OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Phosphorylated neurofilament accumulation in neuronal perikarya by cyclosporin A injection in rat brain.
Author(s)	田中, 稔久
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38108
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	田中稔久（たなかとしひさ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10658 号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Phosphorylated neurofilament accumulation in neuronal perikarya by cyclosporin A injection in rat brain. （ラット脳内サイクロスポリンA注入による神経細胞体内リン酸化ニューロフィラメント蓄積について）
論文審査委員	（主査） 教授 西村 健 （副査） 教授 白石 純三　教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

（目　的）

アルツハイマー病脳に特徴的な神経原線維変化と老人斑の構成蛋白であるタウ蛋白，アミロイドβ蛋白前駆体がリン酸化されていること，アルツハイマー病脳では神経細胞の主要な細胞骨格蛋白の一つであるニューロフィラメント蛋白が過剰にリン酸化されていることが示されている。蛋白の異常なリン酸化はアルツハイマー病の病的過程の特徴と考えられる。細胞内蛋白のリン酸化はプロテインキナーゼによるリン酸化とフォスファターゼによる脱リン酸化とにより調節されていると考えられるが，神経変性疾患およびそのモデルにおけるフォスファターゼに関する検討は未だ少ない。免疫抑制剤として開発されたサイクロスポリンAは，シクロフィリンと結合しカルシニューリン（フォスファターゼ2B）の脱リン酸化能を抑制することが明らかにされた。本研究では，ラット脳内にサイクロスポリンA注入によって生じた神経細胞内細胞骨格蛋白の変化を検討することによりアルツハイマー病の病理過程における脱リン酸化酵素の関与を明らかにすることを目的とした。

（方　法）

1）脳固定装置を用いてウィスター系ラット脳海馬内（ブレグマ右外側5.1mm，尾側5.2mm，深さ5.5mm）に25％dimethyl sulfoxide（DMSO）に溶解したサイクロスポリンA（濃度0.02−200μg／ml）溶液5μℓを注入した。

2）脳内Ca・カルモデュリン依存性フォスファターゼ活性の測定：ラット脳組織ホモジネートにCa・カルモデュリンを添加したものに，^{32}Pラベルした基質蛋白を加えることにより反応を開始した。20％トリクロロ酢酸を加えて反応を停止し，遠沈により上清に遊離した^{32}Pの量を測定し，これをフォスファターゼ活性とした。Ca・カルモデュリンの有無による差をカルシニューリン活性として，サイクロスポリンAの作用を検討した。

3）注入1週間後に10％formaldehydeにて灌流固定後，パラフィン切片（6μm）およびクリオスタット切片（15μm）を作成し，Hematoxylin-Eosin（H-E）染色，鍍銀染色，細胞骨格蛋白関連蛋白に対する抗体を用いた免疫染色によりその変化を観察した。さらにサイクロスポリンA注入ラットの脳ホモジネートについて各種細胞骨格蛋白に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより検討した。

（成　績）

サイクロスポリンAを注入したラットの脳内カルシニューリン活性は対照ラット脳と比べて低下していた。

サイクロスポリンAを海馬に注入したラット脳ではH-E染色により大脳皮質，海馬，視床，小脳にbasophilicに

染色される神経細胞が観察された。この特徴的なbasophilic神経細胞の数は注入したサイクロスポリンA の濃度に応じて増加していた。

細胞骨格蛋白に対する抗体を用いた免疫染色によりこのbasophilic神経細胞の胞体内にはリン酸化ニューロフィラメントが存在することが明らかになった。リン酸化されたニューロフィラメント200K Da（NF-H）に対する抗体を用いた免疫組織化学的検討から対照ラット（25% DMSO 5 ml注入）脳においては軸索のみが染色されたが，サイクロスポリンA注入脳においては軸索を含め細胞体も染色される神経細胞が海馬，視床，小脳に観察された。抗脱リン酸化NF-Hに対する抗体を用いた検討では対照ラット脳の中脳，延髄の神経細胞胞体内は陽性に染色されるのに対して，サイクロスポリンA注入ラット脳ではその染色性が消失していた。タウ蛋白に対する抗体では主として軸索が染色されサイクロスポリンA注入ラットと対照ラットとの間にその染色性の差異を認めなかった。

ウエスタンブロットによる検討ではサイクロスポリンA注入ラット脳において主要な細胞骨格蛋白の量的変化や異常な分解は認められなかったが，そのリン酸化の程度に変化が認められた。

（総　括）

1）サイクロスポリンAはラット脳内において脱リン酸化酵素カルシニューリンの阻害剤として作用することが示された。

2）サイクロスポリンAの脳内投与により神経細胞胞体内にリン酸化ニューロフィラメントが増加することが示された。

3）神経細胞内蛋白のリン酸化状態はプロテインキナーゼ活性だけでなくフォスファターゼ活性によっても調節されていることが示唆された。

4）サイクロスポリンA注入ラットは神経組織内の蛋白リン酸化脱リン酸化の過程を検討するために有用であり，リン酸化の異常が想定されているアルツハイマー病の病態研究に有用な手段となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経原線維変化や老人斑の構成蛋白が過度にリン酸化されていることなどからアルツハイマー病の病理過程として細胞骨格蛋白のリン酸化の異常が推定され，アルツハイマー病脳におけるリン酸化酵素についての検討が進められてきた。脳内細胞骨格蛋白のリン酸化状態は蛋白リン酸化酵素と脱リン酸化酵素とにより調節されているものと考えられるが，アルツハイマー病脳における脱リン酸化酵素について検討した報告は少ない。

本研究は脳内に大量に存在することが知られている脱リン酸化酵素であるカルシニューリンに注目し，その阻害剤であるサイクロスポリンAを動物脳内に投与し細胞骨格蛋白の変化を検討したものである。本研究の結果から，サイクロスポリンAの脳内投与によってカルシニューリン活性が阻害されること，神経細胞内の細胞骨格蛋白が過剰にリン酸化されることが明らかにされた。サイクロスポリンA投与動物に認められる脳内変化は細胞骨格蛋白の過剰リン酸化という点においてアルツハイマー病の病理過程と類似しており，アルツハイマー病の病理過程の解明に有用なモデルとなりうる点で，本研究の意義は大であり，学位に値すると考える。