

Title	Cell biological analysis of neurons in the central nervous system of the klotho mutant mouse
Author(s)	塩崎, 元子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54131
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">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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【7】

氏 名	しお 塩 崎 もと 子
博士の専攻分野の名称	博 士（保健学）
学 位 記 番 号	第 2 3 7 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科保健学専攻
学 位 論 文 名	Cell biological analysis of neurons in the central nervous system of the klotho mutant mouse (クロトー変異マウス中枢神経系の神経細胞の細胞生物学的解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松浦 成昭 (副査) 教 授 山村 卓 教 授 三善 英知

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

Klotho（クロトー）遺伝子はヒトも含めて動物の寿命を調節していると考えられている。クロトー遺伝子変異マウス(クロトーマウス)はクロトー遺伝子がほとんど欠失し、クロトー蛋白質が発現されず、平均寿命は極めて短く約2ヶ月で、新規の老化促進モデルマウスと考えられている。このマウスの老化様症状は動脈硬化、骨粗鬆症、肺気腫、皮膚及び筋の委縮、胸腺の早期退縮、成長障害などがあり、このような変性あるいは老化様症状に共通するメカニズムに関してはカルシウム/リン酸代謝異常に基づくものであるとの説が有力になっている。実際多くの組織や器官で異所性の石灰化が起きており、血管の疾患である動脈硬化や骨の代謝異常である骨粗鬆症はこれらのミネラルイオンのホメオスタシスの破綻と極めて密接に関連していることが示唆される。またクロトーマウスに外因性のクロトー遺伝子を強制導入し、クロトー蛋白質の発現を誘導すると上記の多種類の老化様症状が改善されることや正常の野生型マウスに同様にクロトー遺伝子を過剰発現させると寿命が有意に延長されることもわかっている。すなわち、クロトー遺伝子は寿命延長作用をもち、この遺伝子が欠失するとカルシウムなどのミネラルイオンのホメオスタシスの破綻で種々の細胞の機能も障害され、死に至ると判断される。しかしながら、このようなクロトーマウスの中枢神経系、特に神経細胞が老化様の症状を示すという報告はほとんどない。むしろ、脳ではアミロイドの沈着あるいは老人斑などはみられず、脳の委縮は起こらないのではないかとの意見もある。一方で小脳のプルキンエ細胞の脱落が示唆されているが、それを支持する所見は報告されていない。しかし、クロトーマウスの歩行障害など運動機能の低下やクロトー遺伝子の変異をもつヒトでの認知障害などの報告から判断するとクロトーマウスの神

経系の異常あるいは老化も十分考えられる。従って、本研究ではクロトーマウスの中枢神経系においてどのような細胞レベルの変化があるのかを形態学的、免疫細胞化学的、生化学的及び分子生物学的手法を組み合わせ多角的に解析し、神経細胞とグリア細胞の生化学的形態学的性質の老化類似様の変化を初めて明らかにした。

材料と方法

クロトーマウスは上記したように平均寿命8週なので、本研究では7週齢のマウスを使用した。すべての実験系において、これらのクロトーマウスを同週齢、同性（雄）でかつ同腹の野生型マウスと比較した。ヘテロ接合体のマウスを日本クレア株式会社から購入、交配後、クロトーマウスと同腹の野生型マウスを本研究に用いた。クロトー遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドで、それぞれの新生マウスの尾の組織を用い、クロトーマウス、ヘテロマウス及び野生型マウスの遺伝子型をPCR法で同定した。センスプライマーの塩基配列はクロトーマウスと野生型マウスに共通で5'-TTGTGGAGATTGGAAGTGGACGAAAGAG-3'、アンチセンスプライマーはクロトーマウスの同定には5'-CGCCCCGACCGGAGCTGAGAGTA-3'を、野生型マウスには5'-CTGGACCCCTGAAGCTGGAGTTAC-3'を用いた。

神経細胞及びグリア細胞に発現する蛋白質の解析で、ウエスタンブロット及び免疫組織化学法に用いた抗体は以下の蛋白質に対するものである。ニューロフィラメントのリン酸化H蛋白質（pNFH）、非リン酸化 H 蛋白質（nNFH）及びL蛋白質（NFL）、微小管関連蛋白質2（MAP2）、 α -チューブリン、シナプトフィジン、カテプシンD、MAP1A/Bの軽鎖（LC3）、Bcl-xL、Bax、グリア線維酸性蛋白質（GFAP）、細胞分裂活性化蛋白質リン酸化酵素（MAPK/ERK-1及び2）。ウエスタンブロットではHRP標識二次抗体処理後、免疫反応のバンドをECLシステムで可視化し、免疫組織化学では同様にFITCあるいはTexas Redの蛍光標識二次抗体で処理し、レーザー顕微鏡で解析し、共に定量解析した。

光学顕微鏡（光顕）及び電子顕微鏡（電顕）による解析では、マウスの脳及び脊髄を心臓から0.1Mリン酸緩衝の1%グルタルアルデヒドと1%パラフォルムアルデヒドの混合液で灌流固定し、オスミウム酸で後固定、酢酸ウラン水溶液でブロック染色、脱水後樹脂に包埋、1 μ mの切片をガラスナイフで作製、トルイジンブルー染色後、光顕観察した。その後必要部位をダイヤモンドナイフで超薄切片を作製、酢酸ウランとクエン酸鉛液で二重染色後、電顕観察し、定性及び定量解析した。

結 果

ウエスタンブロットによる生化学的手法、レーザー顕微鏡による免疫組織化学的手法及び光顕と電顕による形態学的手法による解析に用いたマウスはすべてそのゲノムDNAをPCR法により同定し、7週齢の雄クロトーマウスとコントロールとしてその変異マウスと同腹の野生型雄マウスを用いた。

脳及び脊髄でのウエスタンブロットの所見と免疫組織化学でのそれは一致し、野生型マウスと比較し、クロトーマウスで以下の結果を得た。クロトーマウスの神経細胞及び/あるいはグリア細胞が発現が増加した蛋白質は、pNFH、NFL、カテプシンD、LC3、Bax及びGFAPであった。一方、クロトーマウスで発現が減少したものは、nNFH、MAP2、シナプトフィジン、Bcl-xL、MAPKであった。チューブリンの発現のみが両者で有意な変化がみられなかった。また、NFL、Bcl-xL、Bax及びMAPK はウエスタンブロットのみの所見であった。

形態学的解析で野生型マウスに比べてクロトーマウスで変化したものは、細胞骨格系では、軸索のニューロフィラメントの分布密度が増加し、プルキンエ細胞の樹状突起では微小管の間隔が減少した。その他の細胞小器官ではライソソームが有意に増加し、リボフスチン顆粒がみられた。プルキンエ細胞の細胞体と軸索ではリソソームの増加に加えて、オートファゴソーム様の構造が出現し、小脳核にあるその軸索終末の細胞質の電子密度が顕著に増加し、ミトコンドリアが膨化し、プルキンエ細胞の変性的変化が明確に示された。中枢神経系全体でシナプス小胞の分布密度及び軸索終末の大きさの減少が観察された。神経細胞体及び樹状

中枢神経系全体でシナプス小胞の分布密度及び軸索終末の大きさの減少が観察された。神経細胞体及び樹状突起の電子密度の顕著な増加は海馬CA1の一部の錐体細胞にみられ、小脳のプルキンエ細胞と同様この錐体細胞も変性していることがわかったが、共に脱落像は見られなかった。さらに、神経細胞以外でグリア細胞の一種である星状膠細胞のグリアフィラメントの分布密度が顕著に増加した。以上の神経及びグリア細胞における細胞小器官の形態学的変化はウエスタンブロットや免疫組織化学の所見と一致した。

考察

生化学的、免疫組織化学的及び形態学的手法により、野生型マウスと比較し、クロトーマウスの中枢神経系の神経細胞とグリア細胞に老化様の変性的変化が明確に検出され、この変化は未熟な状態で引き起こされたものではなく、ある程度成熟した状態での変性的変化であることが細胞の蛋白質の発現変化や細胞小器官の形態変化を解析することで初めてわかった。すなわち、クロトーマウスでは、シナプトフィジン、Bcl-xL、MAPK、MAP2などの蛋白質やシナプス小胞、ミトコンドリア、粗面小胞体の小器官など、細胞が機能的に活性化している時に増加する細胞蛋白質や小器官が減少した。逆に、pNFH、カテプシンD、LC3、Bax、GFAPなどの蛋白質や細胞質の電子密度の増加に加えて、リソソーム、リボフスチン顆粒、ニューロフィラメント、グリアフィラメントの小器官など、細胞の機能が低下しているか、変性、細胞死や老化などで増加する小器官は増加した。特に細胞骨格系のニューロン及びアストロサイトに発現する中間径フィラメントとその構成蛋白質の増加、さらにpNFHの増加やオートファジー関連蛋白質とその構造の出現はクロトーマウスの中枢神経系の分化後に変性していることを意味する。どのような分子レベルのメカニズムでこのような神経細胞の老化様症状が起こるのか本研究では解析されなかったが、脳内ではクロトーマウスは脈絡叢に比較的高く発現していることから判断して、血液の場合と同様に、脳脊髄液のミネラルイオン組成のホメオスタシスの破綻が海馬のCA1錐体細胞や小脳のプルキンエ細胞など脊髄の神経細胞に比べてより感受性の高い細胞に顕著な老化的変性を引き起こすのではないかと推測される。以上より、クロトーマウス中枢神経系の老化様変性像はヒトの神経老化と類似し、このマウスがヒトの老化関連神経疾患の解析、延いてはそれらの緩和及び予防法の解析に有用なモデル動物であることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

超高齢化社会を迎えている我が国で老化に関連する疾患が大きな問題になっている。老化関連疾患の予防や医療のための研究のアプローチの1つとしてモデル動物の作成と解析がある。今回、申請者が用いたklotho遺伝子変異マウス（クロトーマウス）は老化のモデルマウスとして作成されたものであり、このマウスではカルシウム/リン酸代謝異常による動脈硬化や骨粗鬆症に加え、運動機能低下などの中枢神経症状が見られ、ヒト老化との類似性が注目されている。申請者はこのマウスの中枢神経系を正常マウスと比較検討し、神経およびグリア細胞に発現する蛋白をウエスタンブロットと免疫組織化学で、細胞構造を微細形態学的手法で詳細な解析を行なった。その結果、クロトーマウスでは神経細胞の軸索のニューロフィラメントのリン酸化亢進に伴う軸索の径の増大・軸索輸送の障害、シナプス異常、dendriteの微小管関連蛋白のMAP2発現亢進に伴う微小管の配列異常、径の縮小と機能低下、細胞体のオートファジーの亢進による神経変性、グリア細胞のGFAP発現亢進、グリアフィラメント増加などの所見が認められ、特に脊髄前角細胞、プルキン

エ細胞及び海馬CA1錐体細胞で、著明な変性像がみられた。これらの所見はクロトーマウスの症状に一致した所見と考えられた。この研究はクロトーマウス中枢神経系の所見はヒトの神経系の老化のモデルマウスとして利用可能であることを初めて示すものとして高く評価できる。以上より、本論文は博士（保健学）の学位授与に値するものと考えられる。