

日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋, 12 月,

- 4) Fukui A, Yokoo T, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M. Identification of ureteric bud progenitors using chicken embryos. 39th American Society of Nephrology. San Diego, Nov.
- 5) Yokoo T, Fukui A, Utsunomiya Y, Kawamura T, Okabe M, Hosoya T. Generation of erythropoietin-producing self organs using human mesenchymal stem cells. 39th American Society of Nephrology. San Diego, Nov.

神経科学研究部・神経病理学研究室

教授: 栗原 敏
(兼任)

講師: 福田 隆浩 神経病理学, 神経内科学

講師: 藤ヶ崎純子 神経病理学

研究概要

I. 中枢神経系における MLC1 蛋白質の局在と動態

目的: Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC) では, MLC1 遺伝子変異を認める症例がある。今回, 抗 MLC1 抗体を作成し, MLC1 蛋白質の中枢神経系における局在を明らかにし, その機能を考察した。

対象および方法: ヒト MLC1 cDNA 蛋白質転写領域の PCR 産物を vector に組み込み, 大腸菌にて His-Tag 融合 MLC1 蛋白質を合成後, Tag のアフィニティ精製を行った。His-Tag 融合 MLC1 蛋白質とアジュバントを Balb/c マウスに投与し, 抗 MLC1 抗体を作製後 Western blot 法にて確認。明らかな神経疾患のないヒト 3 剖検例, MLC の 1 剖検例, 脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHR/SP) 200 頭の脳脊髄を対象に一般組織学的検索を行い, 抗 MLC1 抗体, GFAP, aquaporin 1 (AQP1), aquaporin 4 (AQP4) 等に対する抗体を用い, 免疫組織化学的に検索した。

結果および考察: 明らかな病変のない脳脊髄では, 血管周囲および軟膜化, 上衣下の星状膠細胞突起末端に MLC1 および AQP4 が局在し, AQP1 は軟膜下の星状膠細胞突起末端と脈絡叢細胞に認められた。SHR/SP の浮腫を伴う急性期梗塞巣では, MLC1 および AQP1, AQP4 の免疫染色性は低下し, 反応性星状膠細胞の増生する梗塞巣では, 星状膠細胞胞体に MLC1 は強く発現していた。膜蛋白質 MLC1 は, 水チャネルである膜蛋白質 AQP4 と同じ分布であった。梗塞の浮腫発現時も両蛋白質の動態は同じで, 機能の共通性が示唆される。中枢神経系では, MLC 症例は MLC1 mRNA の変異を認めていないにもかかわらず, MLC1 蛋白質の発現低下を認め, 蛋白質発現を抑制する因子の存在を示唆させた。

II. 脊髄小脳失調症 7 型におけるアミロイド前駆体タンパク質の動態

脊髄小脳失調症 7 型 (SCA7) は網膜色素変性, 小

脳失調を特徴とする遺伝性神経変性疾患である。SCA7はポリグルタミン病の一つで、核内に蓄積した変異 ataxin-7 が凝集し、核内封入体が形成される。Ataxin-7は転写調節因子として機能することが報告され、病態との関連が注目されている。Ataxin-7と結合するタンパクは複数知られている。我々は ataxin-7と結合するタンパクとして、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) のファミリー蛋白である amyloid precursor like proteins 2 (APLP2) を同定した。アミロイド前駆体タンパク質ファミリー蛋白の SCA7 疾患脳および細胞モデルにおける細胞内分布について調べた結果、SCA7 では APLP2 は正常とは異なり、神経細胞の核内に蓄積する傾向がみられた。これらの APP 関連蛋白は種々の酵素によって切断され、切断された C 末端フラグメントが核内に移行し、蛋白の翻訳を調整することが判っている。我々は SCA7 の剖検脳、細胞モデルで caspase-3 が活性化されていること、更に caspase-3 によって切断された APP 関連蛋白が変異 ataxin-7 を含む核内封入体に取り込まれることを見いだした。

「点検・評価」

I. 中枢神経系における MLC1 蛋白質の局在を明らかにした。MLC1 蛋白質の機能は未だ不明で、MLC1 遺伝子点変異は Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts を発症することが知られている。中枢神経系に於ける髄鞘の形成障害などに関与している可能性があり、今後、MLC1 蛋白質の機能の解明を進めていく。

II. APP 関連蛋白のプロセッシングが SCA7 の病態に関連する可能性を新たに見いだした。APP はアルツハイマー病の発症に関与する重要な蛋白である。今後は APP のプロセッシングが神経変性に関与する機序を、アルツハイマー病とは異なる、ポリグルタミン病との関連という視点から解明していく。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Fukumitsu N (Univ Tsukuba), Suzuki M, Fukuda T, Kiyono Y¹⁾, Kajiyama S¹⁾, Saji H¹⁾ (Kyoto Univ). Reduced 125I-meta-iodobenzylguanidine uptake and norepinephrine transporter density in the hearts of mice with MPTP-induced parkinsonism. *Nucl Med Biol* 2006; 33: 37-42.
- 2) Sato S¹⁾, Chiba T²⁾, Nishiyama S³⁾, Kakiuchi T³⁾, Tsukada H³⁾ (Central Res. Lab, Mamamatsu

Photonics), Hatano T¹⁾, Fukuda T, Yasoshima Y⁴⁾, Kai N⁴⁾, Kobayashi K⁴⁾ (Fukushima Med Univ), Mizuno Y¹⁾, Tanaka K²⁾ (Tokyo Metro Inst of Med Sci), Hattori N¹⁾ (Juntendo Univ). Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by *in vivo* autoradiography. *J Neurosci Res* 2006; 84 (6) : 1350-7.

- 3) Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hatata Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artif Organs* 2007; 2: 148-51.
- 4) Takahashi-Fujigasaki J, Fujigasaki H (Mushino Red Cross Hospital). Histone deacetylase (HDAC) 4 involvement in both Lewy and Marinesco bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32 (5) : 562-6.

II. 総説

- 1) Fukuda T, Arai T, Nikaido T, Joki T, Ikeuchi S, Kato M, Kawakami M, Abe T. A case of chordoid meningioma with allelic loss of 1p36. *Jikeikai Med J* 2006; 53 (1) : 37-44.
- 2) 伊藤保彦, 福田隆浩. 脊髄性痺みを呈した抗アクアポリン4抗体陽性横断性脊髄炎の25歳女性例. *脊椎脊髄ジャーナル* 2007; 20 (7) : 865-8.

III. 学会発表

- 1) 福田隆浩, 伊東 建, 加藤弘之. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts の1剖検例. 第47回日本神経病理学会. 岡山, 5月. [*Neuropathology* 2006; 26 (Suppl) : 102]
- 2) 福田隆浩, 清水 純, 古幡 博. 老齡ザルの淡蒼球黒質スフェロイドにおける熱ショック蛋白質過剰発現. 第47回日本神経病理学会. 岡山, 5月. [*Neuropathology* 2006; 26 (Suppl) : 107]
- 3) 藤ヶ崎純子, 高木 聡, 井上聖啓. シェーグレン症候群が疑われたステロイド反応性ミエロパチーの脊髄生検所見. 第47回日本神経病理学会. 岡山, 5月. [*Neuropathology* 2006; 26 (Suppl) : A20]
- 4) 藤ヶ崎純子, 柳下三郎 (神奈川リハビリテーションセンター), 岩淵 潔 (山手訪問診療所), 藤ヶ崎浩人 (武蔵野赤十字病院), 高田耕司. プロテアソーム阻害により神経系細胞に形成されるユビキチンおよびSUMO陽性核内封入体の解析. 第47回日本神経病理学会. 岡

山, 5月. [Neuropathology 2006; 26(2): A40]

- 5) 藤ヶ崎純子, 藤ヶ崎浩人 (武蔵野日赤病院), Brice A (INSERM U679), Duyckaerts C (Hopital de la Pitie-Salpetriere). 脊髄小脳変性症 7 型の核内封入体と SUMO, PML との関係. 第 53 回日本病理学会秋季総会. 東京, 5月. [日病理会誌 2006; 95(1): 310]

V. その他

- 1) Yokoi K, Akiyama M, Yanagisawa T, Takahashi-Fujigasaki J, Yokokawa Y, Mikami-Terao Y, Fukuoka K, Fujisawa K, Nakazaki H, Oi S, Eto Y, Yamada H. Sequential analysis of cadherin expression in a 4-year-old girl with intracranial ependymoma. Childs Nerv Syst 2007; 23(2): 237-42.
- 2) Arai T, Tani S, Isoshima A, Nagashima H, Joki T, Takahashi-Fujigasaki J, Abe T. Intraoperative photodynamic diagnosis for spinal ependymoma using 5-aminolevulinic acid: technical note. 脳神経外科 2006; 34(8): 811-7.
- 3) Mikami-Terao Y, Akiyama M, Yanagisawa T, Takahashi-Fujigasaki J, Yokoi K, Fukuoka K, Sakuma M, Miyata I, Fujisawa K, Oi S, Eto Y. Lymphocytic hypophysitis with central diabetes insipidus and subsequent hypopituitarism masking a suprasellar germinoma in a 13-year-old girl. Childs Nerv Syst 2006; 22(10): 1338-43.

神経科学研究部・神経生理学研究室

教授: 加藤 総夫 神経生理学・神経薬理学

研究概要

I. シナプス前神経伝達物質放出関連分子の機能解明

シナプス前からの神経伝達物質放出は脳機能の重要な基礎要素過程である。シナプス前終末に発現する伝達物質放出関連分子群の機能解明を可能とする実験系として、頸部節状神経節ニューロンへ外来遺伝子 (EGFP) および small interfering RNA (siRNA) を導入する技術を確立した。それぞれにおいて、節状神経節および延髄孤束核内一次求心線維における EGFP の発現, および, RNA 干渉による標的分子 mRNA 量の低下 (<15%) を確認した。また、節状神経節ニューロン (迷走神経~孤束一次ニューロン) と孤束核 2 次ニューロンの間のシナプス伝達を脳スライス・パッチクランプ法で解析し、標的分子 mRNA 発現量の変化がシナプス伝達にも有意の影響を及ぼす事実を明らかにした (文部科学省科学研究費補助金・萌芽研究の補助を受けた)。

II. アストロサイト-ニューロン機能連関の解明

延髄孤束核シナプス伝達制御におけるグリオトランスミッター ATP の意義を検証するため, caged 化合物と laser photolysis 法を用いた脳スライスにおける時間・空間限局的細胞外 ATP 投与法を開発した。また、孤束核におけるアストロサイトの存在様式を glial fibrillary acidic protein (GFAP) および neuronal nuclei (NeuN) を用いた免疫組織化学的手法により解析し、孤束核においてアストロサイトが特異的突起伸張パターンを示す事実を見出した (日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究 B および文部科学省科学研究費補助金・特定領域「グリア-ニューロン回路網」の補助を受けた)。

III. 慢性痛における情動障害の脳機能の解明

痛み感覚が不可避的に伴う負的情動の生成機構を解明するために、慢性神経因性疼痛モデル動物において、脊髄後角疼痛特異的ニューロン由来脚傍核經由入力線維と情動応答の中核である扁桃体中心核ニューロンの間のシナプス伝達を評価した。神経因性疼痛の慢性化に伴い NMDA 受容体非依存的シナプス伝達増強が生じる新事実を見出した (厚生労働省ヒューマンサイエンス事業研究補助金の補助を受