

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20700325  
 研究課題名（和文） 前頭側頭型認知症ホルマリン固定標本における封入体の切離および構成蛋白の解析  
 研究課題名（英文） Identification of protein constituting inclusions from formalin-fixed paraffin-embedded fronto-temporal dementia brain tissue using laser-capture microdissection

研究代表者  
 和手 麗香（WATE REIKA）  
 関西医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：50440988

研究成果の概要（和文）：好塩基性封入体を伴う前頭側頭型認知症剖検症例において、ホルマリン固定標本からレーザーマイクロダイセクションシステムを用いて封入体のみを切離し、蛋白質の抽出・解析を行った。抽出された蛋白およびその関連蛋白を標識する抗体を用いて、免疫組織学的に検討したところ、封入体にオートファジー関連蛋白の免疫反応がみられた。これにより、本疾患の封入体形成にはオートファジーの機能不全が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Basophilic Inclusions (BIs) in front-temporal dementia with BIs were separated and collected by laser capture micro-dissection from formalin-fixed paraffin-embedded brain tissue. The identified proteins by liquid chromatography coupled to mass spectrometry and concerning proteins were examined immunohistochemically. The BIs were distinctly labeled with the antibodies against microtubule-associated protein and autophagy-related gene proteins. Our results imply that autophagy has been disrupted before the completion of autophagosome formation, which might contribute to BI formation in this disorder.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：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、神経病理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 前頭側頭型認知症(FTD)は、神経変性型認知症疾患の中で病変の主座が前頭葉または側頭葉、あるいはその両者に存在する疾患の総称であり、変性型認知症の中でもアルツハイマー病、びまん性レビー小体病について3番目に頻度が多いとされ、社会的にも注目を集めている。近年、これまでFTDと総称されてきた疾患群には、3-repeat tauが蓄積するtauopathyであるピック病と、TDP-43が蓄積するubiquitinopathyである群が存在することが明らかになってきており、病態の解明が期待されている。しかし、その本態はまだ明らかにされていない。

高齢化社会を迎えた現在、これらの群の成因に相違があるのか、また他の蛋白の蓄積による群はないのかなどを検討することで、病態の解明にせまることが期待されており、根本的治療法の開発を目指すことが大きな課題となっている。

(2) 一方、2005年、以前は困難とされていたホルマリン固定後パラフィン包埋された組織から蛋白分析する方法が開発された(Hood BL et al Mol Cell Proteomics 4(11)1741-1753 2005, Prieto DA et al Biotechniques. 38: S32-S35, 2005)。これにより、Laser micro dissection (LMD)法を用いて組織を単離し、収集物をLC-MS/MS解析を用いることによって、単離した組織に含有される蛋白の同定が可能となった。

(3) そこで、本手法を用いてホルマリン固定されているFTDのヒト剖検脳においても、封入体の蛋白成分解析を行えるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) ヒト剖検標本からLaser micro dissection (LMD)法を用いて神経細胞質内封入体を切離し、LC-MS/MS解析を用いて封入体に含有される蛋白を解析する。解析された蛋白および、その関連蛋白に対する抗体を用いてFTDの剖検脳を検討することでこれらの疾患群の位置づけを明確にし、病態機序の解明にせまる。

(2) 当臨床講座で有する剖検標本は、同時に臨床データの裏付けを有している。臨床症状と蛋白解析によって得られるデータを比較検討することで、蓄積蛋白とその表現から新しい知見を得ることを目指す。

これまで、免疫組織化学的手法や免疫沈降で行われてきた解析では、含有される蛋白成分を一期的に一覧にすることは困難であった。また、ホモゲナイズ組織を用いたマイクロアレイでの解析では、封入体以外の成分の除外が困難であった。さらに、マイクロダイセクションを用いた蛋白分析ではホルマリン標本での蛋白抽出は困難であった。今回我々が用いた手法は、ホルマリン標本からのマイクロダイセクションおよび蛋白解析が可能であり、①臨床情報に裏打ちされたホルマリン固定ヒト剖検脳を直接解析すること、②異常蛋白の凝集体と考えられる封入体のみを可視下に正確に切離し解析すること、以上の2点が本研究の目的の画期的な点である。

(3) 以上から、病態に関与する蛋白を明らかにし、新たな治療戦略を確立することが最終目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 前頭側頭型認知症封入体のタンパク分析

前頭側頭型認知症例の剖検標本において、ホルマリン固定後パラフィン包埋された脳組織を、5μmに薄切する。薄切標本はAMR社のDIRECTOR(LMD用特殊コーティングスライド)を用いて作成し、ライカ社のレーザーマイクロダイセクションシステムLMD6000を用いて封入体のみ約3万個をダイセクトする。ダイセクトした封入体を、AMR社のLiquid Tissue MS Protein Prep Kitに回収し、ZAPLOUS LC-MSシステムを用いてタンパク質の抽出・解析を行う。

(2) 封入体に含有される蛋白およびその関連蛋白の免疫組織化学的検討

上記(1)で抽出された蛋白およびその上流・下流に位置する蛋白に対する抗体を購入し、再度剖検症例の標本を免疫組織化学的に検討する。

免疫組織化学:

オートクレーブによる前処置、ABC法、DAB発色を用いた。1次抗体は以下のとおりである。

anti-LC3 antibody

(LC3: mouse monoclonal, nanoTools 1:500 · rabbit polyclonal, MBL 1:5000)

anti-Atg12 antibody

(Atg12: rabbit polyclonal, MBL 1:100)

anti-Atg5 antibody

(Atg5: rabbit polyclonal, MBL 1:1500)

anti-Atg16 antibody

(Atg16: rabbit polyclonal, MBL 1:3000)  
anti- Cathepsin D antibody  
(Cat D: rabbit polyclonal, Chemicon 1:100)  
anti- LAMP2 antibody  
(LAMP 2: mouse monoclonal, Santa Cruz 1:50)  
anti- Ubiquitin antibody  
(Ub: rabbit polyclonal, Chemicon 1:400)

免疫電顕：

pre-embedding 法で、2次抗体は、anti (rabbit) IgG Gold 10nm を用いた。

### (3) 他疾患での検討

当院で蓄積された他の神経変性疾患の剖検脳においても免疫組織化学的検討を行い、その異同を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 初回の質量解析では、dermcidin(DCD)が同定され、運動ニューロン病を伴う前頭側頭型認知症の封入体内には DCD が含有されている可能性が判明した。DCD は皮膚で産生され、汗腺から分泌される抗菌蛋白として知られ、中枢神経系では橋などに存在することが報告されている。また、近年、低酸素状態あるいは酸化ストレス下にある種々の細胞や、多種の癌細胞において生存因子として機能すると報告されている。一連の神経変性疾患には以前から酸化ストレスの関与が提唱されているが、これまで DCD の蓄積を検討した報告はなく、この結果は運動ニューロン病を伴う前頭側頭型認知症の病態解明への新しい知見を得た点で意義があるものであった。

(2) また、さらなる質量解析によって、keratin、actin、annexin、junction plakoglobin、tubulin、microtubule 関連蛋白などが同定された。

(3) 上記より、酸化ストレス関連蛋白、細胞骨格系蛋白およびオートファジー関連蛋白につき、免疫組織化学的検討を実施した。結果は、オートファジー関連蛋白のうち、抗-LC3 抗体、抗 Atg12 抗体、抗 Atg5 抗体、抗 Atg16 抗体による染色で封入体に免疫反応を認めることを確認した(図1 B-F)。LC3 と Atg12・Atg5・Atg16 は、オートファゴソーム形成時に関与する蛋白で、隔離膜の伸張に働く。LC3 はオートリソソームまで作用し、Atg12・Atg5・Atg16 は、オートファ

ゴソーム形成初期にのみ関与する。一方、オートファゴソーム形成後期に関与するカテプシンD(CatD)はリソソーム含有酵素の1つであり、LAMP2 はリソソームの膜構成蛋白の1つである。これらは BI での免疫反応は見られなかった(図1 G,H)

今回の結果からオートファジーの早期に関与する蛋白のみが BI に免疫反応性を認めたことは、オートファゴソームからオートリソソームへの成熟が障害されて BI が形成されている可能性を示唆するものであった。

またオートファジー経路の障害は、もう一つの分解系である UPS の負担を増大し、小胞体ストレスとなって神経細胞死を引き起こす可能性がある。Mazroui らは、UPS を阻害した場合、stress granule を認めると報告しており、stress granule がオートファジー系で処理される可能性も考えられる。すなわち、本疾患においては何らかのストレスにより stress granule が形成されてオートファジー系が誘導されるものの、完全には分解除去しきれず途中で停止して封入体を形成している可能性が新たに考慮された。

(4) Dermcidin については複数の抗体を用いて検討したが免疫組織学的な裏付けは得られず、本研究での免疫組織化学的検討からは、主な構成成分としては考え難いことが判明した。

(5) また、他の神経変性疾患である弧発性筋萎縮性側索硬化症および家族性筋萎縮性側索硬化症(SOD1 I113T 変異を伴う)の脊髄標本でもオートファジー関連蛋白の免疫染色を行ったが、いずれの封入体も免疫反応は見られなかった(図2、図3)。

(6) 以上から、運動ニューロン病を伴う前頭側頭型認知症の封入体は筋萎縮性側索硬化症の封入体とは性質を異にしており、形成にはオートファジーの機能不全が関与している可能性が示唆された。本研究の結果は運動ニューロン病を伴う前頭側頭型認知症の病態解明への新しい知見を得た点で意義があるものであった。

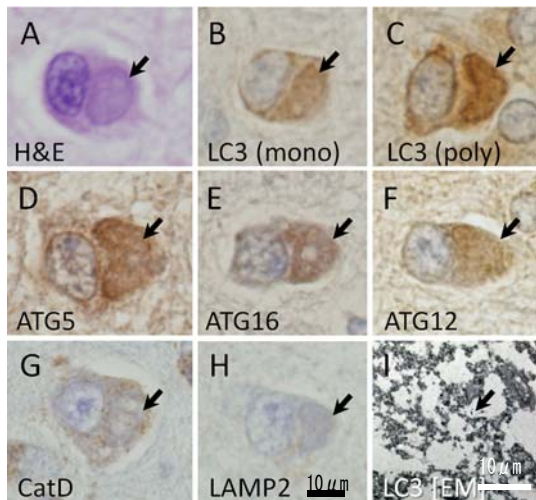


図1 好塩基性封入体を伴う前頭側頭型認知症症例剖検標本における好塩基性封入体の染色性 A: H&E 染色で好塩基性封入体(BI, 矢印)は好塩基性に染色される。B-F:BI は、オートファジー関連蛋白である抗 LC3 抗体、抗 ATG5 抗体、抗 ATG16 抗体、抗 ATG12 抗体で陽性であった。G, H: Cathepsin D と LAMP2 に対する免疫反応は BI では見られなかった。I: 金コロイドで標識した LC3 は電子顕微鏡で観察すると BI 内で陽性反応を認めた。

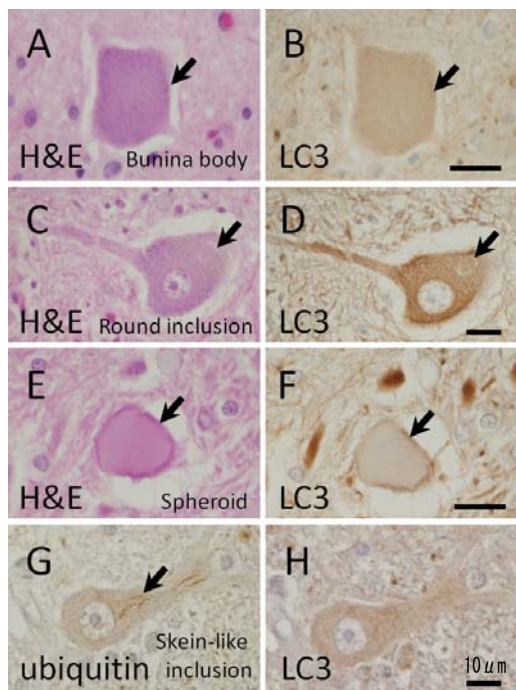


図2 弧発性筋萎縮性側索硬化症で見られる封入体の LC3 の染色性 A-H: Bunina 小体、round inclusion、spheroid、skein-like inclusion はいずれも LC3 の免疫反応は見られなかった。

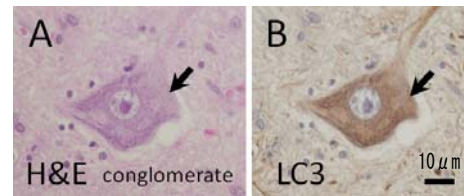


図3 家族性筋萎縮性側索硬化症で見られる封入体の LC3 の染色性 A, B: 腰髄前角で見られた conglomerate は LC3 で陰性であった。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

①藤田賢吾、金子鋭、伊東秀文、西井誠、中村正孝、木下芳美、朝山真哉、中村聖香、和手麗香、中野智、日下博文、好塩基性封入体を伴う成人発症運動ニューロン病での autophagy 関連蛋白の免疫組織化学的検討、第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 21 日、仙台国際センター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和手 麗香 (WATE REIKA)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50440988

### (2) 研究協力者

藤田 賢吾 (FUJITA KENGO)

関西医科大学・医学部・大学院生

木下 芳美 (KINOSHITA YOSHIMI)

関西医科大学・医学部・大学院生