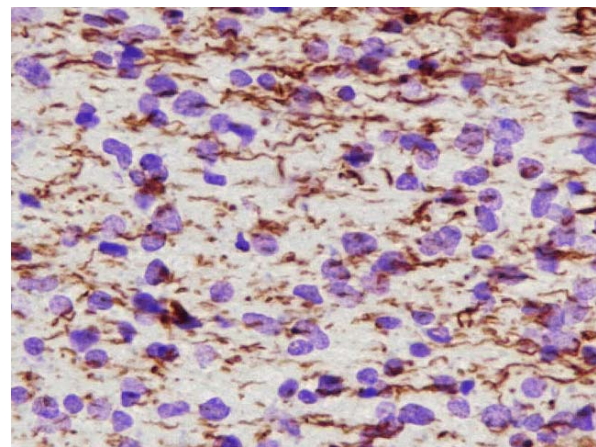
1c : 進行性核上麻痺 (PSP) の tuft-shaped astrocyte



1d : 皮質基底核変性症 (CBD) の astrocytic plaque



1e : 皮質基底核変性症 (CBD) の coiled body▲と argyrophilic threads▲



1f : 皮質基底核変性症 (CBD) の argyrophilic threads

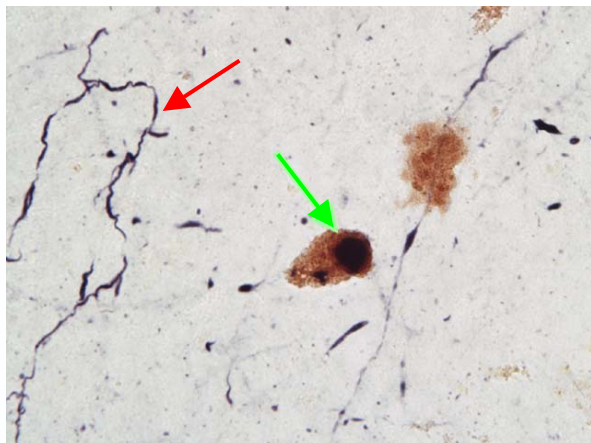
## 2) シヌクレイノパチー(synucleinopathy)について

シヌクレイノパチーは、 $\alpha$ -シヌクレインが蓄積する疾患群をさす。 $\alpha$ -シヌクレインの異常蓄積は病理組織学的には、レビー小体病 (Lewy body disease : LBD) のレビー小体・神経突起 (図 2a) と、多系統萎縮症 (multiple system atrophy: MSA と略す) のグリア細胞質封入体 (glial cytoplasmic inclusion: GCI, 図 2b) とがある。GCI は、MSA の変性部位に多く出現するオリゴデンドログリア細胞質への $\alpha$ -シヌクレイン蓄積であり、小脳や大脳基底核が好発部位である。

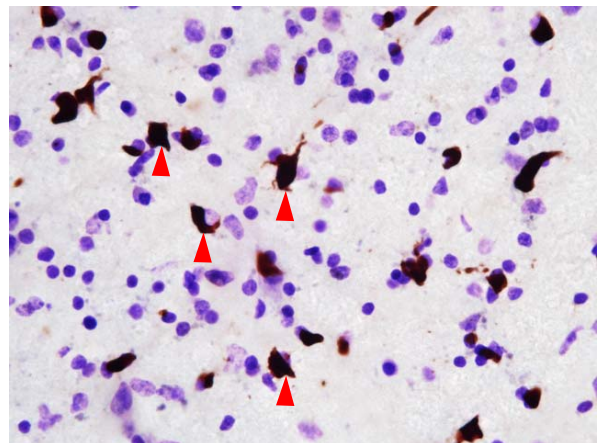
LBD は、臨床的には PD、認知症を伴う PD(Parkinson's disease with dementia: PDD)、レビー小体型認知症 (dementia with Lewy bodies: DLB) に分けられる。しかし、PD は経過と共に PD→PDD→DLB と移行することが多く、病理学的にもこれらを明確に区別することが難しいため、最近、LBD と総称することが提案されている。家族性に発病する PD や DLB の一部が、 $\alpha$ -シヌクレインの遺伝子異常が原因でおきることが知られている。したがって、シヌクレイノパチーと呼ばれる疾患群では、 $\alpha$ -シヌクレインの異常が病因・病態の中心であると考えられている。PD では主として中脳黒質、青斑核、迷走神経背側核などに多数のレビー小体の出現を認める。DLB では扁桃核、辺縁系皮質から大脳新皮質にレビー小体の分布が広がる。タウと同様、異常蓄積した $\alpha$ -シヌクレインはリン酸化されており、リン酸化 $\alpha$ -シヌクレイン特異抗体を使用した高感度免疫組織化学染色ではレビー小体に加えて、変性神経突起様、thread 様、dot 様の $\alpha$ -シヌクレイン蓄積 (図 2c) を観察することができる。

なお、DLB の多くは A $\beta$  やタウの蓄積も認め、AD と同じ病理変化を伴っている。本邦では、Lewy 病変と AD 病変を有する例を DLB という範疇としてとらえる傾向が強いのに対して、米国では AD としてとらえる傾向が強い。臨床的には AD 的な病像、DLB 的な病像というものはあるが、病理学的には、PD、PDD、DLB が連続的に移行するのと同様、DLB と AD の間にも明瞭な境界が認められるわけではない。

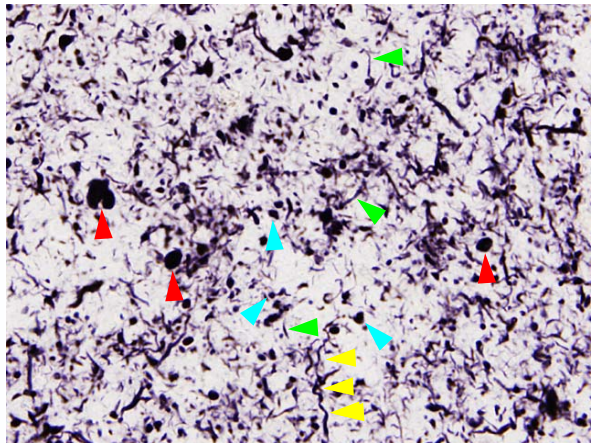
図 2  $\alpha$ -シヌクレイン免疫染色



2a : パーキンソン病 (PD) 黒質メラニン陽性細胞内のレビー小体↑とレビー神経突起↑  
使用抗体 : 抗 $\alpha$ -シヌクレインヤギポリクローナル抗体



2b : 多系統変性症 (MSA) のグリア細胞質封入体 GCI▲  
使用抗体 : 抗 $\alpha$ -シヌクレインマウスモノクローナル抗体 (pSyn#64)

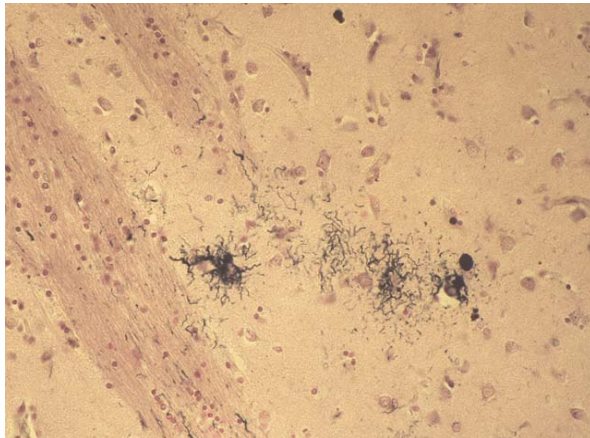


2c : びまん性レビー小体病 (DLB) 大脳皮質の $\alpha$ -シヌクレイン陽性構造 (Lewy body▲, neurites▲, threads▲, dots▲)  
使用抗体 : 抗 $\alpha$ -シヌクレインマウスモノクローナル抗体 (pSyn#64)

**\* タウオパチー、シヌクレイノパチーと Gallyas-Braak 変法について**

Gallyas-Braak 変法 (G-B 変法と略) は、もともと NFT を選択的に染色する目的で開発され使用されてきた。しかし、NFT だけではなく、他のタウオパチー・シヌクレイノパチーの一部も陽性に染色する。G-B 変法の特徴として、PSP や CBD のグリア細胞内タウ蓄積が強く染色される (図 3a、3b)。一方、ピック球の染色は弱い。このような違いが蓄積しているタウの isoform の違いと関係するという説もあるが定かではない。G-B 変法では、通常ホルマリン固定パラフィン標本の場合、レビー小体は染色されないが、GCI は陽性である (図 3c)。

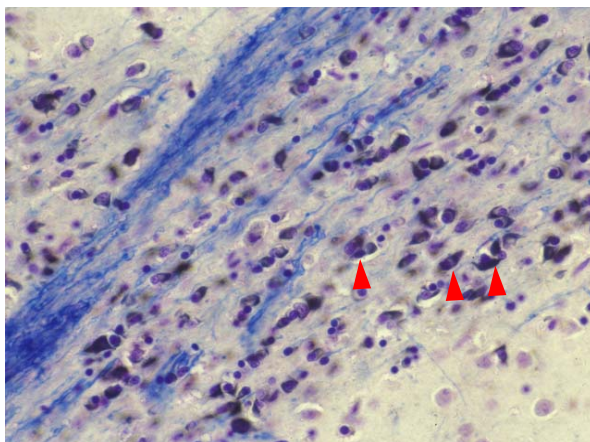
**図 3 Gallyas-Braak 変法鍍銀染色法**



**3a : 進行性核上麻痺 (PSP) tuft-shaped astrocyte**



**3b : 皮質基底核変性症 (CBD) argyrophilic threads**



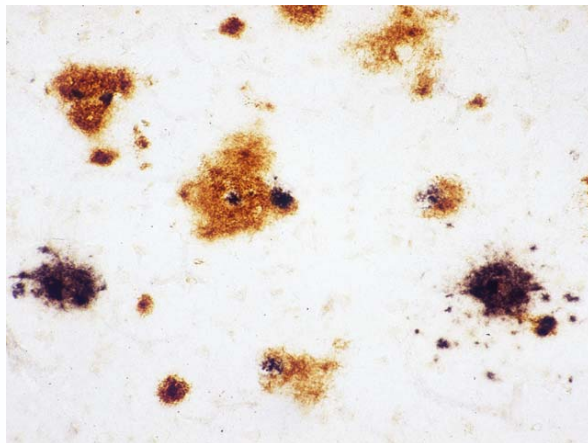
**3c : 多系統変性萎縮症 (MSA) のグリア細胞質封入体 (GCI) ▲**

### 3)AD とアミロイドβ 蛋白質について

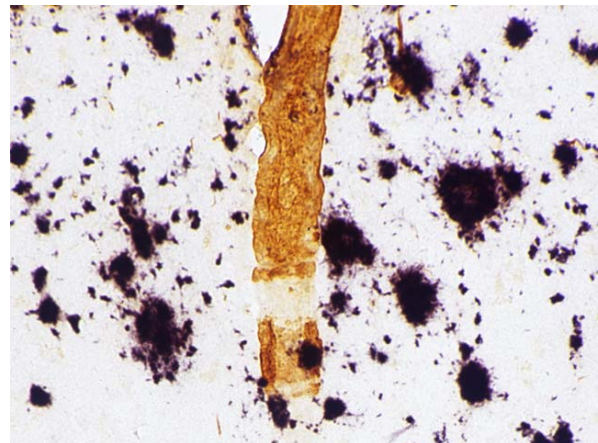
アミロイドβ蛋白質(Aβ)は、ADの本質的な病変と考えられている老人斑アミロイドの主要構成蛋白質である。また、ADや加齢に伴うアミロイドアンギオパチーの蓄積蛋白質でもある。Aβは、カルボキシ末端側の断端の違いにより、大まかにはAβ40とAβ42とに分けられる。Aβ42は不溶性・凝集性が強いいため蓄積しやすく、また、神経細胞毒性も強いと考えられている。老人斑はAβ42が先に蓄積して形成され、後からAβ40の蓄積が加わると推測されている(図4a)。アミロイドアンギオパチーの場合は、髄膜の動脈や髄膜から大脳皮質に貫通する動脈、脳実質の小動脈の場合はAβ40の割合が高く(図4b)、脳実質の毛細血管へのAβ沈着ではAβ42の割合が高い(図4c)。家族性ADの原因であるAPPやプレセニリンの遺伝子異常はAβの蓄積を促進する。したがって、Aβの蓄積はAD発病の根本的なメカニズムであると考えられており(アミロイドカスケード仮説)、今日、Aβ蓄積を解消することを目的とした治療薬開発や、PET、MRIを用いたAβ蓄積の検出法の開発が精力的に進められている。なお、タウやα-シヌクレインが神経細胞内に蓄積するのに対して、Aβは細胞外に蓄積する。そのため、Aβは病因蛋白質のひとつではあるが、タウオパチー、シヌクレイノパチーといった呼び方はなされていない。

#### 図4 Aβ免疫染色(アルツハイマー病:AD)

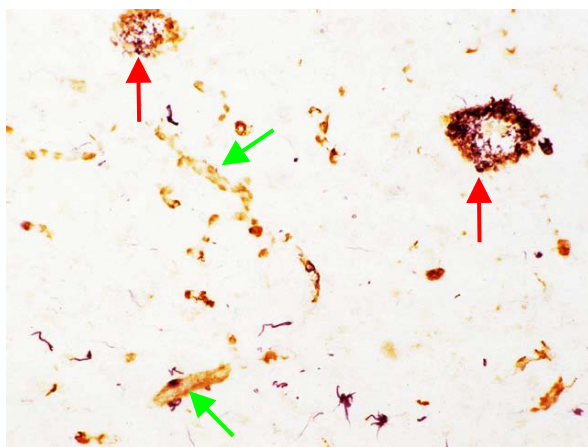
使用抗体(図4a~4c):抗Aβ40, Aβ42 ウサギポリクローナル抗体 大阪市立大学 森 啓先生



4a: Aβ40(紫色) / Aβ42(茶色) 二重染色  
Aβ42のみ蓄積している老人斑の方が、Aβ40, Aβ42両方が蓄積している老人斑よりも多い。



4b: Aβ42(紫色) / Aβ40(茶色) 二重染色  
中央の太いアミロイドアンギオパチーはAβ40でのみ染色されるが、周囲の老人斑はAβ42陽性である。



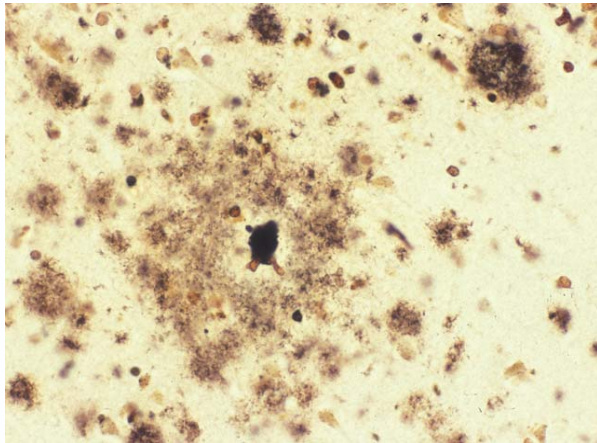
4c: Aβ40(紫色) / Aβ42(茶色) 二重染色  
毛細血管↑へのAβ蓄積は主としてAβ42であるため、この標本では茶色に染色される。老人斑↑にはAβ40, Aβ42両方が蓄積している。

### \* A $\beta$ 免疫染色とメセナミン銀染色

メセナミン銀法では、A $\beta$  免疫染色に近い老人斑の染色が可能であり（図 5）、特に、びまん性老人斑と呼ばれる密度の低い A $\beta$  蓄積については、Campbell-Switzer 法と並んで、他の鍍銀染色法よりも染色性がよいとされている。

図 5 メセナミン銀染色によるアルツハイマー病 (AD)

老人斑とびまん性 A $\beta$  沈着



### 4) 新しい変性蛋白の発見 (TDP-43) について

ピック球を欠き、タウ陰性ユビキチン陽性の封入体が海馬歯状回などに多数出現する前頭葉側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions: FTLD-U) では、そのユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白質が最近まで不明であった。また筋萎縮側索硬化症 (ALS) では、脊髄の運動ニューロンにスケインと呼ばれるユビキチン陽性封入体が出現するほか、一部の症例で臨床的に認知症を伴い、海馬歯状回などに FTLD-U と同様の病変を認めることが知られていた。2006 年秋に、Neumann ら、Arai らによって、これらのユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白質が trans activation responsive region (TAR) DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) であることが発見された。図 6a~6c は FTLD-U 海馬歯状回 (6a)、側頭葉皮質 (6b)、ALS 脊髄 (6c) の TDP-43 染色を示す。今日、ALS と FTLD-U は TDP-43 プロテオパチー (proteinopathy) として相互に関連する疾患と考えられている。TDP-43 はまた、グアム島や紀伊半島に発生する特異な ALS・パーキンソンニズム・認知症複合でも蓄積する。2008 年に入り、家族性に発病する ALS の一部が TDP-43 の遺伝子変異によることが明らかになった。これは TDP-43 異常が ALS の病因に直接関わっていること、すなわちこれらの疾患に本質的な異常であることを意味している。

TDP-43 は正常では核に存在し、中枢神経系の免疫染色では細胞核が陽性に染色される。ALS や FTLD-U において神経細胞が異常をきたすと、TDP-43 は細胞質に蓄積する一方、核には認められなくなる。また、ALS や FTLD-U で異常蓄積した TDP-43 はタウと同様、複数の部位でリン酸化されており、抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いることで、これらの疾患において異常に蓄積した TDP-43 を選択的に染色することができる。図 6d~6f はリン酸化特異抗体で染色した FTLD-U 海馬歯状回 (6d)、側頭葉皮質 (6e)、ALS 脊髄 (6f) である。最近の研究では、TDP-43 の異常蓄積は、量的には僅かであったり部位が限局したりしているが、注意深く観察することで AD や DLB の 30~50% でも検出されることが明らかになった。このように AD や DLB は A $\beta$ 、タウ、 $\alpha$ -シヌクレイン、TDP-43 という、神経変性疾患の主要蓄積蛋白質が症例ごとに異なる量・頻度で蓄積する疾患であることから、オーバラップ症候群という呼び方をされることもある。これからの神経変性疾患の病理診断においては、これら異常蛋白質の蓄積の量、分布などをきちんと評価することが必須である。



### 図6 TDP-43 免疫染色

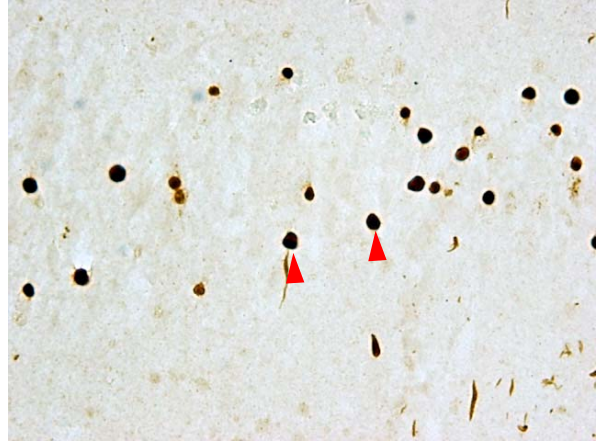
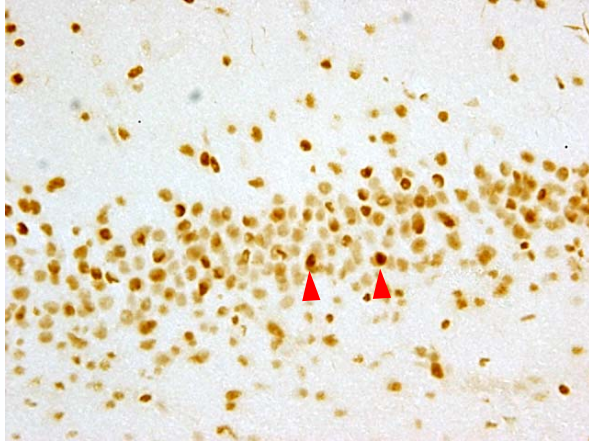
6a ~ 6c : リン酸化非特異抗体による染色

6d ~ 6f : リン酸化特異抗体による染色

リン酸化非特異抗体は細胞核に存在する正常な TDP-43 も染色するため、異常構造を同定しにくい。リン酸化 TDP-43 特異抗体は異常蓄積した TDP-43 のみを選択的に染色する。

使用抗体 (図 6a~6c) : 抗 TDP-43 ウサギポリクローナル抗体

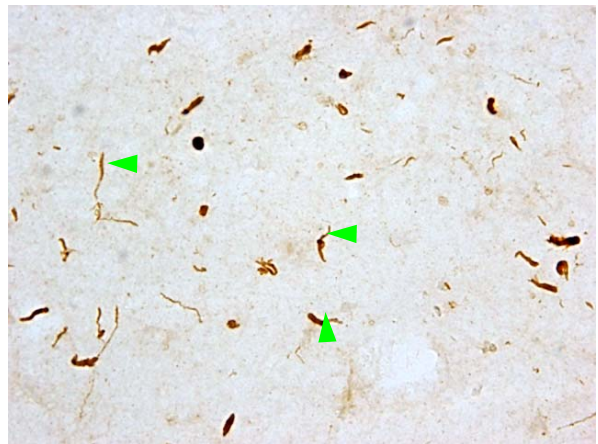
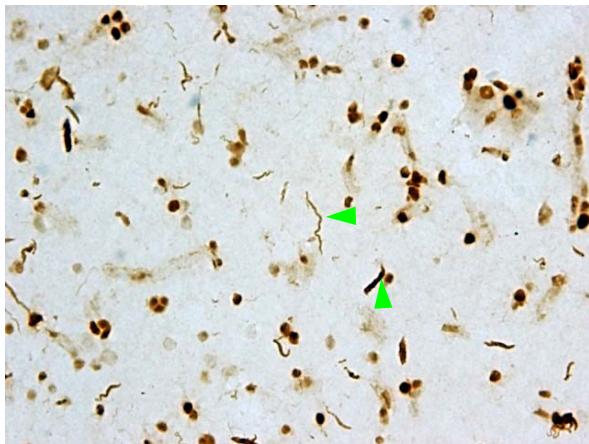
(図 6d~6f) : 抗 TDP-43 ウサギポリクローナル抗体 (自家製抗体)



6a

6d

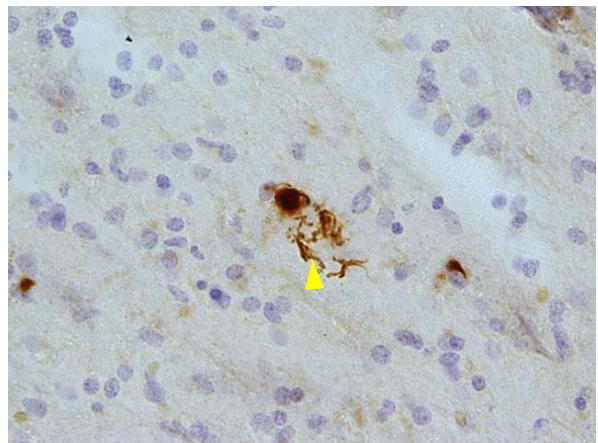
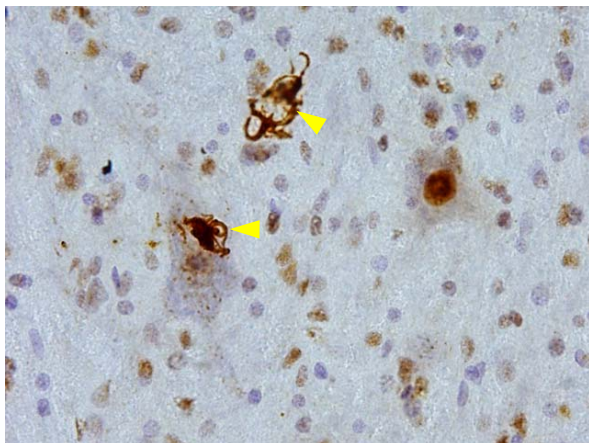
6a および 6d : 前頭側頭変性症 (FTLD-U) 海馬歯状回の顆粒細胞内封入体▲



6b

6e

6b および 6e : 前頭側等変性症 (FTLD-U) 側頭葉新皮質の変性神経突起▲



6c

6f

6c および 6f : 筋萎縮側索硬化症 (ALS) 脊髓前角のスケイン様封入体▲

表1 タウ異常蓄積を伴う疾患

アルツハイマー病 レビー小体型認知症* 神経原線維型老年認知症 石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病 嗜銀顆粒病 進行性核上性麻痺 皮質基底核変性症 ピック病（ピック球を伴う） FTDP-17（ただしタウ遺伝子異常によるもののみ） グアム島／紀伊半島の ALS・パーキンソン症候群・認知症複合 英国／デンマークの家族性認知症（BRI 蓄積症） エコノモ脳炎後遺症（脳炎後パーキンソン症候群） 亜急性硬化性脳炎 拳闘家（ボクサー）脳症 筋緊張性ジストロフィー
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

\*：少数だがタウ蓄積が少ないか、ほとんど認めない症例もある。

図に示した免疫染色方法の要約

1. 試料を H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> で 30 分間ブロッキングする。 10 分づつ 3 回 PBS で洗浄する。 2. 一次抗体（目的に応じた抗体、至適な倍率とする） 4℃ 一晚以上反応させる。 10 分づつ 3 回 PBS で洗浄する。 3. 二次抗体 x 1000 (ABC キット) 2 時間以上反応させる。 10 分づつ 3 回 PBS で洗浄する。 4. ABC 液 x 1000 2 時間以上反応させる。 10 分づつ 3 回 PBS で洗浄する。 5. DAB 反応 20 分～1 時間反応させる。 DAB 液 0.05M Tris Hcl Buffer 42.5ml DAB 5mg 1M imimidazole 液 2.5ml (10% Ammonium Nickel Sulfate 液 5.0ml) 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10～20 μl
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- DAB 反応の発色は、紫色にする場合は、DAB 基質液に 10%アンモニウムニッケル液をもちいたときである。また、茶色の発色では、アンモニウムニッケル液をもちいない。
- アンモニウムニッケルならびイミダゾールは、免疫発色反応の増感作用がある。
- 今回使用したパラフォルムアルデヒド短時間固定クライオカット標本の場合、ここで示した抗 PHF タウマウスモノクローナル抗体 (AT-8)、抗 α-シヌクレインヤギポリクローナル抗体、抗 α-シヌクレインマウスモノクローナル抗体 (pSyn #64)、抗 TDP-43 ウサギポリクローナル抗体では、上記の方法で染色できる。しかし、ホルマリン固定パラフィン標本の場合、抗体によっては、蟻酸処理、オートクレーブ処理などの免疫賦活法が必要な場合がある。また、同じホルマリン固定でも、たとえば固定期間などによって条件が違う場合もあるので、施設ごとに至適条件の設定をしていただくのが望ましい。
- α-シヌクレイン、TDP-43 はいずれもリン酸化抗体を使用した方が病変特異的染色となり、高い検出感度が得られる。pSyn#64 はリン酸化 α-シヌクレインに特異的である。



## 参考文献

- 長谷川 成人：タウオパチーとアルツハイマー病 *Dementia Japan* Vol 16 :22-30, 2002
- 小阪 憲司：シヌクレイノパチー 新たな展開 *Dementia Japan* Vol 21 : 1-7, 2007
- 新井 哲明, 他：FTLD および ALS に出現するユビキチン陽性封入体の主要構成成分としての TDP-43 の同定 *Dementia Japan* Vol 21 : 89-102, 2007
- 新井 哲明, 他：TDP-43 と FTLD-U 研究の新展開 *Dementia Japan* Vol 22 : 37-46, 2008
- Arai T, et al. : TDP-43 is component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351 : 602-611, 2006
- Hasegawa M, et al. : Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and ALS. *Ann Neurol*, 2008 (in press)