

## 論文内容要旨

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is enriched  
in granulovacuolar degeneration bodies and  
neurofibrillary tangles

(ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸は顆粒  
空胞変性や神経原線維変化内に豊富に存在する)

Neuropathology and Applied Neurobiology, 40 : 489 – 501, 2014.

主指導教員：松本 昌泰教授

(応用生命科学部門 脳神経内科学)

副指導教員：栗栖 薫教授

(応用生命科学部門 脳神経外科学)

副指導教員：丸山 博文准教授

(応用生命科学部門 脳神経内科学)

西川 智和

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

## 論文内容要旨

### 【背景】

アルツハイマー病 (AD) は病理学的にアミロイド  $\beta$  蛋白の沈着からなる老人斑と過リン酸化タウ蛋白からなる神経原線維変化 (NFT) の出現によって特徴付けられる。NFT は AD 以外の様々な神経変性疾患でも認められ、これらの疾患はタウオパチーと総称される。また、AD 脳で特徴的に認められる顆粒空胞変性 (GVD) は直径 3~5  $\mu\text{m}$  の球状小胞で周囲を透明帯に囲まれた構造を呈しており神経錐体細胞核周囲において好塩基性の封入体として存在する。GVD マーカーとしてグリコーゲンシンターゼキナーゼ (GSK)-3  $\beta$  やサイクリン依存性キナーゼ 5 (CDK5) などいくつかのタウリン酸化酵素が報告されていることから、GVD がタウ修飾の場であり NFT の形成に関与している可能性が示唆される。一方神経錐体細胞において CDK5 の免疫反応性は GVD だけでなく NFT 内でも微細顆粒構造として認められる。これらの微細顆粒は GVD の小胞内顆粒と同様の大きさであり、ラフト蛋白の一つのフロチリン-1 に対する抗体を用いた免疫染色でみられる顆粒 (Girardot N et al. Neuropathol Appl Neurobiol 2003) とも類似性が高い。脂質ラフトは細胞のシグナル伝達に重要な細胞膜ドメインであり GSK-3  $\beta$  や CDK5 が刺激により神経細胞の脂質ラフトの微小ドメインに動員されるという報告もある。以上のことから CDK5 陽性の GVD が脂質ラフトに由来する可能性が示唆される。しかし GVD や NFT に関連した小胞の脂質構成については報告がない。ホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 (PtdIns[4, 5]P<sub>2</sub>) は細胞膜において脂質ラフト構成成分の一つであり神経細胞における多くの膜輸送に重要である。我々は脂質ラフトが AD に基づく病理学的機序に関与しているとの仮説の元、AD を含むタウオパチーにおけるホスホイノシチドの分布様式を検討した。

### 【方法】

AD 症例 5 例 (平均年齢  $74.2 \pm 6.2$  歳)、他の神経変性疾患症例 17 例 (平均年齢  $67.8 \pm 8.9$  歳)、コントロール症例 4 例 (平均年齢  $64.0 \pm 11.6$  歳) の剖検脳海馬 (ホルマリン固定パラフィン切片) を用いて検討した。一次抗体には抗 PtdIns (4, 5)P2 抗体を用い ABC 法で DAB 発色した。また本研究で用いた抗 PtdIns (4, 5)P2 抗体 (clone 2C11) の特異性を確認するため以下の検討を行った。最初に通常の抗体の代用として PtdIns (4, 5)P2 と特異的に結合する PLC  $\delta$  1 の PH ドメインと GST の融合蛋白をプローベとした protein-lipid overlay (PLO) assay を行った。次に PtdIns (4, 5)P2 と親和性の高いネオマイシンを用いた抗体結合阻害試験を行った。また既知の GVD マーカーである charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B)、タウリン酸化酵素の一つである CDK5、リン酸化タウの一つである AT8、他のラフトマーカーであるフロチリン-1 やアネキシン 2 に対する抗体との二重染色を行い GVD や NFT における PtdIns (4, 5)P2 との局在性を検討した。

### 【結果】

PtdIns (4, 5)P2 は GVD において免疫反応性を示す一方でレビー小体やブニナ小体では示さなかった。NFT においては PtdIns (4, 5)P2 陽性の微細顆粒の集簇が認められた。本研究で用いた抗 PtdIns (4, 5)P2 抗体 (clone 2C11) の特異性の検討では PLO assay にて抗 PtdIns (4, 5)P2 抗体による免疫染色と同様の結果であった。またネオマイシンを用いた阻害試験では GVD と NFT の両者において免疫反応の減弱を認めた。以上のことから本研究で用いた抗 PtdIns (4, 5)P2 抗体 (clone 2C11) の特異性が確認され、PtdIns (4, 5)P2 が GVD や NFT の選択的なマーカーとなり得ることが示された。PtdIns (4, 5)P2 が陽性の神経細胞は①GVD のみ含むもの、②NFT のみ含むもの、③GVD と NFT 両方含むものの 3 つのカテゴリのいずれかに分類された。また蛍光二重染色では GVD において PtdIns (4, 5)P2

と CHMP2B が共局在を示したが、NFT においては AT8 の近傍に PtdIns(4,5)P2 陽性顆粒を認めた。一方 CDK5 とは GVD や NFT いずれにおいても共局在を示した。他の脂質ラフトマーカーを用いた検討では PtdIns(4,5)P2 はフロチリン-1 やアネキシン 2 と GVD や NFT いずれにおいても共局在を示した。

#### 【考察】

PtdIns(4,5)P2 や他の脂質ラフト関連蛋白が GVD や NFT の形成を介して AD を含むタウオパチーにおける神経変性過程に関与している可能性が示唆された。