

## 筋萎縮性側索硬化症における p62 蛋白の異常凝集に 関する検討：痴呆合併・非合併例の比較

日 地 正 典

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8月31日

受理：平成17年12月12日

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は上位と下位の運動神経細胞が選択的に障害される原因不明の神経変性疾患である。病理学的には運動神経細胞脱落と ubiquitin (ub) を用いた免疫組織化学染色により残存運動神経細胞内に疾患特異性の高い封入体が認められる。一方で痴呆を伴う ALS (ALS with dementia: ALS-D) の脊髄においても ALS と同様の病理学的所見を認めるが、両疾患の変性過程についての相違は明らかではない。

本研究では、ALS と ALS-D における変性所見の相違を明らかにするために ALS 5例と ALS-D 5例の剖検脊髄と大脳を用いて検討した。ub 結合ドメインを有し、ストレス応答性蛋白である p62 に対する抗体と抗 ub 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、封入体を伴う運動神経細胞数および分布を比較・検討した。また ub と p62 に対する抗体を用いて免疫二重染色し、細胞内での共存について観察した。残存運動神経細胞内の ub 陽性封入体と p62 陽性封入体は同様の形態を呈しており、両疾患で差は認められなかった。ALS 群では一部の ub 陽性封入体が p62 と共存していた。ALS-D 群の運動神経細胞では p62 陽性封入体数と ub 陽性封入体数は同程度であった。さらに、両疾患の脊髄では p62 陽性の封入体が残存運動神経細胞内のみでなく oligodendrocyte 内にも認められ、ALS-D の大脳では非常に広範囲に観察された。免疫二重染色による結果から、oligodendrocyte 内の p62 陽性封入体は ub との共存を認めなかった。以上より、①運動神経細胞内の封入体は ub と p62 の関連性において ALS 群と ALS-D 群では異なっていることが明らかとなった。②ALS-D では oligodendrocyte 内の p62 陽性封入体が多数認められる。③p62 の異常凝集は運動神経細胞内と oligodendrocyte 内で ub との関連性が異なる。この事は、p62 が変性に強く関わっている事を示唆している。

**Key words** : Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Amyotrophic lateral sclerosis with dementia (ALS-D), Ubiquitin (ub), P62, Oligodendrocyte

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は、錐体路を構成する上位および下位の運動神経が選択的に障害され、進行性の四肢麻痺と致死性の呼吸筋麻痺を生じる疾患である<sup>2)</sup>。その発症原因は現在も尚不明であり効果的な治療法はまだない。

病理学的には運動神経細胞脱落、反応性グリオシス、spheroids に加え、脊髄の残存運動神経細胞内には Bunina 小体が認められる<sup>2)</sup>。ubiquitin (ub) に対

する免疫組織化学では、脊髄運動神経細胞内に ub 陽性で特異な形態をもつ Skein-like inclusions (SLIs) や Round inclusions (RIs) がほぼ全例に認められ、ALS に特異性が高い封入体として知られている<sup>14,15)</sup>。ub は標的蛋白の分解機構に関与しており<sup>4)</sup>、ub の標的となる変性した蛋白の判明が封入体の解明につながると思われる。しかしながら、ALS の標的蛋白は現在、不明である。これまで ub 陽性封入体を伴う神経変性疾患にはアルツハイマー病 (Alzheimer's

disease : AD) における神経原線維変化<sup>5,17)</sup>, パーキンソン病 (Parkinson's disease : PD) におけるレビー小体<sup>6,13)</sup>, 多系統萎縮症 (Multiple system atrophy : MSA) におけるグリア細胞質内封入体<sup>20)</sup>などが報告されている。これらの封入体における ub の標的蛋白も不明であるが, 免疫組織化学による検討ではリン酸化タウ<sup>9)</sup>,  $\alpha$ -synuclein に対して陽性であり<sup>22,23)</sup>, 封入体構成要素の一つであると考えられている。ALS で認められる SLIs と RLs は AD, PD, MSA における封入体とは異なり p-tau,  $\alpha$ -synuclein に陰性の封入体である。以上のように, 神経変性疾患における封入体は疾患特異的な形態を呈するのみでなく免疫組織化学的特徴も異なることが明らかとなっており, 封入体の解明は疾患の発生機序を解明するうえで, 重要な手がかりになると考えられる。

一方で疾患分類学上は, 前頭側頭葉型痴呆 (Fronto-temporal dementia : FTD) に分類されている痴呆を伴う ALS (ALS with dementia : ALS-D) は前頭葉と側頭葉に変性と萎縮があり, これに対応して性格変化を主体とする特有な痴呆症状が出現する疾患である<sup>8,16)</sup>。神経病理学的に ALS と ALS-D の脊髄において, これまでに明らかな違いは報告されていない。しかし ALS-D における前頭・側頭葉には大脳皮質の II・III層に軽度の神経細胞脱落を伴い, ALS-D の海馬歯状回では神経細胞内に球状または核周囲に病理学的な診断マーカーとされている ub 陽性封入体 (ubiquitinated inclusions : ub-Is) が認められる<sup>19,24)</sup>。ub-Is は, 嗅内皮質, 側頭葉, 島回の上層の小型神経細胞や扁桃核, 前頭葉の小型細胞にもしばしば認められるが, 頭頂葉, 後頭葉, 基底核, 小脳, 脳幹には出現しない<sup>10)</sup>。このような ub-Is の分布は FTD としての分布とはほぼ一致しており, 近年, 免疫組織化学を用いた検討により, ストレス応答性蛋白である p62 が共存していることが確認され封入体の構成要素の一つであると考えられている<sup>1)</sup>。p62 は440アミノ酸からなり, C末端に ub 結合能をもつ ubiquitin-binding associated domain が存在する<sup>21)</sup>。ALS-D 症例において p62 が ub-Is と共存していることについての分子生物学的な役割については明らかでないが, 培養細胞による検討で p62 が atypical protein kinase C, p38, p56<sup>lck</sup>, replication protein A interacting protein, nuclear factor  $\kappa$ B のようないくつかのシグナル蛋白と相互に作用する<sup>7)</sup>ことから, ub 結合能以外にストレス応答性のシグナル経路としての機能も重要であると考えられる。このように多機能蛋白である p62 が ALS-D の大脳皮質における神経細胞変性に関与していることが示されたが, ALS

と ALS-D における p62 の関与についての相違は明らかとなっていない。そのため本研究では, 脊髄と大脳において抗 p62 抗体を用いた免疫組織化学的手法により ALS 群と ALS-D 群を比較検討し, 変性所見の相違を明らかにすることを目的とした。本研究により ub と p62 の関連性から ALS 群と ALS-D 群の運動神経細胞の変性は異なることが示唆され, 更に, ALS-D の変性は, 従来考えられているよりも非常に広範囲に及んでいることが明らかとなった。

## 材料と方法

対象は, 臨床診断として El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis の国際的診断基準を満たし<sup>2)</sup>, 病理学的に診断した ALS 5例 (平均発症時年齢 ; 69.2 $\pm$ 4.3歳, 平均罹病期間 ; 31.2 $\pm$ 17.7ヶ月) と ALS-D 5例 (平均発症時年齢 ; 74 $\pm$ 2.4歳, 平均罹病期間 ; 25.8 $\pm$ 15.5ヶ月) (Table 1) の剖検脊髄と大脳である。全ての症例は, 死後3時間以内に剖検を行った。

### 病理組織学的検索および免疫組織化学的検索

検索症例の脊髄と大脳は摘出後直ちに10%ホルマリン液で2週間から4週間の固定を行い, パラフィン包埋した。それぞれ 7 $\mu$ m 厚の切片を用いて Hematoxylin and Eosin (HE) 染色, Klöber-Barrera (KB) 染色, Methenamin-silver 染色, Bodian 染色, Gallyas-Braak (G-B) 染色を行った。神経細胞脱落, グリオーシス, Bunina 小体 (BBs), spheroids の有無については, HE 染色により評価した。

免疫組織化学的方法は, 7 $\mu$ m 厚のパラフィン切片を用いて, キシレンによる脱パラフィン操作後, 100%エタノールから順に60%エタノール系列へ切片を浸透させ, 蒸留水で十分に洗浄した標本を用いた。Protein Block Serum-Free (DAKO, Carpinteria, CA, USA) を室温にて20分間反応させた後, 一次抗体を 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。一次抗体には抗 mouse $\cdot$  monoclonal 抗体 (mAb) である ub (MAB1510, Chemicon, Temecula, CA, USA, diluted 1: 20000), リン酸化タウ (AT8, ENDOGEN, USA, diluted 1: 800) と  $\alpha$ -synuclein (Zymed, South San Francisco, USA, diluted 1: 800) または, 抗 rabbit $\cdot$  polyclonal 抗体 (pAb) である glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Zymed, South San Francisco, USA, diluted 1: 50) を用いて Envision 法 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) により免疫染色した。すなわち, 一次抗体を反応後に cold TBS で10分間洗浄後, mAb に対しては二次抗体に

Labeled polymer-HRP Anti-Mouse (DAKO, Carpinteria, CA, USA) を用い、pAb に対しては、二次抗体に Labeled polymer-HRP Anti-Rabbit (DAKO, Carpinteria, CA, USA) を用いて室温で30分間反応させた。再度 cold TBS で10分間洗浄した後に 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (DAKO, Glostrup, Denmark) を発色剤とし0.001%の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し光学顕微鏡下で発色させた。発色後、ヘマトキシリン染色を用いて核染色した。また、抗 Guinea pig polyclonal 抗体である p62 の C 末端に対する一次抗体 (p62-C) (Progen, Heidelberg, Germany, diluted 1: 2000) と p62 の N 末端に対する一次抗体 (p62-N) (Progen, Heidelberg, Germany, diluted 1: 2000) には peroxidase guinea pig IgG (PK-400, フナコシ, Vectastain) を用いて ABC 法で免疫染色を行った。二次抗体には、Biotinylated antibody を室温で2時間反応させた後、cold PBS で10分間洗浄し、ABC reagent を室温で30分間反応させた。反応後、cold PBS で10分間洗浄し、DAB 発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行った。

#### 免疫二重染色と形態観察

一次抗体に抗 ub 抗体を用いて 4℃で一晩反応させた後、cold PBS で10分間洗浄した。以降の操作は全て暗室で行い、二次抗体に Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Eugene, OR, diluted 1: 1000) を室温で2時間反応させ cold PBS で10分間洗浄した。更に抗 p62-C 抗体または抗 p62-N 抗体を 4℃で一晩反応させた後、cold PBS で10分間洗浄し、Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, diluted 1: 1000) を用いて室温で2時間反応させた。再度、cold PBS で洗浄後 aqua poly/mount を用いて封入し共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

#### 定量分析

頸髄・胸髄・腰髄・仙髄の各髄節で 7μm 厚の連続切片を用いて ub, p62-C および p62-N に対する免疫染色を施行し、封入体を伴う運動神経細胞数とグリア細胞数を一切片あたりで測定した。

#### 統計分析

ALS 群と ALS-D 群の発症時年齢と罹病期間については *unpaired student-t* 検定を用いて両群を比較した。また脊髄の各髄節における封入体を伴う運動神経細胞数 (p62-C/ub または p62-N/ub) とグリア細胞数 (p62-C と p62-N) の2群間比較には *Mann-Whitney U* 検定を用いて検討した。

#### 大脳における封入体の分布

ALS 群と ALS-D 群の全症例で大脳の冠状断 (7μm 厚) の連続切片を作成後、一枚目の切片で KB 染色を行い、二枚目の切片で抗 p62-C 抗体、三枚目の切片で抗 p62-N 抗体を用いてそれぞれ免疫組織化学染色を行った。光学顕微鏡下 (接眼レンズ: 10倍, 対物レンズ: 40倍, デジタル倍率: 1.5倍) でそれぞれ p62-C と p62-N 陽性グリア細胞を確認し、油性マジックを用いて顕微鏡下でマークした (一つの陽性グリア細胞に対し、一つのマークを行った)。全てのマーク終了後に KB 染色済み切片と共にコンピュータ上に取り込み、画像を重ね合わせることで皮質、白質、及び封入体の分布を明らかにした。

#### 成 績

ALS 群と ALS-D 群の *unpaired student-t* 検定による群間比較では発症時年齢と罹病期間に統計学的有意差を認めなかった (発症時年齢;  $p=0.06$ , 罹病期間;  $p=0.62$ )。KB 染色では脊髄内に明らかな脱髄所見を認めなかった。全例の大脳は Methenamin-silver 染色と Bodian 染色により、老人斑は CERAD 分類で A 以下、神経原線維変化は Braak stage 2 以下であり、有意な Alzheimer 病変は観察されなかった。ALS 5例と ALS-D 5例の臨床像と病理学的所見の特徴像 (神経細胞脱落, グリオース, Bunina 小体, spheroids の有無) は、Table 1 に示す。

#### 運動神経細胞内封入体

抗 ub 抗体による免疫組織化学染色では全症例の脊髄で SLIs と RIs が認められ、各疾患群における形態学的特徴に違いは認められなかった。p62-C および p62-N を用いた免疫組織化学染色でも ub と同様の形態で運動神経細胞内に封入体 (SLIs と RIs) が観察された (Fig. 1)。抗 ub 抗体と抗 p62 抗体による免疫二重染色では、SLIs と RIs は ub と p62 が共存して封入体を形成していることが観察された (Fig. 2)。ALS 群では、ub 陽性封入体を伴う残存運動神経細胞が p62 陽性封入体を伴う残存運動神経細胞よりも統計学的に有意に多く検出されたが、ALS-D 群では有意差は認められなかった (Fig. 3)。一方で、ALS 群と ALS-D 群の大脳では、上位運動神経細胞内に ub または p62 陽性封入体は認められなかった。

#### グリア細胞内封入体

p62 陽性封入体は運動神経細胞以外にも認められ (Fig. 4)、連続切片による観察では GFAP 陰性のグリ

**Table 1.** Summary of clinical and pathological data

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10
Sex	F	F	M	M	M	F	F	M	M	F
Age at onset (years)	70	67	72	63	74	72	74	72	78	74
Clinical diagnosis	ALS	ALS	ALS	ALS	ALS	ALS-D	ALS-D	ALS-D	ALS-D	ALS-D
Total duration (months)	41	18	48	42	7	16	12	19	50	32
Respiratory support (months)	-	-	-	-	-	-	-	8	37	-
Brain weight (g)	1200	1130	n.e.	1250	n.e.	1120	1000	1065	1180	950
Spinal lesions										
Neuronal loss	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gliosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bunina bodies	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spheroids	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Neuronal loss in the cortex and subcortical nuclei										
Motor cortex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdala	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CA1 to Subiculum	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ub-Is										
Dentate gyrus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Temporal cortex	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

F; female, M; male, ALS; Amyotrophic lateral sclerosis, ALS-D; ALS with dementia. absent (-), present (+). Ub-Is; ubiquitin-positive inclusions. n.e.; not examined.

ア細胞の核周囲を取り囲むように存在し、Cap 様の封入体 (Cap-like inclusions: CLIs) として認められた。CLIs は主に脊髄前角の白質周囲に存在し、ub との免疫二重染色では ub 陰性の封入体として観察された (Fig. 5)。CLIs も疾患群における形態学的違いは明らかではなく、p62-C により検出された CLIs 数は、両疾患群で共に p62-N よりも多く認められた (Fig. 6-A)。各髄節での検討では、p62-C および p62-N 陽性の CLIs が共に ALS-D の頸髄で統計学的に有意に多く認められた (Fig. 6-B)。頸髄の各髄節における CLIs の分布の違いは明らかではなかった。ALS-D の大脳においても CLIs は多数観察され、主に皮質から白質にかけて非常に多くの封入体が認められた (Fig. 7)。一方で、ALS の大脳における CLIs は稀にしか認められなかった。全症例において G-B 染色、リン酸化タウ、 $\alpha$ -synuclein 陽性の封入体は認められなかった。

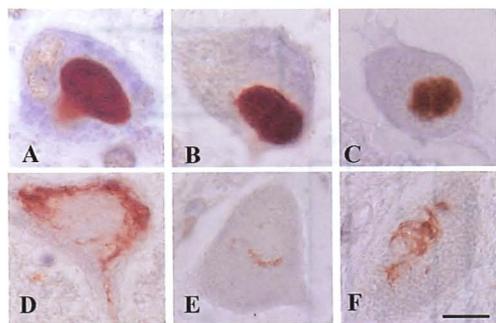
## 考 察

これまでに ALS と ALS-D の脊髄病変において、運動神経細胞脱落、反応性グリオシス、spheroids、Bunina 小体の形態、分布に明らかな違いは認められておらず、出現頻度および免疫組織化学的な特徴の相違は報告されていない。そのため両疾患の運動神経細胞が選択的に機能障害を生じる分子機序の詳細は未だ不明であり、両疾患の運動神経細胞変性が同一の変性

機序によるのかどうかについて明らかでなかった。また、ALS と ALS-D の脊髄に特異的に出現する SLIs と RIs は変性機序解明の手がかりとなりうるが、封入体構成要素もなお、不明である。

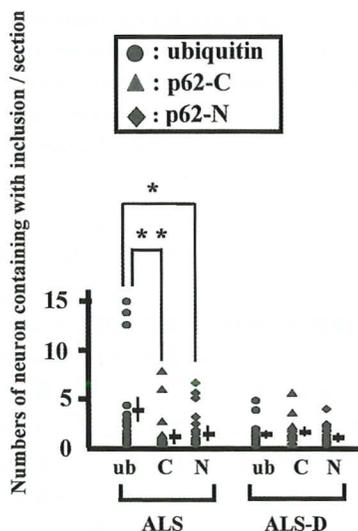
本研究の抗 ub 抗体を用いた免疫組織化学による検討では SLIs と RIs は全症例で認められ、形態学的にも疾患群による明らかな違いはなく、抗 p62 抗体においても同様の形態で検出された (Fig. 1)。また、免疫二重染色では p62 と ub が共存していることが確認され (Fig. 2)、p62 が運動神経細胞内における封入体の構成要素であると考えられた。この事は p62 が ub 結合能を有する<sup>21)</sup> ことから示唆される。更に本研究では、封入体 (SLIs と RIs) を伴う残存神経細胞数を統計的手法により両疾患群を分析した。ALS 群では ub 陽性封入体の約30%が p62 陽性で、ALS-D 群では ub 陽性封入体のほぼ100%が p62 陽性であったことから、運動神経細胞内における ub と p62 の関連性は両群で異なることを明らかにした (Fig. 3)。ALS-D の運動神経細胞では封入体の線維形成において p62 と ub が密接に関連している可能性があり、ALS とは異なる変性過程または機序が存在していると考えられる。

ALS と ALS-D は共に選択的な運動神経細胞脱落を特徴とする<sup>2,8,16)</sup> が、脊髄における変性が神経細胞に限局するかどうかは、従来不明であった。本研究では

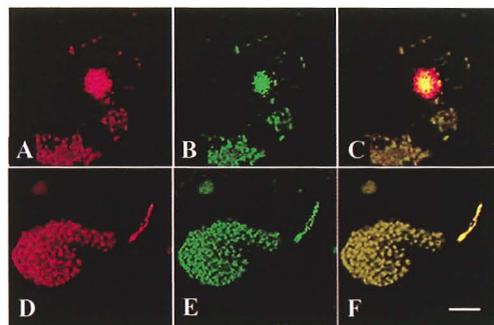


**Fig. 1.** Immunohistochemistry of inclusions in the remaining motor neurons (ALS; A, B, D and E, ALS-D; C and F).

Round inclusions (RIs) were shown in the motor neurons with ALS and ALS-D (A-C). Skein-like inclusions (SLIs) were also shown in the motor neurons in ALS and ALS-D (D-F). Inclusion with ubiquitin (A and D). Inclusion with p62-C (B and E). Inclusion with p62-N (C and F). Inclusions with p62-C or p62-N were shown as similar appearance as ubiquitinated inclusions in ALS and ALS-D. Bar, 10  $\mu$  m (A to F).

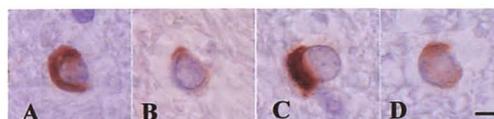


**Fig. 3.** In the spinal cords with ALS and ALS-D groups, compared with the numbers of neuron containing inclusions with ubiquitin (ub), p62-C (C) or p62-N (N). In ALS group, the numbers of neuron containing ub-Is were statistical significantly higher than those of inclusions with p62-C or p62-N. In ALS-D group, the numbers of neuron containing inclusions were revealed with almost similar counts among 3 antibodies. The under lanes represent ALS and ALS-D group, respectively. The solid bars represent mean  $\pm$ SD. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. *Mann-Whitney U-testing* was used.



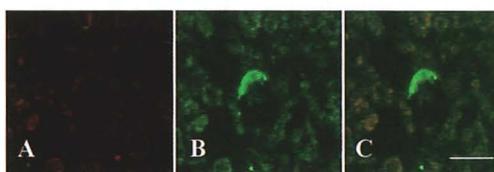
**Fig. 2.** Double-labeling immunohistochemistry, using confocal laser scanning microscopy.

A: RIs with ubiquitin (ub). B: RIs with p62-C. C: Merged with ub and p62-C. D: SLIs with ub. E: SLIs with p62-C. F: Merged with ub and p62-C. Ubiquitinated inclusions were colocalized with p62-C in the motor neurons. Bar, 10  $\mu$  m (A to F).



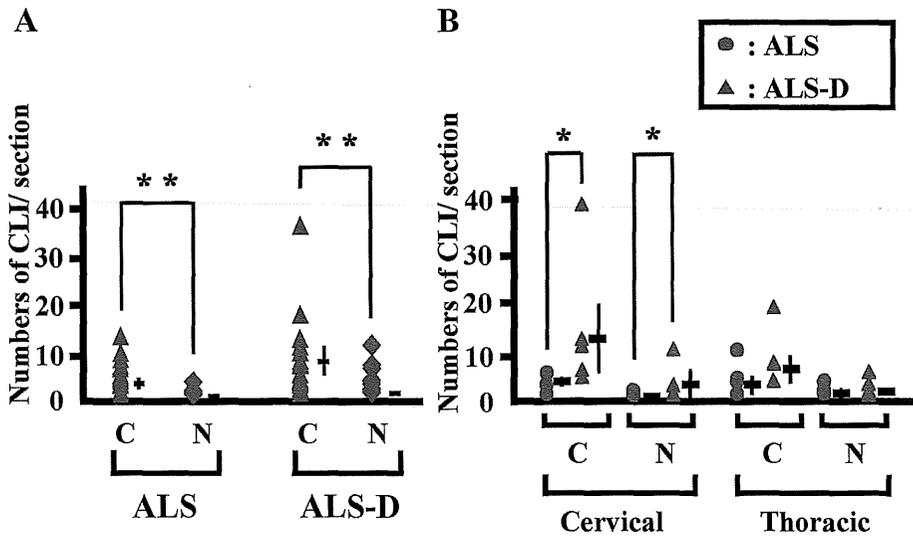
**Fig. 4.** Light microscopic characteristic of "Cap-like" inclusions (CLIs).

The p62 immunoreactive glial inclusions were observed encircling the perinucleus in the glial cells. A: CLIs with p62-C in ALS. B: CLIs with p62-N in ALS. C: CLIs with p62-C in ALS-D. D: CLIs with p62-N in ALS-D. Bar, 5  $\mu$  m (A to D).



**Fig. 5.** Double-labeling immunohistochemistry of "Cap-like" inclusion (CLI).

A: CLI with ubiquitin (red). B: CLI with p62-C (green). C: Merged with ubiquitin and p62-C. CLI was shown without ubiquitin. Bar, 5  $\mu$  m (A to C).



**Fig. 6.** The differential numbers of "Cap-like" inclusions (CLIs) in the spinal cords with ALS and ALS-D.

A: In ALS and ALS-D groups, compared with CLIs between with p62-C (C) and with p62-N (N), the numbers of CLIs with p62-C (c-CLIs) were about 3 times higher than those of CLIs with p62-N (n-CLIs) in both groups. The under lanes represent ALS and ALS-D group, respectively. The solid bars represent mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$ . B: In ALS and ALS-D groups, the figure represents the numbers of c-CLIs and n-CLIs in the cervical and thoracic segments, respectively. However, Mann-Whitney U-testing revealed statistically significant differences in the cervical segment between both groups, the numbers of CLIs under the thoracic segment had absence of significant differences between both groups. ALS-D group had a lot of c-CLIs and n-CLIs compared with those in ALS group. The upper under lanes represent p62-C and p62-N, and the lower under lanes represent cervical and thoracic segment. The solid bars represent mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ .

抗 p62 抗体を用いた免疫組織化学的手法により ALS と ALS-D の脊髄に残存運動神経細胞以外にも封入体が形成されていることを観察した (Fig. 4)。これらの封入体は主に白質におけるグリア細胞内で認められ、pAb である GFAP を用いた連続切片の検討から GFAP 陰性のグリア細胞であることが判明した。すなわち我々は、oligodendrocyte にも異常封入体 (CLIs) が存在することを初めて証明した。これまでに進行性核上性麻痺 (Progressive supranuclear palsy : PSP)<sup>18)</sup>、大脳皮質基底核変性症 (Cortico-basal degeneration : CBD)<sup>11)</sup>、MSA<sup>20)</sup> においては G-B 染色、リン酸化タウ、 $\alpha$ -synuclein などにより検出される oligodendrocyte 内の封入体が報告されている。これらグリア細胞の変性は、それぞれの神経変性疾患と密接に関係していることから分子病理学的、生化学的、遺伝子レベルでの研究が行われている。一方で、CLIs は G-B 染色、リン酸化タウ、 $\alpha$ -synuclein 陰性の封入体であり、PSP、CBD または MSA で認められるグリア細胞内封入体とは形態も免疫組織化学の性状も異なる。p62 と

ub による免疫二重染色の結果からは CLIs は ub 陰性であることが判明し (Fig. 5)、このことから oligodendrocyte と運動神経細胞では変性過程が異なっていると考えられる。更に p62-C 陽性 CLIs と p62-N 陽性 CLIs の出現頻度の違いにおいては、ALS 群と ALS-D 群の両疾患で共に、p62-C 陽性 CLIs が p62-N 陽性 CLIs より多く認められた (Fig. 6)。この C 末抗体と N 末抗体により検出される封入体の出現頻度の違いは、accessibility や modification の違いによるものと考えられ、このような組織切片を用いた epitope mapping による検出頻度の違いは  $\alpha$ -synuclein やリン酸化タウでも指摘されており<sup>12)</sup>、conformation の変化もしくは proteolysis によるものと理解されている。

両疾患における CLIs の形態の違いは明らかでなかったが、頸髄では ALS-D 群において ALS 群よりも多く認められた。そのため、本研究では、大脳病変においても検討し、ALS-D 群では従来考えられていた変性部位よりも非常に広範囲に変性が及んでいることが明らかとなった (Fig. 7)。ALS-D の大脳病変にお



**Fig. 7.** A schematic distribution of Cap-like inclusions (CLIs) with p62-C in the brain with ALS or ALS-D.

Upper and lower figures, coronal section schemas, are represented brain with ALS and ALS-D, respectively. A lot of CLIs were mainly shown in the white matter in the frontal, parietal and temporal lobes, and the corpus callosum. On the other hand, those inclusions are rarely shown in the occipital lobe and the brain with ALS case. Represented figure is case 2 and 10, respectively. One dot means a Cap-like inclusion with p62-C.

る特徴的な変性所見としては、現在、病理学的診断マーカーとされている大脳皮質の ub-Is が報告されている<sup>19,24)</sup>。ub-Is は、嗅内皮質、側頭葉、島回の上層の小型神経細胞や扁桃核、前頭葉の小型細胞にもしばしば認められるが、頭頂葉、後頭葉、基底核、小脳、脳幹には出現せず、oligodendrocyte 内の封入体は認められていない<sup>10)</sup>。このような ub-Is の分布は FTD としての分布とほぼ一致する。一方で CLIs は FTD としての分布と必ずしも一致していないが、その理由として以下のように考えられる。第一に ALS 症例の大脳では脊髄と異なり CLIs がほとんど観察されなかったことから、この封入体は上位運動神経細胞の軸索近位部ではなく軸索遠位部側と密接に関連している可能性がある。第二に ALS-D 症例の大脳では非常に多くの CLIs が観察されたが、注目すべき事は左右の大脳半球を線維連絡する脳梁にも多数の封入体が認められたことである。つまり、CLIs は神経細胞の軸索末端から出現し、軸索近位部へ封入体形成が次第に及ぶことが示唆され、CLIs が必ずしも FTD としての分布を示していなかった理由と考えられる。

本研究により、①運動神経細胞内の封入体は ub と

p62 の関連性において ALS 群と ALS-D 群では異なっていることが明らかとなった。②ALS-D では oligodendrocyte 内の p62 陽性封入体が多数認められる。③ALS 群と ALS-D 群では p62 の異常凝集が運動神経細胞内と oligodendrocyte 内で ub との関連性が異なる。この事は、p62 が変性に強く関わっている事を示唆している。特に、ALS-D 群では運動神経細胞とグリア細胞で p62 が異常凝集を来し易い疾患であると考えられ、今後、運動神経細胞のみでなくグリア細胞における研究が病態解明のために必要であると思われる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました広島大学大学院病態探究医科学脳神経内科学 松本昌泰教授、広島大学名誉教授 中村重信名誉教授、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いた、金 成花先生（広島大学大学院病

態探究医科学脳神経内科学), 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氏に感謝いたします。

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. **Arai, T., Nonaka, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yoshida, M., Hashizume, Y., Tsuchiya, K., Oda, T. and Ikeda, K.** 2003. Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunoreactive for p62. *Neurosci. Lett.* **342** : 41-44.
2. **Brooks, B.R.** 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* **124** (Suppl) : 96-107.
3. **Bunina, T.L.** 1962. On intracellular inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Korsakov J. Neuropathol. Psychiatry* **62** : 1293-1299.
4. **Ciechanover, A.** 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79** : 13-21.
5. **Cole, G.M. and Timiras, P.S.** 1987. Ubiquitin-protein conjugates in Alzheimer's lesions. *Neurosci. Lett.* **79** : 207-212.
6. **Dickson, D.W., Crystal, H., Mattiace, L.A., Kress, Y., Schwagerl, S., Ksiezak-Reding, H., Davies, P. and Yen, S.H.** 1989. Diffuse lewy body disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of senile plaques. *Acta Neuropathol.* **78** : 572-584.
7. **Geetha, T. and Wooten, M.W.** 2002. Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS* **512** : 19-24.
8. **Hudson, A.J.** 1981. Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, parkinsonism and other neurological disorders: a review. *Brain* **104** : 217-247.
9. **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.
10. **Ikeda, K. and Tsuchiya, K.** 2004. Motor neuron disease group accompanied by inclusions of unidentified protein signaled by ubiquitin. *Neuropathol.* **24** : 117-124.
11. **Kommori, T., Arai, N., Oda, M., Nakayama, H., Mori, H., Yagishita, S., Takahashi, T., Amano, N., Murayama, S., Murakami, S., Shibata, N., Kobayashi, M., Sasaki, S. and Iwata, M.** 1998. Astrocytic plaques and tufts of abnormal fibers do not coexist in corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* **96** : 401-408.
12. **Kuusisto, E., Salminen, A. and Alafuzoff, I.** 2001. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* **12** : 2085-2090.
13. **Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M. and Ihara, Y.** 1988. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol.* **75** : 345-353.
14. **Leigh, P.N., Anderton, B.H., Dodson, A., Gallo, J.-M., Swash, M. and Power, D.M.** 1988. Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci. Lett.* **93** : 197-203.
15. **Lowe, J., Lennox, G., Jefferson, D., Morrell, K., McQuire, D., Gray, T., Landon, M., Doherty, F.J. and Mayer, R.J.** 1988. A filamentous inclusion body with anterior horn neurons in motor neuron disease defined by immunocytochemical localization of ubiquitin. *Neurosci. Lett.* **94** : 203-210.
16. **Mitsuyama, Y.** 1984. Presenile dementia with motor neuron disease in Japan: clinico-pathological review of 26 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **47** : 953-959.
17. **Mori, H., Kondo, J. and Ihara, Y.** 1987. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* **235** : 1641-1644.
18. **Nishimura, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Kondo, H., Kato, M., Li, F., Iseki, E. and Kosaka, K.** 1995. Immunohistochemical investigation of tau-positive structures in the cerebral cortex of patients with progressive supranuclear palsy. *Neurosci. Lett.* **201** : 123-126.
19. **Okamoto, K., Hirai, S. and Amari, M.** 1996. Electron micrograph of ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the extra-motor cortices of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol.* **16** : 112-116.
20. **Papp, M.I., Kahn, J.E. and Lantos, P.L.** 1989. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J. Neurol. Sci.* **94** : 79-100.
21. **Park, I., Chung, J., Walsh, C.T., Yun, Y.,**

- Strominger, J.L. and Shin, J.** 1995. Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56<sup>lck</sup> and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92 : 12338–12342.
22. **Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. and Goedert, M.** 1997.  $\alpha$ -synuclein in Lewy Bodies. *Nature* 388 : 839–840.
23. **Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S. and Takahashi, H.** 1998.  $\alpha$ -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* 249 : 180–182.
24. **Wightman, G., Anderson, V.E.R., Martin, J., Swash, M., Anderton, B.H., Neary, D., Mann, D., Luthert, P. and Leigh, P.N.** 1992. Hippocampal and neocortical ubiquitin-immunoreactive inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Neurosci. Lett.* 139 : 269–274.

The Study of Abnormal p62-aggregations in Amyotrophic  
Lateral Sclerosis (ALS):  
The comparative study of ALS with/ without dementia

Masanori HIJI

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

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by selective degeneration of upper and lower motor neurons. Pathologically, both ALS and ALS with dementia (ALS-D) have common pathological findings, these degenerative mechanisms in the motor neurons have not been yet elucidated.

To clarify the differences of degenerative findings between both groups, we examined the human spinal cord and the brain (ALS; n=5, ALS-D; n=5) by immunohistochemical method detecting ub and p62, which is stress responsible protein with ub-binding associated domain. Morphologically, ub and p62-positive intra-motor neuronal inclusions were similar appearances in both groups. We showed, using double-labeling stain by those antibodies, coexistence with those inclusions. In both groups, the numbers of motor neurons containing inclusion(s) were also compared. In ALS-D group, those of neurons containing inclusions were revealed with almost similar counts among 3 antibodies. In addition, we investigated that abnormal p62-positive inclusions are presented not only in the motor neurons but also in the oligodendrocytes without ub in the spinal cords with both groups, and those inclusions were widely extending to the brain with ALS-D. These results suggested that differential p62-aggregations, related to ub, are presented in the motor neurons and oligodendrocytes, in both groups.