

スの脳では神経細胞の細胞骨格が質、量とともに正常マウスの脳とは大幅に異なっていることになる。

D. 考察

Ts65Dnマウスにおける行動の異常は正常マウスとは著しく異なっているが、脳の分子生物学的研究により神経細胞に特異的であるペリフェリンの異常としてとらえることができたことは注目すべき成果である。さらにペリフェリンの発現の制御がヒト染色体21番、マウス染色体16番の末端に存在しているEts-2の支配下にあることが見いだされたことは、遺伝子のトリソミー効果の直接の結果が見いだされたことになる。つまりダウン症の特徴である染色体の数の異常に伴う細胞の他の遺伝子（ペリフェリン）の発現の乱れが見いだされたことになる。またペリフェリンが加齢に伴ってリン酸化を受けることは、脳で加齢に伴うプロテインキナーゼが発現されることを示唆している。以上の結果はTs65Dnマウスはダウン症のモデルとなりえており、将来ダウン症候群の脳の研究に大きく貢献するであろう。

E. 結論

Ts65Dnマウスは少なくとも脳に関する限りダウン症候群のよいモデルになっていると結論できる。しかしTs65Dnマウスは加齢とともにアルツハイマー病に発展することはないので、この点ヒトダウン症とは異なっている。この違いを追求することによってダウン症候群が加齢とともに早発性アルツハイマー病に移行する機構が明らかになるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

小野寺一清. ダウン症候群のマウスモデ

ルー精神遅滞の分子生物学一

SUT BULLETIN. 印刷中 (1999)

高嶋幸男、荒井康祐、岡明、元永耕三、小野寺一清. ダウン症候群と脳の老化

神経研究の進歩,42,pp844-853 (1998)

元永耕三、小野寺一清. ダウン症のモデルマウス

Bio clinica, 12,pp73-77 (1997)

小野寺一清. ダウン症のモデルマウス

バイオサイエンスとインダストリ

一,54,pp116-117 (1996)

2. 学会発表

Motonaga K, Mori Y, Patterson D,

Takashima S, Onodera K.

Overexpression of the peripherin in the brain of Ts65Dn mice and its implication for Down syndrome.

The 7th International Workshop on human chromosome 21, Berlin Germany, 9.12,1997

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

ヒト染色体 21 番ダウン症候群原因領域移入による PC12 細胞の分化異常に関する研究
分担研究者 大野耕策 鳥取大学医学部教授

研究要旨 ダウン症候群は知的障害の原因として、最も頻度の高い疾患であり、脳のアルツハイマー様病変を含む早発老化を特徴とする。この背景には神経細胞の成熟障害と早期変性が存在すると考えられるが、その機構は明らかではない。神経系細胞株である PC12 細胞にヒト 21 番染色体を導入し、分化・成熟過程を検討し、ヒト 21 番原因遺伝子領域および Ets2 遺伝子領域の存在が、PC12 細胞の NGF 刺激後の神経突起形成が早いことを見だし、この早発分化が知的障害や神経細胞の早発老化と関係している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ダウン症候群は染色体 21 番が過剰に存在（トリソミー）になることでおこる疾患で、知的障害を引き起こす単一疾患として最も頻度の高い疾患であり、さらにこの疾患は早期に脳でアルツハイマー様変性をおこす特徴を有している。この背景を明らかにするためこれまで分担研究者はダウン症候群の線維芽細胞を用い、老化関連遺伝子アミロイド前駆蛋白 mRNA の発現 (Urakami et al., Dementia 1996), Presenilin-1 mRNA の発現 (Ikeda et al., J Neurol. Neurosurg. Psychiatr 1998) を検討し、同年齢の正常対象と比較し、これらの発現が、早期に過剰におこることを見出した。これらの現象は成熟と老化プログラムが、ダウン症候群では正常人より短縮しているためではないかと推察してきた。神経細胞の分化が早期におこり、神経細胞の老化・変性が早期におこることがダウン症候群の神経系異常の背景にあると考え、これらを実験的に明らかにする目的で、神経系細胞株である PC12 細胞に微小核融合法で導入し、ダウン症候群のモデル神経細胞株の樹立を目指した。昨年、ヒト染色体 21 番ダウン症候群原因遺伝子領域を持つ PC12 細胞株を樹立し、今年度これらの細胞の神経成長因子刺激後の分化の異常の有無を検討すると同

時に、これらの細胞からヒト染色体断片を脱落したりバートントを作成し分化の異常の有無を検討した。

B. 研究方法

1. ヒト染色体 21 番を持つマウス A9 細胞をコルセミッド存在下で M 期に同調後、サイトカラシン B 存在下で脱核し、微小核細胞とした。これを PC12 細胞とポリエチレングリコール存在下で細胞融合し、ヒト 21 番染色体にタギングされたネオマイシン耐性を指標に、21 番染色体を持つ PC12 細胞を分離し、ダウン症候群原因遺伝子領域 (DCR) と ETS2 遺伝子領域を含み、SOD1 領域や APP 遺伝子領域を含まない PC12 細胞を樹立した（昨年度研究成果）
2. これらヒト 21 番染色体断片を持つ細胞をさらに継代するとヒト染色体は少しずつ脱落する。長期継代によって、異なるヒト染色体領域を保有する PC12 細胞を作成した。
3. 親 PC12 細胞、ヒト染色体断片を保有する PC12 細胞および再びヒト染色体断片を脱落させた PC12 細胞を用いて、神経成長因子刺激後の突起の形成を定量的にカウントしまた神経細胞の変性（アポトーシス）をア

ネキシシンVによる染色で定量的に計測した。

C. 結果

1. 種々のヒト 21 番染色体領域を持つ PC12 細胞の作成。

ヒト染色体特異的プライマーを用い、ヒト染色体断片の確認を行った。昨年度樹立した細胞株のほとんどは APP 領域、SOD1 領域を保持せず、ダウン症候群原因遺伝子領域(DCR)と Ets2 を保持していた。これらのうち代表株を選択し、長期継代後、クローン化し、ヒト染色体領域の存在を、ヒト DCR 及び Ets2 遺伝子領域特異的プライマーを用いて検索した。その結果、DCR+/Ets2+, DCR-/Ets2+, DCR-/Ets2- を持つ亜株の分離ができたが DCR+/Ets2- の株は単離出来なかった。

2. 種々のヒト 21 番染色体領域を持つ PC12 細胞の分化

種々の組み合わせでヒト 21 番染色体領域を持つ PC12 細胞亜株をそれぞれ 3 株づつ、神経成長因子で刺激し、分化の程度を神経突起の伸展を定量的に比較する事により検討した。ヒト 21 番染色体 DCR+/Ets2+ 及び DCR-/Ets2+ 遺伝子領域を保持する細胞は全て神経成長因子刺激後、1日目、2日目、3日目と、神経突起形成速度が早く、3日目にはこれら全てが統計的に有意に神経突起の数を増加させた。神経突起の数の増加は細胞体からでる神経突起の数の増大だけでなく、分岐数の増加によると考えられた。

3. アネキシシンVによるアポトーシス

種々の組み合わせでヒト染色体 21 番領域を持つ PC12 細胞亜株を 2-3 株ずつ神経成長因子で刺激 5 日後、アネキシシンVで染色し、アポトーシスをおこす細胞数を検討した。表 1 に示す様にヒト染色体 21 番領域を持つ細胞のうち DCR+/Ets2+ の 2 株、DCR-/Ets2+ の 4 株中 2 株は親株に比較し、有意にアポトーシスをおこしやすいことが示唆されたが、アポトーシスをおこしやすく原因遺伝子領域が明らかに

出来なかった。

	ヒト 21 番遺伝子		Annexin V 陽性
	DCR	Ets2	
親	-	-	18.7 ± 3.7
亜株	+	+	55.1 ± 8.3**
	+	+	42.8 ± 5.5*
	-	+	52.3 ± 8.3*
	-	+	39.2 ± 12.1
	-	+	31.4 ± 6.6
	-	+	70.7 ± 1.7**
	-	-	29.7 ± 2.5
	-	-	26.0 ± 2.0

● *p<0.05, **p<0.01 (親株に対して)

C. 考察

ヒト 21 番染色体 DCR 領域及び Ets2 遺伝子領域の両方を保持する細胞は、神経成長因子刺激後神経突起の数の形成が明らかに増加し、親株に比較し明らかに早期にアポトーシスをおこしやすいことが明らかになった。神経突起の過剰形成に関しては、Ets2 領域の存在が重要な役割を持ち、早期アポトーシスに関しては、DCR 領域の存在が重要な役割を持つ可能性が示された。

4ヶ月のダウン症候群の脳では正常児と比較し、樹状突起の数が過剰に形成され、1歳すぎる頃から樹状突起の成長が止まりその後樹状突起が萎縮してくることが報告されている(Becker et al., Prog.Clin.Biol.Res 373: 133-152, 1991)。我々がヒト染色体 21 番断片を持つ PC12 細胞で観察した所見と同じである。この現象が Ets2 遺伝子によって起きているかどうかをさらに明らかにするためには Ets2 遺伝子自体を PC12 細胞に導入し同じことがおこるかどうか証明する必要があり、現在検討中である。

一方、PC12 細胞に copper/zinc superoxide dismutase(SOD1)遺伝子のアンチセンスを導入すると PC12 細胞がアポトーシスを引き起こすこ

ると PC12 細胞がアポトーシスをおこすことが知られている(Troy and Shelanski, Proc Natl Acad Sci USA, 91: 6384-7, 1994)。しかしトリソミー型のダウン症候群では SOD1 遺伝子も 1.5 倍に過剰に存在している可能性があり、SOD1 遺伝子が働いていない可能性は低く、この実験モデルからダウン症候群の神経細胞の早期変性を説明するのは困難である。実際、我々の実験系ではヒト SOD1 遺伝子が存在しない PC12 細胞で神経成長因子で分化させた後にアポトーシスが誘導されている。さらに Busciglio と Yankner はダウン症候群流産胎児から神経細胞を培養しダウン症候群神経細胞は正常由来の神経細胞と比較し、早期にアポトーシスをおこすことが報告されている。これもビタミン E などの抗酸化剤の投与でアポトーシスが抑制できると報告し、過酸化脂質の存在が早期細胞死と関係している可能性を報告している。我々もヒト染色体 21 番断片を持つ PC12 細胞で、親 PC12 細胞及びいったんヒト染色体 21 番を保持した後それを脱落させた PC12 細胞に比較し、ヒト DCR 領域と Ets2 遺伝子領域を保持する PC12 細胞は早期にアポトーシスをおこすことを観察したが、このアポトーシスが抗酸化剤投与で改善するかどうかは明らかに出来ていない。ヒト染色体 21 番のどの遺伝子領域が神経成長因子で刺激後早期にアポトーシスをおこす原因遺伝子領域であるのかを明らかにするとともに、これらを防御する薬剤の開発がダウン症候群の知的障害や神経系の早発老化の機構を解明し、その治療法を開発する上で極めて重要であると考えている。

E. 結論

ダウン症候群の知的障害と神経系の早発老化機構の解明を目的として、ヒト染色体 21 番断片を持つ PC12 細胞株を樹立し、これまでダウン症候群の神経病理やダウン症候群由来の神経細胞で観察されてきた、神経突起の早期過剰形成と早期変性を示す試験管内モデル系を作成した。

このモデル神経細胞はヒト 21 番染色体の DCR 領域と Ets2 遺伝子領域を含み、継代によってこれらの領域をランダムに脱落していくことから、この 2 つのフェノタイプと関係するヒト染色体 21 番の責任遺伝子を決定することが可能な系である。

現時点では、神経突起の早期過剰形成（ヒトでは乳児期の樹状突起の過剰形成）は DCR 領域というより、Ets2 遺伝子領域の過剰が関係している可能性が示唆され、神経細胞の早期変性（アポトーシス）には DCR 領域の過剰が関与している可能性が示唆されるが、決定はできていない。これらフェノタイプと関係する染色体領域から遺伝子の同定へと発展させることが課題である。これらの領域の中でどの遺伝子が過剰に発現することで、神経系の早発分化と早発神経細胞死をおこすのか明らかに出来れば、ダウン症候群の神経系の早発老化の機構が明らかに出来、なんらかの早発老化予防法が開発できる可能性があると考えている。

F. 研究発表 (1998)

1. Ikeda K, Urakami K, Isoe K, Nakashima K, Ohno K. High concentration of PS-1 mRNA in skin fibroblasts of patients with Down's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 64: 690-691, 1998
2. Ikeda K, Urakami K, Isoe K, Ohno K, Nakashima K, The expression of presenilin-1 mRNA in skin fibroblasts from Alzheimer's disease. *Dementia* 9: 145-148, 1998
3. Sugita K, Suzuki N, Ohno K, Suzuki Y, Takanashi J, Kita K, Yamamori H, Nakashima N. Detection of UV-Induced K-ras codon 12 mutation by PCR and differential dot-blot hybridization in cells from Down syndrome and Cokayne syndrome. *Oncol Rep* 6: 145-147, 1999

ウェルナー症候群の発症機構に関する研究

三木哲郎 (愛媛大学医学部 教授)

ウェルナー症候群患者由来線維芽細胞では自然老化細胞と同じように様々な遺伝子のmRNAレベルにおける発現変化(転写異常)がみられ、これがウェルナー症候群における各種老化徴候の発現につながると考えられる。そこでWRN-Hの転写活性の有無を検索した結果、全長のWRN-Hは酵母においてTATAプロモーターからの転写を約20倍に増強することが明らかになった。

キーワード：ウェルナー症候群、転写活性、プロモーター、老化、線維芽細胞

A. 研究目的

遺伝的早期老化症候群(早老症)の代表的疾患であるウェルナー症候群(WS)は糖尿病、高脂血症、動脈硬化、性腺機能低下、腫瘍、骨粗鬆症、老人様顔貌、低身長、白髪、禿頭、両側性白内障など多くの老年病および老化徴候を若年期より発現する。細胞学的にも細胞寿命短縮やテロメアの早期短縮などの早期細胞老化がみられるため、WSはヒト老化モデルの代表的疾患とみなされてきた。またWS患者由来線維芽細胞では自然老化細胞と同じように様々な遺伝子のmRNAレベルにおける発現変化(転写異常)がみられ、これがWSにおける各種老化徴候の発現につながると考えられる。

そこで今回、酵母の系でのTATAプロモーターにおけるWS原因遺伝子産物(WRNヘリカーゼ; WRN-H)の直接的な転写活性の検出を試みた。

B. 研究方式

GAL4を欠失させ、代わりにGAL1(UAS)-GAL1(TATA)-lacZを組み込んだ*Saccharomyces cerevisiae* Y187に、WS原因遺伝子(WRN)の様々な断片をGAL4のDNA結合領域との融合蛋白として発現させ、lacZレポーター遺伝子の発現をo-nitrophenyl β -D-galactopyranosideを基質として検出した(Fig. 1)。また酵母のコンピテントセルの作成にはLiAc法、酵母のトランスフォームにはPEG/LiAc法を用いた。

C. 研究結果

1) インサートとGAL4のDNA結合領域との融合蛋白を発現するベクターであるpAS2-1単独と全長のWRNcDNAを組み込んだpAS2-1での β -galactosidase活性を測定した。その結果はそれぞれ0.023単位

と0.548単位（相対比率は24）を示した。従って、WRN-Hは転写活性を保持していると考えられた。

2) WRN-Hの転写活性を確認し、その程度を決定するために、インサートとGAL4のDNA結合領域との融合蛋白を発現し、pAS2-1よりもプロモーターの活性が弱いベクターであるpDBT9単独、弱いポジティブコントロールであるヘマグルティニンのエピトープを組み込んだpDBT9、全長のWRNcDNAを組み込んだpDBT9での β -galactosidase活性を測定した。その結果はそれぞれ0.016単位、0.047単位と0.253単位（pDBT9単独に対する相対比率は各々3と16）を示した。従って、WRN-Hは比較的強力な転写活性を保持していると考えられた。

3) WRN-Hの転写活性に必要な領域を決定するためにpAS2-1単独とWRNの様々な断片を組み込んだpAS2-1での β -galactosidase活性を測定した。その結果はそれぞれ0.073単位（pAS2-1単独）、0.694単位（全長のWRN）、0.052単位（1-152アミノ酸部分）、0.053単位（1-314アミノ酸部分）、0.452単位（1-403アミノ酸部分）、1.014単位（1-1041アミノ酸部分）、0.928単位（1-1309アミノ酸部分）、0.056単位（404-1432アミノ酸部分）、0.068単位（550-1432アミノ酸部分）、0.063単位（1042-1432アミノ酸部分）を示した。pAS2-1単独に対する相対比率は各々10、1、1、6、14、13、1、1、1であった（Fig. 2）。従って、WRN-Hの転写活性に必要な領域は315-403アミノ酸部分にあると考えられた。また、404-1309アミノ酸部分も315-403アミノ酸部分存在下において転写活性に影響を与える領域であると考えられた。

D. 考察

WSにおける転写異常をきたす機構として、WRN-Hが直接的に各種遺伝子の発現調節に関与している可能性とWRN-Hがテロメアやクロマチン構造の維持や他の転写活性を持つ生体内分子との相互作用を介して間接的に各種遺伝子の発現調節に関与している可能性がある。

そこで今回、酵母の系でのTATAプロモーターにおける直接的なWRN-Hの転写活性の検出を試みた結果、全長のWRN-Hは酵母においてTATAプロモーターからの転写を約20倍に増強することが明らかになった。さらにWRN-Hの各種断片を用いた転写実験の結果より、WRN-Hの転写活性は酸性領域を含むアミノ酸配列、315から403の領域に存在し、さらに酸性領域とヘリカーゼ領域を含むアミノ酸配列、404から1309の領域は315から403の領域存在下において転写活性増強作用を示すことが判明した。この結果はまだ酵母内でのTATAプロモーターについて証明されなすぎないため注意が必要であり、同様の結果が哺乳類細胞でいくつかのプロモーターについて証明されなければならない。

E. 結論

酵母の系でのTATAプロモーターにおいて全長のWRN-Hは転写を約20倍に増強すること、転写活性は酸性領域を含むアミノ酸配列に存在し、さらに酸性領域とヘリカーゼ領域を含むアミノ酸配列は転写活性領域存在下において転写活性増強作用を示すことが判明した。同様の結果が哺乳類細胞でも証明されれば、WSにおける各種老化徴候の発現機構解明の糸口となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ye, L., Nakura, J., Morishima, A. and Miki, T. Transcriptional activation by the Werner syndrome gene product in yeast. *Exp. Gerontol.*, 33, 805-812, 1998.
- 2) 三木哲郎：早老症、内科学教科書（黒川清、松澤祐次編）、文光堂、東京、印刷中。
- 3) 三木哲郎：老化遺伝子、新老年学（折茂肇編）、東京大学出版会、東京、印刷中。
- 4) 名倉 潤、三木哲郎：早老症とテロメア、テロメア、テロメラゼ（山木戸道郎編）、日本医学館、東京、印刷中。
- 5) 名倉 潤、三木哲郎、荻原俊男：ヒトの老化機構とウェルナー症候群の発症機構、*MOLECULAR MEDICINE*, 35 (5) : 616-626, 1998.
- 6) 名倉 潤、三木哲郎：早発老化-最近の進歩、*脳と神経*, 50 (11) : 977-987, 1998.
- 7) 名倉 潤、三木哲郎：ヒト老化マウスとその原因遺伝子の発見、蛋白質核酸 酵素, 43 (3) : 251-257, 1998.
- 8) 名倉 潤、三木哲郎：老化遺伝子、*医学のあゆみ*, 185 (9) : 627-632, 1998.
- 9) 名倉 潤、叶 林、森島淳之、三木哲郎：ヘリカーゼ変異と早老症-転写異常症候群-、*最新医学*, 53 (9) : 2110-2117, 1998.
- 10) 名倉 潤、三木哲郎：COLOR HEADLINE「遺伝子と慢性疾患」（8）老化、臨床栄養, 93 (7) :

797-804, 1998.

- 11) 森島淳之、名倉 潤、三木哲郎：臨床講義-早老症（ウェルナー症候群）-、*臨床と研究*, 75 (11) : 2441-2445, 1998.

2. 学会発表

- 12) 三木哲郎：老年病と老化遺伝子、第9回日本老年医学会四国地方会総会、平成10年2月28日、徳島
- 13) 三木哲郎、名倉 潤：「老化機序と制御-新しいアプローチ」Werner症候群の原因、遺伝子とその機能、第71回日本内分泌学会学術総会、平成10年6月6日、福岡
- 14) 三木哲郎、名倉 潤、森島淳之：荻原俊男、ウェルナー症候群の遺伝子多型と疾患との関係、第40回日本老年医学会学術集会、平成10年6月17-19日、福岡
- 15) 森島淳之、名倉 潤、満田憲昭、三木哲郎、荻原俊男：ウェルナー症候群蛋白に関する検討、第40回日本老年医学会学術集会、平成10年6月17-19日、福岡

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

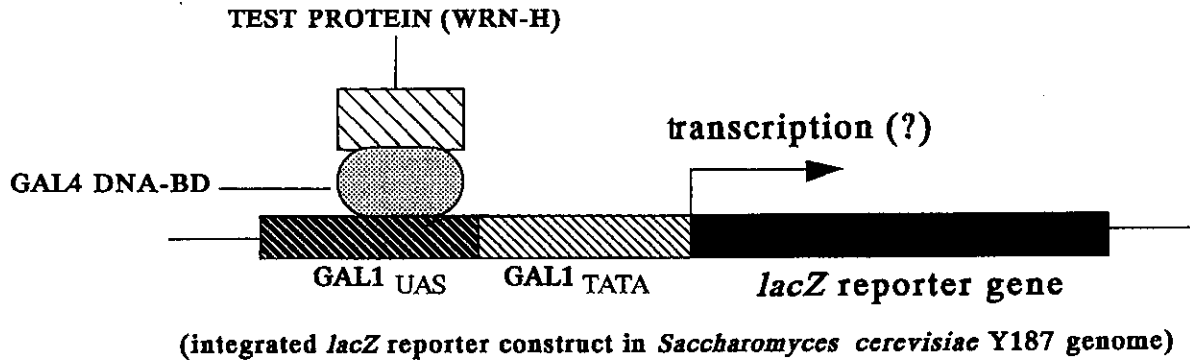


Fig. 1. Scheme representing the transcriptional activation assay system. The report gene *lacZ* is regulated by the wild-type GAL1 promoter. The GAL4 DNA-BD has a high affinity for the GAL1-promoter. This makes the *lacZ* construct a reporter for detecting transcriptional activation by a test protein fused with this DNA-BD.

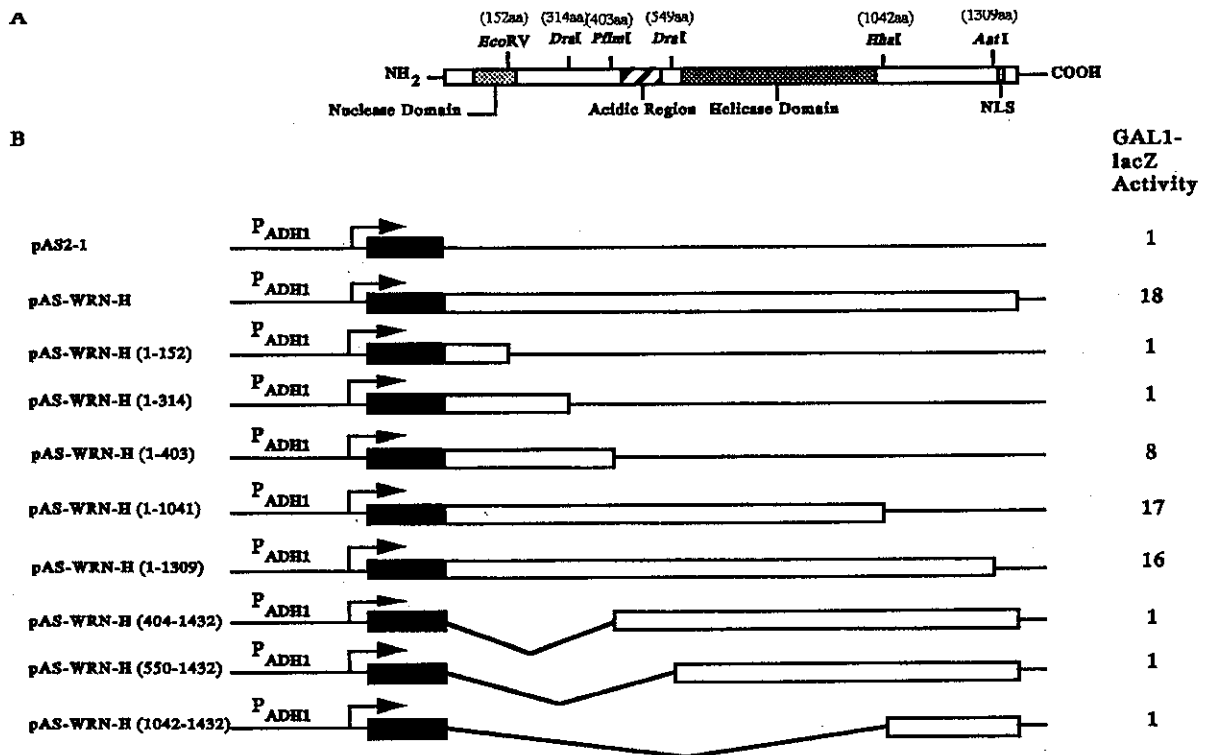


Fig. 2. Schematic diagram of WRN-H with hybrids for expression in *Saccharomyces cerevisiae* Y187. The upper portion of the figure represents WRN-H. Restriction sites are given for the enzymes used in this study. The lower portion of the figure shows schematic representation of plasmid constructs used to assay transcriptional activation. Transcription is initiated from the constitutive *ADHI* promoter (P_{ADHI}). The amino acids from WRN-H are as indicated in parentheses. Transformants were grown and assayed for β -galactosidase activity. Values for β -galactosidase activity are the mean of three replicative assays.

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

分担研究者 難波 吉雄 東京大学大学院医学系研究科・講師

（研究要旨）

アルツハイマー病脳では、APPあるいはA β の分解に関与している可能性が示唆されているBleomycin hydrolase免疫原性が老人斑変性突起に存在していることが明らかとなった。

A. 研究目的

アルツハイマー病脳及びダウン症脳の神経病理学的特徴の1つである老人斑の腫瘍構成成分はA β である。ごく最近、その前駆体蛋白であるAPPの分解に関与している酵素としてBleomycin hydrolaseが注目されている。そこで本研究では、脳内のA β の蓄積におけるBleomycin hydrolaseの関与について明らかとする目的から、抗Bleomycin hydrolase抗体を用いてアルツハイマー病脳およびダウン症脳について免疫組織学的検討を行った。

B. 研究方法

アルツハイマー病脳6例及び正常老年者脳5例については海馬を含む切片、ダウン症脳2例については頭頂葉皮質の切片（いずれもホルマリン固定、パラフィン包埋切片）について検討を行った。抗体は、抗ラット抗Bleomycin hydrolase抗体を用いた。本抗体は、ヒトBleomycin hydrolaseを認識する事が確認されている。免疫染色は、Biotin-Streptavidin法によった。

C. 研究結果

アルツハイマー病脳および正常老年者脳海馬では、神経細胞に強い免疫原性が認められた。神経細胞では、その

胞体が顆粒状に染色された。アルツハイマー病脳と正常老年者脳の染色性を比較すると、その反応性はアルツハイマー病脳で強い印象であった。また、アルツハイマー病脳では、老人斑の変性突起、一部のアルツハイマー神経原線維変化、および顆粒空胞変性の顆粒も陽性に染色された。

ダウン症脳では、神経細胞も同様に染色されたが、アルツハイマー病に比してその染色性は弱いものであった。

D. 考察

我々の研究により、Bleomycin hydrolase免疫原性が老人斑変性突起に見いだされた。A β の蓄積原因の1つとして代謝分解制御異常であるという“アミノペプチダーゼ仮説”が提唱されている。ごく最近、実際Bleomycin hydrolaseはA β ペプチドを分解するという報告もなされている。これらの所見をあわせて考えると、脳内A β 沈着にBleomycin hydrolaseが関与している可能性も考えられよう。今後、アルツハイマー病脳におけるBleomycin hydrolase活性の変動等さらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

アルツハイマー病脳では、老人斑にBleomycin hydrolase免疫原性が存在す

ることが明らかとなった。

F. 研究発表

1) Ueki A, Otsuka M, Namba Y,
Ishii T and Ikeda K.
 α 1-antichymotrypsin and
Apolipoprotein E polymorphism In
Alzheimer's disease. In : "Progress
In Alzheimer's and Parkinson's
disease " (ed by Fisher et al)
pp757-764, Plenum Press, New York,
1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

Cockayne症候群由来線維芽細胞におけるDNA修復関連蛋白質発現の検討

杉田克生 (千葉大学教育学部臨床医科学助教授)

紫外線高感受性を呈するCockayne症候群(CS)由来細胞において紫外線応答に関わり、ヒトインターフェロン β (HuIFN- β)により誘導されてくるDNA修復関連蛋白質を解析した。CS細胞ではP53は正常コントロール細胞に比し高値で、紫外線照射72時間後も持続的高発現していた。HuIFN- β によりBax蛋白質の発現が低下することより、紫外線によるアポトーシスがHuIFN- β により抑制される可能性が示唆された。

キーワード： Cockayne症候群、早老症、紫外線、interferon

A. 研究目的

Cockayne症候群(CS)は早発老化を示す疾患であり、患者より採取した皮膚線維芽細胞は紫外線致死高感受性を示す。ところが、その高感受性が照射前インターフェロン β 処理により軽減する。昨年度の研究では、インターフェロン β によるERCC5 (excision repair cross complementing 5) 遺伝子の発現誘導をdifferential display法により検出した。老化細胞はDNA修復酵素蛋白の異常が予測されている。従って遺伝子の解析のみでなく、ERCC5以外の修復酵素の発現量も測定する必要がある。CS患者由来皮膚線維芽細胞において、ヒトインターフェロン(HuIFN)により誘導され、紫外線の応答あるいはその応答を調節する修復蛋白質をWestern blot解析により検討する。

B. 研究方法

1. 細胞：CS患者由来細胞株はそれぞれ相補性AおよびB群SV-40 トランスフォーム細胞、CS3BE, CS1AN¹)を用いた (英国University of

Sussex, MRC Cell Mutation UnitのProf. A.R.

Lehmannより供与)。色素性乾皮症(XP)由来SV40 transform細胞(XP20S), 正常コントロール細胞(TC)ならびにHeLa細胞もあわせ検討した。上記細胞は、10%胎児牛血清入りMEM液で継代培養を行い、5-10代目の細胞を実験に供した。継代培養はCO₂インキュベーター内にて37℃にて行い、2日毎に培養液を交換した²⁾。

2. 試薬：HuIFN- β は東レ(株)より供与され、従来法にもとづき使用した³⁾。即ちHuIFN- β は紫外線照射の24時間前に培養液中へ添加した。37℃で培養した。

3. Western Blot解析：従来法⁴⁾に基づき細胞を回収した。Western Blot解析には、Amersham製ECL kitを用い検討した。用いた抗体は、anti-P53 antibody, anti-Bax antibody, anti-P21 antibody, anti-Bcl-2 antibody (transduction Laboratories).

C. 研究結果

CSにおいては、紫外線照射後72時間以上P53の発現の誘導が持続していた。(図1)一方、HuIFN- β 処理細胞では、紫外線照射後アポトーシスを誘導するBax蛋白が減少した。bcl-2蛋白の発現量はHuIFN- β の処理の有無に関わらず、低発現であった。CSにおけるインターフェロンによる紫外線致死抵抗化の一機構として、アポトーシス関連蛋白への発現量の調節が関与していることが示唆された。

D. 考察

放射線に対する生体の応答メカニズムには細胞内シグナル伝達系の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。紫外線など放射線を感じた細胞はその情報を伝達し、細胞周期やDNA修復、あるいはアポトーシスや細胞回復に関与する様々な応答系を活性化する。近年、細胞内シグナル伝達に関与する蛋白質が次々に同定され、P53中心としたシグナル伝達系路、MAPキナーゼ関連経路あるいはPKC経路、スフィンゴミエリナーゼを中心とした細胞膜介在経路などが放射線ストレスに反応していることが明らかにされつつある。

平成10年度は、インターフェロンによる紫外線抵抗化の機序にXPGなどの除去修復遺伝子の発現誘導のあることがCSにおいて示唆されたことより、DNA修復過程において誘導されるP53などのシグナル伝達物質の発現量をWestern blot解析により検討した。今回我々はCSにおいて紫外線感受性を調節するIFN- β がどのように上記のシグナル伝達を変化させるかを、特にP53を中心としたシグナル伝達系路を検討した。

HuIFNは種々の生体作用を有するサイトカインの一群である。HuIFNには抗ウイルス作用、

免疫調節作用、細胞増殖調節作用などが主に知られている⁵⁾。これらに加えHuIFNには、種々のヒト由来細胞において、紫外線による突然変異誘発作用や細胞致死作用を減少させることを以前より報告してきた^{3, 6-8)}。

IFN- β 処理細胞では未処理の細胞に比べ細胞増殖周期を調節するretinoblastoma(RB)蛋白質のリン酸化が抑制される報告があり、IFN- β は細胞増殖制御への関与も予測される。一方老化細胞で発現が高いP21蛋白は、DNA損傷のシグナルを受けたP53による転写誘導によって発現され⁹⁾、Cyclin dependent kinase (CDK)に結合してRB蛋白質のリン酸化を阻害することによりG1 arrestを引き起こす。我々の用いたSV40 transform細胞のCS3BE, 1ANでは、P21の発現量は低く、IFN- β の投与によっても発現量は不変であった。

一方ほ乳類の細胞を紫外線照射すると、DNA障害以外に特異な遺伝子誘発が伴うシグナル伝達経路の活性化が知られている¹⁰⁾。Baxはホモ二量体、あるいはBcl2とヘテロ二量体を構成することによりアポトーシスを制御しており、Bax蛋白量が増えてBax-Baxホモ二量体が優勢となるとアポトーシスが促進されると考えられている¹¹⁾。GADD45は紫外線などによるDNA損傷により発現が誘導される一連の遺伝子群の1つで、P53の標的部位は第3イントロンにある¹²⁾。このP53は除去修復を担っている諸因子(XPB/ERCC3, XPD/ERCC2, CSB/ERCC6)などとも複合体を形成し、直接にDNA損集修復に参加している可能性が指摘されている¹³⁻¹⁵⁾。

一方、CS細胞と同様DNA修復異常を有する色素性乾皮症(XP)細胞では、紫外線誘発による種々の遺伝子発現は正常コントロール細胞に比し高いと報告されている¹⁶⁾。実際P53蛋白質の発現が高いことがCSやXP細胞では報告されて

いるが、今回の我々の検討と合致する結果であった。

今回の発見は、紫外線高感受性細胞において紫外線照射によるアポトーシスを引き起こすシグナル伝達がサイトカインにより調節されることを見いだした点が重要であり、今後DNA障害による細胞死を抑制させる観点よりサイトカインの臨床応用を考える上で有用な結果と思われる。

(共同研究者：千葉大学医学部第二生化学鈴木信夫教授、喜多和子および日和佐隆樹博士)

F. 引用文献

- 1) L.V. Mayne, T. Jones, et al: SV 40-transformed normal and DNA-repair-deficient human fibroblasts can be transfected with high frequency but retain only limited amounts of integrated DNA. *Gene* Vol. 66, No. 1: 65-76, 1988.
- 2) K. Sugita, N. Suzuki, et al: Cockayne syndrome with delayed recovery of RNA synthesis after ultraviolet irradiation but normal ultraviolet survival. *Pediatr Res*, Vol. 21, No. 1: 34-37, 1987.
- 3) N. Suzuki, H. Suzuki, et al: Effects of human interferon on cellular response to UV in UV-sensitive human cell strains, *Mutation Res*, Vol. 198, No. 2: 207-214, 1988.
- 4) T. Hiwasa, A. Nakagawara: Suppression of transformed phenotypes of Ha-ras-transformed NIH3T3 cells by Caspase-2. *Biochem Biophys Res Comm*, Vol. 250, No. 4: 741-746, 1998
- 5) G.C. Sen, P. Lengyel: The interferon system, A bird's eye view of its biochemistry, *J Biol Chem*, Vol. 267, No. 8: 5017- 5020, 1992.
- 6) N. Suzuki, H. Suzuki: Suppression of UV mutagenicity by human interferon, *Mutation Res*, Vol. 202, No. 2: 179-183, 1988.
- 7) K. Sugita, N. Suzuki et al: insusceptibility of Cockayne syndrome-derived lymphocytes to plasminogen activator-like protease induction by ultraviolet rays and its abolition by interferon, *Mutation Res*, Vol. 262, No. 2: 139-144, 1991.
- 8) K. Sugita, N. Suzuki, et al, Involvement of antipain-sensitive protease activity in the interferon- β -induced UV-refractoriness of Cockayne syndrome fibroblasts. *Mutation Res*, vol 357, No. 1-2: 177-181, 1996
- 9) WS. El-Deiry, T. Tokino, et al, Waf 1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, vol 75, No. 4: 817-825, 1993
- 10) N. J. Holbrook, A.J. Fornace: Responce to adversity, molecular control of gene activation following genotoxic stress, *New Biologist*, Vol. 3, No. 9: 825-833, 1991.
- 11) T. Miyashita, J.C. Reed, Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, Vol 80, No 2: 293-299, 1995.
- 12) M.B. Kastan, Q. Zhan, et al, A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia. *Cell*, Vol 71, No 4: 587-597, 1992.
- 13) X.W. Wang, K. Forrester, et al, Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and

association with transcriptional factor ERCC3. Proc Natl Acad Sci, Vol 91, No 6: 2230-2234, 1994.

- 14) H. Xiao, A. Pearson, et al, Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP 16 and p53. Mol Cell Biol, Vol 14, No 10: 7013-7024, 1994
- 15) X.W. Wang, H. Yeh, et al, p53 modulation of TFIID-associated nucleotide excision repair Activity. Nature Genet, Vol 10, No 2: 188-195, 1995.
- 16) B. Stein, H. Rahmsdorf et al: UV- induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos and metallothionein, Mol Cell Biol, Vol. 9, No. 11: 5169-5181, 1989.

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① K. Sugita, N. Suzuki, et al: Detection of UV-induced K-ras codon 12 mutation by PCR and differential dot-blot hybridization in cells from Down syndrome and Cockayne syndrome, Oncology Reports, Vol. 6, No 1: 145-147, 1999.
- ② K. Sugita, N. Suzuki, et al: Enhancement of XPG mRNA expression by human interferon- β in Cockayne syndrome cells, Mutation Res, Vol. 408, No.1: 67-72, 1998.
- ③ Y. Higuchi, K. Kita, et al: Search for genes involved in UV-resistance in human cells by mRNA differential display: increased

transcriptional expression of nucleophosmin and T-plastin genes in association with the Resistance, Biochem Biophys Res Commun Vol. 248, No. 3: 597-602, 1998.

- ④ Y. Suzuki, K. Sugita, et al: Enhancement of XPG mRNA transcription by human Interferon- β in Cockayne syndrome cells with complementation group B, Int J Mol Med, Vol. 3, No. 1: 87-89, 1999.
- ⑤ H. Osaka, C. Kawanishi, et al: Pelizaeus-Merzbacher disease: Three novel mutations and implication for locus heterogeneity, Ann Neurol, Vol. 45, No. 1: 59-64, 1999.

2. 学会発表

- ⑥ 杉田克生、鈴木康浩他：高紫外線感受性細胞におけるHuIFN-b培養下での紫外線誘導遺伝子の検索、第40回日本小児神経学会、1998
- ⑦ 杉田克生、鈴木康浩他：HuIFN-b培養下のCockayne症候群において紫外線が発現を誘導する遺伝子、第39回日本神経学会、1998
- ⑧ 喜多和子、杉田克生他：InterferonによるSOS応答能回復に関与する遺伝子の探索、第21回日本基礎老化学会、1998
- ⑨ 中村麻子、松浦伸也他：日本人ファンコニー患者における変異解析：3症例にみられた変異の異質性、第41回日本放射線影響学会、1998

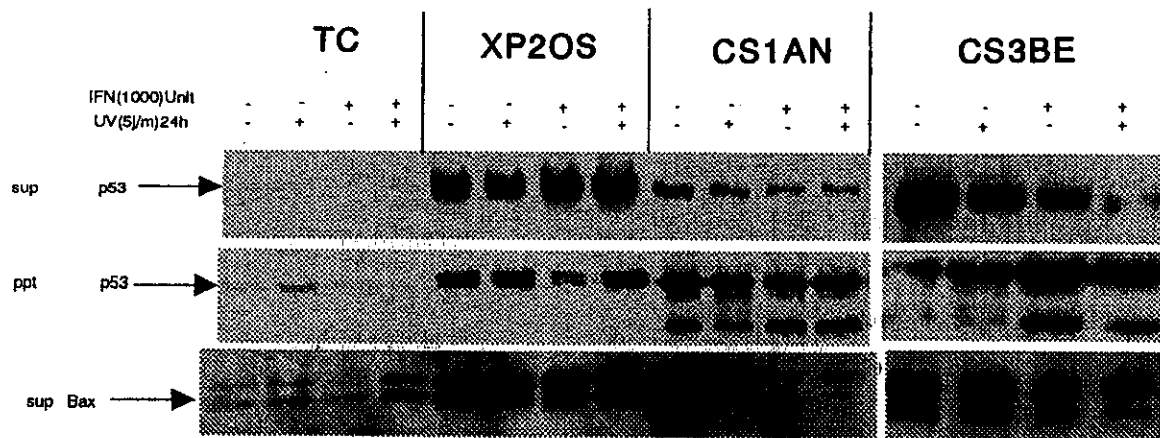


FIG. 1. Expression of P53 and Bax in supernatant and precipitated samples from cell extracts of TC, XP2OS, CS1AN and CS3BE. The cell extracts were sampled 24 h after UV irradiation (5 J/m²) with/without 24h HuIFN- β (1x10³ IU/ml) pretreatment

ヒト胎児脳幹における Neuropeptide Y (NPY) および GTP cyclohydrolase (GTPCH) 含有神経細胞の分布について—免疫組織化学的検討

研究者 塚田昌滋 国立療養所中信松本病院院長

研究要旨

合法的に墮胎された胎児2例について、抗NPY血清と抗GTPCH血清を用いた免疫組織化学により、それぞれを含有する神経細胞のヒト胎児脳幹の分布を明らかにした。NPY含有神経細胞は、中脳、橋、延髄の被蓋部を中心に広範に分布しており、中脳の被蓋部において最も密であった。GTPCH含有神経細胞は、中脳では黒質を含む被蓋部、橋では青斑核と正中部を含む被蓋部全域、延髄では縫線核群と被蓋部の腹外側に主に分布していたが、NPYの分布とは様式が異なっていた。

研究目的

Neuropeptide Y (NPY)は中枢神経系に最も豊富に存在する神経ペプチドであるが[1,2]、ヒトの脳幹における分布についての研究は少なく、その詳細は明らかではない。本研究では、抗NPY血清を用いた免疫組織化学により NPY 含有神経細胞のヒト胎児脳幹の分布を検討した。NPY はしばしばとカテコラミン(CA)やセロトニンと胞体内で共存することが知られている[3,4]が、解剖学的部位による相違については不明の点が多い。そこで、CA とセロトニンの生成にそれぞれ関与するチロシン水酸化酵素(TH)およびフェニルアラニン水酸化酵素の共通する補酵

素で、BH₄ 合成の律速酵素である GTP cyclohydrolase (GTPCH)に対する抗体を用いての免疫組織化学を隣接切片で行い、NPYの免疫染色結果と比較検討した。

方法

検索したヒト胎児は2例(25、27週)で、死産後2時間以内に4%パラホルムアルデヒドPBS液に固定し、パラフィン包埋した。脳幹部は、中脳上端から延髄錐体交叉までOlszewskiらの脳幹アトラスに準じて7レベルについて切り出し、6μm切片を作成した。GTPCH免疫染色には、免疫増強法として脱パラ後、オートクレイブ 120°C、20分前処理を行っ

た。0.3% 過酸化水素添加 100%メタノールで 30 分処理して内因性ペルオキシダーゼをブロックした後、抗 NPY 抗体 (Sigma, polyclonal 1:1000)、抗 GTPCH 抗体 (永津俊治先生より供与、polyclonal 1:15K) を用いて、ABC 法で免疫組織染色を行った。

結果

1) NPY 含有神経細胞の分布

NPY 神経細胞は中脳で最も多く、赤核と動眼神経核の出るレベルで、中脳水道外側腹側の灰白質および中脳網様帯、背側縫線核に密に分布していた。また下丘を含む中脳蓋にも、散在性ではあるが広範に分布していた。本研究に用いた 25 および 27 週令の標本では、黒質神経細胞のメラニンは未だ認められないが、黒質の神経細胞は全て陰性であった。橋では、青斑核および被蓋部内側背部に陽性神経細胞が多数認められた。後述する GTPCH 神経細胞の分布とは異なり、NPY 細胞はそれ以外の被蓋部 (橋上中心核、橋網様帯) には認められなかった。中脳の下丘とともに、脳幹の聴覚路を構成する外側毛帯核にも NPY 陽性細胞が散見された。延髄では、内側背部から外側腹部の網様帯にほぼハの字形に陽性細胞が分布していた。

三又神経脊髄路核、孤束核、迷走神経背側核、疑核に比較的染色性が弱い細胞が散見された。

これらの NPY 陽性細胞の染色性と形状は部位によって若干異なっていたが、通常は unipolar または bi-polar な胞体突起を示していた。ただし感覚系の脳神経核では脳幹網様帯に比べ NPY 神経細胞は全体に小型で、免疫染色性が弱く、核の周囲のみにリング状に陽性所見を呈する神経細胞が多く認められた。

NPY 陽性の神経線維の出現は、NPY 神経細胞 (perikarya) の出現分布に一致する傾向を認めた。

2) GTPCH 含有神経細胞の分布

中脳は GTPCH 神経細胞の密度が最も高く、黒質を含む被蓋部に広範に分布していた。しかしその広がり、NPY とは異なり、被蓋部の背側部や中脳蓋には及んでいなかった。橋では、青斑核の出るレベルで、青斑核、被蓋中央部 (橋上中心核) に GTPCH 神経細胞が集族して認められた。さらに、内側毛帯に隣接した腹側の被蓋部を含む被蓋部全域に、多数の GTPCH 神経細胞を散在性に認めた。延髄では、異なるレベルを通じて一定した傾向があり、縫線核群と被蓋部の背内側から腹外側部にかけてハの字型に分布す

る2群が認められた。これらの神経細胞は、ほとんどがunipolarであった。これらより染色性は弱い、三叉神経脊髄路核、孤束核、楔状核においてもGTPCH陽性神経細胞が認められた。NPYと異なり、GTPCHは核周囲の胞体に局限しており、神経線維には認められなかった。

考察

1) 脳幹のNPYニューロンの分布について

本研究に用いた胎生25週のヒト胎児脳幹では、NPY神経細胞は被蓋部を中心に脳幹全長にわたって広範な分布を示していたが、最も密度が高いのは中脳、ついで延髄であった。延髄被蓋にNPY神経細胞が豊富に存在することについては、ラットやネコなどの実験動物[3,4,6]で報告がある。ヒトにおいてはHallidayらが平均72才の成人剖検例の4例を用いて延髄のNPY神経細胞の詳細な検討を行っている。それに依れば、延髄には1)腹外側被蓋部、2)背内側、3)楔状核や三叉神経の脊髄路核などの感覚神経系の中継核、4)吻側の縫線核の4群に大別できるとしている[4]。本研究でも、4)を除いては同定が可能で、この点はヒトの成人と胎児とでは本質的な差はないと

考えられた。一方、中脳のNPY神経細胞の存在については、Cromwellらがラットにおいて簡単に触れており、中脳水道の外側部、背側縫線核の背外側部、脚間核、下丘に認めたとの記載があるのみである[6]。しかし最近、Pauらはin situ hybridizationを用いて、NPYのmRNAのサル脳幹の分布を検討し、それまで報告のあった延髄被蓋や感覚神経の中継核のみならず、中脳の被蓋部に極めて豊富にNPYニューロンが認められることを報告した[7]。我々の得た所見は、ヒトにおいても中脳でのNPYの存在様式はサルと基本的には同一であることを強く示唆している。

NPYと他の神経伝達物質とのco-localizationについて、HallidayらはNPYは延髄では場所により異なる種々の程度でセロトニンやノルアドレナリンなどのアミンと神経細胞内でco-localizeしていること、更にnon-aminergicなNPY神経細胞も存在していることを報告した[4]。特に彼らが研究の対象とした延髄では、延髄上部のセロトニン神経細胞の約7割がNPYを含有すると報告している。我々が今回報告した胎児脳幹のNPY神経細胞の分布と、本研究で用いたのと同材料の検討得られたTH神経細胞[8]お

よびセロトニン神経細胞[9]の分布とを比較してみると、NPY 神経細胞はTHとセロトニン両者の分布領域とそれぞれ部分的に重複するが一致はしていない。その最も顕著に異なるのは、中脳被蓋と橋上部の被蓋部における分布であり、NPYの分布が後述するようにGTPCH 神経細胞の分布とも異なっている点と符合していると考えられる。

脳幹のNPYの機能については、まだ十分に解明されていない。Fedorらは、三叉神経脊髄路核から上行して橋のperibrachial areaに達するNPY投射系を明らかにし[11]、一方、Tzengらは延髄の腹外側のNPY神経細胞の脊髄中間外側核への投射経路を証明している[12]。これらの所見から、脳幹のNPYは少なくとも自律神経機能や感覚系の情報伝達に調節的に関与している可能性が高いと考えられる。最近、パーキンソン病やアルツハイマー病などの種々の変性疾患において髄液のNPYが減少することが報告された[13]。ヒトの脳幹のNPYの役割については、今後の臨床病理学的な検討により次第に明らかになることが期待される。

2) GTPCH ニューロンと陽性線維の分布について

GTPCH ニューロンの脳幹の分布については、未だヒトでの報告はなく本研究が最初と思われる。実験動物ではNagatsuらは、マウスの脳での分布を免疫組織化学を用いて検討し、中脳のventral tegmental area, 黒質緻密帯、青斑核、三叉神経脊髄路核、孤束核、area postrema, 延髄の縫線核群、延髄被蓋の腹外側に認めると報告した。GTPCHはチロシン水酸化酵素 (TH) およびセロトニン合成に関与するフェニルアラニン水酸化酵素のco-factorであるBH4合成の律速酵素であることから、その分布はTH陽性細胞とセロトニン陽性細胞の分布にまたがっていることが予想され、Nagatsuらの報告はこの推測を裏つけるものであるが、最近Dassesseらもラットの脳で免疫組織学的に大部分のセロトニン神経細胞とTH神経細胞がGTPCHを含有すると報告した[13]。今回の我々の検討はこの推測がヒト胎児にも当てはまることを強く示唆した。本研究で報告した胎児でのGTPCHの分布が、そのまま成人に当てはまるかについては更に今後の検討を要する。Nagatsuらは、新生児マウスの脳で一過性に出現するGTPCH陽性細胞の存在を報告している[14]。

結論

ヒト胎児脳幹における NPY 陽性神経細胞の分布は、実験動物における報告やヒト成人の延髄での報告と基本的に一致していたが、幾つかの新しい知見も得られた。NPY 神経細胞の密度は中脳で最も高く、被蓋部のみならず中脳蓋にも及んでいたが、この所見は以前の報告では実験動物で簡単に触れられているだけで、ヒトでは初めての報告と思われた。このような NPY 神経細胞の分布は、カテコラミン神経細胞やセロトニン神経細胞の文献的な分布とは脳幹の解剖学的な部位によってはそれぞれ重なりを示していたが、全体としての存在様式は異なると考えられた。さらに、GTPCH 含有神経細胞の分布をヒト脳幹で初めて報告した。その分布はアミン含有神経細胞 (aminergic neuron) の分布にほぼ一致しているが、NPY 神経細胞の分布とは明らかに異なっていた。

文献

- [1] Walter A, Mai JK, Jimenez-Hartel W. Mapping of neuro-peptide Y-like immuno-reactivity in the human forebrain. *Brain Research Bulletin* 24: 297-311, 1990
- [2] Brene S, Lindefors Nils, Kopp Jutta et al. Regional distribution of neuropeptide Y mRNA in post-mortem human brain. *Mol Brain Res* 6: 241-249, 1989
- [3] Sawchenko PE, Swanson LW, Grazanna R et al. Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 241: 138-153, 1985
- [4] Halliday GM, Li YW, Oliver JR et al. The distribution of neuro-peptide Y-like immunoreactive neurons in the human medulla oblongata. *Neuroscience* 26: 179-191, 1988
- [5] Nagatsu I, Ichinose H, Sakai M et al. Immunocytochemical localization of GTP cyclohydrolase I in the brain, adrenal gland, and liver of mice. *J Neural Trans* 102: 175-188, 1995
- [6] Crownwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, et al. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15: 1159-1181, 1985
- [7] Pau KY, Yu JH, Lee CJ, Spies HG.