

論 文 内 容 要 旨

4',6-Diamidino-2-Phenylindole Distinctly Labels Tau Deposits

(4',6-Diamidino-2-Phenylindole はタウ病変の検出
に有用である)

Journal of Histochemistry & Cytochemistry,
66(10): 737-751, 2018.

主指導教員：丸山 博文教授
(医歯薬保健学研究科 脳神経内科学)

副指導教員：栗栖 薫教授
(医歯薬保健学研究科 脳神経外科学)

副指導教員：細見 直永准教授
(医歯薬保健学研究科 脳神経内科学)

李 成玉

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

タウオパチーは、微小管関連蛋白質の一種であるタウ蛋白が神経あるいはグリア細胞内に異常集積することにより各種神経徴候と神経病理学的特徴を呈する神経変性疾患の総称であり、神経内科領域において頻度の高い疾患群である。タウ蛋白はそのアイソフォームや集積する細胞の相違を反映して種々の病理学的形態の異なる細胞内凝集体いわゆる封入体を形成する。タウオパチーの病理学的検討におけるタウ蛋白凝集体の検出には鍍銀染色が19世紀初頭から用いられているが、本法は手技的に煩雑であり他の分子とタウ蛋白との共局在を検証することが困難である。他の分子との共局在は蛍光色素のチオフラビンでタウ蛋白凝集体を染色した後に蛍光顕微鏡観察により可能であるものの、チオフラビンのピーク発光波長が他の一般的な抗体標識用蛍光色素のそれに近く、その点でチオフラビンも多重蛍光染色には不向きである。所属研究室においてアルツハイマー病のタウ蛋白凝集体である神経原線維変化を観察する過程で蛍光核染色剤の一つである4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) が細胞核の他に神経原線維変化を蛍光標識することを見出したことを発端に、タウオパチーの病理学的検索上のDAPIの汎用性を検討することを目的として本研究を行った。

本研究では、アルツハイマー病患者5例、進行性核上性麻痺 (Progressive supranuclear palsy, PSP) 患者2例、筋緊張性ジストロフィー、「脳内鉄沈着を伴う神経変性症」(Neurodegeneration with brain iron accumulation)、「17染色体に連鎖する前頭側頭型認知症およびパーキンソンズム」(Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) および大脳皮質基底核変性症 (Corticobasal degeneration, CBD) 患者各1例、計11例のタウオパチー患者ホルマリン固定剖検脳組織を検討対象としてDAPI染色後に蛍光顕微鏡にて観察した。まず、加齢と共に脳組織に高頻度に共存するリポフスチンの自家蛍光との区別のため、切片の紫外線照射によるリポフスチン由来の自家蛍光の消去、あるいは組織をプロテイナーゼK処理することによるリポフスチンの分解を行った。このような処理の後でもDAPIの染色像に変化は見られなかった。アルツハイマー病では火炎状のタウ蛋白凝集体 (神経原線維変化) の他、変性神経突起 (dystrophic neurites)、neuropil threads がDAPIにて染色された。CBDの球状タウ凝集体はDAPIにより染色されたがPSPのそれは染色されなかった。またPSPのtufted astrocyteやCBDのcoiled bodyもDAPIでは染色されなかった。

本来DAPIは核酸の染色剤であることから、タウ蛋白凝集体内の未知の核酸成分がその染色性の原因である可能性を考慮し、ヌクレアーゼのDNase IならびにRNase A処理にて組織内の核酸成分を除去した後もDAPIの染色性が保たれることを確認した。すなわちDAPIのタウ蛋白凝集体染色性は核酸に依存したものではないことが明らかになった。またDAPIは核酸のみならずポリリン酸にも親和性があること、凝集体としてしてのタウ蛋白は一般的に過剰にリン酸化されリン酸基が多いことから、タウオパチーにおけるDAPI染色性にリン酸基が関与している可能性を検討する目的でPhos-tagを実験に供した。Phos-tagはリン酸基に高親和性の

試薬であり、予め Phos-tag で組織を処理することにより組織内のリン酸基をマスクすることが可能である。このような処理の後も DAPI の染色性に変化は見られず DAPI がリン酸基を標的としていないことが明らかになった。一方、これまでタウオパチーの PET トレーサーとして開発されたリガンドの多くが、変性したタウ蛋白の β シート構造を認識する物質であることから、蟻酸により β シート構造を破壊した後にタウ蛋白の凝集物が DAPI により染色されるか検討した。その結果タウ蛋白の凝集物の DAPI 染色性が低下した。以上のことから、DAPI は様々なタウオパチーにおけるタウ蛋白凝集体を標識しうること、タウ蛋白凝集体の DAPI 染色性は、混在するリポフスチンや未知の核酸、タウ蛋白を修飾するリン酸基によるものではなく、凝集体としてのタウ蛋白の高次構造 (β シート構造) に由来するものであることが明らかになった。尚検出感度、特異性の検討から DAPI の濃度として $2 \mu\text{g/ml}$ がタウ凝集体の検出に最適であることを明らかにした。

DAPI は蛍光核染色剤として汎用されている試薬であり、細胞核とタウ凝集体の識別は容易であることから、本研究結果により DAPI を染色剤として用いれば濃度調整のみで追加の試薬を用いることなくタウオパチーにおける病変の検出が可能となることが明らかになった。