

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500325

研究課題名（和文） $\alpha$ シヌクレイン陽性突起の最早期像と進展に基づく病態診断法の開発研究課題名（英文） $\alpha$ -synuclein-positive neurites as an early diagnostic indicator

研究代表者

内原 俊記（UCHIHARA TOSHIKI）

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号：10223570

研究成果の概要（和文）：ヒト剖検脳の $\alpha$ シヌクレインは軸索遠位から神経細胞体へ向かって進展する点で、樹状突起から細胞体へ進展するにつれて4リピートから3リピートへ変化するタウとは異なることを示した。これを反映して、レヴィー小体病では軸索末端が早期から脱落し、これをとらえる MIBG 心筋シンチグラフィが高い診断特異性を有する病態背景を明らかにした。さらこれらの病変の光顕像と免疫電顕像を直接対比できる新たな手法を開発した。今後分子機序との関連を追及するのに強力な手段となる。

研究成果の概要（英文）：We traced the Lewy pathology in human brain and demonstrated its initiation at distal axon and subsequent centripetal extension. Expected dysfunction at distal axons, detectable as a decreased myocardial uptake of MIBG, is a reasonable candidate for early and specific diagnosis of Lewy body disease. In contrast, tau deposition start as 4R deposits in dendrites, which may undertake transition to 3R tau with centripetal progression, as we demonstrated with double labeling for 3R/4R tau. We also established a new method to compare light and immunoelectron microscopic findings of the same lesion, which is potentially useful to bridge molecular changes to lesion formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患、シヌクレイン、パーキンソン病、電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)に対する遺伝子治療、脳深部刺激等の侵襲的治療法が開発されつつある現在、その臨床診断の精度を向上させ、治療効果判定の客観的パラメータを確立することが不可欠である。我々は軸索末

端から近位へ向かう $\alpha$ シヌクレイン( $\alpha$ S)沈着 (Brain Pathol 2008:18:415-22) から軸索脱落へと進展する心臓交感神経の突起変性は PD に特異的なうえ (Brain 2008:131:642-650, Brain Pathol 2007: 17:24-30), MIBG 心筋シンチグラフィのとりこみ低下とし

て早期から検出されるので、これを通じて PD の臨床診断の精度を向上させることが可能なことをこれまで報告してきた。

## 2. 研究の目的

新たな三次元的手法を用いてこの突起病変の広がりをとらえ、さらに  $\alpha$  S 凝集と関連づけて病変の進展を明らかにし、病態理解とそれに基づく臨床診断にも役立つ情報を提供する。特に臨床的にも鑑別が問題となるタウ沈着との違いを明瞭にすることで神経細胞レベルでの病変進展の違いを明確にし、臨床診断の精度向上へと反映させる。

## 3. 研究の方法

1) 蛍光三次元撮像した病変をそのまま免疫電子顕微鏡像としても撮像し、両者を直接比較する方法を開発し、これまで観察困難であった早期突起病変の電子顕微鏡像をとらえる。

## 4. 研究成果

ヒト剖検脳で  $\alpha$  S 病変とタウ病変の進展を比較し、 $\alpha$  S は軸索遠位からタウは樹状突起の遠位から神経細胞体へむかって沈着が進展することを示した。臨床診断の制度向上に貢献した。これらの成果を背景に第 54 回日本神経学会にて国際シンポジウム”Structural template for neurodegeneration”を企画し、演者の一人としても発表した。パーキンソン病早期からみられる MIBG 心筋シンチグラフィの取り込み低下は、心臓交感神経軸索遠位端の脱落を反映するという我々の成果を受け、この検査を健康保険の適応とするとの通達が 2012 年 3 月に厚生労働省より発せられ、今後より一般的な検査としてさらなる普及が期待される。

### (1) : $\alpha$ -シヌクレイン沈着の最早期像 Pale neurites の提唱と超微構造の解明

ホルマリン固定したパーキンソン病剖検例の脳幹から迷走神経背側核や青斑核を含む浮遊切片(50 $\mu$ m 厚)を作成し、抗  $\alpha$  シヌクレイン抗体 (ab6162 Abcam, 1:1000, sheep polyclonal/Alexa488), 抗 neurofilament 抗体 (SMI31 Sternberger, 1:1000, mouse monoclonal/Alexa 633)、凝集した線維に親和性のある色素 Thiazin Red (TR 1:10, 000) で三重蛍光染色し共焦点顕微鏡で三次元像を取得した。TR でモニターした軸索内の  $\alpha$  S 凝集の程度は軸索毎、部位毎に異なり多様であった。同一標本を eosin や  $\alpha$ -シヌクレイン沈着を高感度にラベルする鍍銀染色 Campbell-Switzer 法で染色し蛍光像と比較すると、TR 陽性部は eosin 陽性で凝集度が高くレヴィ小体に類似するのに対し、TR 陰性部は eosin 陰性で凝集度が低く Pale body に類似する早期病変と考え Pale neurites と

命名した(Brain Pathol 2012)。3D-oriented immunoEM 法を用いてこの Pale neurites の蛍光三次元像(図 4A)と同一部位の超微形態を観察すると(図 4B)、TR シグナルの乏しい  $\alpha$  S 陽性部分にも  $\alpha$  S 陽性のレヴィ線維が少数確認できた。

(2) : Lewy neurites は側副枝から近位へ伸展する。 Lewy neurites を高感度で染色する鍍銀染色 Campbell-Switzer 法を用いてパーキンソン病脳幹の 50 $\mu$ m 厚切片を染色すると多数の軸索分岐がみられる。0.2 $\mu$ m/pixel の解像度で標本全体を取り込む virtual slide システムを用い、分岐点を中心とする軸索病変 70 個の輪郭を 2 値化した上で、分岐点から 3 方向に伸びる枝毎に長さや面積を定量した。突起病変は先ず側副枝にはじまり、分岐点から近位へ向かう軸索内へと伸展することを定量的に示した(Brain Pathol 2012)。また心臓交感神経の軸索病変は特に無髄線維に強調されることを初めて電頭的に示し、ミエリン塩基性タンパク陽性の有髄線維は比較的残存することを多重染色標本で定量的に示した(Neuropathol Appl Neurobiol 2012)。

(3) : タウ陽性線維の超微形態を光学顕微鏡像と免疫電頭像の直接比較。ホルマリン固定したピック小体病 3 例の海馬 50 $\mu$ m 厚の浮遊切片を、抗リン酸化タウ抗体 AT8 (1:1,000 mouse monoclonal IgG)/Qdot655-抗マウス IgG(1:100, Invitrogen) でラベルし共焦点顕微鏡(Leica SP5, Germany)でピック小体の蛍光三次元像を再構築した。ピック小体は”パラシュート様”、“ドーナツ様”、中に空洞(lacunae)を含む等多様な三次元構造を呈した。このピック小体の周囲に laser microdissection 用いて小孔をあけた後、同一切片をエポン包埋し、目印の小孔に囲まれる部分を電頭観察した。ピック小体内の細胞小器官が比較的高密度のタウ陽性線維と混在し、タウ陽性線維をラベルする Qdot がカドミウムとセレンに対応するピークを示すことを energy-dispersive X-ray analysis で確認した(Am J Pathol 2012)。尚本研究は第 53 回日本神経病理学会優秀ポスター賞を受賞した。

(4) : 4 リポートタウから 3 リポートタウへの移行が神経原線維変化の根源的事象である。神経原線維変化微小管結合部位の繰り返しが 3 回の 3 リポート(3R)タウと 4R タウがあるが両者を蛍光二重染色して細胞毎に区別する方法を昨年度確立した。今回アルツハイマー病海馬に応用し、病期の進行に伴い進展する神経原線維変化の増加に伴い、3R タウ

陽性神経細胞の割合が増加すること、神経細胞内では突起から細胞体に向かって 4R タウ陽性像が 3R タウ陽性像へと変化することを示した(Acta Neuropathol 2013)。この変化は神経原線維変化形成と進展に共通する根源的事象だが、その分子基盤は説明しがたい。部位や疾患による違いを検索し、背景機序を今後検討していく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Hara M, Hirokawa K, Kamei S, Uchihara T (2013) Isoform transition from four-repeat to three-repeat tau underlies dendrosomatic and regional progression of neurofibrillary pathology. . Acta neuropathologica 125:565-579. 査読有
2. Takeda T, Sato T, Ito T, Sumi Y, Kobayashi T, Kitagawa M, Hirokawa K, Uchihara T (2013) Four-repeat tau-selective deposition in subthalamic nucleus and motor cortex in alzheimer disease. Clinical neurology and neurosurgery 115:641-643. 査読有
3. Nomoto N, Orimo S, Uchihara T, Takahashi K, Fujioka T (2013) Lewy pathology in an autopsy case of fld-mnd with reduced cardiac mibg uptake and depletion of cardiac sympathetic fibers. Parkinsonism Relat Disord 19:472-473. 査読有
4. 融衆太, 市原和明, 内原俊記, 織茂智之 (2012) Neurological cpc 臨床的にレヴィ小体型認知症が疑われ、 $\alpha$  シヌクレイン沈着を認めなかった 87 歳女性例. BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 64:573-582. 査読無
5. 田久保秀樹, 本間琢, 内原俊記, 河村満 (2012) Neurological cpc 経過 7 年で進行性のパーキンソニズム、発語障害を呈した 74 歳男性. BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 64:1181-1190. 査読無
6. Ujiie S, Hatano T, Kubo S, Imai S, Sato S, Uchihara T, Yagishita S, Hasegawa K, Kowa H, Sakai F, Hattori N (2012) Lrrk2 i2020t mutation is associated with tau pathology. Parkinsonism Relat Disord 18:819-823. 査読有
7. Uematsu M, Adachi E, Nakamura A, Tsuchiya K, Uchihara T (2012) Atomic identification of fluorescent q-dots on tau-positive fibrils in 3d-reconstructed pick bodies. Am J Pathol 180:1394-1397. 査読有
8. Uchihara T, Hara M, Nakamura A, Hirokawa K (2012) Tangle evolution linked to differential 3- and 4-repeat tau isoform deposition: A double immunofluorolabeling study using two monoclonal antibodies. Histochemistry and cell biology 137:261-267. 査読有
9. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T (2012) Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of tdp-43. Brain 135:833-846. 査読有
10. Takeda T, Uchihara T, Mochizuki Y, Ishihara A, Nakamura A, Sasaki S, Uchiyama S, Iwata M, Mizutani T (2012) Supranuclear ophthalmoparesis and vacuolar degeneration of the cerebral white matter in amyotrophic lateral sclerosis: A clinicopathological study. Amyotroph Lateral Scler 13:74-83. 査読有
11. Shishido-Hara Y, Ichinose S, Uchihara T (2012) Jc virus intranuclear inclusions associated with PML-NBs: Analysis by electron microscopy and structured illumination microscopy. Am J Pathol 180:1095-1106. 査読有
12. Kasahata N, Uchihara T, Nakamura A, Miyazawa Y, Kamei T (2012) A 71-year-old woman with psp-like symptoms without psp lesions. Clinical and histological pitfalls. Brain pathology (Zurich, Switzerland) 22:733-736. 査読有
13. Kanazawa T, Adachi E, Orimo S, Nakamura A, Mizusawa H, Uchihara T (2012) Pale neurites, premature alpha-synuclein aggregates with centripetal extension from axon collaterals. Brain pathology (Zurich, Switzerland) 22:67-78. 査読有
14. Yamanami-Irioka A, Uchihara T, Endo T, Irioka T, Watanabe M, Kitagawa M, Mizusawa H (2011) Amnesia in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis, masquerading alzheimer's disease. Case Reports in Neurology 3:242-247. 査読有
15. Umahara T, Uchihara T, Yamada S, Hashimoto T, Akimoto J, Haraoka J, Iwamoto T (2011) Differential expression of oxidized/native lipoprotein(a) and plasminogen in human carotid and cerebral artery plaques. Atherosclerosis 215:392-398. 査読有
16. Umahara T, Uchihara T, Nakamura A, Iwamoto T (2011) Differential expression of 14-3-3 protein isoforms in developing rat hippocampus, cortex, rostral migratory stream,

- olfactory bulb, and white matter. Brain research 1410:1-11. 査読有
17. Uchihara T, Nakamura A, Shibuya K, Yagishita S (2011) Specific detection of pathological three-repeat tau after pretreatment with potassium permanganate and oxalic acid in psp/cbd brains. Brain pathology (Zurich, Switzerland) 21:180-188. 査読有
  18. Uchihara T (2011) Expanding morphological dimensions in neuropathology, from sequence biology to pathological sequences and clinical consequences. Neuropathology 31:201-207. 査読有
  19. Shibuya K, Yagishita S, Nakamura A, Uchihara T (2011) Perivascular orientation of astrocytic plaques and tuft-shaped astrocytes. Brain research 1404:50-54. 査読有
  20. Orimo S, Uchihara T, Kanazawa T, Itoh Y, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H (2011) Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in parkinson's disease. Neuropathology and applied neurobiology 37:791-802. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1. Uchihara T. Axonal  $\alpha$ -synuclein and dendritic tau: contrasting spreads in neurons. Symposium Structural template for Neurodegeneration- From Network to Clinical Manifestations- 第 54 回日本神経学会学術大会 (May 30 2013) 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
2. 内原俊記. Pretangles と神経原線維変化. シンポジウム「定義と区別」第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会(April 24-27, 2013) タワーホール船堀 (東京都江戸川区)
3. 原誠, 廣川勝彦, 亀井聡, 内原俊記 (2013) Tau isoform profile からみた神経原線維変化の細胞周期に関する検討. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 (April 24-27, 2013) タワーホール船堀 (東京都江戸川区) .
4. 辰己新水, 内原俊記, 饗場郁子, 三室マヤ, 岩崎靖, 吉田眞理 (2013) いわゆる CBD pretangle の貢献像におけるスペクトラムとその電顕像. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会(April 24-27, 2013) タワーホール船堀 (東京都江戸川区) .
5. 米根鉄矢, 山田哲夫, 内原俊記, 中村綾子, 関貴行, 江石義信, 廣川勝彦 (2013) 筋緊張性ジストロフィの脳では 3-リピート・タウのみの凝集から神経原線維変化が生じる. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会(April 24-27, 2013) タワーホール船堀 (東京都江戸川区) .
6. 本間琢, 田久保秀樹, 高橋一司, 松原四郎, 高橋学, 船田信顕, 望月葉子, 水谷俊雄, 小森隆司, 内原俊記 (2013) 左右差のある大脳皮質病変と大側のパーキンソン病様運動障害を呈したが基底核病変に乏しい CBS-AD の 2 剖検例. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 (April 24-27, 2013). タワーホール船堀 (東京都江戸川区) .
7. 笠畑尚喜, 内原俊記, 中村綾子, 園田康博, 加藤弘之 (2013) L-dopa 反応性の parkinsonism を呈した alzheimer 病の 85 歳男性例. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会(April 24-27, 2013) タワーホール船堀 (東京都江戸川区) .
8. Uchihara T, Kondo H, Ichikawa M, Okabayashi S, Ono F, Kimura N (2013) 4R tau deposition resembling pretangles in the brain of aged macaques. The 11th International conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases. Firenze Fiera, Fortezza DA Basso, Italy (March 8, 2013)
9. Uchihara T, Hara M, Nakamura A, Hirokawa K (2013) How 3R and 4R tau are represented in ad brain? Double immunofluorolabeling with RD3/RD4 screened by fluorescent scanning microscopy. In: The 11th International conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases. Firenze Fiera, Fortezza DA Basso, Italy (March 8, 2013)
10. 内原俊記, 近藤ひろみ, 市川眞澄, 岡林左知, 小野文子, 木村展之 (2012) 老齢サル神経細胞にみる 4 リピート選択的タウ沈着. 第 31 回日本認知症学会 (Oct 26-28, 2012) つくば国際会議場.
11. 金澤俊郎, 安達栄治郎, 織茂智之, 中村綾子, 水澤英洋, 内原俊記 (2012) 最早期  $\alpha$ -synuclein 軸索内沈着(pale neurite) の超微形態-3D-oriented immunoelectron microscopy 法の開発と応用. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (June 28-30, 2012) 朱鷺メッセ (新潟市)
12. 織茂智之, 中村綾子, 内原俊記, 吉田眞理, 若林孝一, 柿田明美, 高橋均 (2012) Lewy 小体型認知症における心臓交感神経の変性と臨床徴候、脳病理所見との比較. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (June 28-30, 2012) 朱鷺メッセ (新潟市)
13. 笠畑尚喜, 内原俊記, 織茂智之, 中村綾子, 牧田芳久, 新井信隆 (2012) MIBG 正常で PSP 類似の臨床徴候を呈した 75 歳男性例で観察された辺縁系と黒質の

- lewy 小体と Alzheimer 病理. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (June 28-30, 2012) 朱鷺メッセ (新潟市)
14. 植松未帆, 安達栄治郎, 中村綾子, 土谷邦秋, 内原俊記 (2012) Qdot Labeling によるピック球の三次元構造と超微形態の直接比較と EDX 解析. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (June 28-30, 2012) 朱鷺メッセ (新潟市)
  15. 融衆太, 内原俊記, 阿部圭輔, 大原麻耶, 小林高義, 廣川勝昱, 北川昌伸 (2012) 臨床的にレビー小体型認知症 (DLB) と診断した症例の神経病理学的検討 第 53 回日本神経学会学術大会 (May 22-25, 2012) 東京国際フォーラム.
  16. 田久保秀樹, 本間琢, 内原俊記 (2012) 経過 7 年で進行性のパーキンソニズム、発語障害を呈した 74 歳男性. 第 18 回 Neuro CPC (Feb 24, 2012) 東京慈恵会医科大学 本館 1 階 西講堂.
  17. 織茂智之, 内原俊記, 若林孝一, 柿田明美, 高橋均, 吉田眞理 (2011) レヴィ小体型認知症 (DLB) における心臓交感神経の変性と臨床徴候、脳病理所見との関連. 第 52 回日本神経学会学術大会. (May 18, 2011) 名古屋国際会議場.
  18. 稲葉彰, 坂本昌巳, 橋本祐二, 吾妻玲欧, 織茂智之, 服部高明, 三村将, 福井俊哉, 伊藤憲嘉, 内原俊記, 若林孝一, 高橋均, 柿田明美 (2011) MIBG 心筋シンチグラフィによる前頭側頭葉変性症とレビー小体型認知症の鑑別. 第 52 回日本神経学会学術大会. (May 18, 2011) 名古屋国際会議場.
  19. 内原俊記, 原誠, 中村綾子, 廣川勝昱 (2011) アルツハイマー病海馬にみる 3R, 4R タウ沈着の多様性—RD3/RD4 蛍光二重染色による検討—. 第 52 回日本神経学会学術大会. (May 18, 2011) 名古屋国際会議場.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内原 俊記 (UCHIHARA TOSHIKI)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・  
感覚システム研究分野・副参事研究員  
研究者番号：10223570

### (3) 連携研究者

織茂 智之 (ORIMO SATOSHI)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・  
感覚システム研究分野・研究員  
研究者番号：10392359

橋本 款 (HASHIMOTO MAKOTO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・  
感覚システム研究分野・副参事研究員  
研究者番号：50189502

和田 昌昭 (WADA MASAOKI)  
大阪大学・情報科学研究所・教授  
研究者番号：80192821

