

ヒト加齢脳におけるプロテオグリカンの動態

—免疫組織化学的手法による研究—

東京医科大学病理学第一講座 (指導: 嶋田裕之主任教授)

李 毓 灵

【要旨】 アミロイド・ベータ蛋白前駆体 (amyloid beta protein precursor APP) は老化脳にみられるアミロイド斑の主構成要素であり、同時にヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan HSPG) のコア蛋白であることが示されている。したがって、老化脳にみられる異常蛋白と HSPG を中心とした5種のプロテオグリカン (PGs) に関連した抗原性について検討した。

検索対象は、48例の非痴呆患者の剖検脳と一例のアルツハイマー病の海馬、海馬傍回を含む側頭葉部を用い、抗ヘパラン硫酸プロテオグリカン、抗デルマトラン硫酸プロテオグリカン、抗コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、および2種の抗プロテオグリカン・消化抗原・抗体で老化脳の免疫染色性について検索した。

〔脳の老化〕で出現する老人斑—neuritic plaques (NPs) および神経原線維変化—neurofibrillary tangles (NFTs) での免疫染色性では、抗-HSPG-抗体が一般に強く陽性を示したが、他の4種の抗体についても陽性に観察された。Neuron に関しては、検討した抗体全てにおいて、免疫染色陽性がみられた。グリア細胞と細胞外基質については、HSPG 以外の抗体で抗原性が認識された。脳内血管については、amyloid-deposits を含まない血管、主に毛細血管で抗-HSPG-抗体との反応性が顕著にみられ、しかし、他の4種類の抗体では amyloid-deposits を含む血管でのみ陽性を示した。つまり、HSPG は正常血管の通常成分 (common component) として証明された。HSPG に関する限り文献的にも同一の成績であった。

本研究で明らかになったことは、HSPG 以外のプロテオグリカンの発現も脳の老化と深く関わることを示された。Neuron や glial cell に複数の PGs の蓄積をみたことは、PGs が単独ではなくグループの形で脳の老化に与り、生体蛋白として老化脳に存在するベータ蛋白やタウ蛋白と親和性をもち、neuron の変性、消失、NPs, NFTs の形成に至る過程を意味すると考える。以上の諸結果を正常老化脳とアルツハイマー病の脳とで比較すると両者の間には免疫染色の強度の点で形態学的な差異は認められなかった。

Alzheimer 病についての HSPG の局在についての報告は数篇あるが、多数の正常ヒト老化脳の組織細胞内の PGs についての研究は初めてであり、通常ホルマリン固定、パラフィン包埋切片では困難とされていたヒト脳組織での免疫染色に成功した。

はじめに

加齢に伴うヒト脳の生理的老化における特徴的な病理学的変化として、神経細胞の萎縮・喪失、アルツハイマー神経原線維変化 (NFTs) および老人斑 (NPs) があげられる。一方で、これらの変化は、アルツハイマー病 (AD) の病理学的所見を特徴づけることでも知られている。しかし、生理的老化脳と AD 脳とでは、これらの程度、分布および出現量におお

きな差があることもわかっている。

NPs の主要構成成分はアミロイド・ベータ蛋白 (APP) であり、NFTs は、異常磷酸化されたタウ蛋白が同定されている。近年、硫酸化されたプロテオグリカン (PGs) の動態がアミロイド沈着に必要欠くべからざる過程であることが指摘されてきて、中枢神経系における老化過程、さらに AD の病理発生の研究に重要な糸口を呈示するようになった。

グリコサミノグリカン (GAGs) あるいは、PGs

1995年10月5日受付, 1995年10月19日受理

キーワード: 脳の老化, プロテオグリカン, グリコサミノグリカン, 免疫組織化学染色, アルツハイマー病.
(別刷請求先: 〒160 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学病理学第一講座 李 毓灵 Tel: 03-3351-6141
Ext. 236, 234; Fax: 03-3352-5719)

が、ADやダウン症候群(DS)の脳で形態学的に発現していることを、従来、病変初期の反応マーカーと考えてきたが、著者の今回の検索によると、これらの物質は単にNPs, NFTs内で免疫反応をみるだけでなく、neuronやglia細胞の中に可視的に観察された。この事実はこれらの巨分子が痴呆症を伴うヒトの脳の中で、NPs, NFTsに直接蓄積するのではなく、脳細胞のなんらかの分子生物学的変化に付随して、(例えば、それが細胞変性ではじまるとしても)、細胞内に最初に蓄積し、蓄積量を増大し、最終的に異常蛋白(ベータ蛋白やタウ蛋白)と結合して、NPs, NFTsの形成を促すことになりはしないか? PGsは硫酸化された多糖類に修飾されたコア蛋白をもつ多様な分子の総称である。とくに、中枢神経系では、APPはHSPGのコア蛋白である可能性が指摘されてきた。APPのペプチドは、ヒト老化脳にみられるアミロイド・ブラク・コアの主な構成要素であり、ある種の神経細胞系より分泌されるHSPGのコア蛋白のアミノ酸の配列やサイズがAPPのそれと極めて似ていることが示されているので、共通したエピトープを持つものと解釈される。

ADおよびDSを対象にしたプロテオグリカン発現の研究文献は数篇存在するが、ヒト脳の加齢にもとづく生理的発現研究の成績はない。そこで本論文では、各種の抗PGs-monoclonal antibodyを用いて、加齢にもとづくPGsの発現を、ヒト脳組織内のアミロイド・ベータ蛋白出現(NPs)およびタウ蛋白出現(NFTs)との関係で検索し、さらに加齢脳における神経細胞内プロテオグリカン出現の病理学的意義について検索した。

対象および方法

東京都老人医療センターおよび、東京医科大学病理学第一講座のルーチン剖検材料のうち、臨床病歴上痴呆のあるものを除外し、40歳以上のものを選び出した。セチル・ピリミヂウム・クロライド(CPC)含ホルマリン液で固定した脳を、外側膝状体部で脳前額断スライスを作成し、海馬、鉤状回、海馬傍回をふくむ側頭葉部を研究に用いた。男性42例、女性41例、計83例で、最小年齢42歳、最高年齢106歳である。一例の60歳のアルツハイマー病脳を加えた。各症例を年齢別に、55歳未満をA群、55~64歳をB群、65~74歳をC群、75~84歳をD群、85~94歳をE群、95歳以上をF群とした。6ミクロン・パ

ラフィン包埋切片を用いて、はじめにメテナミン・銀染色を施行しNPs, NFTsの存在を確認した。この組織学的結果より、PGsの免疫組織化学的検索を、neuron, NFTs, NPsさらにglia細胞、脳内小血管についておこなった。

免疫組織化学的検索はすべて、全症例より得られたヒト脳組織のブロックより薄切された連続切片上でおこなった。したがって、各種のプロテオグリカンの局在を同一のターゲット内で比較検討することができた。48例について、下記の免疫組織化学的染色をおこなった。

一次抗体として;

1. 抗ヘパラン硫酸プロテオグリカン抗体(HSPG:7E12 CHEMICON INTERNATIONAL INC), 抗原:ウシ糸球体HSPG, 反応性:HSPGのコア蛋白;
2. 抗デルマタン硫酸プロテオグリカン抗体(DSPG:6-B-6 生化学工業), 抗原:ヒト卵巣線維腫被膜DSPG, 反応性: DSPG コア蛋白;
3. 抗コンドロイチン硫酸・抗体(CSPG:CS-56 生化学工業), 抗原:ニワトリ砂囊線維芽細胞CSPG, 反応性: CSPGの側鎖-CSPGグリコサミノグリカンのA, Cタイプを識別する。
4. 抗プロテオグリカン・digested抗原・抗体4S(Di-4S:2-B-6 生化学工業) 抗原:種々のCSPGをコンドロイチナーゼで消化した切り株, 反応性:コンドロイチナーゼABC消化後、プロテオグリカンのコア蛋白側に残った分解断片の2糖構造を識別する。
5. 抗プロテオグリカン・digested抗原・抗体6S(Di-6S:3-B-3 生化学工業), (抗原性はDi-4Sと同じ)を用いた。

前処理としてAnti-HSPG-Ab, 0.4%ペプシン37°C5時間; Anti-DSPG-Ab, Anti-CSPG-Ab, Anti-Di-4S-Ab, Anti-Di-6S-Ab; 90%蟻酸, 室温20分でおこなった。

二次抗体として、ニチレイヒストファンLSABキット, DAKOおよびLSABユニヴァーサルキットを使用し、発色団としてDABおよびTMBを用いた。アミロイド・ベータ蛋白累積の部位に局在するか否かを決定するために、抗HSPG抗体、コンゴール・レッド染色の偏光フィルター下の顕鏡および抗アミロイド・ベータ蛋白抗体で検索した。

結 果

メテナミン・銀染色の所見：

ヒト加齢脳の NPs, NFTs の出現をメテナミン・銀染色で調査し (図 1. a, b, c, d), 4×10 視野下で数視野以上について観察し, 1 視野当たりの出現頻度としてカウントし, 表 1 のように, grade 分類した. 出現最小年齢は, 64 歳である. これから分るように海馬のすべての部位, 特に CA1 の領域および, 鉤状回 (subiculum, SBC) のどの部位においても, NFT 数は増加し C 群よりその傾向が認められる. NP は CA1 および SBC のどの部位においても, 加齢とともに増加する傾向をみせたが, NFT に較べて, 出現数は少なかった.

抗 PGs 染色の所見：

A : HSPG について

1. HSPG は, 他のプロテオグリカンより免疫反応が強く, NP の diffuse, primitive, classical の 3 種類のタイプでほぼ同様の反応をしめした (図 2. a, b). アミロイドは, 加齢脳の NPs, 髄膜や脳内の血管および NFTs に存在し, この部で HSPG は強く陽性に反応した (図 2. a, b, c, d). 抗 APP 抗体で免疫染色された部位は, アミロイド線維を含む NPs や, 血管だけではなく, 神経突起をふくむ primitive plaques にも確認された. この primitive plaques の内部にメテナミン・銀染色で神経突起の含有を確認した. 連続切片上で, 抗 HSPG 抗体は, NPs の中心アミロイド・コアを明確に認識した (図 2. a), 更に, アミロイド・コアを含有しない primitive plaques をも認識した (図 2. b). コンゴー・レッド染色陰性で, 抗アミロイド・ベータ蛋白陽性の diffuse plaques も抗 HSPG 抗体で認識された.

2. 抗 HSPG 抗体は NFTs を認識することである, とくに核を失った神経細胞の ghost tangle で確実に陽性を示した (図 2. c).

3. 抗 HSPG 抗体は, 髄膜および脳内の血管と特有な免疫反応を示した (図 2. a, b, c, d). これらの血管はいずれもコンゴー・レッド染色の偏光フィルター下の観察でアミロイド沈着の累積が証明された. アミロイド染色陰性の正常の小血管も免疫染色陽性であった.

4. 抗 HSPG 染色では, NFTs を認識する以外に NFTs を有しない神経細胞を認識した. しかも, 細胞内のリポフスチン沈着と密接な部位に局在して観

表 1

NPs(CA1)						
	A 群	B 群	C 群	D 群	E 群	F 群
50 以上						
20~49					1	
10~19			1	2	5	4
1~9	9	12	8	15	15	8
0						

NFTs(CA1)						
	A 群	B 群	C 群	D 群	E 群	F 群
50 以上				1	4	4
20~49			1		4	3
10~19				3	4	3
1~9			1	9	7	2
0	9	12	8	4	2	

察された (図 2. d).

B : DSPG について

1. 抗 DSPG 抗体は NPs を認識したが, その中でも, 特に classical で陽性を示した. しかし, 抗 HSPG 抗体染色ほどではなかった (図 3. b).

2. NFTs をも認識したが抗 HSPG 抗体とほぼ同程度であった (図 4. b).

3. 抗 DSPG 抗体は, 脳内血管をほとんど認識しなかったが, コンゴー・レッド陽性, 偏光フィルター下でアミロイド陽性の血管を僅かに (弱陽性に) 認識した. しかし, 毛細血管を認識しなかった.

4. 抗 DSPG 抗体は NFTs を有しない neuron を認識するが, その程度は抗 HSPG 抗体染色と同様であった (図 5. a).

5. 抗 DSPG 抗体は細胞外マトリックス (ECM) での蓄積を認識し, とくに glia 細胞周辺に陽性となる.

C : CSPG について,

1. 抗 CSPG 抗体は, NPs を抗 DSPG 抗体とほぼ同じ程度に認識した (図 3. a).

2. NFTs をも抗 HSPG 抗体染色と同様に認識した (図 4. a).

3. 脳内血管については, 抗 DSPG 染色の免疫反応と同様で弱陽性であった.

4. 抗 CSPG 抗体の免疫反応は NFTs を有しない neuron でも観察された.

5. 抗 CSPG 抗体は, 抗 DSPG 抗体と同様に, glia 細胞内に顕著な免疫反応を示した (図 5. b).

表 2

PGs	免疫反応					
	NPs	NFTs	vessels	neuron	glia	ECM
HSPG	卅	卅	卅	卅	+	±
CSPG	+	+	±~+	卅	卅	卅
DSPG	+	+	±~+	卅	卅	卅
Di-4S	+	+	±~+	卅	卅	卅
Di-6S	+	+	±~+	卅	卅	卅

6. 抗CSPG抗体は、細胞外マトリックス (ECM) を認識した (図 5. b).

D: 抗プロテオグリカン消化抗原・抗体; Di-4S および Di-6S (Anti-proteoglycan digested antigen 4S/6S) について,

1. NPs, NFTs をともに認識するが免疫反応は抗DSPG抗体, 抗CSPG抗体と類似の免疫反応があった (図 3. c, d, 図 4. c, d)

2. 脳内血管内では, 抗DSPG抗体, 抗CSPG抗体と同様の免疫反応を示した。

3. neuron についても, 抗DSPG抗体, 抗CSPG抗体と同様の免疫反応を示した (図 5. c, d).

4. 抗Di-4S抗体, 抗Di-6S抗体ともに, glia細胞とECMで顕著な免疫反応を示した (図 5. c, d).

最後に, DSPG, CSPG, Di-4S, Di-6S の primitive NPs 内の発現を図 6. a, b, c, d に示した。

以上の免疫染色の全結果を表 2 に示した。

考 察

ヒトの加齢脳における老人斑 (NPs) のなかにアミロイド・ベータ蛋白を含むアミロイド沈着があり, PGs や, そのグリコサミン鎖 (GAG) がこのような部位に免疫組織化学的に局在していることが判明した。これは一体何を物語っているのだろうか?

Snow らは, AD や DS の脳組織の中で, PGs の中でも HS-GAG がアミロイド・ベータ蛋白含有アミロイド沈着の部位に特殊な局在をしめす事実から, HSPG の core protein の出現を老化脳における早期の発現であるとした¹⁾。つまり, ある特殊な老化にもとづく変性疾患の NPs や, 血管の壁に HS-GAG があるという事実は, HS-GAG の蛋白と糖鎖の両方の物質がアミロイド沈着に一致して存在することを意味する。この場合, HSPG が分解されて蛋白と糖鎖が別々になって存在することも, 分解されずに HSPG の一部としても存在しうる。Snow らの実験

では, AD などの場合, HSPG はアミロイド沈着部位や, NFTs や neuron のなかに局在し, CSPG らは, これらの部位で存在しないと発表している²⁾。著者による今回の検索では, 免疫反応を調査した PGs のうち, HSPG, DSPG および CSPG は, すべて NPs, NFTs の中で陽性に発現した。以下, 各脳内の病変毎に考察を試みる。

まず, NPs であるが, アミロイド・ベータ蛋白を含有する限り, 各種 PGs は, 3 種の NPs 内に蓄積しているが, diffuse type に関しては, とくに HSPG の免疫反応が強い傾向にある。言い換えれば, 原始老人斑 (primitive plaques) や, その構成要素になっている神経突起はアミロイド・ベータ蛋白や, アミロイド・ベータ蛋白前駆体 (APP) に対する主要な抗原決定基を含んでいることを意味する。

次に, ヒト老化脳内の neuron や glia に PGs が存在し, しかもアミロイド・ベータ蛋白を含む部位に局在していることは, これらの細胞が PGs 供給源である可能性を支持する。

第 3 番目には, ヒト老化脳内の NFTs に PGs の免疫染色が陽性の事実があげられる。これは, ベータ蛋白と異なり, タウ蛋白と PGs との関わりを意味する。とくに, 核を失った神経細胞の NFTs, つまり, ghost tangle として認識される [neuron 外] の NFTs に観察された。前述の NPs 内の蓄積の事実とあわせて考えると, PGs が, ヒト加齢脳の中に出現する NPs や NFTs の通常の構成要素であることは事実としても, これが単なる付随的な現象にとどまらず, NPs と NFTs が相互に関連あるという仮説を強く支持するものである。

また, その他の脳内 ECM 分子が抗 PGs 抗体によってどのように認識されるかを検討したところ, DSPG, CSPG がグリア細胞周辺に出現することが観察された。

一般的に, HSPG の免疫反応が, 他の PG に較べ

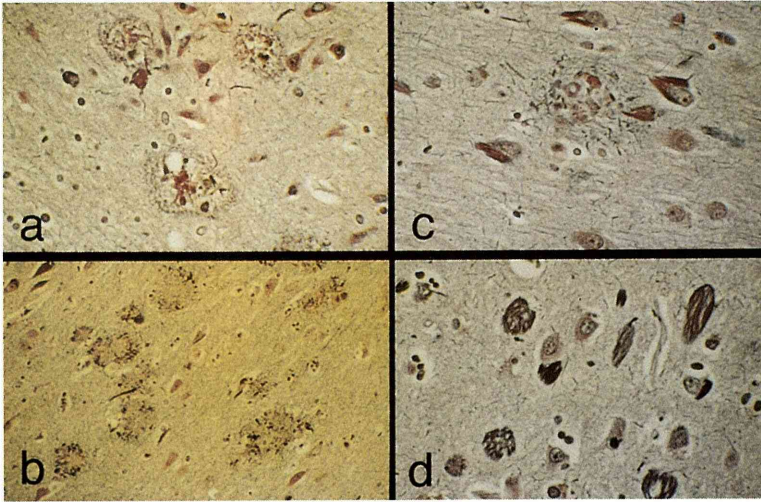


図1 メテナミン—銀染色
a. classical NPs ×40
b. primitive NPs ×40
c. intracellular NFTs ×40
d. extracellular NFTs ×40

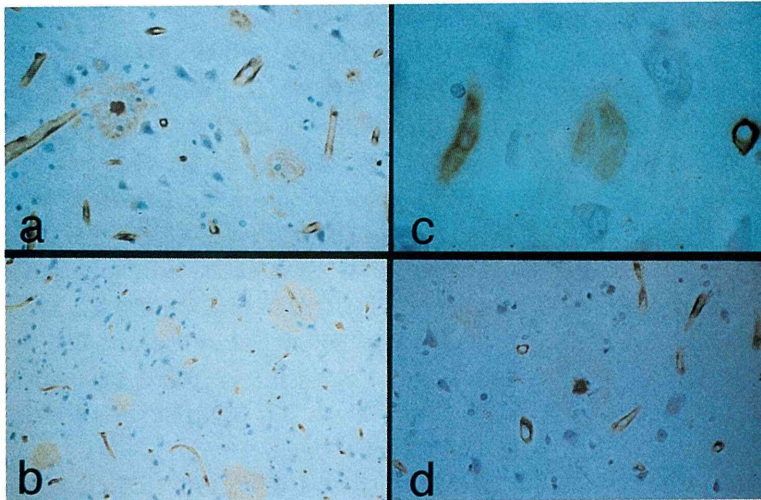


図2 抗HSPG染色
a. NPs (core) ×40
b. primitive NPs ×40
c. extracellular NFTs ×100
d. neurons ×40

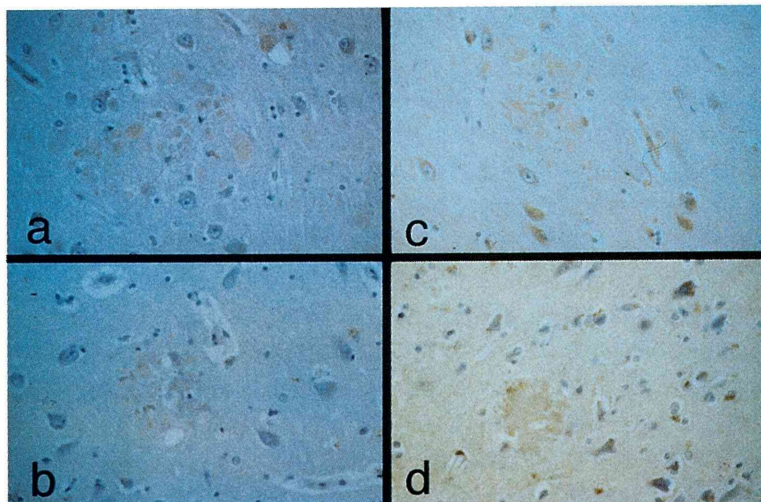


図3 抗CSPG ; DSPG ; Di-4S ;
および Di-6S 染色
a. CSPG classical NPs ×40
b. DSPG classical NPs ×40
c. Di-4S classical NPs ×40
d. Di-6S classical NPs ×40

図 4 抗 CSPG ; DSPG ; Di-4 S ;
Di-6 S ; 染色
a. CSPG : extracellular NFTs
×40
b. DSPG : intracellular NFTs
×40
c. Di-4 S : extracellular NFTs
×40
d. Di-6 S : extracellular NFT
×40

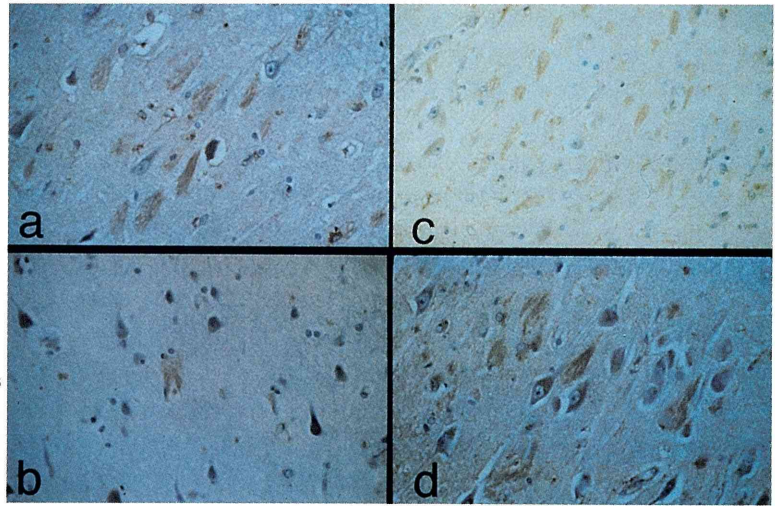


図 5 抗 CSPG ; DSPG ; Di-4 S ;
Di-6 S 染色
a. DSPG : neuron ×40
b. CSPG : glia cells ×40
c. Di-6 S : neurons, glia cells,
ECM ×40
d. Di-4 S : neurons, glia cells,
ECM ×40

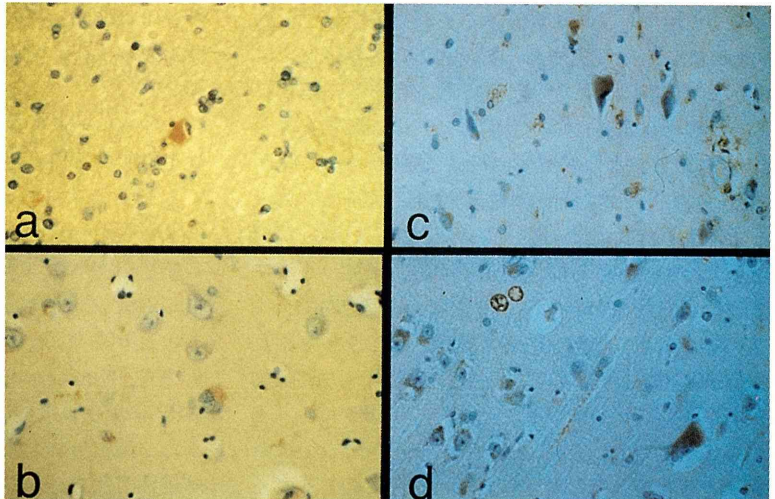
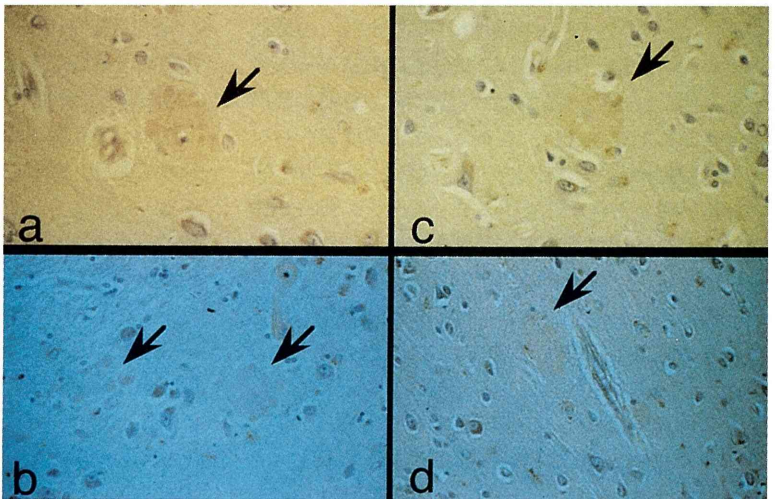


図 6 抗 DSPG ; CSPG ; Di-4 S ;
Di-6 S
a. DSPG : primitive NP ×40
b. CSPG : primitive NP ×40
c. Di-6 S : primitive NP ×40
d. Di-4 S : primitive NP ×40



で強く、しかも、より multifocal に見られたことは事実である。なかでも、神経細胞内に免疫染色陽性を見る場合、リポフスチン顆粒と密接な関係をもって観察された。

最近のモノクローナル抗体法での細胞化学的研究によると、AD 脳や正常ヒト加齢脳の神経細胞のなかで、アミロイド・ベータ蛋白は、リポフスチン内にも局在していることが報告されている^{9)~6)}。このことは、PGs とアミロイド・ベータ蛋白の二つの巨分子が、ヒト加齢脳のなかで共通の局在部位のあることを意味し、その上、二つの巨分子間になんらかの相互作用のあることを想像させる。そもそもリポフスチンなるものは、加齢、老化に関係した細胞内の封入物質であり、ライソゾーム由来のものである⁶⁾⁷⁾。正常のヒト脳でも、AD でもおなじ比率で加齢とともに増加し、AD の脳内のリポフスチン蓄積は加齢に関係した現象であって、AD の病理発生でないことは自明である^{8)~11)}。しかし、けっして正常な加齢過程とは言えない。今回のヒトの加齢脳でみられた PGs とアミロイド・ベータ蛋白の共通局在が neuron のリポフスチン顆粒と密接に関係して見られることの意味はよく分らないが、顆粒と PGs が結合していることの可能性を暗示する。事実、高度に硫酸化された HSPG のような物質は、細胞内でライソゾーム酵素の活性を阻害する¹²⁾¹³⁾。こうした相互作用が APP のアミロイド・ベータ蛋白への選択的スプライシングを妨げることが充分予想される。その結果 APP およびアミロイド・ベータ蛋白の神経細胞内蓄積をもたらすと考えられる。このアミロイド・ベータ蛋白前駆体/アミロイド・ベータ蛋白および PGs のライソゾーム内蓄積が神経細胞内の機能の終局的な変化、ついには、神経細胞死にとっての必要条件となってくる。これが老化脳、AD 脳の形態学的刻印に他ならない。さらに、アミロイド・ベータ蛋白前駆体/アミロイド・ベータ蛋白、および PGs の細胞外脱出が生ずると、これらの分子の細胞外蓄積が脳の皮質に見られる。時間とともに、これらの分子の皮質内沈着が最終的に細線維性アミロイド物質となる。この他に、PGs の神経細胞内蓄積は酵素側からみれば、正常の過程では、PGs を分解するはずのライソゾーム欠損による可能性もある。

今回の免疫組織化学的分析において、海馬、海馬傍回らの神経細胞内での PGs 蓄積は、加齢とともに、増加傾向を示した。一方、AD 脳内 HSPG の蓄

積の研究や加齢によるリポフスチン顆粒発現の報告より考察して、HSPG を中心にした PGs の神経細胞内出現は {脳の老化} の初期の形態学的事件といえる。さらに、NPs や NFTs や congophilic angiopathy の加齢脳における出現の病理発生には、PGs の neuron 内発現が深く関わっていることはまぎれもない。PGs が加齢脳の血管や、NPs 中のアミロイド蛋白および APP とともに、特別に蓄積することは PGs と APP の二つの物質の間に起った相互作用の結果と考えられる。

Schubert らの論文¹⁴⁾ からわかるように、副腎髄質細胞腫 (PC-12) より分泌された HSPG のコア蛋白が持っているアミノ酸の配列順序が APP のそれと極めて酷似していることから、この二つの分子は抗原性の面で関連していると意味づけされている。最近の *in vitro* 実験で、HSPG と APP との間に特徴的な binding affinity が存在することが分かってきた¹⁵⁾。こうした事実関係が、これらの巨分子がアミロイド・ベータ蛋白の存在するところで共通の局在性を説明する根拠となってきた。HSPG を主とする PGs とアミロイド・ベータ蛋白間の結合は heparin や heparan sulfate と蛋白分解酵素 nexin の結合と類似している¹⁶⁾。衆知のごとく、Kunitz inhibitor ドメインを含む APP 分泌部のヴァリアントはとりもおさず、蛋白分解酵素 nexin II である¹⁷⁾¹⁸⁾。Kunitz inhibitor ドメインを含んでいない APP に結合したヘパラン硫酸は、沈着が安定化し、また、蛋白分解を防ぐ可能性もある。終局的には、線維性アミロイドの沈着となる。*in vitro* 実験から、PGs はアミロイド形成に与る前駆体 (つまり APP) の最終的な取込みに関係し、細線維性アミロイドの特徴的な構造であるベータ・シート内への取り込みに重要な役割を演じている。

Neuron の消失、NFTs、NPs の出現らは加齢脳の特徴であり、最終的には AD の 3 大病理学的所見となる。以前から、脳の老化や AD は変性過程ないし変性疾患と考えられてきた。しかし、最近、神経の発芽ともとれる再生過程が、とくに AD で病理学的分子生物学的に立証され、*in vitro* 実験の研究から神経突起の成長には、神経栄養因子が必要であり、basic fibroblast growth factor (bFGF) が AD 脳の NPs のなかにあり、神経突起の成長にとって必要であることが分かっている¹⁹⁾²⁰⁾。しかも、この神経突起の成長には、適切な基質の存在もまた必要であ

る^{21)~23)}。この適切な基質のひとつこそPGsであり、代表的な物質がHSPGである。

以前より生化学的にADの脳組織は正常老化脳組織に較べてGAG量のレベルが高いことが報告されているが²⁴⁾、Snowらは組織化学的技法を用いて、硫酸化GAGsあるいはPGsが、ADの脳組織の中でNPやNFTsやアミロイド細線維を有する脳内血管に発現していることを証明した。最近まで、ADの脳組織の中でPGsやGAGsの特殊な型ものは決定されずにいたが、HSPGのコア蛋白やあるいはその側鎖であるHS-GAGに対する抗体を用いることによって、SnowらはHSPGのコア蛋白はNPや脳血管内のアミロイド沈着部位に存在することを見いだした。さらにHS-GAG側鎖は、neuron, NP, NFTs, glia細胞および血管で発現していることを知った。これらの仕事はいずれもADの脳組織での作業結果であった。一方、Perimutterらは、HSPGのコア蛋白に対する抗体はADのみならず正常の老化脳の毛細管の基底膜で免疫活性のあることを証明した²⁵⁾。

今まで、老化脳やAD脳のHSPGやHS-GAGの局在については不明な点が多すぎたが、特に、HSPG, HS-GAGとNP, NFTs, neuron, gliaの関係については、依然不明のままであった。果たして、microgliaやastrocyteのなかにHSPG, HS-GAGは存在するか、NPを貫通する神経突起にこれらは存在するか、どのようなタイプの細胞がNPのなかでこれらの沈着に関与しているか、こうした根本的な疑問の解明にあたり、著者は正常の加齢脳に焦点をあわせて数種のPGsの局在を明らかにしようとした。

はじめに、全ての種類のNPについて、つぎにベータ・蛋白、タウ・蛋白とPGsの関係について免疫組織化学的作業に入った。今回の検索では痴呆症のみならず、一般の正常脳老化でもPGsは観察され、免疫染色性の面で著しい差異は認められなかった。HSPG以外の巨分子、つまり、DSPGやCSPGについてもモノクロナール抗体はHSPGに対する抗体と強弱の差はあるが同様の局在反応を示した。PGs/GAGsは加齢の段階において、単独ではなく、グループの形で脳の老化に与っている可能性をみつけた。

従来、生化学的にHSはNPの中では、早期の蓄積成分の一つと考えられていたが、NFTsとの関係

は不明であった。もし、類推どおり、PGs/GAGsが細胞成長を媒介する生体蛋白とすれば、老化脳に存在する色々な異常蛋白(ベータ蛋白やタウ蛋白ら)との間に親和性を持ち、いわゆるPGsの多様性が発揮されたことになる。PGs/GAGsのADや正常老化脳との真の意義はまだ明らかではないが、すくなくとも、neuronの変性・萎縮・消失、ベータ蛋白、タウ蛋白の蓄積に関与していることは否定できない。しかも、NFTsを有しない神経細胞にこれらの巨分子を可視化できることは、これらの巨分子の代謝異常のほう老化脳内の異常蛋白の沈着よりも先である。つまり、今回の検索で、ベータ蛋白やタウ蛋白を有しないneuron, glia細胞内にもこれら巨分子の蓄積を証明²⁶⁾したことは、正常老化脳とAD脳間に本質的な区別を付けがたい事象でもあった。多数の正常老化脳について5種類以上のPGs/GAGsの免疫組織学的研究の文献はない。本結果からみると、この巨分子は正常老化脳においても細胞を修復すると同時に細胞内細線維性アミロイドを蓄積させることの双方向的ないし多様性の作用があると思われる。これらの巨分子のうち、特にHSPG/HS-GAGやb-FGFらは終局的にアミロイド沈着促進因子として、beta A4蛋白をアミロイド線維に変化させ、NPを形成する。一方、HS-bFGF複合体として、beta A4蛋白の分解を抑制し、同様に、タウ蛋白蓄積の促進因子として、NFTsの形成の中心的役割を演じ、いくつかの段階を経て細胞内神経原線維変化、細胞の完全消失、さらに、細胞外神経原線維変化(extracellular/ghost tangle)となり、臨床的な症状発現の原因の一つになり得る。ここで、はじめて、NPとNFTsの相互関係が、PGs/GAGsの細胞組織学的検出の研究によってやや明らかになったと言えるであろう。

結 論

PGs/GAGsの脳内異常蓄積は合成亢進・分解障害に原因がある。如何なる原因でPGs/GAGsが加齢脳内に広範に蓄積するかを考えるとPGs/GAGsは痴呆の発病過程に重要であるばかりか、正常の脳老化にも深く関連し、複数のグループとして、脳老化の全過程に関与しているとも考えられる。これらの巨分子が老化脳に出現する蛋白(とくにアミロイド蛋白)への過程をブロックすることによって、予防学、治療学への道が開かれるものと期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に直接ご指導戴いた東京医科大学病理学教室第一講座主任教授嶋田裕之先生に深謝いたします。今回の研究の遂行にあたり、生化学的所見より多大のご助言をくださった生化学教室主任教授友田燁夫先生に深謝いたします。

従来より免疫組織学的検索の困難であったプロテオグリカンのパラフィン切片での免疫染色に成功し本研究に協力して下さった五百部浩昭技師に心から感謝いたします。また、種々御助言を戴いた老年病科馬原孝彦先生に感謝いたします。最後に病理学第一講座の教室員の皆様に感謝します。

引用文献

- 1) Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassel J, Wight TN: The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **133**: 456~463, 1988
- 2) Snow AD, Mar H, Nochlin D, Sekiguchi RT, Kimata K, Koike Y, Wight TN: Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome *Am J Pathol* **137**: 1253~1270, 1990
- 3) Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Kim KS, Isniewsky HM: Immunoreactivity of neuronal lipofuscin with monoclonal antibodies to the amyloid beta-protein. *Neurobiol Aging* **10**: 125~132, 1989
- 4) Grundke-Iqbal, Iqbal K, George L, Tung Y, Kim KS, Wisniewsky HM: Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 2853~2857, 1989
- 5) Stem RA, Otvos JrL, Trojanowski JQ, Lee VMY: Monoclonal antibodies to a synthetic peptide homologous with the first 28 amino acids of Alzheimer's disease beta-protein recognize amyloid and diverse glial and neuronal cell types in the central nervous system. *Am J Pathol* **134**: 973~978, 1989
- 6) Sohal RS, Wolfe LS; Lipofuscin: Characteristics and significances. In Swaab DF, Fliers E, Mirmiran M, van Gool WA, van Haaren F, eds. *Progress in Brain research*. New York, Elsevier Science Publishers, 171~183, 1986
- 7) Tsuchida M, Miura T, Aibara K: Lipofuscin and lipofuscin like substances. *Chem Physics Lipids* **44**: 297~325, 1987
- 8) Mann DMA, Yates PO, Marcyniuk B: Changes in nerve cells of the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease and their relationship to ageing and to the accumulation of lipofuscin pigment. *Mech Ageing Dev* **25**: 189~204, 1984
- 9) Mann DMA, Yates PO, Marcyniuk B: Relationship between pigment accumulation and age in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Acta Neuropath* **63**: 72~77, 1984
- 10) West CD: A quantitative study of lipofuscin accumulation with age in normals and individuals with Down's syndrome, phenylketonuria, progeria and transneuronal atrophy. *J Comp Neur* **186**: 109~116, 1979
- 11) Dowson JH: Neuronal lipofuscin accumulation in ageing and Alzheimer's dementia: A pathogenetic mechanism? *Br J Psychiat* **140**: 142~148, 1982
- 12) Avila JL, Convit J: Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans *in vitro*. *Biochem J* **152**: 57~64, 1975
- 13) Avila JL, Convit J: Physicochemical characteristics of the glycosaminoglycan-lysosomal enzyme interaction *in vitro*. *Biochem J* **160**: 129~136, 1976
- 14) Schubert D, Schroeder R, LaCorbiere M, Saito T, Cole G: Amyloid beta protein precursor is possibly a heparan sulfate proteoglycan. *Science* **241**: 223~226, 1988
- 15) Snow AD, Kinsella MG, Prather PG, Nochlin D, Podisny MB, Kisilevsky R, Hassel JR, Wight TN: A characteristic binding affinity between heparan sulfate proteoglycans and the A4 amyloid protein of Alzheimer's disease. *J Neuropath Exp Neurol* **48**: 352 (Abstr), 1989
- 16) Baker JB, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB: Protease nexin: A cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell* **21**: 37~45, 1980
- 17) Oltersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, Lieberburg I, Johnson-Wood KL, Beattie EC, Ward PJ, Blacher RW, Dovey HF, Sinha S: The secreted form of Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* **341**: 144~147, 1989
- 18) Van Nostrand WE, Wagner SL, Suzuki M, Choi BH, Farrow JS, Geddes JW, Cotman CW, Cunningham DD: Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid beta protein precursor. *Nature* **341**: 546~549, 1989
- 19) Gomez-Pinilla F, Cummings BJ, Cotman CW:

- Induction of basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease pathology. *Neuro Report* **1**: 211~214, 1990
- 20) Perlmutter LS, Chui HC, Saperia D, Athanikar J: Microangiography and the colocalization of heparan sulfate proteoglycan with amyloid in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* **508**: 13~19, 1990
- 21) Lander AD, Fujii DK, Reichart LF: Characterization of a factor that promotes neurite outgrowth: evidence linking activity to a heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol* **94**: 574~585, 1982
- 22) Lander AD, Tomaselli K, Calof AL, Reichardt LF: Studies on extracellular matrix components that promote neurite outgrowth. *Cold Spring Harbor Symp. quant Biol.* **48**: 611~624, 0000
- 23) Mathews W, Patterson P: The production of a monoclonal antibody that blocks the action of a neurite outgrowth-promoting factor. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.* **48**: 625~637, 0000
- 24) Suzuki K, Katzman R, Korey S: Chemical studies on Alzheimer's disease. *J Neuropath exp Neurol.* **14**: 211~222, 1955
- 25) Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, Hassel J, Wight TN: The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Path* **133**: 456~463, 1988
- 26) Snow AD, Willmer JP, Kisilevsky R: Sulfated glycosaminoglycans in Alzheimer's disease. *Hum Path* **18**: 506~510, 1987

Immunohistochemical Study of Proteoglycans in Brains of Elderly Humans

LI Yu Ling

The First Department of Pathology Tokyo Medical College
(Director: Prof. Hiroyuki SHIMADA)

In an immunohistochemical study of proteoglycans (PGs), five monoclonal antibodies which respectively recognize low density heparan sulfate proteoglycan (HSPG: 7E12); localize dermatan sulfate proteoglycan (DSPG: 6-B-6); react specifically chondroitin sulfate proteoglycan of both types of A and C (CSPG: CS-56); and recognize chondroitin sulfate 'stubs' (4S, 6S and OS) remaining after extensive chondroitinase ABC digestion (Di-4S: 2-B-6, Di-6S: 3-B-3) were used to study the distribution and localization of these components in normal human brains of non-demented 48 autopsy cases and a brain of a case of Alzheimer's disease (AD). Accumulation of the sulfate PGs was examined in neuritic plaques (NPs), neurofibrillary tangles (NFTs), neurons, glial cells and extracellular matrix of the aged brains revealing differing results following studies with the above antibodies.

Immunoactivities for antibody to HSPG were clearly demonstrated in classical plaques of NPs containing a central amyloid core and also in primitive plaques without an amyloid core. The 'amorphous' or 'diffuse' plaques were also strongly HSPG-immunopositive. In addition, HSPG-immunopositivity was almost always observed even in meningeal and intracerebral small vessels/capillaries which did not contain amyloid. Immunostaining of four other monoclonal antibodies (DSPG: 6-B-6, CSPG: CS-56, Di-4S: 2-B-6, Di-6S: 3-B-3) was limited to two types of NPs (classical and primitive types). Immunoactivity of DSPG and CSPG was easily identified in glial cells and extracellular matrix of normal aged and AD brains. HSPG, DSPG and CSPG were immunohistochemically detected in both intracellular and extracellular (ghost) NFTs and nontangle-bearing neurons in normal aged brains and the AD brain. Immunoreaction with HSPG was strongly immunopositive in all three types of NPs (diffuse, primitive and classical types of NPs) in contrast to the four other antibodies. However, no distinct difference in immunoreactive intensity was seen in the AD brain compared to normal aged brains.

Although there are a number of studies on the localization and accumulation of HSPG in characteristic lesions of AD brains, the findings manifested in DSPG-, CSPG-immunostained NPs, NFTs, neurons, glial

cells and extracellular matrix represent the first demonstration of PG macromolecules in normal aged and AD brain. The observation of immunoactivity of DSPG and CSPG within specific lesions of the aging-related process, suggests that specific types of PGs which have a similar effect as well as HSPG appear to contribute at all stages of the degeneration process of normal non-demented human and AD brains. Also, this morphological fact suggests that sulfate PGs may play a common role in the early development of aging brain and that the accumulation of these elements in the central nervous system may be the earliest event in the pathogenesis of the aging process of human brains.

〈**Key words**〉 Aging brain, Proteoglycans, Immunostains, Alzheimer's disease.
