

# 進行性核上性麻痺における神経原線維変化および coiled body の出現意義 — 神経原線維変化および coiled body の ubiquitin 化に関する検討 —

金 成 花

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻  
病態探究医科学講座脳神経内科学  
(指導教官: 松本昌泰教授)

受付: 平成17年6月14日

受理: 平成17年7月11日

進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP) は変性病理所見として黒質, 淡蒼球, 視床, 小脳歯状核, 脳幹被蓋における神経細胞脱落, 反応性 gliosis を特徴とする進行性の変性疾患である。細胞内蛋白 tau が異常リン酸化され, 神経細胞内で神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) を, oligodendroglia 内で coiled body (CB) を形成することが報告された。一方, ubiquitin (Ub) 蛋白質は神経変性疾患において ATP 依存性に変性蛋白を分解する重要な役割を果たしている。PSP において NFT, CB が病変の形成にどのように関わっているかを明らかにするために, PSP 三剖検脳を用いて NFT 並びに CB を4つの stage に分類し, 各 stage の出現量を計測した後, PSP の変性病理所見と比較検討した。また, 全 NFT, CB に対する Ub 陽性 NFT, CB の出現量 (Ub 陽性率) を算定した。その結果, NFT は神経細胞脱落と反応性 gliosis と関係なく出現しているが, CB は神経細胞脱落と関連して出現が多いことが解った。神経細胞は脱落しているものの, 細胞死を意味する stage IV の NFT, CB は少なく3症例平均 Ub 陽性率もそれぞれ 2.1%, 2.7% と極めて低いことがわかった。以上より PSP において NFT, CB の形成は神経細胞脱落と反応性 gliosis の中心的役割を担っていないと考えられた。

**Key words** : Progressive supranuclear palsy, Neurofibrillary tangles, Coiled bodies, Stage, Ubiquitin protein

進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP) は進行性変性疾患であり, 臨床的には核上性眼筋麻痺, 無動・寡動, 固縮, 項部ジストニー, 偽性球麻痺, 認知障害などが認められる<sup>19,20)</sup>。神経病理学的には神経細胞脱落と反応性 gliosis が黒質, 淡蒼球, 視床下核, 小脳歯状核, 脳幹被蓋などに見られるのが特徴である<sup>11,20)</sup>。

神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) の出現はアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) では細胞死と密接に関係があることが知られている<sup>7)</sup>。NFT は異常リン酸化 tau 蛋白質が凝集して異常線維として形成されると考えられている<sup>13,15)</sup>。その形成を段階的に観察した研究として, tau 蛋白に対する抗体

を用いて分類した Duong ら<sup>5)</sup> と Bancher ら<sup>2)</sup> は AD を4群に分類 (stage 0-3) した。Braak ら<sup>3)</sup> は AT8 を用いた免疫染色と Gallyas-Braak (GB) 銀染色<sup>4,8)</sup> を別々に行い, AD を5群に分類 (group 1-5) した。これらの研究により NFT は tau 蛋白が線維を形成する前段階 (Duong, Bancher らの stage 1, Braak らの group 1 に相当) から, NFT が形成され (Duong, Bancher らの stage 2, 3, Braak らの group 2, 3 に相当), 細胞死が生じた後 NFT が消化されずに残存した ghost NFT (Braak らの group 4, 5 に相当し, GB 染色でのみ観察可能) までに変化するものと推定されている。一方 PSP でも, 異常リン酸化された tau を主構成蛋白質とする異常線維が神経細胞内に NFT として

多数出現するばかりでなく<sup>28)</sup>, oligodendroglia 内にも coiled body (CB) として多数出現することが最近報告された<sup>14,16,22)</sup>。しかしながら, PSP の NFT, CB の形成を観察した研究は未だない。

AD の NFT は高度に ubiquitin (Ub) 化されている<sup>27)</sup>。Ub は真核生物に普遍的に存在する76個のアミノ酸からなる小蛋白質である<sup>7,9)</sup>。蛋白質の Ub 化は分解を誘導するため標的蛋白質へ共有結合し, 複雑な酵素系によって触媒されている<sup>12)</sup>。最近, AD をはじめ, 様々な神経変性疾患における脳内の病変所見として, 不溶性蛋白質が凝集した封入体が残存した神経細胞の中の細胞質や核内に蓄積していることが頻繁に観察されている<sup>13,15,21,27)</sup>。そして, その封入体の多くに Ub が存在することから, この蛋白質凝集体に Ub 依存性の蛋白質分解系が関与している可能性が示唆されてきた<sup>1,24)</sup>。これらの所見は細胞死と密接に関連していると考えられている<sup>24,27)</sup>。しかし, PSP の NFT は Ub 化されていないと言われているがその詳細な検討はされていない<sup>18,22)</sup>。

本研究で筆者は, PSP における NFT, CB の出現意義を明らかにするために, 異常リン酸化された tau 蛋白質を認識する抗体 (AT8) を用いた免疫組織化学染色と異常線維を認識する銀染色 (modified GB) の二重染色を用いて, PSP における NFT と CB の形成を4つの stage に分類した。NFT と CB の出現と病理学的変性 (神経細胞の脱落と反応性 gliosis) との関連性を検討し, NFT, CB の各 stage の出現量を計測した。さらに, NFT, CB の Ub 陽性率を算定し NFT, CB に蛋白質分解システムである Ub が関与しているかどうかを検討した。

## 方 法

### 症例

臨床病理学的に PSP と診断された3症例の剖検脳を用いた。各症例の死亡時年齢, 性別, 全経過, 臥床状態, 臨床診断, 病理診断, 未固定脳重量を Table 1 に示す。病理診断は国際的診断基準を用いた<sup>11,20)</sup>。

### 病理組織学的検索および免疫組織化学的検索

検索症例は摘出後直ちに10%ホルマリンで3-4週間固定した後, 7 $\mu$ m 厚のパラフィン包埋切片を用いて神経病理学的所見を観察するために Hematoxylin and Eosin 染色, Klüver-Barrera 染色, Bodian 染色, Methenamine 染色を行った。免疫組織化学的検索は, 0.1%過酸化水素による内因性ペルオキシダーゼ阻害を室温で30分間行った。蒸留水で十分に洗浄した後,

**Table 1.** Summary of the backgrounds of PSP cases used in this study

	Case 1	Case 2	Case 3
Age at death (ys)	68	75	71
Sex	Female	Female	Male
Duration of illness (ys)	5	10	5.5
Bedridden duration (ys)	1	3	2
Clinical diagnosis	PSP	PSP/CBD	PSP
Pathological diagnosis	PSP	PSP	PSP
Weight of unfixed brain (g)	1100	1040	1170

PSP: progressive supranuclear palsy, CBD: corticobasal degeneration.

Tris-buffered saline (TBS) で再度洗浄した。Protein Block Serum-Free (DAKO, Carpinteria, CA, USA) を室温にて30分間反応させた後, 一次抗体を4℃で一晩反応させた。一次抗体として anti-ubiquitin antibody (mouse, MAB1510, 1:20,000, Chemicon, Temecula, CA, USA), anti-p-tau (Ser 199/202) antibody (mouse, AT8, 1:800, Innogenetics, Ghent, Belgium) を使用し, cold TBS で10分間洗浄した。Envision 法 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) によって免疫染色した。すなわち, 二次抗体として Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (DAKO, Carpinteria, CA, USA) を用いて室温で2時間反応させ, 反応後再び cold TBS で10分間洗浄した後に, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO, Glostrup, Denmark) を発色剤とし, 0.001%の過酸化水素を加えて, 5分間発色させた。上記各々の抗体の染色性を光学顕微鏡で観察した。

### AT8 & GB 二重染色と AT8 & GB 陽性 NFT および CB の形態観察

GB 染色と免疫染色の二重染色法は Oka ら<sup>26)</sup> の方法を用いた。まず, GB 法で銀染色を行った後に, 一次抗体に AT8 抗体を用いた Envision 法免疫染色を行った。AT8 陽性の場合には茶色に染色され, GB 染色で神経原線維変化は黒色に染色される。形態的には神経細胞と考えられる細胞内に免疫染色と GB 染色の染色量の違いによって, NFT を stage I-IV の4つに分類した。同様に, CB を stage I-IV の4つに分類した。

### 定量分析

連続切片に対し, AT8 & GB 二重染色と Ub 免疫染色を施行し, 大脳皮質 (Brodmann area 4, 6, 8), 尾状核頭部, 被殻, 淡蒼球, 視床外側腹側核, 視床下核, 内包, 脳幹被蓋, 小脳歯状核の11ヵ所において100倍

視野で 1.74 mm<sup>2</sup> 当りの NFT 及び CB の各 stage 数と Ub 陽性 NFT 及び CB 数を 5 ヶ所測定し、その平均を求めた。

統計分析

1.74 mm<sup>2</sup> 当りの各 stage の NFT, CB の平均数を求め、Ub 陽性 NFT, CB の平均数との関連性を明らかにする目的で Stat View for windows program を用いて相関係数を解析した。

結 果

臨床病理学的に PSP と診断された 3 症例の神経細胞の脱落, 反応性 gliosis の程度を Table 2 にまとめた。AT8 & GB 二重染色の結果を Fig. 1 に示す。AT8 & GB 二重染色では AT8 陽性であるが GB 染色により異常線維構造をまったく認めない神経細胞を stage I (Fig. 1B), AT8 陽性で GB 染色で線維構造を AT8 染色性に対し半分未満の神経細胞を stage II (Fig. 1C), AT8 の中に GB で線維構造が明らかで, AT8 染色性に対し, 半分以上のものを stage III (Fig. 1D), AT8 陰性で GB 染色のみで確認される異常線維構造を stage IV (Fig. 1E) と分類した。同様の方法で AT8 & GB 陽性 CB も観察し, stage I-IV に分類した (Fig. 1F-I)。

抗 Ub 抗体を用いた免疫組織化学法で NFT と CB を観察したところ, 少数の NFT と CB が Ub 陽性であった (Fig. 2)。PSP に出現頻度の高い globose tangle も一部 Ub 陽性であった (Fig. 2A)。oligodendroglia と考えられる細胞においても Ub 陽性 CB が観察された (Fig. 2B)。

大脳脳幹各 11 ヶ所, 大脳皮質 (Brodmann area 4, 6,

8), 尾状核頭部, 被殻, 淡蒼球, 視床外側腹側核, 視床下核, 内包, 脳幹被蓋, 小脳歯状核において連続切片で AT8 & GB の二重染色と Ub 染色を Fig. 3 に示す。各部位における NFT と CB の 1.74 mm<sup>2</sup> 当りの平均出現量を示した (Fig. 4)。NFT, CB ともに stage IV (ghost tangle) が極めて少なかった。NFT, CB の stage I-IV の総数に対する Ub 陽性数の割合を算定した (Fig. 4)。視床下核, 脳幹被蓋, 小脳歯状核で NFT の Ub 陽性率が高いこと, CB に関しては脳幹被蓋, 小脳歯状核で高いことがわかった。しかしながら, 3 症例平均 Ub 陽性率は, 全体では NFT で 2.1 (0-16.7) % で, CB は 2.7 (0-11.9) % であった。各 stage の NFT と Ub 陽性 NFT との相関係数は, stage I, II, III でそれぞれ 0.806, 0.569, 0.497 (p<0.005) で, CB においては stage III のみ相関を示し, 0.554 (p<0.005) であった。

以上要約すると, 本研究で NFT と CB において stage I から stage IV までの線維形成段階が観察された。NFT, CB とも細胞死を意味する stage IV は極めて少ないことが判明した。神経細胞死および反応性 gliosis の程度と NFT, CB 出現量との関連は, NFT 出現量との関連が無く, CB 出現量との関連を認めた。また NFT, CB の Ub 陽性率は極めて低いこと, Ub の出現量は NFT, CB 両方 stage III と相関を示した。

考 察

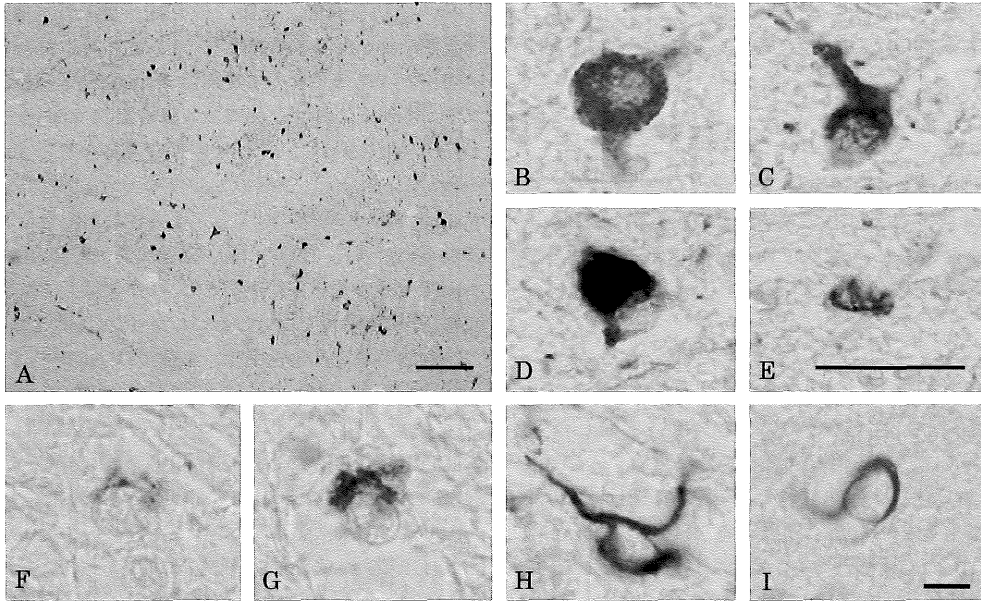
PSP は 1964 年 Steele ら<sup>29)</sup> が特異的なパーキンソン症候を示す疾患として報告された。その時に神経細胞内に tangle が出現していることが記載されている<sup>24)</sup>。1986 年に Pollock ら<sup>28)</sup> によってその tangle が AD と

Table 2. The relationship between neuronal loss and gliosis with NFTs and CBs

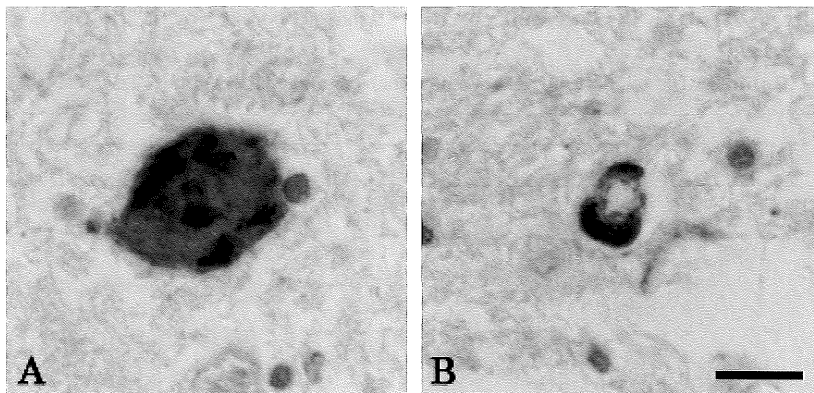
Regions	Case 1				Case 2				Case 3			
	Neuronal loss	gliosis	NFTs	CBs	Neuronal loss	gliosis	NFTs	CBs	Neuronal loss	gliosis	NFTs	CBs
Brodmann areas 4	-	±	+	+	-	±	+	+	-	+	+	++
Brodmann areas 6	-	±	+	++	-	+	+	+	-	+	+	++
Brodmann areas 8	-	+	+	+	-	+	+	+	-	±	+	+
Caudate head	-	±	+	+	-	±	+	+	-	+	+	+
Putamen	+	±	+	+	+	+	+	+	+	±	+	++
Globus pallidus	++	+	+	++++	++	++	+	++	+	++	+	++++
LV of the thalamus	-	±	+	+++	-	±	+	+	-	+	+	++
Subthalamic nucleus	++	+++	++++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+	++
Internal capsule	n.d.	±	n.d.	++	n.d.	+	n.d.	+	n.d.	±	n.d.	+++
Tegmentum of pons	++	+++	++++	++	++	+++	+	+	+	++	++	++
Dentate nucleus	++	+++	+	+	+++	++	+	+	++	+	+	+

Neuronal loss: - normal; ± ~ + subtle; ++ moderate; +++ severe, gliosis: - normal; ± ~ + subtle; ++ moderate; +++ strong; n.d. not detected.

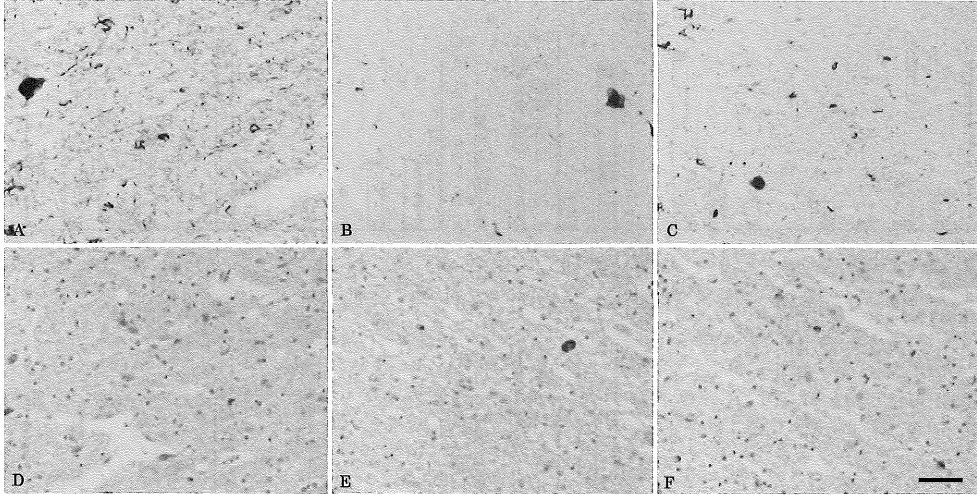
Number of NFTs: + 0-7; ++ 8-15; +++ 16-23; ++++ above 24. Number of CBs: + 0-29; ++ 30-59; +++ 60-90; ++++ above 91.



**Fig. 1.** AT8 (brown) and GB (black) double staining (A). Scale bar=200  $\mu$ m. Several forms of GB-positive structures were observed in AT8-positive neurons and oligodendroglia in the tegmentum of pons (case 1). Fine granules compacted into fuzzy, convoluted bundles were observed in AT8-positive, swollen perikaryon (B). Faint GB-positive structures in an AT8-positive, swollen perikaryon (C), and intense GB-positive filamentous structures and fine granules were observed in faintly AT8-positive deformed neurons (D), as were non-nucleated ghost tangles (E) positive for only GB. Scale bar (B-E)=30  $\mu$ m. A few well-defined granules were observed in the cytoplasm of oligodendroglia, while fibril formation was not observed (F). AT8-positive granules were intensively aggregated with GB-positive fibrils surrounding the nucleus of oligodendroglia (G). A clearly visible linear structure surrounding the nucleus of oligodendroglia was seen by GB and AT8 staining (H). An AT8-negative, GB-positive linear and curved fuzzy filamentous structure with an unclear nucleus, similar to a ghost tangle, was also observed (I). Scale bar (F-I)=1  $\mu$ m.



**Fig. 2.** The figure shows Ub-positive NFT and CB. Scale bar=10  $\mu$ m.



**Fig. 3.** The figure shows NFTs and CBs positive for AT8 and GB double staining (A-C) and Ub antibody (D-F) in serial sections in each case. A and D shows case 1, B and E shows case 2 and C and F shows case 3, respectively. Scale bar=50  $\mu$ m.

同様に tau が陽性であることを、免疫組織化学法を用いて証明した。1994年、Ikeda ら<sup>14)</sup> は異常線維のみを染色する GB 変法を用いて、PSP 脳には神経細胞内に NFT が出現するばかりでなく、oligodendroglia 内にも異常線維が出現し CB と呼んだ。

PSP では従来の変性所見である神経細胞脱落と反応性 gliosis の程度と NFT, CB 出現に関する研究は少なく<sup>20)</sup>、今まで、PSP において NFT, CB を形成段階で分類し、病変との関連を研究した報告は全くない。本研究では初めて、NFT, CB を4つの形成段階に分類し、各形成段階の NFT, CB の出現量を主病変部位にて半定量方法で検討した。NFT, CB の同定方法として AT8 を用いた免疫組織化学法と GB 変法の両者を行うことで、NFT, CB をより正確に stage I-IV まで総てを検出することを可能とした。この方法を用いることで Oka ら<sup>26)</sup>、Mao ら<sup>23)</sup> により NFT とそのほかの蛋白質の出現との関連を明らかにすることができた。NFT の出現と変性所見との関連は淡蒼球、小脳歯状核において相関していない。しかし、CB の出現は変性部位と比較的関連して出現しているのが特徴的であった (Table 2)。

AD では病期に応じて stage IV の NFT (ghost tangle) が高度に出現することが知られている<sup>25)</sup>。ghost tangle は細胞膜が破綻し細胞死が生じ細胞内における NFT のみが残存し、細胞外になった状態である。Fig. 4 に示したように、stage IV の NFT, CB は PSP で極めて少ないことが明らかとなった。PSP では淡蒼球、視床下核、歯状核、脳幹被蓋を主体に多くの神経細胞

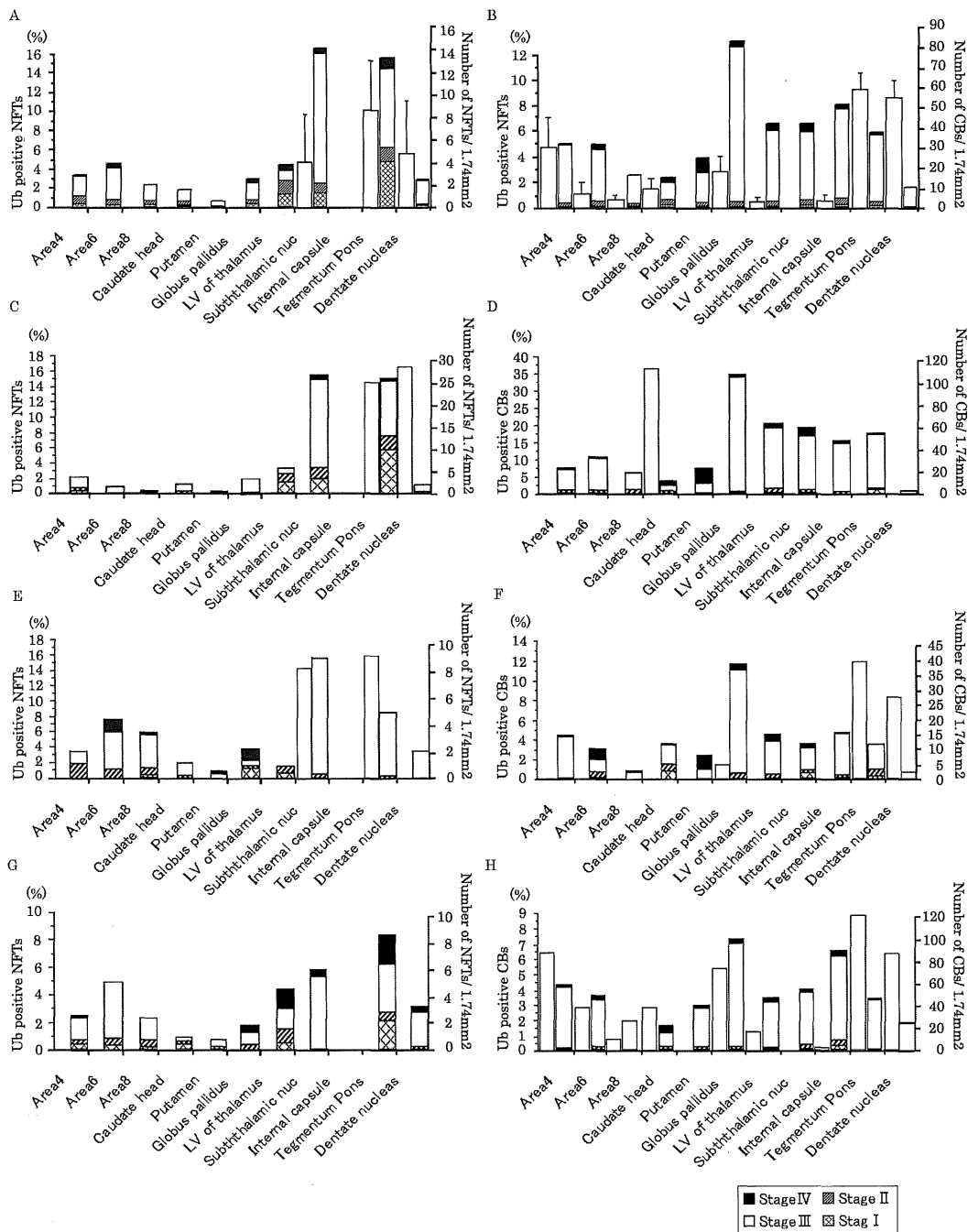
は脱落している。すなわち、細胞死が存在しており、NFT, CB は多数認めるにも関わらず stage IV が極めて少ない。この事は NFT, CB の出現が直接細胞死を意味していないと考えられた。

Ub は細胞内に出現する蛋白分解システムの一つとして知られており、神経変性疾患ではパーキンソン病における Lewy 小体<sup>17)</sup>、Pick 病における Pick 球<sup>26)</sup> など様々な特徴的異常構造物が Ub 陽性である。AD では1987年 Perry らにより老人斑ばかりでなく NFT も Ub 化されていることが報告された<sup>27)</sup>。特に、AD における NFT 出現は神経細胞死と密接に関連しており、その NFT が Ub 化されていることは神経細胞内で NFT を Ub を用いて分解しようとしている、一つの細胞死を防ぐシステムとして注目されている。

本研究では AD と同じ異常リン酸化 tau が NFT を形成する進行性的変性疾患である PSP において神経細胞の脱落、反応性 gliosis を認める部位を中心に11ヵ所において、NFT, CB の Ub 陽性率を半定量的に算定した。

PSP における NFT, CB の Ub 化率の研究はまだない。本研究において NFT, CB の Ub 化率は約 2-3% と極めて少ないことが判明した。AD では免疫二重染色で NFT の60%が Ub 化されており<sup>20)</sup>、NFT と Ub との関連は mature な NFT (本研究での stage II, III に相当) で Ub 化されると報告されている<sup>2)</sup>。したがって本研究により PSP では細胞内で NFT, CB が存在しても Ub 化が生じにくいことが考えられた。

本研究で stage III の NFT, CB の出現量と Ub 陽性



**Fig. 4.** Three cases of Ub-positive NFTs and CBs, expressed as percentages of the total numbers of stage I to stage IV NFTs and CBs. Density of NFTs and CBs was determined with a microscope in 5 fields of 1.74 mm<sup>2</sup> at a magnification of ×100 in 11 brain regions. Data are shown as average of three cases (A and B) and as each case (C-H).

NFT, CB の出現量を 3 症例, それぞれ同一の 11カ所で相関係数を解析したところ, NFT では相関係数 0.50, CB では 0.55 ( $p < 0.005$ ) とゆるやかな相関を認めた。すなわち, 少ないながらも Ub 化されている NFT, CB は AD と同様に成熟段階で Ub と関係している可能性がある。このことは 2-3%細胞においては AD と同様に Ub 化システムが存在していると考えられ, PSP において Ub 化の完全な破綻があるとは考えにくい。Fergusson ら<sup>6)</sup> は PSP において mutant ubiquitin-B が NFT に一致して増えていることに着目して, Ub 化が阻害されている可能性を指摘している。PSP は AD と異なり PSP 脳に生じる変性は神経細胞死を生じるシステムと NFT が生じるシステムとの両者が解離している可能性が考えられる。Ub 蛋白分解システムが PSP の NFT を認識していないほかの蛋白分解システムが作動しているのかどうかは明らかでない。1つの可能性として, NFT が生じることで神経細胞死から防がれている可能性もある。PSP の研究は少なく今後の研究が必要である。一方, CB の形成は oligodendroglia 内に生じていると報告されている<sup>14)</sup>。本研究により CB は神経細胞の脱落部位に多数出現することが解った。また病理学的に PSP 脳で oligodendroglia が脱落している所見は認められていない。CB 形成は神経細胞脱落と何らかの関連を認めるものの, oligodendroglia の機能障害を認めていない。CB 形成は神経細胞脱落に伴う二次的な反応産物の可能性もある。今後 oligodendroglia の反応系に関する研究が必要である。

以上より, PSP における NFT, CB の出現は PSP における細胞死とは密接に関連していない, さらに, 細胞内において分解システムである Ub 化がほとんど作動していないことが明らかになった。これらのことは PSP において NFT, CB の出現は神経細胞脱落と反応性 gliosis の形成に主な役割を担っていないと考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました松本昌泰教授, 中村重信広島大学名誉教授, 広島大学分子病理学安井 弥教授, 病態情報医科学井内康輝教授ならびに独立行政法人 国立病院機構柳井病院 神経内科・リハビリテーション科片山禎夫先生に心から深謝いたします。また, 本研究の遂行にあたり御協力頂きました日地正典先生, 渡辺千種先生 (国立病院機構広島西医療センター), 野田公一先生 (国立病院機構東広島医療センター), 実験助手の笹西美和子さん

に感謝いたします。

最後に, 本研究の一部は科学研究費補助金, 基盤研究 (C) No.14570600 の補助により行いました。

## 参 考 文 献

1. **Alves-Rodrigues A., Gregori, L. and Figueiredo-Pereira M.E.** 1998. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends. Neurosci.* 21: 516-520.
2. **Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal I., Iqbal, K. and Wisniewski, H.M.** 1989. Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 16: 90-99.
3. **Braak, E., Braak, H. and Mandelkow, E.M.** 1994. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol. (Berl).* 87: 554-567.
4. **Braak, H. and Braak, E.** 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl).* 82: 239-259.
5. **Duong, T., Doucette, T., Zidenberg, N.A., Jacobs, R.W. and Scheibel, A.B.** 1993. Microtubule-associated proteins tau and amyloid P component in Alzheimer's disease. *Brain. Res.* 603: 74-86.
6. **Fergusson, J., Landon, M., Lowe, J., Ward, L., van Leeuwen, F.W. and Mayer, R.J.** 2000. Neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy brains exhibit immunoreactivity to frameshift mutant ubiquitin-B protein. *Neurosci. Lett.* 279: 69-72.
7. **Finley, D. and Varshavsky, A.** 1985. The ubiquitin systems: functions and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 10: 343-347.
8. **Gallyas, F.** 1971. Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 19: 1-8.
9. **Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D. and Boyse, E.A.** 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 11-15.
10. **Hatanpaa, K., Brady, D.R., Stoll, J., Rapoport, S.I. and Chandrasekaran, K.** 1996. Neuronal activity and early neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 40: 411-420.
11. **Hauw, J.J., Daniel, S.E., Dickson, D., Horoupian,**

- D.S., Jellinger, K., Lantos, P.L., McKee, A., Tabaton, M. and Litvan, I.** 1994. Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy). *Neurology* 44: 2015-2019.
12. **Hershko, A. and Ciechanover, A.** 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479.
13. **Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R. and Ogawara, M.** 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem. (Tokyo)*. 99: 1807-1810.
14. **Ikeda, K., Akiyama, H., Haga, C., Kondo, H., Arima, K. and Oda, T.** 1994. Argrophilic thread-like structure in corticobasal degeneration and supranuclear palsy. *Neurosci. Lett.* 174: 157-159.
15. **Iqbal, K., Grundke-Iqbal I., Zaidi, T., Merz, P.A., Wen, G.Y., Shaikh, S.S., Wisniewski, H.M., Alafuzoff, I. and Winblad, B.** 1986. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2: 421-426.
16. **Iwatsubo, T., Hasegawa, M. and Ihara, Y.** 1994. Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 88: 129-136.
17. **Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiya, N., Yoshimura, M. and Ihara, Y.** 1988. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 75 : 345-353.
18. **Lennox, G., Lowe, J., Morrell, K., Landon, M. and Mayer, R.J.** 1988. Ubiquitin is a component of neurofibrillary tangles in a variety of neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.* 94: 211-217.
19. **Litvan, I., Agid, Y., Calne, D., Campbell, G., Dubois, B., Duvoisin, R.C., Goetz, C.G., Golbe, L.I., Grafman, J., Growdon, J.H., Hallett, M., Jankovic, J., Quinn, N.P., Tolosa, E. and Zee, D.S.** 1996. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 47: 1-9.
20. **Litvan, I., Hauw, J.J., Bartko, J.J., Lantos, P.L., Daniel, S.E., Horoupian, D.S., McKee, A., Dickson, D., Baner, C., Tabaton, M., Jellinger, K. and Anderson, D.W.** 1996. Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 97-105.
21. **Love, S., Saitoh, T., Quijada, S., Cole, G.M. and Terry, R.D.** 1988. Alz-50, ubiquitin and tau immunoreactivity of neurofibrillary tangles, Pick bodies and Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 47: 393-405.
22. **Lowe, J., Lennox, G. and Leigh, P.N.** 1997. Disorders of Movement and System Degenerations, p. 281-366. *In GreenField's Neuropathology* Eds. DI Graham, PL Lantos, 6th edn. London: Arnold.
23. **Mao, J.J., Katayama, S., Watanabe, C., Harada, Y., Noda, K., Yamamura, Y. and Nakamura, S.** 2001. The relationship between alphaB-crystallin and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27: 180-188.
24. **Mori, H., Hamada, Y., Kawaguchi, M., Honda, T., Kondo, J. and Ihara, Y.** 1989. A distinct form of tau is selectively incorporated into Alzheimer's paired helical filaments. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 159: 1221-1226.
25. **Murayama, S., Mori, H., Ihara, Y. and Tomonaga, M.** 1990. Immunocytochemical and ultrastructural studies of Pick's disease. *Ann. Neurol.* 27: 394-405.
26. **Oka, M., Katayama, S., Watanabe, C., Noda, K., Mao, J.J. and Nakamura, S.** 1998. Argrophilic structures stimulate glial reactions in neurofibrillary tangles and senile plaques. *Neurol. Res.* 20: 121-126.
27. **Perry, G., Friedman, R., Shaw, G. and Chau, V.** 1987. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 3033-3036.
28. **Pollock, N.J., Mirra, S.S., Binder, L.I., Hansen, L.A. and Wood, J.G.** 1986. Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau. *Lancet* 2: 1211.
29. **Steele, J.C., Richardson, J.C. and Olszewski, J.** 1964. Progressive supranuclear palsy. *Arch. Neurol.* 10: 333-359.
30. **Uchihara, T., Nakamura, A., Yamazaki, M. and Mori, O.** 2001. Evolution from pretangle neurons to neurofibrillary tangles monitored by thiazin red combined with Gallyas method and double immunofluorescence. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 101: 535-539.
31. **Yamada, T., Calne, D.B., Akiyama, H., McGeer, E.G. and McGeer, P.L.** 1993. Further observations on Tau-positive glia in the brains with progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 85: 308-315.



# The Significance of Appearance of Neurofibrillary Tangles and Coiled Bodies in Progressive Supranuclear Palsy

— Study about Ubiquitination of Neurofibrillary Tangles and Coiled Bodies in  
Progressive Supranuclear Palsy —

Chenghua JIN

Department of Clinical Neurosciences and Therapeutics, Division of Integrated Medical Science,  
Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University  
(Director: Prof. Masayasu MATSUMOTO)

Progressive supranuclear palsy (PSP) is a degenerative disorder pathologically characterized by neuronal loss with responsive gliosis in the substantia nigra, globus pallidus, thalamus, dentate nucleus of the cerebellum and tegmentum of pons. It has been reported that abnormally phosphorylated tau in neurons and oligodendroglia forms neurofibrillary tangles (NFTs) and coiled bodies (CBs). Ubiquitin protein (Ub) plays an important role in degradation of altered protein in degenerative disorders by an ATP-dependent pathway. To clarify how the formation of NFTs and CBs in oligodendroglia is related to the formation of lesions in PSP, we classified NFTs and CBs in three PSP brains into four stages and counted the number of cells of each stage and the positive rates of Ub in total numbers of NFTs and CBs. The results showed that the appearance of NFTs was not related to neuronal loss and responsive gliosis, while CBs were closely related to neuronal loss. Although there was neuronal loss, there were few stage IV NFTs (ghost tangles) and CBs, which indicate cell death. Moreover, the positive rates of Ub in NFTs and CBs were 2.1% and 2.7%, respectively. These findings suggest that the formation of NFTs and CBs does not have a vital role in neuronal loss and responsive gliosis in PSP.