

厚生科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業
平成10年度研究報告書

研究課題：老化・発生・分化過程における
プレセニリンの発現と神経細胞死の抑制

内原俊記：東京都神経科学総合研究所
神経病理学研究部門 主任研究員

水澤英洋：東京医科歯科大学神経内科教授

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

老化・発生・分化過程におけるプレセニリンの発現と神経細胞死の抑制

主任研究者 内原俊記 東京都神経科学総合研究所
神経病理学研究部門主任研究員

研究要旨：脳虚血巣周囲のグリアやアストロサイトーマ細胞にプレセニリン(PS)のエピトープが発現していることを明らかにした。脳虚血巣周囲の反応性グリア細胞には tau2 の発現もみられ in vivo で両者の関連が示唆された。主に神経細胞が発現していると考えられてきた PS と tau が細胞死や反応性あるいは腫瘍性増殖の盛んなこれらの組織でグリア細胞が発現することは、両者の関連や変性過程を考える上であらたな視点やモデルを提供する。並行してタウ蛋白の沈着様式を免疫蛍光と thiazin red による重染色で検討し、アルツハイマー病大脳皮質のタウ陽性細胞で明瞭な線維形成性は Cortico-basal degeneration で乏しいことを明らかにした。今後タウ蛋白とその沈着様式ならびに PS の発現とその神経原線維変化形成や細胞死における役割を多角的に検討し、治療法の開発に役立てたい。

研究組織

○内原俊記（東京都神経科学総合研究所
神経病理学研究部門 主任研究員）
水澤英洋（東京医科歯科大学
神経内科教授）

A. 研究目的

1. 神経細胞が発現するプレセニリン(PS)は細胞死や生存に関わるとの仮説があるが、本年度は細胞死や増殖の盛んな脳梗塞や脳腫瘍に注目し、その発現を免疫組織化学的に検討し、AIDS や多発性硬化症剖検脳と比較した。
2. タウ蛋白の一次的変化によって変性過程がおこると考えられる一連の疾患群の報告が相次ぎ、最近特に注目を集めている。脳梗塞巣周囲のグリア細胞は PS ばかりでなく tau2 エピトープを発現していることを見出し、平行してタウの沈着様式の疾患による違いを線維構造の有無という視点

から明らかにする方法論を改良した。

B. 研究方法

1. 脳梗塞、アストロサイトーマ、多発性硬化症、AIDS 脳のホルマリン固定、パラフィン包埋標本をマイクロウェーブとトリプシン処理後、ABC 法を用いて免疫染色した。一次抗体には各種抗 PS、抗タウ抗体を用いた。
2. AD 及び CBD の大脳新皮質ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を抗 PHF モノクローナル抗体(AT8)-FITC と Thiazin red による二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡(TCS/SP, Leica)にて観察した。

C. 研究結果

1. 脳梗塞では壊死巣のミクログリア様細胞が抗 PS 抗体の一つである TOR519 (PS1 の遺伝子から想定されるアミノ酸配列 109-120 を認識する)と tau2 によ染色された。TOR520(同 304-319)は虚血巣周囲の

アストロサイトを染色し、一部は tau2 陽性の顆粒状構造物を細胞質に含んでいた。AIDS 脳や多発性硬化症例では抗 PS 抗体による染色は明らかでなかったがミクログリア様細胞、多核巨細胞、血管周囲の細胞が tau2 により明瞭に染色された。

2.AD 脳新皮質のタウ(AT8)陽性神経細胞は TR によっても染色され明瞭な線維構造をとる。CBD 脳新皮質のタウ(AT8)陽性神経細胞は Gallyas 染色でも染色されるが、TR による染色性が極めて乏しい点で AD とは異なる。

D. 考察

脳硬塞虚血巣周囲のグリア細胞に PS と tau2 のエピトープが発現することを明らかにした。さらに本年度は Salpêtrière 病院神経病理研究室の Jean-Jacques Hauw 教授と Charles Duyckaerts 教授を招聘し、AIDS 脳症や多発性硬化症における PS やタウ蛋白の発現についての共同研究を行った。主に神経細胞に発現している PS が脳硬塞巣ではグリアに発現することは、PS の代謝が外的な要因により大きく変化していることを示し、細胞死や反応性増殖に関与している可能性を示唆する。我々は PS1 の introcnic polymorphism が神経原線維変化の発現に影響を与えていることを報告したが、PS と tau の in vivo での関連を明確にする一つの手がかりとして有用なモデルとなることが期待される。PS がタウ蛋白と in vitro で相互作用をするという報告があるが、この相互作用が in vivo のどのような局面で相互作用を行い AD の発症に関与していくのかは未解決の問題であり、今後本研究で得られた結果をもとに、AD 剖検脳や実験動物モデル等を用いて虚血巣での状態を解析し、生化学的分析も加えてより詳細な検討を加えていく必要がある。

平成 10 年度に入り、タウをコードする遺伝子の変異がタウの沈着に特徴づけられる phenotype と関連していることが相次いで

報告された。タウ蛋白の沈着については、その immunolocalization のみならず沈着様式が疾患により異なりその沈着機序を考える上で不可欠な情報となっている。本年度は大脳新皮質にみられるタウ陽性神経細胞に焦点をあて、AD 脳では TR により線維構造が明瞭にみられるが CBD では明瞭でないという違いを見出した。この方法は昨年度報告した免疫蛍光 Bodian 連続染色に較べて、はるかに簡便であり今後 AD や CBD ばかりでなく、タウ蛋白の沈着を来す多くの神経疾患を対象に検索の範囲を拡大していくことが可能となる。また免疫多重染色によりタウとタウ以外のエピトープと線維形成の有無を同時に観察することもでき、今後どのようなエピトープが線維形成に関与しているかを標本上で比較的容易に調べることができる。AD 病変形成に関連のある PS とタウの 2 つの分子とその相互関係を様々な疾患や発生段階で明らかにすることで、AD に限らず広く神経疾患の治療戦略をたてる上で必要な情報を提供することを、今後の本研究の目標とする。

E. 結論

脳虚血巣周囲のグリア細胞に PS と tau2 エピトープの発現がみられ in vivo でも両者の関連が見られることが明らかになった。細胞死やタウ蛋白の沈着を考える上で虚血巣は実験でも再生可能なモデルであり、今後重要な情報を提供することが期待される。一方タウ蛋白の沈着様式は疾患により異なり、線維形成性の有無を thiazin red 蛍光色素で検討し AD よりは CBD で乏しいことを明らかにした。今後タウ蛋白とその沈着様式ならびに PS の発現とその神経原線維変化形成における役割を剖検脳や実験動物を用いて検討し、細胞死や生存に関わる PS の役割を、細胞あるいは分子レベルで開明し治療法の開発に役立てたい。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

老化・発生・分化過程におけるプレセニリンの発現と神経細胞死の抑制

主任研究者 内原俊記 東京都神経科学総合研究所
神経病理学研究部門主任研究員

研究要旨：脳虚血巣周囲のグリア細胞にプレセニリン(PS)のエピトープと tau2 の発現がみられ *in vivo* で両者の関連が見られることが明らかになった。タウ蛋白の沈着様式は疾患により異なることを免疫蛍光染色と線維構造に親和性をもつ thiazin red という色素で二重染色して検討し、タウ陽性細胞の線維形成性はアルツハイマー病よりは Corticobasal degeneration で乏しいことを明らかにした。今後タウ蛋白とその沈着様式ならびに PS の発現とその神経原線維変化形成における役割を剖検脳や実験動物を用いて検討し、細胞死や生存に関わる PS の役割を、細胞あるいは分子レベルに還元し、治療法の開発に役立てたい。

A. 研究目的

1. プレセニリン (PS) は神経細胞に発現して、細胞死や生存に関わるとの仮説があるが、本年度は分担研究者の水澤英洋らと共に脳梗塞や脳腫瘍でグリア細胞にも盛んな発現があることを見出した。さらに他の神経疾患でも同様の所見あるかどうかを AIDS, 多発性硬化症の剖検例を用いて検討した。昨年に引き続きラット発生段階における PS 蛋白の局在を明らかにするために、各種抗体、固定法を比較検討した。

2. 並行して様々なタウ蛋白のエピトープが脳梗塞や他の変性疾患で発現することを検討してきたが、タウ蛋白の一次的变化によって変性過程がおこると考えられる一連の疾患群の報告が相次ぎ、最近特に注目を集めている。PS1 の polymorphism が神経原線維変化の形成に影響を与えていることを平成9年度の本研究では明らかにしたが、その沈着様式や局在との関係が今後アルツハイマー病 (AD) に限らずタウ沈着をきたす多数の神経疾患で問題となる。我々は平成9年度の本研究で免疫蛍光 Bodian 連続染色法を用いてタウ蛋白沈着のパターンが

疾患により一様でないことを明らかにしてきた。しかしこの方法は煩雑であり、多数例を系統的に検索するには適当でない。Thiazin red は線維構造に親和性を有する蛍光色素であり、神経原線維変化や老人斑を高感度に染色することが Wischik らにより報告されてきた。本年度は免疫染色と TR による二重染色を試み、タウ蛋白の沈着様式を容易に検索する方法を開発した。

B. 研究方法

1. 脳梗塞7例、多発性硬化症剖検例3例、他に日和見感染等の合併症のない AIDS 脳症3例の病巣を含むホルマリン固定、パラフィン包埋切片をマイクロウエーブ処理 (500W, 5分) 処理後、トリプシン処理 (0.05%, 37度) して、ABC法を用いて免疫染色し DAB で発色した。また成熟 Wistar 系 rat を 4% パラホルムアルデヒド、プアン液、5% 酢酸エタノールのうち一つを用いて環流固定し、同様に免疫染色を行った。一次抗体は TOR519 (PS1 のアミノ酸配列 109-120 の合成ペプチドに対する rabbit poly clonal 抗体) と TOR520 (PS1 のアミ

ノ酸配列 304-319 の合成ペプチドに対する rabbit poly clonal 抗体) S182(N19, Santa Cruz 社 sc1245,PS1 の N 端を認識 goat polyclonal), S182 (C20 Santa Cruz 社 sc1244 ,PS1 の C 端を認識, goat polyclonal), Chemicon1575(PS1 N端を認識 goat-polyclonal), Chemicon MAB1563(mouse monoclonal), tau2(Sigma,mouse monoclonal), 抗 PHF-tau (AT8 mouse monoclonal)

2. AD 4 例及び Corticobasal degeneration (CBD) 3 例の剖検脳 (ホルマリン固定、パラフィン包埋) を用いた。タウ陽性神経細胞が比較的多数みられる大脳新皮質切片に抗 PHF モノクローナル抗体(AT8)-FITC と TR による二重染色を行い、両者の局在を共焦点レーザー顕微鏡(TCS/SP, Leica)にて観察した。蛍光像を撮像した後、同一切片に Gallyas 法または Bodian 法等の銀染色を行い、同一神経細胞の嗜銀性をさらに比較した。

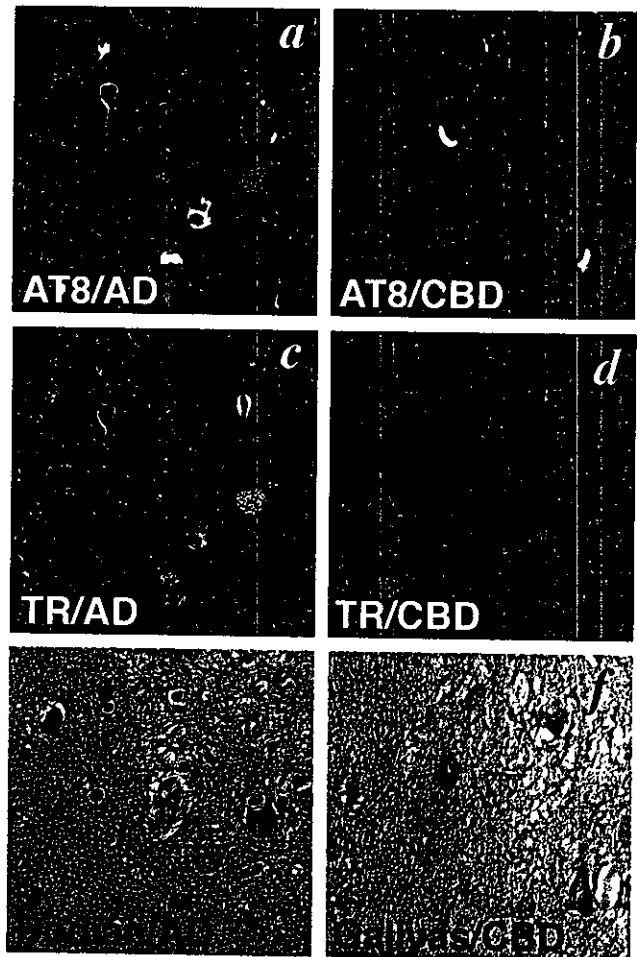
C. 研究結果

1. 脳梗塞では TOR519 による免疫原性が壊死巣内部のミクログリア様細胞にみられ同部では tau2 による免疫原性も認められたが、抗 PHF monoclonal(AT8)による免疫原性はとらえられず乖離があった。TOR520 は虚血巣周囲のアストロサイトを染色し、一部は tau2 陽性の顆粒状構造物を細胞質に含んでいた。AIDS 脳ではミクログリア様細胞、多核巨細胞、血管周囲の細胞が tau2 により明瞭に染色されたが、抗 PS 抗体による染色は明らかでなかった。多発性硬化症では tau2 抗体による染色は一部のグリア細胞に限られ抗 PS 抗体による染色も明瞭には見られなかった。これらの tau2 陽性細胞は AT8 によっては染色されず tau エピトープによる染色性の違いがある。

成熟ラットを異なる固定法、異なる抗 PS 抗体で染色してその免疫原性を検討した。これまでのところ 5% 酢酸エタノール固定し S182C20 で免疫染色した抗体が最も明瞭に神経細胞を染色している。

2. AD 脳新皮質(a,c,e)のタウ(AT8)陽性神経

細胞(a)は TR(c)や Bodian 染色(e)によっても染色され明瞭な線維構造をとる。CBD 脳新皮質(b,d,f)のタウ(AT8)陽性神経細胞(b)は Gallyas 染色でも染色され(f)るが、TR(d)や Bodian 染色による染色性が極めて乏しい点で AD とは異なる。



D. 考察

脳梗塞虚血巣周囲のグリア細胞に PS が発現していることを分担研究者との共同で明らかにしたが、脳梗塞巣には Alz-50 や tau2 等のエピトープが発現することを並行して検討してきた。本年度は平成 7 年度から共同研究を継続している Salpêtrière 病院神経病理研究室の Jean-Jacques Hauw 主任教授と Charles Duyckaerts 教授を本研究事業により主任研究者の研究室に招聘し、AIDS 脳症や多発性硬化症の剖検脳標本の提供をうけ、PS やタウ蛋白の発現についての研究

を共同でさらに発展させることができた。主に神経細胞に発現している PS が細胞死や反応性の増殖が盛んな脳梗塞巣ではグリアに発現することは、PS の代謝が外的な要因により大きく変化し、細胞死や反応性増殖に関与している可能性を示唆する。

我々は平成9年度の本研究の一環として PS1 の introcnic polymorphism が神経原線維変化の発現に影響を与えていることを報告したが、虚血巣周囲で PS と tau のエピトープの一つずつがグリア細胞に強く発現してくるという本年度の結果は両者の *in vivo* での相互作用を考える上で重要な情報を提供すると思われる。PS がタウ蛋白と *in vitro* で相互作用をするという報告があるが、この相互作用が *in vivo* のどのような局面で相互作用を行い AD の発症に関与していくのかは未解決の問題であり、今後 AD 剖検脳や実験動物モデル等を用いて虚血巣での状態を解析し、生化学的分析も加えてより詳細な検討を加えていく必要がある。形態的には PS エピトープの局在をより明瞭な形で可視化する必要があるが、成熟ラットを用いた今年度の検討では固定法や用いる抗体の種類の違いにより得られる染色像には大きな違いがあった。現在酢酸アルコール固定により最も明瞭な染色像が得られているが、さらに検討を要する。

一方タウ蛋白の沈着については、その immunolocalization のみならず沈着様式が疾患により異なることが知られるようになっており、タウ蛋白の沈着機序を考える上で不可欠な情報となっている。AD 以外にもタウの沈着をきたす病態が多数報告されているばかりか、特に平成10年度に入り、タウをコードする遺伝子の変異がタウの沈着に特徴づけられる phenotype と関連していることが相次いで報告された。遺伝子異常から表現型の形成にいたる過程を検証していく上でタウ分子の生化学的異常を明らかにすることは必須の課題であるが、一方で最終的な沈着様式の違いをめやすに、その沈着機序を検索することも同様に重要な方法論と考えられる。本年度は大脳新皮質にみられるタウ陽性神経細胞に焦点をあて、

AD 脳では TR により線維構造が明瞭にみられるのに、CBD 脳では明瞭でないという違いを見い出した。この方法は昨年度用いた免疫蛍光 Bodian 連続染色に較べて、はるかに簡便であり、今後 AD や CBD ばかりでなくタウ蛋白の沈着をに特徴づけられる多くの神経疾患を対象に検索の範囲を拡大していくことが可能になった。また免疫多重染色によりタウとタウ以外のエピトープと線維形成の有無を同時に観察することもでき、今後どのようなエピトープが線維形成に関与しているかを標本上で比較的容易に調べることができる。AD 病変形成に関連のある PS とタウの2つの分子とその相互関係を様々な疾患や発生段階で明らかにすることで、AD に限らず広く神経疾患の治療戦略をたてる上で必要な情報を提供することを、今後の本研究の目標とする。

E. 結論

脳虚血巣周囲のグリア細胞に PS のエピトープが発現するという所見（分担研究者との共同研究）に加え、tau2 の発現がみられ *in vivo* でも両者の関連が見られることが明らかになった。一方タウ蛋白の沈着様式は疾患により異なるが免疫蛍光染色と線維構造に親和性をもつ thiazin red という色素で二重染色しタウ陽性細胞の線維形成性はアルツハイマー病よりは Corticobasal degeneration で乏しいことを明らかにした。今後タウ蛋白とその沈着様式ならびに PS の発現とその神経原線維変化形成における役割を剖検脳や実験動物を用いて検討し、細胞死や生存に関わる PS の役割を、細胞あるいは分子レベルに還元し、治療法の開発に役立てたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Uchihara T, Mizusawa H, Tsuchiya K, Kondo H, Oda T, Ikeda K. (1998) Discrepancy between tau immunoreactivity and argyrophilia by the Bodian method in neocortical neurons of corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol.* 96:553-557

Mokhtari K, Uchihara T, Clemenceau S,

Baulac M, Duyckaerts C, Hauw J-J (1998) Atypical neuronal inclusion bodies in meningioangiomatosis. *Acta Neuropathol.*96:91-96.

Miake H, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Levesque L, Fraser PE, St. George Hyslop, PH, Mizusawa H, Uchihara T. (in press). Glial expression of presenilin epitopes in human brain with cerebral infarction and in astrocytoma. *Acta Neuropathol.*

Uchihara T (in press) Microglia, their relation to A β deposits and apolipoprotein E in Vellas B & Fitten JL ed *Research and Practice in Alzheimer's disease. SERDI, Auzeville-Tolosane*

Iwabuchi K, Tsuchiya K, Uchihara T, Yagishita S. (in press) Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological and genetic correlations. *Rev. Neurol(Paris)*

内原俊記、小柳清光 (1998) ヒト神経疾患におけるオリゴデンドロサイトの細胞骨格異常。脳科学 20 : 403-411

内原俊記 (1998) 脊髄小脳変性症のすべて-出現する症状。難病と在宅ケア 4:26-30

内原俊記 (印刷中) ピック病の病理像。神経内科

内原俊記 (印刷中) Alzheimer 病-tau 蛋白異常の観点から。脳科学

2. 学会発表

Uchihara T, Mizusawa H, Tsuchiya K, Kondo H, Oda T, Ikeda K. Discrepancy between Bodian and tau-immunostaining in neocortical neurons of corticobasal degeneration. 1998 Annual meeting of Society for Neuroscience. Nov. 7-12, 1998 Los Angeles, CA.

内原俊記、池田研二、土谷邦秋、小柳清光。脳虚血巣周辺部の白質にみられるタウ陽性グリア細胞。第 39 回日本神経病理学会総会学術研究会。1998 年 5 月 28-30 日。福岡

和田学、内原俊記、中村綾子、小柳清光。Guam 島の筋萎縮性側索硬化症:Bunina 小体の免疫組織化学および電顕的検討。第 39 回日本神経病理学会総会学術研究会。1998 年 5 月 28-30 日。福岡

山崎峰雄、小柳清光、中村綾子、内原俊記、新井裕至、森修、赫彰郎、中野今治 Hallervorden-Spatz 症候群と Gerstmann-Straussler Scheinker 症候群亜型で認められた Gallyas 陽性 tau 陽性グリア。第 39 回日本神経病理学会総会学術研究会。1998 年 5 月 28-30 日。福岡

熊谷二郎、横田隆徳、内原俊記、水澤英洋、龍継景、世古裕子、清沢源弘、桶田理喜。 α tocopherol transfer protein gene の変異による vitaminE 欠乏を伴った脊髄小脳変性症の一部検例。第 39 回日本神経病理学会総会学術研究会。1998 年 5 月 28-30 日。福岡

研究協力者

Jean-Jacques Hauw (Hôpital de la Salpêtrière, Neuropathologie)

Charles Duyckaerts (Hôpital de la Salpêtrière, Neuropathologie)

土谷邦秋 (都立松沢病院検査科)

三條伸夫 (埼玉県総合リハビリテーションセンター)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化・発生・分化過程におけるプレセニリンの発現と神経細胞死の抑制

老化・発生・分化過程におけるプレセニリンの発現と神経細胞死の抑制

分担研究者 水澤英洋 東京医科歯科大学神経内科教授

研究要旨：正常では神経細胞に発現しているプレセニリンのエピトープが、虚血巣周辺のグリア細胞やアストロサイトーマに発現していることを免疫組織化学的に明らかにした。細胞死や生存に関連していると考えられているプレセニリンは増殖や細胞死が広範に起こっている虚血や腫瘍では神経細胞以外でも機能していることが予想される。培養したグリア細胞などを用いて、プレセニリン発現の制御メカニズム等を細胞レベルで今後検討していく。

A.研究目的

プレセニリン (PS)がアルツハイマー病 (AD)の原因遺伝子として1995年に同定されてから既に三年以上が経つが^{7,12,15}、その生理機能、病理的役割は未だに未解明の部分が多い^{2,9,13,22}。我々の研究を含め多くの報告がPSは主に神経細胞に発現していることを認めている^{1,4,6,11,16,17,20}。またこの分子のフラグメントが細胞死に促進的あるいは抑制的に働いていることが様々なレベルで示され^{2,14,18,21}、神経細胞死を制御するという治療法の開発を視野にいたした病態の開明がPSを通してなされることが期待されている。発生分化の過程では細胞増殖と細胞死が一定の規則に従っておこりプログラムに従っているように見えるが、その他の様々な細胞死や細胞増殖の場でのPSの発現も検討を加える必要がある。本年度は細胞死のプロトタイプとして脳梗塞、増殖のプロトタイプとして脳腫瘍という病的な状態を選びPSの発現との関連を検討した。

B.研究方法

PS1の遺伝子から想定されるアミノ酸配列109-120 (TOR519)と304-319 (TOR520)に対応するペプチドを合成し家兎に免疫して抗血清を得て、affinity purifyしたIgG fractionを用いて免疫組織化学を行った^{15,20}。上記のアミノ酸配列109-120 (TOR519)はPS2の115-126アミノ酸配列と相同性が高く交差反応する¹²。7例の脳梗塞(死亡時49-93歳)剖検例と3例のアストロサイトーマ生検例ホルマリン固定パラフィン包埋標本をマイクロウエーブ処理(500W,5分)処理後、トリプシン処理(0.05%,37度)して、ABC法を用いて免疫染色しDABにニッケルを加えて紫色に発色した。GFAP(HY12-29-1L 精神研羽賀誠一博士より御供与3)またはHLA-DR(CR3/43, DAKO)に対するモノクローナル抗体を用いて同様にABC法を用いて、ニッケルを含まないDABで茶色に発色して抗プレセニリン抗体との二重染色を施行した²⁰。

C. 研究結果

脳梗塞巣内部および周辺部では神経細胞より、グリア細胞にプレセニリン様免疫原性が目立った。グリアの反応や毛細血管の増生が著しい壊死部では、HLA-DR 陽性細胞が TOR519 で染色され、大部分はミクログリアであることが分かった。壊死部から少し離れた部分では TOR520 陽性で GFAP 陽性のアストロサイトがみられた。またアストロサイトーマ細胞は TOR520 陽性であった。

D. 考察

これまでの報告では、正常および AD 脳で PS は主に神経細胞に発現するといわれており、グリア細胞での発現を認めたとする報告は比較的少ない。虚血巣周囲では PS 様免疫原性が^{4,5,23,24} 目立ったのは、神経細胞よりグリア細胞であった。グリア細胞に PS が発現することは、アストロサイトーマ細胞でも免疫組織化学的に確認した。PS の発現は最も目立つ部位の一つは脳梁である¹⁵ことは、PS が同定された最初の報告の段階から記載されており、神経細胞以外での発現があることは早くから予想はされており、培養したグリア細胞でも mRNA の発現があるという報告がある^{6,9,10,11}。実験的に虚血をおこしたラットの海馬では PS の mRNA が up regulate されることが既に報告されているが¹⁸、本研究はヒト剖検脳の虚血巣において PS がグリアに発現することを明らかにした最初の報告である。

PS の生理的および病的役割の全貌はまだ明らかでないが、この分子は細胞死や生存に関わっており、その点変異は神経細胞を死に導くという報告がある^{2,21,22}。虚血の過程は典型的な壊死と考えられてきたが、アポトーシス様の変化も辿る細胞も認められることが知られるようになった⁸。また虚血巣ではグリア細胞の増殖も盛んである。従って様々な段階の細胞死や増殖が見られる虚血巣やでは PS の代謝が変化していることが予想される。また細胞死や増殖はアストロサイトーマではさらに強調されている。本研究では、虚血巣での PS は神経細胞より

もむしろ反応性グリア（ミクログリアや肥拌性アストロサイト）やアストロサイトーマ細胞に目立ち、グリアの反応や増殖に伴って PS が発現することが明らかになった。しかしグリア細胞の種類によって発現するエピトープには差異がある。すなわちアストロサイト（虚血巣周囲の肥拌性アストロサイトやアストロサイトーマ）は TOR520(PS1 の loop region)エピトープを含み、壊死巣のミクログリア様細胞は TOR519(PS1 および 2 の N 端エピトープ)を含む。細胞の種類によって何故発現するエピトープに差があるかは不明だが、マクロファージが PS1 の N 端のエピトープを含み²³、アストロサイトが loop region のエピトープを発現する^{5,24}というこれまでの報告と一致している。さらに生化学的な検索を要するが、もしこれまでの報告通り PS1 が 2 つのフラグメントに分解され^{6,9,10,19}、N 端はミクログリアに loop-region はアストロサイトに選択的に残されるとすれば、これらの所見は全て説明できる。

PS の機能についてはこれまで神経細胞に焦点をあてて、研究がすすめられてきたが^{1,2,17,18}、本研究では反応性あるいは腫瘍性のグリア細胞に豊富な PS の発現があることを見出した。PS の生理的あるいは病理的作用については不明な部分もあるが、in vivo でグリアに PS が明瞭に発現していることは、PS が神経細胞のみならずグリア細胞でも一定の条件下で機能していることを示唆している。変性疾患に比較して、虚血は細胞死と反応性増殖をおこす最も単純なモデルの 1 つであり、この過程において PS の作用を明らかにする手がかりを与えてくれると思われる。今後は実験動物に虚血状態を作り、同様の所見が得られるかを検討するとともに生化学的検討も加えていくことで、PS の虚血における反応をより多角的に検索する。虚血は細胞に対する急激なストレスの 1 つであり、今回の結果はストレスに対して PS の発現が増加したという反応と考えることもできる。培養細胞に種々のストレスを加えて PS の発現の変化を観察することで、PS 発現の細胞メカニズムを今後明

らかにし、細胞死や増殖との関連から治療法の開発につながる所見を得ることを目標とする。

E. 結論

主に神経細胞に発現していると考えられてきたプレセニリンのエピトープが、虚血巣周辺やアストロサイトーマではグリア細胞に発現していることを免疫組織化学的に明らかにした。これらの病変では、増殖や細胞死が広範に起こっており、細胞死や生存に関連していると考えられているプレセニリンは神経細胞以外でも機能していることが予想される。実験動物における虚血巣や培養細胞に虚血ストレスをかけることにより、プレセニリンの発現に変化がみられる可能性があり、細胞や組織レベルでの発現調節機構を解明するうえで有用なモデルとなるものと期待される。

参考文献

1. Giannakopoulos P et al. (1997) Presenilin-1-immunoreactive neurons are preserved in late-onset Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150:429-436
2. Guo Q et al. (1997) Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 17:4212-4222
3. Haga S et al. (1985) Production of a monoclonal antibody against grial fibrillary acidic protein-evaluation of its specificity by immunohistochemistry (in Japanese). *Rinsho-Kensa* 29:819-823
4. Hendriks L et al. (1998) Immunoreactivity of presenilin-1 and tau in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol* 149:341-348
5. Kim KS et al. (1997) Immunoreactivity of presenilin-1 in human, rat and mouse brain. *Brain Res* 757:159-163
6. Lee MK et al. (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* 16:7513-7525
7. Levy-Lahad E et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977
8. Linnik MD et al. (1995) Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Mol Brain Res* 32:116-124
9. Murayama O et al. (1997) Different effects of Alzheimer-associated mutations of presenilin 1 on its processing. *Neurosci Lett* 229:61-64
10. Poddisny MB et al. (1997) Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 3:325-337
11. Quarteron D et al. (1996) Localization of presenilin-1 mRNA in rat brain. *Neuroreport* 7:2587-2591
12. Rogaev EI et al. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775-778
13. Scheuner D et al. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 2:864-870
14. Shen J et al. (1997) Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89:629-639
15. Sherrington R et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760
16. Suzuki T et al. (1996) Regional and cellular presenilin 1 gene expression in human and rat tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 219:708-713
17. Takami K et al. (1997) Expression of presenilin-1 and -2 mRNAs in rat and Alzheimer's disease brains. *Brain Res* 748:122-130
18. Tanimukai H et al. (1998) Alzheimer-associated presenilin-1 gene is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia. *Mol Brain Res* 54:212-218
19. Thinakaran G et al. (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17:181-190
20. Uchihara T et al. (1996) Widespread immunoreactivity of presenilin in neurons of normal and Alzheimer's disease brains: double-labeling immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 92:325-330
21. Vito PEL (1996) Interfering with apoptosis: Ca²⁺-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* 271:521-524
22. Wolozin B (1996) Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274:1710-1713

23. Yamada T (1997) Presenilin 1 immunostaining using well-characterized antibodies in human tissues. *Exp Neurol* 148:10-12
24. Zhang W (1998) Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J Neurosci* 18:914-922

F. 研究発表

1. 論文発表

- Uchihara T, Mizusawa H, Tsuchiya K, Kondo H, Oda T, Ikeda K. (1998) Discrepancy between tau immunoreactivity and argyrophilia by the Bodian method in neocortical neurons of corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol.* 96:553-557
- Miake H, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Levesque L, Fraser PE, St. George Hyslop, PH, Mizusawa H, Uchihara T. (in press). Glial expression of presenilin epitopes in

human brain with cerebral infarction and in astrocytoma. *Acta Neuropathol.*

2. 学会発表

Uchihara T, Mizusawa H, Tsuchiya K, Kondo H, Oda T, Ikeda K. Discrepancy between Bodian and tau-immunostaining in neocortical neurons of corticobasal degeneration. 1998 Annual meeting of Society for Neuroscience. Nov. 7-12, 1998 Los Angeles, CA.

熊谷二郎、横田隆徳、内原俊記、水澤英洋、龍継景、世古裕子、清沢源弘、桶田理喜。
 α tocopherol transfer protein gene の変異による vitaminE 欠乏を伴った脊髄小脳変性症の一部検例。第 39 回日本神経病理学会総会学術研究会。1998 年 5 月 28-30 日。福岡