

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	李 成玉
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 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 )			
論文審査担当者			
主 査	教授	岡本 泰昌	印
審査委員	教授	酒井 規雄	
審査委員	准教授	飯田 幸治	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>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、脳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、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-phenylindole ( 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。</p> <p>本研究では、アルツハイマー病の患者 5 例、進行性核上性麻痺 ( PSP ) の患者 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」( NBIA )、「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ニズム」( FTDP-17 ) および大脳皮質基底核変性症 ( CBD ) の患者各 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 では染色されなかった。また PSP の tufted astrocyte や CBD の coiled</p>			

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(封入)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 を用いた。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りガンドの多くが、変性したタウ蛋白の  $\beta$  シート構造を認識する物質であることから、最後に蟻酸により  $\beta$  シート構造を破壊した後には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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  がタウ凝集体の検出に最適であることを明らかにした。

本研究の結果は、タウ病変の検出に有用な蛍光試薬としての DAPI の新たな可能性を示すものであり、タウオパチーの新規診断方法の開発の上で新たな視点を提供するものと高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	李 成玉
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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 )			
最終試験担当者			
主 査	教 授	岡本 泰昌	印
審査委員	教 授	酒井 規雄	
審査委員	准教授	飯田 幸治	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年2月7日の第78回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年2月5日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 細胞種ならびにタウ蛋白のアイソフォームと DAPI 染色性の関係</li> <li>2 DAPI 染色性の基盤となるタウ蛋白の構造</li> <li>3 タウ病変以外の神経病理所見の DAPI 染色性</li> <li>4 DAPI 類似物質のタウ病変検出試薬としての可能性</li> <li>5 蛍光試薬としてのチオフラビンと DAPI の相違点と DAPI の限界</li> <li>6 タウ標識物質としての DAPI の今後の応用方法</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			