

厚生科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業  
平成 11 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：培養細胞において PS の発現を蛋白および mRNA レベルで観察する系を構築し、ヒトグリオブラストーマ細胞で過酸化水素負荷により PS1 蛋白の増加が認められることを明らかにした。これを *in vitro* の実験系に移すことを目標にラット中枢神経系での免疫組織化学を行い、PS1 のフラグメントが小脳プルキンエ細胞に強く発現していることを明らかにした。また蛍光三重染色法を開発し、タウ蛋白は AD や DNIC では明瞭な線維構造をとっているが、CBD やピック嗜銀球では線維構造に乏しく、その沈着様式は疾患により多様であることを明らかにした。今後 PS やタウの発現を広く観察し、その作用や相互関係についてさらに検討を続けていく。

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）

における PS 蛋白の局在を免疫組織に同定し、実験動物で虚血負荷などに伴う PS 発現の変化を *in vivo* で観察をする準備を行った。

一方虚血負荷では PS ばかりでなくタウの様々なエピトープが神経細胞やグリア細胞に発現することを明らかにしてきたが、神経原線維変化の出現には PS の intronic polymorphism が影響を与えることを平成 9 年度の本研究で我々は明らかにしている。アルツハイマー病(AD)の病態に深く関連するこれらの分子の発現と相互関係を観察することで、その病態を明らかにすることが、期待される。これらの分子の発現沈着機構を剖検脳で観察するため、タウ陽性細胞の線維形

A.研究目的

正常脳では神経細胞に発現して、細胞死や生存に関わるとされるプレセニリン(PS)の発現は、脳梗塞虚血巣のグリア細胞で上昇することを昨年度の本研究であきらかにした。そこで PS 発現の細胞レベルでの調節機構を明らかにすることを目的に本年度は培養細胞にストレスをかけ PS の発現を観察する系を確立することを目指した。また、ラット脳に

成性を蛍光色素 Thiazin Red と免疫染色を組み合わせる方法でさらに多くの疾患で検討した。これらの所見と前述の *in vitro* の発現実験とあわせて包括的な病態の解析につながると考え、本研究を継続した。

## B.研究方法

### 1.培養細胞におけるプレセニリン蛋白の発現

ヒトグリア系細胞株(KNS43)と神経系細胞株(GOTO)を異なった濃度の過酸化水素(最終濃度 10-6400mM)に暴露し、暴露前、4、24 及び 48 時間後に採取し PS1 の N 末端に対する抗体(NTF) または loop 部分に対する抗体(loop) を用いて Western blot を行った。

**2.RT-PCR法による PS1mRNA の定量法：**1 の培養細胞より抽出した RNA を competitor RNA と共に RT-PCR で増幅し、定量的に検討する系を確立した。

**3. タウ蛋白沈着の多様性の検討**  
タウ蛋白が神経細胞内に沈着する各種の神経変性疾患の剖検脳を用いて抗 PHF モノクローナル抗体(AT8)-FITC と TR による 2 重染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で両者の局在とその関係を観察した。必要に応じ、抗 ubiquitin 抗体を加えた 3 重染色や Gallyas 染色との比較も試みた。

**4.実験動物における PS 蛋白の局在**  
成熟ラット中枢神経系を様々な固定法、抗体、発色増感法にて免疫染色し、その

局在を観察した。

## 研究結果

1.KNS 細胞を 6400mM の過酸化水素に暴露すると。PS-NTF に対応する 30kDa のバンドが暴露後 4 時間でより明瞭になった。

2. KNS43 細胞と GOTO 細胞には定常状態において、それぞれ約 300 atto モルと 800 atto モルの PS1 mRNA が存在することが確認できた。

3.タウ陽性神経細胞は AD と DNTC では TR や Gallyas 染色陽性で線維構造を有するが、Pick 嗜銀球は TR や Gallyas 陽性像に乏しく CBD では Gallyas 陽性だが、TR に対する親和性に乏しかった。さらに ubiquitin を加えた三重免疫染色法を確立した。

4.ラットアルコール固定脳を biotinylated tyramide を用いて増感した場合に小脳プルキンエ細胞を中心に PS 様免疫活性を同定できた。

## D.考察

高濃度の過酸化水素の暴露により PS1 のフラグメントが細胞内により多く存在するようになるという本年度の研究結果は、虚血刺激によりグリア細胞に PS の免疫活性がより顕著にみられるという剖検脳における昨年度の観察と対応している。細胞レベルで PS の発現を観察できればその制御に関与する因子を同定して、治療法の開発につながる情

報を、この実験系を用いてえることが期待される。そのためにはタンパクと同時に mRNA の発現を観察する必要があり、我々はこの両者を *in vitro* で観察する系を確立した。さまざまなストレスの質や量の違いによる PS 発現の違いをこの系で観察する一方、実験動物を用いて *in vivo* でのストレス負荷をかけた時に PS の発現がどの様に変化するか、また細胞死や生存にどのような影響を与えるかを観察することが今後の課題となる。その第一歩として PS タンパクの局在を明らかにすべく実験動物での検討を続けてきたが、アルコール固定標本に biotinylated tyramide による増感を行えば明瞭な免疫活性が得られることを明らかにすることができた。今後細胞レベルでの検討と並行して、*in vivo* でも虚血等のストレス負荷を加えることを予定しており、今後細胞レベルから実験動物、さらには剖検脳に至る包括的な所見を得ることで、より real な情報を治療に結びつく形で得ることが期待される。また平成 9 年度の本研究班で PS の intronic polymorphism が神経原線維変化の出現に影響を与えることを報告した。タウと PS が相互作用をするという報告も散見されるが、*in vivo* での互いの影響についてはこれまで報告はない。我々は、平成 9 年度に Bodian 染色との対比で、平成 10 年度には ThiazinRed を用いた蛍光 2 重染色法により、おもに Alzheimer 病と Corticobasal degeneration を比較してきた。前者にくらべ後者では Bodian 染色や TR に対する親和性に乏しく、タウタンパクの沈着がいずれも線維形成性

に乏しいことを反映していると考えられる。平成 11 年度はさらに疾患対象を拡げ、Pick 嗜銀球や Diffuse neurofibrillary tangles with calcificationなどを対象に検索を進めた。AD と DNIC のタウ陽性神経細胞は何れも TR 陽性であり、線維形成が明瞭である。一方 Pick 嗜銀球は TR の親和性に乏しい点で CBD と共通しているが Gallyas 染色で良く染まる CBD とは異なり、明らかな Gallyas 陽性像をとることは少なかった。

さらにタウ免疫染色と TR に加え、さらにもう一つ別のエピトープを観察する 3 重蛍光染色法を確立した。タウ陽性構造物の線維形成性の多寡を TR によって区別した上で、それぞれに共存するエピトープが同一切片上で観察できる新たな手法である。今回 ubiquitin エピトープが線維構造を持つタウ沈着に親和性を有することを明らかにできたが、今後他の疾患や ubiquitin 以外のエピトープの関与を観察していく予定である。PS もタウも AD ばかりでなく、様々な疾患に関与する重要な分子であるが、その相互関係を含め、今後の検討課題は多い。本研究班は剖検脳の所見を様々な疾患同士で比較する一方、その着想に基づいて細胞レベルでの系を構築し、さらに *in vivo* の動物実験へ還元することで包括的な所見を治療に結びつく形で得ることを目標として運営を行ってきた。今後さらにこれらの蓄積に基づき、研究を発展させていく予定である。

## E.結論

これまで、脳虚血の剖検脳にてPSやタウタンパクのエピトープが様々な細胞に発現沈着していることを報告したが、本年度は培養細胞においてPSの発現をタンパクおよびmRNAレベルで観察する系を構築し、ヒトグリオブラストーマ細胞で過酸化水素負荷によりPS1タンパクの増加が認められることを明らかにした。これを*in vitro*の実験系に移すことを目標にラット中枢神経系での免疫組織化学を行い、PS1のフラグメントが小脳プルキンエ細胞に強く発現していることを明らかにした。また蛍光三重染色法によりタウタンパクはADやDNTCでは明瞭な線維構造をとっているが、CBDやピック嗜銀球では線維構造に乏しく、その沈着様式は疾患により多様であることを明らかにした。今後PSやタウの発現を剖検脳から細胞レベ

ルにわたって広く観察し、その作用や相互関係についてさらに検討を続けていく。

## 研究協力者

Paul E Fraser (Univ. of Toronto)

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)

池田研二 (東京都精神医学総合研究所神経病理)

山崎峰雄 (初石病院内科)

森 修 (日本医大第二病理)

三條伸夫 (埼玉県総合リハビリテーションセンター)

山脇正永 (東京医科歯科大学神経内科)

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：プレセニリンの N 端およびループ部分に対する抗体を用いて、ラット小脳を免疫染色した。アルコールによる環流固定に biotinylated tyramide を用いた増感法を組み合わせ、小脳プルキンエ細胞とその周囲に免疫活性を認めた。また線維構造に親和性を有する色素 Thiazin red(TR)を用いてタウ蛋白沈着様式を解析し、Alzheimer 病や Diffuse neurofibrillary tangles with calcification ではタウ陽性神経細胞は TR にも陽性で線維構造を有するが、Corticobasal degeneration や Pick 病では TR 親和性や線維構造に乏しく、タウ沈着様式は疾患によって異なることを示した。さらに TR を含む蛍光三重染色法を開発し、タウ蛋白の線維形成に関与するエピトープを検索する手法を確立した。

研究目的

1. プレセニリン (PS) は正常脳で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、本研究では昨年度まで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。この所見は細胞のおかれた環境や刺激によって PS の発現は変化することを示唆しており、その細胞レベルでの PS の発現制御機構を明らかにするとともに、in vivo のどのような条件でその発現に変化がみられるかを観察することができれば、その意味づけをより明確にすることができる。もし PS が細胞死や生存に関与するとすると発生段階においても PS の発現に変化があるのではないかと、この着想のもとに、本年度は免疫組織化学的に PS の局在を実験動物で同定する

ことを目標に研究を続けた。

2. 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する一方、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。平成 10 年度には線維構造に親和性を有する色素 Thiazin Red (TR) を用いてより簡単に線維形成性の多寡を観察する方法を開発したが、本年度は疾患のスペクトラムを拡大すると共に、TR を含む三重蛍光染色法を開発し、線維形成に関連するエピトープの同定法を確立した。

B. 研究方法

1. Wistar 系成熟ラットを 4% paraformaldehyde または 5% 酢酸アルコ

ールで環流固定し、中枢神経系をパラフィン包埋した。抗体はヒト PS1 の N 端 (NFT) と loop 領域(loop)に対する合成ペプチドを家兎に免疫し、IgG 分画を用いた。通常の ABC 法と biotinylated tyramide による増感法を行い比較した。

2. Alzheimer 病(AD)4 例、Corticobasal degeneration(CBD)6 例、Diffuse neurofibrillary tangles with calcification(DNTC)3 例、Pick 病(PD)4 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または海馬歯状回(PDに限る)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 法を行い、同一神経細胞の嗜銀性をさらに比較した。

また AD 脳海馬を用い、AT8 と抗 ubiquitin 抗体による二重染色を行った後、さらに TR を用いて三重染色を行い同様に観察した。

### C. 研究結果

1. paraformaldehyde 固定標本を通常の ABC 法で染色しても観察できない PS 様免疫活性が、アルコール固定標本に biotinylated tyramide による増感法を用いることで観察できるようになった。小脳プルキンエ細胞に PS 様免疫活性は認められたが loop、NTF 部分でその局在は異なる。すなわち Loop 部分はプルキンエ細胞の細胞体を中心に分布しているが、NTF 部分はプルキンエ細胞を取

りまく神経突起に沿って分布しており、細胞体内の染色には乏しい。

2. タウ陽性神経細胞は AD と DNTC では TR や Gallyas 染色陽性で線維構造を有するが、Pick 嗜銀球は TR や Gallyas 陽性像に乏しく CBD では Gallyas 陽性だが、TR に対する親和性に乏しかった。TR, ubiquitin, タウの三重免疫染色では明らかな線維構造を持つ神経原線維変化は TR, ubiquitin の両者に陽性であるが、線維構造の明瞭でない神経細胞が海馬では認められ、TR, ubiquitin とともに陰性であった。

### D. 考察

1. 実験動物での PS 蛋白の局在を信頼できる方法で同定できれば、その発生過程や病的変化にともないその発現の変化とそれを変化させる状況が同定できるとの着想に基づき、本研究の開始の平成 9 年度より、さまざまな抗体や固定法を試みてきた。平成 7 年度から共同研究を継続しているトロント大学 Paul Fraser 博士を本研究事業により主任研究者の研究室に本年度は招聘し、トロント大学にて作成された PS1 の NTF と loop 部分に対する抗体を用いて免疫染色を行った。アルコール固定に増感法を組み合わせると陽成像が得られたがこの抗体は PS1 のが processing を受けて形成される 30kDa の N 末端フラグメント、15kDa の C 末端フラグメントを特異的にウエスタンブロット上で認識し、その動態を検索するのに適している。今回の検討で loop 部分が細胞質に、NTF が主に周囲の

突起に存在し、小脳に発現が豊富とされる PS もその局在が切断されたフラグメントにより異なる可能性が示唆された。PS の局在については報告によって差異があり、抗体の特異性や固定法の影響などが大きいことを反映していると思われる。今回、固定法、発色法、抗体などについての条件を決定できたため、今後は異なった発生段階での PS のフラグメントの動態を発生過程における系統だった大量の細胞死との関連で観察することを計画している。また平成 10 年度に報告した脳虚血に伴う PS 発現上昇についても、今後齧齒類脳を用いて虚血実験を行えばその動態を *in vivo* で明らかにすることができる。

2. タウ陽性細胞の線維形成性については、平成 9 年度に Bodian 染色との対比で、平成 10 年度には ThiazinRed を用いた蛍光 2 重染色法により、おもに Alzheimer 病と Corticobasal degeneration を比較してきた。前者にくらべ後者では Bodian 染色や TR に対する親和性に乏しく、いずれも線維形成性に乏しいことを反映していることを反映していると考えられる。平成 11 年度はさらに疾患対象を拡げ、Pick 嗜銀球や Diffuse neurofibrillary tangles with calcification など、タウ陽性神経細胞を有するが AD や CBD とは異なる疾患を対象に検索を進めた。AD と DNTC のタウ陽性神経細胞は何れも TR 陽性であり、線維形成が明瞭である。一方 Pick 嗜銀球は TR の親和性に乏しい点で CBD と共通しているが Gallyas 染色で良く染まる CBD とは異なり、明

らかな Gallyas 陽性像をとることは少なかった。

AD や DNTC でみられる明瞭な線維構造が CBD や Pick 病では乏しいとすると、それを促進する要素が AD や DNTC で存在するのか、逆に CBD や Pick 病でそれを阻害する要素が働いているのかいずれかの可能性が考えられる。その要素を同定するためにタウ免疫染色と TR に加え、さらにもう一つ別のエピトープを観察する 3 重蛍光染色法を確立した。タウ陽性構造物の線維形成性の多寡を TR によって区別した上で、それぞれに共存するエピトープが同一切片上で観察できるわけである。今回 ubiquitin エピトープの線維構造との関連を観察できたが、海馬のタウ陽性細胞で線維形成に乏しい (TR 陰性の) pretangloneurons では ubiquitin が共存しておらず、ubiquitin が共存している細胞では線維形成も豊富 (TR 陽性) であった。Ubiquitin の存在と線維形成との時間的前後関係は推測の域をでないが、この手法をもちいることにより、沈着様式の違いに基づいて、共存する分子の違いがあることが形態的に比較的容易に観察できる。今後部位や疾患による違いに注目して、タウ蛋白の沈着とその沈着様式の違いに関与する因子を同定し、これらを制御している因子を通して治療法の開発に寄与する情報を提供していきたい。

## E. 結論

小脳に発現の多いとされる PS の蛋白の局在が成熟ラットの小脳プルキンエ細



胞に豊富なことを免疫組織化学的にあきらかにした。ウエスタンブロットで30kDaのN端フラグメントを認識する、NFT抗体では細胞周囲の神経突起が、15kDaのC端フラグメントを認識するloop抗体では細胞体を中心に免疫活性が認められ、フラグメントによりその局在が異なる可能性がある。

またタウ陽性神経細胞の線維形成性はADとDNTCで顕著だがCBDやPick病では乏しく、疾患によりタウの沈着様式は異なる。線維形成性の多寡とそれに共存するエピトープを観察できればそのことを目標にタウ、TRにさらにもう一つ別のエピトープを観察できる3重蛍光染色法を開発し今後線維構造に関連するエピトープの同定を目指す。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O, Tau-positive neurons in corticobasal degeneration and Alzheimer disease. - Distinction by Thiazin Red and silver impregnations-. *Acta Neuropathol.*, (in press)
- Yokota T, Uchihara T, Kumagai J, Shiojiri T, Pang J-J, Arita M...., Mizusawa H., A postmortem study of ataxia with retinitis pigmentosa by mutation of a-tocopherol transfer protein gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, (in press)
- Colle M-A, Hauw J-J, Crespeau F, Uchihara T, Akiyama H, Checler F et al., Vascular and parenchymal A $\beta$  deposition in the aging dog: correlation with behavior. *Neurobiol. Aging*, (in press)
- Toru S, Murakoshi T, Ishikawa K, Saegusa H, Fujigasaki H, Uchihara T ...Mizusawa H. et al., Spinocerebellar ataxia type 6 mutation causes dysfunction of P-type calcium channel. *J. Biol. Chem.*, (in press)
- Koyano, S., Uchihara, T., Fujigasaki, H., Nakamura, A. Yagishita, S. Iwabuchi, K. Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci Lett* (1999) 273:117-120.
- Koyano, S., Uchihara, T., Fujigasaki, H., Nakamura, A. Yagishita, S. Iwabuchi, K. Neuronal intranuclear inclusions in SCA2 [Letter]. *Ann Neurol* (in press)
- Takahashi, J., Fukuda, T., Tanaka, J., Minamitani M., Fujigasaki, H., Uchihara, T. Neuronal intranuclear hyaline inclusions disease with polyglutamine immunoreactive inclusions. (in press) *Acta Neuropathol*
- Iwabuchi, K., Tsuchiya, K., Uchihara, T., Yagishita, S. Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations (1999) *Rev Neurol*, 155, 255-70,
- Wada, M., Uchihara, T., Nakamura, A., Oyanagi, K. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis on Guam: a histochemical and ultrastructural investigation (1999) *Acta Neuropathol*, 98, 150-6.
- Miake, H., Tsuchiya, K., Nakamura, A., Ikeda, K., Levesque, L., Fraser, P.E., St.-George Hyslop, P.H., Mizusawa, H., Uchihara, T., Glial expression of presenilin epitopes in human brain with cerebral infarction and in astrocytoma (1999) *Acta Neuropathol*, 98:337-340
- Uchihara, T., Microglia, their relation to A $\beta$  deposits and apolipoprotein E (1999) 61-67. in Vellas, B and Fitten, JL ed Research and practice in Alzheimer's disease in 1999. SERDI, Auzeville-Tolosane.
- Ishida, K., Mitoma, H., Song, S.-Y., Uchihara, T., Inaba, A., Eguchi, A., Mizusawa, H., Kobayashi, T., Selective suppression of cerebellar

GABAergic transmission by an autoantibody to glutamic acid decarboxylase (1999) *Ann. Neurol.* 46:62-67

内原俊記、ピック病の病理像、(1999) *神経内科*, 50,342-8.

内原俊記、Alzheimer 病-tau 蛋白異常の観点から-(1999) *脳の科学*, 21,727-35.

## 2. 学会発表

藤ヶ崎浩人、内原俊記、中村綾子、児矢野繁、岩淵潔、柳下三郎、巻淵隆夫、石川欽也、田邊勉、水澤英洋、Machado-Joseph 病原因遺伝子翻訳産物 ataxin-3 の細胞内局在、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜 (1999, 6.5)

中村綾子、土谷邦秋、山崎峰雄、池田研二、内原俊記、Tau-2 免疫染色の界面活性剤による影響—脳梗塞とアルツハイマー病の比較—、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜 (1999, 6.5)

児矢野繁、長友秀樹、渋谷克彦、岩淵潔、柳下三郎、内原俊記、藤ヶ崎浩人、遺伝子産物 ataxin-2 の脳内および細胞内分布の検討、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜 (1999, 6.5)

内原俊記、中村綾子、山崎峰雄、森修、タウ陽性神経細胞の線維形成 Thiazin Red と蛍光免疫二重染色による CBD の特徴、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜 (1999, 6.3)

土谷邦秋、内原俊記、宮崎弘、織田辰郎、小澤英輔、羽賀千恵、近藤ひろみ、

入谷修司、池田研二、松下正明、痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症の基底核病変分布：7 剖検例の神経病理学的研究、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜 (1999, 6.3)

三明裕知、水澤英洋、中村綾子、池田研二、土谷邦秋、内原俊記、グリア細胞における presenilin の発現—脳梗塞および脳腫瘍における免疫組織化学的検討—、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜 (1999, 6.4)

内原俊記、中村綾子、山崎峰雄、森修、タウ陽性神経細胞の線維形成 Thiazin Red と蛍光免疫二重染色による CBD の特徴、第40回日本神経学会総会、東京 (1999, 5.19)

Uchihara, T., Charles Duyckaerts., Jean-Jacques Hauw., アルツハイマー病の進行と ApoE の沈着—老人斑の免疫組織化学的所見と知能障害との相関—、第96回日本内科学会講演会、東京 (1999, 3.31)

藤ヶ崎浩人、内原俊記、児矢野繁、岩淵潔、巻淵隆夫、石川欽也、水澤英洋、田邊勉、中枢神経系における ataxin-3 の局在に関する検討、第40回日本神経学会総会、東京 (1999, 5.19)

三明裕知、水澤英洋、土谷邦秋、池田研二、内原俊記、グリアにおける presenilin の発現—脳梗塞および脳腫瘍における免疫組織化学的検討—、第40回日本神経学会総会、東京 (1999, 5.20)

児矢野繁、長友秀樹、岩淵潔、柳下三郎、

内原俊記、中村綾子、藤ヶ崎浩人、  
Spinocerebellar ataxia 2(SCA2)の  
臨床病理 (ubiquitin 染色による病理  
組織学的特徴) , 第 40 回日本神経学  
会総会 , 東京 (1999 , 5.19 )

内原俊記、土谷邦秋、中村綾子、近藤ひ  
ろみ、森修、山崎峰雄、池田研二 , タ  
ウ陽性神経細胞の線維形成性  
Thiazin Red と蛍光二重染色による  
検討 , 第 18 回日本痴呆学会 , 熊本  
(1999 , 10.7 )

内原俊記 , Apolipoprotein E と老人斑 ,  
平成 11 年度高齢者の医学医療に関  
する研究発表会 , 東京 (1999 ,  
7.5 )

研究協力者

Paul E Fraser (Univ. of Toronto)

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)

池田研二 (東京都精神医学総合研究所神  
経病理)

山崎峰雄 (初石病院内科)

森 修 (日本医大第二病理)

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

分担研究者 水澤英洋 東京医科歯科大学神経内科教授  
(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳機能病態学)

研究要旨：脳梗塞脳においてプレセニリン(PS)の発現がグリア細胞で顕著にみられることを報告したが、その細胞レベルでの機序を明らかにするためにヒトグリア系細胞株(KNS43)と神経系細胞株(GOTO)を酸化ストレスに暴露し、PS1 の発現をウエスタンブロットにて経時的に検索した。KNS43 細胞では高い濃度の過酸化水素暴露後四時間で、PS1 の N 端フラグメント(30kDa)の発現が上昇しており、脳梗塞巣におけるグリア細胞での PS の発現上昇に対応している可能性がある。さらに早い時相で PS の mRNA の発現が上昇している可能性を念頭に、定量的 RT-PCR 法による定量法を確立した。今後、本実験系において PS の動態と細胞死の関係をあきらかにしていく。

A.研究目的

昨年度の本研究事業において脳梗塞巣周辺のグリア細胞にプレセニリン(PS)の発現が上昇していることを、ヒト剖検脳を用いて免疫組織化学的に明らかにした。虚血というストレスが細胞内のメカニズムを通して、PS の発現を上昇させており、かつ PS が細胞の生存や細胞死に関与しているとする、その発現を制御することで、細胞の生存維持を支える治療的手法が見いだされることが期待される。本年度は PS の細胞レベルでの発現を培養細胞で確認し、それ発現の変化を酸化ストレス暴露の前後で経時的に観察した。PS 発現を細胞レベルで制御する因子の同定を通じて、治療法の開発に資する情報を提供することを最

終的な目標とする。

B.研究方法

1.培養細胞におけるプレセニリン蛋白の発現

ヒトグリア系細胞株(KNS43)と神経系細胞株(GOTO)をそれぞれ

DMEM+10%FBS, RPMI1630+20%FBS で subconfluent まで培養した。FBS を含まない培地に交換した直後、異なった濃度の過酸化水素(最終濃度 10-6400mM)に暴露し、暴露前、4、24 及び 48 時間後に TCS により固定後採取し、sonicate した後凍結保存した。

上記の検体を SDS gel 上に電気泳動で展開し、PVDF 膜に転写後ヒト PS1 の N 末端に対する抗体(NTF) または loop 部

分に対する抗体(loop) を用いて probe し ECL 法により可視化した。

2. RT-PCR 法による PS1 mRNA の定量法  
ヒト PS1 遺伝子より PCR 増幅に適当な 421bp の領域を選び、RT-PCR で増幅した後、制限酵素処理をして中央部の 145bp が欠損した dsDNA を作成した。これを挿入した PCR II ベクターを大腸菌へ導入し、産生した RNA を competitor として回収し濃度を確認した。そして、過酸化水素に暴露した KNS43 細胞と GOTO 細胞より抽出した RNA と competitor を同一容器内で同時に RT-PCR を行い、両者の PCR 産物が等量になる点を解析することにより PS1 mRNA を定量した。

### C. 研究結果

1. KNS 細胞を比較的高濃度 6400mM の過酸化水素に暴露すると。NTF により probe される 30kDa のバンドが暴露後 4 時間でより明瞭になった。GOTO 細胞における PS1 発現の変化は明瞭でなかった。過酸化水素の濃度の違いによる PS 発現の違いについては検討中である。

2. KNS43 細胞と GOTO 細胞には定常状態において、それぞれ約 300 atto モルと 800 atto モルの PS1 mRNA が存在することが確認できた。現在、この解析系を用いて過酸化水素暴露後の mRNA の量の変化を解析している。

### D. 考察

KNS 細胞はヒトグリオーマ由来の細胞

株であり、NTF によって probe される 30kDa のフラグメントは PS が生理的な cleavage を受けて作られる N 末端 30kDa のフラグメントに対応していると考えられる。高濃度の過酸化水素の暴露により PS1 のフラグメントが細胞内により多く存在するようになることは、虚血刺激によりグリア細胞に PS の免疫活性がより顕著にみられるという平成 10 年度の我々の研究結果と対応している可能性がある。これまで同様の検討を別の抗体を用いて行ってきたが、平成 11 年度は本研究事業の一環として、平成 7 年度より共同研究が進行している Toronto 大学より、Paul Fraser 博士を本研究グループの研究室へ招聘し、上記の NTF および loop に対する抗体の供与を受けるなどの共同研究が進んだことにより、安定した結果を得ることができた。

PS の蓄積は PS の産生が細胞内で亢進しているのか、あるいは比較的速いとされるその代謝過程に変化があり、分解が遅延しているのかこれまでの検討のみでは区別できない。そこで我々は PS1 の産生の指標となる PS1 mRNA の発現を定量的に観察することを企て、定量的 RT-PCR 法による系を確立した。酸化ストレス暴露後の PS 蛋白と mRNA の量的変化を関連づけて観察することで、その代謝過程を詳細に検討することができる。今後細胞の種類や刺激の程度を変化させて観察を続ける必要がある。

もし暴露後 4 時間までに蛋白の発現が亢進しているとする mRNA の発現上昇はより早い時相で起こっていることが予想され、比較的早い細胞レベルの反

応が PS の発現についてはおこっている可能性が示唆される。PS が神経細胞死や生存維持に関連しているとする、細胞がストレスに暴露された場合比較的急性期に PS の発現変化がおこり、これらの現象に関与していることが予想される。これまでの観察では細胞死や細胞生存を定量的に観察してはいないが、今後細胞死や生存細胞を定量化しつつ PS の発現との関連を観察することを予定している。

我々の実験系は培養細胞における PS の変化を変化させる外的因子を同定できるとともに、PS 発現を変化させている細胞内のメカニズムを検索する機会を与えてくれる。今後細胞死や細胞の生存維持との関連で PS の役割を明確にし、治療法の開発につながる所見を得るために有用な系であると考えられ、さらに検討を続けていく予定である。

## E. 結論

ヒトグリア系細胞株(KNS43)では高い濃度の過酸化水素暴露後四時間で、PS1 の N 端フラグメント(30kDa)の発現が上昇しており、脳梗塞巣におけるグリア細胞での PS の発現上昇に対応している可能性がある。さらに早い時相で PS の mRNA の発現が上昇している可能性を念頭に、定量的 RT-PCR 法による定量法を確立した。今後、本実験系において PS の動態と細胞死の関係をあきらかにしていく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- .Sodeyama N, Ishida K, Jaeckle KA, Zhang L, Azuma A, Yamada M, Mizusawa H, Wada Y., Pattern of epitopic reactivity of the anti-Hu antibody on HuD with and without paraneoplastic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, (1999)66, (97-9.)
- .Kanda T, Iwasaki T, Nakamura S, Ueki A, Kurokawa T, Ikeda K, Mizusawa H, FGF-9 is an autocrine/paracrine neurotrophic substance for spinal motoneurons. *Int J Dev Neurosci*, (1999)17, (191-200.)
- Ishikawa K, Fujigasaki H, Saegusa H, Ohwada K, Fujita T, Iwamoto H, Mizusawa H., Abundant expression and cytoplasmic aggregations of [alpha]1A voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Hum Mol Genet*, (1999)8, (1185-93.)
- Orimo S, Ozawa E, Nakade S, Sugimoto T, Mizusawa H, (123)I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, (1999)67, (189-94.)
- Yoshizawa T, Fujita T, Mizusawa H, Shoji S, L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine enhances the orthostatic responses of plasma renin activity and angiotensin II in multiple system atrophy. *J Neurol*, (1999)246, (193-7.)
- Tsunemi T, Yokota T, Kikyo H, Yamamoto M, Yamada M, Kobayashi T, Mizusawa H., Nonsystemic vasculitic neuropathy presenting with truncal segmental sensory disturbance and hyperhidrosis [letter]. *Muscle Nerve*, (1999)22, (646-7.)

Ishikawa K, Watanabe M, Yoshizawa K, Fujita T, Iwamoto H, Yoshizawa T... Mizusawa H, Clinical, neuropathological, and molecular study in two families with spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). J Neurol Neurosurg Psychiatry, (1999)67, (86-9.)

## 2.学会発表

藤ヶ崎浩人、内原俊記、中村綾子、児矢野繁、岩淵潔、柳下三郎、巻淵隆夫、石川欽也、田邊勉、水澤英洋、Machado-Joseph 病原因遺伝子翻訳産物 ataxin-3 の細胞内局在、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜 (1999, 6.5)

三明裕知、水澤英洋、中村綾子、池田研二、土谷邦秋、内原俊記、グリア細胞における presenilin の発現—脳梗塞および脳腫瘍における免疫組織化学的検討—、第40回日本神経病理学会総会学術研究会、横浜

(1999, 6.4)

藤ヶ崎浩人、内原俊記、児矢野繁、岩淵潔、巻淵隆夫、石川欽也、水澤英洋、田邊勉、中枢神経系における ataxin-3 の局在に関する検討、第40回日本神経学会総会、東京 (1999, 5.19)

三明裕知、水澤英洋、土谷邦秋、池田研二、内原俊記、グリアにおける presenilin の発現—脳梗塞および脳腫瘍における免疫組織化学的検討—、第40回日本神経学会総会、東京 (1999, 5.20)

## 研究協力者

Paul E Fraser (Univ. of Toronto)

土谷邦秋 (都立松沢病院検査科)

池田研二 (東京都精神医学総合研究所神経病理)

三條伸夫 (埼玉県総合リハビリテーションセンター)

山脇正永 (東京医科歯科大学神経内科)