

厚生省厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究

平成10年度研究報告

課題名『高齢者での神経ペプチドの役割』

高齢者での神経ペプチドの役割

主任研究者 満間照典 愛知医科大学第四内科 教授

神経ペプチドは高齢者の生体機能調節や高齢者に伴う疾患における病態生理に関与していることを認めた。さらに、本研究の結果より神経ペプチドの高齢者に伴う疾患の治療への応用の可能性が考えられた。

「研究組織」

- 満間照典（愛知医科大学第四内科教授）
- 矢内原昇（矢内原研究所所長）
- 松永宗雄（弘前大学医学部神経疾患研究施設臨床神経部門教授）
- 橋本浩三（高知医科大学第二内科教授）
- 永松正明（名古屋大学医学部神経内科講師）

A 研究目的

高齢者の生体機能調節や高齢者に伴う疾患の病態における神経ペプチドの役割を解明して、神経ペプチドのそれらの疾患への治療応用の可能性を追求することを目的とする。

B 研究方法

1. 高齢者の神経系における GDNF 受容体 (GDNFR) の発現を神経疾患を有さない剖検 5 例、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 剖検 10 例の末梢神経系（腰部後根神経節、胸部交感神経節、脊髄、座骨神経）、脳、その他の臓器（筋肉、心臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓、直腸、精巣）を剖検時に採取して RNA を抽出した。GDNFR 及び RET の mRNA の発現レベルを RT-PCR 法にて定量した。また、RET 抗体およびリン酸化特異的 RET 抗体を用いた免疫組織化学により、運動ニューロンの RET 蛋白とリン酸化 RET 蛋白の発現を検討した。2. 痴呆老人（21 例、平均 76.7 歳）及び地域在住後期老年者（28 例、平均 84.6 歳）、健常若年者（24 名、平均 28.5 歳）を対象に血中の corticotropin-releasing hormone (CRH), cortisol,

free-T4 を測定した。3. 人クロモグラニン A (CgA) の測定法の開発を試みた。抗体は合成人 CgA (344-374) を抗原としてウサギに感作して得た。標識抗原及び標準抗原としては合成人 CgA (344-374) を用いた。また、作成した抗体を用いて、短時間で CgA 測定可能な EIA 法の開発も試みた。4. 6-hydroxydopamine を右内側前脳束に投与してパーキンソン病モデルラットを作成した（単独破壊群）。さらに、5,7-dihydroxytryptamine を右側脳室内に投与してセロトニン (5-HT) ニューロンを破壊した（両者破壊群）。両群に L-DOPA を投与して線条体からのドーパミン (DA) 放出をマイクロダイアリシス法で測定して、セロトニンニューロンやドーパミンニューロンの破壊の線条体からのドーパミン放出に及ぼす影響を検討した。5. 加齢による発汗活動の変化を検討した。方法は環境温度 23C、相対湿度 40% のコントロールされた人工気候室内で、被験者は軽装、安静座位で前腕屈側での発汗量をカプセル換気法を用いて測定した。対照は健常者（49 名、21-86 歳）で calcitonin-gene-related peptide (CGRP), adrenomedullin (ADM) 投与の発汗活動への影響及びその加齢による変動を観察した。

C 研究結果

1. GDNFR, RET の神経系での発現

RET mRNA の発現は脊髄（前角運動ニューロン）、後根神経節、交感神経節などの末梢神経系、脳、直腸、精巣に見られたが、座骨神経と筋肉には認められなかった。

一方、GDNFR-alpha-mRNA は末梢神経系、脳、一般臓器、座骨神経、筋肉にもその発現が認められた。これらの発現は高齢者でも良く保たれていた。また、ALS 例の運動ニューロンに発現する RETmRNA は対照例に比べて発現レベルが増加しており、萎縮ニューロンで顕著であった。しかし、リン酸化ニューロフィラメント陽性、中心性融解あるいは Bunina 小体を有するニューロン群の RETmRNA の発現は対照と同様であった。さらに、GDNFR-alpha-mRNA の発現レベルは ALS と対照群で差はなかった。RET 蛋白およびリン酸化 RET 蛋白は ALS および対照例でいずれの運動ニューロンにも発現していたが、発現動態は個々のニューロンで異なっていた。

2. 痴呆老人および地域在住後期老年者の血中 CRH 濃度は痴呆老人 (D) で $5.1 \pm 1.5 \text{ pg/ml}$ で地域在住後期老年者 (A) 7.3 ± 2.7 に比して有意に低値であったが、健常若年者 (Y) の 6.2 ± 2.2 との間に差を認めなかった。血中コルチゾールは D 群 $11.9 \pm 3.2 \text{ } \mu\text{g/dl}$ で A 群の 8.0 ± 2.7 、Y 群の 7.3 ± 3.3 に比して有意に高値であった。free-T4 は D 群 1.1 ± 0.2 、A 群 1.1 ± 0.1 、Y 群 1.2 ± 0.1 といずれも正常範囲であったが、D 群及び A 群で Y 群より有意に低い値であった。

3. CgA 測定法の開発

合成人 CgA (344-374) ペプチドを抗原としてウサギに感作して特異性の高い抗体を得た。I-125-人 CgA (344-374) を標識抗原として、合成人 CgA (344-374) 標準抗原として RIA 法を確立した。さらに、この抗体を用いて、短時間 (5 時間以内) で測定可能な特異 EIA 系を開発した。これらの測定法で高齢者の内分泌腫瘍 (下垂体腫瘍、褐色細胞種、直腸カルチノイド、甲状腺髄様癌) の血漿 CgA 測定したところ、いずれの腫瘍でも、健常者の 2 - 3 倍の値であ

った。また、唾液中の CgA は各種精神的ストレスで顕著に上昇することを認めた。

4. パーキンソン病モデル動物の線条体からのドーパミン放出に及ぼすセロトニン系の影響を観察した。DA ニューロン単独破壊群では右線条体の DA 含量は $0.30 \pm 0.07 \text{ pmol/mg}$ と対照群に比して有意低下していたが、5-HT は $1.05 \pm 0.16 \text{ pmol/mg}$ と対照群と同様であった。DA, 5-HT ニューロンの両者破壊群では DA, 5-HT 含量はそれぞれ $0.30 \pm 0.10 \text{ pmol/mg}$ $0.05 \pm 0.01 \text{ pmol/mg}$ と対照群に比して有意に低値であった。L-DOPA 負荷後の DA ニューロン単独破壊群での細胞外 DA 量は投与 100 分後に最大 $242.5 \pm 42 \text{ fmol/sample}$ まで著明に増加した。両者破壊群では 125 分に最大 $39.2 \pm 9.2 \text{ fmol/sample}$ と上昇したが、単独破壊群より有意に低値であった。

5. CGRP, ADM 皮内投与の発汗反応に及ぼす影響とその加齢による変化 CGRP 単独皮内投与では発汗反応には変化はなかった。コリン作動性薬の methacholine (MCH) と同時投与すると MCH によるコリン作動性発汗反応を濃度依存性に促進させた。この CGRP によるコリン作動性発汗反応促進作用は CGRP $10 \mu\text{g/ml}$ で最大で MCH 単独の約 4.7 倍であった。この最大促進作用を示す CGRP 量を用いて加齢による変動を検討したところ、CGRP の発汗促進作用は加齢に伴って低下する傾向がみられた。また、ADM 単独投与では発汗反応に変動が見られなかった。しかし、MCH と ADM を同時に皮内に投与するとコリン作動性発汗反応を濃度依存性に促進させることを認めた。ADM の作用は ADM 100 ng/ml で最大で MCH 単独の約 2.8 倍であった。この量を用いて加齢による変動を検討したところ、高齢者のそれは若年者に比して有意に低値であった。

D 考察

今回の検討では GDNF 受容体の mRNA の発現は末梢神経系、脳及び一般臓器などにおいて特徴的分布を示し、高齢者でもよく保持されていることを認めた。さらに、ALS の脊髄運動ニューロンでの GDNF 受容体の発現は維持されていることを認めた。これらの成績は GDNF-RET 系が広範囲に存在して、神経変性に対する保護作用を担っていると考えられる。さらに、GDNF の臨床応用の可能性を示唆するものである。CRH は視床下部ばかりでなく、脳内の他の部位や膵臓、副腎などの末梢臓器に存在する。アルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆において髄液中の CRH が低下し、それは脳萎縮に由来することをすでに明らかにしている。今回は痴呆老人では地域在住後期老年者に比して血中 CRH は低値であることを認めた。この成績は髄液で見られた変化が血中でも認められることを示している。CRH は前述の如く末梢臓器にも存在するので、血中 CRH の起源は脳ばかりでなく末梢組織にも由来すると考えられる。今回の成績から脳萎縮に並行して末梢組織からの CRH 分泌低下も痴呆老人での血中 CRH の低下に関与している可能性が考えられた。加齢により hypothalamic-pituitary-adrenal gland axis の機能の変化はラットでは見られることが明らかにされているが、人ではあまり変化しないとされている。今回のコルチゾールが老年者と若年者で差が見られなかった成績はこの説を支持するものである。free-T4 は正常範囲であったが、痴呆老人では低い傾向であった。この意義は本研究の成績からのみでは明らかに出来ないのので今後の検討が必要である。CgA はニューロンや内分泌細胞に存在し、その分泌動態はノルエピネフリンやドーパミンの分泌を反映するとされている。従って、CgA の測定法を確立することは高齢者に伴う内分泌疾患や精神神経疾

患の病態を検討する上で重要な手段となる。今回特異的な抗体を作成して、人血中、唾液中の CgA を測定できる RIA 法と EIA 法を確立した。この方法を用いて測定した血中 CgA は高齢者内分泌腫瘍（下垂体腫瘍、褐色細胞種、甲状腺髄様癌）で高値を示した。唾液中の CgA は精神的ストレスで増加することを認めた。これらの成績はこの方法が有用であることを示している。パーキンソン病の病態を明らかにするため、パーキンソン病モデル動物の線条体からのドーパミンの放出に及ぼすセロトニン系の影響を観察した。セロトニン系の破壊は L-DOPA 由来のドーパミンの放出は低下することを認めた。この成績はセロトニン系がパーキンソン病モデル動物の線条体ドーパミンの放出に関与していることを示している。発汗反応は体温調節に重要な役割を担っており、加齢で変動が見られることが明らかにされている。これまで発汗調節神経は主にコリン作動性発汗活動が検討されてきた。一方汗腺周囲の神経終末に神経ペプチドが存在し、汗腺活動に関与していることが推定されている。今回これら神経ペプチドの内 CGRP ADM の発汗活動に及ぼす影響を検討したところ、二つの神経ペプチド単独では発汗活動に変化はなかった。しかし、両ペプチドはコリン作動性発汗活動を濃度依存性に促進する事を認めた。また、この促進作用は加齢で低下することを認めた。この成績は発汗調節にはコリン作動性神経活動ばかりでなく、ペプチド作動性神経活動も関与していることを示している。

E 結論

以上の成績から、神経ペプチドが高齢者の生体機能や高齢者に伴う各種疾患の病態生理に関与していることや一部の神経ペプチドの臨床応用の可能性が示唆された。

Role of neuropeptide in aged people

Terunori Mitsuma (4th Department of Internal Medicine, Aichi Medical University : Professor)

Noboru Yanaihara (Yanaihara Institute: Director)

Muneo Matunaga (Division of Clinical Neurology, Institute for Neurological diseases, Hirosaki University, School of Medicine: Professor)

Kouzou Hashimoto (2nd Department of Internal Medicine, Kouchi Medical School: Professor)

Masaki Nagamatu (Department of Neurology, Nagoya University, School of Medicine: Assistant Professor)

To investigate the physiological and pathophysiological role of neuropeptide in aged people the following studies were made. 1: expression of glia cell line-derived factor receptor (GDNFR) mRNA and RETmRNA in human organs. 2: production of antibody to human chromogranin A (CgA) and development of its radioimmunoassay and enzyme-immunoassay. 3: release of dopamine from the striatum in Parkinson's disease model animal which induced by injection of 6-hydroxydopamine were measured by microdialysis method. 4: corticotropin-releasing hormone (CRH), cortisol and free thyroxine (FT4) in plasma were measured by radioimmunoassay in aged patients with dementia. 5: effects of calcitonin gene related peptide (CGRP) and adrenomedullin (ADM) on sweating from the arm were investigated. The following results were obtained. 1: GDNFR-alpha mRNA was distributed in the peripheral neural system, brain and other organs (muscle, heart, liver, kidney, lung, spleen, colon, testis). In amyotrophic lateral sclerosis, expression of GDNFR-alpha mRNA was preserved in the motor neuron of spinal cord. Expression of GDNFR-alpha mRNA was not differ with aging. RETmRNA was present

in peripheral nervous system, brain, testis and colon but not in ischiatic nerve and muscle. 2: a specific antibody to human CgA was raised in New Zealand white rabbits. Using this antibody, specific radioimmunoassay and enzyme-immunoassay were established. Serum CgA levels were higher in aged patients with endocrine tumor (pituitary tumor, pheochromocytoma, rectal carcinoid, medullary thyroid cancer). Salivary levels of CgA were increased with psychological stress. 3. The dopamine contents decreased significantly in Parkinson's model rats (group A).

Combined with destruction of serotonergic neuron in Parkinson's rats (group B) induced decrease in dopamine contents in the striatum. The release of dopamine from the striatum was significantly lower in group B, compared with group A. 4. CGRP or ADM alone did not influence sweating activity. CGRP and ADM potentiated methacholine's action on sweating and these effects decreased with aging. From these findings, it could be concluded that neuropeptide play important physiological and pathophysiological role in aged people.

汗腺活動の加齢に伴う変化

主任研究者 満間照典 愛知医科大学第四内科 教授

協力者： 熊沢和彦、祖父江元

汗腺活動の加齢に伴う変化を検討した。methacholine (MCH)の発汗促進反応を calcitonin gene-related peptide (CGRP)が濃度依存性に加増させることを認めた。この CGRP の作用は加齢に伴って減少する傾向を認めた。adrenomedullin (ADM)は MCH の発汗促進反応を濃度依存性に増加させたが、その効果は加齢と共に低下した。

キーワード：汗腺活動、加齢 CGRP, Adrenomedullin

A 研究目的

汗腺活動は人の体温調節の上で重要な因子である。人エクリン腺はコリン作動性で、アセチルコリンにより発汗が促進される。一方、近年 calcitonin gene-related peptide (CGRP)などの神経ペプチドが汗腺周囲の神経終末に存在することが明らかにされている。そこで、本研究では CGRP, adrenomedullin (ADM)の発汗に及ぼす影響とその加齢による変動を検討した。

B 研究方法

健常者49名（21-86歳、男性21、女性28名）を対象とした。研究に際しては対象者に十分研究の内容を説明し、同意を得た後に実施した。発汗の測定は全て環境温度23℃、相対湿度40%にコントロールした人工気候室内において行った。被験者は軽装、安静座位にて前腕屈側の測定部位に断面積1.3cm²のプラスチック製のカプセルを装着し、乾燥窒素でカプセル内を換気して、その湿度変化を高感度静電容量湿度計を用いて経時的に測定し、ペンレコーダーに記録した。測定に用いたmethacholine (MCH), CGRP, ADMは生理的食塩水にて一定濃度に溶解した後総量0.1mlとして用いた。投与に際してはこれらの溶液のカプセル内への蒸発による影響

を除去するために、カプセル外から直接27ゲージ針を刺入し、カプセル内の皮内へ投与した。

C 研究結果

1. CGRPとMCH混合皮内投与後の発汗反応の加齢変化

CGRP単独投与では発汗反応に変化は見られなかった。コリン作動性のMCHと同時にCGRPを投与すると、MCHによるコリン作動性発汗反応を促進した。その作用はCGRP濃度依存性で、CGRPが10ug/mlで最大でMCH単独投与の約4.7倍であった。この最大促進作用を示すCGRP濃度で、このCGRP作用と加齢との関係を検討したところ、CGRPの発汗促進作用は加齢に伴って低下する傾向を示したが、統計学的には有意ではなかった。

2. ADMとMCH混合皮内投与後の発汗反応の加齢変化

ADM単独投与では発汗反応に変動は見られなかった。CGRP同様にMCHと同時にADM投与するとADM濃度依存性にコリン作動性発汗反応を促進した。その効果はADM100ng/mlで最大でMCH単独投与の約2.8倍であった。このADM濃度で若年者と高齢者における差異を観察したところ、ADMの発汗促進作用は高齢者で若年者に比して有意に低かった。

D 考察

加齢の人汗腺活動に及ぼす影響についてはこれまでコリン作動性発汗神経活動の変動が検討されてきた。能動汗腺数は加齢で変化しないとする報告もあるが、発汗量自体は加齢と共に低下すると報告されている。一方、近年、汗腺周囲の神経終末に各種の神経ペプチドが存在することが明らかにされ、これらのペプチド作動性神経活動が発汗調節に重要な役割を担っていると想定されている。今回検討した神経ペプチドの CGRP や ADM は強力に長時間持続する血管拡張作用を有することが知られている。これらの血管拡張性のペプチドが汗腺活動時になんらかの機序で分泌され、発汗促進させると共に汗腺周囲に分布する血管網にも作用して血流を増加させることにより生体機能調節に関与していると考えられる。従って、本研究の結果はペプチド作動性神経系の発汗調節が体温調節系の一端を担っていることを示している。一方、高齢者では体温調節脆弱になると考えられている。

老化に伴ってエクリン腺には神経系、血管系の形態的変化が起きることが知られているが、これに加えてペプチド陽性神経においてもさまざまな形態的変化が起こり、その結果汗腺に機能的変化が生じて汗腺活動に影響を及ぼすと考えられる。本研究ではコリン作動性神経を介する発汗反応を CGRP, ADM が促進することを認めた。また、両ペプチドの作用は加齢に伴って変化した。これらの成績は両ペプチドが加齢に伴う体温調節変動に関与していることを示唆している。

E 結論

CGRP, ADM はコリン作動性薬による発汗活動亢進を促進するが、その作用は加齢により低下することを認めた。

発表論文

1. T. Mitsuma, J. Takagi, K. Otake, M. Kayama,

Y. Mori, K. Adachi, T. Nogimori, J. Sakai, Y. Hirooka, Radioimmunoassay for aquaporin-2. *Endocrine Regul.* 32: 141-144, 1988.

2. T. Mitsuma, N. Rhue, G. Sobue, M. Li, S. Terao, M. Kayama, Y. Mori, J. Ping, K. Adachi, Y. Hirooka, T. Nogimori. Thyrotropin-releasing hormone and its receptor in the spinal cord of patients with x-linked recessive bulbospinal muscular atrophy: immunohistochemical study. *Med. Sci. Res.* 26: 525-529, 1998.

3. H. Kaneko, T. Mitsuma, H. Nagai, S. Mori, T. Iyo, K. Kusugai, Y. Tache, Central action of adrenomedullin to prevent ethanol-induced injury through vagal pathways in rats. *Am. J. Physiol.* 274: R1783-R1788, 1998.

4. T. Konagaya, K. Kusugami, H. Yamamoto, H. Kaneko, H. Nagai, T. Mitsuma, Effect of histamine on thyrotropin-releasing hormone and somatostatin secretion in rat stomach. *Hepato-gastroenterology* 45: 567-572, 1998.

5. T. Mitsuma, H. Kaneko, Y. Hirooka, S. Mori, Y. Mori, K. Adachi, S. Yamamoto, T. Hayakawa, C. Yamaguchi, M. Uruma, N. Rhue, J. Ping, T. Nogimori, In vitro effects of endothelin-1 on somatostatin and thyrotropin-releasing hormone release from the rat stomach. *Life Sci.* 62: 1007-1012, 1998.

6. K. Yamashita, H. Kaneko, S. Yamamoto, T. Konagaya, K. Kusugami, T. Mitsuma, Inhibitory effect of somatostatin on helicobacter pylori proliferation in vitro. *Gastroenterology* 115: 1123-1130, 1998.

7. S. Mori, H. Kaneko, T. Mitsuma, T. Hayakawa, C. Yamaguchi, M. Uruma, Implication of gastric topical bioactive peptides in ammonia-induced acute gastric mucosal lesions in rats. *Scand. J. Gastroent.* 33: 386-393, 1998.

8. T. Mitsuma, Y. Hirooka, M. Kayama, Y. Mori, K. Adachi, J. Takagi, T. Wago, J. Ping, T. Nogimori, Thyrotropin-releasing hormone and

somatostatin inhibit each others release in vitro in the rat retina. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106: 140-142, 1998.

9. T. Mitsuma, N. Rhue, Y. Hirooka, M. Kayama, t. Wago, Y. Mori, J. Takagi, K. Adachi, J. Ping, M. Ohtake, T. Nogimori, J. Sakai, Distribution of dopamine transporter in the rat: an immunohistochemical study. *Endocrine Regul.* 32: 71-75, 1998.

10. T. Mitsuma, N. Rhue, M. Kayama, K. Adachi, Y. Mori, T. Nogimori, J. Sakai, J. Ping, Y. Hirooka, Distribution of orphanin FQ in the rat-an immunohistochemical study. *Med. Sci. Res.* 26: 403-405, 1998.

ヒトクロモグラニンAに関する研究

研究者 矢内原 昇 矢内原研究所 所長

研究要旨

ヒトクロモグラニンA (CgA) に対する部位特異ラジオイムノアッセイ (RIA) 系を確立した。ヒト血漿、尿、唾液のCgA濃度の測定が可能であり、その血漿測定限界は1.80 fmol/tubeであった。腎不全患者、褐色細胞腫、甲状腺髄様癌、下垂体腺腫はいずれも正常値(0.31±0.05 pmol/mL)に比し、高値を示し、これら腫瘍のマーカーとして重要であることを明らかにした。さらに、唾液CgA値は、精神的ストレス時に高値を示し、ストレスマーカーとして、従来のコルチソール測定よりも有用であることを証明した。さらにヒトCgAの酵素イムノアッセイ(EIA)を開発することに成功した。

A. 研究目的

本研究は、合成ペプチドを用いて、新規・高感度のラットおよびヒトCgA測定系を開発し、血漿と唾液のCgAが高齢者の内分泌腫瘍および精神的ストレスのマーカーとして有用であることを明らかにすることを旨とする。

B. 研究方法

ヒトクロモグラニンA (CgA) に対する部位特異RIA系を確立するために、合成ペプチドを抗原に用い、ウサギ抗ヒトCgA(344-374)血清、¹²⁵I-ヒトCgA(344-374)を標識抗原、および合成ヒトCgA(344-374)を標準抗原として検討した。確立したRIA系を用い、高齢者の各種内分泌腫瘍の血漿CgAおよび精神的ストレス時における唾液CgAの測定を実施した。さらに、短時間(5時間以内)で測定可能なCgA特異EIA系の確立について検討した。

C. 研究結果

本研究により、高感度のCgA部位特異RIAを確立し、さらに簡便でしかも短時間で測定可能なEIAの確立に成功した。両測定系を用いて検討した結果、高齢者の内分泌腫瘍(下垂体腫瘍、褐色細胞腫、直腸カルチノイド、甲状腺髄様癌)患者の血漿CgA濃度がいずれも正常値(0.31±0.05 pmol/mL)に比し、2~3倍以上の高値を示すことが分かった。さらに、各種精神的ストレス負荷に対し、唾液CgA濃度が顕著に上昇することを明らかにした。また、その由来が顎下腺CgAの自律神経支配による可能性を強く示す結果が得られた。

D. 考察

本研究において、合成ペプチドを用いて確立したCgA部位特異RIAおよびEIAによって測定した各種内分泌腫瘍患者の血漿濃度が、いずれも正常人のそれよりも高値を示し、腫瘍マーカーとして血漿CgAが極めて優れていることを示した。一方、精神的ストレス負荷時における唾液CgA濃度の測定結果は、正常状態のCgA濃度よりも上昇し、精神的ストレスマーカーとして唾液CgAが有用であることを初めて明らかにした。従来、ストレスマーカーとして用いられてきたコルチソルやカテコラミンに比して、ストレス反応初期の精神的反応を特異的に示し、測定の容易さ、感度や反応性においても優れていることを実証した。本測定系は、高齢者の上述の疾患マーカーとして有用である。また、唾液CgAの由来をラットを用いて検討し、顎下腺特殊導管細胞に含まれるCgAが自律神経活動時に唾液中に分泌されてくることを示す実験結果も提示した。

E. 結論

本研究により確立したCgA部位特異RIA及びEIAは、血漿、尿および唾液中のCgA測定を可能にし、血漿CgAがカテコラミン含有腫瘍の腫瘍マーカーとして、一方、唾液CgAは精神的ストレス負荷時のストレスマーカーになりうることを初めて明らかにし、本研究のCgA部位特異RIAおよびEIAが極めて有用であることを証明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishikawa, Y., Nagasawa, S., Yanaihara, N., Iguchi, K., Mochizuki, T., Hoshino, M., Iwanaga, T., and Yanaihara, C. (1998) Immunoreactive chromogranin A in rat plasma and urine measured by region-specific radioimmunoassay. *Biomed. Res.* 19: 237—244.
2. Nishikawa, Y., Li, J., Futai, Y., Yanaihara, N., Iguchi, K., Mochizuki, T., Hoshino, M., and Yanaihara, C. (1998) Region-specific radioimmunoassay for human chromogranin A. *Biomed. Res.* 19: 245—251.
3. Yanaihara, N., Nishikawa, Y., Hoshino, M., Mochizuki, T., Iguchi, K., Nagasawa, S., Li, J., Futai, Y., Kanno, T., Yanaihara, H., Murai, M. and Yanaihara, C. (1998) Evaluation of region-specific radioimmunoassays for rat and human chromogranin A: measurement of immunoreactivity

in plasma, urine, and saliva. In: *The Adrenal Chromaffin Cell* edited by Kanno, T., Nakazato, Y. and Kumakura, K. pp. 305—313, Hokkaido Univ. Press, Sapporo.

4. Nagasawa, S., Nishikawa, Y., Li, J., Futai, Y., Kanno, T., Iguchi, K., Mochizuki, T., Hoshino, M., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. (1998) Simple enzyme immunoassay for the measurement of immunoreactive chromogranin A in human plasma, urine and saliva. *Biomed. Res.* 19: in press.
5. Nakane, H., Asami, O., Yamada, Y., Harada, T., Matsui, N., Kanno, T., Yanaihara, N. (1998) Salivary chromogranin A as an index of psychosomatic stress response. *Biomed. Res.* 19: in press
6. Kanno, T., Asada, N., Iwanaga, T., Nishikawa, Y., Hoshino, M. and Yanaihara, N. (1998) Autonomic control of mandibular chromogranin A secretion in the anaesthetized rat. *Biomed. Res.* 19: in press.

Parkinson病線条体での外来性L-DOPA
由来のドーパミン産生におけるセロトニ
ンニューロンの役割

松永宗雄（弘前大学脳神経疾患研究施設・教授）
田中洋康、神成一哉、前田哲也

ラットの内側前脳束に6-hydroxydopamineを注入してパーキンソン病モデルラットを作成し、同時に5,7-dihydroxytryptamineを側脳室内に注入してセロトニン系も破壊した群と非破壊群に外来性L-DOPAによるドーパミン放出動態をマイクロダイアリシスで検討した。L-DOPA投与後のドーパミン放出の増加量はセロトニン破壊群は非破壊群の約20%にとどまった。

キーワード：6-hydroxydopamine、5,7-dihydroxytryptanine
セロトニン、L-DOPA、ドーパミン放出

A. 研究目的

Parkinson病（PD）では、黒質線条体系のドーパミン（DA）ニューロンが脱落しているため線条体内のDAが不足しており、治療にはその前駆物質であるL-3,4-dihydroxyphenylalanine（L-DOPA）が有効である。投与されたL-DOPAは芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）によりDAに代謝されるが、それがPD線条体内のどの部位で行なわれているかは明らかにされていない。線条体では、AADCはDAニューロン以外にもセロトニン（5-HT）ニューロン、介在ニューロン、グリア細胞、血管内皮細胞などにも存在している。これまでの種々の検討から、PDでは外来性L-DOPAの線条体での主な代謝部位は5-HTニューロンであるとする説が最も有力と考えられるが、5-HTニューロンは無関係であるという意見もあり、結論が出ていない。今回その関与を明らかにする目的で、黒質線条体系DAニューロンのみ破壊したPDモデルラットと、DAニューロン破壊に加え5-HTニューロンを破壊したラットにL-DOPAを腹腔内投与し、線条体での細胞外DA量をin vivoマイクロダイアリシス法を用いて測定し、比較検討した。

B. 研究方法

1. ラット脳内への薬物注入

Wistar系雄性ラットを用いた。すべてのラットは12時間毎に明暗管理された動物実験施設内のケージに各々1-6匹ずつ入れて飼育管理した。ケージ内は行動制限せず、食餌は自由摂取とした。DAニューロンと5-HTニューロン両者破壊群には、DA神経毒の6-hydroxydopamine（8 mg/4 ml）を右内側前脳束に、5-HT神経毒の5,7-

dihydroxytryptamine (200 mg/10 ml) を右側脳室内に投与した。DAニューロン単独破壊群には6-hydroxydopamineを右内側前脳束に投与し、右側脳室内には溶媒 (0.1%アスコルビン酸含有生理食塩水) のみを投与した。対照群には、溶媒を右内側前脳束と右側脳室内に投与した。各群の個体数はn=6とした。

2. in vivo マイクロダイアリシス法

ラットの右線条体にマイクロダイアリシス用プローブ (半透膜部長3 mm) を留置した。24時間後人工髄液を2 ml/minの速度で灌流し、透析液を25分毎に回収して、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて細胞外DAとその代謝物を経時的に定量した。灌流は無麻酔無拘束の状態で行った。

3. 薬剤の投与

灌流開始約3時間後、末梢性AADC阻害剤であるbenserazide (50 mg/kg) を腹腔内投与した。30分後にL-DOPA (50 mg/kg) を腹腔内投与し、その後5時間の細胞外DA及びその代謝物量の変化を観察した。

4. 線条体組織中のDA, 5-HTとその代謝物の測定

薬剤によるニューロンの破壊の程度を確認するため、マイクロダイアリシス終了24時間後ラットを断頭し、線条体組織をホモジナイズして、組織内のDA, 5-HTとその代謝物の含有量をHPLCを用いて定量した。

C. 研究結果

1. 右線条体組織中のDA, 5-HTの含有量は対照群で 60.5 ± 8.27 pmol/mg, 0.92 ± 0.13 pmol/mgであった。DAニューロン単独破壊群では、DAは 0.30 ± 0.07 pmol/mgと対照群の0.05%に低下していたが、5-HTは 1.05 ± 0.16 pmol/mgと変化なかった。一方、両者破壊群では、DA, 5-HTの含有量はそれぞれ 0.30 ± 0.10 pmol/mg (対照群の0.05%), 0.05 ± 0.01 pmol/mg (対照群の5.4%) と両者とも著明に低下していた。

2. 病変を作成した両群では、細胞外DAの基礎量はいずれも著明に低下していた。DAニューロン単独破壊群では、L-DOPA投与100分後に最大 242.5 ± 42.0 fmol/sampleまで著明に増加した。これに対し、両者破壊群では125分後に最大 39.2 ± 9.2 fmol/sampleと上昇は単独破壊群に比べ有意に低かった。

3. L-DOPA投与後5時間の累積DA量は、単独破壊群では 1275.9 ± 214.0 fmolであったのに比べ、両者破壊群では 263.4 ± 54.9 fmolと79%の減少がみられた。

D. 考察

黒質線条体系のDAニューロンと5-HTニューロンの両者を破壊したラットでは、DAニューロン単独破壊群に比べ、線条体内での外来性L-DOPA由来細胞外DA量が著明に減少することが示された。これは、PD線条体では、5-HTニューロン終末内で外来性のL-DOPAの多くの部分がDAに代謝され放出されていることを示唆している。臨床面では、L-DOPAを用いたPD治療において、5-HTニューロンに作用する薬剤を併用投与することにより、線条体での外来性L-DOPA由来のDAの代謝放出を有効に調節する可能性が考えられる。

E. 結論

6-hydroxydopamineを注入して作成するパーキンソン病モデルラットに、同時

にセロトニン毒の5,7-dihydroxytryptamineを注入した群と単独破壊群における外来性L-DOPAによるドーパミン放出動態についてマイクロダイアリス法で検討した。L-DOPA投与後のドーパミン放出の増加量はセロトニン破壊群は非破壊群の約20%で、このことはパーキンソン病の治療上使用されるL-DOPAが、セロトニン系を介してドーパミンに代謝され、放出されていると解される。

F. 参考文献

- 1) Paulson G: Neurology 43:1296-97, 1993
- 2) Melamed E, Hefti F, Wurtman RJ: Ann Neurol 8:558-563, 1980
- 3) Mura A, Jackson D, Manley MS et al.: Brain Res 704: 51-60, 1995
- 4) Arai R, Karasawa N, Geffard M et al.: Neurosci Lett 195: 195-198, 1995
- 5) Melamed E, Hefti F, Liebman J et al.: Nature 283: 772-774, 1980
- 6) Abercrombie ED, Bonatz AE, Zigmond NJ: Brain Res 525: 36-44, 1990
- 7) Castaneda E, Whishaw IQ, Robinson TE: J Neurosci 10: 1847-54, 1990
- 8) Gershanik OS, Heikkila RE, Duvoisin RC: Neurology 29:553, 1979

G. 研究発表

1. 論文

- ① Maeda T, Kannari K, Matsunaga M, Suda T: Loss of regulation by dopamine D2 receptors of exogenous L-DOPA-derived dopamine release in the rats with dopaminergic denervated striatum. Brain Res 817 : 185-191, 1999.
- ② 神成一哉、前田哲也、松永宗雄、須田俊宏：片側黒質破壊ラットにおけるアポモルフィン誘発性回転運動の反対側脚橋核破壊による変化。脳と神経 50: 33-37, 1998.

2. 学会発表

- ① Tanaka H, Kannari K, Suda T, Matsunaga M : Effect of reserpine on dopamine release derived from exogenous L-DOPA in the striatum of hemiparkinsonian model rats. 5th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. 1998, New York, U.S.A.
- ② 富山誠彦、神成一哉、田中洋康、前田哲也、松永宗雄、Palacios JM、Mengos G: ヒト脳幹におけるAMPA受容体サブユニットmRNAの発現；ALSの選択的運動ニューロン変性との関連。第39回日本神経学会総会, 1998, 京都市
- ③ 神成一哉、田中洋康、須田俊宏、松永宗雄:パーキンソン病モデルラット線条体内での外来性L-DOPA由来の遊離可能ドーパミンの存在様式。第39回日本神経学会総会, 1998, 京都市

痴呆老人および地域在住後期老年者における血中 CRH 濃度の検討

橋本浩三 (高知医科大学第二内科教授)

西岡達矢, 三本智子, 浅羽宏一, 西山 充, 七宮和歌子,

金田伊史, 高尾俊弘 (高知医科大学第二内科)

松林公藏, 土居義典* (高知医科大学老年病科, *教授)

末丸修三(福山友愛病院)

加齢や痴呆老人における血中 Corticotropin-releasing hormone(CRH)と視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis)の変化との関連につき検討した。血中 CRH 濃度は痴呆老人で地域在住後期老年者に比し有意に低値であり, 原因として脳萎縮に伴う末梢血中への CRH 分泌の低下が示唆された。一方血中コルチゾールは痴呆老人において, 地域在住後期老年者および健常若年者に比し有意に高値であった。昨年我々は高齢ラットにおける海馬でのグルココルチコイドレセプター mRNA の発現の減少を報告しており, 今回の痴呆老人における血中コルチゾールの上昇も, 同様の原因に基づくグルココルチコイドのフィードバックの障害により HPA axis が亢進している可能性が考えられた。血中 CRH, コルチゾールは後期老年者と健常若年者の間に有意な差はなく, この点は加齢による HPA axis の変化がないとする過去の報告を支持する結果と考えられた。認知機能に影響を与える甲状腺機能を調べるため血中 free-T4 も測定したが, 各群の平均値はいずれも基準範囲内であり, 痴呆老人と地域在住後期老年者は健常若年者に比し低値であった。

キーワード: 痴呆老人, 地域在住後期老年者, 視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis), Corticotropin-releasing hormone(CRH), コルチゾール, 海馬, グルココルチコイドレセプター, free-T4

A. 研究目的

Corticotropin-releasing hormone(CRH)は下垂体副腎系の賦活のみならず神経ペプチドとして脳内で種々の生理活性を有しており, 覚醒作用や認知機能の維持作用もその一つである¹⁾。我々は, 以前より脳血管障害やアルツハイマー病などの痴呆老人における髄液中 CRH を測定し, 痴呆老人における脳内 CRH につき種々の検討を加えてきた^{2,3)}。

今回, 病院に入院中でケアを必要としている痴呆老人と, 地域に在住する老年者および健常若年者の血中 CRH, コルチゾールと free-T4 を測定し, 加齢や痴呆における血中 CRH と視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis) の変化との関連な

どについて検討を行った。

B. 研究方法

対象は福山友愛病院に入院中の痴呆老人 21 名 (男 7, 女 14; 平均年齢 76.7 歳, 以下 D 群)で, 対照は 75 歳以上の比較的健康的な地域在住後期老年者 28 名(男 13, 女 15; 平均年齢 84.6 歳, 以下 A 群) および健常若年者 24 名(男 9, 女 15; 平均年齢 28.5 歳, 以下 Y 群)である。

採血は午前 9 時から 12 時までの間に行ない, 血中 CRH は既報の RIA 法²⁾にて, コルチゾールは RIA キットを用いて, また free-T4 はキットを用いて MAB 法で測定した。

C. 研究結果

血中 CRH 濃度は D 群 5.1 ± 1.5 pg/ml で A

群 7.3 ± 2.7 に比し有意に低値 ($p < 0.005$) であったが、Y 群 6.2 ± 2.2 との間には有意な差を認めなかった。血中コルチゾールは、D 群 11.9 ± 3.2 $\mu\text{g/dl}$ で、A 群 8.0 ± 2.7 、Y 群 7.3 ± 3.3 に比し有意に高値 ($p < 0.0001$) であった。

各群の血中 free-T4 の平均値はいずれも基準範囲内 (D: 1.1 ± 0.2 , A: 1.1 ± 0.1 , Y: 1.2 ± 0.1 ng/dl) であったが、D 群及び A 群は Y 群に比し有意に低値 (各々 $p < 0.05$, $p < 0.001$) であった。

D. 考察

CRH は視床下部の室傍核、視索上核で主に産生され HPA axis の調節に重要な役割を担っているが、脳内の他の部位や膵臓、副腎など末梢臓器でも産生されていることが知られている^{4,5,6,7)}。我々の以前の老年痴呆における検討では、アルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆において非痴呆老年者と比較し髄液中 CRH 濃度は有意に低下していること²⁾や、重症の痴呆患者で軽症例に比較して髄液中 CRH 濃度は有意に低下していること³⁾を報告した。これらのことから髄液中 CRH は大脳皮質、扁桃核などの視床下部外の脳組織の CRH に由来し、脳萎縮などによるこれらの部位での CRH 産生の障害が重症痴呆患者での髄液中 CRH の低下の原因と考えられた。一方痴呆老人を対象として血中 CRH についても検討を行なっているが、髄液中 CRH と同様アルツハイマー型痴呆では脳血管性痴呆に比し、また、重症痴呆では軽症痴呆に比し血中 CRH はより低値であった²⁾。今回は痴呆老人患者をタイプ分けや重症度分類せず、入院していない地域在住後期老年者および健常若年者との比較という異なった視点からの検討である。その結果痴呆老人患者で地域在住後期老年者と比較し血中 CRH が有意に低値であった。今回の結果は髄液中 CRH の変化と同じであり、脳萎縮による脳全体の CRH 産生系の障害が血中 CRH にも反映されているためと考えられる。血中 CRH の起源は脳 CRH ばかりではなく末梢組織にも由来すると考えられていることより、脳萎縮に並行して末梢組織での神経終末からの CRH 分泌低下も痴呆老人での血中 CRH の低下に関与している可能性がある。最近末丸らは、夜間徘徊をする極めて重度の痴呆老人で、血中 ACTH、コルチゾールが非徘徊者の群に比較して有意に上昇してお

り、下垂体-副腎系の亢進が示唆されるという報告を行っているが、この原因として海馬などの脳グルココルチコイドレセプター (GR) の低下によるグルココルチコイドのフィードバックの障害を推定している^{2,8)}。昨年我々は動物実験においても高齢ラットでの海馬 GR mRNA の低下を報告している⁹⁾。今回の検討でも血中コルチゾールの有意な上昇がみられた。従って痴呆老人では HPA axis はやはり亢進しており、髄液中や血中 CRH と異なり視床下部 CRH はある程度保たれている可能性がある。

加齢による HPA axis の機能の変化についてはいくつかの研究があり、ラットでは加齢による血中コルチコステロンの増加や日内リズムの障害が認められるが、人ではあまり変化しないとする報告が多い¹⁰⁾。血中 ACTH は今回測定していないが、血中 CRH、コルチゾールの基礎値は後期老年者と健常若年者の間に有意な差はなく、この点は加齢による HPA axis の変化がないとする報告に合致する結果と考えられた。脳内および末梢 CRH は単なる加齢では変化は少ないが、痴呆という脳が広範な萎縮に陥った状態では減少することが明らかとなった。この減少がさらに痴呆の状態に悪影響を与えていることも推定されるため、痴呆では脳内の活性 CRH を増やすことも治療の一つになる可能性が示唆された。

一方甲状腺ホルモンは認知機能に影響を与えるため、特に痴呆患者について検討を行う際には甲状腺機能低下の有無に十分注意を払う必要がある。今回の検討においても加齢による影響を受けないとされる free-T4¹¹⁾ の測定を行ったが、認知機能に影響を与えるような機能低下はみられずその平均値は各群いずれも基準範囲内であった。統計学的には痴呆老人と後期老年者の間に有意な差はなかったが、両群とも健常若年者に比し有意に低値を示した。しかしこれが高齢者の認知機能の低下に於いてどの程度の意義を有するのかは不明である。

E. 結論

痴呆老人において地域在住後期老年者と比較し、血中 CRH の有意な低下と血中コルチゾールの有意な上昇を認めた。血中 CRH の低下は脳萎縮の関与が推定され、また血中コルチゾールの上昇は

海馬などの脳グルココルチコイドレセプターの低下によるフィードバックの障害に基づく視床下部-下垂体-副腎系の亢進によるものと考えられた。

F. 引用文献

- 1) 橋本浩三ほか: 図解ホルモンのすべて -分子生物学的観点から-, 医学の世界社, 東京: 4-20, 1998.
- 2) 橋本浩三ほか: 痴呆高齢者における corticotropin-releasing hormone (CRH) の役割に関する研究, 平成 8 年度 厚生省長寿科学総合研究事業研究報告書, 1996.
- 3) Suemaru S, et al: Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone and ACTH, and peripherally circulating choline-containing phospholipid in senile dementia, *Life Sciences*, 53: 697-706, 1993.
- 4) Swanson LW, et al: Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study, *Neuroendocrinology*, 36: 165-186, 1983.
- 5) Thompson RC, et al: Corticotropin-releasing factor : basic and clinical studies of a neuropeptide, CRC Press, Inc, Florida: 1-12, 1990.
- 6) Hashimoto K, et al: Corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the adrenal medulla, *Peptides*, 5: 707-711, 1984.
- 7) Petrusz P, et al: Corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the vertebrate endocrine pancreas, *Proc Natl Acad Sci*, 80: 1721-1725, 1983.
- 8) Suemaru S, et al: Severe dementia and pituitary-adrenal overactivity in elderly patients with nocturnal delirious wandering, abstract P133, The 4th International Congress of Neuroendocrinology, Kitakyushu, Japan, 1998.
- 9) 橋本浩三ほか: Lipopolysaccharide (LPS) 単回及び反復投与に対する各種ホルモン, サイトカイン反応性に及ぼす加齢の影響に対する研究, 平成 9 年度 厚生省長寿科学総合研究事業研究報

告書, 1997.

- 10) Seeman TE, et al: Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans, *Endocrine Reviews*, 15: 233-260, 1994.
- 11) Mariotti S, et al: Complex alteration of thyroid function in healthy centenarians, *J Clin Endocrinol Metab*, 77: 1130-1134, 1993.

高齢者の神経系におけるGDNF受容体の発現とその異常に関する研究

永松正明 (名大神経内科, 講師)

山本正彦, 瀧間典雅, 李めい (名大神経内科)

祖父江元 (名大神経内科, 教授)

非神経疾患の剖検例における末梢神経系 (腰部後根神経節, 胸部交感神経節, 腰髄, 坐骨神経), 脳 (前頭葉) および一般臓器 (筋肉, 心臓, 肝臓, 腎臓, 肺, 脾臓, 直腸, 精巣) のGDNF受容体mRNAの発現は特徴的な分布を示し, 他の哺乳類の分布と類似し高齢者でもよく保持されていた. 疾患例としてALSにおいて検討したが, 脊髄運動ニューロンでのGDNF受容体の発現は維持されていた. これらの結果は, GDNFの臨床応用に際してその有効性を考える上で基礎となるものと思われた.

キーワード: GDNF受容体, 発現分布, mRNA, リン酸化, ALS

A. 研究目的

GDNFは脊髄運動ニューロンや後根神経節細胞に対する強力な神経栄養因子の1つであり, 標的組織 (筋肉, 皮膚など) からの逆行性輸送により作用すると考えられている. RETとGDNFR- α がGDNFの機能的受容体を形成し, チロシンキナーゼ型受容体のRETのリン酸化によって細胞内にシグナルが伝達する. 従って, GDNF受容体の末梢神経系を中心とした各組織の発現分布を明らかにすることは, 神経系の障害における神経変性・再生の理解や治療への応用にとって重要と考えられる. さらに病態における変化として, 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄運動ニューロンにおけるRETの発現とリン酸化状態を検討した.

B. 研究方法

神経疾患を有さない剖検例5例 (男性3例, 女性2例, 61-85歳) とALS剖検例10例 (男性6例, 女性4例, 53-65歳) から, 剖検時, 末梢神経系 (腰部後根神経節, 胸部交感神経節, 脊髄, 坐骨神経), 脳 (前頭葉), 一般臓器 (筋肉, 心臓, 肝臓, 腎臓, 肺, 脾臓, 直腸, 精巣) を採取しRNAを抽出した.

GDNF受容体mRNAの発現レベルをRT-PCR法にて定量した. RT反応の後, PCRを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で行ないPCR産物をnon-denaturing polyacrylamide gelにて電気泳動した. mRNAレベルはBAS2000を用いて測定しcyclophilin mRNAに対する相対比として発現量を求めた. RT-PCR法における定量性はPCRのcycle数とtotal RNA量について解析し,

特異性についてはRT-PCR産物の制限酵素切断により得られる産物のサイズにより検討した。また、digoxigenin-labeled probeを用いてin situ hybridization (ISH)を行ないその局在を検討し、シグナルをCCD画像解析にて定量化した。さらにRET抗体およびリン酸化特異的RET抗体 (pTyr905, pTyr1062) を用いた免疫組織化学により、運動ニューロンのRET蛋白とリン酸化RET蛋白の発現を検討した。

C. 研究結果

RETmRNAの発現は脊髄、後根神経節、交感神経節などの末梢神経系と脳に、一般臓器では直腸、精巣に見られたが、坐骨神経と筋肉には認められなかった。一方、GDNFR- α mRNAは末梢神経系、一般臓器に広範囲に発現し、坐骨神経や筋肉にもみられた。

また脊髄では、RETmRNAは前角運動ニューロンに局在したが、GDNFR- α mRNAは後角の神経細胞やグリア細胞にも検出された。

ALS例については、運動ニューロンに発現するRETmRNAは、対照例に比べてALSで発現レベルが増加し、特に萎縮性ニューロンでより増加していた。しかし、リン酸化ニューロフィラメント陽性、中心性融解あるいはBunina小体を有するニューロン群のRETmRNAの発現はそれぞれ対照例と差異を認めなかった。さらに、ALSにおけるGDNFR- α mRNAの発現レベルは対照例と比べ著変がなかった。RET蛋白およびリン酸化RET蛋白はALSおよび対照例のいずれの運動ニューロンにも発現していたが、発現動態は個々の運動ニューロンによって差異がみられた。

D. 考察

非神経疾患については、RETmRNAは非常に特徴的な発現分布を示した。末梢神経系の他に腸管系、生殖器系でのGDNF-RET系の作用が推察される。脊髄運動ニューロンや後根神経節細胞にRETは存在し、標的組織（筋肉、坐骨神経）からのGDNFの逆行性輸送により作用すると考えられる。ニューロパチーやALSの初期では標的組織におけるGDNFmRNAの発現は増加し、神経細胞変性に対する保護作用と考えられる。

ALS例では、脊髄運動ニューロンにおけるGDNFの機能的受容体RETおよびGDNFR- α のmRNA発現を明らかにした。また、ALSの残存運動ニューロンでもGDNF受容体が見られ、萎縮性ニューロンではRETmRNAの発現が増加していた。RET蛋白はALSの残存運動ニューロンにおいても発現していた。今回作成したリン酸化特異的RET抗体 (pTyr905, pTyr1062) は175kDaのRETのリン酸化を特異的に認識し、Tyr1062はShc-Ras系との関係が深いことが知られている。これらの抗体によって、ALSの運動ニューロンが様々なパターンで染色された。この所見はALSでもリン酸化シグナルが伝達されていることを示唆しているが、リン酸化部位の特異性とその局在、運動ニューロン変性との関連などが今後の課題である。また、ALSではGDNFの発現は脊髄と筋肉で増加しており、運動ニューロン変性を内因性にrescueする方向にRETのシグナル伝達系が働いていると考えられる。

E. 結論

GDNF受容体は特徴的な発現分布を示した。ALSの変性運動ニューロンにもGDNF受容体のmRNA、蛋白、リン酸化蛋白の発現がみられ、今後の治療的観点から重要な所見と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sobue G, Yamamoto M et al. Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75, Trk, TrkB, and TrkC) in human peripheral neuropathies. *Neurochem. Res.* 23:821-829, 1998.

2) Yamamoto M, Li M et al. Expression of low-affinity neurotrophin receptor p75 in the peripheral nervous system of human neuropathies. *Acta Neuropathol.* 95:597-604, 1998.

3) Yamamoto M, Mitsuma N et al. Expression of GDNF and GDNFR- α mRNAs in human peripheral neuropathies. *Brain Res.* 809:175-181, 1998.

4) Mitsuma N, Yamamoto M et al. Expression of GDNF receptors (RET and GDNFR- α) mRNAs in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* in press

5) Yamamoto M, Mitsuma N et al. Expression of GDNF and GDNFR- α mRNAs in muscles of patients with motor neuron diseases. *Neurochem. Res.* in press

2. 学会発表

6) 瀧間典雅, 山本正彦他: 筋萎縮性側索硬化症におけるGDNFおよびGDNF受容体 mRNAsの発現. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998. 5

7) 山本正彦, 瀧間典雅他: 運動ニューロン疾患の筋組織におけるGDNFおよびGDNF受容体 mRNAsの発現. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998. 5

8) 山本正彦, 瀧間典雅他: 末梢神経障害におけるGDNFおよびGDNF受容体(RET, GDNFR- α) mRNAsの発現. 第39回日本神経学会総会, 京都, 1998. 5