

200400750A



厚生労働省科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究員 小川 智

平成17(2005)年 5月

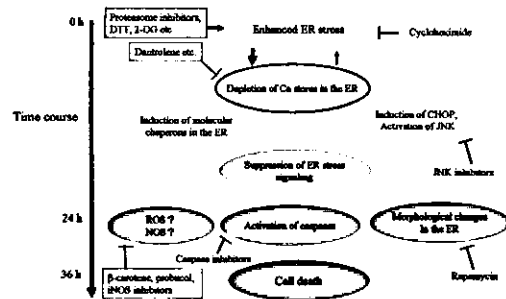
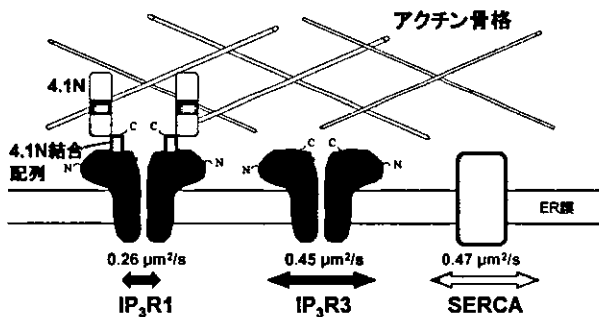
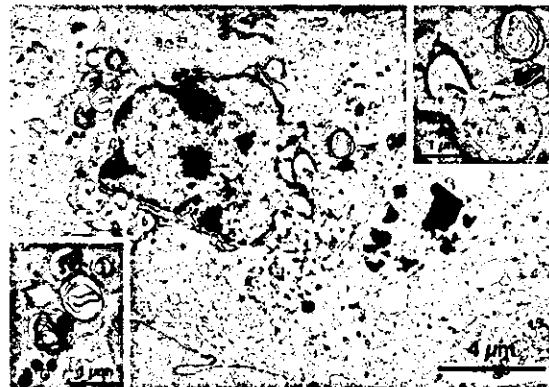
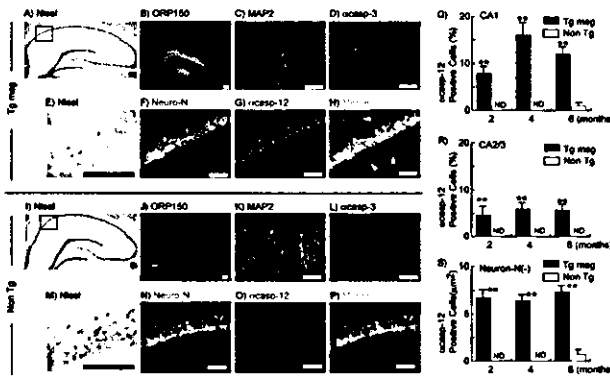


図2 F9 Hep KO cellsにおける、小胞体ストレス由来細胞死の制御

厚生労働省科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究員 小川 智

平成17(2005)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究 小川智	2
-------------------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 慢性神経変性を示す新規モデル動物の解析 小川 智、桃井 隆	8
-------------------------------------	---

2. F9 Herp欠損細胞における小胞体ストレス由来細胞死の制御 堀 修	12
--	----

3. 虚血後の霊長類脳にみられる神経再生 山嶋哲盛	15
------------------------------	----

4. 小胞体環境とオートファジー経路の解明 内山安男	20
-------------------------------	----

5. ミトコンドリア脳筋症における小胞体ストレス細胞死 桃井 隆	24
-------------------------------------	----

6. 神経細胞樹状突起における小胞体からのカルシウム放出機構の解析 井上 貴文	24
--	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	31
------------------	----

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)  
総括研究報告書

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究

主任研究者 小川 智 金沢大学大学院医学系研究科・教授

脳血管障害の根本原因とも言える神経細胞死について、病態の解明が進み予防法や治療法が確立すれば、その成果は単に脳血管障害に留まらず、幅広く「国民の脳を守る」ことに寄与する。本研究グループは小胞体環境の維持が神経細胞の生存にとってきわめて重要なこと、また、その破綻による神経細胞死が虚血だけでなく神経変性疾患にとっても、その病態生理を理解する上できわめて重要であることを示してきた。本年度は慢性的な小胞体ストレスも神経変性の病態生理に深く関与すること、小胞体ストレスからオートファジーに至る経路が、神経細胞死にとって重要な経路となっていることを示してきた。本年度はHerp/SUPノックアウト細胞を用いた薬剤の大量スクリーニングを開始し、さらにin-vivoでの実験系を組み合わせ、画期的新薬の開発を目指している。

◆分担研究者

内山安男  
大阪大学大学院医学系研究科・教授

山嶋哲盛  
金沢大学大学院医学系研究科・助教授、

井上貴文  
東京大学医科学研究所・助教授

◆研究協力者

桃井 隆  
国立精神神経センター・室長

堀 修  
金沢大学大学院医学系研究科・助教授

A. 研究目的

虚血性神経細胞死だけでなく神経変性疾患にも共通する細胞死のメカニズムとして小胞体の機能異常が注目されている。図示した活性酸素やNOなどにより小胞体に折りたたみ異常蛋白が蓄積すると、神経細胞は①ORP150に代表されるストレス蛋白の発現、②蛋白新生の抑制、③蛋白分解系の活性化などの経路により小胞体の

付加を軽減しようとする。これら一連の負荷応答が不成功に終わった場合、神経細胞死が起こると考えられる。申請者らは、小胞体ストレス蛋白のクローニング、小胞体Ca<sup>++</sup>保持機能の可視化、分解系の超微細観察を介して、小胞体ストレスと神経細胞死にかんして先駆的業績を挙げてきた。本研究では、申請者らが見いだしたこれら小胞体のストレス蛋白を中心にして、神経細胞において小胞体機能を制御することが神経細胞死を抑制することにつながることを示し、さらに小胞体ストレスを軽減することにより、神経細胞死を抑制する戦略と見いだすことを目的とする。

研究者らは、1)パーキンソン病、虚血、アルツハイマー病などが小胞体に負荷を与えること、2)これが小胞体環境の悪化をきたし、3)小胞体近傍でのオートファジー経路の活性化により、4)さらなる小胞体障害を引き起こす、ことを示してきた(悪性サイクル:青で囲んでしめす)。さらに、小胞体環境改善剤とERからのCa<sup>++</sup>放出制御剤を見いだすことによって、脳虚血だけでなく神経変性疾患にも共通する神経細胞死機構の制御を目指す。

B. 研究方法、および結果

①慢性神経変性を示す新規モデル動物の解析

(Neuroserpinopathyのモデルとしてのメグシントランスジェニックラットの解析)

$\alpha_1$ アンチトリプシン欠損症は遺伝子変異により小胞体で正常にfoldingされずに小胞体内に異常アンチトリプシンが蓄積、小胞体負荷をもたらす疾患で、中枢神経系でも神経回路の可塑性に関与するセリンプロテアーゼ、およびその阻害ペプチドの変異はneuroserpinopathyと呼ばれる神経変性疾患を呈する。セリンプロテアーゼ阻害ペプチドであるメグシンを全身発現させたメグシントランスジェニックラット(Tg Meg)は、ヘテロ接合体は、生後12ヶ月で、行動テストにて記憶力低下を示した。

Tg Megでは、Non Tgと比較して、生後2-6ヶ月にかけて海馬全体でORP150の発現上昇を認め、これに一致してCA1領域で、活性化型caspase-12およびcaspase-3のシグナルも増加していた。CA3でも若干のシグナル増強を認めた。また、Neuro-N抗体で染色されない細胞、すなわち神経細胞以外の細胞でもTg Mrgでは活性化型caspase-12の陽性シグナルを検出した。

海馬CA1領域では、通常でも興奮性アミノ酸によって常に小胞体負荷がかかった状態にあると考えられる。前回の我々の報告でもORP150ノックアウトマウスでは興奮性アミノ酸の負荷によってCA1領域の神経細胞死が見られた。Tg Megでは、慢性的なかつ繰り返す興奮性アミノ酸の負荷と小胞体負荷によりこの部位での神経細胞死が緩やかに進んでいくと考えられた。

#### ②F9 Herp欠損細胞における小胞体ストレス由来細胞死の制御

神経変性疾患の少なくとも一部は、小胞体ストレス・小胞体ストレス由来細胞死が深く関与していると考えられる。我々は、昨年度、このような神経変性疾患をターゲットにした、新たな薬剤スクリーニング系を開発した。Herp遺伝子欠損F9細胞が小胞体ストレスに脆弱性(Genes to Cells, 2004, 9, 457-469)を示すことを利用して、小胞体ストレス由来細胞死を抑制する化合物を探索するもので、本年度は、実際に既知(約20種類)及び未知の化合物(約120種類)について、その小胞体ストレス由来細胞死抑制効果を検討した。

抗酸化剤のうち、N-アセチルシステインやグルタチオンなどには細胞死抑制効果を認めなかったが、b-カロテインや $\alpha$ -トコフェロール、プロブコールに細胞死抑制効果を認め、また、iNOSの阻害剤1400Wや、誘導剤ラパマイシンにも一定の細胞死抑制効果を認めた。更に、これらの結果をふまえて、これまで約120種類の未知の化合物について、その細胞死抑制効果を測定した所、8種類の化合物についてダント

ロレン以上の細胞死抑制効果を認めた。

F9 Herp欠損細胞を用いた小胞体機能改善薬のスクリーニング系により得られる化合物は、小胞体機能異常を改善するのみならず、他の細胞内異常に対しても改善効果を示す。今後、より神経疾患のモデルにより近い形で、これらの候補化合物の有効性につき、検討していきたい。

#### ③虚血後の霊長類脳にみられる神経再生

虚血負荷によって惹起される霊長類の神経再生現象を明らかにすることである。一過性の脳虚血負荷を与えた二ホンザルにプロモデオキシウリジン(BrdU)を投与した後、3ヶ月間にわたり海馬、側脳室下帯、線状体、嗅索、大脳皮質のBrdU陽性細胞を検索し、そのimmunophenotypeを特異的な細胞マーカーを用いてレーザー共焦点顕微鏡により検索した。

●側脳室下帯における虚血負荷後の神経再生：虚血後4、9、15日の短期観察群においては、対象群に比し、虚血9日目をピークにBrdU陽性細胞が有意に増加していた。

●虚血後3ヶ月間続く側脳室下帯の神経再生：側脳室下帯の一部すなわち被殻側、背側端および前側端においては、対象群に比し、虚血後23、44、79日の長期観察群のいずれにおいてもBrdU陽性細胞が有意に増加していた。

●虚血後の線状体と大脳皮質において増えるのは、大部分がグリア細胞である：虚血後の線状体と大脳皮質において増加していたBrdU陽性細胞は、いずれの時期においても、その約80%はIbal陽性のミクログリアであり、約10%はS100b陽性の星状膠細胞(アストロサイト)であった。

●しかし、非常に少数ではあるが、神経細胞も誕生していた：わずか1%程度のきわめて少数ではあったが、BrdU/NeuN陽性の成熟神経細胞は、大脳皮質ではTbr1に、また被殻においてはIslet1やGABAニューロンのマーカーであるGADに陽性であった。

成熟脳においてprogenitor cellを制御し得る分子機構を解析すれば、「種」や「年齢」「病気」による差異を越えた本質的な神経再生メカニズムを究明し得るし、ヒトの脳神経疾患の治療に現実に役立つデータも得られるであろう。平成17年度の厚生科研費によって、上記のメカニズムを研究する予定である。

#### ③小胞体環境とオートファジー経路の解明

オートファジーは、細胞が自らの構成成分を小胞体様の隔離膜で囲い込み、一般細胞質から隔離し、リソソームと融合することによって分解する現象であり、正常の細胞では代謝の恒常性

維持に必須の現象である。オートファジーが誘導されることで細胞死が起きる時に、オートファジー現象によって細胞死が起きるのか、オートファジーによって次の何かが誘発されて細胞死に繋がるのか、現在は全く不明である。本研究では、一過性脳虚血後の海馬CA1錐体細胞の遅延型神経細胞にオートファジーがいかに関与するのかを、オートファジーのマーカーであるLC3にGFPを融合したGFP-LC3を発現するマウスを用いて解析した。

GFP-LC3を発現するマウスに低酸素-脳虚血を負荷して、海馬CA1錐体細胞の変化を見た所、GFP-LC3陽性の顆粒が増えること、また、TUNEL陽性の錐体細胞には必ずGFP-LC3顆粒が見られることが分かった。また、電顕でも核の変化を示すCA1錐体細胞には、たくさんのオートファジー小体が認められた。これらの事実は、オートファジーの誘導が細胞死に必須の現象であることを示している。先に示した通り、細胞死を引き起こす因子としてのカテプシンDはオートファジーの顆粒で働く可能性があることが推測される。以上より、同遅延型神経細胞死には、LC3陽性の顆粒が誘導され、オートファジーがその死に必須であることが分かった。

#### ④ミトコンドリア脳筋症における小胞体ストレス細胞死

ミトコンドリア脳筋症MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)は3243A→Gの遺伝子変異が高い頻度で見られ、ミトコンドリアのATP合成機能の欠損とこの疾患との関連が注目されている。われわれはERストレス細胞死にもミトコンドリアを介する細胞死の経路が関与することを報告してきた。

ERADにおけるユビキチン・プロテアソーム分解系はATP依存性の分解系である。MELAS疾患筋細胞から0%と80%異常ミトコンドリアを保有する細胞株をクローニングし、カスパーゼ4の活性化型に反応する抗体を作製して、MELASにおけるATP合成欠損とERストレス細胞死との関係について解析を行った。変異ミトコンドリアDNA(mtDNA)量が0%, 50%, 70%, 80%以上と異なる量からなるクローン細胞を用いてグルコース欠乏条件下におけるチトクロームcの放出およびカスパーゼ3、カスパーゼ9、カスパーゼ4の活性化を検討した。その結果、正常細胞と異なり、mtDNA量が約80%以上のクローン(2D2)ではチトクロームcのミトコンドリアからの細胞質への放出とカスパーゼ3、9の活性化が確認された。一方、ERストレス細胞

死に関与するカスパーゼ4の活性化についても、クローン(2D2)で起きていることが観察された(図2)。また、グルコース欠乏が誘導する細胞死はカスパーゼ4の発現をsiRNAで抑制することによって、抑制が可能であった。正常細胞にくらべ、2D2細胞はツニカマイシン、サブシガルジンに対する感受性が高く、低濃度でカスパーゼ4の活性化が誘導された。

グルコースの欠乏はオートファジーの誘導を促進することが知られており、最近オートファジーは恒常的な蛋白分解にも関与していることが明らかになっている。オートファジー形成はユビキチン・プロテアソーム分解系と同様ATP依存性であることから、ATPの欠乏は2D2細胞のオートファジー形成をも抑制し、その結果、不要蛋白の蓄積凝集が、ERストレスを誘導している可能性も考えられ、ERストレスとオートファジー形成との関係について検討を進めている。

#### ⑤神経細胞樹状突起における小胞体からのカルシウム放出機構の解析

細胞内カルシウム放出チャンネルである1型イノシトール3リン酸受容体(IP3R1)は小脳プルキンエ細胞に非常に豊富に発現しており、ERからのカルシウム放出の主要な機能を担っている。本研究は、このシナプス入力により駆動されるカルシウム動員機構を詳細に解明することを目的とする。さらにカルシウム放出機構の基盤である小胞体およびカルシウム放出チャンネルそのもののダイナミクスの解明もあわせて行う。樹状突起のER膜上に存在するER膜タンパク質の動態をFRAP(fluorescence recovery after photobleach)法にて検討したところ、アクチン骨格によりER膜タンパクの拡散が負に制御されていることを見いだした。この現象は他のER膜タンパク(SERCA、3型IP3受容体)には見られず、1型IP3受容体(IP3R1)に特有であった。さらにこの負の制御はアクチン・スペクトリン結合タンパク4.1NとIP3R1との結合によりもたらされていることをつきとめた(Fukatsu et al., 2004)。神経細胞樹状突起はそれ自体が複雑な構造を持ち、小区画ごとに独立の情報処理をした上で、細胞体に加工した情報を送っている。こうした現象にERはカルシウム放出を通じて大きな役割を果たしている。本研究ではカルシウム放出能そのものが発生過程を通じて制御されていることを明らかにし、また、カルシウム放出チャンネルそのものの動態の制御という概念を提唱した。今後ERのカルシウム放出能及びカルシウム放出チャンネルの動態を更に詳細に明らかにしてゆくことは、生理的あるいは病理的状态でのER機能を理解・制御するための重要な基盤にな

ると考えている。

#### D. 考察

本研究グループは小胞耐環境の改善によって神経細胞死を救う、と言う研究目的のため、本年度は、以下の実験成果を得た。

- 慢性小胞体ストレスによる神経変性モデルの確立。
- 細胞レベルで小胞体由来細胞死を抑制しうる薬剤のスクリーニング系の確立。
- 霊長類を用いた慢性虚血性神経細胞死・再生モデルの確立。
- ミトコンドリアから小胞体への負荷伝搬。
- 小胞体由来の神経細胞死におけるオートファジー経路の同定。
- 小胞体からのCa<sup>++</sup>流出機構の詳細な解析方法の確立と、小胞体の機能を評価するツールの開発。

また、本年度はParkinson病の病原遺伝子であるPael受容体による黒質線条体ニューロン細胞死モデルを開発中である。上記のモデルにより小胞体環境を制御し神経細胞死を抑制しうる薬剤を開発するとともに、これらの薬効を同定するための基礎研究も進めている。

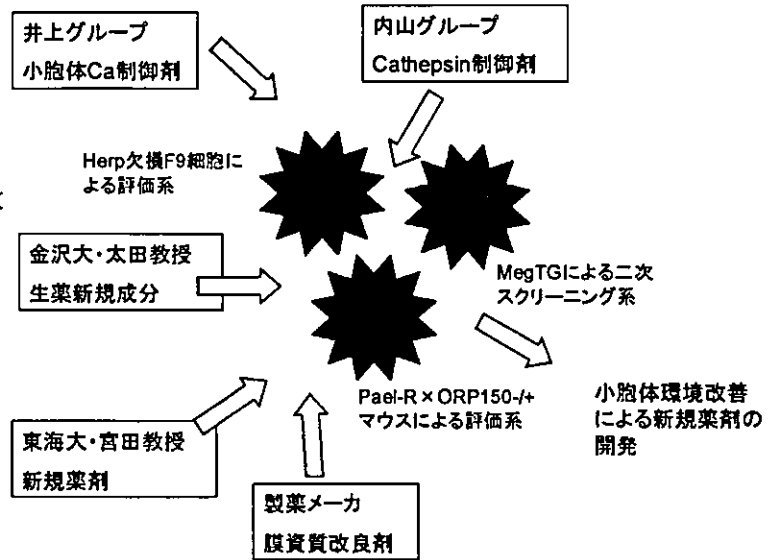


図1. 本研究チームにおける新規薬剤の開発戦略  
Herp欠損F9細胞を用いた一次スクリーニング系、動物実験モデルを用いた二次スクリーニング系を開発し、小胞体制御可能な新規薬剤のスクリーニングを行う。

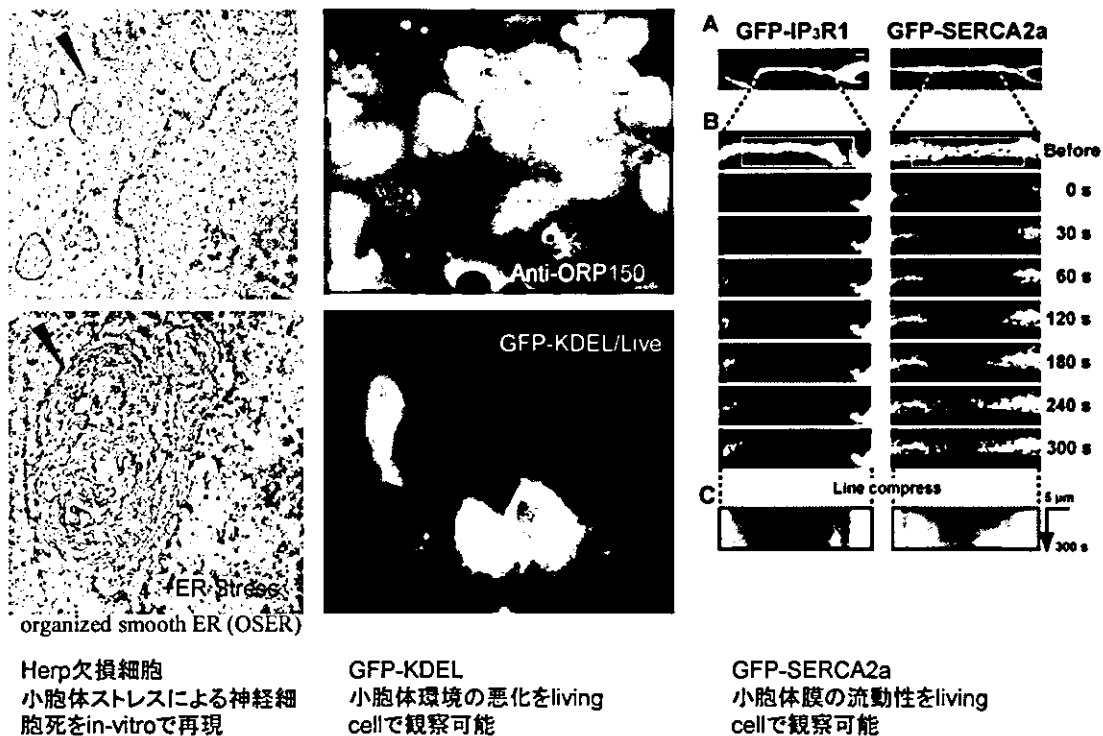


図2. 小胞体環境を可視化するツールの開発



## E. 結論

小胞体環境の維持が神経細胞の生存にとってきわめて重要なこと、また、その破綻による神経細胞死が虚血だけでなく神経変性疾患にとっても、その病態生理を理解する上できわめて重要であることを示している。本年度は、ストレス蛋白の欠損細胞やノックアウトマウスでの病態モデルが、薬剤のスクリーニング系として有効であることを示し、さらに小胞体環境の悪化による神経細胞死を抑制しうる薬剤のスクリーニングを開始した。

## F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表(抜粋)

### 1. 論文発表

1. Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci.* 2004; 24: 1486-96
2. Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.* 2004; 18: 1401-3.
3. Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. *Genes Cells.* 2004 :457-469
4. Nakagomi T, Kitada O, Kuribayashi K, Yoshikawa H, Ozawa K, Ogawa S, Matsuyama T. The 150-kilodalton oxygen-regulated protein ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1279-1288
5. Bando Y, Katayama T, Taniguchi M, Matsuo N., Ishibashi T., Ogawa S., Tohyama M. RA410/Sly1 suppresses MPP+ and 6-hydroxydopamine induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neurobiology of Disease* 2005; 18: 143-151
6. Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S. The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2005; 54(3): 657-63
7. Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus.* 2004; 14(7): 861-875.
8. Takahashi N, Tonchev AB, Koike K, Murakami K, Yamada K, Yamashima T, Inoue M. Expression of estrogen receptor-beta in the postischemic monkey hippocampus. *Neurosci Lett.* 2004; 369(1): 9-13.
9. Yamashima T. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium.* 2004; 36(3-4): 285-293.
10. Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, Hagberg H, Blomgren K (2005) The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 12:162-176
11. Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Matsuda T, Suzuki K, Inoue H, Matsumoto M, Ogawa W, Maeda S, Uchiyama Y, Ohno S, Noda T, Kasuga M (2005) PKC $\delta$  in pancreatic  $\beta$ -cells mediates glucose-induced insulin secretion via the regulation of gene expression. *J Clin Invest* 115:138-145
12. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S (2004) Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice. *Science* 304:1147-1150
13. Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Suhara T, Uchiyama Y, Okano H. (2004) Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci Lett.* 363:33-37
14. Shimamura M., Sato N., Ohshima K., Aoki M., Kurinami H., Waguri S., Uchiyama Y., Ogiwara T., Kaneda Y., Morishita R. (2004) Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* 109: 424-431
15. Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat.* 28, 101-105, 2004
16. Nakamoto Y, Suda T, Momoi T, Kaneko S. Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. *Cancer Res.* 64, 3326-3333, 2004
17. Ganguly A., Oo TF, Rzhetskaya M, Pratt R, Yarygina O, Momoi T, Kholodilov N, Burke RE, CEP11004, a novel inhibitor of the mixed lineage kinases, suppresses apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 8, 8469-8480, 2004.
18. Yoneda K, Furukawa T, Zheng YJ, Momoi T, Izawa I, Inagaki M, Manabe M, Inagaki N. An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to tumor necrosis factor alpha-mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex. *J Biol Chem.* 279, 7296-7303, 2004.
19. Miwako Iwai, Yoko Tateishi, Mitsuharu Hattori, Akihiro Mizutani, Takeshi Nakamura, Akira Futatsugi, Takafumi Inoue, Teiichi Furuichi,

- Takayuki Michikawa, Katsuhiko Mikoshiba. Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 10305-10317 (2005).
20. Yoko Tateishi, Mitsuharu Hattori, Tomohiro Nakayama, Miwako Iwai, Hiroko Bannai, Takeshi Nakamura, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 6816-6822 (2005).
21. Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Songbai Zhang, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is regulated by actin filaments and 4.1N in neuronal dendrites. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:48976-48982 (2004).
22. Iskandar Ismailov, Djanenkhodja Kalikulov, Takafumi Inoue, Michael J. Friedlander. The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of Neuroscience*, 24:9847-9861 (2004).
23. Chihiro Hisatsune, Yukiko Kuroda, Kyoko Nakamura, Takafumi Inoue, Takeshi Nakamura, Takayuki Michikawa, Akihiro Mizutani, Katsuhiko Mikoshiba. Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:18887-18894 (2004).
24. Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Tomohiro Nakayama, Mitsuharu Hattori, Katsuhiko Mikoshiba. Kinesin dependent, rapid, bidirectional transport of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor containing particles in the dendrite of hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 117:163-175 (2004).
- cathepsins B and L. SFN meeting in San Diego
6. Shibata M, Koike M, Waguri S, Uchiyama Y (2004) Suppression of LC3, an autophagy marker protein, in PC12 cells by the siRNA method. SFN meeting in San Diego
7. C. Hisatsune, Y. Kuroda, T. Torashima, H. Hirai, T. Inoue, K. Mikoshiba. Implication of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 1-mediated signaling in the regulation of dendritic outgrowth of Purkinje cells. 34th Annual Meeting of the Society of Neuroscience, San Diego, October 23-27 (2004).
8. 深津和美, 坂内博子, 張松柏, 中村秀樹, 井上貴文, 御子柴克彦. アクチン、4.1NによるIP3受容体タイプ1の拡散制御. 日本生物物理学会第42回年会, 京都, 12月13-15日 (2004).
9. 坂内博子, 深津和美, 水谷顕洋, 夏目徹, 家村俊一郎, 池上徹, 井上貴文, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起における微小管依存的なRNA結合タンパク質SYNCRIPの輸送 -mRNA顆粒の構成要素として-. 日本生物物理学会第42回年会, 京都, 12月13-15日 (2004).
10. 松浦徹, 吉田学, 井上貴文, 宮脇敦史, 道川貴章, 御子柴克彦. イノシトール1,4,5三リン酸濃度変化の時空間的解析. 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月8-11日 (2004).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

2. 学会発表

1. 小川智ほか、ER-stress and neuronal cell death. 神経科学・神経化学合同大会 2004年9月大阪
2. Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of a ubiquitin-like protein in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. 米国細胞生物学会、2004 サンフランシスコ
3. 九州大学生体防御研究所セミナー 招待講演 山嶋哲盛: 「神経細胞死のメカニズム: カルパイン-カテプシン仮説」 平成16年2月23日、九州大学、博多
4. 国立精神・神経センター COE国際シンポジウム「神経の発生と可塑性」講演 山嶋哲盛: 「Mechanism of ischemic neuronal death」
5. Koike M, Shibata M, Waguri S, Kominami E, Peters C, Figura K, Saftig P, Uchiyama Y (2004) Neuropathological features of mouse brains lacking

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)  
分担研究報告書

慢性神経変性を示す新規モデル動物の解析  
Neuroserpinopathyのモデルとしてのメグシントランスジェニックラットの  
解析

主任研究者 小川 智  
共同研究者 桃井 隆

研究要旨

セリンプロテアーゼの遺伝子変異により異常なセリンプロテアーゼが小胞体内に蓄積する疾患はserpinopathyと総称される。セリンプロテアーゼ阻害ペプチドであるメグシンを全身発現させたメグシントランスジェニックラット(Tg Mrg)は、そのホモ接合体は腎不全や糖尿病などの全身疾患を呈し、若年にて死亡するが、ヘテロ接合体は、正常に生育するものの、生後12ヶ月で、行動テストにて記憶力低下を示した。Tg Mrg(ヘテロ接合体)より得られた神経細胞はカルシウム代謝異常を示し、アストロサイトは低酸素環境にてより脆弱であり、その細胞死には小胞体ストレス蛋白の発現上昇とcaspase-12の活性化を伴った。Tg Mrgでは生後2-4ヶ月で海馬CA1領域にcaspase-12の活性化、4-6ヶ月でcaspase-3の活性化を示し、同領域における神経細胞密度の低下を示した。さらにcaspase-12の活性化は黒質緻密層でもみられ、チロシン水酸化酵素(TH)染色陽性の神経細胞の密度減少を伴っていた。以上の事実は、メグシンの過剰発現によって慢性的に小胞体負荷のかかった神経細胞で慢性的かつ緩徐な細胞死が起こることを示している。

A. 研究目的

$\alpha_1$ アンチトリプシン欠損症は、遺伝子の欠損ではなく $\alpha_1$ アンチトリプシンの遺伝子変異により小胞体で正常にfoldingされずに小胞体内に異常アンチトリプシンが蓄積、小胞体負荷をもたらす疾患で、同様の疾患はserpinopathyと総称される。中枢神経系でも神経回路の可塑性に関与するセリンプロテアーゼ、およびその阻害ペプチドの変異はneuroserpinopathyと呼ばれる神経変性疾患を呈することが知られている。メグシンは東海大学の宮田らによって腎糸球体上皮細胞において発現しているセリンプロテアーゼ阻害ペプチドとしてクローニングされた。非常に興味深いことに、メグシンを強制発現させたトランスジェニックラットのホモ接合体では、加齢に伴って、糖尿病、腎不全、低蛋白血症、呼吸器障害などを呈し12週齢以前に死亡するためserpinopathyのモデルであると考えられる。これに対して、Tg Megのヘテロ接合体では生後12ヶ月を経ても主たる臓器異常は見られない。ところが中枢神経系の詳細な観察では、海

馬や黒質緻密層(SNpc)において、ORP150をはじめとする小胞体ストレス蛋白の発現上昇、caspase-12などの細胞死関連酵素の活性化がみられ、神経細胞密度の減少がみられることが明らかになった。

B. 研究方法

- 1) ERストレス蛋白、細胞死マーカーを用いた免疫組織染色  
Tg Mrgヘテロ接合体ラット(以下、Tg Megと略す)およびコントロールとしてメグシントランスジェンを持たない野生型ラット(Non Tgと略す)を用い、生後2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月の時点で灌流固定し、海馬領域の免疫組織染色(抗ORP150抗体、抗MAP2抗体、抗活性化型caspase-3、抗Neuro-N抗体)を用いた免疫組織染色を行った。
- 2) 培養アストロサイトを用いた検討  
生後すぐのTg MegおよびNon Tgラット脳よりアストロサイトを分離培養し、2次培養の後、以下の実験に供した。アストロサイトを最長48

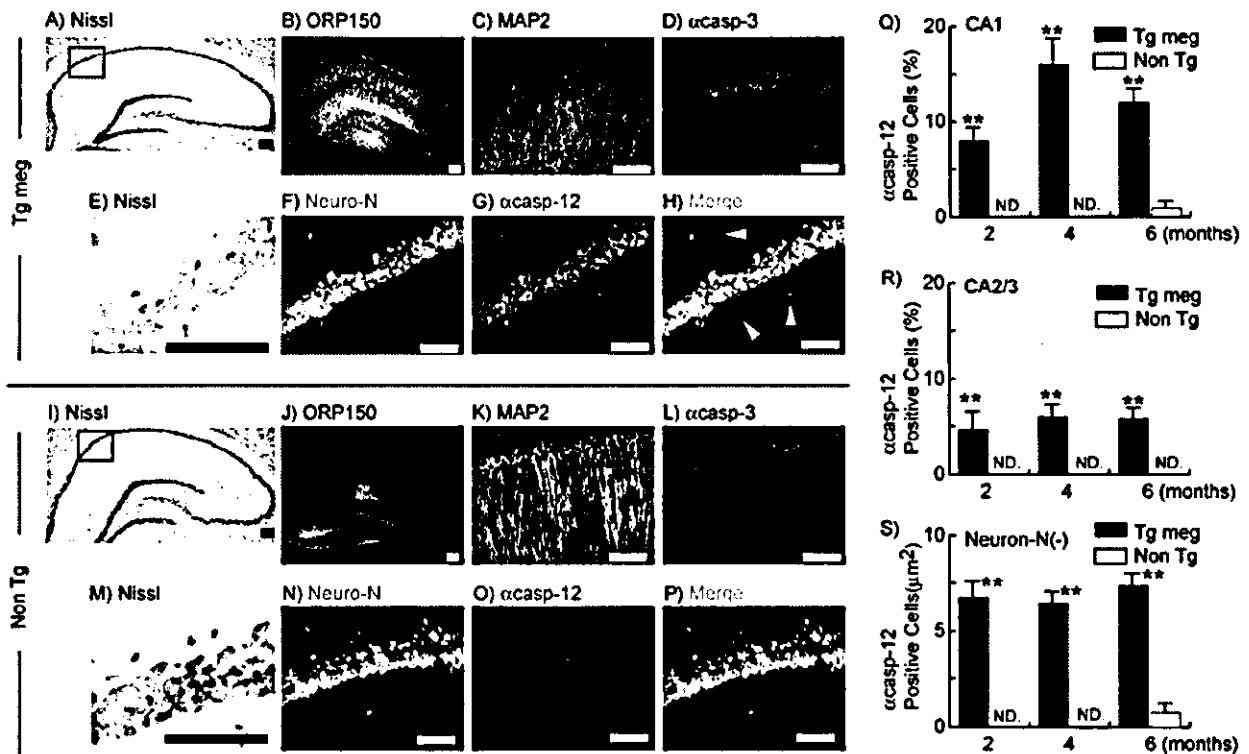


図1: メグシンを過剰発現させたラットではCA1領域で神経細胞死が加速する。

Tg Mrgでは、Non Tgと比較して、生後2-6ヶ月にかけて海馬全体でORP150の発現上昇を認め、これに一致してCA1領域で、活性化型caspase-12およびcaspase-3のシグナルも増加していた。CA3でも若干のシグナル増強を認めた。また、Neuro-N抗体で染色されない細胞、すなわち神経細胞以外の細胞でもTg Mrgでは活性化型caspase-12の陽性シグナルを検出した。

時間まで低酸素環境に暴露し、そのviabilityをLive and dead方にて評価した。また、ORP150、GRP78、活性化型caspase-12を認識する抗体、およびb-actin抗体を用いたWestern blotを行った。低酸素暴露後18時間の細胞を用いてGRP78およびメグシンに対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、小胞体での蛋白分解を阻害する物質としてLactacystinを用いた。さらに、低酸素環境下でのメグシンの細胞内分布を確認する目的でOptiPrepによる密度勾配用によって小胞体分画とゴルジ分画を分離し、dotプロットを行った。局在マーカとしてそれぞれ、calnexin抗体(小胞体)とTGN38抗体(ゴルジ装置)を用いた。また、強制発現されたメグシンが小胞体から処理される過程を分析するためユビキチンを用いた免疫沈降を行った。

### C. 研究結果

#### 1)海馬CA1領域における神経細胞死(図1)

Tg Mrgでは、Non Tgと比較して、生後2-6ヶ月にかけて海馬全体でORP150の発現上昇を認め、これに一致してCA1領域で、活性化型

caspase-12およびcaspase-3のシグナルも増加していた。CA3でも若干のシグナル増強を認めた。また、Neuro-N抗体で染色されない細胞、すなわち神経細胞以外の細胞でもTg Mrgでは活性化型caspase-12の陽性シグナルを検出した。

#### 2)細胞死とメグシンの細胞内分布(図2)

Tg Megより得られたアストロサイトは低酸素環境で、Non Tgより得られた細胞に比し明らかな脆弱性を示した。また、Western blotでは、Tg Mrg由来のアストロサイトではORP150やGRP78などの小胞体ストレス蛋白の発現上昇が明らかであり、さらに低酸素暴露24時間後でcaspase-12の活性化を認めた。また、メグシンの細胞内分布は低酸素負荷前はGRP78のそれと一致する小胞体パターンを示し、低酸素暴露後は核周囲に凝集する傾向が見られ、これはLactacystin添加による変化に類似していた。さらに、OptiPrepによる細胞分画では低酸素暴露前には小胞体とゴルジ装置に連続的に分布していたメグシンが、低酸素環境では小胞体に局在する傾向を示した。またユビキチンを用いた免疫沈降では、メグシンが低酸素暴露にかかわらず、ユビキチン化され、小胞体から分解輸送さ

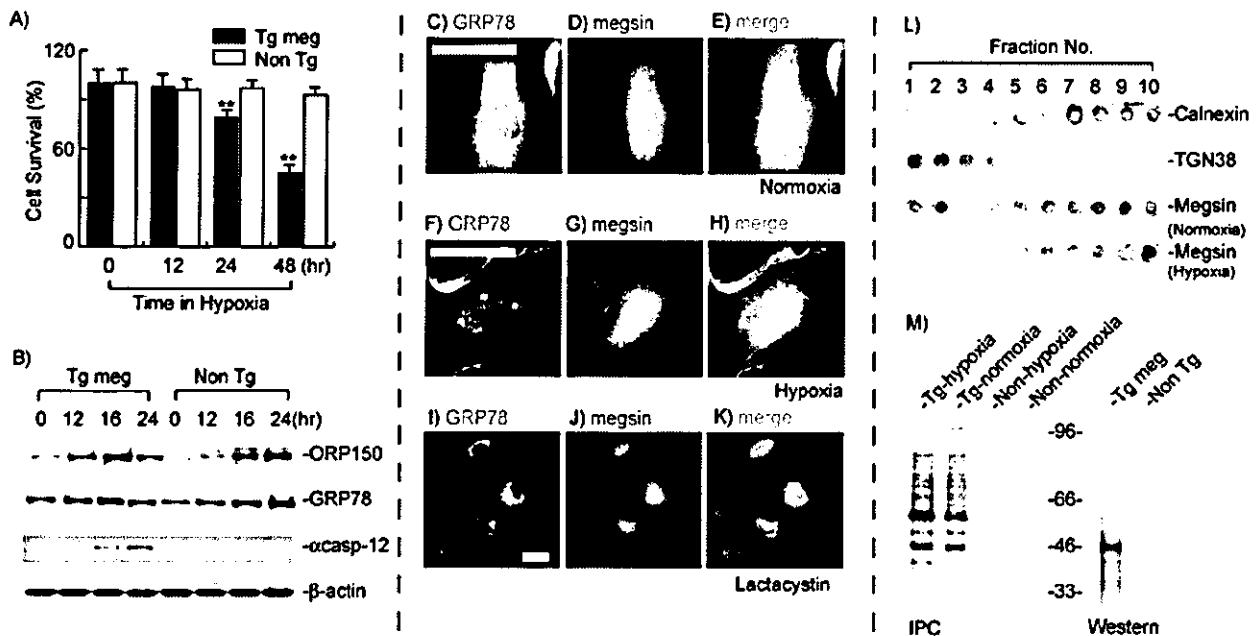


図2: メグシンを過剰発現させたラットではCA1領域で神経細胞死が加速する。

Tg Megより得られたアストロサイトは低酸素環境で、明らかな脆弱性を示した(A)。Tg Meg由来のアストロサイトではORP150やGRP78などの小胞体ストレス蛋白の発現上昇が明らかであり、低酸素暴露24時間後でcaspase-12の活性化を伴った(B)。メグシンの細胞内分布は低酸素暴露後は核周囲に凝集する傾向が見られた(C-K)。OptiPrepによる細胞分画では、低酸素環境では小胞体に局在する傾向を示した(L)。メグシンが低酸素暴露にかかわらず、ユビキチン化され、小胞体から分解輸送されていることが明らかとなった(M)。

れていることが明らかとなった。

#### D. 考察

小胞体に不必要な蛋白が蓄積した場合ERAD (ER-associated degradation)と呼ばれる機構により細胞質に引き出され、蛋白分解を受けることが知られている。Tg Megにおけるメグシンは、通常でもこのERADにより分解されていると考えられるが、低酸素などの環境変化によって小胞体機能の維持が困難になった場合、小胞体のfolding capacityを超え、細胞死に至ると考えられる。海馬CA1領域では、通常でも興奮性アミノ酸によって常に小胞体負荷がかかった状態にあると考えられる。前回の我々の報告でもORP150ノックアウトマウスでは興奮性アミノ酸の負荷によってCA1領域の神経細胞死が見られた。Tg Megでは、慢性的なかつ繰り返す興奮性アミノ酸の負荷と小胞体負荷によりこの部位での神経細胞死が緩やかに進んでいくと考えられた。

#### E. 結論

メグシントランスジェニックラット(Tg Meg)を

小胞体ストレスによって慢性・進行性に神経病変の進むneuroserpinopathyのモデルとして確立した。これによって小胞体機能障害を起源とする神経変性疾患の薬効の評価が可能になる。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci.* 2004; 24: 1486-96
- Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Hirota A, Yutani A, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, and Kitakaze M. Prolonged ER Stress in Hypertrophic and Failing Heart Following Aortic Constriction: Possible Contribution of ER Stress to Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circulation.* 2004; 110: 705-12
- Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa

- S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.* 2004; 18: 1401-3.
4. Nakagomi T, Kitada O, Kuribayashi K, Yoshikawa H, Ozawa K, Ogawa S, Matsuyama T. The 150-kilodalton oxygen-regulated protein ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1279-1288
5. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem.* 2005; 280 (1): 847-851
6. Bando Y., Katayama T., Taniguchi M., Matsuo N., Ishibashi T., Ogawa
7. S., Tohyama M. RA410/Sly1 suppresses MPP+ and 6-hydroxydopamine induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neurobiology of Disease* 2005; 18: 143-151
8. Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S. The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2005; 54(3): 657-63
9. Aleshin AN, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Bando Y, Ono M, Memon IA, Tohyama M, Ogawa S, and Matsuda H. 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38(3): 517-25.

## 2. 学会発表

小川智ほか、ER-stress and neuronal cell death.  
神経科学・神経化学合同大会 2004年9月大阪  
ほか

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)  
分担研究報告書

F9 Herp欠損細胞における小胞体ストレス由来細胞死の制御

共同研究者 堀 修

研究要旨

Herp欠損F9細胞が小胞体ストレスに脆弱性 (Genes to Cells, 2004, 9, 457-469)を示すことを利用して、既知(約20種類)及び未知の化合物(約120種類)について、その小胞体ストレス由来細胞死抑制効果を検討した。ポジティブコントロールとして、これまで既存の化合物の中で最も強い細胞死抑制効果を認めているダントロレンを使用した。既存化合物のうち、b-カロテイン等の脂溶性抗酸化剤の一部に、ダントロレンと同等の細胞死抑制効果を認め、iNOS阻害剤1400Wやオートファジー誘導剤ラパマイシンに中等度の細胞死抑制効果を認めた。これら事は、Herp欠損F9細胞における小胞体ストレス・小胞体ストレス由来細胞死が、様々な経路で制御されていることを示唆している。また、複数の未知化合物に、ダントロレン以上の細胞死抑制効果を認めた。

A. 研究目的

パーキンソン病やアルツハイマー病、ポリグルタミン病と言った、神経変性疾患の少なくとも一部は、小胞体ストレス・小胞体ストレス由来細胞死が深く関与していると考えられる。我々は、昨年度、このような神経変性疾患をターゲットにした、新たな薬剤スクリーニング系を開発した。Herp遺伝子欠損F9細胞が小胞体ストレスに脆弱性 (Genes to Cells, 2004, 9, 457-469)を示すことを利用して、小胞体ストレス由来細胞死を抑制する化合物を探索するもので、本年度は、実際に既知(約20種類)及び未知の化合物(約120種類)について、その小胞体ストレス由来細胞死抑制効果を検討した。

B. 研究方法

- 1.96穴、或いは24穴カルチャープレートにゼラチンコートした後、Herp欠損F9細胞、及びコントロールとして野生型F9細胞を播種する。
- 2.2日間、或いは細胞が培養面積の50-60%を占めるまで培養を行う。
- 3.上記細胞に、小胞体ストレス条件下(例えばツニカマイシン0.8mg/mlで細胞処理)で、被験物質を加えて48時間培養する。

- 4.細胞生存、及び細胞死をcell counting-8 assay及びLIVE/DEAD assayにより測定する。

C. 研究結果

図1に、既知の化合物のうち、本年度新たに測定したものの結果を示す。通常培養条件下(ツニカマイシン非存在下)及びツニカマイシン投与下での生存細胞の数をcell counting-8を用いて測定し、% of controlの形で表した。抗酸化剤のうち、N-アセチルシステインやグルタチオンなどには細胞死抑制効果を認めなかったが、β-カロテインやα-トコフェロール、プロブコールに細胞死抑制効果を認め、また、iNOSの阻害剤1400Wや、誘導剤ラパマイシンにも一定の細胞死抑制効果を認めた。更に、これらの結果をふまえて、これまで約120種類の未知の化合物について、その細胞死抑制効果を測定した所、8種類の化合物についてダントロレン以上の細胞死抑制効果を認めた。

D. 考察

図2に、これまで行った、既知の化合物の細胞死抑制効果をまとめた。これらの結果から、F9 Herp欠損細胞における小胞体ストレス・小胞体

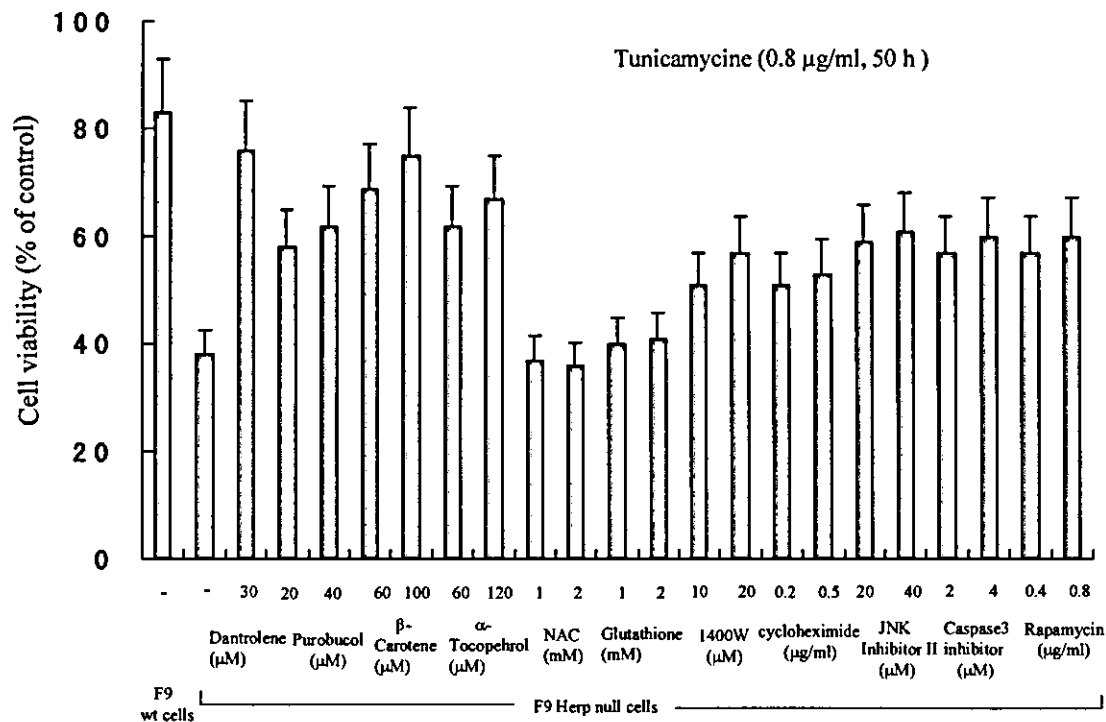


図1 各種薬剤による、小胞体ストレス由来細胞死の抑制

ストレス由来細胞死の制御は、様々なレベル、経路で行われていることが示唆された。このうち、特に、小胞体におけるCa恒常性の維持や酸化ストレスの制御が重要であると考えられた。神経変性疾患の病態（神経細胞死）を細胞生物学的観点から眺めると、ミトコンドリア機能異常（酸化ストレス）、蛋白構造異常（蛋白分解異常）、小胞体機能異常（小胞体ストレス）と言う形で見る事が出来る。そして、近年、これらの細胞内異常（ストレス）は、互いに密接に関連していること（ストレスの細胞内伝播）が明らかになってきている。例えば、ミトコンドリア異常は、Ca恒常性及び酸化還元状態の変化を介して、小胞体ストレスを引き起こし、逆に小胞体ストレスは、蛋白合成量変化やCa異常を介して、ミトコンドリアへ伝播する。また、異常蛋白の凝集は、蛋白分解系の枯渇をもたらし、小胞体ストレス小や胞体ストレス由来細胞死を引き起こす。このことから、我々が開発した、F9 Herp欠損細胞を用いた小胞体機能改善薬のスクリーニング系により得られる化合物は、小胞体機能異常を改善するのみならず、他の細胞内異常に対しても改善効果を示す可能性が示唆される。実際、未知の化合物120種類のスクリーニングを行った結果、8種類のサンプルに非常に強力な小胞体ストレス由来細胞死抑制効果を認めたが、少なくともその中の一部

の化合物は、好酸化作用も保持していることが分かっている。今後、より神経疾患のモデルにより近い形で、これらの候補化合物の有効性につき、検討していきたい。

#### E. 結論

F9 Herp欠損細胞における小胞体ストレス・小胞体ストレス由来細胞死の制御は、様々なレベルで行われていることが示唆された。このうち、特に、小胞体におけるCa恒常性の維持や酸化ストレスの制御が重要であると考えられた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. *Genes Cells*. 2004;457-469
- Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa S.



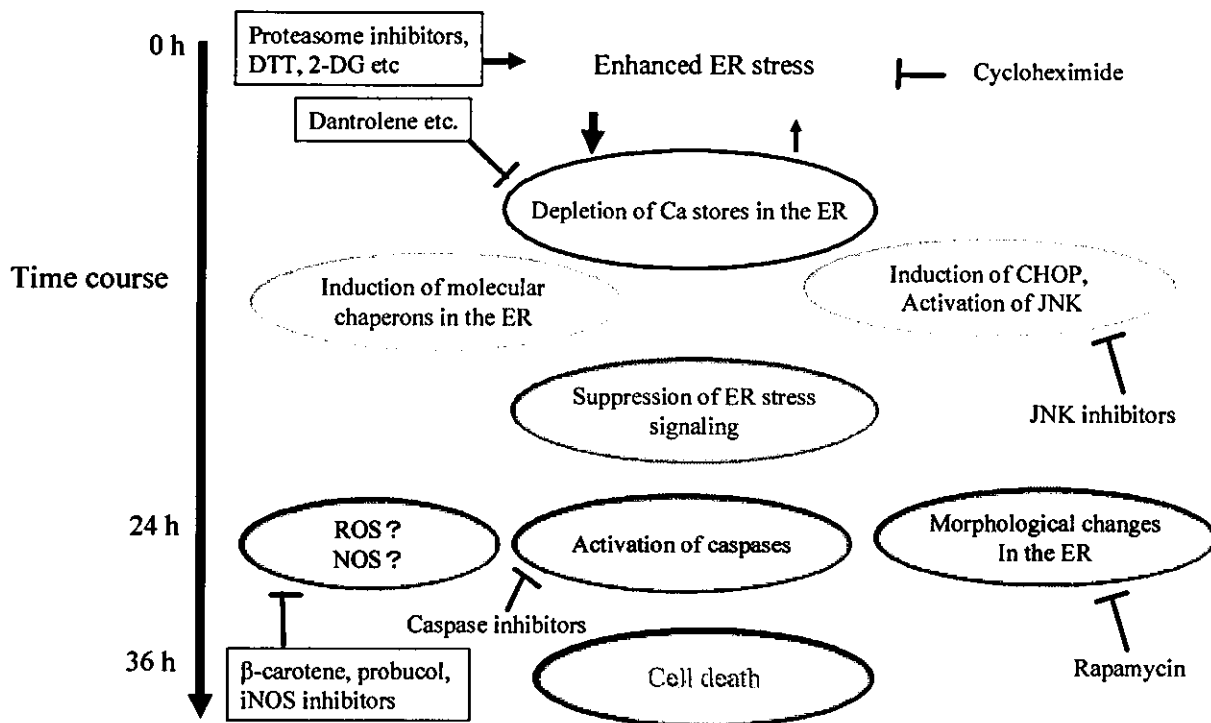


図2 F9 Herp KO cellsにおける、小胞体ストレス由来細胞死の制御

ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.* 2004; 18: 1401-3.

3. Ozawa K, Miyazaki T, Hori O, Kitao Y, Tamatani T, and Ogawa S. The ER chaperone 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) improves insulin resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2005; 54(3): 657-63

## 2. 学会発表

Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of a ubiquitin-like protein in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. 米国細胞生物学会、2004 サンフランシスコ

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) 特になし

## 虚血後の霊長類脳にみられる神経再生

分担研究者 山嶋 哲盛

### 研究要旨

げっ歯類においては、脳虚血後に側脳室下帯において神経(系)幹細胞が増殖し、線状体や大脳皮質における神経再生現象が亢進することが報告されている。しかし、霊長類の脳が虚血負荷に対して同様の反応を示すか否かは不明である。本研究においては、成熟ニホンザルを用いて、20分間の全脳完全虚血後にMusashi1やNestin、βIII-tubulinなどに陽性の神経(系)幹細胞が側脳室下帯において増加することを明らかにした。しかし、これらの側脳室下帯に増加した神経(系)幹細胞は、rostral migratory streamを介する嗅索への遊走や大脳白質を介する線状体や大脳皮質への遊走を示すことなく、虚血3ヶ月後において少なくともその30%は同部位に残存していた。しかも、線状体や大脳皮質においては、局所で産生されたきわめて少数のTbr1やIslet1陽性のpostmitotic neuronが少なくとも虚血79日目まで観察された。

以上より、霊長類において脳虚血後に増幅する神経再生は、げっ歯類と比較すれば微々たるものであるが、側脳室下帯においては長期間にわたりにかなりの神経再生現象が観察された。

### A. 研究目的

#### B.

ほ乳類では、胎生脳のみならず成熟脳においても側脳室下帯と海馬の歯状回において神経再生(adult neurogenesis)が続いていることが近年知られている。しかも、げっ歯類では、脳虚血負荷によってこの神経再生現象は亢進し、海馬のみならず、線状体や嗅索、大脳皮質の神経細胞の一部が入れ代わるとされている。従来、山嶋グループの研究によって同様の現象は霊長類においても確認されているが、虚血負荷によって惹起される神経再生現象はげっ歯類のそれと比べると、微々たるものであることが判明した。

本研究の目的は、虚血負荷によって惹起される霊長類の神経再生現象を明らかにすることである。そのために、一過性の脳虚血負荷を与えたニホンザルにプロモデオキシウリジン

(BrdU)を投与した後、3ヶ月間にわたり海馬、側脳室下帯、線状体、嗅索、大脳皮質のBrdU陽性細胞を検索し、そのimmunophenotypeを特異的な細胞マーカーを用いてレーザー共焦点顕微鏡により検索した。

### B. 研究方法

虚血手術：金沢大学実験動物施設およびNIHのガイドラインに準拠し、動物実験を行った。体重が数Kgのニホンザル19頭を用い、そのうち12頭には脳虚血を負荷し、残り7頭は対照群とした。また、生後2週間目の新生児サルを大脳白質内を遊走する神経(系)幹細胞の陽性コントロールとして使用した。虚血手術は、全身麻酔下で胸骨をはずして縦隔経路で無名動脈と左鎖骨下動脈とに20分間血管クランプをかけた後、クランプをはずし再かん流を行った。

BrdU投与：体重1Kgあたり100mgのBrdUを投与し、短期観察群(虚血後4、9、15日)と長期観察群(虚血後23、44、79日)とにわけて、検索を行った。なお、新生児サルに関しては、誕生の日と生後2週間目にBrdUを投与した。

免疫組織化学：全身麻酔下で4%パラホルムアルデヒドのかん流を行った後、脳標本を摘出し厚さが40mmの前額断切片と水平断切片とを作成した。一次抗体として、BrdU、Ki67、リン

酸化ヒストンH3、Musashi1、Nestin、NeuN、class III b-tubulin (bIII-tubulin)、GFAP、S100b、Iba1、GAD65/67、Islet1、Tbr1、および活性型caspase-3に対する抗体を用いた。また、アポトーシスを検出するため、TUNEL染色を行った。

レーザー共焦点顕微鏡：カールツアイス社のレーザー共焦点顕微鏡 (LSM 510) を用いて、側脳室下帯に関しては800mm'100mmの、線状体と前頭葉皮質に関しては880mm'680mmのグリッド内のBrdU陽性細胞の数を計測し、有意差検定を行った。Alexa Fluor 488 (緑色) TRITCないしAlexa Fluor 546 (赤色)、およびAlexa Fluor 633 (青色) の3者を用いて免疫組織化学的2 (3) 重染色を行った。

### C. 研究結果

側脳室下帯における虚血負荷後の神経再生：虚血後4、9、15日の短期観察群においては、対象群に比し、虚血9日目をピークにBrdU陽性細胞が有意に増加していた。

虚血後3ヶ月間続く側脳室下帯の神経再生：側脳室下帯の一部すなわち被殻側、背側端および前側端においては、対象群に比し、虚血後23、44、79日の長期観察群のいずれにおいてもBrdU陽性細胞が有意に増加していた。虚血後79日目 (すなわちBrdU標識10週間目) における、BrdU陽性細胞の数は側脳室下帯の前側端において $24.4 \pm 3.7$  (対照群： $12.4 \pm 2.4$ )、背側端において $18.3 \pm 1.7$  (対照群： $8.1 \pm 1.1$ )、および被殻側において $21.3 \pm 1.9$  (対照群： $10.8 \pm 1.7$ ) であった ( $P < 0.05$ , Paired T-test)。

側脳室下帯には神経幹細胞と神経系幹細胞の両者が増殖する (付図参照)：短期観察群と長期観察群のいずれにおいてもBrdU陽性細胞の大多数はKi67にも陽性であった。また、一部のBrdU陽性細胞はリン酸化ヒストンH3に対しても陽性であった。虚血後9日目においては、BrdU陽性細胞の約70%はMusashi1やNestinが陽性であったが、以後、虚血後23日目より79日目までにかけて、陽性率は10%程度まで漸減した。一方、これとは対照的にbIII-tubulin陽性の未熟な神経細胞は虚血後9日目には約10%であったが、虚血後79日目には約80%まで増加した。TUNEL陽性細胞とBrdU陽性細胞が一致することは皆無であった。

側脳室下帯から嗅索への神経 (系) 幹細胞の遊走は見られない：生後2週間目の新生児サルの大脳白質においてはbIII-tubulin陽性の幼弱な神経細胞が、側脳室下帯から大脳皮質にかけて遊走する現象が観察された。しかし、虚血負荷後の脳においては、全く同様の抗体を用いて免疫組織化学的染色と顕微鏡観察とを行っているにもかかわらず、側脳室下帯から大脳皮質や被殻へと遊走するbIII-tubulin陽性の幼弱な神経細胞は観察されなかった。嗅索へ向うrostral migratory streamの起始部においてはBrdUとbIII-tubulinのいずれにも陽性の幼弱な神経細胞が多数見られたが、嗅索に近付くと共にbIII-tubulinは陰性となった。

虚血後の線状体と大脳皮質において増えるのは、大部分がグリア細胞である：虚血後の線状体と大脳皮質において増加していたBrdU陽性細胞は、いずれの時期においても、その約80%はIba1陽性のミクログリアであり、約10%はS100b陽性の星状膠細胞 (アストロサイト) であった。

しかし、非常に少数ではあるが、神経細胞も誕生していた：わずか1%程度のきわめて少数ではあったが、BrdU/NeuN陽性の成熟神経細胞は、大脳皮質ではTbr1に、また被殻においてはIslet1やGABAニューロンのマーカーであるGADに陽性であった。

### D. 考察

本研究においては、一過性脳虚血後の二ホンザル脳の側脳室下帯において、BrdU陽性細胞の増加は虚血負荷後9日目に最大となり、そのうち少なくとも30%は局所に留まることが明らかになった。虚血後早期から3ヶ月後に至るまでBrdU陽性細胞の大多数はKi67にも陽性であったが、これらは、TUNEL陽性細胞や活性型のCaspase-3陽性細胞と一致することはなかった。すなわち、多量に投与されたBrdUはDNAを合成している分裂細胞のみを標識しているのであって、アポトーシスの細胞を標識しているのではないことが示された。

側脳室下帯において増殖したBrdU陽性細胞が、線状体や前頭葉皮質に遊走することなく局所に留まっていたことは興味深い。胎生期のサル脳の側脳室下帯に神経 (系) 幹細胞を移植しても、これらの細胞は遊走することなく4週間局所に留まっていることがOurednikら(2001)によって報告された。今回の実験結果は、この報告と一致しているのみならず、虚血後3ヶ月間

もの長期間にわたりこのような現象がみられたという点で興味深い。

げっ歯類の局所脳虚血モデルにおいても、虚血負荷後の側脳室下帯においてBrdU陽性細胞が増加し、これらは線状体や大脳皮質へと遊走した後、神経細胞に分化してゆくことが報告されている。しかし、ニホンザルにおいては虚血後2週間をピークにBrdU陽性細胞は増加していたものの、これらが線状体や大脳皮質へと遊走することはなかった。側脳室下帯において増加したBrdU陽性細胞は嗅索に向けてわずかに遊走していたが、神経細胞への分化は限られていた。本研究で用いた免疫組織化学的手法は新生児サル脳の大脳白質においては、多数のBrdU/bIII-tubulin陽性細胞を検出し得た。

したがって、側脳室下帯において増加したBrdU陽性細胞が遊走する可能性に関しては、げっ歯類と霊長類とは全く様相を異にする可能性がある。ただし、本実験で用いた虚血負荷は20分間の軽微なものであり、線状体や大脳皮質での神経細胞死は30%程度のものである。一方、げっ歯類の脳虚血は例えば中大脳動脈の完全遮断によって線状体や大脳皮質での神経細胞死が完璧に生ずるものである(Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002; Parent et al., 2002; Jin et al., 2003; Zhang et al., 2004)。したがって、このような虚血負荷の程度の差異がBrdU陽性細胞の遊走の有無に関して、げっ歯類と霊長類との間で対照的な結果をもたらした可能性は否定し得ない。

本研究において今一つ興味深いのは、一過性脳虚血後の線状体や前頭葉皮質において観察された2、200個のBrdU陽性細胞のうち28個(約1%)が成熟ニューロンのマーカーであるNeuNにも陽性を示したことである。しかも、BrdU/NeuN陽性細胞は虚血後3ヶ月間にわたり持続的にみられ、Tbr1(大脳皮質)やIslet1やGAD(被殻)など局所に特異的な神経細胞マーカー(transcription factor)も発現していた。したがって、脳虚血後のサルの大脳皮質や被殻においては、いわゆるparenchymal progenitorが生まれているものと思われる。この結果は、成人の大脳皮質や白質からprogenitor cellをin vitroで分離し得たという報告(Arsenijevic et al., 2001; Nunes et al., 2003)と一致している。

成熟脳においてprogenitor cellを制御し得る分子機構を解析すれば、「種」や「年齢」「病気」による差異を越えた本質的な神経再生メカニズムを究明し得るし、ヒトの脳神経疾患の治療に現実的に役立つデータも得られるであろう。平成17年度の厚生科研費によって、上記のメカニズムを研究する予定である。

## E. 結論

1. 脳虚血後には側脳室下帯における神経再生現象が増幅し、約3ヶ月間持続する。
2. ニホンザルの一過性脳虚血モデルにおいては、側脳室下帯から嗅索に向けて少数の神経(幹)細胞の遊走がみられるのみで、線状体や前頭葉皮質への遊走はみられない。大脳白質内においては、BrdU/bIII-tubulin陽性細胞は皆無であった。
3. 脳虚血後の線状体や前頭葉皮質においては、きわめて少数ではあるが、局所的な神経再生現象がみられ、虚血負荷後、約3ヶ月間持続する。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus*. 2004; 14(7): 861-875.
2. Takahashi N, Tonchev AB, Koike K, Murakami K, Yamada K, Yamashima T, Inoue M. Expression of estrogen receptor-beta in the postischemic monkey hippocampus. *Neurosci Lett*. 2004; 369(1): 9-13.
3. Yamashima T. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium*. 2004; 36(3-4): 285-293.

### 2. 学会発表

- 九州大学生体防御研究所セミナー 招待講演  
山嶋哲盛:「神経細胞死のメカニズム:カルパイン-カテプシン仮説」  
平成16年2月23日、九州大学、博多  
国立精神・神経センター COE国際シンポジウム「神経の発生と可塑性」講演  
山嶋哲盛:「Mechanism of ischemic neuronal death」  
平成16年3月5日、早稲田大学、東京  
第5回 日本分子脳神経外科学会 口演シンポジウム  
「虚血サル海馬における神経幹細胞の由来」  
平成16年9月4日、東京大学、東京  
第63回 社団法人 日本脳神経外科学会総会