

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による
酸化ストレス病態の解明

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：水 澤 英 洋

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明
水澤英洋

II. 分担研究報告

1. α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明：電気
生理学的・分子生物学的研究
横田隆徳

2. α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明：分子
生物学的・生化学的研究
新井由洋

3. α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明：神経
病理学的研究
内原俊記

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明に関する研究

主任研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院教授

研究要旨： α -tocopherol(α TTP) ノックアウトマウスにおける酸化ストレス病態の解明するために 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) の修飾タンパクの同定を行ない、その1つが SOD1 であることを明らかにし、 α TTP ノックアウトマウスと Sweden 型変異 APP トランスジェニックマウスや G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスとの掛け合わせを開始した。ビタミン E 欠乏が寿命や神経系にどのように影響を与えるかを検討するために必要な多数の α TTP ノックアウトマウスの作出を開始するとともに、このマウスの病理学的検索をさらに進め副腎髄質へのリポフスチン様顆粒の沈着を見出した。また、酸化ストレス下の培養細胞や脳虚血巣で apolipoprotein E (ApoE) 蛋白の発現亢進を明らかにした。ビタミン E の詳細な機能を明らかにするためにビタミン E 欠乏および過剰状態で変動する遺伝子をマイクロアレイ法にて網羅的に解析し、新たな遺伝子発現の変動を発見した。

分担研究者

横田 隆徳 東京医科歯科大学医学部講師
新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科教授
内原 俊記 東京都神経総合研究所神経病理
副参事研究員

A. 研究目的

- 1) α TTP ノックアウトマウスにおける酸化ストレス病態を解明するために HNE の修飾タンパクを同定するとともに、各種神経変性疾患の病態解明のため α TTP ノックアウトマウスと Sweden 型変異 APP トランスジェニックマウスや G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスとの掛け合わせを行う。
- 2) 酸化ストレスが老化・変性・発癌等に及ぼす影響を明らかにするために多数の α TTP ノックアウトマウスを作出し解析するとともに、酸化ストレス病態の実験的解析も行う。
- 3) ビタミン E の抗酸化作用を含む詳細な機能を明らかにするために α -TTP ノックアウトマウスを用いて、ビタミン E 欠乏時および過剰投与時に変動する遺伝子群を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) マウス脳のタンパクを抽出してイムノプロット法により野生型とノックアウトマウスで HNE 修飾の程度に差があるタンパクを同定した。 α TTP ノックアウトマウス、Sweden 型変異 APP トランスジェニックマウスと G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスを B6/C57J にもどし交配後掛け合わせた。

2) α TTP ノックアウトの精子と C57/JB6 の野生型雌(α TTP+/-) の卵で体外受精をし、まず α TTP+/-の個体群を、次いでノックアウトマウスを作出し観察した。

既存の α TTP ノックアウトマウスの病理学的検索を進め、ヒト neuroblastoma 由来の培養 GOTO 細胞の過酸化水素による酸化ストレスに対する反応を検討しヒト脳の脳梗塞巣と比較した。

3) 対照の C57 BL/6J Jc1 系雄マウスと α -TTP ノックアウトマウスをビタミン E 欠乏および過剰食で飼育し、血液、脳、肝臓の RNA を抽出した。Affymetrix 社の GeneChip® を用いたマイクロアレイ法により発現遺伝子の解析を行った。

本研究は、平成 12 年度に厚生省の遺伝子研究の指針に基づいて発足した新しい倫理委員会において承認されており、遺伝子試料の管理など倫理面への配慮は十分になされている。また、動物実験は本学の規定にもとづき動物実験委員会の承認を得ており、動物愛護の観点から十分に配慮した研究を行っている。

C. 研究結果

- 1) NE により高度に修飾されているタンパクの1つは Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) と判明した。動物モデルではそれぞれのマウスの B6/C57J へのもどし交配を完了し、 α TTP ノックアウトマウスと G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスの掛け合わせを開始し、G93A SOD1 と α TTP-/-のダブルヘテロマウスを作出、運動機能や繁殖機能の解析も行っている。

2) 多数の α TTP ノックアウトマウスの作出のため種々の条件を検討しプロトコールを作成、業者を選択し業務委託を行い、体外受精に着手した。 α TTP ノックアウトマウスの病理学的検索では副腎にリポフスチン様顆粒が蓄積し、肝臓でもその傾向がみられた。培養 GOTO 細胞では過酸化水素への暴露によって ApoE 蛋白の発現が増加し、ヒト脳梗塞巣でも astrocyte や microglia に加え神経細胞にも明らかな ApoE 様免疫活性が認められた。

3) ビタミン E により大きく up regulation するものとして脳では oxytocin-neurophysin I を含む 12 遺伝子、肝臓では CYP4A14 や CYP7B1 を含む 7 遺伝子を同定した。酸化ストレス関連遺伝子群への影響としては erythropoietin やラジカル捕捉能をもつ metallothionein の発現が増加していた。エネルギー代謝関連遺伝子群への影響としてはグルコース 6 リン酸の mRNA が減少し解糖系に係わる酵素の mRNA は増加することが判明した。

D. 考察

α -tocopherol 欠乏による酸化ストレスの結果として HNE 修飾が亢進し、 α -tocopherol の投与により有意に減少することを報告したが、今回 HNE 修飾を受けている物質が Cu/Zn SOD1 であることが判明した。HNE は脂質過酸化の代謝産物であるだけでなく酸化ストレスの際に強力に細胞障害性に働くこともわかっていることから、HNE 修飾を受けて SOD1 機能が障害されてさらに酸化ストレスが強まる機序が想定される。

ビタミン E の欠乏が寿命など個体に及ぼす影響を長期に渉って詳細に観察するためには α TTP ノックアウトマウスを 100 個体以上確保する必要がある。既に着手した体外受精で雌雄それぞれ約 180 匹以上の +/- 個体が得られる予定である。これらを相互に自然交配するか、雌から再び採卵して -/ - 雄より得た精子と体外受精することによって必要数のノックアウト個体を得ることを今後予定している。 α TTP マウスの副腎に沈着していたリポフスチン顆粒は消耗性顆粒ともよばれ、分裂して再生することがないまま長期間に渡って機能し続ける神経細胞や筋細胞等に時間経過と共に蓄積しやすいことが知られている。今回検索したマウスの全身臓器のうち、副腎と肝臓にはリポフスチン顆粒が沈着しており、その蓄積量はビタミン E の摂取量と α TTP 遺伝子の両者に依存していることを明らかにした。これは既に発表した脊髄前角におけるリポフスチン顆粒沈着量の解析と合致しており、局所レベルでの酸化ストレスの結果と考えられる。細胞レベルでの酸化ストレスについては培養細胞とヒト虚血脳を用いて酸化ストレスが ApoE の発現を促進していることと、それがグリア細胞のみならず神経細胞でも生じている可能性を示唆した。神経細胞の発生や再生に係わっている可能性がある。

今回のプローブアレイでは約 12000 種の遺伝子を解析し、 α -TTP ノックアウトマウス脳においてビタミン E により誘導される遺伝子として oxytocin や angiotensinogen など主なものだけでも 12 種類も同定することができた。循環系において相互に拮抗する作用を有するこれらの分子の発現が亢進していたことはビタミン E が複数の血圧調節因子の発現を制御し血管ホメオスタシスに関与している可能性を示唆している。これは α -TTP の抗酸化作用以外の作用を示すものであり重要な知見である。metallothionein 欠損マウスでは、酸化ストレスによる障害が増大しエネルギー産生を抑制することが報告されているが、ビタミン E 欠乏状態にした α -TTP ノックアウトマウスにおいてはビタミン E を過剰投与した時と比較して酸化障害も誘導されずエネルギー代謝にも大きな影響を与えないことが推定された。また、 α -TTP が存在する正常なマウスにおいては、ビタミン E 過剰投与により metallothionein 発現が誘導され、TG を基質とするエネルギー代謝が亢進することが推察され、metallothionein がエネルギー代謝に関与するというこれまでの報告と一致し、metallothionein 欠損時にみられるエネルギー代謝の抑制は酸化障害により誘導されるものでないことが推察される。したがって、metallothionein の上流には α -TTP が位置しビタミン E レベルによって下流のエネルギー代謝を制御する可能性が示唆された。

E. 結論

α TTP ノックアウトマウスでは SOD1 が HNE の修飾を受けその機能が障害されてさらに酸化ストレスが強まる機序が想定された。また、ビタミン E 欠乏が寿命や神経系にどのように影響を与えるかを検討するために、 α TTP ノックアウトマウスを多数作出する作業を開始した。病理学的検索では副腎髓質にリポフスチン様顆粒が沈着することを見出し、酸化ストレスにて培養細胞とヒト脳において ApoE の発現が亢進することを明らかにした。さらに、DNA マイクロアレイ法を使用しビタミン E により制御される遺伝子の網羅的な解析を行った結果、 α -TTP ノックアウトマウスの脳においては、ビタミン E 欠乏状態と比較してビタミン E を過剰に投与すると下垂体後葉ホルモンである oxytocin が誘導されることが判明し、ビタミン E が血管ホメオスタシスに関与する可能性を見出した。この機能はビタミン E の新規の超抗酸化作用を示す生理作用として大いに期待される。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Andria T, Urushidani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, Mizusawa H. siRNA-based Inhibition Specific for Mutant SOD1 with Single Nucleotide Alternation in Mammalian Cells, Compared with Ribozyme and DNA Enzyme. *J Biol Chem* (in revision)
- Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y. Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke*. (in press)
- Nagaoka U, Uchihara T, Iwabuchi K, Konno H, Tobita M, Funata N, Yagishita S, Kato T. Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear inclusions of SCA1 brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (in press)
- Shibuya K, Uchihara T, Nakamura A, Ishiyama M, Yamaoka K, Yagishita S, Iwabuchi K, Kosaka K. Reversible conformational change of tau-2 epitope exposed to detergent in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol*. (in press)
- Owada, K., Uchihara, T., Ishida, K., Mizusawa, H., Watabiki, S., Tsuchiya, K. Motor weakness and cerebellar ataxia in Sjogren syndrome-identification of antineuronal antibody: a case report. *J Neurol Sci* 2002; 197:79-84
- Tsuchiya, K., Ikeda, K., Mimura, M., Takahashi, M., Miyazaki, H., Anno, M., Shiotsu, H., Akabane, H., Niizato, K., Uchihara, T., Tominaga, I., Nakano, I. Constant involvement of the Betz cells and pyramidal tract in amyotrophic lateral sclerosis with dementia: a clinicopathological study of eight autopsy cases. *Acta Neuropathol* 2002; 104:249-259
- Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Kuroiwa, Y., Uchihara, T. Paradoxical absence of nuclear inclusion in cerebellar Purkinje cells of hereditary ataxias linked to CAG expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73:450-452
- Sakamoto, M., Uchihara, T., Hayashi, M., Nakamura, A., Kikuchi, E., Mizutani, T., Mizusawa, H., Hirai, S. Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Exp Neurol* 2002; 177:88-94
- Kumada, S., Uchihara, T., Hayashi, M., Nakamura, A., Kikuchi, E., Mizutani, T., Oda, M. Promyelocytic leukemia protein is redistributed during the formation of intranuclear inclusions independent of polyglutamine expansion: an immunohistochemical study on Marinesco bodies. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002; 61:984-991
- Uchihara, T., Iwabuchi, K., Funata, N., Yagishita, S. Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates-A morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol* 2002; 178:124-128
- Uchihara T, Tanaka J, Funata N, Arai K, Hattori T. Influences of intranuclear inclusion on nuclear size-a morphometric study on pontine neurons of neuronal intranuclear inclusion disease cases. *Acta Neuropathol* 2003; 105:103-108
- D.E.Kaempf-Rotzoll, K.Igarashi, J.Aoki, K.Jishage, H.Suzuki, H.Tamai, O.Linderkamp, H. Arai. a-Tocopherol transfer protein is expressed specifically at the implantation site of pregnant mouse uterus. *Biol. Reprod.* 67, 599-604 (2002)
- D.E.Kaempf-Rotzoll, M.Horiguchi, K.Hashiguchi, J.Aoki, H.Tamai, O.Linderkamp, H.Arai. Human placental trophoblast cells express a-tocopherol transfer protein. *Placenta* (2003) in press
- D.E.Kaempf-Rotzoll, M.G.Traber, H.Arai. Vitamin E and transfer proteins. *Current Opinions in Lipidology* (2003) in press
- 横田隆徳, 水澤英洋: α -tocopherol 転移タンパク遺伝子欠損マウスにおける遅発性運動失調症. *Clinical Neuroscience* 21(2): 177-179, 2003
- 横田隆徳: α -tocopherol 転移タンパク遺伝子変異による Friedreich 型運動失調症 (AVED) の発症機序. *神経内科* 57(2) : 130-137, 2002

2. 学会発表

横田隆徳、日野太郎、斉藤友紀、多比良和誠、水澤英洋。siRNA を用いた変異 SOD1 による筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療—Ribozyme や DNA enzyme との比較—第 43 回日本神経学会総会、2002 年 5 月、札幌

内原俊記、中村綾子、新井哲明、池田研二、土谷邦秋、界面活性剤による tau2 エピトープの可逆的変化、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2002, 5.16)

渋谷克彦、内原俊記、中村綾子、石山宮子、山岡恵子、柳下三郎、岩淵潔、小阪憲司、多系統萎縮症のグリア細胞体内封入体における tau2 免疫染色の界面活性剤による影響、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16)

内原俊記、岩淵潔、船田信顕、柳下三郎、CAG repeat 病における核内封入体の役割—SCA2, SCA3, DRPLA 橋核神経細胞における定量的検討—、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2002, 5.16)

坂本昌己、内原俊記、中村綾子、水谷俊雄、水澤英洋、Thiazin Red を用いた Glial cytoplasmic inclusion の線維形成状態の検討、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16)

中村綾子、内原俊記、中山宏、有馬邦正、森啓、水嶋節雄、同種一次抗体を用いた免疫(CARD9 二重染色の試み—cotton wool plaque 内外の Abeta40, Abeta42 エピトープの観察、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 143]

児矢野繁、内原俊記、岩淵潔、柳下三郎、宋時栄、田岡万悟、ラット脳における ataxin-1 結合蛋白 LANP の局在の再検討、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 171]

高橋純子、藤ヶ崎浩人、内原俊記、岩淵潔、田中順一、El-Hachimi, K. A., Bruni, A., Trottier, Y., de The, H., Hauw, J.-J., Duyckaerts, C., Brice, A., ポリグルタミン病における核内封入体形成過程、特に PML との関係、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2002, 5.17) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 237]

馬原孝彦、内原俊記、土谷邦秋、池田研二、平野朝雄、加藤信介、岩本とし、高崎優、向井清、Alzheimer 病および Parkinson-dementia complex on Guam 例の海馬歯状回顆粒細胞における神経原線維変化の免疫組織化学的研究、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2002, 5.17) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 237]

岩淵潔、内原俊記、柳下三郎、岩田誠、Duyckaerts, C., Hauw, J.-J., サルベトリエール病院に現存する最も古い Marie 病の剖検例と Machado-Joseph 病の比較、

第 43 回日本神経学会総会 (2002, 5.29)

青木和子、内原俊記、中村綾子、池田研二、土谷邦秋、若山吉弘、脳梗塞巣における Aquaporin4 の発現、第 43 回日本神経学会総会 (2002, 5.29)

内原俊記、岩淵潔、船田信顕、柳下三郎、神経細胞変性におよぼす核内封入体の影響—ヒト剖検脳における定量的検討—、第 43 回日本神経学会総会、札幌市 (2002, 5.30)

長岡詩子、内原俊記、岩淵潔、柳下三郎、今野秀彦、船田信顕、加藤丈夫、神経細胞の大きさへの核内封入体の影響—SCA1 剖検脳における定量的検討—、第 43 回日本神経学会総会、札幌市 (2002, 5.31)

児矢野繁、黒岩義之、内原俊記、岩淵潔、柳下三郎、遺伝性脊髄小脳変性症の小脳における病理学的特徴(polyglutamine 蛋白の分布)、第 43 回日本神経学会総会 (2002, 5.31)

小林高義、内原俊記、大橋健一、桜庭均、Sialidosis type I 剖検脳の組織化学的、電顕的研究、第 43 回日本神経学会総会 (2002, 5.31)

内原俊記、多重染色の限界と共焦点顕微鏡への応用、第 72 回関東臨床神経病理懇話会 特別講演、東京医科歯科大学 (2002, 7.27)

馬原孝彦、木内章裕、金谷潔史、岩本俊彦、高崎優、内原俊記、土谷邦秋、伊藤昭三、Alzheimer 病脳の神経原線維変化における 14-3-3 の免疫組織化学的検討、第 44 回日本老年医学会学術集会 (2002, 6.12)

馬原孝彦、清水聡一郎、岩本俊彦、高崎優、内原俊記、土谷邦秋、平野朝雄、Alzheimer 病脳海馬歯状回顆粒細胞層における神経原線維変化の免疫組織化学的検討—Parkinsonism-dementia complex of Guam 例との対比を含めて—、第 44 回日本老年医学会学術集会 (2002, 6.12)

内原俊記、Fraser, P., 中村綾子、St. George-Hyslop, P., ラット小脳形成過程におけるプレセニン 1 発現の変化、第 21 回日本痴呆学会 (2002, 10.3)

青木和子、内原俊記、中村綾子、小森隆司、新井信隆、水谷俊雄、Balloon neuron における apolipoproteinE の発現—脳梗塞と変性疾患の違い—、第 21 回日本痴呆学会、(2002, 10.4)

土谷邦秋、新里和弘、新井哲明、羽賀千恵、内原俊記、松下正明、池田研二、痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS-D) は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の一亜系である：8 剖検例の錐体路症状・上位運動ニューロン障害の臨床病理相関、第 21 回日本痴呆学会 (2002, 10.4)

斉藤尚子、五十嵐啓二、横田隆徳、近藤和雄、新井洋由：血中 γ トコフェロールも α TTPにより制御される 75回日本生化学会、2002.10.17 京都

Daisy E. Kaempf-Rotzoll、五十嵐啓二、堀口昌邦、新井洋由：ビタミンE特異的輸送タンパク質(α TTP)はビタミンE欠乏状態で傷害の起こりやすい臓器に発現している 75回日本生化学会、2002.10.17 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（分担）研究報告書

横田隆徳 東京医科歯科大学 講師

研究要旨 alpha-tocopherol (αTTP) ノックアウトマウスにおける酸化ストレス病態の解明するために 4-hydroxy-2nonenal (HNE) の修飾タンパクの同定を行ない、その 1 つが SOD1 であることを確かめた。αTTP ノックアウトマウス、Sweden 型変異 APP トランスジェニックマウスと G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスのもどし交配が終了してかけ合わせを開始した。

A. 研究目的

- 1) alpha-tocopherol (αTTP) ノックアウトマウスにおける酸化ストレス病態の解明するために 4-hydroxy-2nonenal (HNE) の修飾タンパクの同定を行う。
- 2) αTTP ノックアウトマウスと Sweden 型変異 APP トランスジェニックマウスと G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスとを掛け合わせ、その表現型に及ぼす影響を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) マウスの脳のタンパクを抽出して、イミュノブロット法により、野生型とノックアウトマウスで HNE 修飾の程度に差があるタンパクを同定する。
- 2) αTTP ノックアウトマウス、Sweden 型変異 APP トランスジェニックマウスと G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスを B6/C57J にもどし交配後、かけ合わせる。

（倫理面への配慮）これらの研究は「東京医科歯科大学動物実験の基本指針」に従い動物愛護観点より、適切な麻酔、保定を行って動物に無用な苦痛、不安を最小限にするようにした。

C. 研究結果

- 1) 以下のようにノックアウトマウスにより高度に HNE により修飾されているタンパクの 1 つは Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) と判明した。
- 2) それぞれのマウスの B6/C57J にもどし交配を完了した。両者の掛け合わせを開始し、ダブルヘテロマウスを 10 匹作製した。現在、約 12 週齢だが、運動機能、繁殖機能に大きな変化は見られない。

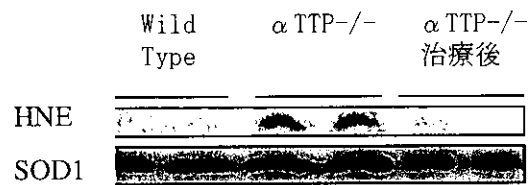


図 大脳半球をホモジネイト後、蛋白を抽出して抗 HNE 抗体でイミュノブロットして、同一のメンブレンを抗 SOD1 抗体で再度イミュノブロットしたところ HNE が αTTP ノックアウトマウス脳組織でより強く修飾されビタミン E 補充で抑制されるバンドと全く分子量で SOD1 反応性が確認された。脊髄組織でも同様の結果を得た。

D. 考察

α-tocopherol 欠乏による酸化ストレスの影響の結果として HNE 修飾が αTTP ノックアウトマウスの中枢神経系において上昇し、α-tocopherol の投与により有意に減少することを報告してきた。今回、HNE 修飾をうけている物質が Cu/Zn SOD1 であることが判明した。HNE は脂質過酸化の代謝産物であるだけでなく、酸化ストレスの際に強力に細胞障害性に働くこともわかっている。HNE 修飾をうけている物質が代表的な radical scavenger の 1 つである SOD1 であり、この修飾により SOD1 機能が障害されて、さらに酸化ストレスが強まる機序が想定された。

E. 結論

αTTP ノックアウトマウスでは SOD1 が HNE の修飾を受けてその機能が障害されて、さらに酸化ストレスが強まる機序が想定された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yokota T, Miyagishi M, Hino T, Matsumura R, Andria T, Urushidani M, Rao RV, Takahashi R, Bredesen DE, Taira K, Mizusawa H. siRNA-based Inhibition Specific for Mutant SOD1 with Single Nucleotide Alternation in Mammalian Cells, Compared with Ribozyme and DNA Enzyme. J Biol Chem (in revision)

2. 学会発表

横田隆徳、日野太郎、斉藤友紀、多比良和誠、水澤英洋。siRNA を用いた変異 SOD1 による筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療—Ribozyme や DNA enzyme との比較—第 43 回日本神経学会総会、2002 年 5 月、札幌。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働研究費補助金（長寿科学総合事業）
分担研究報告書

α トコフェロール転送蛋白質遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明

分担研究者 新井洋由 東京大学大学院薬学系研究科 教授

ビタミン E は生体にとって最も重要な抗酸化剤であり、我々の体を酸素ストレスから防御する役割を担っている。しかし、個体レベルにおいてビタミン E がどのような機能を担っているのか、またビタミン E が欠乏するとどのような病態に陥るのか、詳細は明らかでない。我々はこれまで生体内のビタミン E レベルを決定する α -TTP という蛋白質を同定し、またそのノックアウトマウスの作成に成功している。このマウスはビタミン E 欠乏症のよいモデルとなることから、このマウスを用いてビタミン E の生理的役割の解明を進めた。本研究の初年度として、ビタミン E 欠乏および過剰状態において変動する遺伝子をマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。その結果、これまで予想されていなかった一群の遺伝子がビタミン E により変動していることが明らかになった。

A. 研究目的

α -TTP は AVED の原因遺伝子であり、生体内の α -Toc レベルを規定する重要な因子である。AVED モデル動物として作製された α -TTP 欠損マウスは、これまでにビタミン E 欠乏状態にすると、雌では不妊症状を呈し、長期的欠乏下では AVED 患者と同様に震えや歩行困難などの神経症状を呈することが報告されている。これらの症状は、 α -Toc を過剰投与することで改善することが明らかとなっていることから、ビタミン E がなんらかの遺伝子発現制御に関わっていることが推察される。最近では、ビタミン E の抗酸化作用以外の作用が次々と報告され、beyond antioxidant としてのビタミン E に大きな期待が寄せられている。そこで、ビタミン E の効果が明確に表れると考えられる α -TTP 欠損マウスを用いて、ビタミン E 欠乏時および α -Toc 過剰投与時において変動してくる遺伝子群についての検索を行った。検討する生体組織には神経疾患の原因組織である脳と、物質代謝の主要臓器である肝臓を用い、検討方法には網羅的遺伝子解析が可能な DNA マイクロアレイ法を使用することにした。

B. 研究方法

（実験動物）日本クレア(株)より C57 BL/6J Jcl 系雄マウス 4 週令のものを購入し、固形飼料 Rodent Laboratory Diet® EQ 5L37（日本エスエルシー(株)）で 2 日間予備飼育した。その後、ビタミン E 欠乏群と α -Toc 過剰群に分け、8 週間飼育した。 α -Toc 過剰群にはビタミン E 欠乏飼料に α -Toc を 600 mg 添加した飼料を与えた。各群の C57 マウスを α -TTP 欠損マウスの対照とした。

α -TTP 欠損マウスは研究室にて交配したものを用い、対照マウスと同様にビタミン E 欠乏群

と α -Toc 過剰群に分けた。離乳後（4 週令）から 8 週間各飼料にて飼育した。 α -TTP 欠損マウスの雌は子宮における α -TTP の発現量減少に伴い、E 10.5 日目以降から胎児吸収が始まり不妊となる。しかし、 α -Toc 過剰飼料で飼育すれば胎児吸収が起こらず仔を産むことが可能である。よって本実験では、 α -Toc 過剰飼料で飼育した TTP (-/-) の雌と通常飼料で飼育した TTP (-/-) の雄を交配させ、産まれてきた雄性仔マウス (TTP (-/-)) を使用することにした。ビタミン E 欠乏群においては、より厳しいビタミン E 欠乏状態になることを想定して、胎児期 (E 15-18 日) より母マウスの飼料を α -Toc 過剰飼料からビタミン E 欠乏飼料に切替えた。母マウスには授乳期もビタミン E 欠乏飼料を与え続けた。 α -Toc 過剰群においては、妊娠期から実験終了後までを通して α -Toc 過剰飼料にて飼育した。マウスは群別にケージに分け入れて飼育した。飼育室は室温 22 ± 1 C、湿度 50 % に保った。飼料および水は自由摂取させた。

（飼料） α -Toc 過剰飼料は、飼料重量の 10 % (w/w) 量のストリップドコーン油に 600 mg の α -Toc を添加して均一に混合した後に、ビタミン E 欠乏飼料（船橋農場(株)）に添加し、ビタミン E 欠乏飼料同様、研究室にて調製した。調製後は使用するまで -20 C にて保存した。

（実験プロトコール）調製飼料にて飼育し 12 週令に達したマウスを、14 時間絶食後、エーテル麻酔下にて眼底採血を行い、ヘパリン血にし 3500 rpm、4 C で 15 分間遠心分離して血漿を採取した。その後、頸椎脱臼し脳 (α -TTP 欠損マウス) ならびに肝臓 (α -TTP 欠損マウス、対照マウス) を摘出した。摘出組織はオートクレーブ済み PBS で洗浄し、ただちに液体窒素中で凍結させた。凍結組織より total RNA の抽出

を行った。

(total RNA の抽出) 各凍結組織の一部をクライオプレス (株) マイクロテック・ニチオン) にて粉碎し、1.5 mL アシストチューブに入れ ISOGEN (4 C: ニッポンジーン(株)) を 1 mL 添加して攪拌する。15000 rpm、4 C にて 5 分間遠心し、上清のみを別チューブに移した。そこに CIAA (クロロホルム: イソアミルアルコール = 49:1) を 200 μ L 添加、攪拌後、15000 rpm、4 C にて 15 分間遠心した。すみやかに上清のみを別チューブに移し、イソプロパノールを 500 μ L 添加し攪拌する。室温にて 5 分間放置後、15000 rpm、4 C にて 15 分間遠心する。上清のみを除去し、沈殿物を 80 % (v/v) エタノール/DEPC 水 300 μ L にて洗浄した。15000 rpm、4 C にて 5 分間遠心後、洗浄液を除去し、同様の操作をもう一度行った。遠心後、10 μ L 用のピペットを用いて上清を全て除去し、室温にて風乾させる。その後、16 μ L の DEPC 水にて溶解し、次操作まで -80 C にて保存した。DEPC 水にて 100 倍希釈したサンプル溶液の吸光度 ($\lambda = 260$ nm, 280 nm) を測定し、OD 比 = 1.6-1.8 の total RNA をこれ以降の操作の鋳型として使用した。

(DNA マイクロアレイ法) 組織より抽出した total RNA の精度を電気泳動を行い、不純物の混合、total RNA の切断等がみられないことを確認した。良好な精度を持つ total RNA を T7-(dT)24 primer (Amersham Pharmacia 社) とハイブリダイズし、その後は SuperScript Choice System (Gibco BRL 社) の手順に従って、cDNA 合成を行った。cDNA をフェノール/クロロホルム抽出し、PLG (Phase Lock Gel: PRI 社) を使用して水層を分離し、cDNA の精製を行った。電気泳動にて cDNA 精度の確認をし、BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo 社) を用いて IVT (In Vitro Transcription) 反応を行い、ピオチンラベルした cRNA を合成した。その後、cRNA を Rneasy Mini Kit (Qiagen 社) にて精製し、約 35-200 base のフラグメントに切断して電気泳動を行い、fragment cRNA の確認、定量を行った。

DNA マイクロアレイ法には Affymetrix 社の GeneChip® を使用した。まず、作製した試料 fragment cRNA が GeneChip® に使用可能な質を有しているかを調べるために Test3 Array にて housekeeping gene の確認を行った。その結果、高感度で housekeeping gene が検出されたため、マウスヌクレオチドプローブが結合したプローブアレイ Murine Genome U74v2 にサンプルを 45 C で 16 時間ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、プローブアレイをストレプトアビジン/フィコエリスンで染色し、

その蛍光強度を定量することにより mRNA レベルを測定した。

GeneChip® のハイブリダイゼーション装置には GeneChip Fluidics Station 400 を、プローブアレイの蛍光標識のイメージ処理には Gene Array Scanner を、各ヌクレオチドプローブの蛍光強度解析ソフトには microsoft suite ver. 4.0 (Affymetrix 社) を使用した。

各遺伝子発現量は、オリゴヌクレオチドプローブのシグナル強度を基にした Average difference (Avg. Diff.) で表した。GeneChip® のプローブアレイ上には一遺伝子につき複数組のパーフェクトマッチ (PM) プローブと PM プローブの中央の一塩基に変異を入れたミスマッチ (MM) プローブがセットで用意されている。MM プローブはハイブリダイゼーションの特異性の指標として用いられ、PM プローブと MM プローブのシグナル比から遺伝子発現レベルを決定する。ここから算出された値が Avg. Diff. であり、それぞれのプローブセット内の PM プローブと MM プローブのシグナルの差の平均値である。MM プローブのシグナルが検出される場合は有意なシグナルと解釈しない。また、実験サンプルと対照サンプル間における mRNA 発現量の比較検討は、それぞれの Avg. Diff. 値から算出される Fold change を用いて行った。計算式を以下に示した。Avg. Diff. Change の分母には、実験サンプルもしくは対照サンプルの Avg. Diff. のうちの最小値を使用するが、この最小値がプローブアレイのノイズ (Q) から算出されるバックグラウンド (QM*QC) より小さい場合には分母に QM*QC 値を使用する。

C. 研究結果

(血中 α -Toc 濃度) α -TTP 欠損マウスにおいて、ビタミン E 欠乏飼料、 α -Toc 過剰飼料で飼育したマウスの血中濃度はそれぞれ、0.04 nmol/ mL、1.83 nmol/ mL であった。同様に、対照マウスでは、0.22 nmol/ mL、8.14 nmol/ mL であった。 α -TTP が欠損していても、 α -Toc を過剰に摂取し続けていれば、微量ながらも血中ビタミン E レベルは維持されることが示された。

(ビタミン E により up regulation する遺伝子) α -TTP 欠損マウス脳において、 α -Toc 過剰摂取時にビタミン E 欠乏状態と比較して 3 倍以上 Avg. Diff. が増加した遺伝子は 12 遺伝子であった。それらの Fold change の大多数は 3-5 倍という値を示し、 α -Toc 摂取による mRNA 発現誘導への影響は小さいことが推察される。その中において最も mRNA 量が増大した遺伝子は oxytocin-neurophysin I で、ビタミン E 欠乏状態と比較すると約 20 倍高い Avg. Diff. を示した。Oxytocin (OT) は、視床下部視索上

核および室傍核の大細胞性ニューロンで合成され、下垂体後葉から分泌される nonapeptide hormone である。過去に、ラベルしたビタミン E を用いて組織内分布を調べた結果、下垂体後葉に選択的に移行することがみられ、ビタミン E に抗利尿ホルモン、OT、vasopressin (VP) 等を含む下垂体後葉因子の分泌調節作用があることを示唆した報告がなされており、本実験でその内容と一致する結果が遺伝子レベルで得られた。ただし、OT と同じ細胞より分泌される VP の mRNA 発現に対する影響はみられなかった。

α -TTP 欠損マウス肝臓において、 α -Toc 過剰摂取時にビタミン E 欠乏状態と比較して 2 倍以上 Avg. Diff. が増加した遺伝子はわずか 7 遺伝子であり、うち 3 倍以上増大した遺伝子は 3 遺伝子であった。Fold change は小さいが Avg. Diff. が大きいものに CYP4A14 と CYP7B1 があつた。ビタミン E 欠乏でも過剰でも CYP の活性が減少することが知られている一方で、ビタミン E 過剰飼料で飼育したラット肝臓では脂肪酸組成が変化したことによりビタミン E により CYP2B1 が誘導された可能性もまた示唆されている。今回、肝臓における CYP4A14 ならびに CYP7B1 活性に対するビタミン E の影響について検討は行っていないため不明であるが、 α -TTP が欠損している時、CYP4A14 ならびに CYP7B1 の mRNA 量は α -Toc により誘導されることが示された。この他にも、phenobarbital などにより発現が誘導される epoxide hydrolase (Eph1) の mRNA 量が α -Toc 過剰摂取により誘導されていた。一般的に薬物代謝酵素活性はビタミン E 欠乏時に減少することがわかっており、本結果からビタミン E 欠乏状態において Eph1 mRNA 合成が抑制された結果 Eph1 活性の低下を引き起こすことが示唆された。

対照マウス肝臓において、 α -Toc 過剰摂取時にビタミン E 欠乏状態と比較して 3 倍以上 Avg. Diff. が増加した遺伝子は 15 遺伝子であった。Fold change は小さいが Avg. Diff. が大きいものに metallothionein (MT) があつた。MT は重金属を捕捉し、生体を酸化ストレスから防御するタンパク質であることから、対照マウスの肝臓においては α -Toc が prooxidant として作用した可能性が示唆された。他に α -Toc 過剰摂取により mRNA 量が増加した因子には、メラノーマ増殖活性を持つ GRO1 や核内受容体の ligand である TIF1 β があり、 α -Toc が転写や発生、分化にも影響する可能性が推測された。

(ビタミン E による酸化ストレス関連遺伝子群への影響) ビタミン E 欠乏にした α -TTP 欠損マウスが呈する遅延性神経障害の原因は、極端な α -Toc 供給低下から誘導される神経細胞内の脂質過酸化による機能低下である。ビタミン E

は生体内における脂溶性の強い抗酸化剤であるため、生体内ビタミン E レベルが種々の redox システムに影響を与えることが推察される。そこで、酸化ストレスで変動する遺伝子群に対する α -Toc の影響について以下にまとめた。

α -TTP 欠損マウス脳において、 α -Toc 過剰摂取により大部分の遺伝子の mRNA 量は変動しなかった。しかし、2 倍近く Avg. Diff. が上昇したものの中には低酸素状態で誘導される erythropoietin があつた一方で、ラジカル捕捉能をもつ MT もあつた。このことから、 α -Toc の過剰投与は、 α -TTP 欠損マウスの脳において酸化障害を誘導するだけでなく、その障害を防御し脳を酸化ストレスから防御する機能をもつ可能性が示唆された。

α -TTP 欠損マウス肝臓においては、ビタミン E 欠乏状態と α -Toc 過剰摂取時における酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現量に有意な差はみられなかった。このことから、肝細胞に α -TTP が存在しない場合、大量の α -Toc を吸収しても肝臓内の酸化還元状態は変動しないことが推察された。

対照マウス肝臓においても、ビタミン E 欠乏状態と比較して NOS の mRNA 量に変動はみられなかったため、肝臓に取り込まれた α -Toc が直接的に prooxidant として作用し MT が誘導された可能性が推察される。 α -Toc 過剰摂取時において酸化ストレスマーカーに影響がみられなかったのは、誘導された MT がラジカルスクベンジャーとして作用したためと考える。

(ビタミン E によるエネルギー代謝関連遺伝子群への影響) 上述したように、 α -TTP 欠損マウス脳ならびに対照マウス肝臓において α -Toc 過剰飼料で飼育すると MT mRNA が誘導されることが示された。MT はラジカルや活性酸素から生体を防御する作用を有しているが、MT 欠損マウスでは、酸化ストレスに対する応答性が上昇するだけでなく、肥満になりやすいことが知られている。最近の DNA マイクロアレイ法を用いた研究により、MT 欠損マウスの肝臓で脂肪酸の炭素鎖延長酵素の mRNA が誘導されること、解糖系におけるエネルギー産生を促進する酵素の mRNA が抑制されることがわかり、肥満を引き起こすメカニズムが提唱された。これらの報告から、酸化ストレスとエネルギー代謝が相関していることが予測される。そこで、酸化障害を受けやすいと考えられる α -TTP 欠損マウスをビタミン E 欠乏ならびに α -Toc 過剰にした時、エネルギー代謝関連酵素群が影響を受けているか検討することにした。

α -TTP 欠損マウス脳において、ビタミン E 欠乏状態と比較して α -Toc 過剰摂取により大部分の酵素の mRNA 量に変化はみられなかった

が、解糖系を亢進するいくつかの酵素の mRNA 量について増大する傾向が示された。この時、糖新生に関わる glucose-6-phosphatase mRNA 量は減少しており、糖新生よりも解糖系が進行した可能性が示唆された。他に glycerol kinase が誘導されていたことから、triglyceride (TG) が異化されて解糖系に入る経路が活性化されることが推測された。 α -Toc 過剰摂取時において、 α -TTP 欠損マウスの脳では糖および TG 代謝が活性化し、エネルギー産生が亢進している可能性が考えられた。

一方、 α -TTP 欠損マウス肝臓においては、ビタミン E 欠乏状態と α -Toc 過剰摂取時で mRNA 量が変動する遺伝子はほとんどみられなかった。 α -Toc の過剰摂取により若干発現誘導された遺伝子に glycerolphosphate dehydrogenase と lactate dehydrogenase があつた。この結果から、 α -TTP が存在しない肝臓では α -Toc を投与してもエネルギー代謝系に変化はみられず、むしろ乳酸を蓄積し解糖系が減退する可能性が示唆された。

対照マウス肝臓においても、大部分の遺伝子の mRNA 量は α -Toc 過剰摂取によって変動しなかった。 α -Toc 投与により mRNA 量が変動した遺伝子をまとめると、糖新生の亢進ならびに解糖系におけるトリオース生成以前の経路の進行減退が示された一方で、TG の異化亢進、トリオース生成後の解糖系の亢進が示唆される結果となった。このことから、 α -TTP が存在する肝臓では大量の α -Toc を取り込むことにより、肝臓内の TG 代謝が活性化されエネルギー産生が亢進する可能性が示唆された。

D. 考察

本実験で検討を行ったプローブアレイ GeneChip® Murine Genome U74v2 Set では、約 12000 種の遺伝子 (うち約 6000 は EST クラスター) 解析が可能であった。ビタミン E と遺伝子制御に関しては不明な点が多く、これまでに生体においてビタミン E が遺伝子発現におよぼす影響を網羅的に研究した報告はない。そこで本章では、mRNA の発現量がビタミン E (α -Toc) を過剰摂取した場合に、ビタミン E 欠乏状態の組織と比較して大きく変動した遺伝子群の検索を行った。

(組織中 α -Toc 濃度) α -Toc を過剰に摂取し続けていれば、 α -TTP 欠損マウスの血中ビタミン E レベルは若干量維持されることが明らかとなった。今回、Genechip® に使用した各組織中の α -Toc 量を測定していないため、以下に脳および肝臓内の α -Toc 量を血中 α -Toc 量とこれまでの報告より考察する。

脳については、脳血管閥門が存在するため一

般的に脳内へビタミン E が取り込まれにくいことが知られている。ただし、正常マウスでは脳中にも若干量の α -TTP 発現が認められているため、輸送された α -Toc は微量ながらも取り込まれ維持される。しかしながら、 α -TTP 欠損マウスにおいては元来の α -Toc 輸送量が低いため α -Toc を過剰に与えても脳内にはほとんど α -Toc が維持されない。ゆえに、 α -TTP 欠損マウスの脳中 α -Toc レベルは、血中 Toc レベルとは全く相関せず、 α -Toc 過剰飼料を与えても非常に低いことが想定される。

一方、肝臓内 α -Toc 濃度については、脳と異なり血中の α -Toc レベルを反映することが推測できる。さらに、Leonard らは、重水素ラベルした α -Toc を摂取させた α -TTP 欠損マウスの肝臓中には Wild type で検出されたラベル量の約 3 割が存在していたことを報告した。よって、 α -TTP が欠損していても、 α -Toc 過剰飼料で飼育していれば常に高濃度の α -Toc が肝臓に取り込まれるため、見かけ上は肝臓内で維持されているようなレベルで α -Toc の検出が可能であると考えられる。したがって、同様に飼育した対照マウスの肝臓 α -Toc レベルよりは劣るが、 α -Toc を過剰に摂取していた今回の α -TTP 欠損マウスの肝臓にも α -Toc は存在していたことが推察される。

(α -TTP 欠損マウス脳においてビタミン E により誘導される遺伝子) α -TTP 欠損のため、脳内 α -Toc レベルは非常に低いと考えられるが、 α -Toc 過剰飼料を与えた場合、ビタミン E 欠乏状態と比較して数種類の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった。

その中でも最も発現が誘導された遺伝子は oxytocin であった。下垂体後葉ホルモンである oxytocin は、乳汁分泌や子宮収縮作用を誘導するホルモンであり、分娩開始剤としても広く利用されている物質である。最近、この物質は乳汁分泌や子宮収縮のみならず、心房性ナトリウム利尿ペプチドの放出を誘導し、動脈圧低下やナトリウム利尿作用を示すことが報告された。本実験で使用したマウスは雄性であり、後者の機能調節のために oxytocin mRNA が誘導された可能性が高い。一方で、血管収縮作用を示し血圧上昇に関与する angiotensin の前駆体である angiotensinogen の発現もまた α -Toc により 5 倍近く上昇していた。Angiotensin は循環系において oxytocin とは全く逆の作用を示す物質である。これらのことから、ビタミン E (α -Toc) は数種の血圧調節因子の発現を抑制し、血管ホメオスタシスに関与している可能性が強く示唆された。これまでに血管ホメオスタシスとビタミン E が関わっているという報告はなく、この機能が beyond anti-oxidant としてのビタミン E

の新たな機能になりうるものが今回提案された。

AVED モデル動物として作製された α -TTP 欠損マウスは、長期間ビタミン E 欠乏状態に置くと神経細胞への α -Toc 供給低下により脂質酸化障害が誘導され、神経症状を示すことが報告されている。さらに、ヒトにおいて AVED と類似の症状を示すフリードライヒ運動失調症 (Friedrich ataxia) は、ミトコンドリアからの流出がうまく行われないう Fe イオンが蓄積し、ラジカルを誘導することに起因することが示唆されている。これらの疾患はビタミン E 過剰投与により、震えや歩行困難などの症状が回復する。したがって本研究を始めるにあたり、 α -TTP 欠損マウスに α -Toc を過剰投与した場合には酸化障害関連因子が抑制されること、もしくはラジカル捕捉因子が誘導されることを予測していた。しかし、実際には α -Toc の供給量が微量にも関わらず、一部ではあるが酸化障害因子と生体防御因子の両方が誘導されていた。この結果から、AVED での α -Toc 投与による神経症状抑制は、 α -Toc の抗酸化作用だけでなく、 α -Toc によって生体防御能が上昇することにも起因する可能性が考えられた。さらに、 α -TTP 欠損時ではビタミン E 欠乏にすると正常な状態と比較して、生体が兼ね備えている元来の防御機能が低いことが推察され、神経細胞が酸化障害を容易に受けることから神経疾患に至ることが示唆された。

さらに、脳内に微量の α -Toc が存在する時にはエネルギー産生が亢進されることが推察された。この時、ABC transporter や HACL1、膜結合型 PI 輸送タンパク質の mRNA も誘導されていたことから、産生した ATP が細胞内外の物質能動輸送やシグナル伝達経路を促進することが考えられる。最近のビタミン E 新規機能を提示する報告に、 α -Toc succinate が *in vitro* ならびに *in vivo* において抗酸化システムを介さずに NF- κ B の転写活性を抑制するという報告がある。これらの因子間ならびにビタミン E との関連性は明らかではないが、ビタミン E が抗酸化機能だけでなく、細胞の動的機能を制御するようなシグナル伝達に関与するかもしれないという新たな可能性が示唆された。

(肝臓においてビタミン E により誘導される遺伝子) 生体がビタミン E 欠乏状態である時と比較して、 α -Toc を過剰に摂取した時に誘導される遺伝子種は α -TTP の有無により大きく異なっており、 α -TTP 欠損時に mRNA 量が変動する遺伝子数の方が少ないことが明らかとなった。これは、過剰の α -Toc を摂取した場合、 α -TTP の存在下では転写やシグナル伝達に関与する遺伝子が誘導されたため、他の因子の発現にも影響を与えた可能性が考えられる。正常マウスに

おいて α -Toc を過剰に取り込むと肝臓内の α -TTP 発現量は約 2 倍に増加する傾向がみられ、肝臓から末梢組織へ α -Toc を輸送する一方で、肝臓内に α -Toc を貯留することが示唆された。Leonard らの報告から、 α -TTP 欠損マウスにおいても常に過剰量の α -Toc を摂取している場合には、正常マウスよりは低いもの見かけ上は肝臓内に α -Toc が存在していることが考えられる。したがって、肝臓内における大部分の遺伝子の誘導は、吸収された α -Toc が α -TTP と結合することにより引き起こされることが推察され、 α -TTP はある転写因子の上流に位置している可能性が示唆された。

ビタミン E は生体内で効果的に働く脂溶性の抗酸化物質であるため、ビタミン E 欠乏状態にした α -TTP 欠損マウスでは酸化ストレスによる障害が亢進することを予測していた。しかしながら、 α -TTP 欠損時には α -Toc が肝臓内に取り込まれるにも関わらず、酸化ストレスに関与する遺伝子群に対する影響がみられなかった。一方、 α -TTP 存在下では酸化障害因子と生体防御因子がともに誘導され、生体防御システムの恒常性が維持されるように働くことが推定された。この作用機序として、以下の二仮説が考えられる。まず、肝臓内に蓄積した大量の α -Toc が prooxidant として作用し、その結果生体防御因子である MT が誘導される説である。過剰量の α -Toc を摂取しても、血中には一定量しか輸送されず、代謝物としても α -TTP 欠損時と比較すると排泄される量は少ないことが示された。一般的に、抗酸化物質が大量に存在し、金属などラジカル誘導物質が外的要因としてある場合にはその抗酸化物質は酸化を亢進することが知られている。今回の場合、大量に蓄積したビタミン E が金属と反応して prooxidant になり酸化障害を誘引し、それを抑制するために MT の発現が誘導されたという推測が立つ。もう一つは、上述したようにビタミン E が α -TTP に結合することにより酸化ストレスマーカーの誘導が起こるとい説である。肝臓がビタミン E 欠乏状態である時、 α -TTP の有無に関わらず各酸化ストレスマーカー mRNA 量はほぼ等しいことが示された。よって、これらの遺伝子の誘導には α -TTP と α -Toc の結合が必要であることが推察される。いずれにせよ、生体防御システムの機能恒常性は α -TTP により規定される肝臓内 α -Toc レベルに依存することが示唆された。

MT 欠損マウスでは、酸化ストレスによる障害が増大し、エネルギー産生を抑制することが報告されているが、ビタミン E 欠乏状態にした α -TTP 欠損マウスにおいては α -Toc を過剰投与した時と比較して酸化障害も誘導されず、エネルギー代謝にも大きな影響を与えないことが

推定された。また、 α -TTP が存在する正常なマウスにおいては、 α -Toc 過剰投与により MT 発現が誘導され、TG を基質とするエネルギー代謝が亢進することが推察された。この結果は、MT がエネルギー代謝に関与するというこれまでの報告と一致し、MT 欠損時にみられるエネルギー代謝の抑制は酸化障害により誘導されるものでないことが推察される。したがって、MT の上流には α -TTP が位置し、 α -Toc レベルによって下流のエネルギー代謝を制御する可能性が示唆された。

E. 結論

DNA マイクロアレイ法を使用し、ビタミン E により制御される遺伝子の網羅的な解析を行った。その結果、 α -TTP 欠損マウスの脳においては、ビタミン E 欠乏状態と比較してビタミン E を過剰に投与すると下垂体後葉ホルモンである OT が誘導されることが示され、ビタミン E が血管ホメオスタシスに関与する可能性を見出した。この機能はビタミン E の新規の beyond anti-oxidant 作用を示す生理作用として大いに期待される。

肝臓においては、多くの遺伝子の mRNA 発現誘導に α -TTP の存在が必須である可能性が示唆された。これまで α -TTP は、 α -Toc の輸送タンパク質としての生体内のビタミン E レベルを規定する機能しか明らかになっていない。今回、 α -Toc 過剰摂取により遺伝子の誘導が確認された生体防御システムやエネルギー代謝、転写などにビタミン E ならびに α -TTP がどのように関与しているのか、詳細をさらに検討する必要がある。

本研究において見いだされたビタミン E の新たな生理機能は、これまで主要作用とされてきた生体内の強い脂溶性抗酸化物質としての機能

とは全く異なるものであり、生体におけるビタミン E の存在意義を強く裏付ける興味深いものであった。今回、DNA マイクロアレイ法を用いて、新規のビタミン E 機能の発見に結びつく膨大な量の情報を得たが、本章で検討したものはほんの一部であり、生体内におけるビタミン E の未知の機能を発見するためにはさらなる解析、検討が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) α -Tocopherol transfer protein is expressed specifically at the implantation site of pregnant mouse uterus.

D.E.Kaempf-Rotzoll, K.Igarashi, J.Aoki, K.Jishage, H.Suzuki, H.Tamai, O.Linderkamp and H. Arai
Biol. Reprod. 67, 599-604 (2002)

2) Human placental trophoblast cells express α -tocopherol transfer protein.

D.E.Kaempf-Rotzoll, M.Horiguchi, K.Hashiguchi, J.Aoki, H.Tamai, O.Linderkamp and H.Arai
Placenta (2003) in press

3) Vitamin E and transfer proteins.

D.E.Kaempf-Rotzoll, M.G.Traber and H.Arai
Current Opinions in Lipidology (2003) in press

2. 学会発表

1) 斉藤尚子、五十嵐啓二、横田隆徳、近藤和雄、新井洋由：血中 α トコフェロールも α TTPにより制御される 75回日本生化学会、2002.10.17 京都

2) Daysy E. Kaempf-Rotzoll、五十嵐啓二、堀口昌邦、新井洋由：ビタミン E 特異的輸送タンパク質 (α TTP) はビタミン E 欠乏状態で傷害の起こりやすい臓器に発現している 75回日本生化学会、2002.10.17 京都

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明

分担研究者 内原俊記 東京都神経科学総合研究所神経病理

研究要旨

既に報告した α トコフェロール転送蛋白遺伝子ノックアウトマウスを VE 欠乏状態で飼育することにより、これまでの方法では達成できなかった著しい VE 欠乏状態を個体レベルで達成できる。本研究ではこのマウスを多数作出し長期にわたって飼育し、VE 欠乏が寿命や神経系にどのように影響を与えるかを検討する。初年度はマウスの作出と並行して、既に得られた少数例の検体を検索し、VE 欠乏に伴い副腎髄質にリポフスチン様顆粒が沈着することを見出した。並行してヒト神経組織由来の培養細胞に実験的酸化ストレス刺激を加え、apolipoproteinE(ApoE)蛋白の発現が上昇することを明らかにした。酸化ストレスに曝されている脳虚血巣の周囲でも ApoE 陽性の神経細胞が多数認められ、神経細胞は酸化ストレスに反応して in vivo でも ApoE を産生し、酸化ストレスによる障害に反応している。

A.研究目的

酸化ストレスは老化・変性・発癌等広汎な生物学的プロセスに関与していると考えられている。従って酸化ストレスを軽減させることによって、これらの過程を遅延または逆行させることができるのではないかと期待のもとに、数多くの研究成果が積み重ねられてきた。ビタミン E(VE)は知られている生体内抗酸化物質のうちで、その活性が最も強いとされているが、個体内での抗酸化システムの構成と、そのシステム全体において VE がどのような役割を果たしているかについては不明の点も多く、ヒトにおける VE 投与の臨床的効果を統計的に明瞭な形で示した研究は殆ど無い。VE の正常または病態における機能を明らかにして治療に反映させるには、個体レベルでの VE の動態と酸化ストレスの変化を同時に観察することが必須である。実験動物の飼料中から VE を除去することで相対的 VE 欠乏状態を作りその結果を観察した研究は多いが、期待される程に激的な病変を呈したという報告は意外に乏しい。共同研究者の新井、寺社下らは VE の正常代謝の大部分に関与する α tocopherol transfer protein (α TTP)に注目し、その欠損マウスを作製した。このマウスでは従来 VE 欠乏飼料でえられたよりも激しい VE 欠乏状態を個体レベルで実現することができ、その一部の所見について少数例における結果を既に我々は報告した。本研究では α TTP 遺伝子および産物と VE の動態をさらに多数の個体でさらに詳細に観察し、少数例の検討ではえられなかった包括的情報を得ることを目標としている。また、並行して細

胞レベルや神経疾患における酸化ストレスの意義を検討して、酸化ストレス病態を解明し、その制御を通じたより合理的な治療法の開発を最終的な目標とする。

- 本年度は以下の点について検討を行った
- a.多数（雌 100 匹以上）の α TTP 遺伝子ノックアウト個体の作出
 - b. α TTP 遺伝子ノックアウト個体副腎髄質におけるリポフスチン様顆粒の沈着
 - c.神経細胞での ApolipoproteinE 産生と酸化ストレスによる発現亢進

B.研究方法

a.多数（雌 100 匹以上）の α TTP 遺伝子ノックアウト個体の作出
 α TTP 遺伝子ノックアウト個体（雌 100 匹以上）をほぼ同時期に作出するために以下の方法を用いた。既に作製されて C57/JB6line に 8 世代以上 back cross された α TTP 遺伝子ノックアウト雄個体 3 匹より採取した精子を用いて C57/JB6 の wild type 雌(α TTP+/-)より採取した卵(1500 卵以上)に体外受精を行う。卵割が確認できた受精卵を擬似妊娠状態にした別の雌の子宮内に着床させ妊娠を継続させる。作出された個体は全て α TTP 遺伝子については hetero+/- の遺伝子型を有する。この個体群を用いて、今後ノックアウト個体多数を作出し観察する。

b. α TTP 遺伝子ノックアウト個体副腎髄質におけるリポフスチン様顆粒の沈着
既に神経系の観察をおえた少数例の α TTP ノックアウトマウス(-/-)を VE 欠乏食、VE

正常食、VE 過剰食、と正常対照(+/-)を VE 欠乏食、VE 正常食群に分け、離乳直後よりそれぞれの食餌を与え、生後1年4ヶ月まで飼育した。深麻酔下に Zamboni 液を用いて経心腔的に環流固定した後、脳、脊髄、全身臓器を摘出した。同一固定液で浸析固定後パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE)にて観察した、褐色色素顆粒のみられた副腎に Fontana-Masson 染色を行った。

c. 神経細胞での ApolipoproteinE 産生と酸化ストレスによる発現亢進

ヒト neuroblastoma 由来の cell line(GOTO)を RPMI1630+20%fetal bovine serum で培養し、confluent になった段階で異なる濃度の過酸化水素に暴露した。暴露前、暴露後 4, 24, 48 時間後に細胞を 10% trichloroacetic acid で固定後回収し、SDS+urea で可溶化した後 SDS-PAGE にて展開し抗 apolipoprotein E (ApoE) 抗体(IGL)を probe として Western blot を行った(図 A)。ApoE に対応する分子量に描出された immunoreactive band をデジタル画像に変換後 NIH Image(Ver 1.62)を用いてバンドの相対濃度を定量化した。(図 B)

また同一の抗 ApoE 抗体を用いて脳梗塞巣とその周辺部を免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

a. 多数(雌 100 匹以上)の α TTP 遺伝子ノックアウト個体の作出

上記の方法 a) によって、体外受精をおこなう目的で、 α TTP 遺伝子ノックアウト個体、採卵用 wild type 雌個体を必要数準備し、体外受精に着手した。

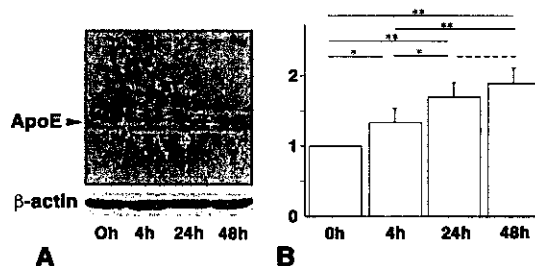
b. α TTP 遺伝子ノックアウト個体副腎髄質におけるリポフスチン様顆粒の沈着

α TTP ノックアウトマウスの副腎には HE にて茶褐色の色素が髄質細胞の細胞体内に認められた。同色素は Fontana-Masson 染色陽性でリポフスチン様顆粒(LG)と思われ、沈着量は α TTP ノックアウトマウスで正常対照より多く、VE 欠乏食 > 正常食 > 過剰食の順に多い傾向があった。肝臓でも同様の色素の沈着が見られるが、その程度はまちまちで、遺伝子型や食餌内容の影響は副腎髄質細胞に見られるほどあきらかでなかった。同様の色素の沈着は遺伝子型、食餌内容に関わらず、肝、副腎以外の全身臓器では認められなかった。

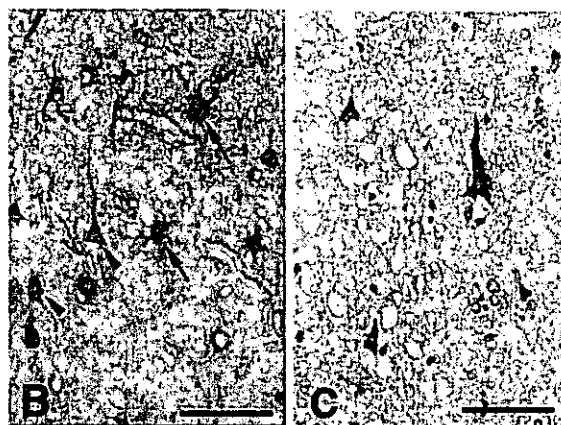
c. 神経細胞での ApolipoproteinE 産生と

酸化ストレスによる発現亢進

ヒト由来の neuroblastoma cell line(GOTO)では定常状態でも ApoE 蛋白を発現しているが、過酸化水素への暴露によって蛋白の発現量が経時的に増加した。



ヒト脳梗塞巣では astrocyte や microglia に加え(下図 B 矢印)、神経細胞にも明らかな ApoE 様免疫活性が認められた(下図 B 矢頭、C)。神経細胞の ApoE 様免疫活性は、正常脳では認めがたいが、梗塞巣の中心部よりも周辺部でより目立った。また一部の ballooned neuron にも同様の ApoE 様免疫活性が認められた。



D. 考察

α TTP 遺伝子ノックアウトおよび VE の欠乏が個体に及ぼす影響を長期に渉って詳細に観察するために、同遺伝子のノックアウトマウスを 100 個体以上確保することを計画した(上記方法、結果 a)。飼育の容易さ、性別の影響を除くために雌個体のみを観察の対象とすることを予定したが、個体作出には 2 倍の手間がかかる事になる。既に着手した体外受精で雌雄それぞれ約 180 匹以上の +/- 個体が得られる予定である。これらを相互に自然交配するか、雌から再び採卵して +/- 雄より得た精子と体外受精することによって必要数のノックアウト個体を得ることを今後予定している。必要個体を得られた後、飼料中の VE 含有量にしたがって VE 欠乏群および VE 正常群に分けて飼

育し、寿命、形態変化、行動学的変化、生化学的变化等について長期に渉り観察する。 α TTP マウスの副腎に沈着していたリポフスチン顆粒は消耗性顆粒ともよばれ、分裂して再生することがないまま長期間に渡って機能し続ける神経細胞や筋細胞等に、時間経過と共に蓄積しやすいことが知られている。今回検索したマウスの全身臓器のうち、副腎と肝臓にはリポフスチン顆粒が沈着していることが明らかとなった(上記方法、結果 b)。副腎に沈着していた LG 量は VE 摂取量が少ない群程多く、 α TTP 遺伝子欠損群ではさらに多かった。生体内の抗酸化物質は多数あるが、副腎髄質局所の酸化ストレスは主に VE の存在によって緩和され、かつ α TTP 遺伝子の欠損が局所の VE 濃度の維持を困難にしているとするれば、LG 蓄積量の副腎における違いは説明できる。一方肝臓にも LG 沈着がみられたが、LG 沈着の程度と VE 摂取量や α TTP 遺伝子の有無との関係は明確でなかった。 α TTP 遺伝子やその産物は生体中では肝臓に最も多量に発現しているが、肝臓での抗酸化作用の主役は VE とは別の物質により担われている可能性がある。また神経系の細胞に比較すると分裂再生能力に富む肝細胞は、一旦 LG を蓄積しても分裂、再生する場合があります、個々の細胞内に蓄積した LG が神経細胞のように長期に渉って保持されない可能性もある。酸化ストレスとそれに対抗する抗酸化システムは生体では巧妙につくられているとされるが、その *in vivo* での全貌や組織・器官による違いは明らかでない。今回副腎髄質で、LG を指標として観察した場合、その蓄積量が VE の摂取量、および α TTP 遺伝子の両者に依存していることを明らかにした。上記の結果は同一個体群について既に発表した脊髄前角における LG 沈着量の解析と合致している。LG の沈着が酸化ストレスの程度を反映しているとする、脊髄前角や副腎髄質など神経系の特定の領域ではその蓄積量が VE 依存性に変化していると考えられ、すくなくともこれらの部位では VE が局所の酸化ストレスの緩和に主要な役割を果たしていると考えて矛盾しない。一方肝臓は α TTP を最も多量に発現する臓器ではあるが、LG の蓄積量は VE に依存して変化するわけではないことも明らかになった。組織によるこれらの違いが何を反映するのか今のところ不明だが、組織・細胞により 1) 主要な抗酸化物質が異なる、2) LG の形成分解の機構が異なる、3) 分裂・再生能が異なる等の可能性があり、組織所見から酸化スト

スと防御機構の解釈をする上で今後留意すべき点と思われ、今後多数例の解析に反映させていく必要がある。

細胞レベルでの酸化ストレスについては培養細胞での ApoE の発現を今年度は検討した。中枢神経系での apolipoproteinE は従来 astrocyte でのみ産生されるかのような議論が続けられてきたが、本研究(上記方法、結果 B)により 1) neuron 由来の細胞が独立して ApoE を産生し得ること、2) neuron での ApoE 産生は酸化ストレス刺激によって増強すること、3) 虚血巣周辺の神経細胞では ApoE 様免疫活性が上昇していることが明らかになった。酸化ストレスによる細胞障害が起こっているのに ApoE 蛋白の産生は増加するという培養細胞での所見は、ヒト脳の虚血巣周辺の神経細胞で ApoE 免疫原性が上昇している事実と対応している可能性がある(以上 Stroke in press)。ApoE の生理的機能は十分に解明されていないが、アルツハイマー病(AD)を増悪させる因子としてばかりでなく、神経細胞の発生や再生に関与する分子として、治療的側面からも注目する研究が増えている。本研究では ApoE 陽性神経細胞は虚血病巣の周辺にみられており、完全な壊死には至らず快復の可能性をもった従来 penumbra と呼ばれてきた領域に対応している可能性がある。同領域では神経細胞死に至らしめる機構とそれに抗する機構が拮抗していると考えられるが、ApoE 蛋白の発現上昇は後者と関連していると思われる。ApoE は従来 astrocyte でのみ産生され、それ以外の細胞には二次的に取り込まれるとの推論がされてきた。本研究の結果はこれまでの推論とは異なり、神経細胞自体が *in vitro* および *in vivo* で ApoE 蛋白を発現していることを示している。神経細胞での ApoE の発現が障害された神経組織の再生等に関与しているとする、その発現調節を通して神経再生を促進するという治療的戦略が想定できる。しかし AD では ApoE は老人斑や神経原線維変化に沈着しており、ApoE はこれらの病変形成を促進している可能性も示唆されている。以上より ApoE の発現調節を合理的な治療戦略に結びつけるには疾患特異的な ApoE 発現細胞の同定が必須であり、病変と ApoE 発現細胞の関係を捉えることがその出発点となる。今後 ApoE 発現の酸化ストレスによる影響や、細胞による影響の違いを培養細胞を用いて検討する。並行して ApoE mRNA の局在をヒト剖検脳で同定し、病態特異的な ApoE 発現パターンを明らかにし、合理的治療法の開発に

必須の情報を提供する。

来年度以降は、多数例のノックアウトマウスの長期飼育を開始するとともに細胞レベルから個体レベルに渡る酸化ストレスのメカニズムを病態との関連からさらに幅広く、かつ詳細に包括的な検討を行う予定である。

E. 結論

本研究では α トコフェロール転送蛋白遺伝子ノックアウトマウスを多数作出し、VE欠乏が寿命や神経系にどのように影響を与えるかを検討する。初年度はマウスの作出をおこない、必要個体数を得た後 VE 欠乏食群と VE 正常食群に分けて長期に渉り飼育する。並行して、既に得られた少数例の検体を検索し、VE 欠乏に伴い副腎髄質にリポフスチン様顆粒が沈着することを見出した。またヒト神経組織由来の培養細胞に実験的酸化ストレス刺激を加え、apolipoproteinE(ApoE)蛋白の発現が上昇することを明らかにした。酸化ストレスに曝されている脳虚血巣の周囲でも ApoE 陽性の神経細胞が多数認められ、神経細胞は酸化ストレスに反応して *in vivo* でも ApoE を産生し、酸化ストレスによる障害に反応している。個体・細胞レベルでの検索を並行して進めることで、多数例を解析する視点を定める。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y. Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke*. (in press)
- Nagaoka U, Uchihara T, Iwabuchi K, Konno H, Tobita M, Funata N, Yagishita S, Kato T. Attenuated nuclear shrinkage in neurones with nuclear inclusions of SCA1 brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (in press)
- Shibuya K, Uchihara T, Nakamura A, Ishiyama M, Yamaoka K, Yagishita S, Iwabuchi K, Kosaka K. Reversible conformational change of tau-2 epitope exposed to detergent in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol*. (in press)
- Owada, K., Uchihara, T., Ishida, K., Mizusawa, H., Watabiki, S., Tsuchiya, K. Motor weakness and cerebellar ataxia in Sjogren syndrome-

identification of antineuronal antibody: a case report. *J Neurol Sci*2002;197:79-84

Tsuchiya, K., Ikeda, K., Mimura, M., Takahashi, M., Miyazaki, H., Anno, M., Shiotsu, H., Akabane, H., Niizato, K., Uchihara, T., Tominaga, I., Nakano, I. Constant involvement of the Betz cells and pyramidal tract in amyotrophic lateral sclerosis with dementia: a clinicopathological study of eight autopsy cases *Acta Neuropathol*2002;104:249-259

Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Kuroiwa, Y., Uchihara, T. Paradoxical absence of nuclear inclusion in cerebellar Purkinje cells of hereditary ataxias linked to CAG expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*2002;73:450-452

Sakamoto, M., Uchihara, T., Hayashi, M., Nakamura, A., Kikuchi, E., Mizutani, T., Mizusawa, H., Hirai, S. Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Exp Neurol*2002;177:88-94

Kumada, S., Uchihara, T., Hayashi, M., Nakamura, A., Kikuchi, E., Mizutani, T., Oda, M. Promyelocytic leukemia protein is redistributed during the formation of intranuclear inclusions independent of polyglutamine expansion: an immunohistochemical study on Marinesco bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*2002;61:984-991

Uchihara, T., Iwabuchi, K., Funata, N., Yagishita, S. Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates-A morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol*2002;178:124-128

Uchihara T, Tanaka J, Funata N, Arai K, Hattori T. Influences of intranuclear inclusion on nuclear size-a morphometric study on pontine neurons of neuronal intranuclear inclusion disease cases *Acta Neuropathol* 2003;105:103-108

2. 学会発表

内原俊記、中村綾子、新井哲明、池田研二、土谷邦秋、界面活性剤による tau2 エピトープの可逆的变化、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2002, 5.16)
渋谷克彦、内原俊記、中村綾子、石山宮子、

- 山岡恵子、柳下三郎、岩淵潔、小阪憲司、多系統萎縮症のグリア細胞体内封入体における tau2 免疫染色の界面活性剤による影響、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16)
- 内原俊記、岩淵潔、船田信顕、柳下三郎、CAG repeat 病における核内封入体の役割-SCA2, SCA3, DRPLA 橋核神経細胞における定量的検討-, 第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会(2002, 5.16)
- 坂本昌己、内原俊記、中村綾子、水谷俊雄、水澤英洋、Thiazin Red を用いた Glial cytoplasmic inclusion の線維形成状態の検討、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16)
- 中村綾子、内原俊記、中山宏、有馬邦正、森啓、水嶋節雄、同種一次抗体を用いた免疫(CARD9 二重染色の試み-cotton wool plaque 内外の Abeta40, Abeta42 エピトープの観察、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 143]
- 児矢野繁、内原俊記、岩淵潔、柳下三郎、宋時榮、田岡万悟、ラット脳における ataxin-1 結合蛋白 LANP の局在の再検討、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会、(2002, 5.16) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 171]
- 高橋純子、藤ヶ崎浩人、内原俊記、岩淵潔、田中順一、El-Hachimi, K.A., Bruni,A., Trottier,Y., de The,H., Hauw,J.-J.,Duyckaerts,C., Brice,A., ポリグルタミン病における核内封入体形成過程、特に PML との関係、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2002, 5.17) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 237]
- 馬原孝彦、内原俊記、土谷邦秋、池田研二、平野朝雄、加藤信介、岩本とし、高崎優、向井清、Alzheimer 病および Parkinson-dementia complex on Guam 例の海馬歯状回顆粒細胞における神経原線維変化の免疫組織化学的研究、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2002, 5.17) [Neuropathology, 22(suppl) (2002) 237]
- 岩淵潔、内原俊記、柳下三郎、岩田誠、Duyckaerts,C., Hauw,J.-J., サルペトリエール病院に現存する最も古い Marie 病の剖検例と Machado-Joseph 病の比較、第 43 回日本神経学会総会(2002, 5.29)
- 青木和子、内原俊記、中村綾子、池田研二、土谷邦秋、若山吉弘、脳梗塞巣における Aquaporin4 の発現、第 43 回日本神経学会総会 (2002, 5.29)
- 内原俊記、岩淵潔、船田信顕、柳下三郎、神経細胞変性におよぼす核内封入体の影響-ヒト剖検脳における定量的検討-, 第 43 回日本神経学会総会、札幌市 (2002, 5.30)
- 長岡詩子、内原俊記、岩淵潔、柳下三郎、今野秀彦、船田信顕、加藤丈夫、神経細胞の大きさへの核内封入体の影響-SCA1 剖検脳における定量的検討-, 第 43 回日本神経学会総会、札幌市 (2002, 5.31)
- 児矢野繁、黒岩義之、内原俊記、岩淵潔、柳下三郎、遺伝性脊髄小脳変性症の小脳における病理学的特徴(polyglutamine 蛋白の分布)、第 43 回日本神経学会総会 (2002,5.31)
- 小林高義、内原俊記、大橋健一、桜庭均、Sialidosis typeI 剖検脳の組織化学的、電顕的研究、第 43 回日本神経学会総会(2002, 5.31)
- 内原俊記、多重染色の限界と共焦点顕微鏡への応用、第 72 回関東臨床神経病理懇話会 特別講演、東京医科歯科大学 (2002, 7.27)
- 馬原孝彦、木内章裕、金谷潔史、岩本俊彦、高崎優、内原俊記、土谷邦秋、伊藤昭三、Alzheimer 病脳の神経原線維変化における 14-3-3 の免疫組織化学的検討、第 44 回日本老年医学会学術集会(2002, 6.12)
- 馬原孝彦、清水聰一郎、岩本俊彦、高崎優、内原俊記、土谷邦秋、平野朝雄、Alzheimer 病脳海馬歯状回顆粒細胞層における神経原線維変化の免疫組織化学的検討 - Parkinsonism-dementia complex of Guam 例との対比を含めて-, 第 44 回日本老年医学会学術集会(2002, 6.12)
- 内原俊記、Fraser, P., 中村綾子、St.George-Hyslop, P., ラット小脳形成過程におけるプレセニン 1 発現の変化、第 21 回日本痴呆学会 (2002, 10.3)
- 青木和子、内原俊記、中村綾子、小森隆司、新井信隆、水谷俊雄、Ballooned neuron における apolipoproteinE の発現-脳梗塞と変性疾患の違い-, 第 21 回日本痴呆学会、(2002, 10.4)
- 土谷邦秋、新里和弘、新井哲明、羽賀千恵、内原俊記、松下正明、池田研二、痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症(ALS-D)は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の一亜系である:8 剖検例の錐体路症状・上位運動ニューロン障害の臨床病理相関、第 21 回日本痴呆学会 (2002, 10.4)

H.知的財産権の出願・登録状況
特記すべきことなし