The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	神経原線維変化の形成機序に関する実験的研究
Author(s)	武田, 雅俊
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33320
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【21】

氏名・(本籍)	武田雅俊（たけだ まさとし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5994 号
学位授与の日付	昭和58年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**神経原線維変化の形成機序に関する実験的研究**
論文審査委員	(主査) 教授 西村 健 (副査) 教授 北村 旦 教授 垣内 史朗

論文内容の要旨

〔目　的〕

アルツハイマー病（AD）やアルツハイマー型老年痴呆（SDAT）の脳では多量の神経原線維変化（NFC）が認められ，脳の老人性変化の中で痴呆症状の発現に最も関係が深い所見の1つとして重視されている。すでに我々は，ADやSDAT患者の脳において，水溶性蛋白が減少し線維性蛋白が不溶化していることを示し，さらにNFCが主としてneurofilament（nf）蛋白とmicrotubule(mt)蛋白により構成されていることを示した。しかし，未だNFCの形成機序については解明されていない。本研究では，家兎にvinblastine，colchicine，Aluminium塩を注入して実験的NFCを作製し，その構成蛋白と脳内線維性蛋白の変化を調べることにより，NFCの形成機序を検討することを目的としている。

〔方法ならびに成績〕

1）実験的神経原線維変化（experimental neurofibrillary change: ENFC）の作製：colchicine（1mg/mℓ）0.1mℓ，vinblastine（2mg/mℓ）0.1mℓ，或いは1.4%$AlCl_3$（Holts abjuvant）0.5mℓを家兎の左大脳半球内に注入すると，vinblastine，colchicineでは2日間，Al塩では7～10日間で動物は後肢の失調を呈し，まもなく死亡する。光顕（Bielschowsky鍍銀法）及び電顕で観察すると，大脳皮質・中脳・延髄・小脳・脊髄などの広範な領域の神経細胞にENFCを認めた。この病変は主に10nmフィラメントの局所的線維増生であり，これは神経細胞体，軸索のいずれにも観察された。

2）ENFCの蛋白構成及びENFCを生じた脳における線維性蛋白の変化：Al塩，vinblastine，或いはcolchicineで処置した家兎脳の不溶性画分から，蔗糖密度勾配法による分画遠沈を反復して

ENEC画分を精製した。この画分はUrea SDS 2/16 gradient polyacrylamide gel electrophoresisを用いて分析すると，nf triplet (200K, 160K, 68K), 55K蛋白，glial fibrillary acidic protein, actinなどの線維性蛋白で構成されている。55K蛋白は免疫学的にtubulinと同定され，nf triplet蛋白と55K蛋白の量比は常に一定であった。他方，ENFCを生じた脳では水溶性画分の蛋白量は減少しており，とくにmt蛋白の減少が著明であった。不溶性画分の蛋白量は増加しており，特にnf蛋白，mt蛋白の著しい増加が認められた。なお上記の所見は，vinblastine, colchicine, Alなどでの処置について共通の現象であり，以下の実験では主としてcolchicine処置脳を実験材料として用いた。

3）colchicineのnf蛋白合成に及ぼす影響：　ENFCを生じた脳におけるnf蛋白の増加が，nf合成の増加によるものか否かを調べるために，colchicine処置家兎脳内に〔^{3}H〕leucineを注入し，細胞分画や線維性蛋白への放射能の取り込みを調べた。colchicine処置脳においては，対照脳に比し蛋白合成の亢進が認められ，とりわけnf画分は高い比放射能を示した。mtではnfほどの著明な合成促進は認められなかった。

4）in vitroにおけるmt蛋白の重合に及ぼすnfの影響：　ENFC形成過程におけるmtとnfの相互作用の有無を検討するために，mt蛋白がGTP存在下で温度依存性に重合・脱重合する系を作製し，この系にnfを加えることにより起こるmt蛋白の重合・脱重合の程度の変化をOD350の変化にて測定した。その結果nfはその量に比例してmtの重合を阻害した。この時，mtの構成成分のうちhigh molecular weight microtubular associated proteins (HMW-MAPs) はnfと結合して不溶化していたが，tubulinそのものは不溶化されなかった。

colchicineの処置脳で増加しているnf, mtの構成subunitsが何らかのposttranslational modificationを受けているか否かを調べるために，colchicine処置脳と対照脳で，線維性蛋白におけるmethylation, phosphorylationの差の有無を調べたが，両群間において有意差は認めなかった。

5）nfとtubulinの相互作用：　nfを8M尿素にて可溶化したのち，25mM imidazole bufferに対して透析するとnfが再構成される。この操作を3回反復し，主としてnf tripletからなるnf試料を調整した。このnfを0℃にてmtと混ぜた後遠沈すると，tubulinは上清に，nf, HMW-MAPsは沈渣に分離される。この時低濃度のcolchicineを加えておくと，上清にくるべきtubulinがnf, HMW-MAPsと共に沈澱することが確認された。

〔総　　括〕

spindle inhibitor (vinblastine, colchicine), Al塩の脳内注入により実験的神経原線維変化(ENFC) を作成し，その形成機序についての実験的検討を試みた。

1．ENFCは大脳皮質から脊髄に至る広範な領域の神経細胞体・軸索における10nmフィラメントの局所的増生として観察される。

2．ENFCの構成蛋白は，主としてneurofilament (nf) 蛋白とmicrotubule (mt) 蛋白である。

3．ENFCを生じた家兎脳内ではnf蛋白の合成が促進されてnfが増量している。またmt蛋白は水溶性画分で減少しており，不溶化してnfと共存している。

4．in vitroにてmtの重合・脱重合の平衡関係に影響を及ぼす因子の存在下で，nfは可溶性のtubu-

linやHMW-MAPsを不溶化し，これらの蛋白と結合する。

5．以上の所見から，ENFCを生じた家兎脳内では，まずnfが増生し，これにmtの重合・脱重合の平衡に影響を及ぼす何らかの因子が加わって，nfにmtサブユニットが結合し不溶化線維構造を形成する可能性が考えられ，ADやSDATで認められるNFCも類似の機序で形成されることが推測される。

論文の審査結果の要旨

アルツハイマー病や老年痴呆の患者脳で認められる神経原線維変化は痴呆症状の発現に最も関係が深い病理学的変化であり，その組織化学的性状や構成蛋白が明らかにされつつあるが，神経原線維変化の形成機序に関する研究は皆無に等しい，

本研究は，家兎脳にアルミニウム塩やSpindle Inhibitorを用いて作製した実験的神経原線維変化が上記疾患の神経原線維変化と同様に主要構成蛋白としてニューロフィラメントとマイクロチュブルのサブユニットを含んでいることから，人脳の神経原線維変化の実験モデルとして妥当なものであることを証明した点で意義がある。

更に，実験的神経原線維変化を生じた家兎脳内で脳内線維性蛋白の変化を調べることによって，神経原線維変化の形成に際してはまずニューロフィラメントが増生し，これにマイクロチュブルの解離・解合系の平衡に影響を及ぼす因子が加わって，ニューロフィラメントにマイクロチュブルサブユニットが結合して不溶性線維構造が形成されることを明らかにし，次いでin vitroの実験でこの過程を解析した。以上の成績は，従来，全く知られていなかった神経原線維変化の形成機序の解明に有力な手懸りを与えたものとして意義が大である。