

Title	Immunohistochemical analysis of copper chaperone for superoxide dismutase in mouse central nervous system : a comparative study with paraffin and frozen section
Author(s)	隅, 寿恵
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43754
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">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	隅 寿 恵
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16868 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Immunohistochemical analysis of copper chaperone for superoxide dismutase in mouse central nervous system; a comparative study with paraffin and frozen section (マウス中枢神経における copper chaperone for superoxide dismutase の分布; パラフィン切片と凍結切片の比較を含めた免疫組織学的解析)
論文審査委員	(主査) 教授 佐古田三郎 (副査) 教授 青笹 克之 教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

【目的】

銅は生体にとり不可欠な微量元素である一方、毒性を与えうるとも知られる。そのため、神経細胞における細胞体内の銅代謝は厳しく規定されている。銅輸送蛋白の存在が近年明らかにされてきており、アルツハイマー病などの神経変性疾患においても、銅代謝との関連が注目されている。我々は superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の突然変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) 患者の中枢神経において、遊離銅イオンの異常な増加を認め、FALS モデルマウスに銅キレート剤を投与すると発症が遅くなることを報告した。CCS は superoxide dismutase 1 (SOD1) に特異的に銅を運び、細胞体内の主要な抗酸化剤である SOD1 を活性化する蛋白であるが、CCS の中枢神経における生理学的役割を明らかにするために、マウス CCS に対する精製抗体を作成し、免疫組織学的検索を行った。また、FALS モデルマウスの病理組織を FALS 患者と比較するのに最適なパラフィン切片に抗 CCS 抗体が応用できるかどうかの検討も加えた。

【方法】

マウス CCS 蛋白のカルボキシル末端側〔アミノ酸251-267、NH₂-WEERGRPIAGQGRKDS-COOH〕に相当する合成ペプチドを抗原として、300 μg をウサギの皮下20カ所に注射し、その後14、28、42、56、70日後に注射を繰り返した。最終免疫7日後に血清を採取し、その血清をマウス CCS ペプチドで免疫した G-セファロースカラムを用いて精製した。6ヶ月齢の C57BL/6J マウスを深麻酔し、phosphate buffer saline (PBS; pH7.4) を還流した後、一部は脳および脊髄を取りだしドライアイスで凍結した。一部のマウスは、続いて4%パラホルムアルデヒドで還流固定した。脳および脊髄を取りだし、引き続いて4度で一昼夜同じ固定液で固定した。この固定後組織について、一部は20%スクロースで cryoprotect した後、凍結ブロックを作製し、一部はパラフィンブロックを作製した。これら3種類の組織切片について抗 CCS 精製抗体を〔濃度 3 μg/ml〕一次抗体として 4°C で18時間反応させた。コントロールとして PBS あるいは十分量の CCS ペプチドで吸収後の抗体を一次抗体の代わりに用いた。PBS でよく洗浄した後、抗ウサギ抗体を二次抗体として、ABC法を用いて DAB で発色させた。また、マウス脳20 μg を用いた western blotting を抗 CCS 精製抗体に対して施行した。

【結果】

PBSあるいはCCSペプチドで吸収後の抗体を反応させたものでは全く免疫反応性を得られなかった。CCSはマウス中枢神経のあらゆる神経細胞に分布していた。細胞質が染まり、核は陰性であった。またそのintensityは神経細胞ごとに異なっていた。固定後の凍結切片は、新鮮凍結切片と染色パターンは同じで、またそのintensityは低下せず、構造物の輪郭はむしろはっきりしていた。またパラフィン切片は固定後の凍結切片に比較し、染色性は劣るものの染色パターンは同様であった。神経細胞においては小脳プルキンエ細胞、大脳錐体細胞、脊髄前角細胞が特に良く染まり、また神経細胞以外にも一部のグリア細胞、軸索も陽性であった。

抗CCS精製抗体を用いたwestern blottingにおいて35kDa付近に、マウスCCSに相当すると考えられる一本のバンドを認めた。

【総括】

抗CCS精製抗体を用いて、マウス中枢神経におけるCCSの分布を詳細に示し、パラフィン切片に応用可能であることを示した。パラホルムアルデヒド(PFA)による固定はCCS抗体の免疫反応性に影響はほとんど見られなかった。蛋白のN末端はPFAによってアミノ酸が架橋結合するために修飾されやすいと知られるが、今回作製したCCS抗体はC末端に対する抗体であったため、PFAによる免疫反応性の低下が抑えられたと考えられた。

変異SOD1遺伝子を高発現させたFALSモデルマウスはFALS患者と同様に致死的な進行性の運動神経病を示し、またその神経病理像も大型の脊髄前角細胞の消失と、FALS患者脊髄の病理学的hallmarkであるとされるLewy body-like hyaline inclusion (LBHI)を示し、非常に良く似ている。著者らは以前にヒトFALS患者脊髄においてCCSがLBHIにSOD1と共に凝集していることを示した。今回得られた抗CCS抗体を用いて、FALSモデルマウスにおける病変形成の、経時的变化の検討に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)は、copper/zinc superoxide dismutase (SOD1)の変異で発症することが報告されているが、その病因および多様な病理像については不明の点が多い。近年SOD1に特異的に銅をトランスファーするcopper chaperone for SOD1 (CCS)が同定された。私は、マウスおよびヒトCCSに対する抗体を作製し、正常マウス、FALSモデルマウス、FALS剖検症例について免疫組織学的検討を行った。得られた抗体が3種類の異なった固定法を用いても抗体の染色パターンがほぼ一致し、病理組織の観察に有利なパラフィン切片に適用されることを示した。

その結果、FALS神経病理における特徴的封入体であるLewy body-like hyaline Inclusion (LBLI)にSOD1と共にCCSが共存していることを初めて示した。

本研究はFALS病理像の解明に貢献するもので学位に値する。