Osaka University Knowledge Archive

Title	アルミニウム中毒ウサギ脳におけるニューロフィラメント蛋白動態の経時的変化
Author(s)	関山, 敦生
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39867
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

【63】

氏　　名	関　山　敦　生（せき　やま　あつ　お）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　12412　号
学位授与年月日	平成8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	**アルミニウム中毒ウサギ脳におけるニューロフィラメント蛋白動態の経時的変化**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　柳原　武彦 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

アルツハイマー病，ピック病，パーキンソン病などの中枢神経系変性疾患では，それぞれの疾患に特徴的な神経細胞内の線維性構造物が出現し，病態との関連が示唆されている。これら線維性構造物の蓄積を実験的に作製し，その機序を検討するモデルとして実験的神経原線維変化（E－NFC）が用いられてきた。E－NFCは成熟ウサギの脳実質内にアルミニウム塩を投与することによって生じる脳幹神経核の神経細胞内の線維性構造物の蓄積をいう。アルミニウムは，疫学的な検討からアルツハイマー病やグアム島のパーキンソン痴呆コンプレックスなどの神経変性疾患との関連が示唆されており，アルミニウムによるE－NFCの形成機序を明らかにすることは神経変性疾患の病態解明に役立つものと考えられる。E－NFCの構成蛋白としてニューロフィラメント蛋白（NF－H，NF－M，NF－L）が同定されており，E－NFCを生じるウサギ脳ではニューロフィラメント蛋白の合成から代謝にいたる多くの段階で，その細胞内動態が変化していることが推測される。本研究では，E－NFC形成過程におけるニューロフィラメントの細胞内蛋白動態の変化を明らかにすることを目的としてNF－HおよびNF－Lの蛋白合成，蛋白レベル，リン酸化レベル，細胞内局在について経時的検討を行った。

【方法】

1．アルミニウム中毒ウサギの作製

体重2.0～2.5kgの成熟ニュージーランドホワイトウサギをエーテル麻酔後，左大脳半球実質内にHolt's adjuvant（10%$AlCl_3$・6H_2O溶液5.6mlに蒸留水27.9mlを加え，更に15.75%Na_3PO_4・12H_2O溶液6.3mlを加え，pH5.5に合わせて滅菌したもの）0.5mlをゆっくり注入した。投与直後（0日），3日，5日，7日目のウサギを麻酔後に断頭して大脳，小脳，脳幹の各部位に分けた。また，一部のウサギは10%ホルマリンにて経時的に還流固定し，組織標本の作製に供した。

2．capture ELISA法によるNF－H，NF－L蛋白量の定量

ウサギ脳各部位をホモジナイズし，NF－Hに対するモノクローナル抗体を固相化したマイクロタイタープレートの各ウェルにホモジネートを加え，1次抗体にNF－Hに対するポリクローナル抗体，2次抗体にALP標識抗ウサギIgGを用い，PNPPによる発色後に吸光度を測定した。NF－Lについてもモノクローナル抗体を固相化し，ポリクローナル抗体を1次抗体とした同様のELISA法にて測定した。それぞれの測定系について精製NF－H，N

F－Lを標準蛋白として標準曲線を作製し，サンプルの吸光度に対応する標準曲線上の値から各々の蛋白量を算出した。

3．ノーザン法によるNF－H，NF－L mRNAの定量

ウサギ脳から抽出したRNAからPT－PCRによってNF－H，NF－Lそれぞれに対して特異的なDNA配列を増幅し，ノーザン法のプローブとした。脳各部位のRNAをAGPC法により抽出し，ノーザン法によりNF－H，NF－LのmRNA量をデンシトメトリーにて定量し，それぞれの経時的変化を検討した。

4．ニューロフィラメントのリン酸化および局在変化の組織学的検討

アルミニウム投与ウサギ脳幹につき，1次抗体としてリン酸化非依存性抗NF－H抗体（N52），抗リン酸化NF－H抗体（SMI－31）および抗脱リン酸化NF－H抗体（SMI－32）を用いた免疫組織化学を行いリン酸化レベルの経時的変化を検討した。また，NF－HとNF－Lの局在変化を観察するため抗NF－H抗体（N52）と抗NF－L抗体を用いた2重染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。

【成績】

アルミニウム投与による脳各部位のニューロフィラメント蛋白量の変化は，NF－Hは経時的に増加したが，逆にNF－Lは経時的に減少していた。NF－Lに対するNF－Hの量比は，3日目以降に上昇していた。特に大量のE－NFCが観察された脳幹ではこの傾向が顕著であった。

アルミニウム投与によるmRNAの変化は，NF－H mRNA量は上昇していたが，NF－L mRNA量は各部位で低下していた。NF－H蛋白の増加はNF－H mRNAの増加のみでは説明できず，蛋白生合成後の軸索輸送障害や代謝障害によりNF－Hが蓄積する機序が示唆された。

アルミニウム投与に伴うニューロフィラメントのリン酸化状態の変化について免疫組織化学的に検討すると，投与後，初期には一過性に脱リン酸化NF－Hが細胞体内に増加し，投与5日（目）以降は逆にリン酸化NF－Hが細胞体内に増加することが示された。

アルミニウム投与に伴うニューロフィラメントサブユニット局在の変化を，NF－LとNF－Hに対する2重蛍光染色を用いて，共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ，投与直後ではNF－HとNF－Lが瀰漫性に一定の量比で混在していたが，投与後5日目の神経細胞胞体内ではNF－Hのみが偏在して認められた。

【総括】

E－NFCの主要な構成成分であるニューロフィラメントの蛋白合成，蛋白レベル，リン酸化レベル，細胞内局在について検討を行い，その動態を明らかにした。その結果，E－NFC形成過程では初期変化として細胞内輸送の障害とリン酸化レベルの上昇とが生じ，その後NF－H蛋白の発現量の上昇とNF－L蛋白発現量の減少のため両者の量比が解離することによりE－NFC形成と神経細胞変性が惹起されることが示唆された。このようなニューロフィラメント動態の異常は，細胞内のマイクロチュブル系，マイクロフィラメント系など他の細胞骨格系にも影響を及ぼすものと考えられ，本研究で得られた成績は，細胞骨格蛋白と神経細胞変性過程の関係を明らかにすることに役立つものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病やピック病などの中枢神経系変性疾患では，神経細胞体内に線維性構造物の蓄積が出現することが知られているが，その形成過程については明らかにされていない。本研究は，ウサギ脳内にアルミニウムを投与して実験的神経原線維変化（E－NFC）を作製し，その形成過程のニューロフィラメント蛋白動態について検討を行ったものである。

ELISA法とノーザン法により，NF－Hについては蛋白，mRNAとも経時的に増加するがNF－Lについては減少し，アルミニウム投与後には両者の比率が大きく解離することを明らかにした。NF－Hの蛋白量の増加はmRNAの増加に先行し，かつ，より顕著であることを示し，蛋白生合成後の軸索輸送障害や代謝障害によりNF－Hが蓄積する機序を示唆した。免疫組織化学的検討により，アルミニウム投与後初期の細胞胞体内には脱リン酸化N

Ｆ－Ｈが増加し，以後はリン酸化ＮＦ－Ｈが経時的に増加することを示した。ＮＦ－Ｈ，ＮＦ－Ｌについての２重蛍光染色では，アルミニウム投与によりＮＦ－Ｈが細胞胞体内で高度に偏在することを示した。これらの結果から，Ｅ－ＮＦＣ形成過程ではＮＦ－Ｈの細胞内輸送の障害が生じ，その後リン酸化レベルの上昇や蛋白量比の顕著な解離によりＥ－ＮＦＣ形成と神経細胞変性が惹起されるという機序を提唱した。本研究の結果は，Ｅ－ＮＦＣの形成機序についてニューロフィラメントサブユニット蛋白間の量比の解離が原因となりうることを示した点で意義があり，この知見は中枢神経系変性疾患における線維性構造物蓄積の形成機序を理解する上で重要と考えられ，学位の授与に値すると考える。