

ISSN : 0037-3796



神経化学

Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry

Vol. 38 (No.3), 1999

第42回 日本神経化学会(広島)大会抄録集号

平成 11 年 9 月

目次

■第42回日本神経化学会組織委員会、プログラム委員	116
■学会場案内	117
学会場への交通	
国際会議場案内図	
学会場案内図	
■発表要領	120
■日本神経化学会からのお知らせ	122
■大会日程概要	123
■プログラム目次	126
■演題抄録	179
会長講演	
合同公開シンポジウム	
公開シンポジウム	
シンポジウム	
ワークショップ	
一般演題（口演）	
一般演題（ポスター）	
■編集後記	358
■人名索引	359
■キーワード索引	365



第42回日本神経化学会 抄 録 集



- 会 期 平成11年9月15日 (水), 16日 (木), 17日 (金)
- 会 場 広島国際会議場 (平和記念公園内)
〒730-0811 広島市中区中島町1の5
TEL:082-242-7777
- 会 長 中村重信 (広島大学医学部第三内科)
- 事務局 広島大学医学部第三内科
第42回日本神経化学会・広島大会事務局
〒734-8551 広島市南区霞1の2の3
TEL:082-257-5201
FAX:082-505-0490
E-mail:3naika@mcai.med.hiroshima-u.ac.jp
- 会期中の学会本部
広島国際会議場 小会議室 (ラン2)
TEL:082-242-8891 (直通)

第42回日本神経化学会組織委員会

太田 茂 (広島大学医学部社会薬学)	筒井 和義 (広島大学総合科学部人間行動研究)
川上 秀史 (広島大学医学部内科学第3)	土肥 敏博 (広島大学歯学部歯科薬理学)
菅野 雅元 (広島大学医学部免疫学・寄生虫学)	仲田 義啓 (広島大学医学部薬効解析学)
菊池 章 (広島大学医学部生化学第1)	三森 康世 (広島大学医学部内科学第3)
栗栖 薫 (広島大学医学部脳神経外科学)	山村 安弘 (広島大学医学部保健学科地域・老人看護学)
笹 征史 (広島大学医学部薬理学)	山脇 成人 (広島大学医学部神経精神医学)

第42回日本神経化学会プログラム委員 (敬称略)

新井 平伊 (順天堂大学医学部精神医学)	下濱 俊 (京都大学大学院臨床神経学)
阿部 康二 (岡山大学医学部神経内科)	武田 雅俊 (大阪大学大学院神経機能医学)
池中 一裕 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経情報部門)	田平 武 (国立精神・神経センター神経研究所)
大久保善朗 (東京医科歯科大学医学部神経精神医学)	西川 徹 (国立精神・神経センター神経研究所)
小川 紀夫 (岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設神経情報学部門)	丹羽 真一 (福島県立医科大学神経精神医学)
加藤 進昌 (東京大学大学院精神医学)	貫名 信行 (理化学研究所脳科学総合研究センター)
神庭 重信 (山梨医科大学精神神経医学)	松本 昌泰 (大阪大学大学院病態情報内科学)
金澤 一郎 (東京大学大学院神経内科学)	三國 雅彦 (群馬大学医学部神経精神医学)
兼子 直 (弘前大学医学部神経精神医学)	水野 美邦 (順天堂大学医学部脳神経内科)
栗山 勝 (福井医科大学第2内科)	山脇 成人 (広島大学医学部神経精神医学)
楠 進 (東京大学大学院神経内科学)	米田 博 (大阪医科大学神経精神医学)
高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)	柳澤 勝彦 (国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部)
斉藤 利和 (札幌医科大学神経精神医学)	渡辺 義文 (埼玉医科大学精神医学)
佐々木秀直 (北海道大学大学院神経内科学)	和田 圭司 (国立精神・神経センター神経研究所)

学会場への交通

広島駅から

路線バス（所要時間約20分）

- 広島駅南口バスのりばA-3ホームから広島バス24号線「吉島営業所または吉島病院」行きへ乗車,「平和公園前」で下車。
- 広島駅南口バスのりばA-1ホームから広島電鉄バス13号線「百メートル道路経由広島西飛行場」行きへ乗車,「平和公園前」で下車。

市内電車（所要時間約20分）

- 広島駅南口市内電車のりばから「宇品（うじな）①」行きへ乗車,「袋町（ふくろまち）」で下車,徒歩5分
- 「己斐（こい）②」,「江波（えば）⑥」,または「宮島」行きへ乗車,「原爆ドーム前」で下車,徒歩5分

タクシー 所要時間約15分, 1500円前後です。

広島空港から

空港リムジンバス（所要時間約65分, 高速道路経由）

- 広島空港1階到着フロアBホーム「広島方面リムジンバス乗場」から「広島バスセンター」行きへ乗車, 終点「広島バスセンター」で下車, 徒歩10分

タクシー 所要時間約50分（高速道路経由）

広島西飛行場から

路線バス（所要時間約20分）

- 広島西飛行場前バスのりばから広島電鉄バス3号線「広島駅」行きへ乗車,「中電前（ちゅうでんまえ）」で下車, 徒歩5分

タクシー 所要時間約10分, 1500円前後です。

広島港（宇品港）から

路線バス

- 広島バス21号線「広島, 大洲（おおず）, 向洋（むかいなだ）」行きへ乗車,「中電前」で下車, 徒歩5分

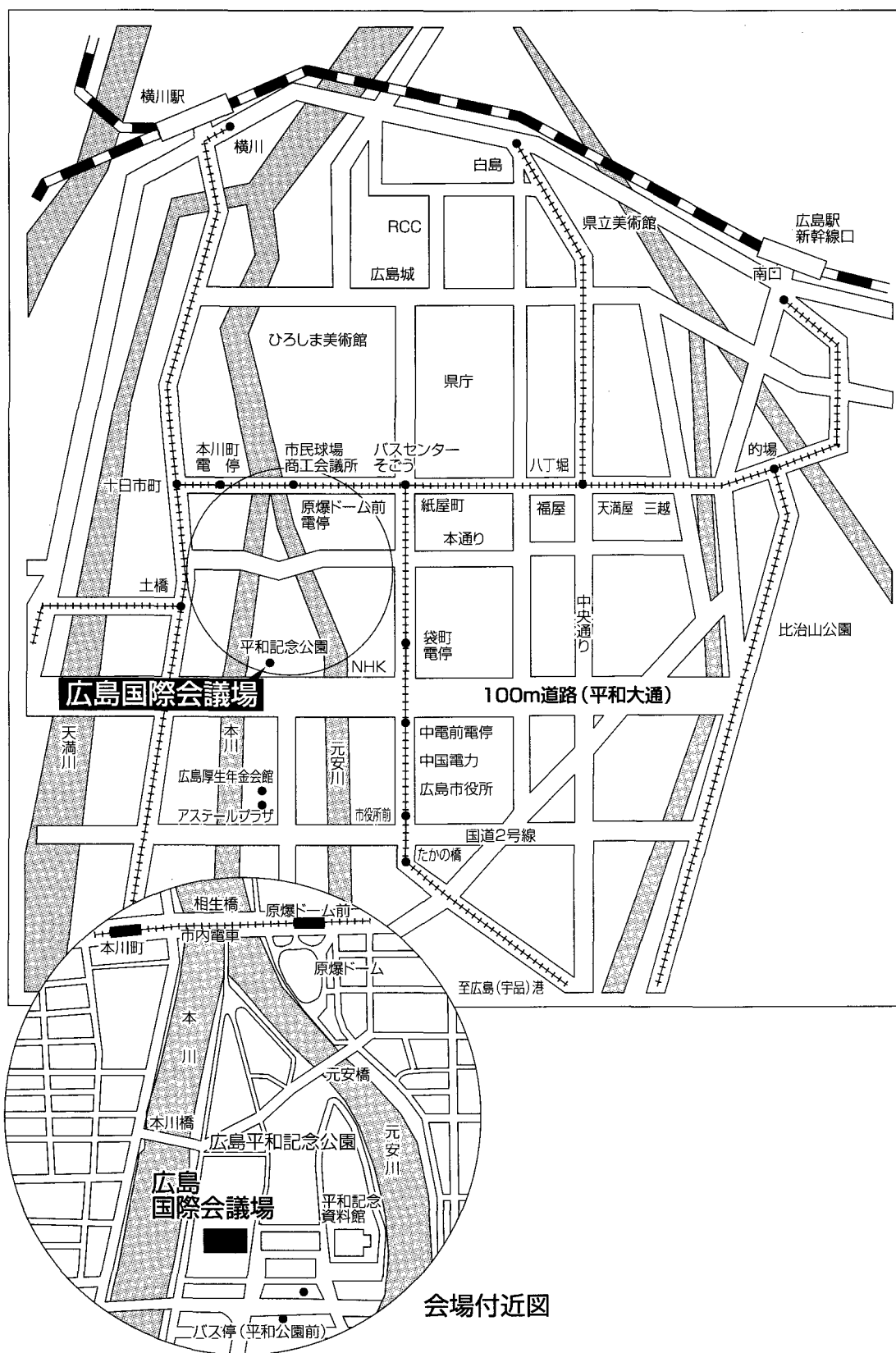
市内電車（所要時間約30分）

- 「広島駅①」または「己斐（こい）③」行きへ乗車,「袋町」で下車, 徒歩5分

タクシー 所要時間約20分, 2000円前後です。

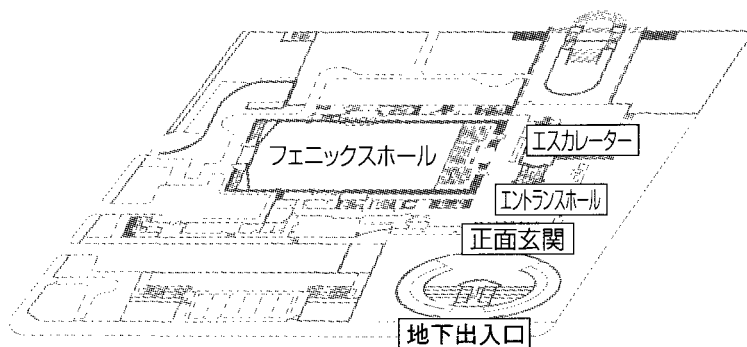
■お車でお越しの方へ

広島国際会議場の駐車場（無料）はご利用台数が限られており, また混雑が予想されるため, なるべくお車でのご来場はご遠慮ください。平和公園の周辺には有料駐車場がありますので, そちらをご利用下さい。

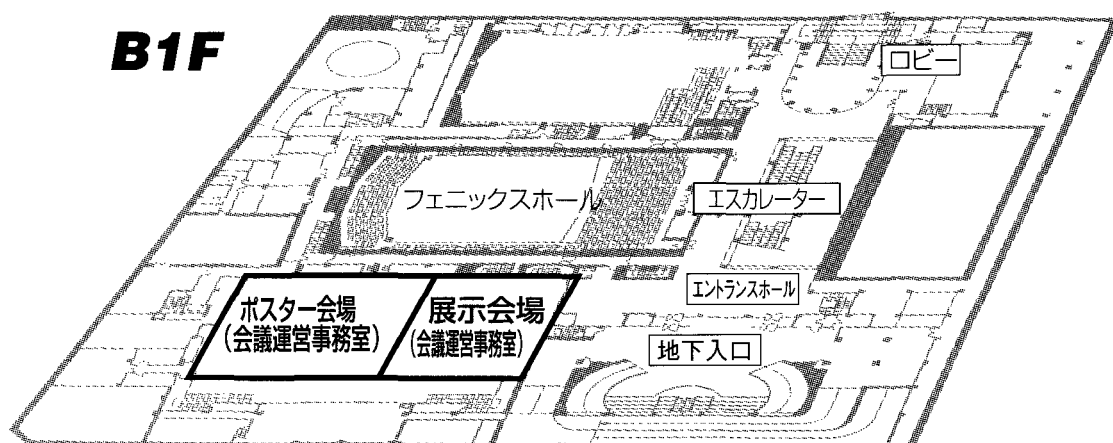


学会場案内図

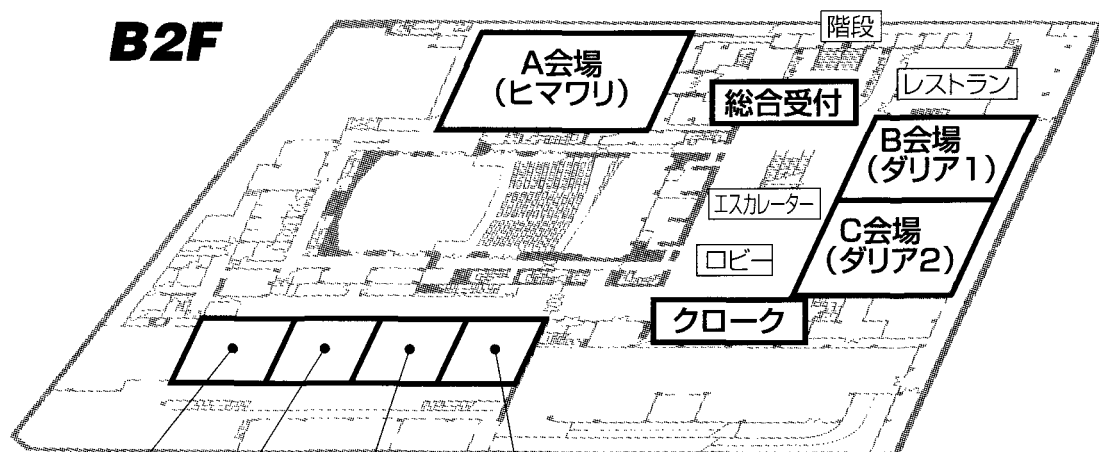
1F



B1F



B2F



学会本部 (ラン2) F会場 (ラン1) E会場 (コスモス2) D会場 (コスモス1)

発表要領

1. シンポジウム、ワークショップ

●演者の方へ

- 1) スライドの受付は各会場の入口受付で行います。シンポジウム（ワークショップ）開始30分前までにスライドをスライド受付に提出して下さい。
- 2) プロジェクターは35mm（5×5cm）判用のものを原則として一台使用します。
- 3) スライドは所定のスライドホルダーに入れて提出し、試写をした上で係にお渡し下さい。その際にスライド預り証をお渡しいたします。講演終了後に預り証と引き替えにスライドをお受け取り下さい。
- 4) ご発表15分前には必ず次演者席にお着き下さい。
- 5) 講演時間の厳守をお願いいたします。

●司会の方へ

- 1) シンポジウム（ワークショップ）開始15分前までに会場入口の受付にお越し下さい。到着されたことを告げられた後、次座長席にお着き下さい。
- 2) 時間厳守にご留意いただき運営して下さい。

2. 一般演題（口演）

●演者の方へ

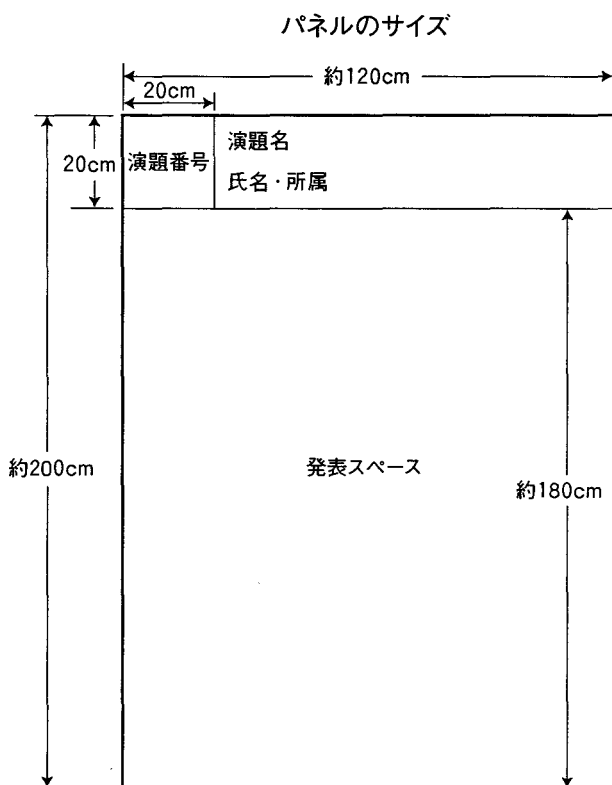
- 1) スライドの受付は各会場の入口受付で行います。発表開始1時間前までにスライドをスライド受付に提出して下さい。
- 2) プロジェクターは35mm（5×5cm）判用のものを原則として一台使用します。スライド枚数は原則として10枚以内です。
- 3) スライドは所定のスライドホルダーに入れて提出し、試写をした上で係にお渡し下さい。その際にスライド預り証をお渡しいたします。講演終了後に預り証と引き替えにスライドをお受け取り下さい。
- 4) ご発表10分前には必ず次演者席にお着き下さい。
- 5) 発表時間は10分、討論時間は4分です。設定時間を厳守して下さい。

●座長の方へ

- 1) セッション開始15分前までに会場入口の受付にお越し下さい。到着されたことを告げられた後、次座長席にお着き下さい。
- 2) 時間厳守にご留意いただき運営して下さい。

3. 一般演題（ポスター）

●ポスターの展示要領



- 1) 発表内容は上記の展示スペースに収まるようにして下さい。
- 2) パネル左上の演題番号のみは大会事務局が作成いたします。演題名, 所属, 氏名は各自で20cm×100cmの大きさのものを用意して下さい。
- 3) ポスターは大きく分かりやすく書いて下さい。
- 4) 日本語が理解しづらい参加者のために、英語での要約をつけたり、英語での図の説明をつけるなどのご配慮をお願いいたします。
- 5) パネル自体には直接図や文字を書いたり、パネルに直接糊付けしたりはできません。
- 6) 展示用の押しピンはポスター受付に準備いたします。

●ポスター発表・討論

- 1) ポスターの展示会場は地下1階のポスター会場（会議運営事務室およびロビー）です。
- 2) ポスター発表は16日, 17日のどちらかになります。期日をご確認下さい。
- 3) ポスター討論時間を以下のように設定してあります。発表者はポスター受付にてリボンを受け取り、必ず自分のポスターの前に待機して下さい。日により時間帯が異なりますのでご注意下さい。
 16日 17:00～18:00
 17日 12:00～13:00
- 4) ポスターは2日とも午前9時から10時までの間に所定の場所に貼付して下さい。また、16日は午後7時までに、17日は午後4時までに撤去を完了して下さい。撤去されないポスターは事務局で撤収させていただきますが、郵送などによるご返送はいたしかねますのでご了承下さい。

日本神経化学会からのお知らせ

1. 総 会

日時：9月16日（木）12：45—13：30

場所：A会場（ヒマワリ）

議題（予定）

1. 理事長報告
2. 庶務報告
3. 委員会報告
4. 平成11年度理事改選結果報告
5. 平成10年度決算の件
6. 平成12年度予算の件
7. 評議員選任の件
8. 次期大会の件
9. その他

2. 評議員会

日時：9月16日（木）12：00—12：45

場所：B会場（ダリア1）

議題（予定）

日本神経化学会の現状と将来

3. 各種委員会

将来計画委員会

9月15日（水）12：00—13：00（E会場：コスモス2）

シンポジウム企画委員会

9月15日（水）12：00—13：00（F会場：ラン1）

編集委員会

9月17日（金）12：00—13：00（E会場：コスモス2）

研究助成金等候補者選考委員会

9月17日（金）12：00—13：00（F会場：ラン1）

ISNプログラム検討委員会

9月17日（金）12：00—13：00（小会議室：ラン2）（予定）

第1日目 9月15日(水) 日程表

S: シンポジウム **WS:** ワークショップ

	A会場 (ヒマワリ)	B会場 (ダリア1)	C会場 (ダリア2)	D会場 (コスモス1)	E会場 (コスモス2)	F会場 (ラン1)	ポスター会場 (会議運営事務局)
9:00							
10:00	合同公開シンポジウム S10 「アルツハイマー病をどうして治すか —神経化学からのアプローチ—」 中村重信 鍋島俊隆						
11:00							
12:00							
13:00	P. H. St. George-Hyslop (Canada) T. Tabira (Japan) M. N. Rossor (U.K.) M. Takeda (Japan) J. D. Gabrieli (USA) K. Yanagisawa (Japan) D. B. Schenk (USA) M. Citron (USA)						
14:00							
15:00							
16:00							
17:00							
18:00							
19:00							

第2日目 9月16日(木) 日程表

S:シンポジウム WS:ワークショップ

	A会場 (ヒマワリ)	B会場 (ダリア1)	C会場 (ダリア2)	D会場 (コスモス1)	E会場 (コスモス2)	F会場 (ラン1)	ポスター会場 (会議運営事務局)
9:00	神経化学会 公開シンポジウム S20	S1 「神経老化の最前線」	S2 「精神分裂病の神経化学的病態に関する新しいアプローチ」	WS1 「シナプスの可塑性のダイナミクス」	WS2 「神経変性とアポトーシス」	WS3 「Peroxisome病の発症機序」	ポスター (P1) 貼 付
10:00	「神経情報信号化分子—チャンネル・トランスポーターの生理と病態—」						
11:00							
12:00		評議員会	ランチョン セミナー1	ランチョン セミナー2			
12:45		12:45	岡本和也	和田康弘			
13:00	総 会						掲 示
14:00	会長講演 中村重信						
15:00	S3 「オリゴデンドロサイトをめぐる最近の話題」	S4 「神経分化の発達とメカニズム」	WS4 「細胞骨格・接着因子の役割とその異常」	WS5 「アミロイドシスの分子病理;アミロイド線維形成機序と治療戦略」	口演 (V1) 神経伝達物質情報伝達	口演 (V2) モデル動物神経細胞死	
16:00							
16:48					16:48	16:34	
17:00							ポスター (P1) 討 論
18:00			イブニング セミナー 水野美邦				撤 去
19:00					ビアパーティ		

第3日目 9月17日(金) 日程表

S: シンポジウム WS: ワークショップ

	A会場 (ヒマワリ)	B会場 (ダリア1)	C会場 (ダリア2)	D会場 (コスモス1)	E会場 (コスモス2)	F会場 (ラン1)	ポスター会場 (会議運営事務室)
9:00	S5 「ポリグルタミン病の解明にむけて」	S6 「免疫性神経疾患の発症をめぐって」	WS6 「神経の再生の新しいアプローチ」	WS7 「神経栄養因子受容体機能制御」	口演 (V3) 痴 呆	口演 (V4) 精神疾患 虚 血	ポスター (P2) 貼 付
10:00							
11:00					11:06		掲 示
12:00			ランチョン セミナー3				ポスター (P2) 討 論
13:00			馬場正之 梶 龍児				
14:00	S7 「パーキンソン病の分子生物学」	S8 「てんかん及びその類縁疾患の分子遺伝学」	WS8 「脳血液関門とトランスポーター」	WS9 「痛みの神経化学的機序」	13:50 口演 (V5) 栄養因子	口演 (V6) 細胞分化 細胞骨格 代 謝	掲 示
15:00							
16:00					15:56		撤 去
17:00							
18:00							
19:00							

会長講演・公開シンポジウム**会長講演**

9月16日(木) 13:30-14:00

広島国際会議場 (A会場: ヒマワリ)

司会: 三木 直正 (大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学)

スフィンクスとミューズー神経化学の臨床応用ー

中村 重信

広島大学医学部内科学第3

合同公開シンポジウム

第42回日本神経化学会・第29回日本神経精神薬理学会

9月15日(水)

広島国際会議場 (A会場: ヒマワリ)

S10. アルツハイマー病をどうして治すか**ー神経化学からのアプローチー**

10:00-12:00

司会: 中村 重信 (広島大学医学部内科学第3)、鍋島 俊隆 (名古屋大学医学部薬剤部)

S10-1. アルツハイマー病はどうして起こるかー神経化学の成果

中村 重信 (広島大学医学部内科学第3)

S10-2. アルツハイマー病治療薬の現状と展望

鍋島 俊隆 (名古屋大学医学部薬剤部)

13:00-17:00

Opening remarks

Shigenobu Nakamura (Third Department of Internal Medicine, Hiroshima University)

公開シンポジウム

Chairpersons Rossor MN (UK), Nakamura S (Japan)

S10-3. Biological functions of the presenilins - components of a high molecular weight protein complex

Peter H. St. George-Hyslop (Toronto Univ., Canada)

S10-4. Studies in presenilin 1 transgenic mice

Takeshi Tabira (National Institute of Neuroscience)

Chairpersons St. George-Hyslop PH (Canada), Tabira T (Japan)

S10-5. Lessons from familial Alzheimer's disease

Martin N. Rossor (National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UK)

S10-6. Presenilin function relating to neuronal death of Alzheimer's disease

Masatoshi Takeda, Takeshi Kudo, Yuka Nakano, Yu Nakamura, Toshihisa Tanaka
(Osaka University)

Chairpersons Schenk DB (USA), Sasa M (Japan)

S10-7. A memory systems analysis of Alzheimer's disease

John D. Gabrieli (Stanford Univ., USA)

S10-8. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β -protein in cell culture

Katsuhiko Yanagisawa (National Institute for Longevity Sciences)

S10-9. Amyloid burden and neuropathology in PDAPP mice; implications for Alzheimer's disease therapy

Dale B. Schenk (Athena Neuroscience, USA)

S10-10. Targets for drug development in Alzheimer's and Parkinson's diseases

Martin Citron and Jean-Claude Louis (Neuroscience AMGEN Inc., USA)

Closing remarks

Masashi Sasa (Department of Pharmacology, Hiroshima University)

公開シンポジウム**日本神経化学会公開シンポジウム****9月16日(木) 9:00-12:00****広島国際会議場 (A会場: ヒマワリ)****S20. 神経情報信号化分子-チャンネル・トランスポーターの生理と病態**

オーガナイザー: 佐野 輝 (愛媛大学医学部神経精神医学)

小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科生物科学)

S20-1. overview

佐野 輝 (愛媛大学医学部神経精神医学)

S20-2. グルタミン酸トランスポーターおよび受容体: 機能異常と病態・創薬和田 圭司¹、西川 徹²、関口 正幸¹(¹ 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第4部、² 同第3部)**S20-3. 神経伝達物質トランスポーターの機能と病態**斎藤 尚亮、酒井 規雄、白井 康仁、阪井 一雄、大倉 陸美、上山 健彦
(神戸大学バイオシグナル研究センター・分子薬理分野)**S20-4. Ca²⁺チャンネルと小脳失調症**井本 敬二 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所、
総合研究大学院大学生命科学研究科)**S20-5. Na⁺チャンネル・K⁺チャンネルと知覚障害**

横山 茂 (金沢大学大学院医学研究科分子情報系独立専攻・細胞遺伝子学)

S20-6. クロライドチャンネルの機能とその異常による細胞病態岡田 泰伸 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所機能協関部門、
CREST・科学技術振興事業団)**S20-7. concluding remarks**

小倉 明彦 (大阪大学大学院理学研究科生物科学)

シンポジウム

シンポジウム

9月16日（木）9：00-12：00

S1 神経老化の最前線

（B会場：ダリア1）

司会：森 啓（大阪市立大学医学部
老年医学研究部門脳神経系分野）
三森 康世（広島大学医学部内科学第3）

S1-PL. 多彩な老化症状に関連する Klotho 遺伝子発見の生物学的意義

鍋島 陽一
京都大学大学院医学研究科腫瘍生物

S1-1. ヒト細胞の老化と不死化

井出 利憲
広島大学医学部総合薬学科薬品分析化学

S1-2. ミトコンドリアと老化

紙野 晃人、太田 成男
日本医科大学老人病研究所生化学部門

S1-3. 老化関連遺伝子の多型と疾患

三木 哲郎
愛媛大学医学部老年医学

S1-4. 老化促進モデルマウス SAMP8 脳に見られる代謝異常

黒川 知則、西谷 しのぶ、櫛木 修
広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学

S1-5. D-アミノ酸と神経の老化

富山 貴美、森 啓
大阪市立大学医学部老年医学研究部門脳神経系分野

9月16日（木）9：00-12：00

S2 精神分裂病の神経化学的病態に関する新しいアプローチ

（C会場：ダリア2）

司会：西川 徹（国立精神・神経センター神経研究所）
新井 平伊（順天堂大学医学部精神医学）

S2-PL. 精神分裂病の神経化学

融 道男¹、西川 徹²

シンポジウム

¹メンタルクリニックおぎくぼ、²国立精神・神経センター神経研究所

S2-1. メタンフェタミン動物モデル研究から

秋山 一文

岡山大学医学部神経精神医学

S2-2. フェンサイクリジン動物モデル研究から

山本 直樹、海野 麻未、平岡 秀一、土田 英人、西川 徹

国立精神・神経センター神経研究所第3部

S2-3. 死後脳研究から - グルタミン酸作動系を中心として

大沼 徹

順天堂大学医学部精神医学

S2-4. 精神分裂病のPETから

須原 哲也

科学技術庁放射線医学総合研究所、高度診断機能研究ステーション、CREST

S2-5. 抗精神病薬の薬理学的研究から

渡辺 雅幸^{1,2}、萩野 洋子¹、開地 泰介¹、野中 良一¹

¹東京都精神医学総合研究所精神薬理、²昭和大学附属烏山病院

9月16日(木) 14:00-17:00

S3 オリゴデンドロサイトをめぐる最近の話題

(A会場: ヒマワリ)

司会: 池中 一裕 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

松本 昌泰 (大阪大学大学院医学系研究科

病態情報内科学)

S3-PL. オリゴデンドロサイトの発生・分化と生理機能

鹿川 哲史¹、A. Ivanova¹、和田 圭樹¹、河野 真子¹、岩崎 靖乃¹、大庭 明生¹

馬場 広子²、池中 一裕¹

¹岡崎国立共同研究機構生理学研究所、²名古屋市立大学医学部第2生理

S3-1. オリゴデンドロサイトのアポトーシス

三浦 正幸

大阪大学大学院医学系研究科神経機能解剖

S3-2. オリゴデンドログリアにおけるグルタミン酸毒性

吉岡 亮¹、廣瀬 源二郎¹、David Pleasure²

¹金沢医科大学神経内科、²Children's Hospital of Philadelphia, USA

S3-3. 慢性脳低灌流による白質障害

富本 秀和、脇田 英明、松尾 明典、秋口 一郎

京都大学大学院医学研究科脳病態生理 (臨床神経学)

シンポジウム

S3-4. 脳虚血におけるオリゴデンドロサイトの動態

北川 一夫、松本 昌泰、柳原 武彦、堀 正二

大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学、神経機能医学

S3-5. Binswanger 型白質脳症と Oligodendrocytes

山之内 博

東京都老人医療センター神経内科

9 月 16 日 (木) 14 : 00-17 : 00

S4 神経分化と発達のメカニズム

(B会場：ダリア1)

司会：小幡 邦彦（岡崎国立共同研究機構

生理学研究所神経化学）

三國 雅彦（群馬大学医学部神経精神医学）

S4-PL. ショウジョウバエ神経幹細胞の分化と遺伝子

堀田 凱樹

国立遺伝学研究所

S4-1. 脳の神経回路形成における拡散性、非拡散性因子の役割

村上 富士夫、白崎 竜一、勝又 隆太

大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学分野神経生理学

S4-2. ドレブリンの発現変化と樹状突起スパインの形態変化

白尾 智明、関野 祐子、林 謙介

群馬大学医学部行動分析学

S4-3. 運動ニューロンの発生の分子的基盤

田辺 康人

大阪バイオサイエンス研究所第4研究部

S4-4. fyn ノックアウトマウスの情動神経機構の発生と機能解析

湯浅 茂樹¹、八木 健²

¹千葉大学医学部解剖学第2、²岡崎国立共同研究機構生理学研究所

S4-5. 精神分裂病の発達障害仮説と機能形態学

池田 研二、入谷 修司、黒木 規臣

東京都精神医学総合研究所、東京都立松沢病院

9 月 17 日 (金) 9 : 00-12 : 00

S5 ポリグルタミン病の解明にむけて

(A会場：ヒマワリ)

シンポジウム

司会：池田 穰衛（東海大学総合医学研究所）

辻 省次（新潟大学脳研究所神経内科学）

S5-PL. ポリグルタミン病における神経細胞死のメカニズム

垣塚 彰

大阪バイオサイエンス研究所第4研究部

S5-1. DRPLA における神経細胞死

下畑 享良¹、山田 光則²、五十嵐 修一¹、小野寺 理¹、小出 怜爾¹、佐藤 晶¹
佐藤 俊哉¹、野崎 兼吉¹、高橋 均²、辻 省次¹

¹ 新潟大学脳研究所神経内科学、² 同病理学

S5-2. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の責任遺伝子の機能と、培養細胞モデル実験系での細胞死の機構

山田 正夫

国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部

S5-3. ハンチントン舞踏病の動物モデル

石黒 啓司

藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療研究部門

S5-4. SCA 6 発症に及ぼすポリグルタミンの作用

松山 善次郎¹、若森 実¹、森 泰生¹、井本 敬二¹、川上 秀史²、中村 重信²

¹ 岡崎国立共同研究機構生理学研究所液性情報部門、² 広島大学医学部内科学第3

S5-5. チャンネルにおけるポリグルタミンの分子生物学

田邊 勉

東京医科歯科大学大学院認知行動医学系高次機能薬理学

9 月 17 日（金）9：00-12：00

S6 免疫性神経疾患の発症のメカニズムをめぐって

（B会場：ダリア1）

司会：吉良潤一（九州大学医学部附属脳神経病研究施設
内科部門）

楠 進（東京大学医学部神経内科）

S6-PL. HAM 研究の最近の進展

納 光弘

鹿児島大学医学部内科学第3

S6-1. 多発性硬化症の免疫病態の解析

山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

シンポジウム

S6-2. HAM/TSP：ウイルス感染細胞と中枢神経内免疫担当細胞の相互作用の観点から

松井 真

国立療養所宇多野病院神経内科

S6-3. 視神経脊髄型多発性硬化症の臨床的・免疫学的特徴と戦後 50 年間における病像の変化

吉良 潤一

九州大学医学部附属脳神経病研究施設内科部門

S6-4. 自己免疫性ニューロパチーと抗糖脂質抗体

楠 進

東京大学医学部神経内科

S6-5. 多発性硬化症における血管内皮細胞の活性化/ 傷害

郡山 達男、池田 順子、越智 一秀、中村 重信

広島大学医学部内科学第 3

9 月 17 日（金）13：00-16：00

S7 パーキンソン病の分子生物学

（A 会場：ヒマワリ）

司会：太田 茂（広島大学医学部総合薬学科社会薬学）

水野 美邦（順天堂大学医学部脳神経内科）

S7-PL. パーキン遺伝子の構造と機能

清水 信義

慶応義塾大学医学部分子生物学

S7-1. 家族性パーキンソン病

松峯 宏人

順天堂大学医学部脳神経内科

S7-2. パーキンソン病発症環境因子

古武 弥一郎、太田 茂

広島大学医学部総合薬学科社会薬学

S7-3. N-methyl(R)salsolinol によるドーパミン神経細胞死

丸山 和佳子¹、直井 信²

¹長寿医療研究センター老化機構研究部生化学代謝研究室

²応用生化学研究所脳科学研究部門

S7-4. 酸化ストレスとドーパミンニューロン

澤田 秀幸¹、衣斐 督和²、赤池 昭紀²、下濱 俊¹

¹京都大学大学院医学研究科脳病態生理（臨床神経学）

²京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析

S7-5. ドパミントランスポーターとパーキンソン病

シンポジウム

川上 秀史、森野 豊之、中村 重信
広島大学医学部内科学第3

9月17日(金) 13:00-16:00

S8 てんかん及びその類縁疾患の分子遺伝学

(B会場：ダリア1)

司会：笹 征史(広島大学医学部薬理学)

兼子 直(弘前大学医学部神経精神医学)

S8-PL. てんかんモデル動物

笹 征史¹、秋光 知英²、栗栖 薫²、北田 一博³、芹川 忠夫³

¹広島大学医学部薬理学、²同脳神経外科学、³京都大学医学部附属動物実験施設

S8-1. CACNA1A 遺伝子変異に基づく神経疾患の分子遺伝学

辻 省次、五十嵐 修一、高橋 哲哉、志知 隆雄、小野寺 理

新潟大学脳研究所神経内科学

S8-2. 良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん (benign adult familial myoclonic epilepsy: BAFME) 病因遺伝子の連鎖解析

佐野 輝¹、三神 正昭¹、安田 雄²、寺尾 章²、中村 雅之¹、上野 修一¹

田辺 敬貴¹、兼子 直³、田中 敏博¹、後藤 雄一⁵、大沼 悌一⁶

¹愛媛大学医学部神経精神医学、²川崎医科大学神経内科、³弘前大学医学部神経精神医学、⁴東京大学医科学研究所、⁵国立精神・神経センター、⁶国立療養所厚潟病院

S8-3. 日本人 Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) と Benign familiar neonatal convulsion 2 (BFNC2) での新しい遺伝子変異

廣瀬 伸一¹、岩田 洋美¹、穂吉 秀隆¹、善利 史子¹、福岡 五龍¹

米谷 美奈子¹、小林 健一郎²、伊藤 正利²、松島 信昭³、杉山 博之³

村中 英樹¹、和田 一丸⁵、兼子 直⁵、満留 昭久¹

¹福岡大学医学部小児科学、²滋賀県立小児保健医療センター小児科、³九州大学理学部生体物理、⁴弘前大学医学部小児科、⁵同神経精神科

S8-4. Lafora 病と小児欠神てんかん

山川 和弘

理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経遺伝

S8-5. 抗てんかん薬とイオンチャンネル

岡田 元宏、兼子 直

弘前大学医学部神経精神医学

ワークショップ

ワークショップ

9月16日（木）9：00-12：00

WS1 シナプスの可塑性のダイナミクス （D会場：コスモス1）

司会：高橋 正身（三菱化学生命科学研究所）

中村 重信（広島大学医学部内科学第3）

WS1-1. リン酸化による神経伝達物質放出制御

高橋 正身

三菱化学生命科学研究所

WS1-2. シナプス小胞リサイクリングと放出制御

黒見 坦、城所 良明

群馬大学医学部行動医学研究施設行動生理部門

WS1-3. NMDA 受容体チロシンリン酸化と神経シナプスの可塑性

手塚 徹、中澤 敬信、久恒 智博、梅森 久視、山本 雅

東京大学医科学研究所制癌研究部

WS1-4. 海馬長期増強の維持相における活性型 CaM キナーゼIIの局在

福永 浩司、宮本 英七

熊本大学医学部薬理学第1

WS1-5. 視床-皮質投射路に存在するサイレントシナプスの発達におけるBDNFの必要性

中村 俊¹、伊丹 千晶¹、河野 朋子¹、水野 恭伸²

¹国立精神・神経センター神経研究所、²長崎大学薬学部

WS1-6. 神経細胞特異的NO合成酵素（nNOS）による細胞増殖・分化因子としての

一酸化窒素NOの生成

阿部 一樹^{1,2}、井上 順雄¹、中山 孝¹、佐藤 光¹、平原 史樹²、加藤 尚彦¹

¹横浜市立大学医学部生化学第1、²同産婦人科

WS1-7. 老化促進モデルマウス（SAM）脳の神経化学的異常と記憶・情動障害

大熊 康修、村山 俊彦、上原 孝、野村 靖幸

北海道大学大学院薬学研究科薬理学分野

9月16日（木）9：00-12：00

WS2 神経変性とアポトーシス （E会場：コスモス2）

司会：遠山 正彌（大阪大学医学部機能形態学）

阿部 康二（岡山大学医学部神経内科）

WS2-1. Caspase と細胞死

ワークショップ

菅野 雅元

広島大学医学部免疫学寄生虫学

WS2-2. 分裂終了ニューロンの APP695 強制発現によるカスパーゼ活性化と アポトーシス誘導

植月 太一¹、西村 伊三男¹、竹本 研¹、桃井 隆²、三浦 正幸³、吉川 和明¹

¹ 大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能制御部門

² 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5部、³ 大阪大学医学部神経機能解剖

WS2-3. ショウジョウバエをモデルとしたアポトーシス実行機構の解明

嘉糠 洋陸、三浦 正幸、岡野 栄之

大阪大学大学院医学系研究科神経機能解剖

WS2-4. 神経細胞死誘導に關する細胞周期調節蛋白質 CDK4 と cyclin D1

稲生 英俊

千葉大学医学部解剖学第3

WS2-5. High-density Oligonucleotide DNA Array (Gene Chip™, Affymetrix) を用い たマウス前脳虚血モデルにおける遺伝子発現変化の検討

永田 俊人、浅井 聰、高橋 泰夫、趙 恒、石川 紘一

日本大学医学部薬理学

WS2-6. フェニトイン (PHT) のマウス小脳顆粒細胞及びプルキンエ細胞への 発達神経毒性

大森 啓充¹、山下 敬介¹、安田 峯生¹、小倉 博雄²、道川 貴章³

御子柴 克彦³、中村 重信¹

¹ 広島大学医学部解剖学第1、² エーザイ筑波研究所

³ 東京大学医科学研究所、⁴ 広島大学医学部内科学第3

WS2-7. ポリグルタミン凝集の時間経過と細胞死

豊島 至¹、菅原 正伯¹、加藤 一磨¹、和田 千鶴¹、下畑 享良²、小出 玲爾²

小野寺 理²、辻 省次²

¹ 秋田大医学部内科学第1、² 新潟大学脳研究所神経内科

WS2-8. パーキンソン病とアポトーシス

永津 俊治¹、茂木 真希雄²、一瀬 宏¹、戸苅 彰史²

¹ 藤田保健衛生大学総合医科学研究所分子遺伝学

² 愛知学院大学歯学部薬理学

WS2-9. 運動ニューロン死とアポトーシス

割田 仁^{1,2}、阿部 康二¹

¹ 岡山大学医学部神経内科

² 東北大学医学部神経内科

9月16日(木) 9:00-12:00

WS3 Peroxisome 病の発症機序 (F会場: ラン1)

司会: 宮武 正 (昭和薬科大学薬学部薬物治療学)

ワークショップ

山田 猛（九州大学医学部附属脳神経病研究施設内科部門）

WS3-1. Peroxisomal Membrane Protein 20 (PMP20) の機能

山下 拓史¹、中村 重信¹、Suresh Subramani²、Hava Avraham³

¹ 広島大学医学部内科学第3、² University of California San Diego

³ Harvard Medical School

WS3-2. ペルオキシソームはPC12D細胞の神経突起中に多数存在する

石川 哲也¹、川井 千景¹、佐野 護²、湊川 洋介¹

¹ 川崎医科大学医学部生化学1、² 京都府立医科大学生物

WS3-3. クロロキン・ミオパチーにおけるタウの蓄積

小山 文隆¹、井原 康夫^{1,2}

¹ 東京大学大学院医学系研究科神経病理学、² 科学技術振興事業団（CREST）

WS3-4. Adrenoleukodystrophy の分子病態

山田 猛、新納 信江、吉良 潤一

九州大学医学部附属脳神経病研究施設内科部門

WS3-5. Adrenoleukodystrophy の遺伝子解析

小池 亮子、高野 弘樹、辻 省次

新潟大学脳研究所神経内科

WS3-5 追加発言. Adrenoleukodystrophy の画像診断

越智 一秀、川上 秀史、天下 智彦、井門 ゆかり、野田 公一、中村 重信

広島大学医学部内科学第3

WS3-6. ペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子

藤木 幸夫

九州大学大学院理学研究科生物科学専攻、科学技術振興事業団（CREST）

WS3-7. 新しいペルオキシソーム病; D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase deficiency

鈴木 康之

岐阜大学医学部小児科

9月16日（木）14:00-17:00

WS4 細胞骨格・接着因子の役割とその異常（C会場：ダリア2）

司会：小宮 義璋（群馬大学医学部分子病態学）

山脇 成人（広島大学医学部神経精神医学）

WS4-1. 神経系におけるギャップ結合の局在と機能

小山田 正人、長岡 孝則、小山田 ゆみ子、高松 哲郎

京都府立医科大学病理学第2

WS4-2. 細胞接着因子ゲセリンのラットにおける発現と機能解析

平 英一¹、奥村 茂樹¹、塚本 康浩²、村岡 修¹、佐々木 文彦²、三木 直正¹

¹ 大阪大学大学院医学系研究科情報薬理、² 大阪府立大学大学院獣医解剖

WS4-3. ミクログリアの膜ラフリング形成と貪食能におけるIba1の役割

ワークショップ

今井 嘉紀、大澤 圭子、金澤 裕子、佐々木 洋、高坂 新一
 国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

WS4-4. アルツハイマー病とタウオパチー

武田 雅俊、田中 稔久、工藤 喬、中村 祐
 大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学精神医学

WS4-5. タウ結合タンパク質の検索

村山 洋、村山 美由紀、高島 明彦
 理化学研究所脳科学総合研究センターアルツハイマー病研究チーム

WS4-6. 家族性前頭側頭型痴呆 (Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17:FTDP-17) にみられる変異 tau を発現する CHO 細胞の解析

松村 展敬¹、山崎 恒夫¹、井原 康夫^{1,2}

¹ 東京大学大学院医学系研究科神経病理学、² 科学技術振興事業団 (CREST)

WS4-7. アルコール・薬物依存と細胞内分子機構

西田 朗¹、久岡 一恵¹、前正 秀宣^{1,2}、岡本 泰昌^{1,2}、山脇 成人²

¹ 国立呉病院臨床研究部精神神経科学研究室、² 広島大学医学部神経精神医学

WS4-8. 細胞膜内における Gs α の可動性に対する慢性抗うつ剤投与の影響

土岐 完^{1,2}、小沢 寛樹¹、山口 高史¹、鶴飼 渉¹、Robert J. Donati³

Mark M. Rasenick³、齋藤 利和¹

¹ 札幌医科大学医学部神経精神医学、² 五稜会病院

³ イリノイ州立大学医学部生理学

9月16日(木) 14:00-17:00

WS5 アミロイドーシスの分子病理；

アミロイド線維形成機序と治療戦略 (D会場：コスモス1)

司会：前田 秀一郎 (山梨医科大学学生化学第1)

柳澤 勝彦 (長寿医療研究センター痴呆疾患研究部)

WS5-PL. アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析

内木 宏延
 福井医科大学病理学第2

WS5-1. 遺伝子改変マウスを用いたヒト遺伝性アミロイドーシス発症機構の解明

前田 秀一郎
 山梨医科大学医学部生化学第1

WS5-2. 分泌型アミロイド前駆体蛋白の機能とその結合蛋白

大澤 郁朗¹、高村 千鶴子¹、森本 高子²、高坂 新一¹

¹ 国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部、² 東京大学大学院理学研究科

WS5-3. 老化促進モデルマウス (SAM) を用いたマウス老化アミロイドーシス発症機構の解析

樋口 京一

ワークショップ

信州大学医学部加齢適応研究センター脈管病態分野

WS5-4. ヒト脳におけるアミロイド β 蛋白質の蓄積の生化学的解析

森島 真帆、井原 康夫

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経病理学

科学技術振興事業団 (CREST)

WS5-5. アルツハイマー病発症におけるラセミ化 β アミロイド (D-Ser26 β 1-40) の役割

金子 勲、久保 武一、森本 潔、熊谷 善弘

三共株式会社神経科学研究所

WS5-6. アルツハイマー病アミロイド形成と神経細胞障害における NAC と A β 蛋白の相互作用

田中 静吾、竹橋 正則、間藤 尚美、上田 國寛

京都大学化学研究所生体反応設計 III

9 月 17 日 (金) 9 : 00-12 : 00

WS6 神経の再生の新しいアプローチ (C 会場：ダリア 2)

司会：植村 慶一 (慶応大学医学部生理学)

板倉 徹 (和歌山医科大学脳神経外科)

WS6-1. 神経「温存」再生のための遺伝子探索とその機能解析

木山 博資、瀬尾 寿美子、涛川 一彦

旭川医科大学解剖学第 1

WS6-2. グリオシスに特異的な新規 CREB/ATF ファミリー転写調節因子 OASIS の同定

和中 明生¹、二階堂 琢也²、森 徹自¹、横屋 幸彦¹、本間 豊¹、金沢 賢也¹、

竹内 真由美¹、菊地 臣一²

¹ 福島県立医科大学生体情報伝達研究所細胞科学研究部門、² 整形外科

WS6-3. 哺乳動物の中樞神経伝導路の再生

井上 辰志¹、栗栖 薫¹、川口 三郎²

¹ 広島大学医学部脳神経外科、² 京都大学医学部認知行動脳科学

WS6-4. 神経再生とミクログリアの活性化-ATP によるラッフル形成の促進-

本田 静世¹、大澤 圭子¹、Fernand Lopez-Redondo¹、井上 和秀²、高坂 新一¹

¹ 国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部、² 国立医薬品食品衛生研究所薬理

WS6-5. ミクログリア細胞移植による神経再生へのアプローチ

澤田 誠

科学技術振興事業団さきかけ研究、藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療
共同研究部門

WS6-6. セルソーターを用いた神経幹細胞と神経前駆細胞の選別と脊髄損傷への 応用の試み

小川 祐人^{1,2,3}、宮田 卓樹^{1,2}、沢本 和延^{1,2}、川口 綾乃^{1,3}、戸山 芳昭¹

岡野 栄之^{1,3}

¹ 大阪大学大学院医学系研究科神経機能解剖学、² 科学技術振興事業団 (CREST)

ワークショップ

³ 大阪大学医学部眼科学、⁴ 慶應義塾大学医学部整形外科学

WS6-7. 新たな神経再生調節因子としての酸化型 Garectin-1

堀江 秀典¹、稲垣 好昌²、相馬 良明²、野沢 りさ²、大川 克也³

長谷川 光広⁴、村松 直樹⁴、川野 仁⁵、堀江 正男⁵、小山 洋道⁶

酒井 偉久子¹、竹下 歌織¹、小和田 祐紀¹、高野 雅彦⁷、門屋 利彦²

¹ 横浜市立大学医学部生理学第1、⁷ 横浜市立大学医学部眼科

² キリンビール医薬探索研、³ キリンビール基盤技術研究所

⁴ 金沢大学医学部脳神経外科、⁵ 都神経研解剖発生、⁶ 横浜市立大学看護短期大学

WS6-8. 成熟ラット海馬における神経細胞新生は虚血ストレスにより亢進する

八木田 桂樹¹、松本 昌泰^{1,2}、北川 一夫¹、高沢 健一郎¹、大槻 俊輔¹

桑原 敬介¹、馬淵 卓真¹、田中 茂¹、柳原 武彦²、堀 正二¹

¹ 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学、² 神経機能医学

WS6-9. GDNF 遺伝子導入細胞移植による黒質ドーパミン細胞の保護と再生促進

中尾 直之、板倉 徹

和歌山県立医科大学脳神経外科

9月17日(金) 9:00-12:00

WS7 神経栄養因子受容体機能制御 (D会場: コスモス1)

司会: 畠中 寛 (大阪大学蛋白質研究所)

栗山 勝 (福井医科大学第2内科)

WS7-1. 神経栄養因子とシャペロン蛋白

小池 達郎、田中 秀逸、三浦 真紀

北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻

WS7-2. 免疫細胞によるニューロトロフィンの産生・応答とその生理的意義

古川 昭栄、浅見 利雄、新田 淳美

岐阜薬科大学分子生物学

WS7-3. 神経栄養因子受容体とガングリオシド

武藤 多津郎

福井医科大学第2内科

WS7-4. bFGF, NGF および EGF におけるシグナル伝達経路の検討

山口 知子¹、川俣 貴一²、新家 一男³

¹ 東京女子医科大学医学部生化学、² 東京女子医科大学医学部脳神経外科

³ 東京大学分子細胞生物学研究所

WS7-5. 成長因子で活性化される Fyn による AMPA 型グルタミン酸受容体の発現制御

斎藤 真子^{1,2}、Alcino J. Silva²、山口 剛¹、林 崇³、山本 雅³、那波 宏之^{1,2}

¹ 新潟大学脳研究所分子神経生物学、² Cold Spring Harbor Laboratory

³ 東京大学医科学研究所制癌研究部

WS7-6. 神経細胞アポトーシス制御機構における NF- κ B と p75 の関連

ワークショップ

浜之上 誠^{1,2,4}、大橋 十也^{2,3}、仲嶋 一範¹、Alun Davies⁴、衛藤 義勝^{2,3}

¹ 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子神経学研究部門、² 同遺伝子治療、³ 同小児科

⁴ St. Andrews 大学

WS7-7. 肝細胞増殖因子受容体 c-MET を介した細胞種特異的シグナル伝達機構

町出 充、神鳥 和代、高坂 新一

国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

WS7-8. 筋萎縮性側索硬化症と神経栄養因子

祖父江 元

名古屋大学医学部神経内科

9 月 17 日 (金) 13 : 00-16 : 00

WS8 脳血液関門とトランスポーター (C 会場：ダリア 2)

司会：金井 好克 (杏林大学医学部薬理学)

下濱 俊 (京都大学大学院医学研究科脳病態生理 (臨床神経学))

WS8-1. 血液脳関門におけるトランスポーター介在薬物輸送

辻 彰、玉井 郁巳

金沢大学薬学部薬効動態学

WS8-2. 中枢神経における中性アミノ酸トランスポーターの同定

金井 好克

杏林大学医学部薬理学、科学技術振興事業団さきがけ研究

WS8-3. マウス継代脳血管内皮細胞 (MBEC4) を用いた L-DOPA の脳血液関門輸送機構の解析

景山 卓、下濱 俊

京都大学大学院医学研究科脳病態生理 (臨床神経学)

WS8-4. アストロサイト産生因子による血液脳関門形質発現の誘導

山本 直樹¹、祖父江 和哉²、米田 和広³、三浦 裕¹、浅井 清文¹、加藤 泰治¹

¹ 名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門

² 名古屋市立大学医学部麻酔蘇生学、³ 名古屋市立大学薬学部製剤学

WS8-5. 炎症性サイトカインによる血管脳関門の細胞接着分子の発現調節

山脇 正永、神田 隆、水澤 英洋

東京医科歯科大学神経内科

WS8-6. ラット脳虚血時の脳血液関門とグルタミン酸再吸収機構の脳温による影響

浅井 聡、趙 恒、永田 俊人、高橋 泰夫、石川 紘一

日本大学医学部薬理学

WS8-7. 心停止後の血液脳関門および血液脊髄関門の機能的変化- 心停止、蘇生マウスを用いた hemodynamic study -

水島 秀勝^{1,3}、W.A.Banks³、土肥 謙二¹、中村 精紀¹、松本 清¹、塩田 清二²

¹ 昭和大学医学部脳神経外科、² 昭和大学医学部解剖学第 1

ワークショップ³VAMC, St. Louis University**9月17日(金) 13:00-16:00****WS9 痛みの神経化学的機序 (D会場: コスモス1)**

司会: 佐藤 公道 (京都大学薬学研究科生体機能解析学分野)

仲田 義啓 (広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学)

WS9-1. 痛覚閾値に対するドパミン受容体の作用- 特に部位差の検討-

野元 正弘、清水 隆雄、福田 健夫、益山 隆志

鹿児島大学医学部薬理学

WS9-2. 痛みとサブスタンスP

井上 敦子、森岡 徳光、熊谷 圭、武田 和美、秀 和泉、仲田 義啓

広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学

WS9-3. ニューロトロフィンによる痛覚および触覚の調節荒川 義弘¹、渡邊 真知子¹、遠藤 之洋¹、木元 克輔¹、仙波 りつ子²¹ 東京大学医学部附属病院分院薬剤部、² 愛知県コロニー研究所**WS9-4. 痛みとオピオイド受容体**

南 雅文、佐藤 公道

京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

WS9-5. 痛覚伝達系におけるP2X受容体の役割井上 和秀¹、津田 誠¹、上野 伸哉²¹ 国立衛生研究所薬理学、² 福岡大学医学部薬理学研究所**WS9-6. 片頭痛関連遺伝子**

竹島 多賀夫、足立 芳樹、楠見 公義、古和 久典、中島 健二

鳥取大学医学部脳神経内科

WS9-7. ノシセプチンと痛み

植田 弘師

長崎大学薬学部分子薬理学

WS9-8. 脊髄における痛みの発現機序南 敏明¹、伊藤 誠二²¹ 大阪医科大学麻酔科学、² 関西医科大学医化学

一般演題（口演）

口演1（E会場）

9月16日(木) 14:00-16:48

神経伝達物質、情報伝達

14:00-14:56・・・・・・・・・・座長：西尾 廣昭（福山大学薬学部応用薬理）

V1-01 セロトニンによるラット前頭葉アセチルコリン分泌の制御機構（Ⅶ）：ACh分泌における5-HT_{2A}受容体と5-HT_{1A}受容体との相互関係平野 均¹、松田 芳人²、渡辺 義文²、平田 牧三¹¹山口大学保健管理センター、²山口大学医学部神経精神医学教室

V1-02 ラット前頭葉におけるキノリン酸注入後の内在性D-セリンの変化

岩間 久行、山本 直樹、高橋 勝宣、海野 麻未、西川 徹

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部

V1-03 ラット松果体に発現しているAMPA型グルタミン酸受容体の機能

八代 聖基¹、山田 浩司¹、林 美都子¹、山本 章嗣²、坪井 誠二¹、森山 芳則¹¹岡山大・薬・生理化学、²関西医科大・第一生理

V1-04 副腎におけるNMDAレセプターの発現

檜井 栄一¹、名田 聡美¹、萩田 喜代一¹、米田 幸雄²¹摂南大・薬・薬理、²金沢大・薬・薬物

14:56-15:52・・・・・・・・・・座長：山内 卓（徳島大学薬学部生化学）

V1-05 ヒスタミンH₁受容体の細胞内internalization福井 裕行¹、中川 美和子¹、藤本 勝巳²、堀尾 修平¹、久山 哲廣¹¹徳島大学薬学部薬理学、²広島大学歯学部生化学

V1-06 DAMP法を用いた松果体細胞のシナプス小胞様オルガネラ（マイクロベイクル）内部pHの測定

林 美都子¹、山本 章嗣²、森山 芳則¹¹岡山大・薬・生理化学、²関西医科大・第一生理

一般演題 (口演)

V1-07 神経系細胞における Ca^{2+} 遊離の基本要員 (elementary Ca^{2+} release events) の解析

小泉 修一、井上 和秀

国立衛研・薬理

V1-08 FK506 binding protein (FKBP) による細胞内 Ca^{2+} 動態の調節機構について

森田 克也、北山 滋雄、土肥 敏博

広島大学歯学部歯科薬理学講座

15 : 52-16 : 48 座長 : 小泉 修一 (国立衛研・薬理)

V1-09 神経突起伸展におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の Ca^{2+} 非依存性活性の役割

祖川 由美、吉村 好之、山内 卓

徳島大学薬学部生化学

V1-10 小脳顆粒細胞とアストロサイトに存在するカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II デルタの同定と細胞内局在

山本 秀幸、竹内 有輔、福永 浩司、宮本 英七

熊本大学医学部薬理学第一

V1-11 培養海馬神経細胞におけるCaM kinase IV のリン酸化反応と活性化反応

笠原 二郎、福永 浩司、宮本 英七

熊本大学医学部薬理学第一講座

V1-12 一本鎖DNA結合蛋白質Pur α のCRE転写活性への影響について

定方 哲史、郭 哲輝、三木 直正

大阪大学大学院医学研究科情報薬理学講座 A6

口演2 (F会場)

9月16日(木) 14:00-16:34

モデル動物、神経細胞死

14 : 00-14 : 56 座長 : 高松 研 (東邦大学医学部第2生理)

一般演題（口演）

V2-01 ヒポカルシン遺伝子欠損マウスの電気生理学および行動科学的解析

増尾 好則¹、正木 全¹、宮本 政臣²、高松 研¹

¹東邦大学医学部第2生理、

²武田薬品工業（株）創薬研究本部

V2-02 長期暗室飼育ラットの視覚野における光刺激に伴うNF-LのCaMKIIによるリン酸化

橋本 亮太¹、中村 祐¹、中舘 和彦²、今村 一之²、武田 雅俊¹

¹大阪大学医学部精神医学教室、

²大阪バイオ研・神経科学

V2-03 N2a neuroblastoma cell神経突起形成におけるRho-kinaseの関与

中村 祐、橋本 亮太、福所 英里子、柏木 雄次郎、貝淵 弘三、武田 雅俊

大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座、精神医学

V2-04 神経芽腫細胞を用いたレチノイン酸誘導性神経細胞死の分子機構の解析

高田 尚幸、河本 竹正、Ashraful Islam、久野 友子、中川原 章

千葉県がんセンター生化学研究部

14：56-15：52・・・・・・座長：加藤 兼房（愛知県コロニー・研・生化）

V2-05 脱分極による神経細胞死の抑制におけるPI-3kinase及びCaMKIIの関与

池上 浩司、小池 達郎

北海道大・院理・生物科学

V2-06 ガラクトセレブロシド合成酵素欠損マウスの中枢及び末梢神経組織のミエリン脂質異常

武富 保、上村 敬一

信州大医・加齢適応研

V2-07 伝達性海綿状脳症の病態発現とサイトカイン-iNOS系との関連性

玉井 洋一¹、笹原 武志²、小嶋 久子¹、中村 和生¹、瀧 龍雄³、田口 文章³、大谷 義夫⁴、

三浦 貞則⁴、百溪 英一⁵、関川 賢二⁵

¹北里大・医・生化、²同・微生物、³同・医療衛生・臨床微生物、⁴同・医療衛生/医・精神科、

⁵農水省・家衛試・分子病理

V2-08 雌雄老化促進モデルマウス(SAMP8)の加齢に伴う脳内核DNA損傷の変化とそれに対する当帰芍薬散の効果について

小松 真紀子、平松 緑

山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所

15：52-16：34・・・・・・座長：直井 信（応用生化学研究所 脳科学研究部門）

一般演題 (口演)

- V2-09 内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinolによるアポトーシスとpropargylamine類による細胞死防御に関する研究
直井 信¹、丸山 和佳子²、高橋 勤³
¹応用生化学研究所 脳科学研究部門、²長寿医療研究センター老化機構研究部 生化学代謝研究室、³愛知江南短期大学
- V2-10 ヒト羊膜細胞移植による神経保護作用—パーキンソン病モデルラットでの検討—
垣下 浩二¹、中尾 直之¹、桜川 宣男²、板倉 徹¹
¹和歌山県立医科大学 脳神経外科、
²国立精神神経センター 神経研究所 疾病研究第5部
- V2-11 アレキサンダー病およびアルツハイマー病患者の中枢神経系に蓄積する α Bクリスタリンのリン酸化について
加藤 兼房¹、稲熊 裕¹、伊東 秀記¹、飯田 佳代¹、岩本 郁子¹、太田 秀臣²、越知 信彦³
¹愛知県コロニー・研・生化、²神奈川県立厚木病院・小児科、
³愛知県心障児療育センター・第二青い鳥学園・小児科

口演3 (E会場)

9月17日(金) 9:00-11:06

痴 呆

9:00-9:56・・・座長：内田 洋子（東京都老人総合研究所神経病理）

- V3-01 Amyloid β はミクログリアのPKC- δ キナーゼ活性を亢進させ、MARCKSの細胞内トランスロケーションをおこす
中井 真通¹、谷向 知¹、八木 敬子²、斎藤 尚亮²、山本 秀幸³、宮本 英七³、長谷川 浩史¹、谷口 泰造¹、寺島 明¹、川又 敏男¹、三好 功峰¹、田中 千賀子¹
¹兵庫県立高齢者脳機能研究センター、²神戸大バイオシグナル研究所、³熊本大医・第一薬理
- V3-02 異性化アミロイド β の凝集特性
清水 孝彦¹、福田 宏之²、中島 光業¹、森 啓³、白澤 卓二¹
¹都老人研・分子遺伝学、
²PEバイオシステムズ、
³大阪市立大・医
- V3-03 Neuro2A細胞においてamyloid β はPKC- α を介してMARCKSをリン酸化する
谷向 知¹、中井 真通¹、長谷川 浩史¹、谷口 泰造¹、寺島 明¹、川又 敏男¹、山本 秀幸²、福永 浩司²、宮本 英七²、三好 功峰¹、田中 千賀子¹
¹兵庫県立高齢者脳機能研究センター、
²熊本大医・第一薬理

一般演題（口演）

- V3-04 Amyloid β はMAPキナーゼカスケードを介してMARCKSをリン酸化する
 長谷川 浩史¹、中井 真通¹、谷向 知¹、谷口 泰造¹、寺島 明¹、川又 敏男¹、福永 浩司²、
 宮本 英七²、向井 秀幸³、小野 功貴¹、三好 功峰¹、田中 千賀子¹
¹兵庫県立高齢者脳機能研究センター、²熊本大医・第一薬理、³神戸大・自然科学、⁴神戸大理・生物
- 9 : 56-11 : 06 座長 : 柳澤 勝彦 (国立長寿医療研)
- V3-05 変異型presenilin2トランスジェニックマウス脳内低密度膜ドメインにおけるA β 42の蓄積
 澤村 直哉¹、小山 文隆¹、森島 真帆¹、井原 康夫^{1,2}
¹東京大学医学系研究科神経病理、²CREST
- V3-06 Presenilin-2過剰発現の初代培養神経細胞に対する影響
 荒木 亘¹、湯浅 勝敏²、武田 伸一²、城谷 圭朗¹、高橋 慶吉¹、田平 武¹
¹国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部、
²同遺伝子工学研究部
- V3-07 β アミロイド蛋白によるMAP1Bの発現誘導とそのリン酸化
 内田 洋子
 東京都老人総合研究所神経病理
- V3-08 ヒスタミンH1受容体とアルツハイマー病 : PETによる研究
 谷内 一彦¹、樋口 真人²、岡村 信行²、佐々木 英忠²、伊藤 正敏³、渡邊 建彦¹
¹東北大学医学系・薬理、
²東北大学医学系老年内科、
³東北大・サイクロ
- V3-09 痴呆性疾患と髄液中微量元素との関連性について
 正田 孝明¹、藤沢 嘉勝²、佐々木 健²、黒田 洋一郎³
¹愛媛大学病院検査部、
²きのこエスポール病院、
³東京都立神経科学総合研究所

口演4 (F会場)

9月17日(金) 9:00-11:06

精神疾患、虚血

9 : 00-9 : 56 座長 : 佐野 輝 (愛媛大学医学部神経精神医学)

一般演題 (口演)

- V4-01 抑うつ状態を呈したがん患者の神経内分泌機能と画像診断学的所見：感情障害の病態生理との比較
井田 逸朗¹、相原 雅子¹、間島 竹彦¹、織内 昇²、富吉 勝美²、井上 登美夫²、遠藤 啓吾²、三國 雅彦¹
¹群馬大学医学部神経精神医学教室、
²同核医学教室
- V4-02 TRH(thyrotropin-releasing hormone)受容体遺伝子の5'-flanking領域における新規多型の発見とその疾患関連
三神 正昭、中村 雅之、上野 修一、佐野 輝、田辺 敬貴
愛媛大学医学部神経精神医学
- V4-03 電位依存性Na⁺/Ca²⁺チャンネル阻害薬(NS-7)は局所脳虚血後の再灌流時、cAMP依存性プロテインキナーゼ障害を抑制する
田中 耕太郎、福内 靖男、野川 茂、永田 栄一郎、鈴木 重明、傳法 倫久、小堺 有史
慶應義塾大学医学部神経内科
- V4-04 低グルコースによるアセチルコリン合成低下に対するアセチル-L-カルニチンの効果
田中 康一¹、福井 文子¹、川端 輝江²、脇 初枝¹、岩本 真知子¹、近 一夫¹、安藤 進¹
¹東京都老人総合研究所・生体膜部門、²女子栄養大学・基礎栄養学
- 9 : 56-11 : 06 座長 : 田中 耕太郎 (慶應義塾大学医学部神経内科)
- V4-05 NF kappa Bの活性化は低酸素再酸素化後の神経細胞死を抑制する
玉谷 実智夫^{1,3}、松崎 秀夫^{1,3}、山口 淳^{1,3}、岡戸 晴夫²、三宅 進一^{1,3}、遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学、
²東京都神経科学研究所病態神経生理、
³CREST, Japan Science and Technology
- V4-06 アストログリア由来の新規ストレス蛋白 ORP150 (150kDa Oxygen Regulated Protein)の分子シャペロンとしての機能の解析
板東 良雄^{1,3}、玉谷 実智夫^{1,3}、小川 智^{2,3}、遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座 (第2解剖)、
²金沢大学医学部第3解剖、
³CREST JST (Japan Science and Technology)
- V4-07 低酸素ストレスで誘導される遺伝子の検索
山口 淳^{1,3}、堀 修^{1,3}、小川 智²、玉谷 実智夫^{1,3}、遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大・医・第2解剖、
²金沢大・医・第3解剖、
³CREST JST
- V4-08 Aktの活性化は、一酸化窒素によるBcl-2の低下およびBaxの上昇を抑制する
松崎 秀夫^{1,3}、玉谷 実智夫^{1,3}、満田 憲昭^{1,3}、湊川 一彦²、木山 博資²、三宅 進一^{1,3}、遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大・院・医・機能形態学、
²旭川医大・医・第一解剖、
³CREST JST

一般演題（口演）

- V4-09 ラット脊髄由来培養神経細胞からのhigh-K⁺ 及びNaCNによるアデノシンの放出
 田口 康智¹、尾形 直則¹、竹葉 淳¹、Miao Chuai¹、奥村 秀雄¹、中村 洋一²
¹愛媛大学医学部整形外科科学教室、²生理学教室

口演5（E会場）

9月17日(金) 13:50-15:56

栄養因子

13 : 50-14 : 46 座長 : 那波 宏之（新潟大脳研）

- V5-01 BDNF遺伝子プロモーターI及びIIIのカルシウム応答性の違い
 田淵 明子、中岡 龍貴、天野 賢示、壹岐 大祐、津田 正明
 富山医科薬科大学・薬学部・分子神経生物
- V5-02 genipinによるPC12h細胞のNOSを介したMAPキナーゼのリン酸化
 山崎 眞津美、千葉 賢三、毛利 哲郎
 北陸大学薬学部生物活性
- V5-03 TNFの神経保護機作
 水野 龍義¹、玉谷 実智夫^{1,2}、松崎 秀夫^{1,2}、蔡 榮浩^{1,2}、山口 淳^{1,2}、三宅 進一^{1,2}、遠山 正彌^{1,2}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学、
²CREST, Japan Science and Technology
- V5-04 細胞外ATPによるラット脳ミクログリアのTNF- α 産生遊離
 田中 将也¹、鈴木 智久¹、井上 敦子¹、秀 和泉¹、井上 和秀²、高坂 新一³、仲田 義啓¹
¹広島大医・総合薬学科薬効解析科学、²国立医薬品食品衛生研究所薬理部、
³国立精神・神経センター神経研・代謝研究部
- 14 : 46-15 : 56 座長 : 津田 正明（富山医科薬科大・薬・分子神経生物）
- V5-05 カルシウムチャネルモジュレーターによるラット脳における脳由来神経栄養因子の動態
 仙波 りつ子^{1,3}、稲熊 裕¹、竹内 郁夫¹、加藤 兼房¹、岩井 美和子²、御子柴 克彦²
¹愛知県コロニー・研究所、
²東大・医科学研究所、
³CREST, 科学技術振興事業団

一般演題 (口演)

- V5-06 イムノフィリンリガンドの神経栄養因子産生誘導作用と神経保護効果
新田 淳美、西岡 博史、古川 昭栄
岐阜薬科大学・分子生物
- V5-07 BDNFとNGFによる一過性グルタミン酸放出作用における細胞内シグナル解析
沼川 忠広¹、松本 知也¹、小島 正己^{1,2}、武井 延之³、畠中 寛¹
¹大阪大蛋白研生合成、
²科技団さがけ21、
³新潟大脳研
- V5-08 NOで誘導されるニューロン死のBDNFによる促進効果は培養日数に依存する
石川 保幸、畠中 寛
大阪大学・蛋白質研究所
- V5-09 大脳皮質ニューロンのBDNFシグナルでのShp-2及びBIT/SHPS-1の機能解析
荒木 敏行、山田 雅司、畠中 寛
大阪大学・蛋白質研究所

口演6 (F会場)

9月17日(金) 13:50-15:56

細胞分化、細胞骨格、代謝

13:50-15:00・・・・・・座長：池中 一裕（国立生理学研究所神経情報部門）

- V6-01 培養アストロサイトの遅発性アポトーシス発現におけるプロテアーゼおよびNF- κ Bの役割
田熊 一敏¹、李 英培²、馬場 明道³、松田 敏夫⁴
¹神戸学院大・薬・分析、²薬理、
³大阪大院・薬・神経薬理、⁴複合薬物動態
- V6-02 Inhibition of gap junctional intercellular communication by endogenous and exogenous oxidative stress in retinal horizontal cells
Z. Y. Zhou、K. Sugawara、S. Kato
Department of Molecular Neurobiology Graduate School of Medicine, Kanazawa University

一般演題（口演）

V6-03 老齡ラットで見られたニューロフィラメント蛋白の構成比変化と軸索輸送

内田 敦子^{1,2}、田代 朋子³、小宮 義璋³、久永 真市¹

¹都立大院・理・生物、

²東工大・生命理工・バイオサイエンス、³群馬大学・医・分子病態

V6-04 スフィンゴミエリン分解によるラットアストロサイトのアポリポロテイン A-I 依存性コレステロール放出の増加

伊藤 仁一、長安 祐子、横山 信治

名古屋市立大学医学部生化学第一

V6-05 ドレブリン関連タンパク質SH3P7の樹状突起内局在

山崎 博幸、白尾 智明

群馬大学医学部行動分析学

15 : 00-15 : 56 座長 : 三浦 正幸 (大阪大学医学系研究科神経機能解剖)

V6-06 中枢神経系細胞によるアストロサイトのコレステロール代謝の制御

上野 幸子^{1,2}、伊藤 仁一²、長安 祐子²、横山 信治²

¹名古屋市立大学医学部精神医学教室、

²名古屋市立大学医学部第一生化学

V6-07 HLH型転写因子によるオリゴデンドロサイトの発生分化調節

鹿川 哲史¹、齋藤 哲一郎²、池中 一裕¹

¹国立生理学研究所神経情報部門、

²国立遺伝学研究所発生工学部門

V6-08 脳の胎児期に優勢な新規遺伝子Bdm2の発現解析

本郷 茂樹、高橋 隆、西中 直也、竹田 二美代、竹田 稔

昭和大学医学部生化学

V6-09 神経芽腫サブセットからのオリゴキャップfull-length cDNAライブラリーの作製およびシーケンシング

大平 美紀¹、高安 肇¹、影山 肇¹、諸橋 愛子¹、穴倉 朋胤¹、河本 竹正¹、高田 尚幸¹、

高橋 将人¹、鈴木 稔²、菅野 純夫²、中川原 章¹

¹千葉がんセンター・生化、

²東大医科研・癌ウイルス

一般演題 (ポスター)**ポスター会場****9月16日(木)**

貼付	9:00-10:00
掲示	10:00-18:00
討論	17:00-18:00
撤去	18:00-19:00

受容体

- P1-01 細胞膜分画に存在するADP-ribosyl cyclase活性の受容体刺激による変化
東田 陽博、横山 茂、橋井 美奈子、星 直人
金沢大学大学院・医学研究科・分子情報医学・細胞遺伝子学講座
- P1-02 ヒトmGluR1a発現細胞及びラット培養大脳皮質細胞におけるCPCCOEtとPHCCCの阻害様式とその性質
丸山 尚治、大沢 ひろみ、塚本 直大、竹内 裕
萬有製薬つくば研究所
- P1-03 ラット脳タイプ1シグマ($\sigma 1$)受容体との会合蛋白質の探索と解析
山本 秀子¹、三浦 玲子²、山本 敏文³、根津 竹哉³、篠原 慶子¹、鷲 直樹¹、山国 徹⁴、
額田 敏秀²
¹(財)東京都精神研精神薬理、²神経化学、³横浜市大院総合理学、⁴三菱生命研
- P1-04 神経細胞におけるNaポンプアイソフォームのイオン輸送活性制御機構の解析
井上 順雄、曾我 智子、加藤 尚彦
横浜市立大学医学部生化学第一
- P1-05 神経軸索上の電位依存性チャネルのクラスター形成におけるPSD-95ファミリーの役割
馬場 広子¹、石橋 智子^{1,2}、秋田 裕美²、池中 一裕²、西野 仁雄¹
¹名古屋市立大学医学部第二生理、²国立生理学研究所

一般演題（ポスター）

- P1-06 Mitochondria tricarboxylate carrier とホモロジーを示す脳特異的新規遺伝子のクローニング
三宅 進一^{1,4}、玉谷 実智夫^{1,4}、満田 憲昭¹、佐藤 康二²、谷口 学^{1,4}、河合 良訓³、堀 修^{1,4}、
仙波 恵美子³、遠山 正彌^{1,4}

¹大阪大・医・第二解剖、²浜松医大・第一解剖、³和歌山県立医大・第二解剖、⁴CREST、JST

- P1-07 グリアセロトニントランスポーターの薬理学的特徴と可視化

稲津 正人、武田 弘志、松宮 輝彦

東京医科大学薬理学教室

- P1-08 高親和性コリントランスポーターのクローニング

奥田 隆志¹、芳賀 達也¹、金井 好克²、遠藤 仁³、石原 健⁵、桂 勲⁵

¹東京大・医・神経生化、CREST、²杏林大・医・薬理、³遺伝研・構造制御、総研大

シナプス

- P1-09 樹状突起にmRNAが局在する新規遺伝子の同定

鈴木 龍雄¹、田 慶宝¹、岡野 照¹、中山 耕造²

¹信州大・医・神経可塑性、²信州大・医・二解剖

- P1-10 成長円錐におけるalpha-latrotoxin依存性の伝達物質放出機構

五十嵐 道弘、小宮 義璋

群馬大・医・分子病態学

- P1-11 新規シナプス小胞タンパク質p36の同定

中山 幸代¹、堀 均¹、韓 春錫²、大倉 多美子³、阿相 皓晃⁴、植村 慶一²、永沢 秀子¹

¹徳島大・工・生物工学、²慶応大・医・生理、³慶応大・先端医科研、⁴都立老人研・細胞生物

一般演題 (ポスター)

- P1-12 神経筋シナプス形成のシグナル分子の解析
重本 和宏¹、久保 幸穂²、近藤 郁子¹、丸山 直紀²
¹愛媛大学医学部衛生学、²東京都老人総合研究所分子病理

- P1-13 シナプトタグミン/ チューブリン相互作用
本多 敦子、西須 英雄、阿部 輝雄
新潟大学脳研究所

細胞骨格

- P1-14 発育初期における遅い軸索内輸送の変化と細胞骨格成熟過程
津田 守弘、田代 朋子、小宮 義章
群馬大学医学部分子病態学講座
- P1-15 ラット脳から新たに分離したNF-H C末尾部キナーゼはGSK3 β であった
佐々木 孝寛¹、内田 敦子¹、石黒 幸一²、久永 真市¹
¹都立大院・理、²三菱生命研
- P1-16 ミクログリア特異的カルシウム結合蛋白質Iba1のアクチン結合能の解析
佐々木 洋、今井 嘉紀、大澤 圭子、金澤 裕子、高坂 新一
国立精神神経センター・神経研・代謝

一般演題（ポスター）

グリア

- P1-17 ミクログリアにおける転写因子NFAT(Nuclear Factor of Activated T Cells)とカルシニューリン
情報伝達系
大森 信彦、星川 裕、内野 博之、芝崎 太
東京都臨床医学総合研究所細胞生理学研究部
- P1-18 小脳顆粒細胞死に応答し活性化するミクログリア遺伝子 gcd-10の同定
折笠 瑞穂、田中 秀逸、小池 達郎
北海道大・院理・行動知能
- P1-19 ラット培養ミクログリアにおけるMRF-1のカルシウムによる発現調節
賀谷 直樹、橋本 敦史、田中 秀逸、小池 達郎
北海道大・院理・行動知能
- P1-20 培養ミクログリアの生存制御におけるPI 3'-キナーゼとMAPキナーゼの役割
小池 達郎、橋本 敦史、池上 浩司
北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻
- P1-21 ミクログリア遺伝子 mrf-1のネクローシスに応答した発現増加
田中 秀逸、小池 達郎
北海道大・院・理・行動知能
- P1-22 ミクログリア活性酸素産生を増強するトリプシン処理アルブミン由来サブフラグメントの精製
中村 洋一、司 秋生、片岡 喜由
愛媛大学医学部生理学第一

一般演題 (ポスター)**P1-23 Mouse Glia Maturation Factor- β 及び- γ のcDNAのクローニング**

井上 雄一郎¹、浅井 清文¹、藤田 佳織¹、森川 将行^{1,3}、山本 愛美¹、三浦 裕¹、河合 洋子¹、森山 明彦²、岸本 年史³、飯田 順三³、加藤 泰治¹

¹名古屋市大医学部分子医研生体制御部門、²同自然科学研究教育センター、³奈良医大精神医学講座

P1-24 オリゴデンドロサイトの細胞系譜におけるスフィンゴミエリン

中井 陽子^{1,3}、伊藤 康一²、桜井 洋子¹、足立 達美¹、国本 学³、植村 慶一³、阿相 皓晃¹

¹東京都老人総合研究所・神経生物、²東京都臨床医学総合研究所・炎症、³慶応義塾大・医・生理、⁴国立環境研究所・地域環境研究

ミエリン

P1-25 ゼブラフィッシュ(Danio rerio) ミエリンDM20のcDNAクローニング

遠山 陽子、一宮 智美、吉田 弘美、栗原 正

創価大・生命研・神経化学

P1-26 マウス脳における新規myelin-associated glycoprotein (MAG) 蛋白質の構造解析

小糸 寿美^{1,2}、岡田 雅人¹、松田 義宏²、永井 克也¹

¹大阪大・蛋白研・代謝、²国立精神神経センター神経研 免疫

P1-27 オリゴデンドロサイト中のII型ペプチジルアルギニンデイミナーゼとその反応産物の検出

秋山 翹一¹、桜井 洋子²、阿相 皓晃²、千秋 達雄¹

¹都老人研生物活性制御、²神経生物

P1-28 P0糖蛋白質の微量成分糖鎖構造解析

北村 邦男、坂本 安、閻 剣虹、野村 正彦

埼玉医大・第一生理

一般演題（ポスター）

- P1-29 ラット小脳白質を認識する抗体12F7の特徴**
 吉村 和法^{1,2}、山室 裕³、桜井 洋子²、野村 正彦¹、須川 誠²、阿相 皓晃²
¹埼玉医科大学医学部生理学、²東京都老人総合研究所神経生物、
³日本大学生物資源科学部動物育種学

細胞分化、パターン形成

- P1-30 P19神経細胞分化におけるガングリオシドGT1bとGQ1bの局在について**
 小山内 たか¹、小谷 政春²
 都臨床研・¹生命情報、²腫瘍免疫
- P1-31 マウスP19細胞の神経分化における新規転写因子Eosの発現**
 清澤 秀孔、横屋 幸彦、森 徹自、本間 豊、金沢 賢也、二階堂 琢也、武田 順子、
 竹内 真由美、和中 明生
 福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門
- P1-32 ゼブラフィッシュ新規Ikarosファミリー遺伝子の単離**
 横屋 幸彦、清澤 秀孔、森 徹自、本間 豊、金沢 賢也、二階堂 琢也、武田 順子、
 竹内 真由美、和中 明生
 福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門
- P1-33 ヒトNeuroD-related factor (NDRF) のプロモーター領域の同定と解析**
 北村 健、宮地 隆史、川上 秀史、中村 重信
 広島大学医学部内科学第三
- P1-34 成熟ラットの脳に多く発現される新規遺伝子Bdm 1 の機能解析**
 大橋 隆、山内 康熙、大木 武、中田 規之、竹田 二美代、本郷 茂樹、竹田 稔
 昭和大学医学部生化学

一般演題（ポスター）

- P1-35 **Necdin変異マウスを用いたゲノムインプリンティングの解析**
中田 祐二^{1,2}、植月 太一¹、小林 正克¹、原 とも子¹、吉川 和明¹
¹大阪大・蛋白研・機能制御部門、²日本学術振興会特別研究員
- P1-36 **ニューロン増殖抑制因子necdinと核マトリックス蛋白質hnRNP-Uの相互作用**
谷浦 秀夫、浅野 徹、松本 国治、吉川 和明
大阪大学蛋白質研究所機能制御部門
- P1-37 **サブプレートニューロンに対するモノクローナル抗体4E1の作製—免疫組織化学的検討—**
韓 春錫、石井 加代子、植村 慶一
慶応義塾大医学部生理学教室
- P1-38 **中枢神経系に高発現するDNA組み換え遺伝子recA様新規遺伝子(MmTRAD) alternative transcriptsの解析**
川端 昌弘、佐伯 清美
岡山大学医学部薬理学教室
- P1-39 **胎生期マウス脳から単離した未知遺伝子,O-833,の解析**
小野田 学時^{1,2}、本田 岳夫¹、佐藤 博²、桑野 良三¹
¹新潟大・遺伝子実験施設、²同・医病・薬剤
- P1-40 **プロテアーゼの内因性インヒビターによるグリア細胞の分化誘導機構**
岩崎 靖乃、熊田 竜郎、中田 智絵、中平 英子、長谷川 明子、馬場 広子、池中 一裕
岡崎国立共同研究機構・生理学研究所
- P1-41 **高力価レトロウイルスを用いた海馬錐体細胞内へのIn vivo 遺伝子導入の試み**
松川 則之¹、池中 一裕²、河野 真子²、湯浅 浩之¹、小鹿 幸生¹
¹名古屋大第二内科、²国立共同研・生理研・神経情報

一般演題（ポスター）

P1-42 ヒト羊膜細胞における神経幹細胞マーカー遺伝子の発現

稲永 由紀子¹、児矢野 聡¹、内田 彩子¹、堀越 嗣博¹、中福 雅人²、岡野 栄之³、桜川 宣男¹
¹国立精神・神経センター神経研究所、²東京大学医学部神経生物、³大阪大学医学部神経機能解剖

P1-43 脳の層構造構築に寄与するリーリンに関連した新規分子mRE-1の単離とその解析

星野 潤^{1,2}、仲嶋 一範³、田畑 秀典¹、御子柴 克彦^{1,2}

¹理化学研究所脳科学総合研究センター発生神経生物研究チーム、²東京大学医科学研究所化学研究部、³東京慈恵会医科大学DNA医学研究所分子神経生物学研究部門

P1-44 プロテオーム的な手法によるラット小脳形成期の解析

田岡 万悟、若宮 昭子、磯辺 俊明
 東京都立大学大学院理学研究科化学専攻

アポトーシス

P1-45 ラット大脳皮質培養細胞におけるエタノールによる細胞毒性について

高寺 恒雄、松田 育美、坂本 ゆかり、大屋敷 孝雄
 北陸大・薬・臨床化学

P1-46 低濃度NOによる細胞選択的毒性

湯山 耕平¹、山本 秀子²、中村 和弘¹、加藤 武¹、山国 徹³、宋 時榮³、山本 敏文¹
¹横浜市大院総合理学、²東京都精神医学総合研究所精神薬理、³三菱化学生命研

P1-47 新規アポトーシス調節タンパク質のクローニングとその機能解析

米田 託成^{1,2}、今泉 和則^{1,2,3}、由井 大錦^{1,2}、遠山 正彌^{1,2}

¹大阪大学・医・機能形態、²CREST・JST、³田辺製薬（株）・創薬研

一般演題 (ポスター)

- P1-48 **培養ミクログリアのアポトーシス制御機構-CキナーゼとAキナーゼの役割-**
宮崎 博文¹、尾形 直則²、Qiu-Sheng Si³、中村 洋一³、片岡 喜由³
¹愛媛大学医学部麻酔蘇生学、²同整形外科、³同第一生理学
- P1-49 **ラット大脳皮質神経細胞に対する粘菌分化誘導因子 (DIF) の効果**
管野 敏夫^{1,4}、久保 原禪²、黒見 担³、後藤 文夫⁴、高田 邦昭¹、林 謙介¹
¹群馬大学生体調節研究所細胞構造、²分子調節、³医学部行動生理、⁴麻酔科蘇生科
- P1-50 **ブレフェルジンによって誘導される神経細胞死における caspase-3 の迅速な活性化**
中村 祥子、小池 達郎
北海道大学大学院理学研究科行動知能学講座
- P1-51 **ヌクレオチド除去修復機構関連遺伝子(XPA, CSB)欠損マウスにおけるDNA傷害に伴う中枢ニューロンのアポトーシス**
安達 直樹¹、村井 真知子¹、榎戸 靖¹、吉野 雅文²、中津 可道²、田中 亀代次²、
Gijsbertus T.J.van der Horst³、Jan.H.Hoeijimaker³、畠中 寛¹
¹大阪大学蛋白研、²大阪大学細生工セ、³Erasmus University Rotterdam
- P1-52 **中枢ニューロンのアポトーシスにおけるシスタチンCの役割**
西山 啓次、西尾 チカ、山田 雅司、畠中 寛
大阪大学蛋白研・生合成
- P1-53 **ラット脳に強く発現するSNF1 family, SNRKの栄養的・環境的ストレスに対する酵素活性の変動**
小西 明雄¹、吉田 聖美²、西尾 チカ¹、山田 雅司¹、畠中 寛¹
¹大阪大学・蛋白質研究所・生合成研究部門、²国立長寿医療研究センター・老年病研究部

一般演題（ポスター）

P1-54 老化に伴い変化する脊髄糖タンパク質の解析

佐藤 雄治¹、中野 泰子²、木幡 陽¹、富田 基郎²、遠藤 玉夫¹

¹都老人研、²昭和大学・薬

P1-55 加齢による脳内metallothionein-III mRNA発現の変化

宮崎 育子¹、浅沼 幹人¹、十川 千春²、田中 健一¹、東 洋一郎¹、小川 紀雄¹

¹岡山大医・分子細胞研・神経情報学、²岡山大歯・歯科薬理学

P1-56 B型 monoamine oxidase (MAO-B) 阻害剤の慢性投与による老齢マウスの寿命延長作用に対するフリーラジカルの関与について

江頭 亨、高山 房子、山中 康光

大分医科大学薬理学教室

精神疾患、薬物依存

P1-57 ラット前頭前野皮質におけるphencyclidine誘発性ドーパミン遊離に対する抗精神病薬の影響

黒木 俊秀、川原 健、米澤 裕次、田代 信維

九州大学大学院医学系研究科精神病態医学

P1-58 Phencyclidine連続投与によるラット脳内神経栄養因子の変化

高橋 誠¹、豊岡 和彦^{2,3}、染矢 俊幸²、那波 宏之³

¹国立療養所犀潟病院精神科、²新潟大学医学部精神科、³新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

P1-59 慢性リチウム投与によるラット海馬グルコルチコイド受容体mRNAの増加

仙波 純一^{1,2}、渡辺 秀栄¹、須原 哲也^{2,3}、赤沼 のぞみ⁴

¹放送大学・教養学部、²科学技術振興事業団・戦略的基礎研究、

³放射線医学総合研究所・高度診断機能研究ステーション、⁴東京医科歯科大学神経精神医学教室

一般演題 (ポスター)

- P1-60 **慢性リチウム処置のラット海馬スライスにおけるノルアドレナリン刺激性細胞内カルシウム反応に対する抑制効果**
岡本 泰昌¹、加賀谷 有行¹、日域 広昭¹、田村 達辞¹、福本 拓治¹、竹林 実¹、前正 秀宣¹、
西田 朗²、堀口 淳¹、山脇 成人¹
¹広島大学医学部神経精神医学講座、²国立呉病院臨床研究部
- P1-61 **フェンサイクリジンによる最初期遺伝子Arcの発現に対する非定型抗精神病薬の影響**
中原 辰雄¹、黒木 俊秀²、本藤 久雄³、堤 哲之³、橋本 喜次郎³、本村 啓介³、植木 裕司³、
平野 誠³、内村 英幸³
¹九州大学理学研究科、²佐賀医科大学精神医学、³国立肥前療養所情動行動障害センター
- P1-62 **5-HT_{1A} 受容体を介したストレス適応機構に視床下部・下垂体・副腎皮質系が関与する**
辻 稔、武田 弘志、松宮 輝彦
東京医科大学薬理学教室
- P1-63 **モルヒネ依存・耐性ラットの中樞神経 Neuropeptide Y 遺伝子発現の増加**
高木 正仁、許 波、弦巻 立、豊里 晃、樋口 宗史
新潟大・医・薬理
- P1-64 **GABA_A 受容体 $\alpha 4$ サブユニット遺伝子新規多型とアルコール依存症との関連研究**
中村 雅之¹、上野 修一¹、三神 正昭¹、田邊 敬貴¹、有波 忠雄²、石黒 浩毅²、
小宮山 徳太郎³、三ツ汐 洋³、佐野 輝¹
¹愛媛大学医学部神経精神医学、²筑波大学基礎医学系遺伝医学、³国立精神神経センター武蔵病院
- P1-65 **ドーパミントランスポーター遺伝子の5' 領域多型についての検討**
上野 修一¹、中村 雅之¹、三神 正昭¹、田邊 敬貴¹、石黒 浩毅²、有波 忠雄²、
小宮山 徳太郎³、三ツ汐 洋³、佐野 輝¹
¹愛媛大学医学部神経精神医学、²筑波大学基礎医学系遺伝医学、³国立精神神経センター武蔵病院

一般演題（ポスター）

痴 呆

- P1-66 **CHO細胞で産生させたAPPの糖鎖の解析**
 佐藤 雄治¹、Chen Liu²、Bogusław S.Wojczyk²、木幡 陽¹、Steven L. Spitalnik²、遠藤 玉夫¹
¹都老人研、²ペンシルベニア大
- P1-67 **NT2ニューロンのアポトーシスに伴うAPPの蓄積**
 西村 伊三男^{1,2}、植月 太一¹、原 とも子¹、吉川 和明¹
¹大阪大・蛋白研・機能制御、²学振特別研究員
- P1-68 **カベオラとは異なるコレステロール高含有ドメインにおけるアミロイド前駆体蛋白**
 林 秀樹、水野 哲也、道川 誠、柳澤 勝彦
 国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部
- P1-69 **アルツハイマー病脳におけるアポトーシス調節タンパク質の変動；加齢による変動との相関**
 藤本 貞毅¹、谷野 浩子¹、守屋 友加¹、下濱 俊²
¹京都薬科大学衛生化学教室、²京都大学医学部神経内科学教室
- P1-70 **合成amyloid β -蛋白を用いたラットグリア細胞培養系における老人斑モデル**
 磯部 一郎、柳澤 勝彦、道川 誠
 国立長寿医療研究センター、痴呆疾患研究部
- P1-71 **アポリポ蛋白Eのアイソフォーム特異的作用の検討：培養神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロールeffluxに及ぼす影響**
 道川 誠、范 企文、磯部 一郎、柳澤 勝彦
 国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

一般演題 (ポスター)

- P1-72 家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン1 変異体の機能解析**
 片山 泰一^{1,2,3}、今泉 和則^{1,2,3}、佐藤 直也^{1,2,3}、三好 耕^{1,3}、遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大・医・機能形態学、²田辺製薬・創薬研究所、³CREST, JST
- P1-73 孤発性アルツハイマー病とスプライシング異常**
 佐藤 直也^{1,2,3}、人見 淳一^{1,3}、今泉 和則^{1,2,3}、遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大・医・機能形態学、²田辺製薬・創薬研究所、³CREST, JST
- P1-74 中枢神経系細胞における2種のNPRAP/ δ -cateninアイソフォームの発現解析**
 川村 勇樹、范 企文、林 秀樹、道川 誠、柳澤 勝彦、駒野 宏人
 国立長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部
- P1-75 アルツハイマー・ β アミロイド蛋白質による細胞内カルシウム流入の細胞による差異**
 川原 正博¹、加藤 みどり^{2,3}、村本 和世¹、黒田 洋一郎²
 東京都神経科学総合研究所 ¹神経生化学、²解剖発生、³科学技術振興事業団
- P1-76 アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンとアミロイド前駆体タンパク質のC末断片の関係について**
 亀谷 富由樹¹、田中 喜久子¹、宇佐美 美穂子¹、丸山 敬¹、森 啓²
¹東京都精神医学総合研究所・分子生物、²大阪市立大学医学部老年医学
- P1-77 エストロゲン受容体 α 遺伝子多型の転写活性およびアルツハイマー病への関与の検討**
 丸山 博文¹、田路 浩正¹、川上 秀史¹、中村 重信²、佐々木 健²、新井 平伊³、保田 稔⁴、
 田中 千賀子⁴、Charles Harrington⁵
¹広島大学医学部内科学第三、²きのこエスポアル病院、³順天堂大精神、⁴兵庫脳研、⁵Aberdeen大
- P1-78 アルツハイマー病の危険因子としてのアンギオテンシンⅠ変換酵素遺伝子多型**
 宮武 史子¹、会津 善紀¹、胡 建国¹、中川 八郎²、中村 重信²、玉岡 晃³、高橋 良輔⁴、
 浦上 克哉⁵、東海林 幹夫⁶
¹株式会社ビー・エム・エル 研究開発本部、²広島大学第3内科、³筑波大学神経内科、
⁴東京都神経研神経学部門、⁵鳥取大学脳神経内科、⁶群馬大学神経内科

一般演題（ポスター）

ポスター会場
9月17日(金)

貼付	9:00-10:00
掲示	10:00-15:00
討論	12:00-13:00
撤去	15:00-16:00

伝達物質

P2-01 Group II代謝調節型glutamate受容体を介する中枢acetylcholine遊離機構と N-anisoyl-GABAによる修飾作用
白根 正智、中村 和雄
日本ロシュ・研究所・CNSラボ

P2-02 ドパミンの核内転写因子への直接作用に関する検討
浅沼 幹人、宮崎 育子、田中 健一、小川 紀雄
岡山大学医学部神経情報学部門

P2-03 ドーパミンによるヒトチロシン水酸化酵素1型活性の抑制はN端の特異的部位によって制御される
中島 昭¹、森 啓至¹、金子 葉子¹、鈴木 崇弘²、永津 俊治²、太田 明¹
藤田保健衛生大・¹医・第1生理、²総医研・分子遺伝

P2-04 内因性アルデヒド化合物によるPC12細胞からのドパミン遊離促進機構の解析
橋本 恒一、矢部 千尋
京都府立医科大学 薬理学教室

P2-05 CALI法の開口分泌機構研究への応用
今泉 美佳¹、岸本 正巳¹、川ノ口 潤、笹川 展幸、西木 禎一²、高橋 正身²、熊倉 鴻之助¹
¹上智大学・生命科学研究所、²三菱化学・生命科学研究所

一般演題 (ポスター)

- P2-06 Catecholamine分泌能の低下したPC12細胞株の解析
笠井 陽子、森島 美絵子、桑原 玲子、高橋 正身
三菱化学生命科学研究所

- P2-07 PC12細胞におけるコンプレキシン(Complexin)の開口放出制御機構の解明
板倉 誠^{1,2}、高橋 聖一³、高橋 正身¹
¹三菱化学生命研、²東工大生命理工、³高知医大第一生理

- P2-08 ラット脊髄後根神経節培養細胞におけるIL-1 β 誘発性サブスタンスP遊離について
森岡 徳光、武田 和美、熊谷 圭、秀 和泉、井上 敦子、仲田 義啓
広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学

- P2-09 豚下垂体から合成ペプチドSucFGRSED-Dnsプロセシング酵素の単離と構造解析
加藤 武¹、山本 賢¹、平野 久²、矢嶋 隆一³、知久馬 敏幸⁴
¹横浜市大・院・総合理学、²木原生研、³特殊免疫研、⁴昭和薬科大・薬品分析

情報伝達

- P2-10 光感応基を有する新規リジン誘導体を用いたケージドペプチドの合成法の開発とCaMキナーゼII特異的阻害ペプチドAIPへの応用
茂里 康¹、達 吉郎¹、石田敦彦²、亀下 勇²、藤澤 仁²、湯元 昇¹
¹通商産業省大阪工業技術研究所、²旭川医科大学・一生化

- P2-11 ラットC6BU-1細胞におけるDehydroepiandrosteroneのcyclic GMP産生に対する効果
竹林 実、加賀谷 有行、稲垣 正俊、三好 出、片桐 秀晃、岡本 泰昌、堀口 淳、山脇 成人
広島大学医学部神経精神医学講座

一般演題（ポスター）

- P2-12 Dual leucine zipper bearing kinase (DLK)欠損マウスにおける海馬体・脊髄白質の発達不全メカニズム
湯川 和典¹、白澤 信行²、鶴尾 吉宏³、辻 繁勝¹
和歌山県立医科大学 ¹第二生理学、²第一解剖学
- P2-13 PHAPI kinaseとPHAP Iの細胞内リン酸化
下島 桐、萩原 民雄、山科 聡子、今川 浩之、竹田 二美代、竹田 稔
昭和大・医・生化
- P2-14 海馬ニューロンにおけるestrogen-nicotine のクロストーク
鬼頭 昭三、新郷 明子
兵庫大学附属研究所
- P2-15 グリア由来培養細胞におけるトロンピン刺激性細胞内カルシウム動員系に対するリチウムとプラスミンの影響
加賀谷 有行¹、岡田 亜希子²、田原 康孝¹、稲垣 正俊¹、三好 出¹、岡本 泰昌¹、竹林 実¹、堀口 淳¹、仲田 義啓²、山脇 成人¹
¹広島大学医学部神経精神医学講座、²広島大学医学部薬効解析科学
- P2-16 小胞体ストレスセンサーのクローニング
三好 耕^{1,3}、今泉 和則^{1,2,3}、片山 泰一^{1,2,3}、佐藤 直也^{1,2,3}、人見 淳一^{1,3}、米田 託成^{1,5}、遠山 正弥^{1,3}
¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座A2、²田辺製薬(株)創薬研、³CREST JST
- P2-17 Cdk5欠損マウス及びCdk5活性化サブユニットp35欠損マウスの生化学的検討
大島 登志男^{1,2}、Veeranna³、H. C. Pant³、御子柴 克彦¹、A. B. Kurkarni²
¹理化学研究所・脳科学総合研究センター・発生神経生物研究チーム、²GTF, NICDR、³LN, NINDS
- P2-18 PC12D細胞におけるM1ムスカリン性アセチルコリン受容体の刺激による前初期遺伝子*zif268*の発現誘導：低分子量G蛋白質Rhoの役割
平林 敏行、David Saffen
東京大学医学部神経生化学教室

一般演題 (ポスター)

- P2-19 PC12細胞におけるMAPキナーゼ経路とプロティンキナーゼA経路のクロストークとニコチン性アセチルコリン受容体の発現調節について

中山 均¹、畠中 寛²

¹奈良医大・薬理、²大阪大・蛋白研

- P2-20 ラット脳におけるアデニル酸キナーゼアイソザイムの分布

井上 幸江¹、山田 康枝²、三浦 公志郎¹、河田 啓介³、松尾 義久³、篠田 晃³、中澤 淳¹

¹山口大学医学部生化学第二、²同・薬理学、³同・解剖学第二

- P2-21 CaMキナーゼIVによるカルモデュリンのリン酸化

石田 敦彦、亀下 勇、奥野 幸子、木谷 隆子、藤澤 仁

旭川医科大学第一生化学教室

- P2-22 PC12細胞および培養小脳顆粒細胞におけるラブフィリン-3Aのリン酸化の解析

古賀 毅¹、板倉 誠^{2,3}、片岡 正和²、大西 浩史²、関口 真理子²、山森 早織²、佐藤 一紀²、高橋 正身^{1,2}

¹東大院・総合文化、²三菱化学生命研、³東工大・生命理工

- P2-23 ヒト羊膜細胞における神経誘導因子の発現とアクチビンA処理によるnoggin誘導

児矢野 聡、桜川 宣男

国立精神・神経センター神経研究所

栄養因子、再生

- P2-24 舌下神経切断により著明な発現上昇の見られる、Rhoファミリー蛋白TC10の神経系細胞における細胞骨格制御作用

田辺 勝久^{1,2,3,5}、立花 太郎⁴、山下 俊英²、蔡 栄浩^{2,3,5}、米田 悦啓⁴、遠山 正彌^{2,5}、

越智 隆弘³、木山 博資¹

¹旭川医大・第一解剖、²大阪大院・医・機能形態学解剖学第二、³大阪大院・医・器官制御外科学、

⁴大阪大院・医・機能形態学解剖学第二、⁵CREST, JST

一般演題（ポスター）

- P2-25 Mevalonate pathwayの酵素であるIPP isomeraseは神経切断後および生直後大脳皮質の神経細胞で発現が上昇する
森原 剛史^{1,2,3}、今泉 和則^{1,3,4}、米田 託成^{1,3}、田辺 勝久^{1,3}、武田 雅俊²、遠山 正彌^{1,3}
¹大阪大学第二解剖、²精神医学、³CREST・JST、⁴田辺製薬（株）創薬研
- P2-26 成体ラット顔面神経核運動ニューロン損傷に対するGDNF組換えアデノウイルス・ベクターの保護効果
坂本 剛^{1,2,3}、渡部 和彦¹、大橋 十也⁴、川添 陽子¹、小柳 清光¹、井上 聖啓²、細谷 龍男³、衛藤 義勝⁴
¹東京都神経科学総合研究所神経病理、東京慈恵会医科大学・²神経内科、³内科第2、⁴小児科/DNA医学研究所遺伝子治療
- P2-27 Haloperidol投与ラットにおける神経栄養因子の脳内動態
豊岡 和彦^{1,2}、高橋 誠²、二村 隆史¹、染矢 俊幸²、那波 宏之¹
¹新潟大学脳研究所分子神経生物学分野、²新潟大学精神医学教室
- P2-28 BDNFによる大脳皮質GABAergic神経細胞のAMPA感受性の亢進
永野 忠聖、難波 寿明、大津 洋、武井 延之、那波 宏之
新潟大・脳研・分子神経生物
- P2-29 BDNF遺伝子発現へのカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの関与
竹内 有輔^{1,2}、山本 秀幸¹、宮川 太平²、宮本 英七¹
熊本大・医・¹第一薬理、²神経精神
- P2-30 脳由来神経栄養因子（BDNF）の糖代謝制御における神経系の関与
野々村 健¹、小野 道子¹、土田 敦之¹、山中 貢¹、板倉 康史¹、中川 勉¹、泰地 睦夫¹、野口 浩²
¹住友製薬（株）総合研究センター、²同・臨床開発センター
- P2-31 糖尿病によって誘発される中枢神経機能障害に対する4-メチルカテコールの保護効果
鈴木 宣雄、新田 淳美、古川 昭栄
岐阜薬科大学分子生物学教室

一般演題（ポスター）

- P2-32 **歯周組織由来培養細胞における神経栄養因子とその受容体のmRNAの発現**
篠原 弘明、吉野 宏、藤岡 大助、栗原 英見
広島大学歯学部歯科保存学第二講座
- P2-33 **上頸神経節細胞におけるNT3受容体-GDNF受容体の発現調節と相互作用**
小林 三和子、松岡 一郎
北海道大学大学院・薬学研究科
- P2-34 **bFGFの脳室内投与による細胞分化異常とその解析**
大宮 誠、新田 淳美、古川 昭栄
岐阜薬科大学・分子生物学教室
- P2-35 **培養マウス小脳顆粒細胞の生存と生存支持因子の性質**
藤川 直人、小倉 明彦
大阪大・院理・生物
- P2-36 **老化促進モデルマウス（SAMP8）の海馬における海馬由来神経刺激因子（hippocampal cholinergic neurostimulating peptide:HCNP）の加齢変化（免疫組織学的検討）**
湯浅 浩之、松川 則之、片田 栄一、小鹿 幸生
名古屋市立大学医学部第二内科学
- P2-37 **ACTH1-24がアストロサイトの神経栄養因子遺伝子発現に与える影響**
小久保 稔^{1,2}、浅井 清文²、青山 峰芳¹、森川 将行²、河合 洋子²、和田 義郎¹、加藤 泰治²
名古屋市立大学医学部・¹小児科、²分子医学研究所生体制御部門
- P2-38 **海馬ニューロンにおけるIGF1 mRNA発現とestrogen**
新郷 明子、鬼頭 昭三、櫻井 香織
兵庫大学附属研究所

一般演題（ポスター）

P2-39 Troglitazoneの運動神経細胞に対する神経栄養因子活性

西嶋 千晶、木元 克輔、荒川 義弘
東京大学医学部附属病院分院薬剤部

P2-40 ミクログリアの活性化とプロテインキナーゼC

中嶋 一行^{1,2}、本田 静世²、Lopez-Redondo Fernando²、中村 泰子²、栗原 正¹、高坂 新一²
¹創価大学生命科学研究所神経化学、²国立精神・神経センター神経研究所代謝

リズム、記憶

P2-41 周期変動性キナーゼ(Pfk)によるBMAL1/CLOCK転写制御系のリン酸化

田丸 輝也、高松 研
東邦大・医・第2生理

P2-42 マウスBMAL1遺伝子の3種のスプライスバリエントとゲノム構造の解析

余 旺節¹、池田 正明¹、安倍 博²、本間 さと²、海老澤 尚³、山内 俊雄³、本間 研一²、
野村 正彦¹
¹埼玉医大・第一生理、²北海道大・医・統合生理、³埼玉医大・精神科

P2-43 ラット海馬スライスにおける化学的長期増強による脂肪酸及びAcyl-CoAの遊離

張 勤増、酒井 久美子、吉田 敏
大分医大実験実習機器センター

P2-44 海馬CA1錐体細胞の活動とhippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) 前駆蛋白 mRNAの発現

岩瀬 環¹、松川 則之¹、西野 仁雄¹、岡田 秀親¹、山本 孝之²、小鹿 幸生¹
¹名古屋市立大学・医学部、²福祉村病院・長寿医学研究所

一般演題 (ポスター)

- P2-45 マウスの動機づけにおよぼすhaloperidolの効果：連続強化スケジュールと摂食量による検討
堀 耕治、野村 正彦
埼玉医科大学第一生理

疾患モデル

- P2-46 A β の脳室内注入によって誘発される脳機能傷害：行動学的、神経化学的および組織学的解析
中村 静雄、村山 宣人、案浦 洋一、大野 知親
サントリー生物医学研究所
- P2-47 子宮内胎児発育不全と中枢神経障害
田口 雅之¹、小嶋 久子²、斎藤 克¹、斎藤 真希¹、栗原 正³、西島 正博¹、玉井 洋一²
北里大・医・¹産婦人科・²生化学、³創価大・生命研
- P2-48 Sandhoff病モデルマウス由来培養神経細胞ならびにシュワン細胞の形態・機能解析
三五 一憲¹、渡部 和彦²、山中 正二³
東京都神経科学総合研究所 ¹解剖発生、²神経病理、³横浜市立大学医学部第二病理
- P2-49 胎児期アルコール被曝ラットの中枢ミエリンタンパクへの影響と学習行動について
小嶋 久子¹、堀 耕治²、栗原 正³、白鷹 増男⁴、中村 和生¹、川島 麗¹、田口 雅之⁵、
野村 正彦²、玉井 洋一¹
北里大・医・¹生化学、⁵産婦人科、⁴医療衛生・医情報、²埼玉医大・生理学、³創価大・生命研
- P2-50 A群色素性乾皮症原因遺伝子およびB群コケイン症候群原因遺伝子ダブルノックアウトマウスにみられる小脳の発達異常
村井 真知子¹、稲村 直子¹、安達 直樹¹、榎戸 靖¹、吉野 雅文²、中津 可道²、
Gijsbertus T.J.van der Horst³、Jan.H.J.Hoeijmakers³、田中 亀代次²、畠中 寛¹
¹大阪大学・蛋白研、²大阪大学・細生工センター、³Erasmus University

一般演題（ポスター）

変性疾患

- P2-51 **ドーパミン神経毒MPP⁺によるアポトーシス誘導の機構**
梅沢 倫子、村山 俊彦、野村 靖幸
北海道大院・薬・薬理
- P2-52 **酸化的ストレスと内在性脳内アミン1BnTIQの相乗効果による神経毒性の検討**
本田 真知子、古武 弥一郎、太田 茂
広島大学医学部総合薬学科
- P2-53 **新規パーキンソン病発症物質候補の毒性評価**
杉谷 誠一郎、太田 茂
広島大学医学部総合薬学科
- P2-54 **MPTPマウスにおけるGDNF受容体Retのdown-regulation**
平田 洋子、足立 香代、村口 佐知子、木内 一壽
理化学研究所 バイオミメティックコントロール研究センター 運動遺伝子研究チーム
- P2-55 **ヒトNurr1の遺伝子構造**
鳥居 剛、瓦井 俊孝、川上 秀史、中村 重信
広島大学医学部内科学第三
- P2-56 **Niemann-Pick病C型モデルマウス(spm)由来培養シュワン細胞株の樹立**
渡部 和彦¹、坂本 剛^{1,2}、井田 博幸³、上原 けい子³、衛藤 義勝³、大野 耕策⁴
¹東京都神経科学総合研究所神経病理、²東京慈恵会医科大学神経内科、
³東京慈恵会医科大学小児科、⁴鳥取大学医学部神経生物

一般演題（ポスター）

- P2-57 筋萎縮性側索硬化症モデルマウス大脳皮質および脊髄組織内ミトコンドリア複合酵素ⅠとⅣ活性の発育に伴う変動

柴山 健三¹、藤田 公和¹、芳本 信子²、小川 和人¹、永田 豊¹、宮地 栄一¹

¹藤田保健衛生大学・医学部・生理、²名古屋文理短大

- P2-58 Iminodipropionitrileによる脊髄前角細胞NOS活性変化に対するaniracetamの効果

鎗木 真理子、駒井 清暢

金沢大学医学部神経内科

- P2-59 Human NeuroD/BETA2/BHF1遺伝子プロモーターの解析

宮地 隆史、川上 秀史、北村 健、丸山 博文、中村 重信

広島大学医学部内科学第三

虚 血

- P2-60 脳虚血後の海馬における前シナプス蛋白質、NACP/ α -synuclein, SNAP-25およびsynaptophysinの変化

石丸 裕久¹、上田 健治²、高橋 章¹、Fiorella Casamenti³、Giancarlo Pepeu³、丸山 悠司¹

¹群馬大学医学部神経精神薬理ツムラ、²東京都精神医学総合研究所神経化学、

³フィレンツェ大学医学部臨床薬理

- P2-61 糖尿病ラットにおける一過性前脳虚血後の大脳皮質の進行性萎縮

近藤 文雄、小川 紀雄

岡山大学医学部分子細胞研究施設神経情報学部門

- P2-62 グルタミン酸取り込み阻害剤は、ラジカル生成促進とグルタチオン枯渇によって培養海馬神経細胞に対する興奮毒性を増強する

氷見 敏行、池田 正行、室田 誠逸

東京医科歯科大学 分子細胞機能制御学

一般演題（ポスター）

- P2-63 ラット大脳皮質スライスでの低酸素・無グルコース/再酸素化による組織障害に対するNS-7の保護作用：ナトリウムおよびカルシウムチャンネル遮断作用を介した一酸化窒素合成酵素活性化抑制作用の関与について
岡 美智子、伊藤 善規、鵜飼 洋司郎
日本新薬・創薬研究所
- P2-64 慢性脳血流低下動物における細胞内情報伝達系の変化；オートラジオグラフィーを用いた検討
車谷 隆宏、工藤 喬、福所 英里子、中村 裕、谷向 仁、橋本 亮太、武田 雅俊
大阪大・神経機能医学講座・精神医学
- P2-65 Differential Display 法における単離配列解析の改良
東田 道久
富山医科薬科大学・和漢薬研究所・生物試験
- P2-66 局所脳虚血・再灌流時の局所脳血流量と小胞体カルシウムイオン取り込み能の検討
傳法 倫久¹、福内 靖男¹、田中 耕太郎¹、野川 茂¹、鈴木 重明¹、二木 啓²
¹慶應義塾大学医学部神経内科、²理化学研究所

炎症、てんかん

- P2-67 自己免疫性ニューロパチーにおける免疫吸着療法の効果：抗糖脂質抗体の変動と臨床予後
池田 順子¹、郡山 達男¹、小塚 和子¹、越智 一秀¹、原田 暁²、中村 重信¹
¹広島大学医学部内科学第三、²県立広島病院神経内科
- P2-68 ラット急性脊髄損傷モデルに対する性ホルモン投与による神経変性抑制効果
小川 和人¹、藤田 公和¹、山内 理充²、安藤 正人²、永田 豊¹、宮地 栄一¹
¹藤田保健衛生大学医学部生理学教室、²愛知学泉大学

一般演題（ポスター）

- P2-69 グリオースシス特異的遺伝子OASISのヒトホモログの同定**
森 徹自、竹内 真由美、二階堂 琢也、横屋 幸彦、清澤 秀孔、和中 明生
福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門
- P2-70 単純ヘルペスウイルスを用いたTIMP-2発現defective virus による悪性脳腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討**
星 道生^{1,2}、矢崎 貴仁^{1,2}、河瀬 斌²、植村 慶一¹
慶應義塾大学医学部 ¹生理学、²脳神経外科
- P2-71 抗てんかん薬ゾニザミドの抗酸化能力のin vivo評価**
徳丸 潤¹、植田 勇人¹、横山 秀克²、中島 暉³、土井 拓¹、大矢 博昭²、鎌田 仁²
¹宮崎医大精神科、²山形生物ラジカル研、³宮崎医大化
- P2-72 外傷性てんかんモデルにおけるてんかん原性焦点獲得のメカニズム**
植田 勇人¹、徳丸 潤¹、横山 秀克²、中島 暉³、土井 拓¹、大矢 博昭²、鎌田 仁²
¹宮崎医大精神科、²山形生物ラジカル研、³宮崎医大化
- P2-73 ペンチレンテトラゾールによるキンドリング痙攣とヒスタミン神経系**
李 争艶^{1,2}、櫻井 映子¹、Jalal Izadi Mobarakeh¹、飯沼 一字²、渡辺 武³、渡邊 建彦¹、
谷内 一彦¹
¹東北大学医学系院・薬理、²東北大学医学系院小児、³九州大・生体防御医学研
- P2-74 シュワン細胞における抗酸菌感染による神経栄養因子・サイトカインの発現**
遠藤 真澄、野間口 博子、小林 和夫
国立感染症研究所ハンセン病研究センター

ランチョン・イブニングセミナー

ランチョンセミナー イブニングセミナー

9月16日(木)

ランチョンセミナー1

12:00-13:00 (C会場:ダリア2)

司会:湯浅 龍彦(国立精神・神経センター 国府台病院神経内科)

in vivo ¹³C-磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)による脳代謝計測

岡本 和也(株)東芝 医用システム社 医用機器・システム開発センター)

ランチョンセミナー2

12:00-13:00 (D会場:コスモス1)

司会:須原 哲也(放射線医学総合研究所 高度診断機能研究ステーション)

脳神経領域へのPETの応用

和田 康弘(シーメンス旭メディテック株式会社マーケティング本部)

イブニングセミナー

18:00-19:00 (C会場:ダリア2)

司会:永津 俊治(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

パーキンソン病の原因と治療をめぐる最近の話題

水野 美邦(順天堂大学医学部脳神経内科)

9月17日(金)

ランチョンセミナー3

12:00-13:00 (C会場:ダリア2)

司会:祖父江 元(名古屋大学医学部神経内科)

講演1. 電気生理学的にみたCIDP

馬場 正之(弘前大学医学部脳研究施設臨床神経部門)

講演2. CIDPとガンマグロブリン療法

梶 龍児(京都大学医学部神経内科)

会長講演

スフィンクスとミューズ
ー神経化学の臨床応用ー

中村 重信

広島大学医学部内科学第三

古来、スフィンクスの謎として「朝は4本足、昼は2本足で夜になると3本足になる動物は何か？」という問が投げかけられ、多くの人の頭を悩ませてきた。その回答は「歩行障害のある老人」といった説もあるが、まだ分からないのが本当だろう。スフィンクスはいかにも思慮深げであり、その脳のネットワークを解き明かしたいという誘惑に駆られる神経化学者も少なくないであろう。しかし、良く見るとその顔つきはパーキンソン病患者の仮面様顔貌に似ており、何千年も不動の姿勢を保っているところから臨床医はパーキンソン病と診断しそうである。パーキンソン病患者の大脳基底核でドーパミンが減少していること、L-DOPAを投与すると症状改善がみられることを故佐野勇博士が日本神経化学会に報告してから40年が過ぎようとしている。それ以来、おびただしい数の世界的な研究が報告され、それが臨床応用されて、患者の福音となってきており、ミューズの神も驚いていることだろう。

最近、種々の精神神経疾患の遺伝子異常が明らかにされ、短時間に診断がつくようになってきた。アルツハイマー病のようなスフィンクスの謎を具現化したような複雑怪奇な病気でもその大まかな発病の機序、病気になりやすい人の遺伝子上の特性、さらに最近では治療薬も発売されようとしている。アルツハイマー病に限らず、分子生物学的手法を用いた、神経細胞の分化や細胞死のメカニズム、グリア細胞の機能とその病的変化、チャンネルやトランスポーターの分子構造とその意義が精力的に探究され、病気の治療に応用されようとしている。世はまさに「脳の世紀」の幕開けにふさわしい活況を呈している。しかし、スフィンクスの謎は依然謎として解かれないまま、神経化学に手を染めているわれわれを見下ろしている状態が続いている。これからの最大の課題は、得られた神経化学の基礎的知見をいかに臨床に応用して、患者や社会のために役立てるかという問題である。神経化学に携わる若い研究者諸君もミューズの神に仕えるだけでなく、謙虚にスフィンクスの謎を解き明かすべく挑戦を続けて頂きたい。その命題こそが本学会の使命と考えている。

S10-1

アルツハイマー病はどうして起こるか
- 神経化学の成果

中村 重信

広島大学医学部内科学第3

【略 歴】

生年月日: 1938(昭和13)年11月18日

1963(昭和38)年3月 京都大学医学部卒業

1964(昭和39)年 京都大学大学院医化学 (早石研)

1968(昭和43)年 京都大学医学部助手 (老年医学)

1971(昭和46)年・72年 Oxford大学留学 (薬理学)

1980(昭和55)年 京都大学医学部助教授(神経内科)

1990(平成2)年・現在 広島大学医学部内科学第3教授

【主要な著書・論文・賞】

1. Abnormalities of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease with special reference to effect of acetylcholinesterase inhibitor. *Behavioral Brain Research* 83: 25, 1997.
2. Characteristic magnetic resonance imaging findings in spinocerebellar ataxia 6 (SCA 6). *Arch Neurol*, 55: 1348-1352, 1998.
3. Apolipoprotein E promotor polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett* 259:56-58, 1999.
4. Prevalence and risks of dementia in the Japanese population: RERF's adult health study Hiroshima subjects. *J Am Geriatr Soc* 47:189-195, 1999.
5. Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in mouse cerebellum. *J Neurochem* 72: 1497-1506, 1999.
6. Identification and analysis of the promoter region of the human Neuro D-related factor (NDRF). *Biochim Biophys Acta* 1445: 142-147, 1999.
7. Spinocerebellar ataxia type 6 in relation to CAG repeat length. *Acta Neurol Scand* 99: 209-212, 1999.
8. Organization of the human orphan nuclear receptor Nurrl gene. *Gene* 230: 225-232, 1999.
9. Structure and regulation of the human Neuro D (BETA2/ BHF1) gene. *Mol Brain Res* 69: 223-231, 1999.
10. Direct alteration of the P/Q type Ca^{2+} channel property by polyglutamate expansion in spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *J Neurosci* 19:RC14 (1-5), 1999.

第2回ベルツ医学賞受賞

国際アルツハイマー病協会日本代表、英国王立医学協会評議員、日本神経学会理事、日本老年医学会理事、日本脳卒中学会理事、日本痴呆学会理事、日本自律神経学会理事、日本神経化学会理事、日本内科学会評議員、第42回日本神経化学会会長、第52回日本自律神経学会会長、JANS, J Stroke Cerebrovascular Diseases などのEditor

S10-2

アルツハイマー病治療薬の現状と展望

鍋島 俊隆

名古屋大学医学部薬剤部

【略 歴】

生年月日: 1943(昭和18)年4月9日

1968(昭和43)年 3月 2日 岐阜薬科大学卒業.

4月 8日 大阪大学大学院薬学研究
科修士課程 (生物薬品化
学講座) 入学

1970(昭和45)年 3月 大阪大学大学院薬学研究
科修士課程修了

4月 8日 同上博士課程入学

1973(昭和48)年 3月31日 同上単位取得

1977(昭和52)年12月14日 薬学博士 (東北大学)

1973(昭和48)年 4月 1日 名城大学薬学部助手

1978(昭和53)年10月30日~1981(昭和56)年5月3日

米国ミシシッピ州立大学

メデイカルセンター客員助教授

1982(昭和57)年 4月 1日 名城大学薬学部講師

1984(昭和59)年 4月 1日 名城大学薬学部助教授

1990(平成 2)年 1月 1日 名古屋大学医学部附属病
院教授、薬剤部長

兵庫教育大学(1990-91)、岐阜薬科大学(1990-)、

名城大学薬学部(1990-)、岡山大学医学部(1991)、

浜松医科大学(1992)、広島大学医学部(1992-94)、

名古屋大学教養部(1993-94)、名古屋大学情報文化学

部(1997)各非常勤講師

【主要な著書・論文・賞】

1. Two phases of behavioral plasticity in rats following unilateral excitotoxic lesion of the hippocampus. *Neuroscience*.1999;92(3):819-26.
2. Prophylaxis of local vascular graft infection with levofloxacin incorporated into albumin-sealed dacron graft (LVFX-ALB graft). *Microbiol Immunol*. 1999;43(4):317-21.
3. Nociceptin system plays a role in the memory retention: involvement of naloxone benzoylhydrazone binding sites. *Neuroreport*. 1999 Apr 26;10(6):1171-5.
4. Characterization of learning and memory deficits in C57BL/6 mice infected with LP-BM5, a murine model of AIDS. *J Neuroimmunol*. 1999 Mar 1;95(1-2):65-72.

1.日本薬学会奨励賞受賞(1986. 4. 2.)

2.日本薬学会宮田専治学術賞受賞(1987. 7. 24.)

3.日本神経精神薬理学会学術賞受賞(1994.10. 20.)

4.日本薬学会学術貢献賞受賞(1995. 3. 29.)

5.病院薬学会賞受賞(1999. 6.)

S10-3

Biological functions of the presenilins - components of a high molecular weight protein complex

Peter H. St. George-Hyslop
Toronto University, Canada

【略 歴】

Date of Birth: 1953年7月10日
1976 May The University of Ottawa (Ontario, Canada) graduateion
1985 January - 1987 June Research Fellow, Department of Neurology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston.
1997 July - 1991 January Instructor in Neurology, Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA, USA.
1991 January - 1996 June Assistant Professor, Department of Medicine (Neurology), University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.
1996 June - present Professor, Department of Medicine (Neurology), University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.
1995 March - present Director, Centre for Research in Neurodegenerative Diseases, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

【主要な著書・論文・賞】

1. Interfamilial and intrafamilial phenotypic heterogeneity in familial Alzheimer's disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 10:1-6, 1997.
2. Splicing mutation of presenilin-1 gene for early onset Alzheimer disease". *Hum. Mutation Suppl.* 1: S91-S94, 1997.
3. No association between apolipoprotein E genotype and late onset depression in Alzheimer disease. *Biol. Psychiatry.* 41: 246-249, 1997.
4. Amyloid β -protein isoforms in brain of subjects with PS1-linked, β APP-linked, and sporadic Alzheimer disease. *Molec. Brain. Res.* 56: 178-185, 1998.
5. Role of genetics in tests of genotype, status and disease progression in early onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 19: 133-137, 1998.
6. Presenilin 1 is actively degraded by the 26S proteasome. *Neurobiol. Aging* 19: 19: S19-21, 1998.
7. Analysis of the butyrylcholinesterase gene and nearby chromosome 3 markers in Alzheimer disease. *Hum. Molec. Genet.* 7: 933-935, 1998.
8. A novel frameshift mutation induced by an adenosine insertion in the polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Kidney Int.* 53: 1127-1132, 1998.

9. Absence of association between Alzheimer disease and the -491 regulatory region polymorphism of APOE. *Neurosci. Letts.* In the press, 1998.
10. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J. Biol. Chem.* 273, 16470-16475, 1998.
11. Evidence for an Alzheimer Disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity. *JAMA.* 280: 614-618, 1998.
12. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of β -catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nature Medicine* 5 (2):1-6, 1999.
13. Presenilins interact with Armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and β -catenin. *J. Neurochem.* 72 (3): 999-1008, 1999.
1. The Francis McNaughton Research Prize, Canadian Neurological Society, 1982.
2. Medical Research Council of Canada Post-Doctoral Research Fellow, 1985 - 1987.
3. Metropolitan Life Foundation Award for Medical Research, 1987.
4. Medical Research Council Scholar, Medical Research Council of Canada, June, 1991 - May, 1996.
5. Faculty Scholar Award, Alzheimer Association (US), January, 1992 - December, 1994.
6. Gold Medal in Medicine, Royal College of Physicians of Canada, 1993.
7. Member, American Society for Clinical Investigation, 1995.
8. Alois Alzheimer Award, University of Munich/European Community, 1995.
9. EJLB Foundation Special Award, 1996 - 1998.
10. Potamkin Prize, American Academy of Neurology, 1996.
11. Medical Research Council of Canada Scientist, Medical Research Council of Canada, 1996 - 2001.
12. Michael Smith Award for Excellence, Medical Research Council of Canada, 1997.
13. Howard Hughes Foundation International Scholar Award, Howard Hughes Medical Research Foundation, 1997 - 2002.
14. Canadian Honour Roll, MacLean's Magazine 1997

S10-4

Studies in presenilin 1 transgenic mice

田平 武

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部

【略 歴】

生年月日: 1945(昭和20)年7月24日

1970(昭和45)年 九州大学医学部卒、内科研修
(尾前照雄教授)

1971(昭和46)年 神経内科研修(黒岩義五郎教授)

1974(昭和49)年 米国NIH, NINCDS Visiting Fellow
(Henry de F. Webster部長)

1977(昭和52)年 九州大学医学部神経内科助手

1978(昭和53)年 医学博士(九州大学)

1982(昭和57)年 九州大学医学部神経内科講師

1983(昭和58)年 国立精神・神経センター
神経研究所疾病研究第6部部長

【主要な著書・論文・賞】

1. No effect of anti-leprosy drugs in the prevention of Alzheimer's disease and beta-amyloid neurotoxicity. *J Neurol Sci*. 1999 May 1;165(1):28-30.
2. Genome structure and chromosomal mapping of the gene for Fe65L2 interacting with Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 May 10;258(2):385-9.
3. Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med*. 1999 May;5(5):560-4.
4. Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with presenilin 1. *Neuroreport*. 1999 Feb 25;10(3):563-8.
5. A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene. *Neuroreport*. 1999 Feb 25;10(3):497-501.
6. Molecular cloning of human Fe65L2 and its interaction with the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Neurosci Lett*. 1999 Feb 19;261(3):143-6.
7. Effects of presenilin N-terminal fragments on production of amyloid beta peptide and accumulation of endogenous presenilins. *Neurosci Lett*. 1999 Feb 26;262(1):37-40.
8. X11L2, a new member of the X11 protein family, interacts with Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Feb 24;255(3):663-7.

T. Tabira

Division of Demyelinating Disease and Aging, National Institute of Neuroscience, NCNP.

Presenilin 1 (PS1) was found in 1995 by St. George-Hyslop and his colleagues as a causative gene for an early onset familial Alzheimer's disease (FAD). Since the FAD mutations correlate with the elevated $A\beta$ $x-42/A\beta$ $x-40$ ratio in plasma and CSF of the FAD patients as well as in the PS1 / transfect cells and transgenic mice, PS1 is thought to be involved in the amyloid cascade. However, $A\beta$ deposition in senile plaques has not been shown in PS1 transgenic mice. Therefore, we conducted careful quantitative studies on neuron numbers in transgenic mice carrying wild type, H163R, or L286V PS1 with the PDGF promoter¹⁾. Although $A\beta$ deposition in senile plaques was not observed in the PS1 transgenic mice, neuron numbers in the frontal cortex and hippocampus were significantly decreased in aged mutant mice. In these mice, numbers of dark neurons were significantly elevated and some dark neurons showed an apoptotic nature. Notably, $A\beta$ $x-42$ positive neurons were significantly more frequent in aged mutant mice, while not were $A\beta$ $x-40$ positive neurons. We have previously shown that PS1 in tangle formation²⁾. However, the PS1 transgenic mice did not show neurofibrillary tangles. These results indicate that PS1 mutations facilitate neuronal apoptosis possibly via intraneuronal deposition of $A\beta$ 42.

1) Chui DH et al.: Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med* 5(5): 560-564, 1999

2) Chui DH et al.: Both N-terminal and C-terminal fragments of presenilin 1 colocalize with neurofibrillary tangles in neurons and dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 53: 99-106, 1998

S10-5

Lessons from familial Alzheimer's disease

Martin N. Rossor

National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UK

【略 歴】

生年: 1950年

最終学校・卒業年: Kings College Hospital
Medical School, 1974年

学位: 医学博士

最近の研究分野: 家族性Alzheimer病患者脳の画像解析を併用した分子遺伝学的研究

所属機関・職名: National Hospital for
Neurology and Neurosurgery,(国立神経
病院) Clinical Director(臨床主任教授)所属機関所在地: Queen Square, London WC1N
3BG, UK(英国ロンドン市クイーンスク
ウェア)

【主要な著書・論文・賞】

1. Early diagnosis of dementia. *J Neurol* 1999; 246(1): 4-5.
2. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999;353(9148):183-9.
3. Familial dementia lacking specific pathological features presenting with clinical features of corticobasal degeneration. *J Neuropathol* 1998;65(4):600-3.
4. Presymptomatic cognitive deficits in individuals at risk of familial Alzheimer's disease. A longitudinal prospective study. *Brain* 1998;121(Pt9):1631-9.
5. CANDID- Counselling and Diagnosis in Dementia: a national telemedicine service supporting the care of younger patients with dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 1998;13(6):381-8.
6. Clinical trial designs for demonstrating disease-course-altering effects in dementia [In Process Citation]. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1998;12(4):281-94.
7. Report of the European Working Group on Dementia Drug Guidelines Meeting-Brussels, November 1997. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1998;12(4):259-61.
8. Slowing the progression of Alzheimer disease: monitoring progression. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1997;11(5):S6-9.
9. Protocols to demonstrate slowing of Alzheimer disease progression. Position paper from the International Working Group on Harmonization of Dementia Drug Guidelines. The Disease Progression Sub-Group. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1997;3:50-3.
10. Ethical issues in dementia drug development. Position paper from the International Working Group on Harmonization of Dementia Drug Guidelines. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1997;3:26-8.
11. Clinicopathological features of familial Alzheimer's disease associated with the M139V mutation in the presenilin 1 gene. Pedigree but not mutation specific age at onset provides evidence for a further genetic factor. *Brain* 1997;120(Pt3):491-501.
12. Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 1996;5(4):393-7.
13. Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. A longitudinal MRI study. *Brain* 1996;119(Pt 6):2001-7.
14. A multicenter double-blind study of controlled-release physostigmine for the treatment of symptoms secondary to Alzheimer's disease. Physostigmine Study Group. *Neurology* 1996;47(6):1389-95.
15. Amyloid beta protein (Aβ) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease: predominance of Aβ42(43). *Ann Neurol* 1996;40(2):149-56.
16. Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;348(9020):94-7.
17. Apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease. The UK Alzheimer's Disease Genetic consortium [letter]. *Lancet* 1996;347(9017):1775-6.
18. Incomplete penetrance of familial Alzheimer's disease in a pedigree with a novel presenilin-1 gene mutation [letter]. *Lancet* 1996;347(9014):1560.
19. A new variant of prion disease. *Lancet* 1996; 347 (9006): 916-7.
20. Predominant deposition of amyloid-beta 42(43) in plaques in cases of Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage associated with mutations in the amyloid precursor protein gene. *Am J Pathol* 1996;148(4):1257-66.
21. Clinical and neuroimaging features of familial Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996;777:49-56.

S10-6

Presenilin function relating to neuronal death of Alzheimer's disease

武田 雅俊

大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学

【略 歴】

生年月日: 1949(昭和24)年10月20日
 1949(昭和24)年3月 佐賀西高等学校卒業
 1968(昭和43)年4月 東京大学入学
 1972(昭和47)年5月 ダートマス大学
 (米ニューハンプシャー州)卒業
 1979(昭和54)年3月 大阪大学医学部卒業
 1980(昭和55)年3月 大阪大学医系大学院卒業
 医学博士
 1984(昭和59)年10月 大阪大学精神医学教室 助手
 1985(昭和60)年10月 フロリダ大学神経科学部門
 リサーチフェロー
 1986(昭和61)年7月 ベイラー医科大学分子生物学
 部門リサーチアソシエイト(87年8月まで)
 1991(平成3)年7月 大阪大学精神医学教室講師
 1996(平成8)年4月 同教授

【主要な著書・論文・賞】

R.Cacabelos, & M.Takeda 編著

"Annals of Psychiatry-Basic and Clinical Neurosciences-
 Vol.5", Praus, 1995

西村健、志水彰、武田雅俊編著「臨床精神医学」教科書、南山堂、1996

K.Iqbal, B.Winblad, T.Nishimura, M.Takeda,

H.Wisniewski 編著

"Alzheimer's Disease; Biology, Diagnosis and Treatment",
 Wiley, 1997

武田雅俊編 「高齢者の精神障害」精神科ケースライブラリ、中山、1998

1. 痴呆の精神生化学的研究。特にアルツハイマー病の
 病因・病態・診断マーカー・治療法の開発に関
 する研究

2. 認知機能に関する神経科学的研究

生物学的精神医学会、神経精神医学会、神経化学
 会、老年精神医学会、痴呆学会、未病システム学会
 の理事

精神神経学会、老年医学会、精神神経薬理学会の評
 議員

M.Takeda, T.Kudo, Y.Nakano, Y.Nakamura, T. Tanaka
 Psychiatry, Department of Clinical Neuroscience, Osaka
 University, Graduate School of Medicine

Presenilin-1 (PS1) is a newly identified gene on
 chromosome 14, causing familial Alzheimer's disease
 (FAD), and now more than 50 mutations have been
 reported with FAD pedigrees. Biological function of PS1
 has been intensively studied, indicating participation in
 Notch signaling in neuronal differentiation and
 development, neuronal apoptosis, processing of amyloid
 precursor protein (APP), response to ER stress, and
 others.

We have shown that PS1 gene is induced in the earlier
 stage of embryonic rat brain than APP gene. In adult
 brain tissue, PS1 gene expression is highly stimulated
 after neuronal insult, such as ibotenic acid administration
 into rat hippocampus, and transient ischemia by carotid
 artery occlusion in Mongolian gerbil. In gerbil model of
 transient ischemia, PS1 expression is more stimulated in
 CA3 and dentate neurons, rather than CA1 neurons,
 indicating PS1 is induced in neurons more resistant to
 ischemic stress.

Cultured cells transfected with mutated PS1, show
 significantly suppressed expression of GRP78 in response
 to ER stress. It suggests that cells transfected with
 mutated PS1 are more vulnerable to ER stress.
 New mutation of PS1 (I213T) is identified in FAD
 family in Osaka. The mutated PS1 gene is introduced by
 homologous recombination, producing homo- and hetero-
 "knock-in" mouse. Homo knock-in mice with I213T PS1
 are born and grow up without phenotype. Neither
 amyloid deposition, nor cytoskeletal derangement is
 observed in the brain upto 10 months of age, however,
 increased production of amyloid β 42 is observed in the
 brain tissue as well as tissue culture from the knock-in
 animal.

S10-7

A memory systems analysis of Alzheimer's disease

John D. Gabrieli
Stanford University, USA

【略 歴】

Date of birth: 1955年12月01日

1974-1978 B.A., English, Yale University,
New Haven, CT

1982-1987 Ph.D., Behavioral Neuroscience,
Department of Brain and Cognitive
Sciences, Massachusetts Institute of
Technology, Cambridge, MA

1986-1988 Postdoctoral Fellow, Department of
Psychology, Harvard University

1986-1988 Postdoctoral Fellow, Department of
Psychology, Harvard University

1988 Lecturer, Department of Psychology,
Harvard University (Spring)

1988-1991 Assistant Professor, Department of
Psychology, Northwestern University

1991-1998 Assistant Professor, Department of
Psychology and Neurosciences,
Program, Stanford University

1989-present Research Associate, Memory
Disorders Research Center, Boston
VA Medical Center and Boston
University School of Medicine

1990-present Visiting Lecturer, Department of
Neurological Sciences, Rush-Presbyterian-
St. Luke's Hospital and Rush Medical
College

1998-present Associate Professor (with tenure),
Department of Psychology and
Neurosciences Program, and by courtesy,
Department of Radiology, Stanford
University

【主要な著書・論文・賞】

1. Gabrieli, J.D.E., Keane, M.M., Stanger, B.Z., Kjelgaard, M.M., Corkin, S., and Growdon, J.H. (1994) Dissociations among structural-perceptual, lexical-semantic, and event-fact memory systems in Alzheimer, amnesic, and normal subjects. *Cortex*, 30, 75-103.

2. Gabrieli, J.D.E. (1996) Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13534-13540.
3. Gabrieli, J.D.E., Brewer, J.B., Desmond, J.E., and Glover, G.H. (1997) Separate neural bases of two fundamental memory processes in the human medial temporal lobe. *Science*, 276, 264-266.
4. Gabrieli, J.D.E. (1998) Cognitive neuroscience of human memory. *Annual Review of Psychology*, 49, 87-115.
5. Sobel, N., Prabhakaran, V., Desmond, J.E., Glover, G.H., Goode, R.L., Sullivan, E.V., and Gabrieli, J.D.E. (1998) Sniffing and smelling: Separate subsystems in human olfactory cortex. *Nature*, 392, 282-286.
6. Fleischman, D.A. and Gabrieli, J.D.E. (1998) Repetition priming in normal aging and Alzheimer's disease: A review of findings and theories. *Psychology and Aging*, 13, 88-119.
7. Park, S.M., Gabrieli, J.D.E., Reminger, S.L., Monti, L.A., Fleischman, D.A., Wilson, R.S., Tinklenberg, J.R., and Yesavage, J.A. (1998) Preserved priming across study-test picture transformations in patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychology*, 12, 340-352.
8. Brewer, J.B., Zhao, Z., Desmond, J.E., Glover, G.H., and Gabrieli, J.D.E. (1998) Making memories: Brain activity that predicts how well visual experience will be remembered. *Science*, 281, 1185-1187.
9. Wagner, A.D., Poldrack, R.A., Eldridge, L.E., Desmond, J.E., Glover, G.H., and Gabrieli, J.D.E. (1998) Material-specific lateralization of prefrontal activation during episodic encoding and retrieval. *NeuroReport*, 9, 3711-3717.
10. Rypma, B., Prabhakaran, V., Desmond, J.E., Glover, G.H., and Gabrieli, J.D.E. (1999) Load-dependent roles of frontal brain regions in the maintenance of working memory. *Neuroimage*, 9, 216-226.

S10-8

Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β -protein in cell culture

柳澤 勝彦

国立長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部

【略 歴】

生年月日: 1954(昭和29)年6月
 1980(昭和55)年 3月 新潟大学医学部卒業
 1984(昭和59)年 米国国立衛生研究所(NIH) 客員研究員
 1990(平成 2)年 新潟大学脳研究所神経内科助手
 1991(平成 3)年 東京医科歯科大学医学部 神経内科助手
 1994(平成 6)年 東京大学医学部脳研究施設 病理学部門助手
 1995(平成 7)年11月 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 部長

【主要な著書・論文・賞】

1. Implications of presenilin 1 mutations in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 1999 Mar 15;107(3):281-98.
2. Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture. *Mech Ageing Dev.* 1999 Mar 15;107(3):233-43.
3. Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis by amyloid beta-protein and chloroquine in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett.* 1999 May 7;266(2):129-32.
4. Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem.* 1999 Jun;72(6):2278-85.
5. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture. *J Biol Chem.* 1999 May 21;274(21):15110-4.
6. Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed de novo cholesterol synthesis. *J Neurosci Res* 1998 Oct 1; 54(1): 58-67.
7. Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. *J Neurochem* 1998 Oct 71(4): 1535-1543.
8. Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid beta-protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells. *Biochem Biophys Acta.* 1998 Aug 14;1373(1):119-130.

所属学会

日本神経学会評議員、日本神経化学会評議員、
 日本痴呆学会理事、米国神経科学会

Katsuhiko Yanagisawa, M.D.

Department of Dementia Research, National Institute for Longevity Sciences.

Deposition of aggregated amyloid β -protein ($A\beta$), a proteolytic cleavage product of the amyloid precursor protein (APP), is a critical step in the development of Alzheimer's disease (AD). However, we are still far from understanding the molecular mechanisms underlying the initiation of $A\beta$ polymerization in vivo. It has been hypothesized that aggregation of soluble $A\beta$ involves seeded polymerization, although this assumption has not yet been proved in vivo. Here, we report, for the first time, that a seeding $A\beta$, which enhances the fibril formation of soluble $A\beta$, is generated from the apically missorted APP in cultured epithelial cells (Madin-Darby canine kidney cells). Significantly, the generation of this $A\beta$ depends exclusively on the presence of cholesterol in the cells. Taken together with mass spectrometric analysis of this novel $A\beta$ and our recent study, it is suggested that a conformationally altered form of $A\beta$, which acts as a "seed" for amyloid fibril formation, is generated in intracellular cholesterol-rich microdomains.

S10-9

Amyloid burden and neuropathology in PDAPP mice; implications for Alzheimer's disease therapy

Dale B. Schenk

Vice President, Neurobiology, Elan Pharmaceuticals

【略 歴】

Date of Birth: 1957年 3月10日

1984-1987; Scientist, Scios/Nova (formerly California Biotechnology Inc.), Mountain View, California.

1987-1990; Senior Scientist and Project Leader: AD Diagnostic Program, Athena Neurosciences, South San Francisco, California.

1990-1993; Senior Scientist and Director of Immunochemistry, Athena Neurosciences, South San Francisco, California.

1993-1994; Project Leader/Manager: anti- $\alpha 4$ Integrin monoclonal antibody (AN-100226) for treatment of multiple sclerosis.

1994-1998; Director of Neurobiology Responsible for departments of Biochemistry, Immunochemistry, Neurobiology, Cell Biology and Molecular Biology Athena Neurosciences, Inc.

1998-present; Vice President, Neurobiology. Responsible for biological disciplines at Elan Pharmaceuticals (formally Athena Neurosciences, Inc.) Primarily responsible for Alzheimer's disease research. Education: 1979; B.A. cum laude, University of California, San Diego - Biology.

1984; Ph.D. University of California, San Diego Physiology/ Pharmacology, Department of Medicine.

【主要な著書・論文・賞】

1. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999 Jul 8;400(6740):173-7.
2. Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein (A β) dimer in the cortex during aging. *Am J Pathol*. 1999 Jan;154(1):271-9.
3. Comparison of absolute cerebral haemoglobin concentration in neonates measured directly and by the oxygen swing method both based on near infrared spectrophotometry. *Adv Exp Med Biol*. 1998;454:125-9.
4. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta₄₂ levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol*. 1998 Jul;55(7):937-45.

5. Cerebrospinal fluid levels of amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and major depression - inverse correlation with dementia severity. *Eur Neurol*. 1998;39(2):111-8.
6. A β deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci*. 1997 Sep 15;17(18):7053-9.
7. A novel presenilin-1 mutation: increased beta-amyloid and neurofibrillary changes. *Ann Neurol*. 1997 Jun;41(6):809-13.
8. Amyloid precursor protein processing and A β 42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1550-5.
9. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*. 1997 Jan;3(1):67-72.
10. The effect of apolipoprotein E genotype on biochemical markers of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Dec 16;802:92-100.

Fellowships and Academic Honors

Graduated with High Distinction in Biology, cum laude, University of California, San Diego, 1979.
 Recipient of a Regents Fellowship, 1979.
 Recipient of an Earl C. Anthony Dissertation Fellowship, 1983.

S10-10

Targets for drug development in Alzheimer's and Parkinson's diseases

Martin Citron and Jean-Claude Louis

AMEN INC.

Martin Citron

Date of Birth: April 10, 1964

Citizenship: German

【略 歴】

Education:

- 1988 Diploma in Biochemistry, Freie Universität Berlin
- 1990 Ph.D in Biochemistry, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik and Freie Universität, Berlin

Postdoctoral Training:

- 1990-1992 Postdoctoral Fellow (Molecular Biology) Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin (Prof. Dr. H. Schuster)
- 1992-1994 Postdoctoral Fellow (Neurology) Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School (Dr. D. J. Selkoe)

Appointments:

- 1995-1997 Assistant Professor in Neurology Harvard Medical School
- 1997 American Health Assistance foundation grant for work on Presenilins
- since 1997 Research Scientist at AMGEN heading the Alzheimer's disease research program

【主要な著書・論文・賞】

Awards and Honors:

- 1984-1988 supported by Studienstiftung des Deutschen Volkes
- 1991 Otto Hahn Award of the Max-Planck-Society for exceptional Ph.D.thesis

Publications

1. Alpha-Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of parkinson's disease. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19509-19512.
2. Self-help groups for families of persons with mental illness: perceived benefits of helpfulness. *Community Ment Health J.* 1999 Feb;35(1):15-30.
3. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9843-6.
4. The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem.* 1999 Mar 19;274(12):7615-8.
5. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32322-31.
6. Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein. *Neurobiol Dis.* 1998 Aug;5(2):107-16.
7. Amyloid precursor protein processing in sterol regulatory element-binding protein site 2 protease-deficient Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19;273(25):15309-12.
8. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3205-11.
9. A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity. *J Med Chem.* 1998 Jan 1;41(1):6-9.
10. High-resolution recombinational map of mouse chromosome 16. *Genomics.* 1997 Jul 15;43(2):202-8.
11. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5349-54.
12. Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem.* 1997 Mar 21;272(12):7977-82.

S20-1, 7

神経情報信号化分子

ー チャンネル・トランスポーターの生理と病態 ー

佐野 輝¹、小倉 明彦²¹愛媛大学医学部神経精神医学、²大阪大学大学院理学研究科生物科学

脳の機能は、多数のニューロンが織りなす回路の中でやりとりされる情報の伝達と統合によって生み出される。個々のニューロンは（興奮性伝達を担うニューロンであると抑制性伝達であるニューロンであるとを問わず）活動電位を発生して軸索上を伝導させ、軸索末端から伝達物質を放出する。このメカニズムの担い手である分子群を挙げると、膜電位形成に関わるCl⁻チャンネル、活動電位の発生に関わるNa⁺チャンネル、その終結に関わるK⁺チャンネル、伝達物質放出に関わるCa²⁺チャンネルであり、放出された伝達物質を結合して反応する伝達物質受容体であり、伝達を終結しかつ伝達の強度を調節する伝達物質トランスポーターである。これらの分子群が、ニューロンの神経細胞の興奮と伝達という基本的機能に直結している以上、当然予測される通り、これらの機能不全は、脳機能の異常に直結し、運動制御の異常や精神機能の異常をもたらす。

最近の分子生物学・生化学・薬理学・生理学の進歩により、脳機能の異常・疾患が、これらの分子の遺伝的異常あるいは自己免疫疾患として同定される例が急速に増えつつある。病因の分子的なレベルでの解明は、精密な診断を可能にし、治療手段の開発に大きな手がかりを与える。また、臨床からの情報がその分子の個体レベルでの役割の理解にヒントを与える。本シンポジウムでは、このようなチャンネル・受容体・トランスポーター異常と脳・神経疾患との関連解析の最前線を紹介する一方、臨床家からの積極的な討論参加を期待し、基礎・臨床双方にとって実り多いものにした。

S20-2

グルタミン酸トランスポーターおよび受容体：機能異常と病態・創薬

和田 圭司¹、西川 徹²、関口 正幸¹¹国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部、²同第三部

グルタミン酸は代表的な神経伝達物質として脳機能の発現・維持を支える一方、神経細胞死を引き起こす興奮毒性を合わせ持ち、種々の精神・神経疾患ではその発症・進行に関与する有害な因子になると想定されている。グルタミン酸トランスポーターおよび受容体はグルタミン酸が直接作用する機能分子であるため病態に直接関係するだけでなく創薬の対象としても極めて重要な存在として位置づけられている。我々はここ数年、グルタミン酸トランスポーターの生理学的・病態生理学的役割を明らかにし、また新規受容体作用薬を開発する目的で新しい生物学的・薬理的ツールの開発・導入に努めてきた。すなわちトランスポーターにおいては遺伝子欠損マウスの作製を行いグルタミン酸興奮毒性の個体モデルとしての重要性を確立したほか、受容体においてはAMPA受容体に特異的な新規アロステリックモジュレーターとしてPEPAを開発した。さらに我々は、神経伝達物質本来の作用部位には直接作用せずに神経伝達物質-受容体の相互作用を修飾し受容体活性を最大限にまで引き出す物質、つまりコ・アゴニストを用いたグルタミン酸受容体コ・アゴニスト療法の可能性を追求した。その結果、NMDA受容体のコ・アゴニストであるD-セリンの誘導体が運動失調症改善作用を有することを動物で見い出した。本シンポジウムでは最近の知見を含めこれらグルタミン酸トランスポーターおよび受容体に対する我々の取り組みを紹介する。

S20-3

神経伝達物質トランスポーターの機能と病態

斎藤 尚亮、酒井 規雄、白井 康仁、
阪井 一雄、大倉 陸美、上山 健彦
神戸大学バイオシグナル研究センター・分子薬理分野

神経伝達物質トランスポーターはシナプス間隙に遊離された伝達物質を Na^+ 等のイオン依存性に伝達物質を前シナプスに取り込むことにより神経伝達を終了させる膜タンパク質である。近年の分子クローニングによって、伝達物質トランスポーターの構造やサブタイプの存在が明らかにされた。さらに、ノックアウトマウスの研究により、トランスポーター生理機能のみならず、病態における役割も明らかにされてきた。その中でも、抗うつ薬のターゲットとしても知られており、感情障害の発症に深く関与していると考えられているセロトニントランスポーター (SET)、および、神経細胞死に関与するグルタミン酸トランスポーター (EAAT) は、薬物の標的としても注目を集めている。本シンポジウムではSETの遺伝子発現制御機構および機能調節機構に関する研究の結果と感情障害との関連、およびEAATに作用する薬物の臨床的応用の可能性について述べる。つまり、1) SETの取込み能はPKC等のリン酸化酵素によって制御されるが、その制御機構はSETの直接のリン酸化ではなく、細胞骨格蛋白質を介した制御であること、2) SET遺伝子のプロモーター解析によるSETの発現制御機構の解析、3) インターフェロンによるうつ病発症とSET発現調節の関連、4) EAAT機能亢進薬の虚血による神経細胞死予防への応用の可能性について述べる。

S20-4

 Ca^{2+} チャネルと小脳失調症

井本 敬二
岡崎国立共同研究機構生理学研究所、総合研究大学院大学生命科学研究科

Ca^{2+} イオンは重要な細胞内メッセンジャーである。筋・神経系で Ca^{2+} は神経伝達物質の放出や筋収縮に必須の要素として機能し、また Ca^{2+} は遺伝子の転写調節なども含め広く細胞の代謝調節に関わっている。

このように細胞代謝に重要な役割を果たす Ca^{2+} の調節に異常が生じたときに、どのような異常が起こるのかについては、多くの研究がなされてきた。特に Ca^{2+} 濃度の異常な上昇により細胞障害が起こることが示されてきた (Ca^{2+} overload)。

電位依存性 Ca^{2+} チャネルは神経細胞への主要な Ca^{2+} 流入路の一つである。電位依存性 Ca^{2+} チャネルにはいろいろなサブタイプが存在するが、脳の主要なサブタイプであるP/Q型 Ca^{2+} チャネルの遺伝子異常により、小脳変性症を含む神経疾患が起こることが近年明らかとなってきた。

しかし、遺伝子の変異により Ca^{2+} チャネルの性質がいかに変化するのか、その変化と疾病発症とはどのように関係しているのかについては不明であったため、われわれは小脳変性症マウスの小脳より急性単離したプルキンエ細胞の Ca^{2+} チャネルおよび組換えcDNAを用いて発現させた変異 Ca^{2+} チャネルの性質を検討した。プルキンエ細胞での最も著明な変化は電流密度の低下であり、またキネティクスの変化も観察された。これらの変化は組換え Ca^{2+} チャネルでも観察された。この結果はミュータントの性質は変異により直接的に起こされたものであり、 Ca^{2+} 流入の低下が神経細胞障害そして小脳変性症を起こすことを示唆する。

S20-5

Na⁺チャンネル・K⁺チャンネルと知覚障害

横山 茂

金沢大学大学院医学研究科分子情報系独立専攻・細胞遺伝子学講座

神経細胞における活動電位の発生、伝播は、電位依存性Na⁺チャンネルと電位依存性K⁺チャンネルの活動状態によって大きく影響される。1980年代から現在に至るまで、電位依存性Na⁺チャンネル、K⁺チャンネルのサブユニットをコードする遺伝子が多数同定されてきた。イオン通過路を形成する α サブユニットに限っても、その数はNa⁺チャンネルで10種類以上、K⁺チャンネルで30種類以上に及んでいる。これらの遺伝子は、in situハイブリダイゼーション法および免疫組織学的手法によって、個体の発達段階、組織分布の上で特徴的な発現調節を受けていることが明らかにされている。しかしながら、個々の遺伝子産物と実際の生理機能との対応に関しては未だ不明な点が多い。一方、家族性周期性四肢麻痺、遺伝性てんかんなどの原因遺伝子の連鎖解析の結果、Na⁺チャンネル、K⁺チャンネルの遺伝子異常が報告されるようになった。非遺伝性の病態では、神経損傷・再生に伴うチャンネルの発現レベルの変動が明らかにされつつあり、痛み・知覚異常との関連性が示唆されている。これらの点について、我々の研究データも含めてこの分野の現状を概説したい。

S20-6

クロライドチャンネルの機能とその異常による細胞病態

岡田 泰伸

岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・機能協関部門、CREST・科学技術振興事業団

Cl⁻チャンネルは、種々の細胞において膜電位形成とCl⁻輸送に関与する。現在までに遺伝子クローニングされたものに、グリシンレセプターやGABAレセプターなどのリガンド作動性アニオンチャンネルファミリー、上皮や心筋のサイクリックAMP依存性Cl⁻チャンネルであるCFTR、Ca²⁺依存性Cl⁻チャンネルであるCLCAファミリー、及び種々の組織に発現しているCLCファミリーの4種がある。それらの遺伝子異常が神経・筋・上皮性疾患をもたらすことが明らかにされ、Cl⁻チャンネル病として確立している。内外で得られたこれらの知見についてまず紹介する。

CFTRは他のチャンネルに対するレギュレータとして働くなど多機能性を示す。その1つとして、CFTR Cl⁻チャンネル蛋白がATPチャンネルとしての機能も果すという仮説が提出された。私達は、上皮細胞CFTRは細胞膨張時のATP放出を亢進させ、容積調節に重要なシグナルを与えるが、CFTR自身はATPチャンネルとしては働かないことを示した。一方、Cl⁻チャンネルがATP放出チャンネルとして働く事例も実際にあることを、腎密集斑細胞においてはじめて証明した。これらの私達自身の最新データを紹介し、その生理的・病理的意義に触れる。

虚血条件下において脳神経・グリア細胞や心筋細胞は持続性の膨張を示し、細胞死へと至る。最近、この過程に細胞膨張によって活性化される容積感受性Cl⁻チャンネルの機能とその傷害が深く関わっていることが報告されはじめている。このメカニズムについて、私達自身のデータも含めて考察する。最後に、アポトーシスにおけるCl⁻チャンネルの役割についても触れる予定である。

S1 - PL

多彩な老化症状に関連するKlotho遺伝子発見の生物学的意義

鍋島 陽一

京都大学大学院医学研究科腫瘍生物

老化に伴う疾患を克服することは人類の有史以来の願望であり、多くの試みが積み重ねられてきたが、その複雑さから研究は多くの困難を抱えている。しかし、遺伝子研究の進展によってその突破口が開かれようとしている。細胞の分裂寿命やヒト早老症の原因遺伝子の研究、寿命や老化疾患の発症に関する変異動物の分子遺伝学的解析などである。

我々の研究室では挿入突然変異によって早期老化症状を呈するKlothoマウスを樹立した。多彩な老化症状は単一遺伝子の欠損に起因しており、原因遺伝子Klothoを同定した。Klotho遺伝子は約5.2 Kで、N端にシグナル配列、C端に膜貫通ドメイン構造をもつ1014アミノ酸からなる新規の1型膜蛋白質をコードしており、その発現は腎臓で高く、弱い発現が中枢神経系で観察された。RT-PCRにより卵巣、精巣などでも発現が確認されたが、骨、皮膚、胃などの強い変異症状が観察される臓器で、Klotho遺伝子の発現が観察されず、Klotho蛋白の機能を伝える液性因子の存在が示唆された。また、変異マウスはnullに近いhypomorphであることが確認された。マウスcDNAをプローブとしてヒトcDNAライブラリーより相同遺伝子を分離し、その構造を決定したところ、同様の1型膜蛋白質をコードするmRNAとスプライシングの制御により、蛋白中央にストップが入るmRNA、すなわち、分泌型蛋白質をコードするmRNAが同定された。Klotho自身が分泌されて、ターゲット組織、分子に結合し、機能していることが推定されるが、Klothoが β -Glucosidaseに相溶性が高いことから、酵素活性によって不活性分子の活性化に関わる可能性も残されており、その他の可能性を含めて、検討中である。本会ではKlothoの分子機能を中心に老化の分子メカニズムについて討論したい。

S1 - 1

ヒト細胞の老化と不死化

井出 利憲

広島大学医学部総合薬学科

ヒト正常体細胞は分裂可能回数に限界があり、これを有限分裂寿命とよぶ。直鎖状ゲノムDNAの末端にあるテロメアDNAが複製の度に短縮することが基本的な原因である。ただ、活性酸素などによってもテロメア短縮は促進されるから、細胞内で実際に起きるテロメ短縮量は両者の複合である。生殖細胞や発生初期の細胞にはテロメラーゼ活性があつてテロメア短縮を補償するので、テロメア長は維持され、基本的に無限分裂能を保証される（不死化細胞）。再生系組織の幹細胞には弱いテロメラーゼ活性があり、テロメア短縮を遅延させて細胞供給を可能にしているが、テロメアは徐々に短縮し有限分裂寿命である。すなわち、すべての体細胞は有限分裂寿命である。

ヒトでは、年齢とともに体細胞のテロメアが短縮しやがて増殖が悪くなることによって、種々の組織・細胞での再生不全を起こし、老化表現をあらわす。それだけでなく、テロメア短縮とともにサイトカインなどの発現・分泌が変化することは、個々の臓器・組織のみならず、ホルモン、免疫、神経などの調節系の機能にも変化を与えて、老化表現形を促進する。遺伝的早老症患者では、健常者の細胞に比べてテロメアが短かったり、短縮速度が早かったりする。マウスなどではテロメアが長いから、テロメラーゼノックアウト動物でも5世代まで問題なく誕生するが、6世代目になると誕生時からテロメアが短くなっているため、老化表現形が早期から出現し、テロメア短縮が老化を進行させることが判る。ヒトではたまたま短いテロメアをもつため、テロメア短縮が各世代ごとの老化を引き起こしている。

S1-2

ミトコンドリアと老化

紙野 晃人、太田 成男

日本医科大学老人病研究所生化学部門

ミトコンドリアはエネルギー代謝を司る細胞内小器官であり、クエン酸回路にてアセチル-CoAを起点としたATP産生をおこなう。ミトコンドリア遺伝子異常に起因するミトコンドリア脳筋症ではその症候が非分裂細胞が主体である神経及び筋肉に際立つことから、脳の老化にはミトコンドリア機能障害が関与していると考えられる。また、アルツハイマー病にみられる β アミロイド沈着は正常の老化でもみられることから、アルツハイマー病の病理学的変化は脳の老化を反映すると思われる。 α ケトグルタル酸脱水素酵素複合体E2KサブユニットをコードするDLST遺伝子は第14染色体長腕に位置し、プレセニリン1遺伝子とは約1センチモルガンの距離にある。DLST遺伝子のイントロン13-エクソン14の多型はアルツハイマー病と有意な関連を示し、特に早期発症型アルツハイマー病での関連が際立つ。DLSTにはエクソン8よりタンパク合成が開始されたsmall DLSTがあり、そのmRNAは脳血管アミロイド沈着脳では有意に減少していることを明らかにした。また、エクソントラップにてDLSTのスプライシング多型が認められた。ERABは β アミロイドと結合して神経細胞毒性を増強することが報告されているが、ERABはミトコンドリアに局在するL-3-hydroxyacyl-CoAと同一であることが判明している。DLSTでも同様の機序、すなわちこれらの不完全なDLST蛋白が β アミロイドによる神経細胞毒性を軽減していることも考えられる。また、ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)はバリンからのサクシニル-CoA、アセチル-CoA合成に関与しているが、ALDH2の欠損型はアルツハイマー病では有意に高頻度に認められた。したがって、 β アミロイド、ミトコンドリア酵素、アセチル-CoA供給がアルツハイマー病での神経細胞死に関与し、結果としてこれらのファクターが脳の老化にも関与していると考えられる。

S1-3

老化関連遺伝子の多型と疾患

三木 哲郎

愛媛大学医学部老年医学

ヒトゲノム解析計画の進展は早く、2000年春までに90%が判明すると予想されている。さらに、遺伝子多型の研究の流れは、マイクロサテライト多型から、単一塩基多型(single nucleotides polymorphisms = SNPs)に変化しつつある。欧米の製薬企業が創設したThe SNPs Consortiumにおいては、全体で200万個存在すると予想されるSNPsのうち30万個を、今後2年間で同定するという計画がある。SNPsを利用した遺伝子型を決定すると、身長などの個人の表現型の相違から、薬理遺伝学や疾病の感受性などが分類されると予想される。

老化に関連した遺伝子の多型としては、これまで、アンジオテンシン変換酵素(Angiotensin Converting Enzyme = ACE)や、アポリポ蛋白E(Apolipoprotein E)の遺伝子多型が、長寿に関連があると報告されている。

老化関連遺伝子の遺伝子多型を応用した解析は、老年病、長寿者、早老症などを対象とした症例-対照研究(case-control study)である。例えば、遺伝性早老症であるウェルナー症候群の原因遺伝子(WRN)のコドン1367に存在する多型(Cys $\leftrightarrow$ Arg)を用いて心筋梗塞(MI)、アルツハイマー型痴呆(SDAT)、長寿老人、後縦靱帯骨化症(OPLL)、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)などと健常対照人群の間で症例-対照研究を行った。MI群でのみ、ホモ接合性のCysteineを持っている人が、持っていない人に比べリスクがあると判明した。WRN遺伝子産物は、DNAヘリケースドメインを保持していることより、遺伝子の複製、修復などを制御していると考えられる。したがって、WRN遺伝子産物の多型が、蛋白機能に影響を及ぼし、最終的に動脈硬化に関与していると推察された。

S1-4

老化促進モデルマウスSAMP8大脳に見られる代謝異常

黒川 知則、西谷 しのぶ、植木 修

広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学講座

老化促進モデルマウス(SAMP系)は、発育・成熟過程や老化の開始時期は、対照マウス(SAMR系)と同等であるが、老化過程が加速的に進行する。SAMP系の中でSAMP8は、促進老化とともに早い個体では生後2ヶ月齢から学習や記憶などの脳機能の障害を自然発症することが知られている。

我々は、SAMP8大脳の加齢に伴う生理的变化を明らかにするために、大脳皮質から調製した単離脳細胞におけるグルコース代謝($6\text{-}^3\text{H}$ D-glucoseから $^{14}\text{CO}_2$ の産生)の加齢変化をSAMR系と比較した。その結果、若齢期(4-8週齢)に特異的に $^{14}\text{CO}_2$ の産生がSAMP8から調製した脳細胞において上昇することを見出した。しかし同週齢の大脳皮質ホモジネートにおける $^{14}\text{CO}_2$ の産生は、両系統間に相違は認められなかった。また若齢期SAMP8から調製した単離脳細胞への2-デオキシグルコースの取り込みもSAMR系と比較して増加が認められた。更にSAMP8大脳皮質の膜画分におけるグルコース阻害性 ^3H サイトカラシンB結合活性の加齢変化を検討したところ、若齢期特異的に B_{max} 値がSAMR系に比べて増加していた。なお K_d 値には両系統間に相違はなかった。これらの結果から若齢期SAMP8大脳皮質におけるグルコース代謝の亢進には、グルコーストランスポーター量の増加が関わっていることが示唆された。

次に、グルコース代謝の際に消費される酸素の代謝物の生成も、若齢期において両系統間に相違があるかどうかを検討した。そのため両系統の大脳皮質から調製した単離脳細胞にDCFH-DAを添加後、 H_2O_2 の生成量を比較したところ、SAMP8においてその増加が認められた。またこの時期に、カタラーゼ活性の低下とアシルCoA-オキシダーゼ活性の上昇が認められた。一方過酸化脂質やカルボニルタンパク量の加齢変化を両系統の大脳皮質において比較したところ、SAMP8における両酸化物の増加は、グルコース代謝の場合と同様に若齢期特異的に認められた。

以上、SAMP8において脳機能障害が発症する生後2ヶ月齢以前に、大脳皮質においてグルコース代謝や酸素代謝が上昇することが明らかになり、こうした上昇と脳機能障害の発症との関連性が示唆された。

S1-5

D-アミノ酸と神経の老化

富山 貴美、森 啓

大阪市立大学医学部 老年研 脳神経系分野

タンパクのラセミ化およびイソ化は、生理的温度およびpHでひとりでに起こることが知られている。このような構造変化は、代謝的に安定なタンパクでより頻繁にみられ、特にニューロンなどの分裂終了後の細胞で認められる。脳タンパクのD-アミノ酸含有量と神経疾患でみられる病理変化との間には何らかの関連があることが示唆されている。最近の研究により、アルツハイマー病(AD)脳の老人斑より精製されたアミロイド β タンパク($A\beta$)や神経原線維変化(NFT)より精製されたタウタンパクは、いくつかの決まった部位のアミノ酸(通常はL-Asp)がiso-AspやD-Aspに変化していることが明らかとなった。さらに、異常Asp残基の修復酵素と考えられる protein L-isopartyl methyltransferase の発現量はAD脳で増加しており、しかもNFTに陽性となることが示されている。Abとタウは自己凝集して不溶性の繊維を形成し、脳に蓄積することが知られているが、 $A\beta$ のL-Asp残基をiso-AspやD-Aspに変えると、 β シート構造を取りやすくなり、凝集が促進されることがわかった。これらの結果は、ラセミ化・イソ化によって引き起こされた $A\beta$ やタウの構造変化が、これらタンパクの代謝に影響を与え、自己凝集を促進し、生体内での異常な安定性をもたらしている可能性を示唆する。タンパクのラセミ化およびイソ化は、いわゆる「conformational disease」の発症に関係しているのかもしれない。

S2-PL

精神分裂病の神経化学

融 道男¹、西川 徹²¹メンタルクリニックおぎくぼ、²国立精神・神経センター神経研究所

精神分裂病（分裂病）の神経化学的研究は、1)抗精神病薬のD2型ドーパミン（DA）受容体遮断作用やS2型セロトニン（5HT）受容体遮断作用、2)分裂病様の幻覚・妄想状態を引き起こすアンフェタミン類やコカインのDA伝達亢進作用、3)分裂病様の陽性・陰性双方の症状を発現させるフェンサイクリジンやケタミンのNMDA型グルタミン酸受容体遮断作用、等にもとづいて、実験動物および分裂病患者の脳内DA伝達系、グルタミン酸伝達系および5HT伝達系を中心に進められてきた。この他にも、1)GABA受容体、ベンゾジアゼピン受容体、アセチルコリン受容体、シグマ受容体等の神経伝達物質受容体、2)サブスタンスP、オピオイドペプチド、ニューロテンシン、コレシストキニンをはじめとした種々の神経ペプチド伝達系、3)各種のG蛋白、アデニレートシクラーゼ、ホスホリパーゼC等の細胞内情報伝達系、の変化も注目されている。最近では、これらの情報伝達分子だけでなく、神経発達やシナプス・神経回路形成の異常の可能性に着目した、シナプス特異的蛋白、細胞骨格蛋白、細胞接着分子、神経栄養因子についての報告も増えている。さらに、differential cloning法を用いた分裂病関連遺伝子の探索も試みられるようになった。一方、トレーサーの開発が進み、PETまたはSPECTによる脳画像解析法を用い、脳内のD1およびD2型DA受容体、S2型5HT受容体およびベンゾジアゼピン受容体の非侵襲的な検討が行われている。

現時点では、服薬の影響、in vivoにおける測定と脳組織を用いた解析の不一致、研究者間の不一致等、多くの疑問点があり、以上の研究成果から分裂病に特異的分子異常が見いだされるには至っていない。今後、このような神経化学的变化に関与する遺伝子について、分裂病患者における変異の検索や遺伝子操作技術を用いたモデル動物の作出が進み、さらに詳細な組織化学的検討、MRI・MEGによる脳機能障害の検討等とも組み合わせることにより、分裂病の分子メカニズムへのアプローチが可能になることが期待される。

S2-1

メタンフェタミン動物モデル研究から

秋山 一文

岡山大学医学部神経精神医学教室

アンフェタミン(AMPH)、メタンフェタミン(METH)と呼ばれる覚醒アミン（覚醒剤）によるモデルである。わが国では覚醒剤の乱用が多く、長期乱用によって生じてくる精神分裂病様状態の再燃しやすい経過や遷延性病像が注目されてきた。そのモデルとして覚醒剤を実験動物に反復投与したときに出現するいわゆる行動感作（逆耐性現象）がある。多くの研究により、腹側被蓋野、黒質緻密層内のドーパミンニューロンの活動性の増加が逆耐性現象の形成に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、それをもたらす要因としてはドーパミンニューロンの細胞体または樹状突起から放出されるドーパミンと求心性グルタミン酸ニューロン終末から放出されるグルタミン酸との相互作用が重要視されている。一方、逆耐性現象の形成には覚醒剤の薬理作用だけでなく、それが特定の環境下で行動に表現される過程と、その行動を個体が認知する過程が重要であることも指摘されている。また形態学的変化としてはAMPH反復投与によってニューロンの樹状突起上のspineの密度が増加するなどシナプスの構築の変化を示唆する報告もある。このように多面から研究されているが、ここではドーパミン系の機能亢進に引き続いて様々な情報伝達系、神経回路の変化が巻き込まれていくことが逆耐性現象ひいては覚醒剤による脳後遺症の形成につながるという立場から発表を行う。細胞内情報伝達系として我々はカルシウムカルモジュリン系を取り上げた。逆耐性現象形成後のMETHチャレンジによって膜分画のカルモジュリンは中脳辺縁系、海馬、前頭葉皮質で増加した。カルモジュリンは前シナプスでカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼII (CaM kinase II)を活性化して、これが神経伝達物質の放出に関与するとされるシナプシンIをリン酸化することが知られており、AMPH反復投与後ではシナプシンIのリン酸化が増加するという報告もある。しかし我々はMETHの急性及び反復投与が脳内各部位でCaM kinase IIの活性を著明に減少させることを認めた。またMETH急性投与によるCaM kinase II活性減少はドーパミンD1受容体拮抗薬、NMDA受容体拮抗薬の前処置によって阻害されることを認めた。この活性減少が何故起きるのかは明らかではないが、METH急性投与によってCaM kinase IIの自己リン酸化(Thr²⁸⁶)が減少することをWestern blotで認めており、この変化にはドーパミンの過剰放出に伴って産生される過酸化ラジカルとグルタミン酸との相互作用が関与する可能性が推察される。

S2-2

フェンサイクリジン動物モデル研究から

山本 直樹、海野 麻未、平岡 秀一、

土田 英人、西川 徹

国立精神・神経センター神経研究所第三部

精神分裂病（分裂病）症状のうち、幻覚・妄想を中心とする陽性症状は既存の分裂病治療薬（D2型ドーパミン受容体遮断作用をもつ抗精神病薬）によって改善されるが、感情鈍麻、意欲減退、引きこもりなどの陰性症状は抗精神病薬に対して抵抗性であり、多くの患者の社会復帰を拒む主要因となっている。そこで、フェンサイクリジン（PCP）をはじめとするNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬によって、陰性・陽性双方の分裂病様症状群が出現し、抗精神病薬が部分的にしか奏効しない精神病状態が引き起こされることに着目し、PCP投与動物をモデルとして、抗精神病薬抵抗性症状の発現機序と新しい治療法を検討している。PCPが引き起こす異常行動（移所運動量増加、常同行動、運動失調）は、NMDA受容体グリシン調節部位のアゴニストであるD-セリンおよびD-アラニンの脳室内注入によって抑制されることがわかった。この抑制効果は、グリシン調節部位の選択的遮断薬によって拮抗された。一方、PCPは脳内ドーパミン伝達を亢進させるが、この作用は線条体や側坐核に比べて前頭葉皮質ではるかに強かった。前頭葉内または脳室内にNMDAやD-アラニンを注入しておくと、PCPによる前頭葉のドーパミン代謝の増大が減弱した。さらに、D-セリンは従来の定説に反して、哺乳類の脳に恒常的に高い濃度が保持される内在性物質であり、NMDA受容体と類似した分布を示すことが明らかになった。以上の結果から、1) NMDA受容体を介するグルタミン酸伝達の低下が、分裂病の陽性および陰性症状の発現に関与し、2) グリシン調節部位を刺激してNMDA受容体機能を促進する物質や内在性D-セリンの代謝系に作用してD-セリンシグナルを増強する物質は、双方の症状に効果をもつ新しい抗精神病薬の候補になる可能性が示唆された。現在、内在性D-セリンの代謝・機能および分裂病の病態との関連や、PCPが引き起こす抗精神病薬抵抗性症状と関係する遺伝子発現の検討を進めている。

S2-3

死後脳研究から- グルタミン酸作動系を中心として

大沼 徹

順天堂大学精神医学教室

精神分裂病患者（以下分裂病）脳の病態生理として、特に大脳皮質前頭前野においては、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の神経伝達低下が示唆されている。この仮説は、グルタミン酸受容体の拮抗薬であるフェンサイクリジンの投与が分裂病様症状を産出することから始まり、その後のいくつかの死後脳研究でも一貫性はないもののこれを示唆する傾向が認められている。分裂病患者脳の研究結果に一貫性がないことの背景には、この疾患に臨床および薬理学的異種性が強いことや、他の神経変性疾患と比べ変化がより微細である可能性などがあると考えられている。近年我々は、分裂病患者脳の障害を微細な変化として仮定し、それを数種の神経伝達物質マーカーを同時に測定することで検討した。グルタミン酸の神経伝達低下仮説については、シナプス間隙における新たなマーカーとして代謝型グルタミン酸受容体（mGluRs）と興奮性アミノ酸トランスポーター（EAAT）のmRNA発現量を*in-situ* hybridization法を用い定量し、HPLCにて同部位のグルタミン酸そのものの含有量も同時に測定し、分裂病群と正常対照群で比較検討した¹⁾。その結果、個々のマーカーの比較では分裂病群でグルタミン酸神経伝達の低下が生じている可能性、すなわちmGluRs mRNAの代償性増加傾向、EAAT mRNAの代償性減少傾向が認められたが、著しい変化ではなかった。しかしながら、症例ごとに薬理学的に相反するこれらのマーカーの比、すなわちmGluRs/EAAT比として比較したところ、分裂病群で有意に著しく増加していることが明らかとなった。HPLCによる同部位の全グルタミン酸含有量の減少は有意に至らなかったことから、これらの変化は一種類のグルタミン酸伝達マーカーのみの調査では検出されにくいより微細な変化であり、また分裂病前頭前野における「グルタミン酸伝達の低下」はシナプス間隙に局限している可能性が示唆された。なお、我々は抑制系神経伝達物質であるGABAについても、同様の方法論で検討しており²⁾、これらも併せて報告し、考察を加えることとする。

1) Ohnuma T. et al. Mol. Brain Res. 1998, 56, 207-217.

2) Ohnuma T. et al. Neuroscience. 1999, 93, 441-448.

S2-4

精神分裂病のPETから

須原 哲也

科学技術庁放射線医学総合研究所、高度診断機能研究ステーション、CREST

Positron Emission Tomography (PET)はポジトロン核種で標識された化合物を生体に投与し、その生体内分布および動態をコンピュータ断層により経時的に画像化する方法であり、生体脳の機能的情報が得られる。PETで用いるポジトロン核種は半減期の短い ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F などの同位元素であり、これらの核種で特異的なリガンドを標識することによって精神分裂病における脳内神経伝達物質受容体やトランスポーターの測定を行うことができる。

PETによる精神分裂病のドーパミン受容体研究はこれまで線条体のドーパミンD2受容体の研究が中心で、1つのグループを除いて精神分裂病のドーパミンD2は正常対照群との間に有意な差は認められていない。一方大脳皮質ではD1受容体の密度が高く、D1受容体は認知機能における役割も報告されている。我々が行った精神分裂病におけるD1受容体計測では、線条体の結合能には正常対照群との間に有意な差は認められなかったが、前頭前野のドーパミンD1受容体結合が、正常対照群と比較して有意な低値を示した。また症状との相関ではBPRS(brief psychiatric rating scale)の陰性症状評価尺度と負の相関が認められたほか、D1受容体結合の低い患者では有意にWisconsin card sorting testの成績が悪かった。我々は $[^{11}\text{C}]\text{FLB457}$ を用いて大脳皮質領域のD2受容体が約1pmol/mlと極めて低密度であることを明らかにしたが、精神分裂病の皮質領域のD2受容体については予備的結果ながら、海馬及び前部帯状回D2受容体結合と陽性症状に相関が認められている。

S2-5

抗精神病薬の薬理学的研究から

渡辺 雅幸*、萩野 洋子、開地 泰介、野中 良一

東京都精神医学総合研究所精神薬理、

*現所属：昭和大学附属烏山病院

近年、従来の抗精神病薬の奏功しない分裂病陰性症状にも効果があり、錐体外路系副作用の少ない薬剤としてクロザピンに代表される非定型抗精神病薬が注目されている。ハロペリドール等の定型抗精神病薬の作用機序としては脳内ドーパミンD2受容体遮断がその一義的臨床効果と関連していると考えられる。他方、クロザピンについてはセロトニン2A受容体との関連を指摘する説が有力であるが、その優れた臨床効果が何に由来するものかまだ明確にされているとは言い難い。従ってクロザピンの作用機序の究明は分裂病の生化学的病態に迫る新たな道筋である。

そこでクロザピンとハロペリドールの薬理作用の相違を究明すべく、両薬剤のラット前頭前野及び線条体におけるドーパミン放出に及ぼす影響を脳内透析法により比較検討した。ハロペリドール投与(0.1 mg/kg)は線条体のドーパミン放出を約2倍に増加させたが、前頭前野におけるドーパミン放出促進作用は弱かった。クロザピン(10mg/kg)は前頭前野においてドーパミン放出を約8倍と顕著に増加させたが、線条体においてはドーパミン放出に影響を及ぼさなかった。クロザピンの前頭前野におけるドーパミン放出促進作用がこの薬剤の独特な臨床効果と関連していると推測された。

またD2受容体類似のD3ドーパミン受容体は側坐核などの辺縁系に局在し、クロザピンなどの非定型抗精神病薬の作用部位であるとの指摘もある。そこでex vivoオートラジオグラフィーにより、ラット生体に投与された各種抗精神病薬が脳内D3ドーパミン受容体をどの程度占有するかの検討を行った。クロザピンなどの非定型の薬剤は高用量(100mg/kg)でもD3受容体にはほとんど結合せず、したがってクロザピンが直接的にD3受容体に作用しているとは考えにくい結果であった。

S3-PL

オリゴデンドロサイトの発生・分化と生理機能

鹿川 哲史¹、A. Ivanova¹、和田 圭樹¹、
河野 真子¹、岩崎 靖乃¹、大庭 明生¹、
馬場 広子²、池中 一裕¹

¹生理学研究所、²名古屋市立大学第2生理

オリゴデンドロサイト (OL) は中枢神経系のミエリン形成細胞である。OL 前駆細胞は血小板由来成長因子 α 受容体 (PDGFR α) を発現しているが、成熟すると発現なくなることが示されている。われわれはミエリンプロテオリビド (PLP) 遺伝子も OL 系譜の早期から発現していることを見いだしている。しかし、PDGFR α 遺伝子発現細胞 (α R 細胞) と PLP 遺伝子発現細胞 (PLP 細胞) が一致しないことから、これら2種類の細胞がOLの別の系譜の細胞を現しているのか、 α R 細胞がPLP 細胞の前駆細胞であるのか論争的である。われわれは詳細に発達段階のマウス脳における両遺伝子の発現パターンを解析したところ、やはり両遺伝子とともに発現している細胞はほとんどないことを確認できた。しかし、脳の領域によりPLP 細胞が分裂している部位とそうでない部位のあることが明らかとなった。分裂部位ではPLP 細胞は未分化で移動を示すような形態をしており、OLの分化が脳の領域により異なっていることを示している。また、今回の解析より、OLが脳の極めて限られた領域から非常にわずかな数の前駆細胞より発生・分化することも明らかとなった。実際、レトロウイルスによる細胞系譜解析より、一つの前駆細胞から2千個ものOLが産生されることも分かった。

今回の発表ではこのOLの発生・分化は抑制因子により強く制御されていること、神経軸索との接触がOL、神経細胞相互に大きな影響を与えていることも分子レベルで紹介する。

S3-1

オリゴデンドロサイトのアポトーシス

三浦 正幸

大阪大学医学系研究科神経機能解剖

オリゴデンドロサイト (OLG) はNGF/TNF受容体ファミリーの多くを発現している特徴のある細胞である。これらのリガンドであるTNF- α やFasLは多発性硬化症 (MS) 時のメディエーターとして機能することが示唆されている。OLGがDeath Factorにさらされたときに活性化される細胞死の機構を明らかにする目的で、caspaseの関与を検討した。マウスから分離培養したOLGはTNF- α や抗Fas抗体に感受性を示しその細胞死はICE様caspaseの阻害剤YVAD-CHOで効率よく抑えられた。よってこの細胞死にICE pathwayが関与することが示唆された。MSの動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘発したマウスにおいて、caspaseの発現を免疫組織学的に検討した結果、ICEとcaspase-11の高い発現が脊髄の病変部位に集積した浸潤細胞とその周辺のOLGで観察された。また、EAEにおいて脊髄のOLG数の減少と、アポトーシス様の変化を示したOLGの増加が観察された。ICE pathwayの活性化に必要なcaspase-11欠損マウスから得られたOLGはTNF- α や抗Fas抗体による細胞死に抵抗性を示したことから、ICE/caspase-11の pathwayがEAEにおけるOLG細胞死に関与することが示唆された。

S3-2

オリゴデンドログリアにおけるグルタミン酸毒性

吉岡 亮¹、廣瀬 源二郎¹、David Pleasure²¹金沢医科大学神経内科、²Children's Hospital of Philadelphia, USA

我々はBinswanger病などの虚血性脳白質病変の病因の一つとして、低酸素時におけるオリゴデンドログリア（オリゴ）の細胞障害を推察し、ラットのO-2A progenitor cellより株化したCG-4 cellを用いて実験をおこなってきた。1) オリゴにおけるグルタミン酸レセプター(GluR)の発現を、RT-PCR法で検討した。その結果、CG-4 cellはGluR1を除くGluR2-7, KA-1, KA-2のnon-NMDA型GluRの発現が明らかとなった。NMDA型では、NR1, NR2Dの発現が示されたが、Western blottingではNR1蛋白の発現は見出されなかった。2) オリゴ様に分化したCG-4 cellは、グルタミン酸アナログのカイニン酸(2 mM)投与によって24時間後に細胞外液中に放出されたLDH量は増加していた。この細胞障害はnon-NMDA GluR阻害剤の6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)および細胞外液中の Ca^{2+} の除去で抑制された。3) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込み実験で、カイニン酸誘発性の細胞障害は、細胞外 Ca^{2+} の取り込み量と相関していた。4) グルタミン酸、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)投与では細胞障害は誘発されなかった。しかし、AMPA型GluRのdesensitizationを阻害するcyclothiazideによって、AMPAおよびグルタミン酸誘発性細胞障害が誘発され、カイニン酸誘発性細胞障害は増強された。5) 12時間の低酸素および低グルコース状態でオリゴに細胞障害が誘発された。この細胞障害はCNQXおよび細胞外液中の Ca^{2+} の除去で抑制された。以上より、オリゴはnon-NMDA型GluRを介する Ca^{2+} 流入により細胞障害を受け(excitotoxicity)、この障害過程の低酸素+低グルコース状態誘発性細胞死における関与が示唆された。

S3-3

慢性脳低灌流による白質障害

富本 秀和、脇田 英明、松尾 明典、秋口 一郎
京都大学医学部神経内科

ビンスワンガー病は多発ラクナと大脳白質の変性を病理学的特徴とする脳血管性痴呆のサブタイプである。ビンスワンガー病で見られる白質病変は認知機能障害の責任病変となっている可能性が指摘され、病理学的には白質領域でミクログリアの活性化、変性アストログリアの出現、オリゴデンドログリアや白質線維密度の減少を伴う。われわれはWistarラットの両側頸動脈の永久結紮により慢性低灌流状態が誘導され、脳白質病変の実験モデルとして有用であることを報告してきた。ラットの両側頸動脈を結紮すると、前脳の脳血流は50-60%に慢性的に低下する。また髄鞘染色で見た白質の粗鬆化が視神経・視索などの視神経路で結紮3日目から生じ、前交連・脳梁・内包・線条体白質などの白質諸領域では14日目から遅発性に生じる。これに対応して脳梁のオリゴデンドログリア細胞密度は14日以降に減少が見られる。

いっぽう、より高感度な方法で検索すると慢性虚血下の白質線維の変化は早期から観察される。軸索流障害を反映するアミロイド蛋白前駆体(APP)陽性軸索についても、結紮後早期から大脳白質で観察される。また、抗encephalitogenic peptide (EP) 抗体はミエリン塩基性蛋白の68-86アミノ酸配列に対する特異抗体であり、正常の髄鞘とは反応せず髄鞘の病的変化を直接反映する指標とされるが、本抗体を用い慢性低灌流脳を調べた成績では、白質諸領域でEP陽性線維が結紮後早期から認められた。従って、オリゴデンドログリアの慢性虚血に対する応答は、まず髄鞘の変性として現れるものと思われる。

オリゴデンドログリアの減少が生じる機序として、初期に生じる血液脳関門の障害やグリアの反応性変化が関連する可能性がある。白質の各部位でミクログリアの活性化は1日後から、アストログリアの増加は3日後から認められる。特に活性化ミクログリアはフリーラジカル、NO、TNF α などのサイトカインを介して細胞傷害的に作用する場合があることが示されている。いっぽう、TUNEL陽性オリゴデンドログリアが3-7日目をピークに出現し、オリゴデンドログリアの細胞死にアポトーシスが関与する可能性がある。

S3-4

脳虚血におけるオリゴデンドロサイトの動態

北川 一夫、松本 昌泰、柳原 武彦、堀 正二
大阪大学病態情報内科学、神経機能医学

ヒト脳梗塞症例の多くで脳白質にも虚血性病変が及んでいる。しかし脳白質を構成するミエリンや軸索が虚血に対してどのような過程で傷害されるのか、またどのような治療のアプローチが可能なのか不明点が多い。我々は、これまで虚血に対してオリゴデンドロサイトがどのように傷害されるかについて、ミエリン蛋白質の一つであるプロテオリピッド蛋白質(PLP)のmessenger RNAを認識する*in situ* hybridization法を用いることにより検討してきた。本法により、感度良く、特異的に中枢神経系でオリゴデンドロサイトの細胞体を検出することが可能である。マウスおよびラットの中大脳動脈閉塞による局所脳虚血モデルを用いた検討で以下の事が明らかになった。

- ①.オリゴデンドロサイトのシグナル(PLP mRNAは中大脳動脈閉塞後も少なくとも6-12時間は保たれている事、
- ②.神経細胞の脱落や血液脳関門の破綻が、オリゴデンドロサイトのシグナル消失よりはるかに先行する事、
- ③.虚血領域にマクロファージ、活性化ミクログリア、顆粒球の浸潤がみられる12-24時間後頃まで、オリゴデンドロサイトのシグナルもしばしば残存してみられる事、
- ④.虚血領域で残存するオリゴデンドロサイトに断片化DNAが観察される事、
- ⑤.髄鞘蛋白質の免疫組織化学反応は、中大脳動脈閉塞後数日間残存する事、
- ⑥.3-5日後には、梗塞周辺部で反応性アストロサイトや活性化ミクログリアと共にPLP mRNAシグナルを有するオリゴデンドロサイトが集積する事

以上の結果から、脳虚血後のオリゴデンドロサイトの障害は神経細胞に比べてはるかに遅れ、炎症細胞が浸潤する頃に顕著化する事が明らかになった。オリゴデンドロサイトの虚血性障害に一時的な虚血侵襲のみならず、二次的な炎症反応の重要性が示唆された。また脳梗塞周辺部での組織修復反応に他のグリア系細胞と共にオリゴデンドロサイトの関与が示唆された。

S3-5

Binswanger型白質脳症とOligodendrocytes

山之内 博
東京都老人医療センター神経内科

脳血管性痴呆の代表的なひとつであるBinswanger型白質脳症は脳白質の広範な淡明化が特徴であり、これは従来、脱髄とされてきた。しかし、光学顕微鏡的に本症と診断された前頭葉白質の神経線維を電子顕微鏡で観察したところ、一定面積内の神経線維の数はコントロール比で有意に減少し、深部白質では約半数になっていた。白質淡明化は従来云われてきた脱髄ではなく神経線維そのものの減少が主要素と思われる。

何故、どのようなプロセスで神経線維が減るのか。この減少に神経膠細胞(Astrocytes[A], Oligodendrocytes[O])が関与しているのではないかとの仮説の下に、本症の脳白質の[A]と[O]の数を検討した。白質淡明化の部位では、[A]と[O]の合計は明らかに減少していた。線維の残っているU線維では[O]は減少していなかったが、それ以外の淡明化の部位では[O]の数は明らかに減少していた。[O]の減少は単に神経線維の減少に伴う二次的なものではなく、神経線維を減少させる要因として働いている可能性がある。あるいは、神経線維、神経膠細胞を共に減らす共通の要因があるかもしれない。[O]の減るプロセスが今後の検討課題である。

S4 -PL

ショウジョウバエ神経幹細胞の分化と遺伝子

堀田 凱樹
国立遺伝学研究所

われわれが最近発見したショウジョウバエの *gcm* (*glial cells missing*) 遺伝子は、神経幹細胞からニューロンとグリアとが分化させるマスタースイッチ遺伝子で、新規の転写因子をコードしていることが明らかとなった。

ショウジョウバエ胚神経系は各体節の片側に約30個存在する幹細胞 (NB: neuroblast) に由来する。個々のNBはそれぞれ異なった遺伝子群を発現しており、それを指標として識別出来る。われわれはこの性質を利用して、グリア細胞系譜の分化分裂期における *gcm* 遺伝子発現のタイミングを詳細に明らかにしたので、本講演ではNB6・4 とよばれる幹細胞の非対称細胞分裂を例としてその概要を解説したい。

NB6・4 は *eagle* を発現するので、それを指標として細胞の同定を行った。また、NB6・4 は腹部体節 (NB6・4A) では1回分裂して2個のグリアを形成するが、胸部 (NB6・4T) では複数回分裂して3個のグリアと4個のニューロンをつくる。したがって、同一胚の胸部と腹部とを同時に比較観察することによって、生理的に意味のある *gcm* 発現の詳細を明らかにした。その結果、NB6・4では次の事実が証明された。(1) *gcm* mRNA は分裂に先立って転写され、(2) 分裂直前に細胞質内で正中線より局在し、(3) 分裂により正中線の娘細胞(M1)のみに不等分配される。(4) M1内でGCM蛋白が翻訳され、M1は分裂によって3個のグリアのみをつくる。(5) 他方の娘細胞(L1)は通常のNB様の分裂を繰り返してニューロンをつくる。(6) この *gcm* の不等分配はNB6・4A では起こらない。なお、この非対称分裂は *Notch*, *numb* 遺伝子の支配下にあることを示唆する結果が末梢神経系の解析から得られている。

なお、哺乳類にも *gcm* ホモログが2個存在するが、ニューロン・グリア分化との関連は検討中である。

S4-1

脳の神経回路形成における拡散性、非拡散性因子の役割

村上 富士夫、白崎 竜一、勝又 隆太
大阪大学大学院基礎工学研究科 生物工学分野
神経生理学研究室

神経管の腹側正中部にある底板は、その前後軸方向に中脳部付近まで伸びているが、小脳出力線維の底板を通り、対側へと投射する。我々は、ラット胚の神経細胞のコラーゲンゲル培養をおこない、底板が小脳遠心性線維に対して誘引活性を有し、その成長円錐の正中線へのガイドに寄与していることを示した。また底板は中脳、後脳、髄脳、脊髄の全てのレベルの交連性ニューロンに対しても同様な活性を示し、これらのニューロンの腹側正中線へのガイドにも寄与していることを示した。成長円錐は誘引因子の濃度を何らかの機構によって検知し、濃度の高い方に向かって伸びて行くものと考えられるが、上述の成長円錐は底板で留まらずに正中線を越えて対側へと伸びて行く。我々は成長円錐が底板の細胞に遭遇することによりその反応性を変えるのではないかと考えて、培養系を開発した。この培養系では後脳の交差性ニューロン (将来小脳の出力細胞となる) と正中部 (底板) を含む短冊状の標本を用い、それに加えて他の部位から切り出してきた第二の底板移植片を並べておいた。こうする事によって正中線を一度交差した成長円錐が二度目に底板に遭遇したときの反応を調べることが出来る。こうして培養下で正中線を一度交差した成長円錐の挙動を調べたところ、成長円錐は底板移植片を無視して伸長した。また正中部の底板片を切り取った標本を作り、底板に遭遇することなく成長円錐が対側に辿り着くような標本では、成長円錐は底板移植片に向かって伸びていった。このように成長円錐の拡散性誘引因子に対する反応は底板の細胞に遭遇することにより失われることが明らかとなった。底板を通過した軸索はその後直角に曲がって吻側及び尾側に向かって走行を始める。どのような機構でこのような方向転換が起こるのかは神経発生の基本的課題の一つである。我々はこの問題にアプローチする事を可能にする *in vitro* のシステムの開発に成功した。そして交差性ニューロンが縦軸に沿って伸びるためには、やはり底板との相互作用が必要であることが明らかになった。

S4-2

ドレブリンの発現変化と樹状突起スパインの形態変化

白尾 智明、関野 祐子、林 謙介
群馬大学医学部行動分析学

神経系の代表的なアクチン結合蛋白であるドレブリンは発生過程の神経細胞の形態形成における役割が示唆されているが、特に成熟神経細胞では樹状突起スパインに局在することから、スパインの形態制御における役割が注目を浴びている。

ドレブリンはN末端領域にADF・Hドメインを持つが、アクチンへの強い結合を示す領域はADF・HドメインよりもC末端側に存在している。ドレブリンそのものにはアクチンの重合、脱重合、架橋等の活性はないが、トロポミオシンや α -アクチニン、ファッシンなどと競合的にアクチンフィラメントに結合することにより、細胞内で特徴的なアクチンの束を作る。また、ドレブリンはアクチンに結合することにより、アクチンによるミオシンATP分解酵の活性化を阻害する。

以上よりドレブリンはアクチン細胞骨格系の制御因子として働き、神経細胞の形態形成に関与していると考えられた。実際に、GFP融合ドレブリンAを培養後1週間の神経細胞に遺伝子導入により発現させ、培養後3週間目で観察したところ、スパインが長くなっていた。この際スパインの密度には有意差がなかったが、遺伝子導入を行った時期には既にスパイン形成が始まっていると考えられるため、ドレブリンがスパインの形成開始に影響を及ぼすかどうかは不明である。

ドレブリンのスパインへの集積がどのようなメカニズムによって起こるのかは未だ解明されていないが、培養細胞にグルタメートを投与すると10分以内にドレブリンがスパインから消失し、樹状突起に移ることが観察された。またドレブリンのスパインへの集積はアクチンフィラメント依存性であり、スパインのアクチンフィラメントを脱重合させた状態では、 α -アクチニン、CaMKII、GluR1などと同様に、スパインへの集積象は観察されなくなることが報告されている。実際、アクチン結合能を欠いたミュータントドレブリンを培養神経細胞に発現させてみると、このミュータントドレブリンはスパインへ集積しなかった。

S4-3

運動ニューロンの発生の分子的基盤

田辺 康人
大阪バイオサイエンス研究所 第4研究部

運動ニューロンは、今世紀はじめに中枢神経系の最終共通路として位置付けられた中枢神経系の運動系機能発現に最も重要な役割を演じる神経細胞群である。運動ニューロンが選択的に障害される神経変性疾患には、その発症が致死的な筋萎縮性側索硬化症が存在する。運動ニューロンが、初期発生においてどのようにしてその細胞特異性を獲得するのかを理解する事は、なぜ、運動ニューロン選択的に細胞変性・細胞死が引き起こされるのか、その発症機構解明に向かった確固たる基盤を与えると考えられる。

我々は、脊髄初期発生において、その発現が運動ニューロン特異的なホメオボックス遺伝子であるMNR2(Motor Neuron Restricted type2)を単離した。MNR2は、脊髄内の全ての神経細胞領域において、その単独異所性発現により、1) 運動ニューロン特異的な転写因子群の発現、2) 運動ニューロンの神経伝達物質であるアセチルコリンの合成酵素(ChAT)の発現、3) 運動ニューロン特異的な軸索投射、などにより特徴づけられる運動ニューロンの発生・分化のプログラムを開始させる事を示した。これは、MNR2が、運動ニューロン発生に関して十分性を有する事を示し、他の中枢神経細胞の発生も、最終的にこの様な細胞特異性を与える単一の運命決定因子により調節されるメカニズムを示唆する。

MNR2はどのようにして運動ニューロンの発生・分化を調節しているのだろうか。MNR2により誘導される下流の転写因子群は、個々の単独作用では運動ニューロン発生・分化の十分性を示さないが、それらがネットワークを形成し、運動ニューロン分化の個々の小プログラムを進める事が明らかにされた。

本研究は、将来的に、運動ニューロンを特徴づける一つ一つの生化学的性質の発現が、転写因子のネットワークによりどのように調節されているのかを解明し、更には、中枢神経系を構成する個々の神経細胞群が*vivo*から*vitro*へ再構築され、神経変性疾患発症機構の解析のための新たな実験系が確立されうる可能性を示唆するものである。

S4-4

fynノックアウトマウスの情動神経機構の発生と機能解析

湯浅 茂樹¹、八木 健²¹千葉大学医学部解剖学第二、²岡崎国立共同研究機構生理学研究所

fyn tyrosine kinase遺伝子欠損マウス(Yagi T. et al. Nature, 366, 742-5, 1993)は強い恐怖反応、哺乳行動の異常など多彩な情動行動の障害を示す。Fynは中枢神経シナプス活動における細胞内情報伝達にかかわるとともに神経発生にも関わりと考えられており、特定の遺伝子欠損が情動障害を引き起こす神経機構を解析するための良いモデルになると考えられる。このマウスを用いて情動の発現に関わる扁桃体ならびに関連する神経構築の発生と機能を解析した。

マウス扁桃体ニューロンは胎生12~14日にganglionic eminence最内側の神経上皮から発生し放射状グリア突起に沿って移動する。Fyn蛋白は移動神経細胞の先導突起に強く局在し、Fyn欠損マウスでは扁桃体、大脳新皮質、海馬ニューロンが移動障害を示した。

Fyn欠損成体マウスの情動機能について検討するため恐怖条件づけを行なうと恐怖反応が著明に亢進していた。恐怖条件づけ後に脳内に出現するc-Fos免疫陽性ニューロンのマッピングを行なうと、Fyn欠損マウスでは対照マウスに比較して扁桃体、視床下部で陽性ニューロンの数が著明に増加していた。NMDA投与によってもFyn欠損マウスの扁桃体、視床下部でc-Fos免疫陽性ニューロンの著明な増加が認められた。いずれの場合も扁桃体亜核についてみると、視床下部に投射する扁桃体内側核群が増加が著しく、Fyn欠損マウスでは情動表出システムの興奮性亢進が起こっていると考えられる。

一方、haloperidol投与によって対照マウスは錐体外路症状を示すがFyn欠損マウスでは症状が認められなかった。また、線条体のNMDA受容体のチロシンリン酸化がhaloperidol投与によって対照マウスでは著明に亢進するのに対しFyn欠損マウスでは亢進の程度は低かった。

以上の所見より、Fyn欠損マウスの情動障害には扁桃体の興奮性亢進とともにドーパミン作動性システムの障害も加わっており、その基盤には発生障害が関与していると推測される。

S4-5

精神分裂病の発達障害仮説と機能形態学

池田 研二、入谷 修司、黒木 規臣
東京都精神医学総合研究所、都立松沢病院

精神分裂病は多因子疾患であると考えられている。分裂病脳には特異性のある病理所見や変性所見は見出されないが、画像研究や神経病理研究で少なくとも一部には微細な形態学的異常があることが指摘されており、形態学的異常は胎生期の発達障害に基づくと考えられている(発達障害仮説)。異常は側頭葉内側部辺縁系と前頭葉に集中しており、海馬領域では海馬錐体細胞の配列異常、嗅内野第2層のpre- α 細胞の迷入、前頭前野では介在ニューロンの数の減少、NADPH-d陽性細胞の異所性などの細胞構築異常がこの仮説を支える有力な根拠とされている。このような形態学的異常は、胎生期の中枢神経系の分化発達の障害の結果と考えられている。これらの異常の多くは統計学的処理を通してはじめて有意差として検出される性質のものであり、その多くには肯定と否定の両論があり今後数多くの症例数の検討を必要としている段階にある。分裂病脳の神経化学的研究から、その病因としてのドーパミン仮説やグルタミン酸仮説が提唱され、また多くの神経伝達物質および受容体の異常が報告されている。これら神経伝達物質の異常は薬理学的研究などにより検証されつつある。分子レベルの研究では神経伝達物質自身が、本来の情報機能だけでなく神経の発達や分化、細胞構築、シナプスの可塑性にも関与していることが明らかにされつつある。これらを統合的に解釈可能なものとして、神経栄養因子の異常が注目されている。神経栄養因子は、神経細胞の発生、分化、発達、遊走、生存を助けるタンパクの総称であり、多くの因子が知られており、その機能低下により分裂病脳の異常を理解することができる。即ち、これらの因子の不全で神経細胞のアポトーシスがプログラムされたように起こらず神経細胞の減少や増加、NADPH-d陽性細胞の残存などが起こったり、遊走異常が細胞構築や配列異常を起こすと解釈できる。また、これらの因子はシナプスの可塑性や伝達の修飾に関与しており、分裂病の神経伝達の異常を説明できる可能性がある。さらに、神経伝達物質との関係については、これら因子の一つであるBDNF(Brain-derived neurotrophic factor)が、GABA作動性ニューロンを刺激してニューロペプチドYやソマトスタチンといった神経ペプチドを発現させることが培養神経細胞で実験的に確認され、分裂病脳でもこれらの神経ペプチドの含有、発現異常が報告され、神経発達仮説は分子レベルで検証されつつある。

S5-PL

ポリグルタミン病における神経細胞死のメカニズム

垣塚 彰

大阪バイオサイエンス研究所・第4研究部

遺伝性神経変性疾患は、疾患ごとに特有の障害部位とその結果として特有の症状（痴呆・運動失調・異常運動・筋力低下等）を示し、多くの疾患に当てはまる統一的な発症機構に関わる概念を導き出すことはできないと考えられてきた。しかし、いろいろな疾患を注意深く観察するといくつかの共通点が存在することに気が付く。例えば、1) 発症が中年以降に起こり進行性であること、2) 障害部位は異なるにせよ病理像として共通に神経細胞の変性と脱落（細胞死）を示すこと、3) そして優性遺伝形式をとる疾患が極めて多いことを挙げることができる。さらにいくつかの疾患では、この3つの特徴に加えて、世代を経るごとに症状が重篤になりしかも発症年齢が早くなることが観察され「表現促進現象」と呼ばれていた（しかし、この現象の存在自体を疑問視する学者も多かった）。このような共通性から遺伝性神経変性疾患には共通する分子機構が存在する可以考虑することができる。実際、近年になって多くの遺伝性神経変性疾患の原因となる遺伝子変異が明らかになり、その原因遺伝子の変異とその変異が作り出す異常蛋白質の発現動態について眺めてみると驚くべき類似性に気が付く。いずれの疾患においても、異常な蛋白質が細胞内で重合・蓄積することによって神経細胞が変性に陥り脳から脱落していくと考えることができること、そして、そのような病態が優性遺伝病としての表現型をとることである。

本講演では、これまで我々が行ってきた遺伝性神経変性疾患の発症メカニズム、すなわちハンチントン舞蹈病・Machado-Joseph 病等の原因となる伸長したCAGリピートが作り出すグルタミンリピートによって引き起こされる神経細胞の死・変性の分子解析を紹介し、これらの変異が生み出す生化学的実体（細胞死のシグナル伝達）について議論する。さらに、伸長したグルタミンリピートを複眼に特異的に発現させたトランスジェニック・フライの解析から得られた知見を紹介し、合わせて、神経変性疾患を総括的に治療する戦略を考察する。

S5-1

DRPLAにおける神経細胞死

下畑 享良¹、山田 光則²、五十嵐 修一¹、小野寺 理¹、小出 怜爾¹、佐藤 晶¹、佐藤 駿哉¹、野崎 兼吉¹、高橋 均²、辻 省次¹¹新潟大学脳研究所神経内科、²同病理学教室

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）は小脳歯状核遠心系と淡蒼球遠心系の病変を合併する常染色体優性遺伝性の神経変性疾患である。1970年代に本邦で発見され、その後1994年に原因遺伝子におけるCAGリピートの増大が同定されて以来、分子遺伝学的研究、病態機序の研究が飛躍的に進展している。一方、現在までにDRPLAを含む8つの遺伝性神経変性疾患がポリグルタミン鎖をコードするCAGリピートの増大により発症することが明らかにされ、増大ポリグルタミン鎖自体がgain of function機構を介して細胞死に関与する可能性が指摘されている。近年、患者剖検脳の神経細胞において核内凝集体の存在が証明されたが、核内凝集体形成は細胞障害の誘因として必ずしも必要ではなく、増大ポリグルタミン鎖の核移行が細胞障害機構に不可欠であるとする知見も報告され、ポリグルタミン病の細胞障害機構における核内環境の意義が注目されている。

我々はポリグルタミン病における細胞障害の機序を明らかにする目的で、全長のDRPLA cDNAの様々な欠失変異体を作製し、発現ベクターに組み込んだ後、培養細胞に発現させ、全長の変異蛋白質がプロセシングを受け短くなると凝集体を形成すること、ならびに細胞障害が誘発されることを明らかにした。本講演では、ポリグルタミン鎖が細胞障害を引き起こすメカニズム、ならびにポリグルタミン病の発症機序について最近の研究成果を紹介したい。

S5-2

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の責任遺伝子の機能と、培養細胞モデル実験系での細胞死の機構

山田 正夫

国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) は遺伝性神経変性疾患の 1 つで、運動失調と錐体外路系の症状の両者を伴う特徴があるが、表現促進現象により様々な病態を示す。我々のグループおよび新潟大学辻教授のグループは、それぞれ独立に、DRPLA が CAG リピート伸長に起因することを 1994 年に報告した。現在までに、DRPLA を含む 8 種類の神経変性疾患で CAG リピート伸長が原因となることが見出されている。これらの責任遺伝子で CAG リピートは翻訳領域に位置し、グルタミンをコードする。培養細胞で伸長 CAG リピートを強発現すると、凝集体を形成し、さらにアポトーシスを誘導すること、モデル動物や患者脳組織で核内封入体が見られることから、伸長ポリグルタミンによる凝集体形成が神経細胞死の分子機構と考えられている。一方、責任遺伝子は一般にどの組織でも発現するが、疾患毎に特定の神経集団や特定の部位で神経細胞が死に至るために、異なる病態を呈する。この組織特異性の機構は良くわかっていない。我々の研究室では、培養細胞実験系で凝集体形成とアポトーシス機構について解析し、カスパーゼ 8 が最初に活性化されることなどを見出し、神経細胞死の機構解明に貢献してきた。また、DRPLA 遺伝子に、核移行シグナル、カスパーゼ 3 による切断部位、SH3 ドメインとの結合部位、RE モチーフなどを見出し、それぞれ機能との関係で明らかにしてきた。DRPLA 蛋白質は細胞質と核を行き来するシャトル蛋白質で、インスリン/IGF-1 ないし Wnt シグナルの伝達機構に関係していると推定している。本シンポジウムでは、神経細胞死の機構および DRPLA の機能について、我々の研究室における結果を中心に紹介し、さらには最新の結果も紹介したい。

S5-3

ハンチントン舞蹈病の動物モデル

石黒 啓司

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

ハンチントン舞蹈病(HD)は常染色体優性遺伝形質をとる神経変成疾患である。病理学的には線条体の小型神経細胞の変性と脱落を特徴とし、症状進行と共に淡蒼球、ルイ体、大脳皮質にも神経細胞脱落が広がるとされている。神経細胞の脱落は、同時にグリオーシスを進行させる。本疾患はCAGリピート病の一つであり、疾患責任遺伝子IT-15 (Hd)のexon 1 に存在するCAGリピートの異常伸長がHD発症の原因と考えられている。CAGはグルタミン(Q)に翻訳されるため、HD患者では異常伸長したポリQが確認される。本研究はCAGリピート病の発症機序を解明する目的で、ヒトHd患者から82CAGリピートを持つエクソン1を単離し、マウス(Hdh)のエクソン1と入れ替えることでHDモデルマウスを作製した。

ES細胞作製段階でCAGは77に短くなっていたが、作製されたマウスは77CAGリピート保持していた。ヘテロ変異マウスはCAGの長さに相当する長いポリQを持つ変異型アリアルと野性型から産生される2種類の蛋白質を全身で産生していた。また、ホモ変異マウスは長いポリグルタミンを持つhtt蛋白質のみ発現していた。これらの結果、我々が作製したHDモデルマウスは遺伝子構造と蛋白質発現パターンがHD患者と極めて類似していると確認された。Genescan法を用いたCAGリピートの不安定性を検討したところ、生後9週齢、20週齢マウスではCAGリピートのパターンに大きな変化は観察されなかった。しかし、60週齢マウスでは、小脳を除いた脳組織全体(線条体、大脳皮質、海馬、中脳、視床、視床下部、橋/延髄)で強いCAGリピートのモザイク化が加齢と共に進行していた。このモザイク化は75週齢マウスにおいて60週齢マウスとほとんど変化がなかったことからCAGリピートのモザイク化は60週齢前後で進行が停止したと考えられた。これに比して、小脳と末梢組織(肝臓、肺、心臓、尾等)ではモザイク化は観察されなかった。以上の結果から、小脳を除いた脳組織特異的にCAGリピートの伸長化が細胞レベルで起こっていると考えられた。ヒトではCAGリピートの伸長が精子形成時に生じることが解っているが、HDモデルマウスの精巣のモザイク化は認められなかった。

免疫組織化学による解析の結果、ヘテロ変異マウスの線条体および中脳の一部にGFAP陽性細胞の増加が確認されており、本大会ではこれらの結果もあわせて報告する予定である。

S5-4

SCA6発症に及ぼすポリグルタミンの作用

松山 善次郎¹、若森 実¹、森 泰生¹、井本 敬二¹、川上 秀史²、中村 重信²¹生理学研究所 液性情報部門、²広島大学医学部内科学第三

spinocerebellar ataxia 6 (SCA6)は、常染色体性優性遺伝形式をとる脊髄小脳変性症で、電位依存性カルシウムチャンネル α 1A subunitのC末端に存在するCAG repeatの伸長が原因であることが明らかにされた。SCA6は、他のglutamine-repeat diseasesと比較し、発病年齢とrepeat数が反比例することや世代間でのCAG repeatの伸長など共通の特徴が認められる一方、病的範囲のCAG repeat数が短く原因遺伝子の機能が分かっていることや病変が小脳皮質に局限しているなどの相違が認められる。

α 2, β 1 subunitを安定発現させたBHK6細胞にCAG repeatの伸長を導入した電位依存性カルシウムチャンネル α 1A subunitを一過性発現させ、ポリグルタミン長のチャンネル特性に及ぼす影響を電流を指標として解析した。repeat数24以下では、対照と比し特性に差が認められなかったが、repeat数30および40において不活性化曲線が8mV過分極側にシフトしていた。このことは、ポリグルタミンの伸長は、細胞へ流入するカルシウムイオンの減少を通じて細胞死を引き起こす可能性を示唆した。

S5-5

チャンネルにおけるポリグルタミンの分子生物学

田邊 勉

東京医科歯科大学大学院認知行動医学系高次機能薬理学

脊髄小脳変性症は主に小脳系に変性をきたす一群の変性疾患の総称であり、大きく遺伝性と弧発性に分類されている。本疾患は根本的治療法のない神経難病であり、早急な治療法の開発が望まれる疾患の一つである。脊髄小脳失調症6型 (SCA6) は中枢シナプス伝達機構において中心的役割を果たしているP/Q型Caチャンネル遺伝子のCAGリピートの異常伸長が原因の遺伝子疾患である。SCA6はこれまで原因遺伝子が明らかにされてきたいくつかの脊髄小脳変性症の中でも唯一機能のわかっている分子を原因遺伝子としており、本疾患の発症機序の解明と治療法の開発は他の脊髄小脳変性症および小脳失調を主症状とする多くの難治疾患においても役立つことが期待される。

本講演においてはSCA6の病態とP型Caチャンネル遺伝子変異との関係を明らかにすることを目的に行った我々のこれまでの研究成果について報告する。

S6 -PL

HAM研究の最近の進展

納 光弘

鹿児島大学医学部内科学第三

HAMの病態を考える上で特に重要なことが末梢血中のHTLV-Iプロウイルス量の増加であることは、これまでも多くの研究者により指摘されてきた。最近私共は多検体のHTLV-Iプロウイルス量を高精度に自動的に測定する方法を確立し、この方法を利用して、HAM発症者、未発症家族、HTLV-I感染者未発症者（キャリア）のprovirus量を多数検体において定量し、ウイルス動態の解析を行い、極めて重要な結果を得ることができた。現在までにHAM202例、家族43例、キャリア200例のprovirus量を定量した。平均HTLV-I provirus量はHAM7.78%、家族5.24%、キャリア1.08%であり、HAM及びその家族で明らかにprovirus量が増加しており、provirus量増加の背景には何らかの遺伝要因があることが示唆された。また、HAM発症者ではHLA-A2を持つ患者の頻度が有意に低く、HTLV-Iプロウイルス量はHLA-A2を持つHAM患者及びHTLV-Iキャリアでより低下していることが判明した。さらに疫学的解析からHLA-A2保持者からのHAM発症は、このタイプを持たないものより25%低いことが判明した。これらのことより、HLA-A2がHAM発症抑制に繋がっているものと結論した。

S6-1

多発性硬化症の免疫病態の解析

山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

多発性硬化症(MS)の発症に自己免疫性T細胞の関与することが現在確実視されている。これまでミエリンの主要構成蛋白であるミエリン塩基性蛋白(MBP)やプロテオリピッド蛋白(PLP)に対する免疫応答の解析が特に進んでおり、限界希釈法 (limiting dilution assay; LDA) による抗原特異的クローン頻度の解析、T細胞抗原受容体 (TCR) のシーケンス配列決定、などによりMBPやPLP特異的T細胞の病態への関与が示唆されている。しかし、LDAでは増殖しているT細胞クローンが過小評価される点に問題があり、従来のTCR解析法はサンプル処理能に問題があった。我々は近年single strand conformation polymorphism (SSCP)法を用いて、患者末梢血の活性化T細胞 (CD25陽性T細胞) のT細胞レパトアを解析し、MSの免疫病態に関する新たな手がかりを得ている。本法はサンプル中に含まれる優勢クローンのTCRを個別にバンドとして描出する優れた方法であり、in vitroでの細胞培養によるバイアスが入らないこと、特定のT細胞クローンの相対的な重要度が判定されること、などの長所がある。MSと健常人 (HS) の末梢血を本法で検討したところ、HSでは100種類以上のバンドが見られたのに対し、MSでは一部の症例において著しいバンド数の減少が観察された。さらに同一患者の末梢血から樹立されたMBPやPLP特異的T細胞クローンを平行して解析したところ、MS患者の活性化T細胞分画で増殖しているクローンの中に、MBPまたはPLP特異的なクローンの存在していることが証明できた。一種類のPLP95-116特異的クローンは、ある患者において1年間以上にわたって明瞭に描出された。さらに患者増悪期に採取した髄液においても同クローンの存在が証明された。このようにして、MSでは持続的に増殖し、活性化状態にある自己免疫性T細胞の存在することが確実になった。このようなクローンは病態に積極的に関与する可能性があり、TCRワクチンなどの特異的な治療法の標的となりうる。SSCP法は自己免疫病に対する遺伝子医療 (TCR特異的治療) を支援する基礎技術として有用である。

S6-2

HAM/TSP: ウイルス感染細胞と中枢神経内免疫担当細胞の相互作用の観点から

松井 真

国療宇多野病院神経内科

HAM/TSPは、retrovirusであるHTLV-Iによる感染に起因する慢性進行性のミエロパチーである。しかし、HAM/TSP患者が、大部分を占める無症候性キャリアーとはかけ離れた病的状態にあるのか、それとも連続的な病態の延長線上にあるのかは不明である。今日、HTLV-Iウイルス量の増加が不可欠の要因であること、また同ウイルスに対する免疫応答の相違が発症に深く関与していることは疑いのないところである。

HAM/TSPの病態生理を考える上で重要な点は、1) HTLV-Iが中枢神経内に存在すること（免疫系細胞内に限局するという報告と神経系細胞も含めた両者に存在するという報告がある）、2) 発症初期にはHTLV-Iに感染したCD4陽性ヘルパーT細胞の関与が重要であるが、次第にCD8陽性の細胞傷害性T細胞（CTL）浸潤が優位になること（CTLはHTLV-I感染防御的とする意見と神経組織傷害的に作用しているとする意見がある）、3) 中枢神経内におけるB細胞の活性化およびproinflammatory cytokineの上昇とは対照的に、全身的にはツベルクリン反応陰性などの細胞性免疫の低下が存在することなどである（副腎皮質ホルモン療法を積極的に行うとする意見や消極的な意見など、確立された治療法は現在存在しない）。

そこで、HTLV-I感染に合併した中枢神経以外の組織における病態について文献的検討を加えたところ、ブドウ膜炎・関節炎・多発性筋炎・肺炎・原発性胆汁性肝硬変などの病変局所に存在する細胞は少なからずHTLV-Iに感染しており、CD8陽性リンパ球優位であるとする報告が多いことが判明した。したがって、HTLV-I関連疾患群におけるCTLは、病初期にはウイルス感染を限局させる防御的役割を担っていると推定されるものの、疾病として発症した段階では、組織局所における細胞との相互作用により、炎症惹起性サイトカインの過剰状態などを現出し、むしろ組織障害を進行させている可能性がある。このことから、HAM/TSP患者の治療は、HTLV-I特異的CTL活性やサイトカイン・ケモカイン値のモニタリング等により抗HTLV-I免疫の状態を正確に把握し、適切な時期に抗ウイルス療法と免疫修飾療法を使い分けるか、両者を併用することが重要であると考えられた。

S6-3

視神経脊髄型多発性硬化症の臨床的・免疫学的特徴と戦後50年間における病像の変化

吉良 潤一

九州大学医学部神経内科

我々は日本人の多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) を視神経と脊髄に主病変が限られるアジア型 (視神経脊髄型) MSとそれ以外の中枢神経系に多発性に病変を有する西洋型 (通常型) MSとに大別し、その臨床的・免疫学的特徴について検討を行った。視神経脊髄型MSは西洋型MSに比べ、有意に高齢発症でEDSSが高く、髄液中の細胞数と蛋白量が増加していた。また、MRI 検査では西洋型に比べ、有意に大脳病変が少ない一方で、脊髄萎縮とガドリニウムによる視神経の増強効果は高頻度に見られた。さらに、西洋型MSが HLA-DRB1*1501アリルに相関する一方、視神経脊髄型MSではHLA-DPB1*0501アリルの頻度が健常対照に比し有意に高率であった。視神経脊髄型MSは末梢血CD4陽性T細胞中のIFN γ /IL-4 比が健常対照より有意に高値で、かつCD4⁺CD45RA⁺CCR5⁺細胞、CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁺細胞が有意に増加しており、著明なTh1シフトを示した。以上より、視神経脊髄型MSと西洋型MSは臨床的・免疫学的・遺伝学的に異なる独立した疾患であることが示唆された。次に、戦後50年間での日本人MSの病像の変化をみるために、九州大学神経内科にて精査されたMS患者143人について retrospective に検討を行った。視神経脊髄型と西洋型の比をみた場合、1920年代生まれでは西洋型が著しく少なかったが、1960年以降に生まれたものでは、急速に西洋型が増加した。また初発年齢および性差において視神経脊髄型は高齢化し、かつ女性の割合が多くなっていた。以上より、食住環境の欧米化により、日本におけるMSの病像については西洋型の比率が多くなった可能性があると思われる。

S6-4

自己免疫性ニューロパチーと抗糖脂質抗体

楠 進

東京大学医学部神経内科

ギラン・バレー症候群(GBS)、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、IgM paraproteinemiaを伴うニューロパチーなどの自己免疫性ニューロパチーの患者血中には、抗糖脂質抗体がしばしばみられる。なかでもGD1bのジシアロシル基を認識する抗体は、感覚障害性失調性ニューロパチー(sensory ataxic neuropathy, SAN)に特異的にみられ、標的抗原(GD1b)は大径一次感覚ニューロンに局在し、ウサギにGD1bを免疫するとSANの発症がみられることなどから、SANの発症に直接関わると考えられる。抗GQ1b IgG抗体は、眼球運動麻痺・失調・腱反射消失を三徴とするフィッシャー症候群に特異的かつ90%を越える高率にみられる。眼球運動麻痺のみで失調のない不全型フィッシャー症候群でも陽性であること、眼球運動を司る脳神経の傍絞輪部ミエリンにGQ1bが局在することなどから、同抗体は眼球運動麻痺の発症因子と考えられてきた。一方同抗体と失調との関連はまだ十分検討されていなかった。そこで抗GQ1b IgG抗体陽性で重篤な四肢麻痺のない149例について、眼筋麻痺と失調の有無を調べたところ、120例では眼筋麻痺と失調の両者がみられ、24例では失調のみならず眼筋麻痺のみ、5例では眼筋麻痺がなく失調のみがみられた。抗GQ1b IgG抗体陽性例に、きわめて少数だが失調のみを呈するものがあることは、同抗体がフィッシャー症候群の失調の病態にも関連することを示唆する。抗GQ1bモノクローナル抗体により免疫染色される一部の一次感覚ニューロンに、抗GQ1b IgG抗体が結合して失調をきたす可能性が考えられる。またGalNAc-GD1aを認識するIgG抗体はpure motor GBSに関連し、IgM抗体は脳神経麻痺(特に顔面神経麻痺)を伴うことが多い。抗糖脂質抗体は、その反応特異性により、臨床病型を規定する因子であると考えられる。

S6-5

多発性硬化症における血管内皮の活性化／傷害

郡山 達男、池田 順子、越智 一秀、中村 重信
広島大学医学部第三内科

多発性硬化症(MS)の病変形成において、血液脳関門の重要性はよく知られている。この血液脳関門の本態は血管内皮細胞である。そこで、多発性硬化症の病因・病態における血管内皮の活性化／傷害の関与を解析する目的で、多発性硬化症患者の血液中において血管内皮因子と白血球／血管内皮接着分子の動態を検討した。対象は寛解・増悪型の多発性硬化症(MS)患者26例を用い、対照として健常者18名を用いた。血管内皮因子として、血漿フォン・ウィレブランド因子活性(vWF)と血清可溶性トロンボモジュリン(sTM)を、接着分子として、血清可溶性intercellular adhesion molecule-1(sICAM-1)と血清可溶性vascular cell adhesion molecule-1(sVCAM-1)を測定した。その結果、活動期のMS患者群では、対照群と比較して、血管内皮因子のvWFと接着分子のsVCAM-1が有意に上昇していた。また、MS患者群では、活動期は非活動期に比較して、vWFとVCAM-1が有意に上昇していた。このことから、MSでは、vWFはsVCAM-1とともに疾患活動性の有用な指標になり得ることを明らかにした。MS患者群では、免疫抑制療法により、総合障害度(EDSS)の有意の改善に伴って、vWFとsTMならびにsICAM-1とsVCAM-1が有意に減少することを示した。これらの結果から、MSでは個々の症例の治療効果の指標として血管内皮因子のvWFとsTMならびに接着分子のsICAM-1とsVCAM-1とが有用であることを示した。MS患者群では、vWFとVCAM-1とが有意に相関した。また、VCAM-1はICAM-1とも有意に相関した。vWFは主として血管内皮細胞で産生され、血漿vWFは血管内皮細胞の活性化や傷害で上昇する。TMも血管内皮細胞で産生され、血管内皮細胞の傷害で血中濃度が上昇する。一方、ICAM-1とVCAM-1は血管内皮／白血球接着分子であり、活性化された血管内皮細胞に発現し、多発性硬化症の病変形成に深く関与するとされている。以上の結果から、MSにおいては血管内皮因子のvWFは接着分子のVCAM-1と相関して変動することから、vWFはVCAM-1と同様な機序で血管内皮の活性化／傷害に基づく血液脳関門の障害を反映すると考えられる。

S7-PL

パーキン遺伝子の構造と機能

清水 信義

慶應義塾大学医学部分子生物学

パーキンソン病 (PD) は振戦・筋強剛・動作緩慢・姿勢反射障害などを特徴とする神経変性疾患である。孤発性PDとともに20歳代から発症する遺伝性の若年性PDも知られており、そのうち常染色体性劣性若年性パーキンソンニズム (Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism: AR-JP) は顕著なL-DOPA反応・日内変動・午睡による症状の改善・ジストニアの出現・腱反射の亢進などの臨床症状を示し、病理学的には黒質・青斑核等の選択的細胞死・レビー小体形成の欠如などの特徴が知られている。

AR-JPは順天堂大(水野ら)のリンケージ解析によって6番染色体のバンドq25.2-q27にマップされていたが、我々は共同で遺伝子探索を行い、その原因遺伝子のクローニングに昨年成功しParkin(パーキン)と名付けた(Nature 392: 605-608, 1998)。パーキン遺伝子から産生される蛋白質は分子量約5万で、N末にユビキチン様のドメイン、C末にはRINGフィンガーモチーフをもち、全体としてCysに富んでいる。また、パーキン蛋白質にはカゼインキナーゼIIなどの磷酸化サイトが数カ所存在する。パーキン遺伝子は12個のエキソンから成るが、イントロンが大きく全体として1Mbを越える巨大遺伝子である。患者血液のDNA診断の結果さまざまな変異が同定された。それらの多くは大きな欠失変異であり、また1塩基置換によるミスセンス変異やナンセンス変異、Compound Heterozygosity型の変異も同定され、現在、AR-JP患者の70%以上でいずれかの変異が見出されている。

パーキン遺伝子の発現は脳だけでなく多くの組織に及んでいる。免疫組織化学的な解析の結果、いわゆるPD患者の脳ではパーキン蛋白質がしばしばレビー小体にユビキチンとともに蓄積されているが、AR-JP患者では見られなかった。さらに、前頭葉皮質の細胞分画による解析では、パーキン蛋白質は核にはなく主に細胞質とゴルジ体に局在していた。また、メラニン含有ニューロンの神経突起にもその局在を認めた。これらの知見はパーキン蛋白質がvesicular transportのキャリア蛋白である可能性を強く示唆している。

このように遺伝性パーキンソン病AR-JPの原因遺伝子が特定されたことによって、黒質の神経細胞が変性消失する仕組みを分子生物学的に解明する糸口が得られた。神経細胞死を防ぐ薬剤の開発、さらには遺伝子治療法の確立に発展することが期待される。

S7-1

家族性パーキンソン病

松峯 宏人

順天堂大学脳神経内科

家族性パーキンソン病(PD)の遺伝子が最近次々と同定されはじめた(Park1,2,3)。そのうちPark1は特に重要である。Park1家系においては、 α -synucleinの変異(A53T, A39P)が発症とco-segregateしており、この蛋白の異常が、Lewy小体の形成を伴う黒質細胞死に深く関わっているようである。しかも、 α -synucleinは、孤発性PDにおけるLewy小体の主要な構成成分である。したがって、Alzheimer病における β amyloid仮説と同様に、 α -synucleinの異常沈着をprimary eventとする細胞死カスケードの存在がPDにおいて現れられる。

一方、Park2(autosomal recessive juvenile parkinsonism:AR-JP)においては、新規遺伝子Parkinのloss-of-function型変異によりLewy小体陰性のparkinsonismが生じることがわかっている。したがって、この遺伝子の機能は、黒質細胞の基本的な生存維持に必須と考えられる。それ故に、Parkinのかかわる生存維持機構が、synuclein沈着による死のカスケードの標的になっているかどうかは、非常に興味深い問題である。

一方、Park3(Chr2p)は、浸透率の低い優性遺伝子で、しかもその表現型は孤発性PDのそれに酷似する。したがって、この遺伝子は、孤発性PDの発症促進遺伝子のひとつである可能性が高い。

このように、これら複数のPD遺伝子は、あるひとつの細胞死カスケードに対して、それぞれ特異なレベルで接点を持っている可能性が高い。すなわち、Park3は、Synucleinの沈着を促すカスケードの上流因子として機能し、Parkinの関与する系においては、その破綻による細胞死がsynuclein沈着(Lewy小体)を伴わないことより、Synucleinカスケードの下流における死の標的として位置づけられる可能性がある。

いずれにしろ今後同定されるであろう多くの家族性PD遺伝子は、polygene diseaseとしての孤発性PDをひきおこす共通の細胞死カスケードの様々なレベルに関与する遺伝子群として位置づけられる可能性が高い。その解析の結果として、カスケードの実体を明らかにすることができ、ひいては孤発性PDの病因が解明され、さらには、未だ明らかでない神経細胞死の基本的分子メカニズムが明らかにされることを期待したい。

S7-2

パーキンソン病発症環境因子

古武 弥一郎、太田 茂
広島大学医学部総合薬学科

多因子性疾患であると考えられているパーキンソン病に関しては、近年急速に解明されつつある分子遺伝学的研究と並んで環境因子に関する研究も必要不可欠である。我々のグループは脳内在性のパーキンソン病発症物質候補に関する研究を行っており、現在までに数種のテトラヒドロイソキノリン (TIQ) 誘導体を発症候補化合物として提唱している。ドパミンの部分構造を有しており、ドパミントランスポーターにより取り込まれる3',4'-DHBnTIQ、生体内に存在する直鎖アルデヒドから生成すると考えられる $C_{16}H_{21}TIQ$ 等多岐にわたるが、これらにおおよそ共通する性質として、脳内在性であり、実験動物に投与するとパーキンソン病様症状を誘発し、パーキンソン病患者の脳脊髄液中で増加傾向があり、ミトコンドリア呼吸鎖阻害活性を有すること等が挙げられる。

毒性発現メカニズムの研究に関しては1BnTIQが詳細に検討されている。1BnTIQの神経毒性を中脳線条体切片共培養系を用いて調べたところ、1BnTIQはまずドパミン量を減少させ、一定時間経過後、細胞体の萎縮を経てドパミン神経を死に至らしめることが示唆され、100 μM 1BnTIQ添加24時間後のドパミンの減少は不可逆的であった。100 μM 1BnTIQ添加時には、6時間から12時間の間に細胞死シグナルのスイッチをオンにする時間 (コミットメントタイム) が存在することが示唆された。また、1BnTIQの神経毒性は中脳選択的であり、酸化的ストレスと相乗効果を有する。

一方、TIQ誘導体の中で1MeTIQのみがMPTPおよびTIQ類によるパーキンソニズムを防御する作用を有している。これは化合物の構造の僅かな違いが相反する性質を有している点で興味深く、1MeTIQを含めた脳内在性化合物群の量的バランスが発症メカニズムに関係している可能性を示唆している。

老年期に発症する病気の発症原因候補物質を考える上で、弱毒性であることは必要条件である。反対に毒性の強すぎる物質は発症原因にはなり得ないと考えられる。現在、これら脳内在性化合物群の量的バランス、相互作用するタンパク、生合成酵素の解析と、パーキンソン病発症との関連を探っている。

S7-3

N-methyl(R)salsolinolによるドパミン神経細胞死

丸山 和佳子¹、直井 信²

¹長寿医療研究センター老化機構研究部 生化学代謝研究室、²応用生化学研究所 脳科学研究部門

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の発見以来、ヒト脳に内在する神経毒がパーキンソン病の病因に関わっているのではないかと仮説が提唱されてきた。

N-methyl(R)salsolinol [NM(R)Sal]はヒト脳に内在するMPTP類似のイソキノリンでありドパミンから2段階の酵素反応により生成される。NM(R)Salを線条体に持続注入することによってラットにパーキンソン病に類似した病態を惹起することができた。また黒質においてドパミン神経細胞の選択的脱落が認められた。NM(R)Salが本当にパーキンソン病に関与しているか否かを検討するため患者サンプルの分析を行った。脳脊髄液中のNM(R)Sal濃度はパーキンソン病患者で有意に高かった。リンパ球中のNM(R)Salの合成に関与する酵素系の活性を調べたところ、NM(R)Sal生成の律速段階であるneutral (R)salsolinol N-methyltransferaseの活性がパーキンソン病患者で増加していることが見い出された。ヒトドパミン神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞を用い細胞死の機序を検討したところ、NM(R)Salはアポトーシスによる細胞死を惹起することが証明された。これはラットパーキンソン病モデルにおける組織所見と相応するものであった。neutral (R)salsolinol N-methyltransferaseの活性増加を引き起こす環境または遺伝因子はパーキンソン病発症に関与する可能性があると考えられた。

S7-4

酸化ストレスとドーパミンニューロン

澤田 秀幸¹、衣斐 督和²、赤池 昭紀²、下濱 俊¹¹京都大学大学院医学研究科脳病態生理(臨床神経学)、²京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析

パーキンソン病におけるドーパミンニューロン死には、酸化ストレスが重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、酸化ストレスによる神経細胞死の機序、および、これに対する神経保護物質の作用機序について検討した。胎仔ラット腹側中脳より単離した培養神経細胞を用いて、酸化ストレスモデルとしてグルタミン酸、bleomycin sulfate(BLM)、およびbuthionine sulfoximine(BSO)を用いて神経毒性を検討した。グルタミン酸暴露(1mM, 10分間)は、ドーパミン(DA)ニューロン、非ドーパミン(ND)ニューロンの両者に対し、NMDA受容体を介し、細胞内Ca流入を増大させ細胞死を引き起こした。NDニューロンでは、NOおよびONOO-により神経毒性を呈したが、DAニューロンではNOからONOO-への変換が抑制されており、NOに依存しない神経細胞死を呈した。DAニューロンの自己受容体であるD2受容体をD2受容体刺激薬で刺激するとグルタミン酸誘発細胞死は有意に拮抗された。その際、グルタミン酸刺激による細胞内酸素ラジカルの産生が抑制された。BLMおよびBSO暴露によりDAニューロン、NDニューロンともに細胞死を生じたが、その際、クロマチンの凝集、DNAの断片化を伴っており、前者はcaspase-1,3阻害薬により、後者はcaspase-3阻害薬により細胞死が抑制され、アポトーシスの特徴を伴っていた。これに対し、グルタミン酸誘発神経細胞死は、これらの特徴を欠き、ネクローシスと考えられた。Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)はBLMおよびBSO誘発神経細胞死を抑制した。GDNFによる神経保護作用は、phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)阻害薬、タンパク合成阻害薬、転写阻害薬により抑制された。また、GDNF処置によりBcl-2およびBcl-xのタンパク量が増大した。BLM処置により細胞内酸素ラジカルの増大とcaspase-3活性の上昇がみられたが、これらはいずれもGDNF処置より抑制された。PI 3-Kはc-Retの下流で活性化されることから、GDNFはc-Ret、PI 3-Kを介し、Bcl-2、Bcl-xの合成を促進し、酸素ラジカル産生を抑制し、caspase-3活性を抑制することにより抗アポトーシス作用をもつと考えられる。

S7-5

ドパミントランスポーターとパーキンソン病

川上 秀史、森野 豊之、中村 重信
広島大学医学部内科学第三

ドパミントランスポーター (DAT) は、ドパミン神経の終末に存在し、同終末から放出されたドパミンをシナプス間隙から再吸収し、神経伝達を終止させる一方、ドパミン神経系の調節に重要な働きをしていることがあきらかになっている。

パーキンソン病の成因に関しては、環境要因と遺伝要因の2つが関与しているとされている。環境要因に関連して、近年パーキンソニズムを引き起こす神経毒、1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP⁺)が注目を集めてきた。この物質はDATを通して黒質のドパミン産生細胞に取り込まれ、黒質細胞の脱落を引き起こす。さらに人工的にDATに変異を加えるとドパミンとMPP⁺の取り込みが大幅に変化することが知られている。MPP⁺自体は自然界には存在せずパーキンソン病の直接の原因物質となりえないが、DATの変異が環境毒を取り込む働きを促進あるいは抑制している可能性があり、DATを環境要因と遺伝要因の相互作用する場として捉えることも可能である。

そこで、我々はヒトDAT遺伝子を単離し、その全エクソシーイントロン構造を決定した。その結果、ヒトDAT遺伝子は全長50kb以上にわたり、1つの非蛋白翻訳領域を含むエクソンを含めて15個のエクソンからなることを明らかにした。さらに、各エクソンを増幅し塩基配列を決定し、その結果、パーキンソン病患者において、エクソン内の多型の一部が有意に頻度が低いことを見出した。このことは、DATの遺伝的多型がパーキンソン病の発症に関与する可能性を示したものであり、今後多型がいかにパーキンソン病発症にかかわっていくかを明らかにしていくことが必要と思われる。

S8 -PL

てんかんモデル動物

笹 征史¹、秋光 知英²、栗栖 薫³、北田 一博³、
芹川 忠夫³

¹広島大学医学部薬理学、²脳神経外科学、³京都大学
大学院医学研究科付属動物実験施設

てんかんは人口の1~2%が罹患し、そのうち、20~30%の患者は治療薬によりコントロールできない難治てんかんと考えられている。最近てんかん発症の単一遺伝子 (BFNC、ADNFLE、Unverricht-Lundborg Myoclonusなど) が発見されたが、多くは多因子の遺伝子が関与すると考えられる。一方、てんかんの成因の研究とその治療法の開発にはヒトのてんかんに限り無く近いモデル動物が必要である。さらにこのモデル動物のてんかん発症遺伝子を同定できれば逆にヒトのてんかん遺伝子の探索に有効な手段になると思われる。現在のところ、てんかんモデル動物として、マウスではEIマウス、聴原性発作を起こすDB/2Jマウスがあり、ラットではGAERS (genetic absence epilepsy rat of Strasbourg)、GEPR (genetically epilepsy-prone rat)、また我々が見出したtremorラット、自然発症てんかんラット (SER)、ノダてんかんラット (NER) などが知られている。これらのモデル動物のうちてんかん発作に関与する遺伝子座はEIマウスでは知られているが、tremorラットを除いて不明であり、遺伝子自体も不明である。この中でSERは二重突然変異体 (*tm/tm*, *zi/zi*) であり、ヒトてんかんの欠神様発作と強直-間代発作のモデル動物として有用と考えられる。SERにはてんかん発作に加え、脳内の広範な領域に空胞変性が認められる。SERはtremorラットヘテロ (*tm/+*) とzitterラットホモ (*zi/zi*) を交配して得られることから、tremorラットとzitterラットのそれぞれの遺伝座について連鎖解析が行われ、それぞれ *tm* 遺伝子は10q24に、*zi* 遺伝子は3q35に存在することが判明した。さらにpositional cloningより、D10M11 Mit 194を含む広範な領域に欠失が存在することが明らかになった。この中でてんかん発作に関与するのはaspartoacylaseの欠失と考えられた。事実この酵素欠損のためtremorラットではN-acetyl-L-aspartate (NAA) の増量が認められた。NAAを脳室内へ投与した場合、てんかん発作を誘発することからNAAは新たなてんかん誘発物質と考えられる。

S8-1

CACNA1A遺伝子変異に基づく神経疾患の分子遺伝学

辻 省次、五十嵐 修一、高橋 哲哉、
志知 隆雄、小野寺 理
新潟大学脳研究所神経内科

CACNA1A遺伝子 (P/QタイプCaチャネル α 1サブユニット遺伝子) 上に生じる変異の種類によって、片麻痺性片頭痛、episodic ataxia (遺伝性発作性小脳失調症2型, EA-2)、脊髄小脳変性症6型 (SCA6) などのさまざまな神経疾患が起こりうるのが近年の分子遺伝学的解析から明らかにされてきている。SCA6はポリグルタミン鎖をコードしているCAGリピートが異常に伸長していることが発見された。その結果、わが国でこれまでHomes型小脳失調症とされてきたものの約半数がCACNA1A遺伝子のCAGリピートの異常伸長によるSCA6であること、増大CAGリピートと発症年齢の間に負の相関関係のあることが示されている。一方、これまでの遺伝子変異の解析からは、片麻痺性片頭痛についてはミスセンス変異によるものが多く、EA-2はtruncation mutationによるものが多いことが示されている。我々の研究室では、最近、臨床的には片麻痺性片頭痛と小脳失調を示す1家系について、CACNA1A遺伝子のエクソン16のミスセンス変異 (T666M) を見いだした。また、孤発例ではあるが発作期間の長い、発作性小脳失調症の1例を経験し、臨床的にEA2の可能性が高いと考え、発作間欠期と発作時の脳血流異常の比較、アセタゾールアミドによる脳血流の改善効果、発作の予防効果について詳細な検討を行い、アセタゾールアミドの脳血流の改善および発作に対する軽減効果を確認することができた。CACNA1A遺伝子変異については現在解析中である。これまでに我々の研究室で解析した、CACNA1A遺伝子の遺伝子変異について genotype-phenotype correlationについて報告する。

S8-2

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん (Benign adult familial myoclonic epilepsy: BAFME) 病因遺伝子の連鎖解析

佐野 輝¹、三神 正昭¹、安田 雄²、寺尾 章²、
兼子 直³、田中 敏博⁴、後藤 雄一⁵、大沼 悌一⁶
¹愛媛大学医学部神経精神医学、²川崎医科大学神経内
科、³弘前大学医学部神経精神医学、⁴東京大学医科学
研究所、⁵国立精神神経センター、⁶国立療養所厚満病
院

1991年安田は、常染色体優性遺伝形式を示し、成人発症で、良性経過を示すミオクローヌスてんかんの家族例(二つの大家系)を報告し、遺伝性と電気生理学的に不随意運動がcortical reflex myoclonusの一種であることに着目し、良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん(Benign adult familial myoclonic epilepsy: BAFME)の疾患名を提案し、他の進行性ミオクローヌスてんかん症候群との差異を示した。この疾患では、桑野らが疾患の歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)との類似性から、この遺伝子との連鎖および変異を検討したが、連鎖は否定され、変異も存在しなかった。今回の解析対象としては安田の報告した岡山県の家系Aのみとし、17名の罹患者を含む27名の家系構成員から情報を得た。罹患者は、安田の報告したBAFMEの診断該当者であった。連鎖解析には、プログラムMLINKを用い、多点検定にはプログラムLINKMAPを用い、2種のマーカーと疾患による3点検定を行った。他のてんかん遺伝子がすでにマップされた染色体領域での連鎖の否定と、トリプレットリピート伸長性神経変性疾患遺伝子群におけるトリプレットリピート伸長および連鎖の否定を先に確認した。続いて、連鎖解析を全染色体カバーである Génét hon human genetic linkage map (1996)に従い、マイクロサテライトマーカーの解析をすすめ、第8染色体に2点検定でのロッドスコア4.31、多点検定でのロッドスコア5.42を得る領域を見出した。この領域は、第8染色体において他のてんかん症候群でマップされた8pter-23.1 (Nothern epilepsy)、8q13-21 (familial febrile convulsion)、8q24 (EBN2)領域とは異なるものであり、第8染色体に新たなてんかん関連遺伝子座位が存在することが考えられた。、現在、この候補領域にマップされた遺伝子およびESTを対象とした候補遺伝子アプローチによる病因遺伝子の探索を行っている。

S8-3

日本人Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) と Benign familiar neonatal convulsion 2 (BFNC2)での新しい遺伝子変異

廣瀬 伸一¹、岩田 洋美¹、穂吉 秀隆¹、
善利 史子¹、福岡 五龍¹、米谷 美奈子¹、
小林 健一郎²、伊藤 正利²、松島 伸昭³、
杉山 博之³、村中 英樹⁴、和田 一丸⁵、
兼子 直⁵、満留 昭久¹
¹福岡大学小児科、²滋賀県立小児保健医療センター小
児科、³九州大学理学部生物物理、
⁴弘前大学小児科、⁵同神経精神科

【緒言】現在まで家族性特発性てんかんの責任遺伝子として同定されたものは、わずかにADNFLEでのCHRNA4、BFNC1と2でのKCNQ2、3及び熱性けいれん+でのSCN1B遺伝子のみである。この内日本人ADNFLEとBFNC2での遺伝子異常を初めて同定した。

【方法】ADNFLE：日本人ADNFLEの一家系内のCHRNA4遺伝子変異をSSCPと直接シーケンス法により検索同定した。BFNC2：日本人BFNC2家系の罹患者のKCNQ3遺伝子の全15エクソンを直接シーケンスし変異を検索同定した。

【結果】ADNFLE：CHRNA4遺伝子の膜貫通部分(M2)をコードする部分に新しい点変異(c752C>T)を見いだした。BFNC2：一家系においてKチャネルのP-loopをコードする部位のKCNQ3遺伝子に新しい点変異(c925T>C)を見いだした。以上二つの遺伝子の変異は罹患者すべてと保因者にヘテロで認められたが、100人の対照者には認められなかった。

【考察】ADNFLE：CHRNA4はβ2サブユニットとともに中枢神経でリガンド結合型イオンチャネルのニコチン性アセチルコリン受容体を構成している。c752C>Tによりリガンド結合型チャネルに保存されているSer252がLeuに置換(S252L)することが推定された。Ser252はイオン通過路(ポア)の開閉の際の軸を形成すると考えられている。BFNC2：KCNQ3はKCNQ2とともに四量体のKチャネルを形成し、おそらくM-currentの発生に関連している。c925T>CによりKCNQファミリーで保存されているTry309がArgに置換(W309R)することが推定された。Try309はKチャネルポア内のイオンフィルターを保持していると考えられている。以上からいづれの変異ともチャネル機能に異常を来すことが推定された。

【総括】てんかんを中枢神経のイオンチャネルの異常によるチャネル病(channelopathy)としてとらえる作業仮説は、今後の種々のてんかんの病因や新しい治療の研究展開上有用かもしれない。

S8-4

Lafora病と小児欠神てんかん

山川 和弘

理研・脳科学総合研究センター・神経遺伝

近年になり複数のてんかんにおいてイオンチャネルなどが原因遺伝子として同定され、てんかんの分類に新しい概念をもたらしつつある。我々は、更なるてんかん遺伝子の同定、およびその機能の解析を目指し、小児欠神てんかん、ラフォーラ型進行性ミオクロヌスてんかんなどに関する研究を進めている。小児欠神てんかんでは、強直間代発作を伴うサブタイプの大家系の連鎖解析により同定された候補領域8q24の物理地図を作成することにより候補領域を絞り込み、KCNQ3, JRK/JH8などの近傍の候補遺伝子や新規遺伝子について検討を加えた。又、ラフォーラ型進行性ミオクロヌスてんかんでは、原因遺伝子として同定されたEPM2Aのfull ORF (351 a.a.)を有するcDNAクローン、5' alternative splicing product、マウスホモログを単離・解析し、また、20をこえるラフォーラ病の家系を用いて検索を行い欠失を含む複数の変異を同定した。本シンポジウムでは更に、多くの進行性ミオクロヌスてんかんでリソゾーム蛋白が原因遺伝子として同定されていることの意味、共通する発症機構の可能性などについて論じてみたい。

S8-5

抗てんかん薬とイオンチャネル

岡田 元宏、 兼子 直

弘前大学医学部神経精神医学講座

現在開発中の抗てんかん薬は、興奮性神経伝達機構抑制・抑制性神経伝達機構亢進を主要作用機序としているものが多い。一方、遺伝子研究から、てんかんの原因として、カリウムチャネル (KCNQ, GIRK) や ACh 受容体などの関与が明らかにされつつある。これらの新たな発見は、てんかん発作発現機序にイオンチャネルが重要であることを示し、かかる事実は今後の新薬の開発、てんかんの分類等に大きく影響する。一方、神経科学的検討から、spontaneous transmission (ST) と depolarization induced transmission (DT) では伝達機構が異なる可能性が示唆されてきた。我々は *in vivo* microdialysis glutamate biosensor を用い、抑制性神経伝達物質 monoamine (MA) と興奮性神経伝達物質 glutamate (Glu) の遊離機構の比較検討を行い、同時に抗てんかん薬の神経伝達機構に対する作用を検討してきた。MA の基礎遊離は、N-type Ca^{2+} channel (N-type-VSCC) > P-type-VSCC、protein kinase C (PKC) > protein kinase A (PKA) により規定され、 Ca^{2+} 感受性遊離は N-type-VSCC、PKC により規定されていた。Glu はこれらに対して非感受性であった。MA、Glu の K^+ 感受性遊離は、P-type-VSCC > N-type-VSCC、PKA > PKC に規定され、かつ tetrodotoxin (TTX) により阻害された。抗てんかん薬 carbamazepine (CBZ)、valproate (VPA)、zonisamide (ZNS) は MA 基礎遊離及び Ca^{2+} 感受性遊離を亢進したが、Glu 基礎遊離には効果がなかった。MA、Glu の K^+ 感受性遊離はこれら3剤により抑制された。 K^+ 頻回刺激による MA、Glu の遊離パターンを比較検討すると、MA は刺激回数増加に伴い、MA 遊離量は漸減し、Glu は逆に漸増することが明らかとなった。この MA 漸減、Glu 漸増を CBZ、VPA、ZNS は抑制する。以上の結果は、古典的抗てんかん薬は、抑制性神経伝達機構の ST 機能を亢進し、同時に DT 機構を抑制し、しかも DT 持続に伴う抑制性神経伝達系の相対的抑制—興奮性神経伝達機構の相対的亢進を抑制することにより、抗てんかん作用を発現する可能性を示唆する。学会当日は、これらの実験結果に加え、従来の基礎てんかん学的検討から得られた実験事実も加えて、詳細に考察する予定である。

WS1-1

リン酸化による神経伝達物質放出の制御

高橋 正身
三菱化学生命科学研究所

シナプスの性質が可塑的に変化する上で、神経伝達物質の放出が制御されることは一つの重要な基盤である。新たな遺伝子発現やタンパク質の合成を必要としない短期的な変化には、既に存在するタンパク質がリン酸化などの翻訳後修飾によって可逆的に制御されることが重要であると考えられている。シナプスの機能の制御にはさまざまな種類のタンパク質キナーゼの関与が示唆されているが、それらのキナーゼがどのようなタンパク質をリン酸化し、神経伝達物質が放出されるまでのどのような過程を変化させているのか、さまざまなキナーゼによるリン酸化は神経回路の上でどのように使い分けられているのかといった基本的な問題も未だ解決されていない。

ラット副腎髄質細胞腫由来のPC12細胞は、大型の有芯小胞にドーパミンを、小型のシナプス小胞にアセチルコリンを貯蔵し、Ca²⁺依存的に開口放出する。我々はPC12細胞からの神経伝達物質放出が様々なタンパク質キナーゼによって制御されることに注目し、そこに関わるリン酸化基質の同定と、リン酸化を特異的に認識する抗リン酸化抗体の作成を進めている。

PC12細胞をアデニル酸シクラーゼを活性化するフォルスコリンやPKCを活性化するフォルボールエステル、あるいはNGFなどであらかじめ前処理しておくでドーパミンおよびアセチルコリン放出が亢進した。これらの促進効果は全てイオノマイシン誘発性の放出も促進することから、Ca²⁺流入以降の過程が変化していると考えられた。現在までにPKAによってシナプシンとラプフィリン3Aが、PKCによってSNAP-25とGAP-43がそれぞれ細胞内でリン酸化されることを見出した。抗リン酸化抗体を用いた定量的解析の結果、フォルボールエステルによる放出促進にはタンパク質リン酸化を介した機構の他に、リン酸化に依存しない機構もあることが明らかとなった。ラプフィリン3AやSNAP-25に対する抗リン酸化抗体でPC12細胞の免疫染色を行うと、細胞内でのキナーゼ活性化に伴って染色強度が著しく増加することが認められた。現在これらのリン酸化抗体を用い、スライス培養した海馬の神経回路の中でこれらのタンパク質のリン酸化がどのように変化しているかを明らかにしようとしている。一方NGFによる放出促進には、受容体型チロシンキナーゼであるTrkAと、その下流にあるPI3キナーゼ系やMAPキナーゼ系が関与していることが明らかとなった。現在これらのシグナル系の詳細な解析を行うと共に、放出制御に関わるリン酸化基質の同定を進めている。

WS1-2

シナプス小胞リサイクリングと放出制御

黒見 坦、城所 良明
群馬大学医学部行動医学研究施設行動生理部門

神経伝達物質は、シナプス前終末における活動電位に応じて放出され、シナプス小胞はリサイクルされる。W. Betz らによる蛍光色素 FM 1-43 の導入により、この過程を研究するための手段が手軽に利用できるようになった。ショウジョウバエの神経筋シナプスは、シナプス機能に欠陥を持つ多くの突然変異体があり、シナプス伝達の研究をする上で極めてユニークな標本である。まず我々は変異体、shibire、を用いてシナプス小胞の動態を研究した。この変異体は endocytosis の際に働く蛋白、dynamin、に温度依存性の変異がおき、高温でその機能が失われる。shibire の神経筋シナプスにおいて高K⁺液により脱分極させ伝達物質の放出を促進させると、外液中に入れた FM 1-43 が取り込まれる (activity dependent loading)。この場合、シナプス前終末の bouton の外側に取り込まれ、蛍光像はドーナツツ状になる。再び高K⁺液を作用させると色素はすべて消失した。これを exo/ endo cycling pool と名づけた。次に、幼虫を 34°C に保ち、高K⁺液で伝達物質の放出を起させると、endocytosis が起らないために、シナプス小胞は完全に涸渇する。その後室温に戻してエンドサイトーシスを再開させると (depletion reformation loading)、FM 1-43 はシナプス前終末の bouton 全体に取り込まれた。その後再び高K⁺液で取り込まれた色素を放出させると中心部を残して色素が消失した。したがってこの中心部にある小胞は、通常のリサイクリングには参加していないようである (reserve pool)。depletion reformation loading の際に actin の polymerization / depolymerization を阻害する cytochalasin D を作用させると、reserve pool は形成されず、exo / endo cycling pool のみになる。このような標本を高頻度刺激するとシナプス電位の振巾は急速に減少する。したがって、reserve pool 内の小胞は高頻度刺激の際に動員されシナプス伝達を維持するのに役立っている。野生株の幼虫においても、色々な操作をすることによって exo / endo cycling pool の大きさを変えることができる。例えば、adenylate cyclase の activator、forskolin、を作用させると exo / endo cycling pool が増大し、シナプス伝達が増強する。したがって、シナプス小胞のプールの大きさを制御することによってシナプス伝達の効率を変えることができる。

WS1-3

NMDA受容体チロシンリン酸化と神経シナプスの可塑性

手塚 徹、中澤 敬信、久恒 智博、梅森 久視
山本 雅

東京大学医科学研究所制癌研究部

グルタミン酸は中枢神経系の主要な神経伝達物質である。グルタミン酸受容体の一種であるNMDA

(N-methyl-D-aspartate) 受容体は、学習、記憶等に関わるシナプスの可塑性や、発達時のシナプス形成において重要である。近年、Srcチロシンキナーゼが、NMDA受容体と会合してそのチャンネル活性を制御することが報告された。また、NMDA受容体のNR2AとNR2Bサブユニットは、脳でチロシンリン酸化されている。これらは、NMDA受容体とチロシンキナーゼの機能的関連を指摘するものである。我々は、fyn欠損マウスで、NR2A、NR2Bのチロシンリン酸化レベルが共に低下していることを見出した。また、293T細胞に活性化型FynとNR2Aを外来性に発現させ、FynがNR2Aのチロシンリン酸化を促進することを示した。さらに、このFyn依存的NR2Aのチロシンリン酸化が、PSD-95により、亢進することを見出した。PSD-95の三つのPDZドメイン (PDZ1、PDZ2、PDZ3) のうち、N端側のPDZ1とPDZ2はNMDA受容体のシナプス後膜でのクラスタリングに関わる。我々は、PDZドメインを様々に欠損する変異体を用い、PSD-95のPDZ3ドメインがFynのSH2ドメインと会合することを示した。このことはPSD-95分子が異なるPDZドメインを用いて、FynをNMDA受容体に接近させる足場として機能していることを示唆している。次いで我々は、NR2A/NR2B分子のリン酸化の意義を明らかにする為に、in vitro反応系でFynがNR2AやNR2Bをリン酸化する部位を特定した。それらのいずれもが、NR2Aと活性化型Fynを発現する293T細胞でリン酸化されることを確認した。さらにそのうちの一つがPI3-キナーゼのp85サブユニットと会合することを示した。

本ワークショップではNR2A/NR2Bがチロシンリン酸化される分子機構について議論し、さらにそのリン酸化の意義について考察したい。

WS1-4

海馬長期増強の維持相における活性型 CaM キナーゼ II の局在

福永 浩司、宮本 英七
熊本大学医学部第一薬理

CaM キナーゼ II の 286 番目のスレオニン (Thr-286) の自己リン酸化反応は酵素をカルシウム依存性型からカルシウム非依存性型 (構成的活性型) に変換する。この構成的活性型 CaM キナーゼ II の発現はシナプスの高頻度刺激に伴うカルシウムイオン上昇をコードしており、記憶の分子素過程に関与するという仮説が提唱されている。私達はこれまでに、放射性無機リン酸で標識した海馬切片を用いて、LTP 誘発後、1 時間において CaM キナーゼ II の自己リン酸化反応が亢進することを報告した。本研究では Thr-286 の自己リン酸化反応を特異的に認識する抗体を作成して、CaM キナーゼ II の海馬錐体細胞における活性化部位を同定すること試みた。海馬CA1 への入力線維であるシャッフアー側枝と交連線維を高頻度刺激 (100 Hz、1s) して LTP を誘発した。刺激後 1 時間においてパラホルムアルデヒドで固定した後、抗リン酸化特異抗体で免疫染色した。構成的活性型 CaM キナーゼ II は CA1 領域錐体細胞の細胞体、樹状突起に存在しており、LTP 誘発に伴って著明な免疫染色性の上昇が見られた。この上昇は少なくとも 1 時間以上持続しており、特に樹状突起において上昇が顕著であった。さらに、構成的活性型 CaM キナーゼ II の発現部位はNMDA 受容体の局在と一致した。本研究では、LTP において Thr-286 の自己リン酸化反応の亢進が錐体細胞の細胞体と樹状突起で起こることを確認した。また、自己リン酸化反応に伴って発現した構成的活性型 CaM キナーゼ II は LTP の維持相においても安定であることが示された。

WS1-5

視床-皮質投射路に存在するサイレントシナプスの発達におけるBDNFの必要性

中村 俊¹、伊丹 千晶¹、河野 朋子¹、水野 恭伸²¹国立精神・神経センター神経研究所²長崎大学薬学部

神経回路は遺伝子プログラムと個体の経験の相互作用によって発達する。神経活動が神経回路シナプスの結合性を制御することはよく知られているがその機構は不明である。最近、海馬や大脳皮質のシナプスはNMDA受容体を主とする機能的に未熟なものからAMPA受容体を主とする活動型に変換されて発達するとする、silent synapseモデルが提唱されている。しかし、神経活動がこの変換過程をどのように制御しているかは明らかにされていない。我々は遺伝子機能を解析できる実験系としてマウスの体性感覚野バレルの視床-皮質シナプス結合の発達過程を解析した。BDNFを欠いた変異体でバレルの形態形成は正常であるが、脳切片を用いた細胞外電位の計測ではAMPA受容体の応答が顕著に低下していた。これに対し、NMDA受容体の応答は幼弱期と同様に大きくグルタミン酸受容体の応答に占めるNMDA受容体の応答が相対的に高いことが明らかとなった。さらに、グルタミン酸受容体の応答の空間的分布を可視化するために膜電位依存性の色素を用いて光計測を行ったところ、正常な発達ではNMDA受容体がAMPA受容体に移行するのにに対し、BDNF変異体ではNMDA受容体の応答が5/6層を含む広い範囲に残存していた。さらに、頬髯を出生直後から切除した個体ではBDNF変異体と同様な現象が観察された。以上の結果はサイレントシナプスが神経活動に依存して活性型に変換されること、しかもこの過程にBDNFが必要であることを示している。

WS1-6

神経細胞特異的 NO 合成酵素 (nNOS) による細胞増殖・分化因子としての一酸化窒素 NO の生成

阿部 一樹^{1,2}、井上 順雄¹、中山 孝¹佐藤 光¹、平原 史樹²、加藤 尚彦¹横浜市立大学医学部、¹第一生化学、²産婦人科

出生後ラット小脳の表面に形成される外顆粒層内の顆粒細胞は分裂増殖し、分裂を停止した細胞が分子層内を移動しながら分化して、内顆粒層（成熟後の顆粒層）を形成する。我々はnNOSが神経芽細胞である外顆粒細胞に発現しており、NOSの特異的阻害剤であるN^G-nitro-L-arginine (NArg)を腹腔内投与すると、外顆粒細胞の増殖分化が阻害され、小脳層の形成が遅延した構造が乱れることを報告した(Wang et al., Develop. Brain Res. 111: 65-75, 1998)。細胞増殖と分化におけるnNOSの働きを解析するため、より単純な系として過排卵させたマウスの卵と着床前胚（1細胞～胞胚）20個を試料とし、定量的RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)によりnNOS mRNAを測定した。着床前胚は受精後1細胞から桑実胚(16細胞)を経て胞胚(32細胞)まで増殖し、胞胚は表層のtrophectodermと内部のinner cell massに分化する。この増殖分化に伴い湿重量当たりのnNOS mRNA濃度は、未受精卵と受精卵（1細胞胚）ではマウス全脳の平均濃度(1.56mg/g湿重量)の2.6倍、2細胞胚では1.3倍含まれており、4細胞胚で卵の1/10に激減し、胞胚までに徐々に卵の2/10まで増加した。卵胚には他のNOS isoforms (eNOSとiNOS)はnNOS測定と同じ感度では検出できなかった。2細胞胚を500 μM NArgを加えた培養液中で72時間培養すると、4細胞胚迄は影響を受けず、その後胞胚まで胚細胞の増殖分化は12時間以上遅れ、より小さな胚胞しか形成されなかった。卵胚はnNOS抗体により免疫染色され、NOの蛍光発色試薬であるDAF-2AによりNOを生成していることが証明された。上述の神経芽細胞と卵胚についての結果は、nNOSにより生成されるNOが細胞増殖分化の為の一種の“栄養因子”として働いていることを示している。

WS1-7

老化促進モデルマウス(SAM)脳の神経化学的異常と記憶・情動障害

大熊 康修、村山 俊彦、上原 孝、野村 靖幸
北海道大学大学院薬学研究科薬理学分野

老化促進モデルマウス(SAM)のP系は老化促進を示し、活動性の低下、脱毛、寿命短縮など共通の老化所見を示す。SAMP8系は加齢に伴い学習記憶障害を自然発症し、またSAMP10系は脳萎縮と学習記憶障害を自然発症することより、痴呆を主とする神経変性疾患の病態解析や脳の老化機序解析のモデル動物として有用と考えられている。そこでSAMP8およびSAMP10脳のとくにシナプスにおける神経化学的特徴について検討した。

SAMP8の学習記憶障害とそれに関する神経化学的变化について、2-8ヶ月齢の大脳皮質、海馬でのグルタミン酸(Glu)および、グルタミン(Gln)含量の増加が認められた。また10ヶ月齢SAMP8において、脱分極刺激によるGlu遊離量が増加していたことのみならず神経伝達物質ではないGln遊離量も増加していたことより、SAMP8脳のシナプスの脆弱性が示唆された。さらに12ヶ月齢海馬でのNMDA受容体結合量、M1-ACh受容体結合量、セロトニン1A受容体結合量、ベンゾジアゼピン受容体結合量およびプロテインキナーゼC量それぞれの低下が認められた。これらの脳シナプスにおける異常がSAMP8学習記憶障害の一因をなすことが示唆された。

一方、SAMP10は学習記憶障害を発症するとともにうつ状態を伴う情動障害も生じている可能性が示唆されている。10ヶ月齢SAMP10の海馬においてM1-ACh受容体結合量およびプロテインキナーゼC量の減少が認められた。またドパミンD2受容体結合量およびセロトニン1A受容体結合量の中脳領域における増加が認められ、これらの異常がSAMP10のうつの情動障害に関与している可能性が示唆された。したがって以上のような脳のシナプスにおける異常がSAMP8およびSAMP10の学習記憶障害あるいは情動障害に関与している可能性が示唆され、本モデルがシナプス可塑性の病理学的変化に関する基礎的な研究にも有用であると考えられる。

WS2-1

Caspaseと細胞死

菅野 雅元
広島大学医学部免疫学寄生虫学

細胞の死には様々な形が存在し、その中の一つの形がアポトーシス(apoptosis)である。本ワークショップでは、アポトーシスという狭い定義(領域)に限定することなく、生物学としての細胞死をCaspaseという酵素をもとに考えてみたい。最近、Caspase依存性ばかりでなく、Caspase非依存性の細胞死も多く発見されてきており、いろいろな形の細胞死の存在が判明してきている。細胞死はさまざまな生物学的要因(Fasリガンド、TNF、ウイルス感染など)、化学的要因(制癌剤、毒物など)、物理的要因(放射線、紫外線、熱など)によって起こる。このように細胞死を始動する要因には多様性があるが、いずれもDNA断片化を中心とするクロマチンの凝縮、核の断片化などの共通の現象がみられ、このことから共通の細胞死実行装置が存在していると考えられている。そしてこの実行装置は多くの場合Caspaseファミリーの活性化に依存することがわかってきた。Caspaseファミリーとは細胞死の実行過程に働くプロテアーゼ群で、現在10種類以上に番号がつけられているが、さらに数種類の存在が確認されてきている。細胞死の研究は線虫Caenorhabditis elegans(C.elegans)を用いた研究が先行し、それをモデルとして哺乳類の細胞死の研究がおこなわれるようになった。(線虫の場合、発生の過程で起こる細胞死なので「プログラム細胞死」と呼ばれる。)今回は、現在までに判明しているCaspaseの制御因子について討論を行いたい。

WS2-2

分裂終了ニューロンのAPP695強制発現によるカスパーゼ活性化とアポトーシス誘導

植月 太一¹、西村 伊三男¹、竹本 研¹、桃井 隆²
三浦 正幸³、吉川 和明¹

¹大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能制御部門

²国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5

部、³大阪大学医学部神経機能解剖

本学会で我々はアデノウイルスベクターを用いてアミロイド前駆体蛋白質695を *in vivo*, *in vitro* の分裂終了ニューロンへ遺伝子導入、強制発現すると、変性を引き起こすことを既に報告した。今回は、APPによるニューロン変性の過程についてさらに検討を行ったので報告する。

細胞死に直接関与するプロテアーゼ群カスパーゼがAPP導入によって活性化されるかどうかを検討した。APP発現ウイルス感染後のヒトNT2ニューロンから細胞抽出液を調製し、蛍光標識基質の切断によりカスパーゼ活性を測定した。その結果、APP遺伝子導入後カスパーゼ1の活性化は検出されなかったが、カスパーゼ3様活性は導入24時間後から検出され、48時間後に最高値を示した。ウェスタンブロッティング法によりカスパーゼ3蛋白質を解析すると19 K, 17 Kの活性化断片が48時間後に顕著に増加することを確認した。活性型カスパーゼ3断片特異的な抗体で免疫組織化学を行うと変性が開始されたニューロンで陽性を示すものが検出された。NT2ニューロンの形態変化は約72時間後から顕著であり、それ以前の段階でカスパーゼ3が活性化されることを示す実験結果である。ラット脳海馬ニューロンにAPPを直接導入した場合も免疫組織化学により同様の結果が得られた。次に変性過程の細胞形態をヘキスト染色した核を中心に観察した。殆どの変性ニューロンの核は凝集または分断化していた。またタネル法で核を染色すると、陽性を示す凝集した核が検出された。

以上の結果からAPPの強制発現による変性に先立ってカスパーゼ3が活性化されること、ニューロンの変性は典型的なアポトーシスの特徴を示すことが確認された。これらの実験結果から分裂終了ニューロンではAPPが蓄積されるとカスパーゼ系が活性化され、それに引き続いてアポトーシスが起るものと推定される。

WS2-3

ショウジョウバエをモデルとしたアポトーシス実行機構の解明

糠 洋陸、三浦 正幸、岡野 栄之
大阪大学大学院医学系研究科神経機能解剖

確立されたモデル生物系であるショウジョウバエでは、分子レベルでの様々な細胞内シグナル伝達経路と、個体の表現型とを密接に関連させて研究を行うことが可能である。アポトーシス（プログラム細胞死）に関与する遺伝子に関しても、ショウジョウバエでは *reaper*, *hid*, *grim* 等の細胞死開始遺伝子、またその下流で機能するカスパーゼ (*Caspase*) をコードする遺伝子が同定されている。特にこのカスパーゼは線虫から哺乳類まで保存されている細胞死実行プロテアーゼであり、ショウジョウバエでは既に4種類発見されていることから、哺乳類での細胞死実行メカニズムを解明する上でショウジョウバエは有用なモデル系であると考えられる。

我々はショウジョウバエの細胞死実行過程、特にカスパーゼの活性化に関与する遺伝子群の同定及び機能解析を試みており、本ワークショップではその結果を報告する予定である。また各種神経変性モデルショウジョウバエを用いた解析結果も併せて報告したい。

WS2-4

神経細胞死誘導に關与する細胞周期調節蛋白質 CDK4 と cyclin D1

稲生 英俊

千葉大学医学部解剖学第三

Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) と cyclin D は複合体を形成し、細胞周期の G1 期の進行を促進する。したがって、これらは増殖性細胞に特異的であり、細胞周期の停止とともに消失すると考えられてきた。実際、これらの蛋白質は神経系においても発達期の増殖の盛んな部位に一致して高い発現がみられる。

一方、興奮性神経毒カイニン酸を成熟ラット腹腔に投与すると扁桃体、梨状皮質等に神経細胞死が誘導される。このとき、これらの部位のニューロンにおいて細胞死の発生にやや先行する形で CDK4 および cyclin D1 の mRNA の発現上昇がみられることを、Northern blot および in situ hybridization によって確認した。また、免疫組織化学によっても CDK4、cyclin D1 の核局在性の染色像の出現が観察された。さらに、これらが in vivo において神経細胞死の誘導に必要なか否かを調べるため、次のような実験を行った。すなわち、CDK4 および cyclin D1 に対する antisense oligonucleotide (AON) を mini osmotic pump によってラット片側側脳室内に持続注入した状態でカイニン酸を腹腔内投与し、2 日後アポトーシス細胞の出現を TUNEL 法によって調べた。Cyclin D1 の AON を投与した群の同側（投与側）扁桃体および梨状皮質ではアポトーシス細胞の数は激減していたのに対し、対側では対照群（sense oligonucleotide 投与群）との間に大きな差は検出されなかった。また、CDK4 の AON を投与した群では、cyclin D1 の場合ほど顕著ではないが、やはり同側での有意なアポトーシス細胞の減少が観察された。これは AON による CDK4 または cyclin D1 の翻訳阻害が神経細胞死を抑制したことを示している。おそらく、CDK4-cyclin D1 複合体が神経細胞死誘導の情報伝達系に關与しているものと考えられる。

WS2-5

High-density Oligonucleotide DNA Array (GeneChip™, Affymetrix) を用いたマウス前脳虚血モデルにおける遺伝子発現変化の検討

永田 俊人、浅井 聡、高橋 泰夫、趙 恒

石川 紘一

日本大学医学部薬理学

【はじめに】脳虚血時における神経細胞の障害には、Necrosis や Apoptosis を含め様々な変化が観察されているが、近年の分子生物学的手法を用いた検討により、虚血時における神経細胞障害には、数種類の遺伝子発現が關与している事が明らかになってきている。このような遺伝子変化の概略を明らかにするため、我々は GeneChip™ (Affymetrix) を用いて、マウス前脳虚血モデルにおける、海馬の経時的な遺伝子発現の変化を検討した。

【方法と対象】総頸動脈結紮により前脳虚血を起こしたマウスより、海馬を経時的に摘出し、各検体より mRNA を抽出した。次に各 mRNA より dsDNA を合成し、in vitro transcription 行い cRNA を合成した後、得られた cRNA を High-density Oligonucleotide DNA Array と hybridization を行い、経時的に 6500 種類の遺伝子発現の変化を検討した。

【結果】NF- κ B などの従来報告されている数種類の遺伝子発現の変化に加えて、多数の遺伝子変化が経時的に観察された。

【考案及び結語】今回の検討で、虚血ストレスに対し、従来の報告に加えて様々な遺伝子発現の変化が起こる事が観察された。従って虚血時に見られる神経細胞の変化には、従来発表されている以上に、複雑な遺伝子発現の変化が關与していると考えられた。

WS2-6

フェニトイン(PHT)のマウス小脳顆粒細胞及びプルキンエ細胞への発達神経毒性

大森 啓充¹、山下 敬介¹、安田 峯生¹、
小倉 博雄²、道川 貴章³、御子柴 克彦³
中村 重信⁴

¹広島大学医学部解剖学第1、²エーザイ筑波研究所

³東京大学医科学研究所、⁴広島大学医学部内科学第3

抗てんかん剤のフェニトイン(PHT)は、長期服用で運動失調、構音障害、眼振などの小脳症状や小脳萎縮を神経毒性として誘発し、また、妊娠中のPHTの服用で、児に小脳異常をきたした症例も報告されている。小脳の発生分化が、ヒトでは妊娠後期に、マウスでは周生期に著しいことに注目し、マウス新生仔にPHTを経口投与し、小脳の形態形成、とくに、顆粒細胞及びプルキンエ細胞の発達・成熟と運動機能に及ぼす影響を中心に検討した。PHT粉末をゴマ油に懸濁し、35 mg/kgを生後2日から生後4日までの3日間、連続経口投与した。生後5日(PHT投与終了後24時間)には、投与群で、外顆粒層にアポトーシス(TUNEL法)が多く認められた。外顆粒層の細胞移動の動態をBrdUを用いて検索したが、BrdU投与後72時間の時点で、PHT投与群では、外顆粒層内に依然としてBrdU陽性細胞が多く認められた。イノシトール1,4,5-三リン酸受容体タイプ1(IP3R1)に対する抗体を用いたプルキンエ細胞の変化では、PHT投与群では、IP3R1の発現が遅く、樹状突起の形成が未熟で、その伸展が悪い傾向がみられ、一部に細胞配列の不規則性が観察された。また、生後8週-9週の時期に行った運動機能検査では、PHT投与群で、運動協調性障害が認められた。

WS2-7

ポリグルタミン凝集の時間経過と細胞死

豊島 至¹、菅原 正伯¹、加藤 一磨¹、和田 千鶴¹
下畑 享良²、小出 玲爾²、小野寺 理²、辻 省次²

¹秋田大医学部内科学第1

²新潟大学脳研究所神経内科

ポリグルタミン病では正常より長いポリグルタミンが神経細胞死を引き起こす。培養細胞に伸長ポリグルタミンを含むペプチドを強制発現させると、細胞内と核に沈着し細胞死を引き起こすことができる。凝集を阻害する薬物で細胞死を軽減することも確認された。ポリグルタミン凝集形成と細胞死の関係をj知るため、個々の培養細胞での細胞内と核内の凝集形成の時間経過と細胞死を観察した。

培養細胞はCOS7とCHOを用いた。ベクター上に齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)のポリグルタミン部分とその近傍にGFP遺伝子を結合させ、融合タンパクを発現させた。倒置型顕微鏡で温度と炭酸ガスをコントロールし、蛍光単独、蛍光/位相差同時、あるいは位相差単独でビデオカメラで観察し、タイムラプス記録した。画像はNIH Imageで解析した。

核局在シグナルを追加した57ポリグルタミン(Q57NLS/GFP)と、これをもたないQ56/GFPを発現させた。凝集の開始はQ57NLS/GFPがQ56/GFPより早い傾向が見られた。凝集の開始から最大径に達するまでの時間は、Q57NLS/GFPで30分、Q56/GFPで90分であった。凝集形成速度を回転楕円体で近似し算出すると0.5-15 $\mu\text{m}^3/\text{分}$ であったが、Q57NLS/GFPでのみ10 $\mu\text{m}^3/\text{分}$ 程度の急速に大きくなる凝集体が見られた。細胞死までの時間は凝集開始から2-9時間で不定であった。

凝集形成速度が、核局在シグナルを持つものの方ではよいことは、核内に凝集形成をより促進する要素のあることを示唆している。凝集形成と細胞死の間隔は不定であること、長時間を要する場合があることは、凝集形成と細胞死の間には、数多くの段階があることを示しているように思われた。

WS2-8

パーキンソン病とアポトーシス

永津 俊治¹、茂木 真希雄²、一瀬 宏¹戸荆 彰史²¹藤田保健衛生大学総合医科学研究所分子遺伝学²愛知学院大学歯学部薬理学

パーキンソン病 (PD) は高齢者に多発する運動障害を主症状とする神経変性疾患である。黒質線条体ドーパミン (DA) 神経が未知の原因で選択的細胞死をおこして発症する。素因遺伝子に神経毒などの環境因子が重なって発症すると推定される。我々はPD脳 (線条体) と脳室・脊椎脳脊髄液にTNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, EGF, TGF- α , TGF- β 1などのサイトカイン類が増加することを見出して、PDの神経細胞死に炎症反応や免疫反応とそれに続いておこるアポトーシスが重要な役割を果たすことを示唆してきた。PDモデル動物でも、MPTP-PDマウスの線条体にIL-1 β の増加 (自治医大、中野らと共同)、また6-OHDA 半側 PD ラットの傷害側の黒質線条体にTNF- α の増加を見出した。6-OHDA半側PDラットにL-DOPAを連続投与したが、対照側、傷害側のTNF- α レベルは変化せず、L-DOPAはin vivoではサイトカインを変化させないことがわかった (岡山大、小川らと共同)。また、神経栄養因子のNGFファミリーのNGF, BDNFが、MPTP-PDマウスとPD脳 (黒質線条体) で減少することを見出した。TNF- α やIL-1 β の炎症性サイトカインの増加とBDNFやNGFの減少はアポトーシスをおこすと考えられる。そこでさらにアポトーシス関連タンパク質を検索してbcl-2とsoluble Fas (sFas), さらにTNF receptor R1, caspase-1とcaspase-3の活性がPD脳 (黒質線条体) で増加することを見出した (順天堂大、水野ら・宇多野病院、久野らと共同)。

PDにおけるサイトカインの増加は神経細胞死の代償機構とも考えられるが、原因あるいは促進因子である可能性がある。PD黒質で何らかの原因でミクログリアが増殖してTNF- α , IL-1 β などの炎症性サイトカインを放出し、酸化的ストレスを促進し、アポトーシスを惹起してDA神経細胞死をおこすことが推定される。PDの神経細胞死の機構に炎症・免疫反応のサイトカインに始まるシグナル伝達によるアポトーシスが関与するとすれば、免疫抑制薬や抗アポトーシス作用をもつ神経栄養因子の増加による新しい神経細胞の保護治療の開発が期待される。

(本研究は厚生省厚生科学研究費脳科学研究事業 (T. N.) の支援による)

WS2-9

運動ニューロン死とアポトーシス

割田 仁^{1,2}、阿部 康二¹¹岡山大学医学部神経内科、²東北大学医学部神経内科

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は進行性の筋萎縮により平均3~5年の経過で死に至る重篤な疾患である。ALSでは神経系の中でも運動ニューロンが比較的選択的かつ系統的に傷害されるが、その機序は未だ不明な点が多い。ALS発症者の5~10%は家族性 (familial ALS, FALS) で遺伝性をもっており、1993年以来Cu/Zn SOD (SOD1) 遺伝子の変異が発見されている中で、我々も本邦のFALS家系においていくつかの新しいSOD1遺伝子変異を見出してきた。

変異SOD1トランスジェニックマウス (TgM) はALSとはほぼ同様の表現型を示しFALSだけでなく孤発性も含めたALSの有用な動物モデルの一つとして既に確立している。我々は本モデルにおいて、臨床症状が出現するかなり前のより早期にこそ、運動ニューロン死の重要かつ一次的な変化があり得と考え、これまでに脊髄運動ニューロンの脱落が起きていない未発症の早期に、速い軸索輸送が高度に障害されている可能性を示唆した。

さらにアポトーシス関連蛋白caspase-1, caspase-3, bcl-2とともに神経細胞の生存促進にかかわる蛋白phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)やAkt/protein kinase B (Akt/PKB) について病期を追って蛋白レベルの変化を検討した。その結果、臨床症状が出現したごく末期のTgM脊髄運動ニューロンにおいて、対照には認められないcaspase-3の免疫組織化学陽性像が一部認められた。一方でbcl-2, PI3-K, Akt/PKBについては未発症のかなり早期から蛋白レベルでの減少が示唆された。

運動ニューロン死の制御は生と死のシグナル両者のバランスによると考えられるが、本モデルにおける運動ニューロン死には、一方的な死のシグナルの増加よりは、生のシグナルの緩やかな減少が関与している可能性が考えられる。

WS3-1

Peroxisomal Membrane Protein 20 (PMP20) の機能

山下 拓史¹、中村 重信¹、Suresh Subramani²
Hava Avraham³

¹広島大学医学部内科学第3

²University of California San Diego

³Harvard Medical School

現在までに30種類以上のペルオキシゾーム異常症が知られており、そのほとんどは重篤な神経障害を来す。その中にはadrenoleukodystrophyなどのようにペルオキシゾーム代謝の異常で発症するものもあるが、Peroxisome Biogenesis Disorder (PBD)とよばれるペルオキシゾーム機能異常によって発症する一連の疾患群があり、PBDは臨床症状から20種類のComplementation Group (CG)に分類されている。近年、そのPBDの多くはペルオキシゾーム蛋白PEXの遺伝子異常によることが明らかにされている。われわれは分子量20 kDaで新規のペルオキシゾーム蛋白と考えられるPeroxisomal Membrane Protein (PMP20)のhumanおよびmouseの遺伝子を単離し機能を解析した。

hPMP20は細胞質とペルオキシゾームに存在し、胎生期には発現が低く、成人ではほぼ全臓器で発現し、脳、心臓、肺、腎、骨格筋で比較的多く発現していた。hPMP20およびmPMP20はperoxisomal targeting signal 1 (PTS1)を持ち、hPMP20はPBDのCG2の原因遺伝子の産物でありPTS1レセプターであるhPEX5と特異的に結合した。hPMP20はhPEX5により細胞質からペルオキシゾームに輸送されると考えられた。hPMP20およびmPMP20のアミノ酸配列は高い相同性を示したが、両者とも抗酸化酵素であるthiol-specific antioxidant protein (TSA)と相同性を認めた。hPMP20はTSA活性を示し、過酸化水素を分解した。他のPMPのメンバーであるPMP35、PMP40はそれぞれPBDのCG10、CG3の原因遺伝子であることが知られている。PMP20も他のPMPと同様に、未知のPBDの発症に関与している可能性が考えられる。

WS3-2

ペルオキシゾームは PC12D 細胞の神経突起中に多数存在する

石川 哲也¹、川井 千景¹、佐野 護²、湊川 洋介¹
¹川崎医科大学医学部生化学1

²京都府立医科大学学生物

多くのペルオキシゾーム病は神経系にも障害をもたらす。従って、ペルオキシゾームは神経系でも何らかの機能を持っていると推測できる。そこで我々は神経系におけるペルオキシゾームの機能を知るために、まず神経細胞内の分布を調べようと考えた。神経細胞への分化能を持つ培養細胞 PC12D 細胞を用い、GFP をマーカーとしてペルオキシゾームが神経突起中に存在するのか調べた。

GFP (Green Fluorescent Protein) のカルボキシル末端に PTS1 (Peroxisome Targeting Signal 1) である SKL を融合させたタンパク質が、ペルオキシゾームに局在することはすでに明らかになっている。この GFP-SKL 融合タンパク質を発現するプラスミドを PC12D 細胞に transfection し、NGF (50 ng/ml) を添加して2日後、ペルオキシゾームの局在性を GFP-SKL の蛍光として観察した。

PC12D 細胞に NGF を作用させて神経突起を伸長させると、その中にペルオキシゾームが複数存在することが明らかになった。さらに成長円錐やバリコシティー中にもペルオキシゾームを観察することができた。またNGF 添加後5日目の神経突起を観察すると、2日目より多くのペルオキシゾームを観察することができた。従って、ペルオキシゾームは神経突起中を運ばれて先端部分へ移行すると考えられる。さらに NGF 以外の神経突起伸長作用を持つ staurosporine、dbcAMP、forskolin を作用させても同様な結果が得られた。従って、ペルオキシゾームの神経突起内への移行は NGF の効果であるというより、神経突起の伸長と correlate していると考えられる。

以上の結果から、ペルオキシゾームは神経突起中に多数存在しており、神経機能に何らかの役割を担っているのではないかと考えている。

WS3-3

クロロキン・ミオパチーにおけるタウの蓄積

小山 文隆¹、井原 康夫^{1,2}¹東京大学大学院医学系研究科神経病理学²科学技術振興事業団 (CREST)

Inclusion body myositis (IBM) は中年以降に発症する炎症性筋疾患で、筋細胞内にアルツハイマー病に特徴的な β -amyloid および paired helical filament (PHF) に形態及び免疫原性が類似している構造物が形成される。また、IBM の実験モデル系であるクロロキンミオパチー (chloroquine myopathy; CM) は、抗マラリア剤であり lysosome 阻害剤として知られるクロロキンをラットに連続投与して誘導され、筋細胞内にタウが蓄積する。IBM はヒト筋疾患なので検索は限られるが、CM は実験的に作製できるのでタウ蓄積の詳細な解析が可能である。我々は筋組織におけるタウの蓄積機構を明らかにするため、CM を生化学的、免疫組織学的に詳細に検討した。タウ mRNA はクロロキン処理の初期に一過的に過剰発現され、その後定常レベルに戻った。これに対し、タウの蛋白質レベルはタウ mRNA の過剰発現がない後期に上昇した。そのタイムコースは lysosome で代謝されることが知られている APP とその C 末端断片に類似していた。さらに免疫組織学的にタウは acid phosphatase 活性を有する rimmed vacuole に蓄積した。また免疫電顕ではタウが rimmed vacuole 内に局在することが示された。これらの結果は、筋細胞中の lysosome あるいはそれに相当する構造物が障害を受け、その結果としてタウが蓄積した可能性を強く示唆する。

WS3-4

Adrenoleukodystrophyの分子病態

山田 猛、新納 信江、吉良 潤一

九州大学医学部附属脳神経病研究施設内科部門

伴性劣性遺伝型副腎白質ジストロフィー(ALD)は、中枢・末梢神経の脱髄による神経症状と副腎不全を呈する疾患である。生化学的には組織、血中の極長鎖脂肪酸(VLCFA)の増加がみられる。4名のALD患者について病因遺伝子(ALDP)の分子遺伝学的解析を行った。1名ではmRNAの発現がなく、他3名でP534L、R660W、G512Sのミスセンス変異を見出した。変異ALDPは患者線維芽細胞には検出されず、pulse-chase実験により変異ALDPは分解速度が亢進していることを明らかにした。

ALDP遺伝子のexon 1を破壊することによりALDP欠損マウスを作成した。ALDP欠損マウスは、ヘテロ、ヘミ、ホモ欠損マウスのいずれも正常に生まれ発育した。脳、脊髄、肺、腎においてVLCFAの増加が認められた。しかしながら最長2年間の観察でも、明確な神経症候は認められず、生後1年までの中枢神経系、副腎の病理学的検索でも、ヒトALDにみられる脱髄や封入体などの異常所見は見い出されなかった。したがって、ALDP欠損マウスはヒトALDの生化学的モデルといえる。

ALDP欠損により、VLCFAの代謝障害が生ずる機構を調べた。ALDPとVLCF acyl-CoA synthetase (VLACS) cDNAを、ALDP欠損マウス由来の線維芽細胞に導入すると、VLACS単独ではリグノセリン酸 β 酸化活性の上昇は乏しかったが、ALDPとの同時導入により β 酸化活性が明らかに上昇した。細胞分画のウェスタンブロット解析で、VLACSのペルオキシソーム分画の全分画に対する割合は、ALDP欠損マウスで0.83、対照マウスで1.24とALDP欠損マウスで低下していた。このことからALDPはVLACSがペルオキシソームに局在するのに関与していると考えられた。

ALDにおける炎症性脱髄の機序に、ミクログリアの異常活性化が関与しているかどうかを検討した。ミクログリアはALDP欠損マウスと正常対照とも、インターフェロン- γ とlipopolysaccharideの同時投与により活性化された。NO₂-産生量はALDP欠損マウスで増加傾向がみられたが、有意差は得られなかった。TNF- α 産生量にも差はみられなかった。マクロファージについても、NO₂-産生量に差はみられなかった。マクロファージのVLCFAの組成は、C24/C22、C25/C22、C26/C22の比ともALDP欠損マウスで若干の増加がみられたが、組織中の蓄積に比較して軽度であった。リグノセリン酸 β 酸化活性の低下も軽度であった。マクロファージではALDP欠損によるVLCFAの代謝障害が軽度であるために活性化の異常を検出できなかった可能性が考えられた。

WS3-5

Adrenoleukodystrophyの遺伝子解析

小池 亮子^{1,2}、高野 弘樹¹、辻 省次¹¹新潟大学脳研究所神経内科²水原郷病院神経内科

Adrenoleukodystrophy(ALD)の病因遺伝子はペルオキシソーム膜蛋白で、ATPase superfamily に属するALD protein(ALDP)をコードしているが、その生理機能については充分解明されていない。ALDには小児型ALDの他、成人大脳型ALD、AMN、Addison病のみ、などの多様な臨床病型が存在する。これらの臨床病型とALD遺伝子の変異との間に関連があるのか否かを明らかにする目的でALD患者における遺伝子解析を行った。

対象ならびに方法：各々独立した家系に由来する小児型ALD13例、成人大脳型ALD11例、AMN5例の計29例を対象として、サザン解析、ならびにRNAを用いた直接塩基配列決定法にてALD遺伝子の解析を行った。

結果：1) 成人大脳型ALD3例でALD遺伝子のrearrangementがみられた。

2) 他の26例で21種の変異が検出され、その中の69%がミスセンス変異であった。ミスセンス変異のほとんどがPMP70,mALDRP, Pxa1pで保存されている部位であった。

3) 白人で12-17%と最も頻度の高いと報告されている1081-1082のAG2塩基欠失は日本人でも12%と高頻度にみられた。

4) 臨床型と遺伝子変異部位には関連は見出せなかった。

結論：ALDの臨床病型にはALD遺伝子以外の遺伝因子あるいは外因の関与が推測される。

WS3-5-追加発言

Adrenoleukodystrophyの画像診断

越智 一秀、川上 秀史、大下 智彦
井門 ゆかり、野田 公一、中村 重信
広島大学医学部内科学第三

Adrenoleukodystrophy (ALD)はPeroxisome病といわれる疾患群として分類されており、原因遺伝子はadrenoleukodystrophy protein (ALDP)とされ、ABC輸送体に属す膜局在型の蛋白である。ALDはその機能異常によって、血中の極長鎖脂肪酸(VLCFA)の上昇を来す疾患である。画像的には従来より後頭葉有意に両側白質にび漫性の高信号域が認められ、左右の病変が脳梁膨大部を介して連続しているものが典型例とされてきた。しかし近年特に成人発症例や女性保因者において、従来以上に多彩な所見を呈することが知られてきた。さらに、MRIをはじめとする画像診断機器の進歩と、遺伝子や、血中VLCFAの測定などにより、発症早期のALDについての病変部位の確定が可能となっている。

Kumarの分類では成人発症型のALDは1)純粋型AMN、2)脊髄路変性を伴うAMN(ALMN1)、3)大脳変性を伴うAMN(ALMN2)、4)成人大脳型の4型のサブグループに分類され、多くは胸髄の萎縮を伴う皮質脊髄路を中心とした病変であった。病理学的には炎症性の脱髄病変としている。

我々は比較的稀なMRI所見を呈した成人発症ALDを経験したので呈示する。症例は24歳男性。主訴は歩行障害、書字障害。20歳時より歩行時の不安定感を自覚。22歳時には階段昇降が難しくなり、引き続いて書字障害、構音障害、嚥下障害が出現し、さらに手指の振戦、歩行障害の増悪を来し、当科受診した。注視方向性眼振、失調性構音障害、嚥下障害、四肢に軽度の筋萎縮と深部腱反射亢進を認めた。rapidACTH負荷テストで反応性低下、血清中、赤血球膜中のVLCFAの上昇よりALDと診断した。頭部MRIにて大脳白質病変は認めなかったが、右歯状核から上小脳脚を通り、中脳にて交差し、対側の赤核に終わる、歯状核赤核路のT2高信号病変を認めた。オレイン酸、エルカ酸の投与を開始し、その後2年間フォローアップ中であるが、MRI上病変は両側の歯状核赤核路に拡大している。本症例では典型的な脊髄路病変ではなく、歯状核赤核路に局限した病変がMRIにて早期に描出され、さらにその経過を追うことにより、白質病変の進行が示された点特徴的であり、ALDの白質病変に何らかのtractの障害が関与している可能性が示唆された。

WS3-6

ペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子

藤木 幸夫

九州大学大学院理学研究科生物科学専攻、CREST・科技団

私たちはペルオキシソームの形成機構やその障害機構の解明に向けて、ペルオキシソーム欠損性CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞変異株を用いたペルオキシソーム形成に必要な因子の解明とその機能ならびに病態遺伝子解明を目的として研究を行っている。その成果として、現在までに13の異なる相補性群に分類されるペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞の分離に成功している。さらに13の相補性群に分類されるペルオキシソーム生合成異常症患者由来の線維芽細胞に対し、これら13種のCHO変異細胞のうち9種はヒトの相補性群と対応することも明らかにしている。このことは哺乳動物のペルオキシソーム形成には17以上の遺伝子(産物)が関わっていることを意味する。私たちはこれまでにCHO変異細胞を用いた相補活性検定法やEST法により10種の相補遺伝子(PEX、ペルオキシソーム形成因子)のクローニング、ついで9つの相補性群に分類されるペルオキシソーム欠損症患者の病因遺伝子の解明など研究を展開している。本ワークショップではペルオキシソーム形成不全症病因遺伝子解明の現状とペルオキシソーム形成機構研究の最新の動向などについて議論したい。

WS3-7

新しいペルオキシソーム病：
D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase
deficiency

鈴木 康之

岐阜大学医学部小児科

ペルオキシソームβ酸化系はacyl-CoA oxidase (AOX), D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein (D-BP), 3-ketoacyl CoA thiolase から構成され、それぞれに酵素欠損症が報告されている。演者らはD-BPが極長鎖脂肪酸・胆汁酸前駆体・分枝脂肪酸に対して幅広い基質特異性を持ち、従来L-BP欠損症と診断されていた症例の多くがD-BP欠損症であることを報告してきた。今回はD-BP欠損症を中心に、ペルオキシソームβ酸化系酵素欠損症の臨床・生化学的病態について報告する。

【対象と方法】極長鎖脂肪酸分析で異常を示し、ペルオキシソームβ酸化酵素欠損が疑われた4家系5例の乳幼児について、有機酸・胆汁酸分析、酵素活性測定、イムノブロット、蛍光抗体染色、遺伝子解析、相補性解析を行った。

【結果と考察】①解析の結果、2例がD-BP欠損症、3例がAOX欠損症と診断した。②D-BP欠損症はAOX欠損症より重症で、新生児期から筋力低下・顔貌異常・肝腫大・発達遅滞を認め、生後1～2年で死亡した。胆汁酸代謝異常・ジカルボン酸尿を認め、線維芽細胞のC24:0酸化活性は対照の10%以下であった。D-BP蛋白質は2例ともに欠損し、変異解析の結果、症例1, 2でそれぞれ52bp, 237bpの欠失が検出された。③細胞融合による相補性解析では2例ともL-BP欠損症と診断されていたが、融合に用いた基準細胞(米国)もD-BP欠損であることが確認され、9例の欧米症例でD-BP遺伝子の変異が検出された。④症例2の家系で出生前診断を実施し、C24:0酸化活性低下、DBP蛋白質欠損、237bpの欠失から胎児異常を診断した。⑤AOX欠損症は2～3才までゆっくりと発達し、歩行や発語が可能になるが、その後退行を認めた。ジカルボン酸尿を認めるが胆汁酸異常はなく、C24:0酸化活性はD-BP欠損症と同様に低下していた。AOX蛋白質は3例ともに検出され、1家系で点変異が検出された。

⑥ペルオキシソームβ酸化酵素欠損症は臨床的にも神経病理学的にもペルオキシソーム欠損症と類似しており、神経系の発生とその異常を解析するモデルとして期待される。

【文献】

1. Suzuki Y et al: Am J Hum Genet 54: 36, 1994
2. Suzuki Y et al: Am J Hum Genet 61: 1153, 1997
3. Jiang LL et al: J Biochem 121: 506, 1997
4. Une M et al: J Biochem 122: 655, 1997
5. Suzuki Y et al: J Hum Genet 44: 143, 1999
6. Grunsven EG et al: Am J Hum Genet 64: 99, 1999

WS4-1

神経系におけるギャップ結合の局在と機能

小山田 正人、長岡 孝則、小山田 ゆみ子
高松 哲郎
京都府立医科大学第2病理

ギャップ結合は、隣接する細胞の細胞質を直接連絡する細胞間チャンネルで、分子量1000以下の物質を通過させるため、細胞の分化、増殖などの生命活動に重要な役割を果たしている。ギャップ結合構成蛋白質であるコネキシン(Cx)は、14種類以上存在し、それぞれが組織特異的、細胞特異的に発現している。Cxの突然変異によって生ずる疾患の発見やノックアウトマウスの研究より、ギャップ結合の重要な生理作用が明らかにされつつある。神経系においては、X遺伝子にリンクしたCharcot-Marie-Tooth病の原因が、Cx32遺伝子の突然変異であることが明らかにされたが、神経系を構成する多種類の細胞におけるCxの発現や神経系の分化とギャップ結合細胞間コミュニケーションの関係など不明な点が多い。ここでは、われわれが行ってきたギャップ結合に関する研究のうち、1)末梢神経におけるCxの局在とcrush-injury後の変化、及び、2)embryonic stem cell (ES細胞)のin vitroでの神経系分化過程におけるギャップ結合細胞間コミュニケーションの変化について紹介したい。

1)ラット座骨神経におけるCxの発現を免疫組織化学的に共焦点レーザ顕微鏡を用いて解析した。Cx32蛋白がSchwann細胞のRanvier絞輪とSchmidt-Lanterman切痕に局在するのに対して、Cx26はperineuriumに、Cx43はperineuriumとepineuriumに発現が見られた。二重標識により、Cx43はperineuriumで多層にわたって、タイト結合関連蛋白occludinと密接に関連して発現するのに対して、Cx26はperineuriumの最内層のみに限局することが分かった。crush-injury後、perineuriumのCx43はほとんど変化しないが、Cx26は直後に発現が増加して、その後減少し、Cxの発現変化が一様でないことが明らかとなった(J Histochem Cytochem 47: 937-948, 1999)。

2)マウスES細胞をレチノイン酸処理し、神経系への分化をin vitroで誘導した。A2B5陽性の神経上皮の段階では、コロニー内に限局して活発なギャップ結合細胞間コミュニケーションが認められ、神経系に分化する細胞群は、早期からコンパートメントを形成することが分かった。さらに、神経細胞の分化に伴って、コロニー内の細胞間コミュニケーションが低下することが明らかとなった。

WS4-2

細胞接着因子ギセリンのラットにおける発現と機能解析

平 英一¹、奥村 茂樹¹、塚本 康浩²、村岡 修¹、
佐々木 文彦²、三木 直正¹

¹大阪大学大学院医学系研究科情報薬理

²大阪府立大学大学院獣医解剖

ギセリンは我々が見出した細胞接着因子であり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。ニワトリにおいては筋肉組織に恒常的に発現が見られる他、神経系においては発生期に一時的な発現が見られる。ギセリンの発現は神経細胞が分化、細胞移動、神経突起伸展を行う時期に一致しており、神経系の発生に関与していると考えられる。実際、培養系においてギセリンを介する神経細胞の細胞移動、突起伸展が認められる。一方、ギセリンには細胞内領域の異なる2種類のサブタイプが存在する。それぞれのサブタイプで発現部位に差異があること、細胞接着活性が異なることから、細胞内領域はそれぞれ異なる機能を持ち、さらには細胞内への情報伝達を行っていると考えられる。

今回我々はさらにギセリンの機能を解析すると共にその細胞内への情報伝達等の機構を検討するためにラット及びマウスにおけるギセリンのクローニングを行った。ギセリンに部分的にホモロジーを持つラット及びマウスのMUC18の全塩基配列を決定した。ニワトリギセリンとラットMUC18のアミノ酸ホモロジーは全体では30%程度であるが、細胞内領域に関しては90%と高く、さらに2種のサブタイプが存在すること等からMUC18がギセリンであると考えられる。ラット神経系におけるギセリン/MUC18の発現を検討したところ、ニワトリと同様に発生初期に発現が強いことが明らかになった。しかし、ニワトリとは異なり、成体ラットにおいても神経系において発現が見られ、特に、脊髄、中脳、小脳において発現が強い。一方、ラット褐色細胞種PC12はギセリンを発現しており、NGFにより突起伸展を行う際にその発現が上昇することを見出した。

WS4-3

ミクログリアの膜ラッフル形成と食食能におけるIba1の役割

今井 嘉紀、大澤 圭子、金澤 裕子、佐々木 洋
高坂 新一

国立精神神経センター神経研究所代謝研究部

Iba1(ionized calcium binding adapter molecule 1)は我々が見出した分子量約17kDaのEFハンド型カルシウム結合たんぱく質である。我々はこれまでに、Iba1が脳内ではミクログリアに局在すること、ミクログリアの活性化に伴いその発現が上昇することを報告してきた。今回我々はIba1がアクチン細胞骨格系の制御を介し、活性化ミクログリアの遊走能・食食能において重要な役割を担っていることを見出したので報告する。

ミクログリア細胞株MG5を用い、抗Iba1抗体による免疫細胞染色を行い、Iba1の細胞内局在を調べた。M-CSF刺激下のMG5でIba1は膜ラッフル部にF-アクチンと共に集積していた。そこで、Iba1の変異体を作成し、緑色蛍光たんぱく質(GFP)と融合たんぱく質としてMG5で発現させた。GFP-野生型Iba1を発現させたMG5をM-CSFで刺激すると、膜ラッフルが形成され、そこへのGFP-Iba1の集積が認められたのに対し、N末端、C末端欠損変異体、カルシウム結合領域の変異体が発現させると、膜ラッフルの形成自体が抑制された。一方、食食部位についても同様に調べたところ、ザイモザン取り込み時に一過性に形成されるファゴサイティックキャップにIba1とF-アクチンが共存すること、上記Iba1変異体が発現した細胞では食食能が抑制されることがわかった。

アクチン細胞骨格系はRhoファミリー単量体Gたんぱく質により制御されることが示され、注目されている。M-CSF刺激時・食食時のMG5を調べると、Racの活性化型への転換と、膜ラッフル・ファゴサイティックキャップへの集積が観察された。ドミナントアクティブ型RacをMG5に発現させると膜ラッフルが形成されるが、同時にC末端欠損Iba1変異体が発現させると、膜ラッフル形成が抑制された。以上の結果はIba1がRacシグナル系に関与してアクチン細胞骨格の機能を調節する分子であることを強く示唆する。

WS4-4

アルツハイマー病とタウオパチー

武田 雅俊、田中 稔久、工藤 喬、中村 祐
大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学精神医学

タウ蛋白は細胞骨格を形成するマイクロチューブル付随蛋白の一つであり、17番染色体上遺伝子によりコードされる分子量5-7万の蛋白である。選択的スプライシングにより6種のアイソマーが発現している。アルツハイマー病脳に出現する神経原線維変化(neurofibrillary tangle; NFT)は過剰にリン酸化されたタウ蛋白からなり、神経細胞変性と細胞骨格蛋白との関係が推定されてきた。

アルツハイマー病脳内のタウ蛋白はCDK5やGSK3 β などの蛋白キナーゼにより約20箇所のSer/Thr残基がリン酸化されている。リン酸化タウは、正常タウと比較してマイクロチューブル結合能・チューブリン重合促進能が低下しており、リン酸化タウは凝集してPHFを形成することから、タウのリン酸化と軸索輸送障害とについて検討してきた。また、GSK3 β はリン酸基により細胞内シグナル系において重要な役割を果たしており、上流のPKB(Akt)およびPKCにより調節されていることを示したが、GSK3 β などのリン酸化制御機構はアポトーシス過程と関係している。近年、前頭側頭型痴呆(FTDP-17)家系においてタウ遺伝子変異が同定された。これらはタウ遺伝子の第10エクソン内ミスセンス変異、第10エクソン5'側イントロン変異、第10エクソン外の変異とに区分され、それぞれ特徴的な病理過程を呈し、第10エクソンのスプライスインによる4リピート型タウの発現と神経細胞変性との関係が想定されている。また、タウのリン酸化によるマイクロチューブル結合能の低下が核内移行するイソメラーゼにより快復するとの知見も興味深く、タウ蛋白のリン酸化と神経細胞変性との関係についても新たな知見を踏まえて議論したい。

WS4-5

タウ結合タンパク質の検索

村山 洋、村山 美由紀、高島 明彦

理化学研究所脳科学総合研究センターアルツハイマー病研究チーム

老年期痴呆の多くを占めるアルツハイマー病 (AD) の病理学的特徴は、神経細胞の脱落と異常構造物 (老人斑、神経原線維変化) の出現である。ADの原因遺伝子として、これまでに β アミロイド前駆体タンパク質 (APP) やプレセニリン (PS1, PS2) が家族性ADの遺伝的解析により同定されていて、それぞれの変異が老人斑を構成する約40アミノ酸からなる β アミロイド ($A\beta$) の産生・分泌に影響を及ぼすことが明らかにされており、 $A\beta$ を中心にAD発症のメカニズムの研究が進められている。しかし、ADの患者のほとんどは孤発性ADであり、家族性ADの割合は低い。したがって、AD発症のメカニズムを解明するためには原因遺伝子APPやプレセニリン以外の要因も考慮する必要がある。我々は、神経原線維変化に認められる高度にリン酸化されたタウに着目し、タウがglycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) にPS1との相互作用を介してリン酸化されることを明らかにした (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 9637-9641 (1998))。このことは、タウがGSK3 β と協調的にAD発症に関わっている可能性を示している。従って、AD発症メカニズムの解明には原因遺伝子の機能解析に加えタウ及びタウと相互作用する因子も考慮する必要があると考えられる。そこで、酵母 two-hybrid systemによるタウ結合タンパク質の検索を試みた。タウcDNAを挿入したGAL4DNA-BD発現ベクターpAS2-1を酵母CG1945に導入し、標的タンパク質 (BD-タウ融合蛋白) 発現酵母CG1945/tauを作製した。CG1945/tauにGAL4AD発現ベクターpACT2で構築されたヒト脳cDNAライブラリーを導入後、Trp(-)/Leu(-)/His(-)選択培地に播種した。タウとの結合を示すポジティブクローンについて現在解析中である。

WS4-6

家族性前頭側頭型痴呆 (Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: FTDP-17) にみられる変異tauを発現するCHO細胞の解析

松村 展敬¹、山崎 恒夫¹、井原 康夫^{1,2}¹東京大学大学院医学系研究科神経病理学²科学技術振興事業団 (CREST)

神経原線維変化はアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患にみられ、その出現頻度は神経細胞の脱落の程度と相関することが知られている。神経原線維変化の単位はPHF (paired helical filament) であり、その主要成分は異常にリン酸化された微細管結合タンパクのtauである。しかし、神経原線維変化またはPHFの形成メカニズムは不明のままであった。昨年、神経原線維変化を生じる遺伝性変性疾患のひとつFTDP-17がtau遺伝子の塩基置換によって生じることが明らかとなり、PHFの形成や病態メカニズムの解明の突破口となることが期待されている。そこでわれわれは、野生型およびFTDP-17で発見された4つの変異tau (G272V, P301L, V337M, R406W) を安定的に発現するCHO細胞株を構築し解析を行った。

まず初めに、これらの変異がtauの微細管結合領域とその近傍に存在することから、tauの微細管への結合能について解析した。正常な培養条件下では野生株と変異株間に相違は見られなかったが、微細管脱重合試薬のコルセミドで処理した場合、G272VとP301L株は野生株を含む他の株と比較して微細管が不安定であった。

次に、tauのリン酸化について検討したところ、R406W株ではtauのThr231とSer396のリン酸化が顕著に減少していることが明らかとなった。しかし、細胞をオキサゲ処理することによりこれらの部位が他の細胞株と同様にリン酸化された。興味深いことに同処理によって分裂期の細胞数が増加し、それらの細胞でリン酸化が亢進していた。すなわち、R406W株では、Thr231とSer396がリン酸化されにくい、細胞が分裂する際には同部位もリン酸化された。

R406Wの患者脳の神経原線維では、Thr231とSer396は過剰にリン酸化されているので、異常線維形成時には、微細管が脱重合する、分裂期のkinaseが働く、または双方が必要があると考えられた。

WS4-7

アルコール・薬物依存と細胞内分子機構

西田 朗¹、久岡 一恵¹、前正 秀宣^{1,2}岡本 泰昌²、山脇 成人²¹国立呉病院臨床研究部精神神経科学²広島大学医学部神経精神医学

精神疾患と中枢神経系内の細胞骨格・接着因子との関連性については現在のところ不明な点が多い。我々はアルコールや抗うつ薬の慢性投与が細胞内情報伝達系を変化させたり、遺伝子発現変化を引き起こすことを報告してきている。これらの変化が細胞骨格・接着因子の変化に関連する可能性が指摘されているが、未だ推定の域でしかない。しかし、最新の分子生物学技術であるマイクロアレイ法によりその関連性の解明が一気に進む可能性がある。マイクロアレイ法は同時に多数（数百から1万個程度）の遺伝子発現変化を定量的に比較検討できる手法である。この中には種々の細胞骨格・接着因子関連遺伝子も含まれている。我々はマイクロアレイ法によりアルコールや抗うつ薬の慢性投与がこれら細胞骨格・接着因子関連の遺伝子発現への作用を検討したので報告する。今後、マイクロアレイ法は、細胞骨格・接着因子の基礎的な機能や細胞分子との相互作用の解明のみならず、臨床的病態の機構解明や臨床応用可能な生物学的指標の開発、遺伝子発現解析に基づいた創薬などに寄与すると考えられる。

WS4-8

細胞膜内におけるGsαの可動性に対する慢性抗うつ剤投与の影響

土岐 完^{1,2}、小沢 寛樹¹、山口 高史¹、鶴飼 渉¹Robert J. Donati³、Mark M. Rasenick³、齋藤 利和¹¹札幌医科大学神経精神医学、²五稜会病院³イリノイ州立大学医学部生理学

これまで、抗うつ剤の慢性投与が細胞膜におけるGsαとadenylyl cyclaseの共役を増強することが示唆されており（Chen and Rasenick, 1995）、さらに近年、受容体、伝達器、効果器などの細胞膜内での動きが細胞骨格をはじめとする細胞膜の構成成分によって制限され、これら蛋白質の共役の調節に関与していることが示唆されている（Neubig, 1994）。そこで今回我々は、抗うつ剤投与によるG蛋白質の細胞膜内での可動性の変化を調べる目的で、抗うつ薬投与後のC6 glioma細胞の膜蛋白質を、強度の異なる二種類の界面活性剤によって抽出し、疎水性の強い部分に存在するG蛋白質と疎水性の弱い部分に存在するG蛋白質の量を比較した。C6細胞を10μMの抗うつ剤（amitriptyline, iprindole, fluoxetine）を含む培養液で3日間培養した後、粗膜標品を調整し、細胞膜蛋白質をTriton X-100を用いて抽出した。残った細胞膜成分から、より強い界面活性剤であるTriton X-114を用いてさらに膜蛋白質を抽出を行った。抗うつ剤投与群では対照群と比較してより多くのGsαがTriton X-100によって抽出され、逆にTriton X-114によって抽出されるGsαの量は減少していた。さらに、抗うつ剤の慢性処置を行ったC6 glioma細胞をホモジェナイズし、ショ糖密度勾配を用いた超速心法によって分別したところ、抗うつ剤慢性処置群では、疎水性の強いcaveolin-enriched domainに含まれるGsαの量が対照群と比較して減少していた。以上の結果から、抗うつ剤の慢性処置によって細胞膜内のGsαが疎水性の低い部分に異動し、caveolinなどの細胞膜の構成成分との共役の変化をおこし、Gsαとadenylyl cyclaseの共役の増加に関与している可能性が示唆された。

WS5- PL

アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析

内木 宏延
福井医科大学病理学第2

【緒言】近年、我々を含む数グループにより、アミロイド線維形成機構を説明するモデルとして「重合核依存性重合モデル」が提唱されている。本講演では、 $A\beta$ アミロイドを中心に我々の実験系の発展を概観し、ヒトアミロイドーシス全般に共通する治療戦略を提示する。【アミロイド線維分光蛍光定量法】蛍光色素チオフラビンT (ThT)は、前駆蛋白質と反応させても蛍光を発しないが、前駆蛋白質が重合して線維を形成するとこれに結合し、特異的蛍光を発した。蛍光強度は線維濃度に比例して増加した。【線維伸長の一次反応速度論モデル】前駆蛋白質をアミロイド線維と37℃で反応させると、電顕により線維伸長を観察した。上記分光蛍光定量法を駆使し、線維伸長が、既に存在する線維の端に前駆蛋白質が次々に結合し、立体構造を変化させることにより起こることを証明した。【重合核依存性重合モデル】 $A\beta$ をpH7.5、37℃で反応させると、蛍光は一定のラグタイムを伴うシグモイド曲線を描いて増加し、線維を形成した。この曲線は、順に重合核形成相、線維伸长相、及び平衡相より成る。この反応溶液にあらかじめ線維を加えると、蛍光はラグタイム無く増加し、上記シグモイド曲線に比し相対的に短時間で平衡に達した。以上より、数個の前駆蛋白質からの重合核形成が、線維形成の律速段階であると考えられる。【 $A\beta$ 1-42と1-40の線維形成における相互作用】両 $A\beta$ をpH7.5、37℃で反応させると、両者は重合核形成過程で阻害的相互作用を及ぼし合うが、やがて $A\beta$ 1-42が重合核を形成し、これに $A\beta$ 1-40が次々に結合し線維を形成する事を証明した。【アポE及び抗酸化剤の $A\beta$ 線維形成に及ぼす阻害作用、治療戦略】アポE及び数種の抗酸化剤の、 $A\beta$ 線維形成に及ぼす阻害効果について比較解析したところ、両者の線維形成阻害機構が異なることが明らかになった。重合核依存性重合モデルに基づいた精密な実験により、アポEは $A\beta$ と高親和性複合体を形成し、線維形成を阻害することが示唆された。最近、遺伝子改変マウスを用い、アポEの脳内 $A\beta$ アミロイド沈着に対する阻害効果が明らかにされている。一方、多彩な立体構造を持つ種々の抗酸化剤が $A\beta$ 線維形成を阻害するという事実は、活性酸素が、未知の機構によりアミロイド線維形成に深く関与していることを示唆しており興味深い。上記分子の多様な阻害機構は、治療戦略への示唆を与える。

WS5-1

遺伝子改変マウスを用いたヒト遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析

前田 秀一郎
山梨医科大学医学部生化学第一

常染色体性優性の遺伝性神経難病、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の病因は、トランスサイレチン (*ttr*) 遺伝子上の点変異で、1アミノ酸が置換した異型TTRから成るアミロイドが全身種々の臓器に沈着する。現在、FAPの治療法として、TTRの主要産生臓器である患者の肝を切除し、正常肝を移植する方法が行なわれである患者の肝を切除し、正常肝を移植する方法が行なわれる。肝移植により症状の進行を止めることができ、現在、唯一の有効な治療法であるが、問題点も多い。そこで我々は、実験操作のしやすい動物を用いて、FAPの発症機構を明らかにし、治療法や予防法を開発するため、マウスでの発生工学的手法を応用して、以下のように研究を進めている。

FAPの病因となるヒト変異*ttr* 遺伝子をマウス受精卵に注入する方法で作製したトランスジェニックマウスでは、FAP患者と同様の種々の臓器に、ヒト異型TTRから成るアミロイドが沈着する。しかし、この方法ではマウス内在性の*ttr* 遺伝子の機能は正常のまま、FAP患者に特徴的な末梢神経へのアミロイド沈着がなく、神経障害を認めない。そこで、以下のように研究を進めた。

1) 標的遺伝子組換え法を用いて、TTRを完全に欠損したマウスを作製した(PNAS: 90, 2375, '93)。TTR欠損マウスは、胎生期において致死的ではなく、形態形成や成長にも何ら異常を認めない(J Biol Chem: 269, 33135, '94; J Biol Chem: 270, 866, '95)。

2) このTTR欠損マウスにFAPの病因となるヒト変異*ttr* 遺伝子を導入し、ヒト異型TTRから成るアミロイドの沈着にマウス内在性の正常TTRがどう影響するかを解析した(Am J Pathol: 150, 1497, '97)。さらに、マウス内在性の*ttr* 遺伝子にFAPの病因となる点変異のみを導入するための新しい標的遺伝子組換え法を開発し(Gene: 166, 197, '95)、最近、*ttr* 遺伝子の方のアレルにこの点変異をもつマウス株の作製に成功した。点変異のみを導入するための新しい標的遺伝子組換え法を開発し(Gene: 166, 197, '95)、最近、*ttr* 遺伝子の方のアレルにこの点変異をもつマウス株の作製に成功した。

3) 種々のアミロイドーシスの発症に共通に関与することが疑われている血清アミロイドP成分(SAP)についても、標的遺伝子組換え法を用いて、SAP欠損マウスを作製し、対照野生型マウスに比べ二次性のAAアミロイドが有意に遅れて沈着することを見出した(Lab Invest: 77, 525, '97)。

ワークショップでは、上記の遺伝子改変マウスを、FAPの研究に今後どう利用するかについても言及したい。

WS5-2

分泌型アミロイド前駆体蛋白の機能とその結合蛋白

大澤 郁朗¹、高村 千鶴子¹、森本 高子²高坂 新一¹¹国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部²東京大学大学院理学研究科

アミロイド前駆体蛋白 (APP) はアルツハイマー病患者脳の老人斑に蓄積する β アミロイドの前駆体であり、その遺伝子はアルツハイマー病の原因遺伝子の一つであることが知られている。しかし、APP の正常脳内における機能は未だ明確ではない。APP は中枢神経系の発達初期から発現が認められ、脳内で広範に発現していることから、中枢神経系の発達・維持にAPP が関与することが示唆されている。そこで、我々はAPP とりわけ分泌型APP の機能を探索してきた。その結果、分泌型APP がラット大脳皮質より調整した神経幹細胞の増殖及びその組織内の神経突起伸長を促進すること、シナプスの形成と伝達を修飾することを見出した。さらに増殖および突起伸長促進活性は進化的に保存されたE1領域を含むN末端側断片 (NAPP) に認められ、E2領域を含むC末端側断片には認められなかった。

そこで、このNAPPの機能に関する分子生物学的解析の手がかりとして、NAPPに結合する蛋白を酵母 two-hybrid system でスクリーニングした。人胎児脳のcDNAバンクをスクリーニングしたところ、ポジティブ・クローン3ヶを得た。このうちのクローン308は、EGF-likeモチーフを含む既知の蛋白をコードしており、中枢では主にニューロンで強い発現が見られ、アストロサイトでも発現が検出された。大腸菌およびCOS7細胞で発現したクローン308蛋白についても分泌型APPとの結合が認められ、その結合はE1領域に特異的であり、E1領域内の配列を認識するモノクローナル抗体22C11でその結合は阻害された。現在、この結合がAPPの機能に及ぼす影響について検討中である。

WS5-3

老化促進モデルマウス(SAM)を用いたマウス老化アミロイドーシス発症機構の解明

樋口 京一

信州大学医学部加齢適応研究センター脈管病態分野

アミロイド線維形成は前駆蛋白の本来の生理的機能を担っている立体構造から β -シート構造を持つアミロイド線維への構造変換を伴う重合反応である。アミロイドーシス発症の機構をアミロイド線維形成反応の観点から明かにし、各アミロイド蛋白に共通した分子機構の解明に迫ることが重要である。各種のアミロイドーシスに共通したアミロイド線維形成機構として核形成依存性重合モデル(nucleation dependent polymerization model)が提唱されている。アミロイド線維形成はnucleation(核形成)とextension(線維伸張)の2段階で起こり、核形成は熱力学的に非常に起こり難い反応で、これが生体での中・高年齢での発症を説明するとされる。一旦核が形成されるとアミロイド蛋白モノマーの結合による伸張反応は急速に進行する。我々はマウス老化アミロイドーシスをモデルとしてこの仮説の検証を行いさらに遺伝子治療の可能性を探った。マウスでは、血清高密度リポ蛋白質 (HDL) の主要なアポ蛋白であるアポリポ蛋白A-II (apoA-II) が加齢に伴い、アミロイド線維 (AApoAII) として全身に沈着してくる。マウスapoA-IIには少なくとも3種のvariants (A,B,C型) が知られており、このうちC型のapoA-IIをホモに持つマウスでは若齢から重篤なアミロイドーシスを発症し、B型をホモに持つマウスではほとんど発症しない。アミロイド線維(AApoAII)をマウスの尾静脈に投与するとアミロイドーシスの発症は著しく促進された。一方グアニジン塩酸で線維構造を破壊したAApoAIIを投与してもアミロイドーシスは全く促進されなかった。これらのことから蛋白質の異常構造が伝播する核構造依存性重合反応機構言い換えれば、「アミロイド線維構造依存性線維形成機構」

(fibril-conformation dependent fibrilization) が実証されたと考えている。アミロイド嫌発生のB型apoA-IIは試験管内でC型apoA-IIのアミロイド線維伸長を阻害する。B型apoA-IIを発現する組み換えアデノウイルスベクターを作製、マウスに投与した。B型apoA-IIの過剰発現によって、アミロイドーシスの発症は抑制され、遺伝子治療の可能性を示した。

WS5-4

ヒト脳におけるアミロイド β 蛋白質の蓄積の生化学的解析

森島 真帆、井原 康夫

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻
神経病理学、科学技術振興事業団 (CREST)

アルツハイマー病脳におけるアミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) の蓄積はその病因に密接に関与していると考えられている。私達は、脳における $A\beta$ 蓄積機序を明らかにするために、ヒト脳での老化に伴う $A\beta$ 蓄積の過程を調べてきた。そして、中高齢者の脳をサンドイッチELISA法を用いて調べることににより、 $A\beta$ が加齢に伴って正常脳の水不溶性画分に蓄積すること、その主要成分はC末端が2残基長くより凝集性の高い $A\beta_{42}$ であり、50歳代から70歳代にかけて急激に蓄積が起ることを明らかにした。また、Western blot法による解析により、蓄積の非常に初期段階からSDS安定性の $A\beta$ 二量体が検出されることがわかった。一方、私達は最近、ヒト神経系細胞でも $A\beta$ が不溶性画分に存在することを報告した

(Biochemistry, 1998) が、このことは正常細胞でも $A\beta$ が不溶性画分に分画される可能性を示唆する。そこで、さらに検出感度を上げる工夫を行い、これまで $A\beta$ を検出することができなかったような若年者の脳不溶性画分に含まれる $A\beta$ の解析を行った。その結果、20歳代の脳ですでに $A\beta$ が不溶性画分に存在していること、そこでは $A\beta_{40}$ の方が $A\beta_{42}$ よりも多く存在することが明らかになった。脳不溶性画分の $A\beta$ の量は、その後定常状態を保ち、50歳前後になると $A\beta_{42}$ の増加が見られた。これに続いて $A\beta_{40}$ も増加したが、 $A\beta_{42}$ に比較すると非常にゆっくりとしたものだった。また、これら不溶性画分の $A\beta$ の一部はカベオラ様の低密度膜画分に局在することがわかった。以上の結果は、不溶性画分 $A\beta$ が正常な代謝産物であり、その代謝機構の破綻が $A\beta$ 蓄積の引き金になる可能性を示唆する。

WS5-5

アルツハイマー病発症におけるラセミ化 β アミロイド(D-Ser26 β 1-40)の役割金子 勲、久保 武一、森本 潔、熊谷 善弘
三共株式会社神経科学研究所

我々は、 β アミロイド (β 1-40, β 1-42, D-Ser26 β 25-35) は単独では脱落を起こさないが、少量の興奮性アミノ酸 (グルタミン酸) とともにラット海馬内に共注入すると、海馬領域の広範囲にわたる相乗的神経細胞脱落が誘発されることを明らかにした。

しかし、アルツハイマー病 (AD) において、老人斑中の不溶性 β アミロイド線維がなぜ遠隔部位の海馬CA1及び海馬台の錐体神経細胞を選択的に変性させるかは定かではない。この点に関して、我々は加齢現象の一つであるアミノ酸のラセミ化反応に注目し、 β アミロイドのラセミ化の観点からAD発症メカニズムについて研究を進めた。AspとSer残基をD型アミノ酸に置換した各種D型アミノ酸含有 β アミロイドを合成し、その微小線維(fibril)形成能及び神経細胞障害活性を調べた。その結果、D-Ser26 β 1-40は、 β 構造、fibril形成能及びin vitroでの神経細胞障害活性を持たずかつ可溶性であった。しかし、D-Ser26 β 1-40を脳内に存在するセロトリン様酵素とミバブタゲゼ処理すると、 β 構造及びfibril形成能を持ち神経変性作用の強いD-Ser26 β 25-35に変換されることが分った。さらに、D-Ser26 β 1-40をラット海馬にグルタミン酸と共注入したところ、各々単独では脱落は起こさないが、海馬CA1を含む広範囲の神経細胞の脱落が起ることが判明した。このことは不活性体のD-Ser26 β 1-40が脳内では活性体に変換される可能性を示唆する。

そこで、実際のAD脳でD-Ser26 β 25-35への変換が起きているか検討するために、D-Ser26 β 25-35特異的抗体2種類を作製し、AD患者脳の免疫染色を行った。その結果、AD全例 (8例) で海馬CA1及び海馬台の変性錐体神経細胞が特異的に染色されたが、正常脳6例 (age-matched control) では全く染色されなかった。また、一部の老人斑(compact type)も染色された。以上のことより、我々は、不溶性 β アミロイド (β 1-40) 線維が老人斑に蓄積後、加齢に伴いSer26残基がラセミ化されD-Ser26 β 1-40が生成されると、老人斑から溶出・拡散し、脳内タンパク分解酵素により活性体D-Ser26 β 25-35に変換されると考えた。さらに、D-Ser26 β 25-35は海馬錐体神経細胞に取りこまれ、興奮性アミノ酸に対する感受性を上げることにより、細胞傷害を与えると推定した。

WS5-6

アルツハイマー病アミロイド形成と神経細胞障害におけるNACとA β 蛋白の相互作用

田中 静吾、竹橋 正則、間藤 尚美、上田 國寛
京都大学化学研究所生体反応設計III

NAC (non-A β component of AD amyloid) はアルツハイマー病 (AD) 老人斑アミロイドより、A β 蛋白に次ぐ第2の蛋白質成分として単離同定されたペプチドである。今回、アミロイド形成と細胞障害におけるNACとA β 蛋白の相互作用を解析し、神経細胞変性制御への手掛りを探った。

【方法】まず、NAC単独ならびにA β 蛋白 (A β 25-35, A β 1-40) と比率を変えて混合し、アミロイド形成の継時変化をチオフラビンT法により解析した。また同時にコンゴレッド染色による形態の観察をおこなった。次いで、種々の条件下で作成したアミロイドを、神経分化させたPC12細胞に投与し、MTT法や細胞核染色を用いて細胞障害を解析するとともに、各種薬剤の影響を検討した。

【結果】チオフラビンT法による解析では、NACのアミロイド形成能はA β 1-40よりも強く、A β 25-35と同程度であり、線維化したNACをA β 1-40に添加することにより、アミロイド形成の促進効果を認めた。また、NAC、A β 蛋白ともにコンゴレッド染色にて緑色偏光を示したが、形態的には前者が顆粒状、後者が針状と異なっており、混合物では両者が混在していた。MTT法によるミトコンドリア機能の評価では、NACは単独でも100 nMの濃度で機能障害を引き起こし、A β 25-35と同程度の毒性を示した。また、A β 1-40と同時に添加することにより、Ab蛋白のもつ毒性を増強した。ヘキスト33258と沃化プロピディウムによる核染色から、これら細胞障害にはアポトーシスとネクローシス両者が関与していることが示された。また、抗酸化剤 (propylgallate およびBPN) の投与により細胞障害は軽減した。

【考察】以上の結果より、NACがA β 蛋白と相互作用して老人斑アミロイドを形成し、神経細胞障害性に働くことが示された。その機序については、抗酸化剤の防御効果から活性酸素の関与が考えられ、抗酸化剤の治療薬としての可能性が示唆された。脳アミロイドをターゲットとしたアルツハイマー病の治療薬の開発にあたっては、A β 蛋白のみならずNACアミロイドを考慮に入れる必要がある。

WS6-1

神経「温存」再生のための遺伝子探索とその機能解析

木山 博資、瀬尾 寿美子、湊川 一彦
旭川医科大学解剖学第一

神経再生を目指すには、2つの方法がある。損傷や変性疾患などで死へ運命づけられた神経細胞を何とか生存させ、後にこれらの細胞自身による軸索再生をめざすやり方。もう一つは、死にゆく細胞の脱落を防ぐのではなく、それを補う細胞を加えてやる方向である。「温存」か「補充」かともいえるこの二つの方法の選択は、損傷の種類や治療の時期などに強く依存する。これらのうち我々は「温存」再生をめざしており、生存しているうちに何らかの手立てを加えることにより、細胞死を防ぎ、さらに神経軸索再生を誘導しようとするものである。このため、神経損傷に対して極めて高い耐性を有している末梢神経をモデルとして、この耐性がいかなる分子基盤に因るのかを解明しようと目標を定めた。耐性の分子基盤というジグソーパズルのピースを集めるための遺伝子探索のツールとして、Differential Display法や損傷神経核のcDNAライブラリーを作成することにより、パズルの部分部分が明確になりつつある。このようにして得られた分子は本当に神経再生に期待される役割を果たしているのかは、実際に動物を用いて、得られた分子を発現させることにより損傷神経細胞を生存・再生させることができるかどうかを確認しなければならない。我々はアデノウイルスベクターを用いて損傷神経細胞に特異的に遺伝子導入することで、これらの確認を試みている。本ワークショップでは、遺伝子探索から遺伝子の生体への導入までの方法を紹介し、損傷神経細胞の生存維持・再生の促進について、我々が得た知見を紹介する。

WS6-2

グリオーシスに特異的な新規CREB/ATFファミリー転写調節因子OASISの同定

和中 明生¹、二階堂 琢也²、森 徹白¹横屋 幸彦¹、本間 豊¹、金沢 賢也¹竹内 真由美¹、菊地 臣一²福島県立医科大学学生体情報伝達研究所細胞科学研究部門、²同整形外科

中枢神経系の再生を考える上でグリア細胞の存在は抜きにして考えることは出来ない。グリオーシスは抑制的な面があると考えられておりこのグリオーシスの制御因子がもし存在するとすれば、これを用いて人為的にグリオーシスを制御することにより一般に再生しにくいと考えられる中枢神経の修復を図れる可能性がある。我々はグリオーシスに特異的に発現する遺伝子群を検索することを目的とし、マウス培養アストロサイトからdifferential display法を用いて長期培養の際に特異的に発現誘導される遺伝子群の検索を行った。OASISと命名した遺伝子はアミノ酸507個からなる蛋白をコードし、この蛋白はホモロジーサーチの結果ショウジョウバエのBBF-2に最も相同な新規のCREB/ATFファミリーに属する転写調節因子であることが分かった。成熟マウスにおいて凍結損傷を大脳皮質に与えると壊死に陥った組織の周辺にGFAP陽性のアストロサイトが出現するが、この部位に一致してOASISのmRNAが検出された。これ以外にも脊髄損傷などの際にも反応性アストロサイトに一致して発現することからこのOASISがグリオーシスの初期過程に何らかの役割を担っている可能性が高い。現在OASISの転写機構、及び強制発現の影響を検討中である。

WS6-3

哺乳動物の中枢神経伝導路の再生

井上 辰志¹、栗栖 薫¹、川口 三郎²¹広島大学医学部脳神経外科²京都大学医学部認知行動脳科学

【目的】哺乳動物の中枢神経伝導路は一旦損傷されると再生しないと広く信じられているがそうではない。ここ数年、軸索環境を軸索伸長に対し、非許容的なものと捉え、これを許容的なものに変えようとする試みがなされてきた。例えば、軸索伸長の足場として、末梢神経を用い、再生軸索を髄鞘白質から、灰白質に誘導したり、oligodendrocyteに由来する、軸索伸長阻害因子に対する抗体の投与などが相当する。しかし、これらの試みの結果得られるのは、疎で、距離的にも短い不完全な再生である。一方、神経外科臨床の現場からの要望は、十分な機能回復を期待できる量的、距離的に限定のない正常と同様な投射の再構築である。今回我々は、損傷部局所の条件を整えることにより、幼若動物、成熟動物の双方において著明な再生が可能であることを示す。【方法】Wistar系ラット(8~52日齢)の錐体路をparapharyngeal routeにより、延髄の高位で顕微鏡下にrazor bladeを用いて鋭利に片側切断する。幼若例では移植操作は行わず、成熟例では胎仔脳幹組織(E15)を移植した。手術後4日~21ヶ月後、切断側の感覚運動野にWGA-HRPを注入し、錐体路の順行性標識を行い、再生線維の切断部での状態、走行経路、終止を観察した。【結果】移植を行わない自然再生例では、最長28日齢で切断した例においても、錐体路は著明な再生を示した。移植群では、47~52日齢のラットにおいても、再生が誘導され、良好再生例では再生線維は切断部において若干の配列の乱れを生じるものの、延髄切断部を通過し、錐体交叉を形成したのち、後索を下行し、仙髄にまで達した。【結論】軸索再生の成否を左右するのは、中枢神経全体の非許容的環境にあるのではなく、損傷部の局所的条件と思われる。

WS6-4

神経再生とミクログリアの活性化—ATPによるラッフル形成の促進—

本田 静世¹、大澤 圭子¹、Fernand Lopez-Redondo¹
井上 和秀²、高坂 新一¹

¹国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

²国立医薬品食品衛生研究所薬理

我々はこれまで神経再生の分子メカニズムの解明を目的に、ラット顔面神経線維の再生系をモデルに研究を進めてきた。成熟ラットにおいて片側顔面神経線維を切断すると、顔面神経核内では運動ニューロンやアストロサイトの形態変化等さまざまな現象が観察される。その中でも最も顕著な反応はミクログリアの活性化である。増殖し、大きく形態を変化させ、かつ運動ニューロンの周囲に移動している活性化ミクログリアは運動ニューロンとのクロストークを通じ、神経の再生に重要な役割を担っているものと考えられる。

我々はこの神経再生時のミクログリアの活性化のトリガーとしてATPに着目し、培養ミクログリアへの作用を検討した結果、ATPがミクログリアからのプラスミノーゲンの放出を促進することを報告した。今回はミクログリアの細胞動態に対するATPの作用を検討した。まず、ミクログリアの細胞形態に及ぼすATPの効果を調べてみると、ATPは比較的低濃度（10・50μM）でミクログリアのラッフルリング運動を著しく亢進した。また、ケモタキシスチャンパーを用い細胞の移動能について検討してみると、これもまた著明に亢進していた。さらに、これらのATPの作用は百日咳毒素の添加によりほぼ完全に抑制されることから、ATPのラッフル形成や細胞移動促進作用はGi共役型ATP受容体を介したものであることが示唆された。

WS6-5

ミクログリア細胞移植による神経再生へのアプローチ

澤田 誠

科学技術振興事業団さきがけ研究、藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療共同研究部門

ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で、炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか、脳内サイトカインネットワークの中心的な細胞である。また最近では学習や記憶といった高次の脳機能の発現にも不可欠であることが示され、脳に特異的な役割を持った特殊化した細胞であると考えられている。脳内でのミクログリアの役割については、脳虚血や神経線維切断による神経細胞の変性にともなって活性化ミクログリアの集積や増殖が観察されることや、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患でミクログリアが活性化していることなどから、神経細胞の変性や生存維持に対する作用が注目されている。しかも最近の研究から、ミクログリアは単にマクロファージのように貪食細胞としてアポトーシスを誘導したり死細胞を除去するばかりでなく、神経細胞をアポトーシスから保護する役割も果たしていることもわかってきた。そこで末梢血管に注入したミクログリアが脳特異的に移入する性質を利用して、一過性前脳虚血を起こした砂ネズミ脳に蛍光色素標識ミクログリア導入を行い、遅延性神経細胞死が見られる海馬CA1領域の錐体細胞層に標識ミクログリアが集積することを見いだした。この時、内在するミクログリアも海馬の広範囲に渡って集積活性化し、一過性脳虚血処理をしたが、遅延性細胞死が見られなかった例においても内在ミクログリアの集積活性化が観察できた。さらに、ミクログリアを脳内導入した場合や虚血再還流直後にミクログリアを注入した場合においては有意にCA1錐体細胞の神経細胞死が抑制されることがわかった。一方、株化したミクログリアに外来遺伝子を導入したものも同様に脳特異的な侵入を示すので、神経栄養因子や神経再生促進作用のあるタンパク質の遺伝子を組み込んだミクログリアを作成することによって神経細胞死を抑制するばかりでなく、神経再生を促進することが可能となると考えられる。

謝辞：本研究の一部は藤田保健衛生大学医学部脳神経外科今井文博博士・鈴木弘美研究員との共同研究による。

WS6-6

セルソーターを用いた神経幹細胞と神経前駆細胞の選別と脊髄損傷への応用の試み

小川 祐人^{1,2,4}、宮田 卓樹^{1,2}、沢本 和延^{1,2}川口 綾乃^{1,3}、戸山 芳昭⁴、岡野 栄之^{1,2}¹大阪大学大学院医学系研究科・神経機能解剖学²科学技術振興事業団・CREST³大阪大学医学部眼科学⁴慶應大学医学部整形外科

我々はセルソーターを用い、神経幹細胞（以下NSC）及び神経前駆細胞（以下NP）を効果的に同定・分離する方法を確立し、脊髄損傷の治療への応用を試みた。NSCに発現するNestinの遺伝子のエンハンサー制御下にGreen fluorescent protein(GFP)を発現するTgマウスを作成した。同マウスの神経組織からセルソーターによりGFP強陽性細胞としてNSCを生きた状態で分離し、これらの細胞の自己複製能と多分化能を明らかにした。本来、ニューロンを産生しない部位である脊髄より調製したNestin-GFP陽性のNSCはin vitroで、ニューロンを作ることが示された。現在、in vivoでのニューロン産生を検討している。また、脊髄損傷に対する移植治療効率の向上を目的に、ニューロンの前駆細胞と幼若ニューロンで発現するT α -1 tubulin 遺伝子プロモーター制御下にYellow fluorescent protein (YFP)を発現するTgマウス及びラットを作成し、NPと幼若ニューロンをセルソーターにより選択的に分離することを可能とした。分離した細胞をラット脊髄損傷モデルに移植し、in vivoでの分化を検討している。また、作成したTg動物で、前駆細胞の性質をリアルタイムで可視化できることを利用し、Tissue explantを用いた脊髄損傷時における各種前駆細胞の動態の解析についても報告したい。

WS6-7

新たな神経再生調節因子としての酸化型Galectin-1

堀江 秀典¹、稲垣 好昌²、相馬 良明²野沢 りさ³、大川 克也³、長谷川 光広⁴村松 直樹⁴、川野 仁⁵、堀江 正男⁵、小山 洋道⁶酒井 偉久子¹、竹下 歌織¹、小和田 祐紀¹高野 雅彦⁷、門屋 利彦²¹横浜市立大学医学部生理学第1⁷横浜市立大学医学部眼科、²キリンビール医薬探索研³キリンビール基盤技術研究所⁴金沢大学医学部脳神経外科、⁵都神経研解剖発生⁶横浜市立大学看護短期大学

腎由来株細胞COS1の培養上清中に神経線維束切断端からの神経再生促進する活性を見出し、各種クロマトグラフィーにより活性因子を精製した。活性はSDS-PAGEで分子量約14kDaのバンドと一致し、シークエンス分析の結果、Galectin-1と同定した。還元状態でレクチン活性を示すGalectin-1は神経再生促進作用は示さず、細胞外に存在するレクチン活性を失った酸化型Galectin-1 (GAL-1/Ox) が μ g/mlオーダーの非常に低濃度で神経再生促進活性を示すことが明らかとなった。in vivoにおける神経損傷後の神経再生に対するGAL-1/Oxの効果を成熟ラットの坐骨神経凍結損傷による挫滅モデルと腓骨神経切断コラーゲンゲル充填シリコンチューブ縫合の2種類のacellularモデルを用い検討した。両実験の結果よりGAL-1/Oxにより神経再生が促進されることが、その抗体により神経再生が強く抑制されることが判明した。in vitroとin vivoの実験結果並びにGAL-1の再生神経線維内での存在が証明されたことから、GAL-1/Oxは生体内で神経損傷後の初期再生調節因子として重要な役割を果たしていると推察される。

WS6-8

成熟ラット海馬における神経細胞新生は虚血ストレスにより亢進する

八木田 桂樹¹、松本 昌泰^{1,2}、北川 一夫¹
 高沢 健一郎¹、大槻 俊輔¹、桑原 敬介¹
 馬淵 卓真¹、田中 茂¹、柳原 武彦²、堀 正二¹
¹大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学
²神経機能医学

【目的】成熟脳においても海馬歯状回のsubgranular zone (SGZ)と側脳室周囲のsubventricular zone (SVZ)では例外的に神経細胞新生が持続している。特にSGZの神経細胞新生は学習行動や生活環境の影響を受けることが知られており、脳機能との関連が示唆されている。今回虚血ストレスが神経細胞新生に対してどのような影響を与えるかを経時的に検討した。

【方法】雄性Wistarラット(4.5ヶ月齢)を用い、4血管一過性閉塞モデルを作成した。虚血時間は10分間とし、正常動物及び虚血後4、7、10、14、28日後にbromodeoxyuridine (BrdU: 50mg/kgBW)を4時間毎に3回腹腔内投与した。BrdU投与の翌日4%PFAにて灌流固定した後30μmのピラトーム切片を作成した。ラベルされた新生細胞は抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学染色で同定した。ラベルされた細胞の形質を検討するため、BrdUラベル後7日または28日後のサンプルに対してNeuNを神経細胞の、GFAPをアストロサイトのマーカーとした二重染色を行った。

【結果】正常動物ではSGZに少数のBrdU陽性細胞を認めた。虚血動物の海馬においてはCA1領域で遅発性神経細胞死を認めた。SGZでは陽性細胞が7日後をピークに数倍に増加しており、その後漸減して28日後にはほぼbase lineに戻っていた。BrdU陽性細胞はクラスターを形成しているところがあり、1個の幹細胞から分裂増殖したものと考えられた。二重染色を用いた検討ではラベル後7日では、これらSGZにおけるBrdU陽性細胞は神経細胞とアストロサイトのいずれの形質も示していなかったが、28日後のものでは約70%がneuronal phenotypeを示していた。

【結論】一過性前脳虚血後SGZに存在する神経幹細胞からと考えられる新生神経細胞数が増加していた。今後はこの神経細胞新生の調節機構について検討することが虚血性脳障害後の機能回復を目指す新しい治療法を考える上で重要である。

WS6-9

GDNF遺伝子導入細胞移植による黒質ドーパミン細胞の保護と再生促進

中尾 直之、板倉 徹
 和歌山県立医科大学脳神経外科

＜目的＞teratocarcinoma由来の細胞株P19は多分化能を有し、レチノイン酸(RA)処置により成熟ニューロンへと分化することが知られている。本研究では、ドーパミン(DA)ニューロンに対して強い神経栄養効果を示すGDNFの遺伝子をP19に導入しGDNF分泌機能をもたせ、さらに同細胞をRA処置で分化誘導した後にパーキンソン病モデルラットに移植しP19の神経分化の状態およびDAニューロンへの神経保護効果を調べた。

＜方法＞未分化状態のP19にマウスGDNF遺伝子を導入し、RA処置を行った後の神経分化能やGDNF分泌機能をin vitroで調べた。さらにRA処置後のP19を脳内移植しその神経分化状態やGDNF発現性を調べ、ホスト脳のDA細胞に及ぼす神経栄養効果についても検討した。

＜結果＞in vitroでは神経分化したP19は未分化P19と同レベルのGDNFを分泌し、RAによる分化誘導はGDNF発現や分泌能に影響を及ぼさなかった。移植4-8週後、ほとんどの移植P19細胞はMAP-2、synaptophysin、NeuN、SMI-34などの神経マーカーを発現し、成熟ニューロンに分化していることが示唆され、かつ安定したGDNF分泌がELISAにより確認できた。さらに、GDNF分泌P19細胞移植は6-OHDAによる黒質DA細胞の変性を抑止し、残存ニューロンからの線維再生も促進した。

＜結論＞神経栄養因子の供給手段として遺伝子導入細胞を移植する場合長期の安定した生着が必須であり、そのためには移植細胞がニューロンなどに分化しホスト脳に十分にintegrateされることが重要である。本研究結果からP19細胞のような多分化能をもつ細胞にあらかじめ遺伝子操作を行い、分化誘導物質によりニューロンに分化させた後に脳内移植する方法が、神経変性疾患に対する有力な治療戦略となることが示唆された。

WS7-1

神経栄養因子とシャペロン蛋白

小池 達郎、田中 秀逸、三浦 真紀
北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻

神経成長因子 (NGF) により分化したPC12細胞のNGF除去による細胞死ではBiP/GRP78が顕著に活性化されることを報告した (Aoki et al., 1997)。熱ショック蛋白質HSP70ファミリーのうちBiP/GRP78は小胞体のみに存在し、タンパク質の膜透過、立体構造の安定化に必要な分子シャペロンである。細胞質ではHSP70がタンパク生合成に伴うポリペプチド鎖高次構造の安定化を担っている。従ってプログラム神経細胞死においては小胞体における生合成輸送系に変化が起ることを示唆している。BiP/GRP78を活性化するパラダイムの内とくにBAPTA-AM処理やThapsigargin処理と神経細胞死との相関から、細胞死に伴う生合成輸送系の傷害を保護する役割があると考えられた。上頸神経節細胞はその生存にNGFを必要とする。in vitroのNGF投与による上頸神経節細胞の発達に伴ってBiP/GRP78の蛋白レベルは増加した。またアデノウイルスベクターに組み込んで細胞にBiP/GRP78を強制発現させると、Ca²⁺イオノフォアやThapsigargin処理による細胞内ストアからのCa²⁺放出が増大した。これはBiP/GRP78がカルシウム結合蛋白として細胞内ストアへのCa²⁺の貯蔵を増加させたことを意味する。実際、ストレスやカルシウムの過剰流入に対する神経細胞の耐性は増加する。上頸神経節細胞ではニコチン性刺激による細胞生存/細胞死抑制が効率的に起こり、生存を促進するシグナルとして働いていることが示唆された。現在、神経栄養因子のシグナルとの関連や小胞体ストレス応答との関連を調べている。

WS7-2

免疫細胞によるニューロトロフィンの産生・応答とその生理的意義

古川 昭栄、浅見 利雄、新田 淳美
岐阜薬科大学分子生物学

ニューロトロフィンファミリーは成熟ニューロンの機能維持作用に加え、種々の脳障害に抵抗するニューロン保護物質としての機能をもつ。成熟脳を損傷すると種々の脳構成細胞においてニューロトロフィンの発現が変化するが、これはニューロンを保護し、脳を修復、機能再建するための機転と考えられる。

近年、免疫-炎症-痛覚過敏といった臨床医学的にも重要な領域でNGFに固有の生理作用が報告され、NGFは神経系と免疫系を結ぶ分子として脚光を浴びている。しかしNGF以外のニューロトロフィンと免疫系との関わりについてはほとんど報告がない。最近我々は、以下に示すように、脳構成細胞だけでなくマクロファージやT細胞もニューロトロフィン

(NGF, BDNF, NT-3) の産生を介して脳損傷修復に関与することを示唆する結果を得ている。

1) マクロファージとBDNFの産生・応答

ラット脳の凍結損傷を作るとその周囲にマクロファージが出現しBDNFとNT-3を発現することを観察した。培養マウス腹腔マクロファージでも同様の発現が確認された。培養マクロファージのBDNF発現の程度は貪食能の強さと相関し、LPS刺激によって増強された。またBDNF受容体であるTrkBを発現しており、BDNFを作用させると貪食能のほかにインターロイキン-1 β の発現が著明に上昇した。以上より、マクロファージはBDNFとNT-3を産生し、特にBDNFはマクロファージにオートクライン機構で作用するサイトカインであると考えられた。

2) T細胞のニューロトロフィン産生

マイクロスフェア脳梗塞ラットの脳内に出現する活性化T細胞にNGF, BDNFの発現を観察した。株化T細胞BW5147は通常NGFしか発現しないのに、コンカナバリンAで刺激するとBDNF, NT-3の著明な発現が誘導された。梗塞障害を受けた脳では、活性化T細胞によってBDNFやNT-3が産生されることが示唆される。以上の結果より、脳は大きな損傷を受けると脳構成細胞ばかりでなく、損傷部位に浸潤してくる免疫細胞をも動員してニューロトロフィンの産生を増強させ損傷修復に役立てていると考えられる。

WS7-3

神経栄養因子受容体とガングリオシド

武藤 多津郎

福井医科大学第二内科

神経成長因子 (NGF)をはじめとする神経栄養因子類(NTF)とその高親和性受容体のTrk-ファミリーは神経系組織の中であって、神経細胞の生存・分化・機能制御に本質的な役割を果たしていることが解明されてきた。さらに、最近の欧米を中心としたこれらNTFの神経疾患患者への臨床応用への試みは新たな神経疾患治療法開発への明るい話題となっている。これらNTFの細胞内情報伝達機構はその受容体のTrkの細胞質ドメインに存在するチロシンキナーゼ(TK)の自己磷酸化反応を始点とする一連のプロテインキナーゼカスケードの詳細が検討されてきた。しかし、これらNTFの受容体機能を制御する生理活性物質に関する知見の集積は未だ不十分と言えよう。我々はこれまでこうしたTrk機能を制御する内因性の物質の探索を行ってきた。そして、1) 神経細胞膜上に存在する酸性糖脂質のGM1 ガングリオシド (GM1) がTrkに存在するTKの活性化因子であること、2) その作用はGM1とTrkとの結合によること、3) 同じ細胞でもグルコシルセラミド合成酵素の特異的阻害剤であるD-PDMPで前処理してGM1を含むガングリオシドをknock outすると、TrkはNGFに反応しなくなる事実などを報告してきた。本会では、これまでのデーターを紹介するとともに、Trk内のGM1 binding siteやcaveolae-like glycosphingolipid enriched microdomainによるTrkを介する細胞内情報伝達機構に及ぼす影響についての最近のデーターを報告する。

WS7-4

bFGF, NGFおよび EGFにおけるシグナル伝達経路の検討

山口 知子¹、川俣 貴一²、新家 一男³¹東京女子医科大学医学部生化学²東京女子医科大学医学部脳神経外科³東京大学分子細胞生物学研究所

ニューロンの生存と修復過程に近年bFGFの有効性が注目されてきているが¹、その分子機序については明らかにされていない。PC12を用いた培養系へのbFGF添加効果をNGFあるいはEGFを添加した効果と対比して、細胞の増殖と細胞活性について検討した。分子作用の特異性を調べる一つの手段として、細胞内シグナル伝達系を担ういくつかの分子活性を阻害した培養系にそれぞれのEffectorを添加して生存あるいは増殖促進効果への影響を調べた。阻害剤として、PI3 kinase系に対してはRapamycin、MAP系にはPD98059およびU0126を用いた。さらにNF- κ B阻害ペプチドのSN-50、Trk Tyrosine kinaseを特異的に阻害するといわれているK252aを用いて、培養細胞の増殖と分化へのシグナル伝達のスイッチがどの系に依存しているかを検索した。これら三つのEffectorのうち、PC12における細胞増殖への分子効果としてはEGF>bFGF>NGFであり、細胞活性効果としてはNGF>bFGF>EGFであった。U0126による細胞活性抑制効果はbFGFおよびEGFによっては回復されなかったが、NGFによっては阻害に対する保護効果がみられた。このことにより、bFGFおよびEGFのシグナル伝達系はMAP kinase系に主に依存し、NGFはRapamycinの結果よりPI3kinase系を主に介しているものと思われる。また、SN-50によって阻害されるEffectorの効果には3者間に差が認められず、NF- κ Bを介する経路への依存度は同程度と思われる。K252aによる細胞活性賦活効果の阻害はNGFで感受性が高いとはいえ、すべてのEffectorの効果が共通して阻害を受け、Trk Aのみならず、それぞれの受容体のTyrosineのリン酸化をはじめとして、細胞内分子のリン酸化がシグナル伝達の鍵を握っている。

WS7-5

成長因子で活性化されるFynによるAMPA型グルタミン酸受容体の発現制御

斎藤 真子¹、Alcino J. Silva²、山口 剛¹、林 崇³
山本 雅³、那波 宏之^{1,2}

¹新潟大学脳研究所分子神経生物学

²Cold Spring Harbor Laboratory

³東京大学医科学研究所制癌研究部

Srcファミリー蛋白チロシンキナーゼ(PTK)は神経の分化、成長、可塑性を制御しているがその活性化因子については不明点が多い。今回我々は、BDNF: brain-derived neurotrophic factor及び、PDGF: platelet-derived growth factorがSrcファミリーPTKを介してAMPA型グルタミン酸受容体、GluR1, GluR2/3の発現量を上昇させていることを報告する。BDNF, PDGFによるAMPA型グルタミン酸受容体の発現量上昇は、SrcファミリーPTK特異的阻害剤の添加により抑制された。またSrcファミリーPTKのひとつであるFyn遺伝子欠損マウスの大脳皮質培養神経細胞は、BDNFに反応しなかった。さらにFyn遺伝子欠損マウスの大脳皮質でAMPA型グルタミン酸受容体の発現量は低下していたが、mRNAレベルは低下していなかった。またBDNFはin vitroでFynの酵素活性を上昇させた。以上の結果より成長因子の下流で活性化されたSrcファミリーPTK、Fynは脳の発達段階におけるAMPA型グルタミン酸受容体の発現制御に重要な役割を果たしていることが、示唆された。現在、成長因子の下流で活性化されたFynの基質となる分子とAMPA型グルタミン酸受容体の関連を検討中である。

WS7-6

神経細胞アポトーシス制御機構におけるNF- κ Bとp75の関連

浜之上 誠^{1,2,4}、大橋 十也^{2,3}、仲嶋 一範¹

Alun Davies⁴、衛藤 義勝^{2,3}

¹東京慈恵会医科大学DNA医学研究所分子神経学研究部門、²同遺伝子治療、³同小児科、⁴St Andrews大学

Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B)は全身の組織に広く存在する転写因子で、免疫機能やアポトーシスの制御に関連していることが示唆されていたが、神経系における機能については不明であった。そこで我々は、NGFを除去することでアポトーシス状態を誘導できる培養三叉神経節細胞を使用し、まずNF- κ Bとアポトーシスとの関連性について検討を行った。結果、培養液中からNGFを除去するとほとんどの細胞がアポトーシスを起こし死滅するのに比べ、NF- κ Bを強制発現させた細胞群では、NGFが存在しないにも関わらず、ほとんどの細胞が生存し、NGFの活性にほぼ匹敵するほどの抗アポトーシス活性を確認できた。次に三叉神経節細胞がその生存にNGFが必須である細胞であることから、NGFとNF- κ Bの抗アポトーシスとの関連性を検討した。結果、NGFはNF- κ Bの活性化を効果的に誘導し、この活性化はNF- κ Bの阻害蛋白であるI κ Bで阻害された。また興味深いことに、この活性化はNGF受容体の1つであるp75の中和抗体を使用することで、ほぼ完全に阻害されることを見出した。このことから、NGFがp75からNF- κ Bに続く経路を使用して抗アポトーシス活性を発揮している可能性が考えられた。しかしながら、NGFの抗アポトーシス活性はI κ Bやp75の中和抗体を使用しても、わずかな阻害しか受けなかった。以上の結果より、1) NF- κ Bが強力な抗アポトーシス活性を有していること、2) NGF、p75との関連性において、NGFの抗アポトーシス活性の大部分はtrkを介する経路で機能しており、p75-NF- κ B経路の関与は少ないこと、が示唆された。さらにNF- κ Bがそれ単体のみならず、その作用機序の違いを利用して、NGFなど他の栄養因子との組み合わせで、より効果的に抗アポトーシス活性をも持ちうる可能性も考えられた。

WS7-7

肝細胞増殖因子受容体c-METを介した細胞種特異的シグナル伝達機構

町出 充、神鳥 和代、高坂 新一
国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

神経栄養因子はそれぞれの特異的なレセプターを介して、細胞種や細胞の状態に応じて異なる作用を誘導する。これらの作用の多様性がどのような細胞内シグナルによって制御されているかは十分に検討されていない。

肝細胞増殖因子 (HGF) はラット胎仔培養大脳皮質神経細胞に対して神経突起伸長を促し、アストロサイトに対して細胞遊走を促進する。我々はこの点に注目し、神経細胞とアストロサイトにおけるc-Met下流のシグナル経路の差異について検討した。その結果、大脳皮質神経細胞においては、PLC γ 1とPI3-kinaseの両方が発現していたにも関わらず、HGF刺激によりPLC γ 1だけが選択的にチロシンリン酸化され、その下流でc-またはnPKCの活性化を介してMARCKSやGAP43のリン酸化、MAP-kinaseの活性化が誘導された。一方、アストロサイトにおいては神経細胞の場合とは異なりPLC γ 1はチロシンリン酸化されずPI3-kinaseの活性化が認められた。

これらのことから、大脳皮質神経細胞とアストロサイトに対するHGFの作用の違いは、c-Met下流のシグナル伝達分子の選択的活性化 (または抑制) によるものと考えられた。そこでさらにアストロサイトのPI3-kinaseの選択的活性化の機構を検討した。無刺激のアストロサイト中のPLC γ 1とPI3-kinaseにはチロシンフォスファターゼが結合していたが、HGF刺激によりPI3-kinaseとの結合は解離し、PLC γ 1との結合は影響を受けなかった。すなわちアストロサイトにおけるHGFの作用は、チロシンフォスファターゼによるPI3-kinaseの抑制状態が選択的に解除されることにより誘導されたことが示唆された。

WS7-8

筋萎縮性側索硬化症と神経栄養因子

祖父江 元
名古屋大学医学部神経内科

運動ニューロンの変性、脱落をきたす筋萎縮性側索硬化症(ALS)では、現在のところ神経細胞死を抑制する根本的な治療法は確立されていない。一方神経栄養因子は神経突起の伸長や細胞死の抑制に重要な役割を果たすが、脊髄運動ニューロンに対して特異的に働き、神経の修復・再生を促進する神経栄養因子がいくつか知られている。神経栄養因子は治療へのアプローチとして大きな期待が寄せられている。GDNFは運動ニューロンに対して強力な栄養作用を有し、Retが特異的チロシンキナーゼ型受容体である。正常のヒト末梢神経系における発現分布解析では、GDNF mRNAは異なり筋肉に多く発現し、脊髄運動ニューロンにRetおよびGFR α -1 mRNAsが局在することを明らかにした。筋肉GDNF mRNAは筋細胞に局在し、ALSの初期では増加するが進行にともなって減少傾向を示した。また、ALSではRet mRNAの発現は脊髄全体で減少したが、個々の残存運動ニューロンでは発現が増加しているものも見られた。形態学的には萎縮性運動ニューロンでより増加した。一方、GFR α -1 mRNAは脊髄全体、残存運動ニューロンともに発現レベルに著変は見られなかった。次に、脊髄運動ニューロンにおけるRetのリン酸化シグナルの動態を解析するためにリン酸化RET特異抗体を作成し、ALSの残存運動ニューロンにもリン酸化RETが存在することを証明した。発現パターンには個々の運動ニューロンによって差異がみられたが、ALSでもリン酸化シグナルが伝達され、ALSの進展に伴って減少するGDNFを補充する神経栄養因子治療への可能性を示している。特に、GDNF遺伝子のプラスミドベクターをエレクトロポレーション法により筋肉へ導入する遺伝子治療の可能性についても触れる。このようなALSにおける運動ニューロン-筋肉系の系統的な解析は神経細胞死を抑制する治療法の開発にとって重要である。

WS8-1

血液脳関門におけるトランスポーター介在薬物輸送

辻 彰、玉井 郁巳
金沢大学薬学部薬効動態学

毛細血管内皮細胞で構成される血液脳関門を介した薬物の脳移行は、それらの脂溶性と分子サイズに依存する単純拡散機構に従うと広く信じられてきた。しかし近年に至り、内因性物質のみならず薬物の血液から脳および脳から血液への血液脳関門透過においてトランスポーターが介在する輸送機構が提唱されている。我々がクローニングしたモノカルボン酸トランスポーターMCT1は脳毛細血管内皮細胞の血液側膜および脳側膜に発現し、乳酸、短鎖脂肪酸、安息香酸およびその他のモノカルボン酸系化合物を輸送する。また、血液脳関門にはコリンおよびH1-受容体拮抗薬(mepyramine, azelastine, ketotifen, cyproheptadine), imipramine, propranololなどの脂溶性の塩基性薬物を輸送する二つの異なる輸送系が存在する。一方、ペプチド系化合物の脳へのデリバリーに対しては受容体介在、あるいは正電荷を有するペプチドであれば吸着介在によるエンドサイトーシス/トランスサイトーシス機構の利用が有用である。抗腫瘍薬(vincristin, doxorubicin, digoxin, quinidine、免疫抑制薬(cyclosporin A, tacrolimus)やquinolone系抗菌薬(grepafloxacin, HSR-903)のような脂溶性の薬物の脳移行は、P-糖蛋白質による能動的排出によって制限されている。さらに、in vivoおよびin vitro実験系を用いた最近の研究により、多くの薬剤が未知の能動的トランスポーターによって排出されることが報告されている。

血液脳関門に備わるトランスポーター群の輸送機能を利用することによって中枢作用型薬物の脳移行を促進するあるいは末梢作用型薬物の中枢毒性を回避するために脳移行を制限することが可能となる。

WS8-2

中枢神経における中性アミノ酸トランスポーターの同定

金井 好
杏林大学医学部薬理
科学技術振興事業団さきがけ研究

血液・脳関門においては中性アミノ酸の血液から脳への取り込み輸送系が存在する。中性アミノ酸全般を輸送するL系(system L)や、Gln、Asn、Hisを輸送基質とするN系(system N)などが知られているが、とくにL系は神経系への栄養としての中性アミノ酸の輸送を担当するのみでなく、モノアミン合成の前駆体としての芳香族アミノ酸の供給経路、及びL-DOPAの透過経路として関心が持たれ、その分子の実体の解明が待たれていた。演者らは、CD98として知られる1回膜貫通型の糖タンパク質4F2hc(the heavy of 4F2 antigen)が、L系トランスポーターの機能発現に必須の因子であるという想定のもとに、4F2hcとC6グリオーマ細胞poly(A)⁺RNAの共発現による機能発現クローニングを行い、L系トランスポーターLAT1を同定した。LAT1は12回膜貫通構造を持つと予想される糖付加を受けない膜タンパク質であり、その機能発現には4F2hcと共存することを必要とする。LAT1はLeu、Ile、Val、Phe、Tyr、Trp、Met、Hisといった大型の中性アミノ酸を輸送基質とし、脳、脾臓、胎盤そして腫瘍細胞に高発現するL系トランスポーターであった。

LAT1の塩基配列を基にして、さらに2種のLAT1類似構造を持つ神経系に発現する中性アミノ酸トランスポーターLAT2及びasc-1を同定した。両者ともに、LAT1と同様、4F2hcを機能発現に必須の補助因子として要求した。LAT2は、中性アミノ酸全般を輸送基質とし、LAT1より広い基質選択性を有するL系トランスポーターであった。これに対してasc-1は小型の中性アミノ酸を選択的に輸送し、またD-SerやD-Alaにも高い輸送活性を示すという特徴があった。

4F2hcは、脳毛細血管内皮に発現が認められ、そこに4F2hcと連結するトランスポーターが存在することが示唆される。LAT1、LAT2ともにL-DOPAを効率よく輸送し、古典的L系の機能的特徴を有している。脳毛細血管内皮での発現の検討が進行中である。

WS8-3

マウス継代脳血管内皮細胞(MBEC4)を用いたL-DOPAの脳血液関門輸送機構の解析

景山 卓、下濱 俊

京都大学大学院医学研究科脳病態生理
(臨床神経学)

【目的】L-DOPAはアミノ酸トランスポーターのひとつである system L によって輸送される。最近、複数のグループにより、system L が 4F2hc と LAT1 という2つのサブユニットからなることが証明された。一方、パーキンソン病患者においては、脱水や炎症などによりL-DOPAの作用が低下することが知られている。また、最近では一部のサイトカインがパーキンソン病の病態に関与している可能性も示唆されている。今回我々は、様々な状況下でのL-DOPAの脳内移行の変化をみるため、マウス継代脳血管内皮細胞(MBEC4)による ^3H -L-DOPAの取り込みが、薬物やストレスにより変化するか否かを検討した。

【方法】24 well-dishにMBEC4細胞を培養し、24-48時間のストレスをかけた後、 ^3H -L-DOPAの取り込みを測定した。またwestern blotにより、トランスポーター分子の発現量も検討した。

【結果】L-DOPAの取り込みは、培地中の血清を除去することで有意に低下した。また、tumor necrosis factor(TNF) α やdexamethasone処置により抑制された。一方、これらの処置では、トランスポーター分子(4F2hc、LAT1)の発現量に変化はみられなかった。高浸透圧ストレスや、interferon γ 、interleukin-2ではL-DOPAの取り込み量に変化はみられなかった。

【結論および考察】本研究により、TNF α が血液脳関門におけるL-DOPA輸送を低下させている可能性が示唆された。パーキンソン病患者では、黒質においてTNF α 陽性のグリアの増生が報告されており、このことがさらにL-DOPAの残存ニューロンへの移行を低下させている可能性が考えられた。また、炎症状況下においては、一部のサイトカインやホルモンによりL-DOPA輸送効率が低下することで、パーキンソン症状が増悪する可能性が示唆された。一方TNF α やdexamethasoneはsystem L の個々のサブユニットの発現量に変化は与えなかった。したがって、これらの刺激は、サブユニット蛋白の細胞膜への移行、サブユニット間の結合などのレベルで作用している可能性が考えられた。

WS8-4

アストロサイト産生因子による血液脳関門形質発現の誘導

山本 直樹¹、祖父江 和哉²、米田 和広³、三浦 裕¹、浅井 清文¹、加藤 泰治¹¹名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体制御部門²名古屋市立大学医学部麻酔蘇生学³名古屋市立大学薬学部製剤学

【目的】血液脳関門(B-BB)は脳のホメオスタシスを維持する機構である。一般にアストロサイトは脳毛細血管内皮細胞に作用してB-BB機能発現をされると考えられている。しかしこの作用をもつアストロサイト機能分子は未だ同定されていない。そこで今回、アストロサイト条件培養液(CM)中に存在するB-BB形質誘導因子をスクリーニングした。【方法】実験にはウシ大脳より単離した毛細血管内皮細胞を不死化した細胞株(t-BBEC-117)を用いた。B-BB特異的形質として、密着帯(TJ)、Alkaline phosphatase(ALP)活性、multidrug resistance(mdr)遺伝子やglucose輸送体(GLUT-1)遺伝子の発現、D-glucoseの取込を指標とした。透過性は細胞間隙のみを通過する ^3H -glucoseを用いて測定した。【結果】t-BBEC-117細胞はB-BB特異的形質をほぼ保持していた。二重層培養系の外側にアストロサイト、内側にt-BBEC-117共培養するとt-BBEC-117のL-glucose透過性は50%に低下した。アストロサイトが産生する既知のサイトカインを用い、ALP活性を指標としたB-BB形質誘導活性をスクリーニングした。bFGFが一番強い活性をもち、CM中のALP活性もbFGFに起因することが示された。またbFGFはL-glucose透過性も抑制した。さらにGLUT-1を介する2-deoxyglucoseの取込みもb-FGFやCMによって上昇した。ただmdr遺伝子及びGLUT-1遺伝子の発現量はb-FGFでもCMでも変化なかった。【結論】アストロサイトの条件培養液中にはbFGFが存在し、t-BBEC-117細胞のB-BB機能を誘導(ALP活性促進、L-glucose透過性抑制)している。しかし他のmdr遺伝子及びGLUT-1遺伝子の発現には影響を及ぼさず、全てのB-BB特異的形質の発現にはb-FGF以外のアストロサイト因子も存在することが示唆された。

WS8-5

炎症性サイトカインによる血管脳関門の細胞接着分子の発現調節

山脇 正永、神田 隆、水澤 英洋
東京医科歯科大学神経内科

(目的) 多発性硬化症等の炎症性疾患において、リンパ球の血管脳関門のtransmigrationの段階で種々の細胞接着分子(CAMs)とcytokinesが関与しており、この段階をブロックすることによる治療法も試みられている。我々は種々のcytokinesにて培養脳微小血管内皮細胞(BMECs)を刺激し、その細胞膜表面の細胞接着分子の発現変化につき検討した。

(方法) ウシ脳をホモジュネートとしcollagenase-dispase処理をした後、BMECsのprimary cultureを作成した。2週間培養した後にcellular ELISA (cELISA)法にて検討した。Microtiter plateに5 x 104/ wellのBMECsを用いた。細胞を約48時間培養しconfluentとなった時点でIL-1 β , TNF α , endothelin-1 (ET-1)等のcytokinesをin situで刺激し測定した。定量的分析にはWestern-blotting法、TLC-immuno-blotting法、ELISA法を用いた。

(結果) サイトカイン非刺激のBMECsにはGM3, GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GA1, E-selectinが発現していた。SGPG, LeX, sialyl-LeX (sLeX)の発現は認めなかった。IL-1 β によりGM3 (392 %), GM1 (135 %), SGPG, E-selectin (218 %)の発現増加を認めたが、LeX, sLeXの発現は認めなかった。定量的分析でもBMECsにはcytokine刺激前及び後にLeX, sLeXの発現を認めなかった。

(考察) GM3, LeX, sLeX, SGPG, E-selectinは糖鎖の関与したCAMsとして知られている。In vitroの研究ではGM3はhomo-philic adhesionを、SGPG・LeX・sLeXはL-及びP-selectinのligandである事が報告されている。今回の検討では白血球のCNSホーミングの第一段階であるrollingの段階で、白血球側のL-selectinのligandとして脳血管内皮細胞側ではLeX・sLeXではなくSGPGが主要な役割を演じていると考えられた。

WS8-6

ラット脳虚血時の脳血液関門とグルタミン酸再吸収機構の脳温による影響

浅井 聰、趙 恒、永田 俊人、高橋 泰夫
石川 紘一
日本大学医学部薬理学

虚血性神経細胞死が驚くほど虚血中の温度に依存し、数度の脳温低下が、虚血性障害を劇的に減少させることが知られているが、数多くの研究結果から、明らかな温度依存性があるのは、虚血中の細胞外へのグルタミン酸 (GLU) 濃度の放出量の減少であったことから、その減少は脳温低下による細胞保護効果の有力なメカニズムの一つであると考えられている。また、形態的变化では、脳血液関門の傷害も特徴的である。

近年我々は、微小透析電極 (Dialysis Electrode) とフェロセンを用いた、酸素非依存性GLUのリアルタイム測定系を開発し、ラットを使った虚血再灌流実験系で、虚血中に起こる二相性 (神経伝達物質と代謝プール) のGLU放出機構 (Anoxic depolarization とGLUトランスポーターの逆回転放出機構) と再灌流後に起こるGLUトランスポーターによると考えられるグルタミン酸再吸収機能を区別し、より詳細なGLU動態の解析が可能になった。ラット10分間の虚血再灌流モデルにおいて、脳温と虚血時のGLU動態を詳細に検討した結果、虚血中のGLUの上昇は、脳温上昇によって変化を示さず、再灌流後のGLUの上昇を遷延させたことから、以前から言われていた脳温上昇による虚血中のGLUの放出の増加は、脳温の上昇によって、虚血再灌流後のグルタミン酸の取り込み機構が障害され、その結果としてグルタミン酸の上昇が遷延する可能性を示唆した。したがって、グルタミン酸再吸収機構は、脳虚血再灌流障害に密接に関わっており、グルタミン酸再吸収を促進する、すなわち、GLUトランスポーターが、脳虚血性疾患に密接に関与している可能性が示唆された。

WS8-7

心停止後の血液脳関門および血液脊髄 関門の機能的変化- 心停止、蘇生マウスを用いた hemodynamic study-

水島 秀勝^{1,3}、W.A.Banks³、土肥 謙二¹中村 精紀¹、松本 清¹、塩田 清二²¹昭和大学医学部脳神経外科²昭和大学医学部解剖学第1³VAMC, St. Louis University

【目的】血液脳関門(BBB)及び血液脊髄関門(BSCB)は、外傷、脳虚血などの外的変化により脳浮腫などさまざまな二次的合併症をもたらすことが報告されている。そこで今回我々は心停止後のBBB及びBSCBの経時的な機能変化を調べるためにAlbumin、TNF- α およびPituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)をラジオアイソトープでラベリングしBBB、BSCBの障害程度を定量的に解析した。

【方法】ICRマウスを全身麻酔下に3.5分間の心停止を行い、その後CPRを行い蘇生した。Day 0, 1, 2, 3, 5, 7及び6h, 12h群を作成した。I131標識Albumin, TNF- α , PACAPをG-10 Sephadex column法で作成し、頸静脈から静注後I131-Albは60分後、TNFおよびPACAPは10分後に頸動脈から血液を採取し直ちに断頭し脳及び脊髄を摘出し、脳、脊髄、血液中のRI活性を測定しbrain/serum, spinal cord/serum比でBBB、BSCBの機能的変化を調べた。また心停止マウスの虚血後の体重、脳、脊髄の各重量変化も併せて測定した。

【結果】心停止後のマウスの体重はDay 2で15%の減少を示しその後漸次改善した。脳の体重変化では心停止後Day5,7で有意な体重減少を認めたが脊髄では変化を認めなかった。BBBに関してはDay5にAlb, TNFの最大透過性をみとめた。しかしPACAPでは変化を認めなかった。一方BSCBではDay 2でPACAPの最大の透過性を示し、さらに脊髄の部位別の機能変化を調べたところ胸髄レベルで透過性亢進が顕著に見られた。しかしAlb, TNFでは変化を認めなかった。

【結論】BBBに関してはDay5にて軽度BBB透過性の亢進を認めた。BSCBに関しては、PACAPが虚血後早期にBSCBを通過することが明らかとなり今後脊髄損傷の治療に用いる可能性が考えられた。

WS9-1

痛覚閾値に対するドパミン受容体の作用
一特に部位差の検討一野元 正弘、清水 隆雄、福田 健夫、益山 隆志
鹿児島大学医学部薬理学

NLA(neuroleptanalgesia)では鎮痛薬のfentanylとともに鎮静薬としてdroperidolが用いられる。droperidolやsulprideはドパミン受容体拮抗薬であり鎮静作用があるが、中枢作用として鎮痛薬の効果を高めるように作用することが知られている。一方、L-dopa加療時にはL-dopaの作用の切れるときに一致して痛みを生じる。私たちはこれかL-dopa投与後の鎮痛作用の反跳現象としての痛覚過敏であることを明らかにした。すなわちドパミン受容体の刺激は脊髄では痛覚閾値を上昇させる。以上のことからドパミン受容体による痛覚閾値の制御には部位差のあることが示唆される。このことを確認するために以下のような検討を行った。【方法】ddYマウスを用いた。L-dopaは脊髄クモ膜下腔、脳室内、腹腔内に投与した。疼痛の評価はサブスタンス P(SP)仮性疼痛反応の測定、あるいはテールフリック法で行った。SP仮性疼痛反応はSP(6-9pmol)を脊髄クモ膜下腔に投与し、直後より1分間の腰尾部へのなめる反応あるいは引っかかり反応の回数を測定した。【結果】L-dopa 1nmolの脊髄クモ膜下腔内投与は、SP仮性疼痛反応を8%に抑制した。この抑制はL-dopaの同量を脳室内に前投与することにより完全に消失した。なお、L-dopaの腹腔内投与はテールフリック反応を変えなかったが、DOPA脱炭酸酵素阻害薬のbenserazideを脳室内へ投与してL-dopaを腹腔内へ投与すると、テールフリック反応は対照に較べて有意に延長し鎮痛作用がみられた。

【考察】脊髄では鎮痛に作用するドパミンは脳内では反対に作用した。大脳辺縁系はopioidの作用部位であるが、ドパミン受容体も豊富に分布する。辺縁系はドパミンが脳内で痛覚に関与する部位の候補の一つであろう。【結論】脊髄においてはドパミンは鎮痛に作用し、脳内のドパミンは脊髄での鎮痛効果を減弱させることが示された。

WS9-2

痛みとサブスタンスP

井上 敦子、森岡 徳光、熊谷 圭、武田 和美
秀 和泉、仲田義啓
広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学

サブスタンスP(SP)は、侵害情報を伝達するペプチド性神経伝達物質である。サブスタンスPは脊髄後根神経節で遺伝子より前駆体ペプチドを介して生合成され、末梢の疼痛刺激により、脊髄後角において一次知覚神経終末部から遊離される。神経伝達物質の遊離活性はその神経の活動度を現わすものであり、すなわち一次知覚神経のサブスタンスP遊離活性は痛みの伝達活性を示すものであると考えられる。本研究では、SPの遊離調節機構解明の目的で、一次知覚神経に着目し初代培養脊髄後根神経節(DRG)細胞を使用した。

成熟Wistar系ラットからDRGを単離し、酵素処理することにより分散させ、初代培養細胞を作成した。インターロイキン-1 β (IL-1 β)は炎症に関わるサイトカインである。炎症時に痛覚過敏が起こることから、培養DRG細胞SPに及ぼすIL-1 β の影響についてそのメカニズムを検討した。

IL-1 β は、0.1ng/mlをDRG細胞培養液中に添加すると6時間で培養液中のSP遊離量を約50%有意に増加した。この作用はEDTAにより抑制されCa依存性であった。またIL-1 β の作用はIL-1受容体アンタゴニストおよびアスピリンやインドメタシンなどのシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害薬により抑制された。従ってIL-1 β の作用はIL-1受容体およびプロスタノイド系を介したものであることが示唆された。さらにIL-1 β の作用はCOX-2特異的阻害薬であるNS-398とデキサメタゾンにより抑制され、IL-1 β 処置により培養DRG細胞においてCOX-2 mRNAの一過的増加が観察された。膜透過性の8-bromo-cAMPを培養液中に添加すると30分でDRG細胞からのサブスタンスP遊離増加が観察された。以上の結果は培養DRG細胞においてIL-1 β がCOX-2によるプロスタノイドcAMP経路を介してサブスタンスP遊離を誘発することを示唆するものであり、IL-1 β による痛覚過敏のメカニズムの一部を説明しうる作用であると考えられる。

WS9-3

ニューロトロフィンによる痛覚および触覚の調節

荒川 義弘¹、渡邊 真知子¹、遠藤 之洋¹
木元 克輔¹、仙波 りつ子²

¹東京大学医学部附属病院分院薬剤部

²愛知県コロニー研究所

NGFは、局所投与により痛覚過敏を惹起すること、炎症時における痛覚過敏発現に関与することなどが明らかになっている。一方、他のニューロトロフィン (NT) については、皮膚知覚に対する機能は明確ではない。そこで、皮膚におけるNTの発現量を正常時および炎症時について測定し、痛覚および触覚機能との関連性について検討した。また、NT局所投与による作用についても検討した。炎症モデルは、ラットの右後肢足裏にアジュバントを皮下注射して作成した。組織中NT mRNAの測定は、各NTの標準RNAと内標を用いたRT-PCR-HPLC法を確立して行った。NT蛋白量はELISA法により測定した。圧痛覚はvon Frey hairs法により、熱痛覚はwater bath法により測定した。触覚は、中空に懸垂した足をペイントブラシでなで、足を屈曲する頻度により評価した。正常ラットにNTを足裏に局所投与した場合、NGFは1時間後で既に圧痛覚と熱痛覚の過敏を生じ、BDNFはNGFより多い量で遅れて圧痛覚の過敏を生じ、NT-3は何れにおいても変化が見られなかった。一方、炎症モデルにおいては、NGF mRNAは急速に誘導され6 hrでピークに達した後、急速に低下した。BDNFとNT-3のmRNAの発現は逆に急速に低下し約10時間で最低になった後、2ないし3日で回復した。NGFとNT-3の蛋白の動きもほぼ同様であったが、BDNFは何れにおいても測定限界以下であった。一方、この時、熱痛覚はNGFの動きとよく一致し、熱痛覚が神経終末においてNGFによる調節を受けていると考えられた。圧痛覚の過敏にもNGFの関与が報告されているが、NGFレベルが低下した後も過敏状態が持続することから、上位での2次的な変化が考えられた。触覚については、炎症とともに低下することを見だし、その動きはBDNFおよびNT-3のうごきと一致した。BDNFやNT-3が低下している5時間後にBDNFやNT-3を投与すると、BDNFでは回復促進することがわかり、BDNFが触覚機能の維持に重要な因子であることが明らかとなった。

WS9-4

痛みとオピオイド受容体

南 雅文、佐藤 公道

京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬および内因性オピオイドペプチドは、生体内に存在するオピオイド受容体に作用することにより痛みの情報伝達を抑制的に修飾する。現在までに、一次感覚神経から脊髄後角への痛覚情報伝達とオピオイドによる制御に関する神経化学的機序は、かなり明らかにされてきた。演者らも、痛覚情報伝達への関与が考えられているサブスタンスPやグルタミン酸の一次感覚神経終末からの遊離が、オピオイド類、特に μ オピオイド受容体アゴニストにより強く抑制されることを見だし、さらに、ダブルインジツハイブリダイゼーション法によりサブスタンスP前駆体mRNAを発現する一次感覚神経細胞の90%以上が μ オピオイド受容体mRNAを発現していることを報告している。また、脊髄後角に発現しているオピオイド受容体が痛覚情報伝達制御に関与することを示唆する研究結果として、持続的な侵害刺激によりサブタイプ特異的な受容体遺伝子発現変化が起こることも見だし、脊髄後角におけるオピオイド鎮痛の神経化学的機序がかなり明らかにされてきたのとは対照的に、高次中枢におけるそれは不明な点が多い。今後、体性感覚情報の中継核である視床や、痛みに伴う不安、怒り、抑鬱などの情動反応形成に関与していると考えられる扁桃体などにおけるオピオイドの作用の神経化学的機序を明らかにしていく必要がある。特に、情動面での変容が痛みの感覚を修飾し、また、臨床上、痛みに伴う不安や抑鬱などの情動反応が病状の悪化や治療の妨げにつながる場合があることなどを考えると、扁桃体をはじめとする大脳辺縁系におけるオピオイドの作用機序を明らかにすることは重要である。演者らは、インジツハイブリダイゼーション法により、扁桃体において μ および κ オピオイド受容体mRNAが強く発現していることを見だし、現在、ダブルインジツハイブリダイゼーション法により、それらオピオイド受容体発現細胞が含有する神経伝達物質あるいは神経ペプチドを明らかにすることを試みている。

WS9-5

痛覚伝達系における P2X 受容体の役割

井上 和秀¹、津田 誠¹、上野 伸哉²¹国立衛生研究所薬理学²福岡大学医学部薬理学研究所

三叉神経節および後根神経節におけるイオンチャネル型 ATP 受容体の一つである P2X₃ 受容体の特異的発現が報告されて以来、痛覚伝達系における P2X 受容体の生理的役割が注目されている。我々は、急性単離したラット脊髄神経後根節細胞 (DRG) を細胞体の大きさおよび capsaicin に対する反応性の有無から 3 種類に分類し、ATP により誘発される内向電流を whole-cell patch clamp 法によりそれぞれ測定した。その結果、小型の capsaicin 感受性 DRG においては急激な脱感作を伴う電流が、中型の capsaicin 非感受性 DRG では脱感作を示さない電流がそれぞれ出現した。しかし、大型の細胞では ATP 誘発内向き電流が検出できなかった。P2X 受容体の遺伝子を導入した C6BU-1 細胞における電気生理学的検討と in situ hybridization 法を用いたラット DRG における P2X 受容体の局在性を検討した結果より、小型の capsaicin 感受性 DRG での ATP 誘発電流は P2X₃ 受容体を、中型の capsaicin 非感受性 DRG では P2X₂₊₃ 受容体を介することが明かとなった。

一方、行動薬理学的検討から、ラットの足底部に P2X 受容体作動薬を投与することで疼痛反応が惹起されることが報告されている。また、我々は、P2X 受容体作動薬をマウスの髄腔内に投与することにより、熱刺激に対する痛覚過敏を誘発することを明らかにした。その発現機序として、脊髄後角に終末している一次知覚繊維の末端部に存在する P2X₃ 受容体の活性化が glutamate 遊離を誘発し、遊離された glutamate による NMDA 受容体の活性化が重要であることを想定している。以上の知見から、一次知覚繊維における P2X 受容体は、末梢側においては痛みの発生に、一方中枢側では痛みの調節にそれぞれ役割を担っていることが示唆される。

WS9-6

片頭痛関連遺伝子

竹島 多賀夫、足立 芳樹、楠見 公義
古和 久典、中島 健二
鳥取大学医学部脳神経内科

片頭痛は拍動性頭痛に悪心・嘔吐・光過敏・音過敏を伴う遺伝性疾患である。欧米では人口の約15～20%が、本邦では約9%が罹患している。片頭痛は未解明の点が多いが、病態仮説として三叉神経・血管説が提唱されている。硬膜血管には三叉神経終末が分布しており、その興奮により無菌性炎症をきたすとするものである。セロトニン、サブスタンスP等の神経伝達物質が関与する。

単一遺伝子異常による特殊な片頭痛としては、19番染色体に連鎖する家族性片麻痺性片頭痛(FHM)において、P/Q型Caチャンネルのサブユニット(CACNL1A4)の点変異が同定された。また、ミトコンドリア遺伝子変異によるミトコンドリア脳筋症では片頭痛様頭痛を合併し片頭痛におけるミトコンドリア機能が検討されている。

一方、大多数の片頭痛では遺伝的に規定された発症閾値と食事・ライフスタイルを含めた環境要因の関与が想定されており、片頭痛発作の誘発閾値を低下させる遺伝子の探索がなされている。セロトニン受容体(5HTR)には複数のサブタイプが知られているが、5HT2C-R Codon 23にはCys:Ser遺伝子多型がある。我々はSerアリル頻度が前兆を伴う片頭痛群で非頭痛対照と比較して有意に高いことを見出した。ドパミン受容体(DRD2)遺伝子多型(C313T, His)において欧米白人の片頭痛患者でCアリル頻度が有意に高いと報告されたが、日本人における我々の検討では有意差はなかった。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR)のC677T遺伝子多型は冠動脈疾患・脳血管障害との関連において注目されているが、頭痛患者の検討では片頭痛群(n=74)におけるTアリル頻度は0.48で、非頭痛健常対照群(n=261)の0.35と比較して有意に高かった。さらに“前兆を伴う片頭痛”群では0.64と著明に高いTアリル頻度であった。MTHFR変異により軽度の高ホモシステイン血症をきたすことが知られているが、興奮性アミノ酸として作用するホモシステインが片頭痛の発症閾値に影響するものと考えられる。片頭痛関連遺伝子の検索結果と片頭痛発症機序の関連についても考察する。

WS9-7

ノシセプチンと痛み

植田 弘師
長崎大学薬学部分子薬理学

ノシセプチンは脳内あるいは脊髄内に投与した際に疼痛過敏や鎮痛が観察されるが、疼痛制御に関するそのメカニズム並びにその生理的役割については十分な検討はされていない。我々は新しく考案した末梢性疼痛試験法を用い、サブフェムトモルレベルでの疼痛誘発作用を見出し、しかもカルシウム流入を含む細胞内メカニズムによるサブスタンスP遊離を介することを見出している。同レベルのノシセプチンを脊髄腔に投与した際にも同様な侵害反応が観察されるが、ピコモルレベルの末梢端並びに脊髄腔への投与ではそれ自身の侵害応答は極端に減弱し、逆にサブスタンスP誘発侵害作用を抑制した。我々はこの作用の違いが侵害受容器末端におけるリガンド結合以降の受容体クロストークに関係があることを見出している。更に、脊髄後シナプスにおけるノシセプチンの役割をカプサイシン処理マウスあるいはタキキニン遺伝子欠損マウスを用いて検討したところ、ノシセプチンは侵害応答に対し抑制作用を示した。疼痛制御機構におけるノシセプチンの生理的役割を検討するため、ノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスを用いたところ、遺伝子欠損マウスでは他の発痛物質(ブラジキニンなど)の末梢端への投与によるサブスタンスP神経を介する効果を1000倍以上も過敏にさせた。更に、脊髄腔に投与したサブスタンスPによる侵害反応も著明に増強した。従って、ノシセプチン神経系は脊髄において、サブスタンスP神経の受容ニューロンの下流に存在し、疼痛抑制としての生理的役割を有していることが示唆された。

脊髄における痛みの発現機序

南 敏明¹、伊藤 誠二²

¹大阪医科大学麻酔科学

²関西医科大学医化学

演者らは、マウス髄腔内に投与した PGE_2 と PGF_2 が生理活性物質としてはじめてアロディニア (軽い触覚刺激で誘発される痛みの現象) を誘発することを見いだした。薬理学的実験および NMDA グルタミン酸受容体ノックアウトマウスを用いた実験から、 PGE_2 と PGF_2 によるアロディニアはグルタミン酸 NO を介することを明らかにした。さらに、生後 2 日目のマウスにカプサイシン処理を行い C 線維を除去したマウスでアロディニアの実験を行うと、 PGF_2 によるアロディニアはカプサイシン処理により全く影響されなかったが、 PGE_2 ではカプサイシン処理をしたマウスではアロディニアが全く誘発されなくなった。また、 PGE_2 のアロディニアはモルヒネで抑制されるのに対し、 PGF_2 のアロディニアは抑制されない。正常な状態では、触覚刺激を伝達する A β 線維は痛覚伝達に関与しないが、病的な状態においては A β 線維がアロディニアの伝達に関与すると考えられていた。これらの結果は、アロディニアに C 線維を介するものがあることが示され、アロディニアにはモルヒネに感受性のものと非感受性のものと少なくとも 2 種類あることが示された。

Meunier らおよび Reinscheid らのグループとはほぼ同時に、演者らはウシ脳から新しいタイプのオピオイド受容体 ROR-C の内因性リガンド、ノシセプチンの単離・同定に成功した。ノシセプチン前駆体 mRNA が脊髄後角に存在し、髄腔内投与したノシセプチンが生理的濃度でアロディニアを誘発すること、ノシセプチンの痛覚反応がグリシンの同時投与で抑制されることから、その作用が中枢性の脱抑制に起因することを明らかにした。

PGE_2 および PGF_2 は興奮系アミノ酸グルタミン酸による神経シナプスの可塑性により、神経細胞の感受性が増大しアロディニアを誘発する。ノシセプチンは抑制系アミノ酸グリシンの脱抑制によりアロディニアが生じる。アロディニアの発現には、少なくとも 2 つの機構が存在することが明らかとなった。

V1-01

セロトニンによるラット前頭葉アセチルコリン分泌の制御機構 (VII) : ACh分泌における5-HT_{2A}受容体と5-HT_{1A}受容体との相互関係

平野 均¹、松田 芳人²、渡辺 義文²、平田 牧三¹
¹山口大学保健管理センター、²山口大学医学部神経精神医学教室

5-HTによる皮質ACh分泌の制御機構を解明する一環として、脳微小透析法を用いて前頭葉ACh分泌における5-HT_{2A}受容体と5-HT_{1A}受容体の相互関係について検討した。

Wistar 系雄性ラットの前頭葉に透析プローブを留置し、2日後に無麻酔・自由行動下で人工脳脊髄液を還流し、透析液中に回収されるAChをHPLC-ECDにより10分間隔で測定した。5-HT_{1A}受容体agonistの8-OH-DPATと antagonist のWAY 100-635は蒸留水に、5-HT分泌促進薬のfenfluramine、5-HT₂受容体agonistのDOI、5-HT_{2A} antagonist のketanserin は生理食塩水に、またプローブを介して前頭葉に60分間にわたって投与した8-OH-DPATとWAY 100-635は人工脳脊髄液 (pH 7.4) に溶解した。

皮下 (1.0 mg/kg) ならびに前頭葉 (10 μM) に投与した8-OH-DPATは、共に前頭葉ACh分泌を有意に増加した。一方、皮下 (0.1 mg/kg) あるいは局所投与 (0.1, 10 μM) したWAY100-635は、ACh分泌には影響をもたさなかった。さらに fenfluramine (10 mg/kg, i.p.)、またはDOI (2.5 mg/kg, i.p.) 投与30分後に局所投与した10 μMのWAY 100-635も、fenfluramine とDOIのACh分泌増加作用には何ら影響しなかった。しかし、同様の方法でDOI投与後に前頭葉に投与した10 μMの8-OH-DPATは、ACh分泌をさらに著しく増加した。一方、ketanserin (5.0 mg/kg, i.p.) 投与30分後に局所投与した同濃度の8-OH-DPATはACh分泌を軽度増加したが、ketanserin 単独投与群との比較では有意差は認められなかった。

以上の実験結果から、①5-HTはシナプス後5-HT_{1A}受容体を介してACh分泌をtonicには促進していない、②fenfluramineによるACh分泌の増加は主として5-HT_{2A}受容体を介して行われており、この際5-HT_{1A}受容体は重要な役割を担っていない、③5-HT_{2A}受容体が活性化している状態では、5-HTによるシナプス後5-HT_{1A}受容体を介するACh分泌促進作用は亢進している可能性が示唆された。

V1-02

ラット前頭葉におけるキノリン酸注入後の内在性D-セリンの変化

岩間 久行、山本 直樹、高橋 勝宣、
 海野 麻未、西川 徹
 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部

D-セリンは、NMDA受容体のアロステリック・アゴニストとして作用する脳内在性物質である。D-セリンに対する抗体を用いた免疫組織化学的研究やグリア細胞における取り込み活性の解析結果等から、内在性D-セリンは主としてグリア細胞に含まれることが示唆されてきた。さらに、細胞外液中のD-セリン濃度が神経伝導遮断薬の灌流によっても減少せず脱分極刺激後に増加しないことから、内在性D-セリンはグリア細胞から放出されている可能性がある。今回、ニューロンとD-セリンとの関連を明らかにする目的で、神経細胞体を選択的に破壊 (グリア細胞や神経終末は存続) する毒素のひとつであるキノリン酸 (240 nmol/ side) を注入したラット前頭葉皮質組織中のD-セリンの変化を調べた。注入1週間後では、従来の報告に一致してL-グルタミン酸やGABAの含量が著明に低下した。この時、D-セリンも対照群 (生食投与) の30%程度にまで低下することが明らかとなった。一方、L-セリンは約70%残っていることから、このD-セリンの著明な低下はD-体の特異的な変化であると考えられる。一方、大脳皮質の局所破壊によって線状体部分のD-セリン含量にほとんど変化が認められず、線状体の局所破壊によっても大脳皮質部分のD-セリン含量に変化がないことから、このD-セリン含量の変化は他部位から投射を受けた神経終末よりもむしろ局所に存在する神経細胞体の破壊を反映したものと考えられる。マイクロダイアリシスの結果、キノリン酸によって局所の細胞外液中D-セリン濃度も対照群の約50%に低下した。今回の結果は、ニューロンがD-セリンの代謝に関与する可能性を示唆する。ニューロン-グリア細胞間の相互作用がその調節に関わる可能性が考えられる。

V1-03

ラット松果体に発現しているAMPA型グルタミン酸受容体の機能

八代 聖基¹、山田 浩司¹、林 美都子¹、
山本 章嗣²、坪井 誠二¹、森山 芳則¹

¹岡大・薬・生理化学、²関西医科大学・第一生理

ラット松果体実質細胞(pinealocyte)は時間情報ホルモンであるメラトニンを分泌するだけでなく、興奮性のアミノ酸であるL-グルタミン酸を開口放出している。我々は、昨年の本大会において放出されたグルタミン酸がパラクリンの作用し、代謝型受容体(mGluR3)を介して松果体細胞のメラトニンの合成を抑制していることを報告した(1)。

今回我々は、松果体にイオン型グルタミン酸受容体も発現していることを見いだした。RT-PCR法及びNorthern blotting法によりラット(3週令オス)の松果体にGluR1・KA2・NR2Cの3種類のmRNAを検出した。GluR1は蛋白質レベルで同定できるが、他のものは検出できなかった。GluR1は松果体細胞の原形質膜に存在していた。Fura-2を負荷した松果体細胞にAMPAを添加すると一過性に細胞内Ca²⁺濃度が上昇した。この上昇は細胞外液にCa²⁺が存在しないと起こらず、AMPA型受容体のアンタゴニストやL型Ca²⁺チャンネルブロッカーにより阻害された。一方、NMDAでは細胞内Ca²⁺濃度は上昇しなかった。AMPAによりグルタミン酸が開口放出された。

以上の事から松果体には機能的なGluR1が発現しており、この受容体を刺激するとマイクロベシクル内のグルタミン酸が開口放出されると結論した。従って、松果体細胞ではグルタミン酸依存的にグルタミン酸が分泌され、器官全体に刺激が効率的に伝達されている可能性がある。

(1) Yamada et.al(1998) J Neurosci 18:2056-2062, 4946-4952.

V1-04

副腎におけるNMDAレセプターの発現

檜井 栄一¹、名田 聡美¹、荻田 喜代一¹、
米田 幸雄²

¹摂南大・薬・薬理、²金沢大・薬・薬物

グルタメイト(Glu)レセプターは、イオノトロピック型とメタボトロピック型に大別され、前者はさらに外因性アゴニストに対する感受性の相違によりNMDA型とnon-NMDA型に分類されるが、いずれのサブタイプも中枢神経系に局在性が高いと理解される。しかしながら、演者らは以前に脳以外にも末梢組織である下垂体や副腎に、³H]Glu特異的結合部位が存在する事実を見出した。したがって、今回はRT-PCR法およびイムノブロット法などを用いて、これら末梢組織におけるGluレセプター局在の可能性を検討した。

ラット全脳、下垂体および副腎からtotal RNAを抽出したのち、oligo(dT)カラムによりmRNAを精製し、各GluレセプターサブユニットのcDNAsを特異的に認識するプライマーを用いたRT-PCRを行った。その結果、全脳標品では調べたすべてのイオノトロピック型GluレセプターサブユニットmRNAの発現が認められたのに対して、下垂体ではNR2B以外のすべてのサブユニットmRNAが、また副腎においてはGluR1,2,3,5およびNR1,NR2C,NR2DサブユニットmRNAがそれぞれ検出された。

次いで、各Gluレセプターサブユニットを特異的に認識する抗体を用いたイムノブロットイングにより、ラット全脳、下垂体および副腎におけるレセプタータンパク質の発現を併せて検討したところ、全脳では調べた全サブユニットの発現が観察されたのに対して、副腎髄質ではNR1の発現が、また下垂体ではGluR6/7およびNR1の発現がそれぞれ認められた。

以上の結果より、中枢神経系だけでなく末梢組織である副腎や下垂体においても、NMDAレセプターが存在する可能性が示唆される。

V1-05

ヒスタミン H₁ 受容体の細胞内
internalization

福井 裕行¹、中川 美和子¹、藤本 勝巳²、
堀尾 修平¹、久山 哲廣¹

¹徳島大学薬学部薬理学、²広島大学歯学部生化学

ヒスタミン H₁ 受容体は中枢ヒスタミン神経系の覚醒作用、食欲調節、飲水調節、体温調節、平衡感覚調節、神経内分泌調節、痙攣抑制などのヒスタミンの多彩な中枢機能を仲介する。そして、H₁ 受容体はニューロンのみならずグリア細胞にも多く存在する。H₁ 受容体の脱感作は H₁ 受容体発現細胞を保護する機構であると考えられ、ヒスタミンおよびそれ以外の神経作用物質により引き起こされる。そして、受容体リン酸化が関与することが明らかにされつつある。H₁ 受容体の脱感作は受容体の G 蛋白との uncoupling、細胞内への internalization、受容体数の down-regulation の 3 つのステップに分けられる。今回、internalization について調べた。ヒトのリコンビナント H₁ 受容体を発現する Chinese hamster ovary (CHO) 細胞をヒスタミンで刺激すると、破碎した CHO 細胞の異なる密度のショ糖重層による超遠心により H₁ 受容体が細胞膜分画より密度の小さい分画に移行し、internalization が引き起こされたと考えられた。蛋白キナーゼ C (PKC) の活性化は H₁ 受容体の脱感作を引き起こすが、ホルボールエステルによる刺激も H₁ 受容体の internalization を引き起こした。しかし、ヒスタミン刺激による H₁ 受容体の internalization は PKC 阻害薬により抑制されなかった。H₁ 受容体の PKC リン酸化部位であり、脱感作に関与する Ser398 を Ala に変異させた S398A H₁ 受容体はヒスタミンによる internalization が著明に減弱した。

V1-06

DAMP法を用いた松果体細胞のシナプス小胞
様オルガネラ (マイクロベジクル) 内部pH
の測定

林 美都子¹、山本 章嗣²、森山 芳則¹

¹岡大・薬・生理化学、²関西医科大・第一生理

内分泌細胞には分泌顆粒とは別にシナプス小胞様オルガネラ (マイクロベジクル) が存在し、神経伝達物質を分泌し、隣接する細胞のホルモン合成・内分泌を制御している。マイクロベジクルはシナプス小胞と同様に液胞型 H⁺-ATPase を主要な構成要素として含んでおり、内部は酸性に維持されている。しかしながら、これまで生細胞における正確な pH 値は不明であった。今回、我々は DAMP 法と凍結超薄切片を組み合わせた免疫電子顕微鏡法を用い、松果体細胞におけるマイクロベジクルの内部 pH を定量した。

(方法) ラット松果体を 50 μ M DAMP を含む培養液で 1 時間培養後、固定し、凍結超薄切片を作製して、抗 DAMP 抗体、コロイド金標識 2 次抗体と反応させた。電顕写真上でシナプス小胞様オルガネラ、および核 (中性コンパートメント) に結合した金粒子密度を計測して、両者の比から pH を算定した。

(結果) マイクロベジクルの内部 pH は 5.07 ± 0.09 ($n = 7$) であり、バフィロマイシン A1 と塩化アンモニウム添加によりそれぞれ 5.92 ± 0.29 ($n = 4$)、 6.20 ± 0.11 ($n = 4$) に上昇した。

(結論) マイクロベジクル内が強く酸性化されていること、この酸性化が液胞型 ATPase によることが明確になった。

V1-07

神経系細胞におけるCa²⁺遊離の基本要員 (elementary Ca²⁺ release events)の解析

小泉 修一、井上 和秀
国立衛研・薬理

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、NGFで分化させたPC12細胞及び海馬初代培養神経細胞における、Ca²⁺遊離の基本要因の解析を行った。細胞の神経繊維部分で、低濃度caffeine刺激により、ryanodine受容体(RyR)から空間的に非常に局在したしかもライフタイムの非常に短いCa²⁺遊離"spark"が、またbradykinin(PC12細胞)及び代謝型glutamate受容体アゴニスト、t-ACPD(海馬)刺激により、inositol-1,4,5-trisphosphate受容体(InsP3R)から同様のCa²⁺遊離"puff"が認められた。これらを視覚化し、それぞれの性質を詳しく解析した。神経系細胞におけるspark及びpuffは、従来報告されていた非神経細胞のそれらとは性質が異なり多くはRyRsとInsP3Rsの混在した受容体群から惹起されており、両者は互いに影響を与え合っていた。従って、一方の受容体をブロックすると、多くの場合、他方の応答も消失した。Spark及びpuffは小胞体内Ca²⁺量に依存しており、ストアのCa²⁺量増加により、その大きさ及び頻度は顕著に増大した。さらにこれらの応答は神経線維の分岐点"branch point"で多く認められ、普段はその近傍に局在していたが、ストアのCa²⁺量を増加させるとグローバルなCa²⁺応答に移行した。Ca²⁺ストアである小胞体は、細胞体だけでなく、軸索、樹上突起、さらにspineに至るまでくまなく張り巡らされており、遊離されたCa²⁺は自己再生的に細胞全体に伝搬し得ることから【神経細胞内のもう一つの神経(a neuron within a neuron)】と呼ばれて注目されている(Berridge, Neuron, 21,13-26,1998)。Ca²⁺遊離の最も基本的な要因であるspark及びpuffからグローバルな応答へのスイッチ機構は神経細胞におけるCa²⁺を介した情報伝搬の観点から非常に重要であると考えられる。

V1-08

FK506 binding protein (FKBP)による細胞内Ca²⁺動態の調節機構について

森田 克也、北山 滋雄、土肥 敏博
広島大学歯学部歯科薬理学講座

近年、FK506 binding protein(FKBP)がIP3受容体(IP3R)やryanodine受容体(RyR)に会合してチャンネル安定化に寄与することが示されつつあり、免疫抑制薬の副作用発現の指標として注目されているが、その機序は不明である。さらにcyclic ADP-ribose(cADPR)がFKBP12.6に作用しRyRからCa²⁺動員作用を現すことが脾臓細胞で明らかにされた。そこで、RyRチャンネルにおけるFKBPの役割を明らかにすべく、副腎クロマフィン細胞を用いcADPRによるCa²⁺遊離および[Ca²⁺]_iダイナミクスへのFKBPの関与についてRyR阻害薬および免疫抑制薬を用いて検討を加えた。Digitoninで膜透過性としたクロマフィン細胞でFK506, rapamycinはcADPRのCa²⁺遊離を抑制したが、cyclosporin A(CsA)は増強した。これら薬物はcaffeine, ryanodineによるCa²⁺遊離に対しては強い増強作用を示した。FK506およびrapamycinはFKBPに結合しRyRから解離させることから、cADPRの作用点かFKBPにあることが示唆される。また、CsAはcyclophilinと複合体を形成しcalcineurinを阻害することが知られており、calcineurinはFKBPをアンカーとしてRyRに作用すると考えられる。従ってこれら免疫抑制薬によりRyRの脱リン酸化が阻害され、Ca²⁺遊離が増強されたものと推測された。無傷細胞でAChは急峻で一過性の上昇とそれに続く持続した[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした。FK506, rapamycinは[Ca²⁺]_i上昇を一過性に増強したが、ピーク後急速に下降し、持続時間の著しい短縮を認めた。RyRを阻害するimperatoxin inhibitor(IpTx)でも同様に持続相を抑制した。CsAでは抑制はみられなかった。さらにFK506, rapamycinの作用はIpTxで処置した細胞では認められず、cADPRがRyRに作用し[Ca²⁺]_i上昇の維持に寄与していることが示唆された。以上、FKBPはcADPRのターゲットとして、またcalcineurinのアンカーとしてRyRチャンネル活性に影響し、[Ca²⁺]_iダイナミクス調節に寄与していることが示唆された。

V1-09

神経突起伸展におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の Ca^{2+} 非依存性活性の役割

祖川 由美、吉村 好之、山内 卓
徳島大学薬学部生化学

カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (キナーゼ II) は脳に高濃度に存在し、記憶をはじめ脳の高次機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。私達は、培養細胞を用いてキナーゼ II の機能解析を行っている。以前に、キナーゼ II 過剰発現細胞では神経突起の伸展が促進されたことから、神経突起伸展にキナーゼ II が関与していることを報告した。また、キナーゼ II は自己リン酸化により Ca^{2+} 非依存性活性を示すことから、本研究では神経突起伸展におけるキナーゼ II の Ca^{2+} 非依存性活性の役割について検討した。

神経芽細胞 (Neuro 2a) にキナーゼ II α アイソフォームおよび自己リン酸化部位の点変異をおこした α アイソフォームの cDNA を導入した。これにより、 α クローン、自己リン酸化を受けない変異酵素を発現する T286A クローン、及び自己リン酸化したキナーゼ II と同様の効果を持つ変異酵素を発現する T286D クローンを得た。

各クローンの形態を観察した結果、 α クローンは継代後 24 時間以内の早い時期に急激な突起の伸展をおこし、72 時間後には伸展が停止した。この際の突起の長さは、細胞体の 3 ~ 5 倍程度であった。これに対して、T286D クローンは継代後 24 時間では丸い形態を示しており、継代後 48 時間頃からゆっくりと持続的に突起が伸展しはじめた。96 時間後には α クローンよりも突起が長くなり、その後もさらに伸展を続け、突起の長さは細胞体の 10 倍近くまで達した。T286A クローンは、継代後の時間に関わらず丸い形態を示し、突起の伸展は全くみられなかった。また、自己リン酸化したキナーゼ II に特異的な抗体を用いたイムノブロットにより、 α クローンでは継代後、突起の伸展に先立って細胞内でのキナーゼ II α アイソフォームの自己リン酸化レベルが上昇することが明らかとなった。これらの結果から、神経突起の伸展にはキナーゼ II が関与しており、特にキナーゼ II の Ca^{2+} 非依存性活性が重要であることが示唆された。

V1-10

小脳顆粒細胞とアストロサイトに存在するカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II デルタの同定と細胞内局在

山本 秀幸、竹内 有輔、福永 浩司、宮本 英七
熊本大学医学部薬理学第一

カルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) は、神経系におけるカルシウムを介するシグナル伝達に深く関与している。本酵素にはアルファ、ベータ、ガンマ、デルタの 4 種類のサブユニットの遺伝子が存在する。デルタサブユニットにはスプライシングの違いにより、8 種類のアイソフォームが見出されている。我々はデルタサブユニットの神経系での機能を明らかにする目的でデルタ 1-4 に対する抗体を作製した¹⁾。本抗体を用いてデルタ 1-4 が小脳と培養アストロサイトに多量に存在することを見出した。小脳の免疫染色では顆粒細胞の細胞質と核が強く染色された¹⁾。それぞれのアイソフォームを RT-PCR 法と免疫ブロット法により同定し、その細胞内局在について検討した。ラット小脳にはデルタ 1-4 が全て存在し、デルタ 1 が最も多く発現していた。核移行配列 (NLS) を有するアイソフォームとしてデルタ 3 に加え、新たにデルタ 3.1 と 3.4 を見出した。得られたそれぞれのアイソフォームを NG108-15 細胞に発現させると、デルタ 1 は細胞質にデルタ 3 は核内に局在した。ラット脳の培養アストロサイトには 4 種類のサブユニットが全て存在していた。検出された 10 種類のアイソフォームの中でデルタ 2 が最も多量に発現していた。アストロサイトの免疫染色により、デルタ 2 はゴルジ体に局在することが明らかになった。すなわち、小脳顆粒細胞とアストロサイトでは存在するデルタアイソフォームの種類と細胞内局在に違いが認められた。これらの結果は本酵素がそれぞれ異なる機能に関与していることを示唆している。また、デルタ 3.1 や 3.4 の細胞内局在についての検討から見出した NLS の機能を阻害するアミノ酸配列についても報告する。

1) Takeuchi Y. et al. (1999) J. Neurochem. 72, 815-825.

V1-11

培養海馬神経細胞におけるCaM kinase IVのリン酸化反応と活性化反応

笠原 二郎、福永 浩司、宮本 英七
熊本大学医学部薬理学第一講座

CaM kinase IVは、神経細胞の核に豊富に存在し、神経活動に伴った遺伝子発現制御に関与すると考えられている。私達は、培養ラット海馬神経細胞において、グルタミン酸刺激や高カリウム脱分極刺激によって、CaM kinase IVのリン酸化反応がCaM kinase IIと同様に亢進することを見出した。薬理的検討の結果、グルタミン酸刺激によるリン酸化反応は、MK801によって抑制され、CNQX、AP3などは抑制しないことから、NMDA受容体を介することが明らかになった。さらにNifedipineは弱い抑制効果を示し、L型カルシウムチャネルの関与は小さいことがわかった。アゴニストによる実験を行ったところ、予想通りNMDA投与によってCaM kinase IVのリン酸化反応が亢進したが、AMPA投与によってもリン酸化反応は亢進した。この反応を解析したところ、AMPAは細胞を脱分極させて内因性のグルタミン酸放出を促進し、その結果NMDA受容体を介したカルシウム流入が生じてCaM kinase IVのリン酸化反応が亢進したと考えられた。一方、高カリウム脱分極刺激によるリン酸化反応には、グルタミン酸受容体阻害剤はほとんど抑制効果を示さず、Nifedipineによって強く抑制されたことから、この反応にはL型カルシウムチャネルが関与していることが明らかになった。

また、CaM kinase IVのC末端部分を認識するポリクローナル抗体を用いて免疫沈降を行い、ペプチド基質を利用して、神経細胞に発現しているCaM kinase IVの活性化反応を検討した。その結果、グルタミン酸刺激や高カリウム刺激によるリン酸化反応の亢進に伴ってCaM kinase IVの活性も確かに上昇しており、グルタミン酸刺激による活性化反応にはNMDA受容体が、高カリウム脱分極刺激による活性化反応にはL型カルシウムチャネルが関与することが明らかになった。このように、リン酸化反応と活性化反応それぞれで得られた結果が一致し、培養海馬神経細胞におけるCaM kinase IV活性化機序が明らかになった。

V1-12

一本鎖DNA結合蛋白質Pur α のCRE転写活性への影響について

定方 哲史、郭 哲輝、三木 直正
大阪大学大学院医学研究科情報薬理学講座 A6

慢性モルヒネ処理したマウス脳で、一本鎖cAMP response element (ssCRE)に結合する蛋白質のDNA結合活性が減少することを見だし、これがPur α と同一であることを報告している。今回、Pur α をPC12細胞に強制発現させ、CRE-ルシフェラーゼベクターを用いた転写活性測定、および内源性c-fos mRNA発現への影響を調べた。Pur α は、10 μ M forskolinにより誘導されるCREのプロモーター活性を増強し、c-fos発現を抑制した。また、Pur α は、forskolin (10 μ M)で誘導される神経突起伸張を著明に抑制した。現在、遺伝子転写に影響を与えるPur α の作用機作について検討中である。

V2-01

ヒポカルシン遺伝子欠損マウスの電気生理学的および行動科学的解析

増尾 好則¹、正木 全¹、宮本 政臣²、高松 研¹¹東邦大学医学部第2生理、²武田薬品工業(株)創薬研究本部

ヒポカルシンは、海馬錐体細胞に特徴的に発現しているEF・ハンド型カルシウム結合蛋白質で、細胞体と樹状突起、軸索に分布している。今回、我々はヒポカルシン遺伝子欠損マウス(−/−)を作成し、電気生理学および行動科学的解析を行った。

電気生理学的解析：海馬スライス用い、シャワー側枝の刺激後、CA1錐体細胞の電場電位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)を測定した。まず、ペアードパルス刺激(10~500 m秒間隔)を加え、促進現象を調べた。fEPSPの振幅は100 m秒間隔刺激において対照群(+ / +)に比し有意に低下していたが、fEPSPの傾斜には有意差は認められなかった。このことから、−/−では抑制性シナプス伝達が増強している可能性が示唆された。次に、テタヌス刺激(100 Hz, 1秒間)を加え、60分後までfEPSPを測定した。−/−でも長期増強(LTP)は観察されたが、LTPが惹起されたスライスの割合が低かった。

行動学的解析：自発運動量、プラス迷路、ステップスルー型受動回避テスト、および回転棒テストにおいて、−/−は有意な変化を示さなかった。自発運動量の概日リズムも正常であった。したがって、ヒポカルシンの欠損は運動系および情動系機能には影響しないと考えられた。次に、モーリス水迷路試験においてプラットホームを見出すまでの潜時と泳動距離を測定した。毎日4試行を連続4日間行ったが、−/−と+ / +の間に有意な差は認められなかった。この試行を終えた後、プラットホームを除去して1分間マウスを自由に泳がせ、訓練中にプラットフォームが存在した領域を横断する回数を測定した。この認知テストでは、群としては統計学的有意差はないが、−/−には明らかな低下を示す例が認められた($p=0.06$)。次に、プラットホームの位置を変えて新しい水迷路試験を行った。予めプラットホーム位置を提示した後の試験では、潜時および泳動距離の両方で−/−が+ / +より有意に高値を示した。

これらの結果から、ヒポカルシンは海馬CA1領域におけるシナプス伝達を調節し、空間記憶などの認知機能に関与している可能性が示唆された。

V2-02

長期暗室飼育ラットの視覚野における光刺激に伴うNF-LのCaMKIIによるリン酸化

橋本 亮太¹、中村 祐¹、中舘 和彦²、今村 一之²、武田 雅俊¹¹大阪大学医学部精神医学教室、²大阪バイオ研・神経科学

NF-Lはニューロフィラメントの主要なサブユニットであり、そのHEAD領域のリン酸化により重合・脱重合が調節されている。我々はいくつかのキナーゼによるNF-LのHEAD領域のリン酸化部位を決定し、部位特異的リン酸化抗体群を作成した。その抗体群を使って、海馬CA1領域の長期増強現象において樹状突起のNF-LがCaMKIIによって選択的にリン酸化されることを明らかにしてきた。今回NF-Lのリン酸化を暗室飼育のLong Evans系ラット視覚野にて免疫組織化学的に検討した。これまで生理学的研究により開眼以前より長期完全暗室飼育された動物の視覚野では、シナプスの可塑性レベルが感受性期と同様に高く保たれていることが知られている。本実験によりこのような動物の視覚野において、1時間の光刺激後に長期増強現象の場合と同じくCaMKIIにより選択的にNF-Lがリン酸化されることが明らかになった。一方、光刺激していない暗室飼育ラットではNF-Lのリン酸化は認められなかった。さらに外側膝状体や上丘といった皮質下の視覚中枢においてはNF-Lのリン酸化は認められなかった。24時間暗順応させた成熟ラットを光刺激した場合にも視覚野におけるNF-Lのリン酸化は認められなかった。これらの結果により、CaMKIIによる特異的なNF-Lのリン酸化が脳皮質の可塑性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

V2-03

N2a neuroblastoma cell 神経突起形成における Rho-kinase の関与

中村 祐、橋本 亮太、福所 英里子、
 柏木 雄次郎、貝淵 弘三、武田 雅俊
 大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能
 医学講座、精神医学

Rho-associated kinase (Rho-kinase/ p160ROK/ ROCK)は、PC12などの細胞株において lysophosphatidic acid (LPA)による神経突起退縮(neurite retraction)に関与している。今回、我々はN2a neuroblastoma cellにおいてRho-kinaseのdominant active (CAT, bovine ROK 6-553) / negative (RB/PH(TT), 941-1388) を transfection し、神経突起形成への Rho-kinase の関与について検討した。尚、発現vector としてpEF-BOS を使用し、各geneのN末にmycをラベルとして付加した(Amano M, Genes Cells 3:177, 1998)。

10%FCS/DMEM存在下で培養したN2a cellに Lipofectamine plusを用いてtransfectionを行い、更に 2.5mM dibutylic cAMP/DMEMにおいて2日間培養した。CATがtransfectされた細胞は円形状なり、また、RB/PH(TT) がtransfectされた細胞では、多くの不完全な形状をした突起がみられた。また、2.5mM dibutylic cAMP/DMEMにおいて2日間培養し、突起を形成した細胞にCATをtransfectionしたところ、突起の急激な退縮と考えられる瘤状の構造が突起にみられた。

これらの結果からN2a cellにおいてRho-kinaseは、突起の形成、伸展及び退縮に関与していることが示唆された。

V2-04

神経芽腫細胞を用いたレチノイン酸誘導性神経細胞死の分子機構の解析

高田 尚幸、河本 竹正、Ashrafur Islam、
 久野 友子、中川原 章
 千葉県がんセンター生化学研究部

レチノイン酸(RA)はビタミンAの活性型代謝物質であり、神経系をはじめとした胎生期の形態形成に重要な役割をはたしている。in vitroにおける胎児由来細胞に対する作用からRAは細胞分化とともにアポトーシスを誘導して正常の形態形成を促していると考えられている。神経細胞も例外ではなく発生過程における神経細胞死はRAの制御を受けているが、その分子機構は依然不明である。我々は神経芽腫培養細胞を用いてRAにより誘導されるアポトーシスモデルを作製し、その分子機構の解析を行った。

[方法および結果] 神経芽腫CHP134株に5 μ Mの all-trans retinoic acid (ATRA) 処理を行った結果、3日目増殖が停止し細胞分化した。ATRA処理5日目より著明な細胞死が誘導されし、このとき細胞核の凝縮とTUNEL染色の陽性化が観察されアポトーシスと判定された。アポトーシスに伴う関連分子をノザンプロットおよびサザンプロット法にて解析した。Caspase familyの解析ではCaspase-9、Caspase-3およびCaspase-1の発現が誘導されておりCaspase-3が活性化されていた。同時にミトコンドリア膜電位の低下も伴っており、このアポトーシスはmitochondria/Caspase-9 カスケードが働いていることが明らかとなった。Caspase-2、-6、-7、-8および-10はいずれも発現量に変化はなかった。ミトコンドリア膜の安定化によりアポトーシスを抑制する因子、Bcl-2およびBcl-XLには量的変化は見られなかった。Caspase familyの活性抑制因子であるIAP familyの分子については、唯一SurvivinのみがRA処理により劇的に発現減少し、他のメンバーであるIAP-1、-2、NAIP、XIAPの発現量は一定であった。p53はRA処理によりmRNAレベルでも蛋白レベルでもdown-regulateされていた。p53 target geneのうちp21waf1は一過性に誘導されていたがBaxおよびPIG-3はp53と同様に発現は低下していた。[結語] レチノイン酸により誘導される神経芽腫のアポトーシス分子機構を解析した。アポトーシスはmitochondria/Caspase-9 カスケードにより実行されていたがこのシグナルにp53が積極的に関与している証拠はなかった。Caspase-1はアポトーシスカスケード上での位置づけは定まっていないが、我々のモデルではCaspase-1もアポトーシス実行に何らかの働きをしていると考えられた。またSurvivinはその発現のパタンから増殖期神経芽腫の生存維持に関与している分子の可能性が示唆された。

V2-05

脱分極による神経細胞死の抑制における
PI-3 kinase及びCaMKIIの関与

池上 浩司、小池 達郎

北海道大学・院理・生物科学

神経細胞は自身の生存を標的由来の神経栄養因子に依存している。神経栄養因子の欠如は直ちに神経細胞死へとつながる。しかし、細胞外 K^+ 濃度を上昇させることにより、この細胞死を完全に阻止することができる。細胞外 K^+ の上昇により、細胞膜は脱分極を起こし、L型の電位依存型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} の流入が起こり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的な上昇が引き起こされる。現在、神経細胞死の抑制には、この持続性の細胞内 Ca^{2+} 上昇が必要であると考えられているが、 Ca^{2+} 上昇後どのようなメカニズムで細胞死が阻止されるのかは、あまりよく説明されていない。今回我々は、ラットの上頸神経節 (SCG) より単離培養した交感神経を用い、二つのリン酸化酵素が関与している可能性を示唆した。

脱分極下にあるSCG神経細胞に、PI-3 kinaseの阻害剤であるLY294002を処理した結果、濃度依存的に細胞死抑制効果が失われた。更に我々は、PI-3 kinaseの下流に存在するAktが、脱分極刺激によりリン酸化され活性化状態になること、またそのリン酸化がLY294002により完全に阻害されることを観察した。これらの結果は、脱分極による神経細胞死の抑制がPI-3 kinaseを介していることを強く示唆している。しかし、細胞死抑制の効果を消失させる濃度と、Aktのリン酸化を阻害する濃度とが大きく異なっていたため、我々はPI-3 kinase以外にも何らかの酵素が関わっていると考えた。

そこで我々は、 Ca^{2+} に応答する因子の一つであるCaMKIIに着目した。CaMKIIの阻害剤であるKN-62を用い、LY294002と同時に処理した結果、それぞれ単独では細胞にあまり影響を与えない濃度でも、組み合わせることにより、脱分極の効果が完全に失われた。NGFの存在下では、このような組み合わせによる効果は全く見られなかった。これらの結果より、脱分極による神経細胞死の抑制には、PI-3 kinaseとCaMKIIの両キナーゼが働いていることが予想される。更に、どちらか片方の経路が阻害されても、もう片方の経路によって、神経細胞は細胞死から回避できるメカニズムを有していることが示唆される。

V2-06

ガラクトセレブロシド合成酵素欠損マウス
の中核及び末梢神経組織のミエリン脂質異常

武富 保、上村 敬一

信州大学医学部加齢適応研

神経障害を呈するガラクトセレブロシド合成酵素欠損(cgt^{-/-})マウスの中枢及び末梢神経組織のミエリン脂質異常を解明することを目的とした。実験方法としてはUDP-galactose ceramide-galactosyltransferase (CGT)の遺伝子をknockoutして、homologous recombinationによつて得られたcgt^{-/-}マウス及び野生型(cgt^{+/+})マウスの20-30日齢の組織学的にミエリンが十分形成された脳及び坐骨神経よりクロロホルム/メタノール (2:1,v/v) によつて抽出された総脂質を出発材料(Drs.Bosio & Stoffel, Univ.of Cologne提供)とした。常法により、その総脂質を処理して主要ミエリン脂質をDE MALDI-TOF MSにより分析した。結果として、cgt^{+/+}マウスでは正常なガラクトセレブロシド及びそれより生成されるスルファチドが同定されたが、cgt^{-/-}マウスでは確かに全く認められなかった。それにも拘らず、myelin compactionが見られるのはミエリンのタンパク質に異常が認められないこと、存在するその他のミエリン脂質が代償作用をしていることが分った。興味あることとして、主要なスフィンゴミエリンが全く変身して正常には見られないガラクトセレブロシドやスルファチドに見られる α -オキシ酸の長鎖脂肪酸を多く含有してことであつた。また、ミエリン脂質としては稀であるが、ガングリオシドの前駆体であるグルコセレブロシドが単独で存在し、その構成脂肪酸も正常と違って α -オキシ酸の長鎖脂肪酸を含有した。しかしながら、cgt^{+/+}のガラクトセレブロシド/スフィンゴミエリンの比率に対してcgt^{-/-}のグルコセレブロシド/スフィンゴミエリンの比率は明らかに低下した。このようにcgt^{-/-}マウスは脳及び坐骨神経組織ではガラクトセレブロシド、スルファチド合成が出来なくても、その他のミエリン脂質の代償作用によつてミエリン形成を果すが、そのミエリンは本来の完全な機能を果たし得ず発育とともに神経障害を呈して遂には死に至ることが明らかになった。

V2-07

伝達性海綿状脳症の病態発現とサイトカイン-iNOS系との関連性

玉井 洋一¹、笹原 武志²、小嶋 久子¹、
中村 和生¹、瀧 龍雄³、田口 文章³、
大谷 義夫⁴、三浦 貞則⁴、百溪 英一⁵、
関川 賢二⁵

¹北里大・医・生化、²同・微生物、³同・医療衛生・臨床微生物、⁴同・医療衛生/医・精神科、⁵農水省・家衛試・分子病理

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) をはじめとする伝達性海綿状脳症は、病理組織学的に脳組織の海綿状変化が特徴であるが、海綿状化の機構については明らかでない。以前から、実験的CJDやスクレビーなどに見られるミエリンの空胞変性が、細胞性障害の強いTNF α によって引き起こされる場合と類似していることが指摘されていた。TNF α をマウス眼球に注入し、視神経ミエリンに空胞変性が出現することを観察した報告もある。本研究は、実験的CJDマウスを用いて、伝達性海綿状脳症の病態発現にたいするサイトカイン-iNOS系の関与の有無を検証することが目的である。SWR/j マウスにCJD北里1株を脳内接種し、経口的に脳におけるPrPScをWestern blot法で検出し、TNF α 、IL1 α 、iNOS、GFAP-mRNAの発現はRT-PCR法で調べた。また脳の組織変化はHEおよび免疫組織化学的に検索した。その結果、PrPScの蓄積、mRNAの発現増強、組織変化などが症状の発現とほぼ平行して起こり、症状の進行とともに顕著になることがわかった。次に、CJDの病態発現におけるTNF α とiNOSの必須性を検証するため、これらの遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて接種実験を行った。その結果、発症までの潜伏期間、脳の海綿状変化、PrPScの蓄積と分布などは、TNF α とiNOSの産生がないにもかかわらず、いずれも対照群と差がなかった。以上の結果から、伝達性海綿状脳症の病態発現にサイトカイン-iNOS系は必須の因子としては関与していないと結論した。

V2-08

雌雄老化促進モデルマウス(SAMP8)の加齢に伴う脳内核DNA損傷の変化とそれに対する当帰芍薬散の効果について

小松 真紀子、平松 緑
山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)は活性酸素によりDNAのグアニンの8位が水酸化されて生成するが、8-OHdGの生成は加齢に伴って増加することが報告されている。そこで老化促進モデルマウス(SAMP8)脳内の核DNAを抽出し、加齢に伴う8-OHdGの変化およびその変化の雌雄差について検討した。つぎに漢方薬である当帰芍薬散は、コリン作動性神経機能を賦活させることから、抗痴呆薬として期待されているので、SAMP8の8-OHdG生成に対する当帰芍薬散の効果について検討を加えた。実験動物は、雌雄SAMP8の3・4ヶ月齢および7・12ヶ月齢を使用した。当帰芍薬散は1%懸濁液を給水瓶に入れ1ヶ月間自由に摂取させた。8-OHdGの測定は投与後頸椎脱臼して脳を摘出後、核DNAを抽出し、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーにより行った。8-OHdGは2'-deoxyguanosine (dG)との比から求めた。雌雄SAMP8の脳内核DNA中の8-OHdG量は、3・4ヶ月齢に比べて7・12ヶ月齢の方が増加していた。8-OHdGの生成は加齢に伴い増加することが報告されているが、今回の実験成績においても8-OHdG生成は加齢に伴い雌雄群共に増加することが認められた。当帰芍薬散を投与すると雄性SAMP8では、3・4ヶ月、7・12ヶ月齢ともに8-OHdGの生成は抑制されることが認められた。雌性SAMP8においては、当帰芍薬散を投与しても脳内の8-OHdGの生成に影響は認められなかった。さきにわれわれは当帰芍薬散にはフリーラジカル消去作用および脳内の過酸化脂質抑制効果のあることを認めているが、雄群での8-OHdGの生成抑制作用は当帰芍薬散の抗酸化作用によるものであることが想定された。さきに雌雄SAMP8に当帰芍薬散を1ヶ月間投与し、脳内の神経伝達物質への影響を調べた結果、雌雄差のあることを認めた。これらのことから当帰芍薬散の効果はSAMP8の雌雄間で相違のあることが明らかとなった。

V2-09

内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinolによるアポトーシスとpropargylamine類による細胞死防御に関する研究

直井 信¹、丸山 和佳子²、高橋 勤³

¹応用生化学研究所 脳科学研究部門、²長寿医療研究センター老化機構研究部 生化学代謝研究室、³愛知江南短期大学

N-methyl(R)salsolinol [NM(R)Sal]はドーパミン神経に選択的なヒト脳内性神経毒である。最近パーキンソン病患者ににおいて、NM(R)Salの脳脊髄液中濃度、およびそれを生成する酵素であるneutral (R)salsolinol N-methyltransferaseのリンパ球中の活性が増加していることが見出された。一方ラット線条体にNM(R)Salを投与することによって、黒質ドーパミン神経細胞の脱落が惹起された。パーキンソン病における黒質ドーパミン神経細胞変性にはNM(R)Salが関与している可能性が示唆された。ヒトドーパミン神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞を用い、NM(R)Salによる細胞脱落の機序を検討した。NM(R)Salはミトコンドリア膜電位を低下させ、カスパーゼ3の活性化を介してDNAの断裂を引き起こした。核染色により核の凝縮と分葉化が認められ、NM(R)Salはアポトーシスによる細胞死を惹起したことが証明された。一方B型モノアミン酸化酵素の選択的阻害剤である

(R)(-)-deprenyl、rasagilineなどのpropargylamine類はNM(R)Salによるアポトーシスを抑制した。SH-SY5Y細胞はB型モノアミン酸化酵素をもたないことから、モノアミン酸化酵素阻害とは無関係な機序が考えられた。アポトーシスの初期変化であるミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)の低下を蛍光色素であるJC-1を使用して検討したところ、rasagilineはNM(R)Salによる膜電位低下を有意に抑制した。propargylamineの抗アポトーシス作用を解明することにより、パーキンソン病などの神経変性疾患に対する神経保護薬が開発できる可能性がある。

V2-10

ヒト羊膜細胞移植による神経保護作用 - パーキンソン病モデルラットでの検討 -

垣下 浩二¹、中尾 直之¹、桜川 宣男²、板倉 徹¹

¹和歌山県立医科大学 脳神経外科、

²国立精神神経センター 神経研究所 疾病研究第5部

(目的) 羊膜細胞はドーパミンを産生しパーキンソン病の細胞移植のドナーとなり得ることを報告してきた。今回、羊膜上皮細胞のドーパミン神経細胞に対する神経保護効果を培養系とパーキンソン病モデルラットで検討した。(方法) 羊膜細胞は帝王切開分娩により採取し、培養した。この際、提供者よりインフォームドコンセントを得ている。ドーパミン神経細胞は胎生14日令のラット腹側中脳より採取した。採取したドーパミン神経細胞をCONTROL群(無血清培地で培養)、条件培養液群(CONTROLと同じ無血清培地で羊膜細胞を24時間培養した培地)にわけて5日間培養したのちドーパミン神経細胞数、神経突起の長さ、細胞体の面積を検討。同様に、採取したドーパミン神経細胞を5日間培養後、100 μ M 6-OHDAを加え同様に検討。次にラット線条体に6-OHDAを注入して作成したパーキンソン病モデルにヒト羊膜細胞を移植し、その中脳ドーパミン細胞に対する保護効果をTH免疫染色、FULUOROGOLDの逆行性ラベルにより検討した。ドーパミン神経細胞同定にはTHモノクローナル抗体を用いた。(結果) 羊膜上皮細胞の条件培養液は胎生14日令の培養ラットドーパミン細胞の生存(対CONTROL比 5倍)、軸索伸長を促進し(対CONTROL比 2倍)、さらに神経毒である6-OHDAに対する細胞死も阻止した。羊膜細胞移植は同モデルにおける進行性の黒質ドーパミンニューロンの脱落を阻止し、さらに残存ニューロンの萎縮も予防した。(結論) 羊膜細胞移植はパーキンソン病における進行性のドーパミン細胞死を阻止する治療手段となる可能性が示唆された。

V2-11

アレキサンダー病およびアルツハイマー病患者の中枢神経系に蓄積する α Bクリスタリンのリン酸化について

加藤 兼房¹、稲熊 裕¹、伊東 秀記¹、
飯田 佳代¹、岩本 郁子¹、太田 秀臣²、
越知 信彦³

¹愛知県コロニー・研・生化、²神奈川県立厚木病院・小児科、³愛知県心障児療育センター・第二青い鳥学園・小児科

低分子量分子シャペロンの一つである α Bクリスタリン（以下 α B）はアレキサンダー病（AX）患者脳のグリア細胞封入体であるRosenthal fibersの主たる構成成分である。また、自己免疫疾患である多発性硬化症の自己抗原の一つと考えられている。我々は、アルツハイマー病（AD）脳の可溶性分画でも α Bが増加していることを以前報告している。 α Bは各種のストレスに応答して最高三カ所のセリン残基

（Ser-19, Ser-45, Ser-59）がリン酸化される。細胞分裂期にはSer-19とSer-45のリン酸化が促進されることを明らかにした。

【方法と材料】今回、AXおよびAD脳に蓄積する α BとHsp27のレベルと α Bのリン酸化状態を、脳の可溶性および不溶性分画について等電点電気泳動あるいはSDS-PAGE後に各分子およびそれぞれのリン酸化部位を認識する抗体を使ったウェスタンブロット法にて解析した。また、免疫組織染色も行った。

【結果と考察】2例のAX（infantile type 1例とjuvenile type 1例）ともに不溶性分画に多くの α BとHsp27が検出された。 α Bの一部はリン酸化型で、特にSer-59のリン酸化が多く、Ser-45のリン酸化も検出されたがSer-19のリン酸化は検出されなかった。4例のADと対照脳について解析したところAX脳ほどではないが、 α B、Hsp27ともに不溶性分画に多く検出され、リン酸化 α BもおもにSer-59のリン酸化されたものが検出された。免疫組織染色では α B、Hsp27ともにAX脳ではRosenthal fibersが、ADおよび対照脳ではミエリン線維が染色された。Ser-59のリン酸化 α Bの局在も α Bの局在と同じであった。ADおよび対照脳でも、Ser-59のリン酸化された α Bが検出されたがこのリン酸化の病理的・生理的意義は不明である。

V3-01

Amyloid β はミクログリアのPKC-d キナーゼ活性を亢進させ、MARCKSの細胞内トランスロケーションをおこす

中井 真通¹、谷向 知¹、八木 敬子²、
斎藤 尚亮²、山本 秀幸³、宮本 英七³、
長谷川 浩史¹、谷口 泰造¹、寺島 明¹、
川又 敏男¹、三好 功峰¹、田中 千賀子¹

¹兵庫県立高齢者脳機能研究センター、²神戸大学バイオシグナル研究所、³熊本大学医学部第一薬理

アルツハイマー病脳に多量に見られる老人斑の構成成分であるAmyloid β ($A\beta$)はミクログリアを活性化することが知られており、実際に老人斑には多数の活性化ミクログリアが認められる。私どもはミクログリア活性化の機構を検討し、 $A\beta$ がPKC- δ のチロシン残基とMARCKSをリン酸化する事を昨年報告したが、今回私どもはさらに詳細にそのメカニズムを検討した。

【方法及び結果】E20 Wistar ratから脳を摘出し、初代培養を行い、ミクログリアを分離した。PKC活性測定はimmunocomplex-kinase assayを用いた。 $A\beta$ はミクログリア膜分画においてPKC- δ のチロシン残基をリン酸化した。さらに $A\beta$ はPKC- δ 活性を亢進させたがPKC- δ の明瞭な細胞内トランスロケーションは起こさなかった。ミクログリアに存在する他のPKCアイソフォームPKC- α 、 ϵ の活性は亢進しておらず、また細胞内トランスロケーションも認められなかった。 $A\beta$ 刺激により、PKC- δ とMARCKSは免疫沈降にて共沈し、またMARCKSは細胞膜分画からサイトゾル分画に転移し、MARCKSの転移はPKC阻害剤calphostin C、chelerythrineやチロシンキナーゼ阻害剤herbimycin Aで阻害された。

【結論】 $A\beta$ はミクログリアにおいてチロシンキナーゼを介して細胞膜分画でPKC- δ のチロシン残基をリン酸化しPKC- δ の活性を亢進させ、さらにMARCKSと直接接してMARCKSの膜分画からサイトゾル分画への転移を引き起こしていると考えられた。

V3-02

異性化アミロイドβの凝集特性

清水 孝彦¹、福田 宏之²、中島 光業¹、森 啓³、
白澤 卓二¹

¹都老人研・分子遺伝学、²PEバイオシステムズ、

³大阪市立大学・医

異性化はラセミ化とともに老化蛋白質に特徴的な翻訳後修飾である。アルツハイマー病 (AD) 患者脳から単離したアミロイドβ (Aβ) とタウ蛋白質は異性化していることが知られている。特にAβは3個

(1、7および23番目) のアスパラギン酸 (Asp) 残基のうち1番目と7番目のAspの多くがイソアスパラギン酸 (isoAsp) に異性化していることが知られている。本研究ではAβの異性化がAβの凝集特性を変化させるかどうか調べるために、異性化Aβを化学合成した。7番目または23番目のAspをisoAspに置換したAβ1-42(isoAsp7)とAβ1-42(isoAsp23)を試験管内で凝集させ正常Aβ(1-42)と凝集性を比較した。さらに異性化Aβを特異的に認識する抗体 (抗isoAsp7抗体と抗isoAsp23抗体) を作製し、AD患者脳での異性化Aβの存在様式を調べた。

合成異性化Aβ1-42の試験管内での凝集性を調べた結果、Aβ1-42(isoAsp23)がチオフラビンT蛍光量、βシート含量ともにAβ1-42とAβ1-42(isoAsp7)に比べて高い値を示した。また電子顕微鏡観察の結果、Aβ1-42(isoAsp23)は強い繊維形成能を有していた。9例のAD患者脳について免疫組織化学染色を行った。抗isoAsp7抗体はいずれの組織標本でも老人斑と血管アミロイドを染色することを確認した。一方、抗isoAsp23抗体は血管アミロイドを特徴的に染色することが判明した。AD患者脳抽出物のウェスタンブロットティングにおいても、抗isoAsp23抗体によって陽性バンドが確認された。以上の結果から、Aβ(isoAsp23)の存在が初めて示された。また23番目のAsp残基の異性化がAβの凝集化に重要な役割を担っており、異性化がアミロイド形成に積極的に関与することが示唆された。

Aβの22番目のグルタミン酸 (Glu) がグルタミンに変換する点突然変異 (オランダ型出血性脳血管アミロイドーシス症) は高度の脳血管アミロイドーシス症を発症することで知られ、22番目のGlu変異も23番目のAspの異性化と同様にAβの凝集性を亢進させる。本研究により22位のGlu残基における先天の変異 (アミノ酸置換) と23位のAsp残基における後天的変異 (異性化) が同様のメカニズムで脳血管アミロイドーシス症を発症させている可能性が示唆され興味深い。

V3-03

Neuro2A細胞においてamyloid βはPKC-αを介してMARCKSをリン酸化する

谷向 知¹、中井 真通¹、長谷川 浩史¹、

谷口 泰造¹、寺島 明¹、川又 敏男¹、

山本 秀幸²、福永 浩司²、宮本 英七²、

三好 功峰¹、田中 千賀子¹

¹兵庫県立高齢者脳機能研究センター、

²熊本大学医学部第一薬理

アルツハイマー病脳で多量に出現する老人斑の構成成分であるamyloid β (Aβ) は神経細胞に毒性を示すこと、neuroblastoma細胞でphospholipaseを刺激することなどが知られている。今回我々はAβ刺激がneuro2A (N2A) においてどのような神経内神経伝達経路に影響を及ぼしているのかを検討した。

[方法および結果] N2A細胞のlysateをSDS-PAGE後PKC isoformの各抗体で染色した結果PKC α、γ、δ、εの存在が確認された。この4つのisoformを対象にN2A細胞にAβ(25-35)、Aβ(1-40)刺激を与えprotein kinase C (PKC) 活性測定をimmunocomplex-kinase assayを用いて行ったところPKC-αのみ活性亢進がみられた。またこの活性はAβに用量依存的に亢進を認めた。さらにPKCの基質であるmyristoylated anilin-rich C kinase substrate (MARCKS) のリン酸化を検討したところAβ刺激によってMARCKSはリン酸化された。一方、N2AにPKC阻害剤であるcalphostin C、chelerythrineを前処置してAβ刺激を行ったものではMARCKSのリン酸化は認められなかった。さらにAβはPKC-αの細胞内トランスロケーションを引き起こした。

[結論] Aβ刺激はN2A細胞においてPKC-α活性を亢進させ、MARCKSのリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。

V3-04

Amyloid β はMAPキナーゼカスケードを介してMARCKSをリン酸化する

長谷川 浩史¹、中井 真通¹、谷向 知¹、
谷口 泰造¹、寺島 明¹、川又 敏男¹、
福永 浩司²、宮本 英七²、向井 秀幸³、
小野 功貴⁴、三好 功峰¹、田中 千賀子¹

¹兵庫県立高齢者脳機能研究センター、²熊本大学医学部第一薬理、³神戸大学自然科学、⁴神戸大学理学部生物

アルツハイマー病の病理学的特徴である老人斑の周囲には、特に活性化ミクログリアが多数認められる。これまでに、老人斑を構成する成分の一つであるAmyloid β ($A\beta$)がミクログリアを直接活性化させることが報告されているが、その細胞内情報伝達経路は不明である。我々は、昨年度、ラット初代培養ミクログリアにおいて $A\beta$ がPKC δ のチロシン残基とMARCKSをリン酸化することを報告したが¹、MARCKSのリン酸化機構について更なる検討を行った。

＜方法、結果＞E20のWistar ratよりミクログリアの初代培養を行った。32Pを用いて細胞をラベルし $A\beta$ によるMARCKSのリン酸化を定量したところ、MEKの選択的阻害剤であるPD098059はリン酸化を著明に抑制した。次にMEKの下流であるERK1、ERK2のリン酸化を同様に測定したところ、 $A\beta$ 刺激により両者のリン酸化の亢進が認められた。さらに、ERK1、ERK2が直接MARCKSをリン酸化することを確かめるために、 $A\beta$ で刺激したミクログリアからERK1、ERK2を免疫沈降法により分画し、リコンビナントMARCKSを基質としてリン酸化を検討したところ、ERK1、ERK2は共に $A\beta$ 刺激によりMARCKSのリン酸化を亢進させた。

＜結論＞MARCKSはPKCやプロリン指向性キナーゼによりリン酸化を受けることが知られているが、ミクログリアでは少なくともMEK、ERKを介してリン酸化を受ける経路が存在することが明らかとなった。

V3-05

変異型 presenilin 2 トランスジェニックマウス脳内低密度膜ドメインにおける $A\beta$ 42 の蓄積

澤村 直哉¹、小山 文隆¹、森島 真帆¹、
井原 康夫^{1,2}

¹東京大学医学系研究科神経病理、²CREST

Presenilin 2 (PS2) はアルツハイマー病を発症するVolga-German 家系の解析で同定された遺伝子で、141 番目の Asn の Ile への点突然変異 (N141I 変異) が報告されている。本研究では、すでに我々が作製した野生型および変異型 PS2 cDNA を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて、N141I 変異の amyloid β -protein ($A\beta$) 産生への影響を調べた。マウス脳より得た TS 不溶性の画分をグアニジン塩酸により可溶化し、two site EIA で $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 のレベルをそれぞれ定量した。その結果、N141I 変異マウス脳の不可溶性画分で $A\beta$ 42 が顕著に増加していた。次にこの画分での $A\beta$ 42 の増加がどのような細胞内コンパートメントに由来するのかを調べる目的で、Triton X-100 による脳抽出液をショ糖密度勾配遠心法により分画し、 $A\beta$ の分布を調べた。この結果、N141I 変異の低密度膜ドメインで $A\beta$ 42 が上昇することが明らかとなった。このドメインは他の組織ではカベオラ(caveolae)と呼ばれている部位で、コレステロールとスフィンゴリピッドの割合が高く、G蛋白質など多種類の情報伝達系に関与する分子が存在することから、情報伝達の間や細胞内輸送に関する機能が指摘されている。以上の結果から、変異型 PS2 トランスジェニックマウス脳内では TS に不溶性の画分から $A\beta$ 42 が蓄積し、特に低密度膜ドメインと呼ばれる細胞膜の特殊なドメインから $A\beta$ 42 が蓄積することが示唆された。

V3-06

Presenilin-2過剰発現の初代培養神経細胞
に対する影響

荒木 亘¹、湯浅 勝敏²、武田 伸一²、
城谷 圭朗¹、高橋 慶吉¹、田平 武¹

¹国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6
部、²同遺伝子工学研究部

アルツハイマー病遺伝子Presenilin-2 (PS2) の機能は明らかではないが、アポトーシスへの関与が指摘されている。今回我々はPS2の神経細胞死における役割を明らかにする目的で、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて、初代培養神経細胞にPS2を過剰発現させた。

野生型および変異型 (N141I) ヒトPS2 cDNAを挿入した組換えアデノウイルス (AxCAPS2wt、AxCAPS2mu) はCOS-TPC法により作成した。培養ラット大脳皮質ニューロンにLacZ遺伝子の組換えアデノウイルス (AxCALacZ) を感染させた場合、90%以上の細胞が β -galactosidase陽性に染色され、感染効率の高いことが示された。AxCAPS2の感染後、ニューロンにおけるPS2タンパク発現をPS2抗体を用いるウエスタンブロットおよび免疫組織化学により分析した。ウエスタンブロットでは全長型PS2タンパクの発現とPS2C末、N末断片の増加が観察された。PS2免疫反応性は染色強度に差はあるものの大多数の細胞で増強しており、ニューロン内では細胞体および神経突起近位部に存在していた。MAP2陽性の生存ニューロン数はAxCAPS2wt、AxCAPS2mu感染細胞で非感染細胞、AxCALacZ感染細胞に比較して有意に減少していた。以上の結果、PS2過剰発現により培養大脳皮ニューロンの細胞死が促進されることが示唆された。

V3-07

 β アミロイド蛋白によるMAP1Bの発現誘導
とそのリン酸化

内田洋子

東京都老人総合研究所神経病理

β アミロイド蛋白(A β)がニューロンにどのような遺伝子を発現させ、それがニューロン死をどのようにに制御するのかを解明する目的で、初代培養ニューロンを用い、A β 1-42添加初期に発現誘導される遺伝子群を探索した。New A β とaged A β によるニューロン死は、A β 添加後3時間以降に認められたため、A β 添加3時間後に培養ニューロンよりmRNAを調製し、72種類のprimer pairを使ってdifferential display法で解析した。その結果、new A β またはaged A β によって誘導される遺伝子断片(7種類)のうちの1つは、library screeningの結果、胎児性抗原であり、PHFのminor componentであるMAP1Bと同定された。Northern blotによって、MAP1B以外の微小管関連蛋白(MAPs)のmRNA発現と比較したところ、他のMAPsよりもMAP1Bに一過性の誘導(1.5倍)が認められた。MAP1Bには3種類のalternative transcriptが存在するため、どのtranscriptがA β によって誘導されるかを、RT-PCRで調べた。その結果、胎生期の脳で強く発現しているexon 3Uから始まるtranscriptが、new A β 添加3時間後に増加していた。MAP1B蛋白の増加は、new A β 添加6時間以後認められたが、リン酸化されたMAP1Bの量は、new A β 添加3-14時間後までは変化せず、24時間後に著しく増加した。

以上の結果は、A β が胎児性抗原であるMAP1BmRNAと蛋白の発現をまず誘導し、その後、MAP1Bのリン酸化を促進することを示唆した。MAP1B蛋白はplaque neuritesやneuropil threads、NFTに分布することから、アルツハイマー病脳では胎児性抗原の再誘導がおこっていると考えられる。そして、胎児性抗原の再誘導の少なくとも一部にA β が関与していると考えた。

V3-08

ヒスタミンH1受容体とアルツハイマー病：PETによる研究

谷内 一彦¹、樋口 真人²、岡村 信行²、
佐々木 英忠²、伊藤 正敏³、渡邊 建彦¹

¹東北大学医学系・薬理、²東北大学医学系老年内科、³東北大・サイクロ

ヒスタミンはH1受容体を介して直接あるいは間接的に大脳皮質を賦活している。アルツハイマー病脳においてヒスタミン神経が減少するという報告もあるが、H1受容体に関しては全く報告がない。最近では、剖検脳研究と並んで、PETによる研究も欧米を中心に盛んである。我々は今回、10人のアルツハイマー病(AD)患者と5人の正常老人、および6人の若年男子においてPETと[11C]ドキセピンを用いてH1受容体を測定した。H1受容体は正常老化に伴い減少する。ADにおいてH1受容体結合量は正常老人と比較して顕著に減少した。脳血流量の指標である血液と脳コンパートメントの速度定数のK1もADにおいて減少する傾向はあるが、H1受容体結合量の減少と比較して軽度であった。ADにおけるH1受容体結合量減少はMini-Mental State Examination (MMSE) Scoreと相関していた。本研究によりH1受容体がAD患者や正常老人の認知機能低下に関係していることが示唆された。

V3-09

痴呆性疾患と髄液中微量金属元素との関連性について

正田 孝明¹、藤沢 嘉勝²、佐々木 健²、
黒田 洋一郎³

¹愛媛大学病院検査部、²きのこエスポール病院、
³東京都立神経科学総合研究所

近年、我が国ではアルツハイマー病(AD)は、脳血管性痴呆(VD)に近い発症率を示しているが、AD、VDおよびPick病は痴呆性疾患の研究テーマの中心でもある。

これらの痴呆性疾患の原因を明らかにするために血清中および髄液中の蛋白、脂質、酵素など各種成分の分析によって、これらの痴呆性疾患の原因が探求なされている。

今回我々は上記の3痴呆性疾患を解明するために髄液中のAl、Zn、Cu、Feの微量金属元素を測定したので報告する。

〔対象〕痴呆の認められない他の疾患群30例(非痴呆対照群)より基準参考値を求め、AD30例、VD18例およびPick病34例を対象とした。

〔方法〕測定は原子吸光分析法を用いた。すなわちAl、Cu、Feはフレイムレス原子吸光法により、Znは原子吸光法によった。髄液は0.5mlを用い、直ちに測定できない場合は凍結保存した。

〔結果〕1).髄液中Al値において非痴呆対照群と痴呆群で明らかな差が認められた。とくにAD群、Pick群で高値であった。2).Cu値はAD群、Pick群で高値を示した。3).Zn値は有意差が認められなかった。4).Fe値についてはAD群で明らかに高値が認められた。

尚、測定は続行しており発表当日は症例数が異なるものと考えられる。

〔まとめ〕髄液中の微量金属元素、とくにAl値についてPick病群が高値を示すことを明らかにしたのは最初の報告と考えられる。

V4-01

抑うつ状態を呈したがん患者の神経内分泌機能と画像診断学的所見：感情障害の病態生理との比較

井田 逸朗¹、相原 雅子¹、間島 竹彦¹、
織内 昇²、富吉 勝美²、井上 登美夫²、
遠藤 啓吾²、三國 雅彦¹

¹群馬大学医学部神経精神医学教室、²同核医学教室

がん患者に抑うつ症状が高頻度にみられ、その quality of lifeに重大な影響を与えることがわかっているが、がん患者に抑うつ症状が発現する生物学的機序は未だ十分な説明はなされていない。既に抑うつ症状を主体とする感情障害の病態研究では、神経内分泌学的には視床下部-下垂体-副腎皮質（HPA）系のフィードバック機能の異常が指摘され、画像診断学的には大脳皮質や辺縁系における脳内糖代謝の低下が報告されている。われわれはまず抑うつ状態を呈した抗うつ薬未服薬のがん患者3例を対象に、dexamethasone（1.0 mg）を夜11時に内服させ、翌日午後1時にcorticotropin releasing hormone（CRH、100 μ g）を静脈内投与し、経時的に血清cortisol値を測定した。その結果、全例でCRH投与後に血清cortisol値が5 μ g/dl以上となり、HPA系のフィードバック機能低下が認められた。さらに上記患者のうち2例に18FDG PETを実施したところ、患者健常者に比べ、前頭葉中心に顕著な糖代謝の低下を認めた。現在抗うつ薬未服薬の感情障害患者についても同様の検査を実施中であり、両者の所見を比較することで、がん患者における抑うつ状態の発現要因について考察する。

V4-02

TRH(thyrotropin-releasing hormone)受容体遺伝子の5'-flanking 領域における新規多型の発見とその疾患関連

三神 正昭、中村 雅之、上野 修一、佐野 輝、
田辺 敬貴

愛媛大学医学部神経精神医学

TRH (thyrotropin-releasing hormone)受容体は7回膜貫通型の蛋白構造をとるG蛋白連結型受容体であり、中枢及び末梢神経系に広く発現している。TRH-TRH受容体システムは、TSH(thyroid-stimulating hormone)やプロラクチンの分泌促進以外にニューロトランスミッター、ニューロモジュレーターとして機能する。またTRHには、動物の自発運動の増加作用、体温上昇作用、覚醒作用、抗うつ様作用など多彩な中枢神経作用が存在し、臨床的にもTRH製剤は、意識障害、脊髄小脳変性症などの改善目的で使用されている。今回我々は、TRH受容体の5'領域に新たな多型を確認した。この多型は、TRH受容体遺伝子の発現調節に関与されているとされるプロモーター領域に存在する。我々は精神神経疾患の患者群と対照群で比較検討を行った。診断は、ICD-10の診断基準に基づいて行い、研究対象者には、文書によるインフォームドコンセントを得た。その結果、各疾患群と健常対照群の間に有意な相関は確認できなかった。

V4-03

電位依存性Na⁺/Ca²⁺チャンネル阻害薬(NS-7)は局所脳虚血後の再灌流時、cAMP依存性プロテインキナーゼ障害を抑制する

田中 耕太郎、福内 靖男、野川 茂、
永田 栄一郎、
鈴木 重明、傳法 倫久、小堺 有史
慶應義塾大学医学部神経内科

我々は既に脳虚血急性期にcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)のcAMP結合能が有意に抑制されることを報告した。今回は電位依存性Na⁺/Ca²⁺チャンネル阻害薬(NS-7)の、脳虚血後の再灌流時における脳保護効果の有無をPKAのcAMP結合能の面より検討した。

「方法」Sprague-Dawleyラット30匹を使用し、4群：MCAO群(n=7)、生食群(n=9)、NS-7群(n=7)、sham群(n=7)に分けた。前3群では中大脳動脈起始部を栓糸法で閉塞し、生食群とNS-7群では閉塞1.5時間後に3.5時間再開通させた。MCAO群では閉塞を5時間行った。再開通開始後5分の時点で生食群では生食水、NS-7群ではNS-7(1mg/kg)を静注した。実験終了時、各群とも¹⁴C-iodoantipyrine法で局所脳血流量(ICBF)を測定した。凍結脳よりクリオスタットで連続切片を作成し3群に分け、それぞれICBFオートラジオグラム、³H-cAMP結合量を示すオートラジオグラム、及びcresyl violet染色標本を得た。

「結果」血圧、血液ガスは各群とも正常範囲にあった。閉塞側のLCBFは、生食群、NS-7群ともMCAO群に比し良好な回復を示していたが、両群間に差はなかった。cAMP結合量はMCAO群で線条体、大脳皮質で広範に低下し、生食群では線条体の低下は更に増強していた。NS-7群では線条体、大脳皮質とも、cAMP結合量低下は、生食群、MCAO群に比し有意に抑制され、梗塞巣面積もNS-7群で有意に縮小していた。

「結論」電位依存性Na⁺/Ca²⁺チャンネル阻害薬(NS-7)は、中大脳動脈閉塞後の再灌流時におけるPKAを介する細胞内情報伝達系の障害を有意に抑制し、梗塞巣の縮小化と密接に関連していた。

V4-04

低グルコースによるアセチルコリン合成低下に対するアセチル-L-カルニチンの効果

田中 康一¹、福井 文子¹、川端 輝江²、
脇 初枝¹、岩本 真知子¹、近 一夫¹、安藤 進¹
¹東京都老人総合研究所・生体膜部門、²女子栄養大学・基礎栄養学

脳はグリコーゲンの貯蔵が他の神経外組織に比べて極端に少ない組織である。そのため、血液供給の中断による低血糖状態に極端に敏感であり神経伝達物質の合成や放出などのシナプス機能がすぐさま影響を受ける。アセチル-L-カルニチン(ALCAR)は骨格筋や心筋に多量に含まれる生体物質であり、脂肪酸のミトコンドリアでのβ酸化に関与しエネルギー産生を高めると考えられる。本研究ではカルニチンのコリン作動性シナプスへの作用をin vitroでの急性効果実験と長期経口投与実験により検討した。

グルコースを除いたメディウム中でラット大脳皮質より調製したシナプトソームをインキュベートすると、アセチルコリン(ACh)合成は対照の42%まで減少した。ところが、このメディウムにALCARを添加すると、ACh合成はALCARの濃度に依存して増加した。100 μMのALCARは、グルコース存在下での合成量の58%までアセチルコリン合成を回復させた。この効果は、アセチル-D-カルニチン、プロビル-L-カルニチン、ブチル-L-カルニチンには認められなかった。一方、ALCAR(100mg/Kg BW/day)を飲料水から長期間投与したラットの脳シナプトソームにおけるACh代謝を調べた。水道水を与えた群のシナプスでは、グルコースを欠乏させると対照の60%までACh合成低下を示したのに対して、1ヶ月間ALCARを投与したラットでは対照の70%の合成能を保持していた。この結果は、経口的に与えたALCARも脳コリン性シナプスにおいて有益な効果を発揮し得ることを示すものである。脳虚血性侵襲のなかで、一過性脳虚血や無症候性の小梗塞も後遺症として呆けを生じたりすることから重大視されている。そのようなエネルギー危機を模したin vitro実験で、ALCARがシナプス機能の保護作用を有することがしめされたことから、加齢に伴う潜在的なシナプス障害に対してカルニチンは予防的に用いられることが考えられた。

V4-05

NF kappa Bの活性化は低酸素再酸素化後の神経細胞死を抑止する

玉谷 実智夫^{1,3}、松崎 秀夫^{1,3}、山口 淳^{1,3}、
岡戸 晴夫²、三宅 進一^{1,3}、遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学、²東京都神経科学研究所病態神経生理、³CREST, Japan Science and Technology

低酸素再酸素化(H/R)によって引き起こされる神経細胞死においてNF kappaBの活性化が如何なる役割を果たすかについて検討した。ラット海馬より単離した初代培養神経細胞においてH/RによりNF kappaBの活性化、ミトコンドリアからのcytochrome cの遊離、及び細胞死が認められた。アデノウイルスベクターを用いI κ B変異体を高発現させるとH/RによるNF kappaBの活性化を完全に抑制し、この時、cytochrome cの遊離と細胞死は増強された。一方、H/Rは抗アポトーシス蛋白であるBcl-2とBcl-xの発現を誘導し、この誘導はI κ B変異体の発現によりほぼ完全に抑制された。また、I κ B変異体を発現させた細胞にアデノウイルスベクターを用いBcl-2を過剰発現させるとH/Rによるcytochrome cの遊離及び細胞死を抑制した。以上の結果よりH/RによるNF kappaBの活性化はBcl-2とBcl-xの発現誘導を介しミトコンドリアからのcytochrome cの遊離を抑制することにより細胞死を防ぐ機能が示唆された。

V4-06

アストログリア由来の新規ストレス蛋白ORP150(150kDa Oxygen Regulated Protein)の分子シャペロンとしての機能の解析

板東良雄^{1,3}、玉谷実智夫^{1,3}、小川 智^{2,3}、遠山正彌^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座(第2解剖)、²金沢大学医学部第3解剖、³CREST JST(Japan Science and Technology)

ORP150は脳虚血にあって強い抵抗性を示すアストログリアより同定された新規ストレス蛋白である一方、ERに存在する他の分子シャペロンであるGRP78(78kDa Glucose Regulated Protein)やGRP94などと同様にATP依存性に分子シャペロンとして蛋白輸送や蛋白のmaturationに関与している。そこで、MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 細胞を用いてORP150 antisense transformant (ORP150(-)) 株を樹立し、MDCK細胞の分泌蛋白であるGP80/Clusterinをmarker蛋白として虚血環境下におけるORP150の機能について検討を行った。pulse-chase法を用いたmetabolic labelingを行った結果、低酸素曝露されたORP150(-)株はwild typeに比べてGP80/ClusterinがERにretentionし、maturationが遅延する傾向を得た。このことは、ORP150が蛋白輸送やmaturationに重要であることを示唆している。また、ORP150(-)株はwild typeに比べ、低酸素曝露に対してviabilityが減少した。さらに、ATPに対する親和性についても検討した。結果、ORP150は強いATP親和性を持ち、GRP78や94と比べ、より少ないATP濃度でGP80/Clusterinを解離させることが可能であった。このことからORP150はGRP78などと同様に強いATP親和性を持つだけでなく、これら分子シャペロンの中で最も効率の良い分子シャペロンであることが示され、このことがアストログリア内で虚血環境下にERの機能を保持することによって細胞死を防いでいると考えられた。

V4-07

低酸素ストレスで誘導される遺伝子の検索

山口 淳^{1,3}、堀 修^{1,3}、小川 智²、玉谷 実智夫^{1,3}
遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大・医・第2解剖、²金沢大・医・第3解剖、
³CRESTJST

今回、我々は、ラットのアストログリア・ブライマリーカルチャーを用いて、ディファレンシャル・ディスプレイ法にて、低酸素で誘導される遺伝子の検索を行った。その結果、これまで低酸素で誘導されると報告のある、解糖系の酵素、シャペロン等の遺伝子の他に、新規遺伝子を含むいくつかの遺伝子の誘導を認めた。今回のディファレンシャル・ディスプレイ法で認めた小胞体に局在する新規蛋白SERP1は、低酸素ストレス以外にもツニカマイシンやカルシウムイオノフォア等のいわゆる小胞体ストレスで誘導された。ラットの中大脳動脈閉塞モデルを使った、in situ hybridization法では、SERP1は、梗塞巣周囲に誘導を認めた。また、免疫共沈やメタボリックラベリング等を使った機能解析の結果、小胞体膜に存在する蛋白輸送チャネルであるSEC61complexと相互作用し、ストレス時に小胞体に蓄積するアンファールドな膜蛋白の再フォールディング、安定化に関わっている可能性が示唆された。

V4-08

Aktの活性化は、一酸化窒素によるBcl-2の低下およびBaxの上昇を抑制する

松崎 秀夫^{1,3}、玉谷 実智夫^{1,3}、満田 憲昭^{1,3}、
涛川 一彦²、木山 博資²、三宅 進一^{1,3}、
遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大・医・第2解剖、²旭川医大・医・第1解剖、
³CRESTJST

初代培養神経細胞を用い、Insulin-like growth factor 1(IGF-1)が一酸化窒素(NO)による細胞死を抑制する機作について検討した。IGF-1はNOによる神経細胞死を抑制し、またBcl-2蛋白発現の減少およびBax蛋白発現の増加を抑制した。これらIGF-1の効果はPI3 kinase inhibitorの投与により阻害された。一方、アデノウイルスを用いて活性型Aktを過剰発現させておくとNOによる神経細胞死およびBcl-2蛋白、Bax蛋白の発現の変化は有意に抑えられ、kinase-negative Aktの発現はIGF-1の効果を抑制した。以上よりAktの活性化がIGF-1の神経保護作用には必要であり、また、活性化AktはNOによるBcl-2、Baxの発現変化を抑制することにより神経保護効果を示すと考えられた。

V4-09

ラット脊髄由来培養神経細胞からのhigh-K⁺及びNaCNによるアデノシンの放出

田口 康智¹、尾形 直則¹、竹葉 淳¹、
Miao Chuai¹、奥村 秀雄¹、中村 洋²

¹愛媛大学医学部整形外科科学教室、²生理学教室

アデノシンはDNAや生体のエネルギー源としてのATPの構成要素であるが、それだけではなく、アデノシンレセプターを介して様々な生理作用を持つことが知られている。神経組織内においてはneurotransmitterではないが、neurotransmitterの作用を様々に修飾するneuromodulatorとして知られている。この物質はin vivo microdialysisを用いた研究で脳の細胞外液濃度が脳虚血によって上昇することがわかり、その病態生理学的意義が議論されているところである。本研究で我々は虚血によるアデノシン放出機序を解明する研究の一環としてラット脊髄由来培養神経細胞を用いて様々な刺激により培養液中に放出されるアデノシン量を測定した。胎生14日のラット胎仔脊髄より単離培養した細胞を7日間培養し、実験に供した。使用時の細胞の約50%が神経細胞のマーカーであるMAP-2染色に陽性であった。細胞はテストする薬剤を含むHKR(Hepes-buffered Krebs Ringer solution)に暴露され、5分、15分、30分、1時間、2時間後にsolutionをサンプルとして採取した。サンプルをイプシロン化した後逆層カラムのHPLCで分離し、蛍光測定(excitation: 280nm, emission: 410nm)によりATP、ADP、AMP、およびアデノシンを測定した。細胞を薬剤を含まないHKRのみに暴露したところ、約2時間かけて170 nMまでsolution中のアデノシン濃度が上昇した。これを基準(control)として虚血のfactorである細胞膜の脱分極を起こさせるため、30 mMのKClを含むHKRに細胞を暴露したところ、1時間値、2時間値ともにcontrol値の3倍の濃度まで上昇していた。続いて細胞の化学的低酸素状態として5 mMのNaCNを加えたところ、control値に比べ、1時間値、2時間値ともに2.5倍の上昇が観察された。これに対しATP、ADP、AMPはこれらの刺激によって全く上昇しなかった。これらの結果より虚血時のアデノシン放出機構には細胞膜の脱分極や低酸素が関与していると考えられた。

V5-01

BDNF遺伝子プロモーターI及びIIIのカルシウム応答性の違い

田淵 明子、中岡 龍貴、天野 賢示、
壹岐 大祐、津田 正明
富山医科薬科大学・薬学部・分子神経生物

脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)遺伝子には、エキソンI-Vが存在し、エキソンI・IVの上流にはプロモーターI・IV(BDNF-PI・IV)がそれぞれ存在する。N-methyl-D-aspartate(NMDA)レセプターや電位依存性カルシウムチャネル(voltage-dependent calcium channel; VDCC)を介した細胞内Ca²⁺流入によってBDNF遺伝子の発現誘導が引き起こされるが、そのプロモーターごとの制御系については不明な点が多い。私たちは、その点を明らかにするために、ラット大脳皮質神経細胞初代培養系への、リン酸カルシウムによるDNAトランスフェクション系を用いて、BDNF-PI及びPIIIのカルシウム応答性について検討を加えた。培地中のKCl濃度を上げると脱分極でVDCCが開いてCa²⁺流入が起こるが、この場合、NMDA-RからもCa²⁺流入が起こる。そこで、25mMあるいは50mMKClで脱分極を起こす際にAPVを加えてカルシウム応答性を調べた。その結果、VDCCからのCa²⁺流入はBDNF-PI及びPIIIの活性化を誘起したが、NMDA-RからのCa²⁺流入はBDNF-PIIIのみを活性化した。この事実は、BDNF遺伝子プロモーターは、NMDA-RとVDCCからのCa²⁺流入に対して異なった応答を行っていることを示している。現在、プロモーターのCa²⁺応答エレメントの解析中である。すでに、VDCCからのCa²⁺流入でBDNF-PIII上のCRE、CRS-1が応答していることが報告されている(Neuron, 20, 709-726 and 724-740, 1998)。VDCCからのCa²⁺流入でCREBのSer133のリン酸化が認められたが、このリン酸化だけではBDNFプロモーター活性化は説明できなかった。

V5-02

genipin による PC12h 細胞の NOS を介した MAP キナーゼのリン酸化

山崎 眞津美、千葉 賢三、毛利 哲郎
北陸大学薬学部生物活性

NGF による分化誘導過程において、NO や MAP キナーゼが重要であることはすでに知られている。一方、我々は山梔子由来のイリドイド化合物である genipin も、PC12h 細胞に対して NO-cGMP 経路および MAP キナーゼを介して突起伸展をもたらす可能性をすでに報告した。今回、genipin の突起伸展作用に関与する NOS および NO-cGMP 経路と MAP キナーゼのリン酸化との関係について検討した。

PC12h 細胞は血清入り培地で培養し、24 h 後に genipin および阻害剤を含む無血清培地に交換した。突起伸展活性は画像解析法により測定し、NOS の発現および MAP キナーゼのリン酸化は、iNOS、nNOS およびリン酸化 ERK の特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。

その結果、5 μ g/mL genipin による突起伸展は選択的 iNOS 阻害剤の 1400W および選択的 nNOS 阻害剤の ETPI で有意に阻害された。また、genipin 処理 2-60 min でコントロール細胞より強い MAP キナーゼのリン酸化が起こり、そのリン酸化は NOS 阻害剤である L-NAME で阻害された。さらに、genipin 処理 6 h から iNOS の発現が認められ、96 h まで発現が増加した。

以上のことから、PC12h 細胞において genipin は、iNOS および nNOS を介した NO-cGMP 経路に続いて MAP キナーゼをリン酸化することにより、突起伸展を誘導することが示唆された。

V5-03

TNFの神経保護機作

水野 龍義¹、玉谷 実智夫^{1,2}、松崎 秀夫^{1,2}、
蔡 榮浩^{1,2}、山口 淳^{1,2}、三宅 進一^{1,2}、
遠山 正彌^{1,2}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学、

²CREST, Japan Science and Technology

近年、虚血性脳障害においてTumor Necrosis Factor (TNF)の神経保護作用が報告されているが、そのメカニズムは明らかでない。今回、我々は初代培養神経細胞を用いTNFの神経保護機作について検討した。TNFは低酸素および一酸化窒素供与体による細胞死を用量依存性に抑制し、また抗アポトーシス蛋白であるBcl-2及びBcl-xを誘導した。Bcl-2或いはBcl-xのアンチセンスオリゴの投与はほぼ完全にTNFによるBcl-2或いはBcl-xタンパクレベルの上昇を抑制し、この時TNFによる神経保護作用を部分的に抑制した。さらに、アデノウイルスベクターを用いI κ B変異体を高発現させておくとTNFによるNF κ Bの活性化、Bcl-2とBcl-xの発現誘導および神経保護作用はほぼ完全に抑制された。TNFの神経保護作用にNF κ Bの活性化を介するBcl-2及びBcl-xの発現誘導が関与することが示された。

V5-04

細胞外ATPによるラット脳ミクログリアのTNF- α 産生遊離

田中 将也¹、鈴木 智久¹、井上 敦子¹、秀 和泉¹、井上 和秀²、高坂 新一³、仲田 義啓¹

¹広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学講座、²国立医薬品食品衛生研究所 薬理部、³国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部

ミクログリアはマクロファージ系の細胞がその起源と考えられ、脳組織傷害、神経変性、あるいは炎症の際に活性化し、TNF- α などのサイトカインを分泌し、脳の免疫反応に関与している。一方、ミクログリアにはイオンチャネル型P2X7とG蛋白質共役型P2Yの2種類のATP受容体が発現していることが報告されているが、細胞機能における役割は明らかではない。そこで我々はラット新生児脳の培養ミクログリアを用いて、ATP受容体を介するTNF- α 産生遊離の制御について検討を行った。その結果、P2X7活性化に必要とされる濃度のATP (1 mM)およびP2X7選択的アゴニスト2' and 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-adenosine 5'-triphosphate (BzATP)によってTNF- α mRNA発現、およびTNF- α 遊離が引き起こされた。この効果はATPが起こす持続的Ca²⁺流入と相関し、P2X7アンタゴニスト (calmidazolium, KN-04) はCa²⁺流入、TNF- α 遊離のいずれをも抑制した。さらにATPならびにBzATPはMAP kinaseのp44/42、およびp38を活性化し、その特異的阻害剤であるPD98059、SB203580はそれぞれATPならびにBzATPが起こすTNF- α 遊離を抑制した。以上の結果からミクログリアにおいてATPはP2X7受容体の活性化を介してCa²⁺を流入させ、TNF- α の転写、遊離を引き起こすこと、さらにこのシグナル経路にはp44/42とp38が関与する可能性が示唆された。

V5-05

カルシウムチャネルモジュレーターによるラット脳における脳由来神経栄養因子の動態

仙波 りつ子^{1,3}、稲熊 裕¹、竹内 郁夫¹、加藤 兼房¹、岩井 美和子²、御子柴 克彦²

¹愛知県コロニー・研究所、²東京大・医科学研究所、³CREST, 科学技術振興事業団

私達は、脳における脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現調節機構を明らかにするため、薬物投与による脳内BDNFの変化を調べている。これまでに、痙攣誘発物質であるカイニン酸、AMPA、PTZ投与により、海馬および嗅内皮質(梨状葉皮質を含む)のBDNFが増加することを明らかにした。今回、電位依存性カルシウムチャネルのモジュレーターである(±)Bay K-8644 (BAY-K: 2.4 mg/kg, ip) およびNifedipine (NIF: 100 mg/kg, sc) 投与の効果について4-5週齢のSDラットを用いて調べた。

Lタイプのカルシウムチャネルの活性化剤であるBAY-Kの投与によりBDNFプロテインが、海馬(1.3倍)、中隔野(1.3倍)、大脳皮質(2.8倍)、嗅内皮質(2.4倍)、線条体(2.1倍)および脳幹(1.3倍)で有意に増加した。一方、NIFは、大脳皮質のBDNFプロテインの濃度を64%に減少させ、BAY-KによるBDNFプロテインの増加を阻害した。BAY-K投与による発作は投与5分後からみられ、約一時間続いた。大脳皮質では、BAY-K投与後2時間で、1.4 kbと4.2 kbのBDNF mRNAがもっとも増加していた。一方、BDNFプロテインは6時間で最大となり、14 kDaと30 kDaに観察された。これらの所見は、海馬や嗅内皮質でもみられた。BDNFの免疫染色では、大脳皮質5-6層の神経細胞が染色されるが、BAY-K投与後は、すべての層の神経細胞が染色された。最近、BDNF合成の開始がCREBのリン酸化(CREB-P)により起こることが報告されている。そこで、BAY-K投与後のCREB-Pの変化を調べたところ、大脳皮質では投与後5分で約1.4倍に増加していた。その他のカルシウムチャネル、NMDA受容体の活性化やIP3受容体の欠損マウスではBDNFプロテインに変化がみられないことから、電位依存性カルシウムチャネルの活性化が、BDNF合成の開始にかかわっているものと思われる。

V5-06

イムノフィリンリガンドの神経栄養因子産生誘導作用と神経保護効果

新田 淳美、西岡 博史、古川 昭栄
岐阜薬科大学・分子生物

免疫抑制剤の受容体を総称してイムノフィリンと呼び、臓器移植の際などの拒絶反応を抑制するためにT細胞内に存在すると考えられてきた。しかし、イムノフィリンが免疫系の10-50倍脳に発現していることが最近報告され、中枢神経系での役割に関心が持たれている。本研究では、イムノフィリンリガンドの1つであるタクロリムスの神経栄養因子産生誘導作用およびドパミン作動性神経への保護効果について検討した。

常法に従って神経細胞およびアストロサイトを培養し、タクロリムス(0.1 - 10ng/ml)を24時間作用させた後の上清中のNGF、BDNF、NT-3およびGDNFの濃度を酵素免疫測定法で測定したところ、GDNF含量が用量依存的に著しく増加していた。一方、タクロリム(1.5mg/kg)を7日間腹腔内投与した8週齢のラット脳各部位でも有意なGDNF含量の増加が観察された。6-OHDAを右側線状体に注入したマウスに10日間タクロリムス(10mg/kg)を投与すると、メタンフェタミン投与によって誘発される回転運動が著しく抑制された。

本研究の結果から、イムノフィリンリガンドの1つであるタクロリムスは、ドパミン作動性神経系に対して生存維持効果を持ち、その時GDNFの産生誘導が少なくとも一部は寄与していると考えられる。パーキンソン病やアルツハイマー型老年期痴呆症など奏功を示す治療薬が存在していない神経性疾患に対して、このようなイムノフィリンの作用は新しいアプローチとして期待される。

V5-07

BDNFとNGFによる一過性グルタミン酸放出作用における細胞内シグナル解析

沼川 忠広¹、松本 知也¹、小島 正己^{1,2}、
武井 延之³、畠中 寛¹

¹大阪大、蛋白研生合成、²科技団さがけ21、

³新潟大脳研

神経活動の重要なステップである神経伝達物質放出にニューロトロフィン(NTF)は重要な役割を担っている。我々はニューロトロフィンのひとつBDNFが中枢ニューロンにおいて神経伝達物質放出のステップに直接関与していることを見出した。小脳顆粒細胞においてBDNFはpreシナプスに作用し、一過的なグルタミン酸放出を引き起こす。この放出作用はBDNFの特異的なチロシinkinase型レセプターTrkBを介する作用であり、BDNFの興奮性シナプス調節因子としての重要性を示している。別のニューロトロフィンであるNGFでも小脳顆粒細胞において顕著なグルタミン酸の放出を観察した。小脳顆粒細胞ではNGFに特異的なTrkAの発現はほとんどみられない。にもかかわらずNGFで顕著なグルタミン酸放出が観察される。また、その放出はBDNF同様細胞内カルシウムに依存性の高いものである。培養細胞にカルシウム指示薬Fluo-3を取り込ませ共焦点レーザー顕微鏡下で観察するとBDNF、NGFともに有意な細胞内カルシウムの上昇がみられた。さて、BDNFはTrkB活性化の下流であるPLC- γ 経路の活性化によるIP₃産生を介して細胞内カルシウムの上昇を引き起こし、グルタミン酸の放出を行っていると考えられる。すなわち、BDNFによる上昇はIP₃レセプター阻害剤、heparinにより完全に抑制され、IP₃レセプターの活性化が関与している。また、PLC- γ の阻害剤、U-73122でもカルシウム応答は抑制された。BDNFによるグルタミン酸の放出においてもheparin、U-73122で阻害効果がみられた。一方でTrkAの発現がみられないNGFでのグルタミン酸放出、カルシウム応答にはいかなる経路が関与しているのか、ここでは低親和性のp75下流シグナルをグルタミン酸放出、細胞内カルシウムの応答を指標に解析中である。

V5-08

NOで誘導されるニューロン死のBDNFによる促進効果は培養日数に依存する

石川保幸、畠中寛
大阪大学・蛋白質研究所

BDNFは主としてニューロンの生存維持に働く栄養因子として知られている。また、最近では成熟ニューロンにおけるシナプス可塑性にも関わっていると報告されている。我々は、高酸素気相下のニューロン死およびNO依存性のニューロン死をむしろ促進する可能性があることを報告した。

今回この、BDNFによるニューロン死の促進効果をNOによっておこる細胞死の系でさらに詳細に検討した。その結果、NOによる細胞死はBDNFによって顕著に促進され、BDNFによって促進される細胞死は遺伝子発現、蛋白質合成、核凝縮、DNA断片化を伴うことからアポトーシスであることが明らかとなった。さらにBDNFによる細胞死促進効果は用量依存的でありBDNFの濃度はTrkBを介する一般的な濃度と一致していた。このBDNFによる細胞死促進効果は、TrkB-IgGおよびK252aの添加によって抑制されたことからTrkBを介した効果であった。p38の選択的阻害剤であるSB202190、およびSB203580によって抑制されたことからp38が関与することが示唆された。更に、NOによる細胞死促進効果は、細胞の培養日数およびラットの日齢に依存していた。このことから、BDNFによる細胞死促進効果は、神経系の発達段階において何らかの役割を担っていると考えられる。

V5-09

大脳皮質ニューロンのBDNFシグナルでのShp-2及びBIT/SHPS-1の機能解析

荒木 敏行、山田 雅司、畠中 寛
大阪大・蛋白研

脳由来神経栄養因子は(BDNF)は神経細胞の分化や生存、さらには可塑性に関わることが知られている。BDNFはその高親和性受容体であるTrkBに結合してその機能を発揮する。TrkB以降の細胞内シグナルについては現在種々の分子が同定されているにすぎない。最近PC12細胞においてNGFのシグナルにおいてtyrosine phosphataseであるShp-2が関与している事が明らかとなり、我々は同様に培養下のラット大脳皮質ニューロンにおいてもBDNFの添加により、Shp-2およびBIT/SHPS-1がリン酸化されることを明らかにした。またその際Shp-2がBIT/SHPS-1と結合することを見いだした。そこで今回、我々はBDNFシグナル伝達系におけるShp-2およびBIT/SHPS-1の役割を分子レベルで解析するために、アデノウイルスベクターを用いこれらの蛋白質を過剰発現させることを試みた。Shp-2 wild type およびShp-2 のphosphatase inactive mutant (C/S mutant)を発現するアデノウイルス、BIT/SHPS-1 wild typeおよびBIT/SHPS-1のリン酸化されるtyrosine残基をphenylalanineに置換したmutant (4F mutant)を発現するアデノウイルスを作製し、培養下のラット大脳皮質ニューロンへ過剰発現を行った。その結果、Shp-2 wild type及びC/S mutantを発現させることで、BDNF添加後のチロシンリン酸化に顕著な違いが観察された。特にC/S mutantを発現させることで少なくとも4種の蛋白質のチロシンリン酸化が增強していた。その中の68kDの蛋白質はShp-2自身と考えられ、Shp-2は自分自身を基質としていることが予想される。また、BIT/SHPS-1を発現させることでそれ自身のチロシンリン酸化が顕著に誘導された。また、興味深いことにBDNFによるMAP kinaseの活性化はこれらの蛋白質の過剰発現によって影響されなかった。現在我々はShp-2やBIT/SHPS-1と相互作用すると思われる分子について、これらのアデノウイルスを用いて解析を行っている。

V6-01

培養アストロサイトの遅発性アポトーシス発現におけるプロテアーゼおよびNF-kappa Bの役割

田熊 一敏¹、李 英培²、馬場 明道³、松田 敏夫⁴

¹神戸学院大・薬・分析、²薬理、³大阪大院・薬・神経薬理、⁴複合薬物動態

我々は既に、遅発性グリア細胞死を含むCa²⁺パラドックス様障害が培養アストロサイトにおいて発現すること、本細胞障害に活性酸素およびアポトーシスが関与することを報告している。今回は、本障害の発現機構におけるプロテアーゼおよびNF-kappa Bの役割について薬理学的手法を用いて検討した。アストロサイトは生後1～2日齢のラット大脳より調製した。培養アストロサイトを低Ca²⁺培地に曝露後、正常培地に戻すと活性酸素産生の増加が認められた。Ca²⁺再灌流による活性酸素の産生増加に対して、BAPTA-AM、カルパイン阻害薬、カタラーゼおよびアロプリノールが抑制効果を示した。一方、グルタチオン枯渇薬BSO、カタラーゼ阻害薬ATZおよびキサンチンは活性酸素産生を促進した。過酸化水素(100 μM)に短時間曝露し再灌流するとDNAラダーおよび核の凝縮が認められた。過酸化水素曝露およびCa²⁺再灌流によるアポトーシスに対して、フェナントロリン、FK-506、カスパーゼ3阻害薬Ac-DMQD-CHO、カテプシンD阻害薬ベプスタチンAおよびNF-kappa B阻害薬PDCが保護効果を示した。Ac-DMQD-CHOによる活性酸素障害に対する保護効果は、カテプシンB阻害薬CA074Me共存下消失し、さらにカテプシンD阻害薬ベプスタチンAを添加すると回復した。過酸化水素曝露によるNF-kappa Bの核内移行が認められ、本活性化はフェナントロリン、FK-506およびPDCにより阻害された。これらの成績は、Ca²⁺再灌流による遅発性アポトーシスの発現における、(1)カルパイン～サンチンオキシダーゼ系活性化に伴う活性酸素の産生、ならびに(2)活性酸素によるカテプシンD～カスパーゼ3系およびカルシニューリン～NF-kappa B系の活性化の関与を示唆する。

V6-02

Inhibition of gap junctional intercellular communication by endogenous and exogenous oxidative stress in retinal horizontal cells

Z. Y. Zhou, K. Sugawara, S. Kato

Department of Molecular Neurobiology, Graduate School of Medicine, Kanazawa University

To investigate the effects of oxidative stress in gap junctional intercellular communication of carp retinal horizontal cells, we used two well-characterized models of oxidative stress in carp retina. Endogenous oxidative stress was induced by blocking synthesis of the endogenous antioxidant glutathione (GSH) with buthionine sulfoximine (BSO). Exogenous oxidative stress was induced with paraquat (PQ), an intracellular generator of superoxide. The gap junctional intercellular communication between horizontal cells was studied by intracellular recording of light-induced responses and dye coupling of the fluorescence Lucifer Yellow. The retinal GSH level was reduced and the intercellular communication of horizontal cells was inhibited by both BSO and PQ.

V6-03

老齡ラットで見られたニューロフィラメント蛋白の構成比変化と軸索輸送

内田 敦子^{1,2}、田代 朋子³、小宮 義璋³、久永 真市¹

¹都立大院・理・生物、²東工大・生命理工・バイオサイエンス、³群馬大学・医・分子病態

ニューロフィラメント (NF) は神経細胞に特異的な中間径フィラメントで、軸索内の最も主要な細胞骨格である。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のような神経軸索変性疾患では軸索内でのNFの蓄積が頻繁に見られる。このようなNFの蓄積は、軸索輸送の傷害の結果であると考えられている。ALSは老化に伴い発症率が増加する。一方、NFの軸索輸送速度は老化に伴い低下する。両者には何らかの関連があると考えられるが、NFの軸索輸送機構についてさえ未だ不明な点が多い。老化でみられる軸索輸送速度低下の原因を明らかにするため、老齡ラットと若齡ラットのNFを比較し、老齡ラットのNFは軸索内で密にパッキングしていること、3つのサブユニット(NF-L、NF-M、NF-H)のうちNF-Mの割合が減少していることをすでに報告した。本研究では、NFのパッキングとサブユニット構成比が、軸索に沿ってどのように変化するかを座骨神経を用いて詳細に解析した。老齡ラットでみられた軸索内NFのパッキングは、前根など軸索近位部で著しく、遠位部では緩和されていた。一方、NFのサブユニット組成も軸索の部位により異なっていた。若齡ラットでは軸索の遠位部でNF-Mの割合が高いのに対し、老齡ラットでは遠位部に行く程NF-Mの割合が減少していた。遠位部におけるNF-Mの減少と軸索輸送との関連性を明らかにするために、脊髄前角部位に [35S] メチオニンを注入し、坐骨神経を輸送される各NF蛋白の速度と量を調べた。その結果、老齡ラットではNF-Mの輸送速度が他のサブユニットに比べ低下していることが判明した。これらの結果から、NF-Mの輸送速度低下は老化に伴うNFの輸送速度低下の原因の一つである可能性が示唆された。現在はNF-Mの輸送速度が低下する原因について調べているところである。

V6-04

スフィンゴミエリン分解によるラットアストロサイトのアポリポプロテイン A-I 依存性コレステロール放出の増加

伊藤 仁一、長安 祐子、横山 信治

名古屋市立大学医学部生化学第一

ラットアストロサイトはアポリポプロテイン (apo) E を分泌し、同時にコレステロール (Cho)、リン脂質を放出して細胞外に high density lipoprotein (HDL) を生成する。また外来性 apoA-I に反応して細胞内 Cho pool が減少し、Cho 放出が促進されるが、その放出量は他の細胞種に比べ著しく低い。本実験では、細胞膜におけるスフィンゴミエリン (SM) と Cho との強い親和性に注目して、ラットアストロサイトによる外来性 apoA-I 依存性 Cho 放出における SM の役割を検討した。

100 mU スフィンゴミエリナーゼ (SMase) で1時間処理することにより、ラットアストロサイトの見かけ上約70%のSMが分解され、細胞内 Cho poolが増加した。しかし SMase 処理された細胞は非処理細胞に比べ、外来性 apoA-I (5 mg/ml) 刺激により細胞内 Cho pool のより顕著な減少が認められた。また apoA-I 依存性の Cho 放出が約 40% 促進され、microemulsion による非特異的な Cho efflux もわずかに上昇した。apoA-I で誘導される Cho 放出は SMase 作用中に最も高く、SMase 除去後の時間経過と共に Cho 放出は減少した。SM の培養液中への添加は SMase による apoA-I 依存性 Cho 放出促進作用を抑制した。また SMase 処理された細胞膜の Triton X-100-insoluble fraction における Cho content は約 60% 減少した。TritonX-100-insoluble fraction は Cho および SM が豊富に存在し、これらの強い相互作用により安定な構造を形成すると考えられている。こうした知見から、SMase は細胞膜 Triton-insoluble fraction の SM を分解することにより、apoA-I に対する反応性を高め Cho 放出を促進するように Cho 分子の存在様式を変化させることが示唆された。

V6-05

ドレブリン関連タンパク質SH3P7の樹状突起内局在

山崎 博幸、白尾 智明
群馬大学医学部行動分析学

SH3P7はSH3ドメインのリガンドスクリーニングによってマウス胎仔cDNAライブラリーより単離されたタンパク質で、C末端側にSH3ドメインを1つ持ち、N末端側にアクチン結合タンパク質ドレブリンの相同領域を持つ。免疫系においては、リンパ球の抗原受容体から細胞骨格への情報伝達の過程で、SH3P7がアダプタータンパク質として働いていると示唆されている。我々はラットSH3P7のクローニングを行い、得られたcDNAより種々の解析を行った。

RT-PCRで得られたDNA断片をプローブにしてラット海馬cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ16個のクローンが得られ、それらは僅かなアミノ酸の有無で4種類に分けられた。pETシステムにより合成した融合タンパク質を抗原にしてウサギポリクローナル抗体を作製し、ABC法、蛍光法を適用して免疫組織化学を行った。材料は7週齢ラット脳をパラホルムアルデヒド固定したクリオスタット切片を用いた。また、EGFP(Enhancement Green Fluorescent Protein)とSH3P7全長cDNA(4種類)、SH3ドメイン欠損配列、N末端領域欠損配列(ドレブリン相同部位を含む)との融合タンパク質をCHO細胞に発現させて観察した。

SH3P7は脳に広く存在したが、特に海馬、小脳分子層が強く染色された。海馬においては歯状回分子層、CA1放射状層などに多く存在し、樹状突起様またシナプス様の染色が観察された。小脳分子層においてはブルキンエ細胞樹状突起様に染まり、また斑点状の染色も確認された。各種マーカーを用いて二重染色を行ったところ、SH3P7は細胞体には少なく樹状突起に多く存在しシナプス後部スパインにも存在した。対照的にシナプス前部には存在せず、グリア細胞にも目立った局在は観察されなかった。遺伝子導入の結果、EGFP-SH3P7は細胞質に分散して存在しストレスファイバーにも局在した。4種のcDNA間の発現形における差は観察されなかった。一方、SH3ドメイン欠損変異体はストレスファイバーでの局在は変わらなかったが一部が核に移行し、N末端領域欠損変異体ではほとんど全てが核に移行した。

これらの結果より、SH3P7はドレブリン相同部位を含むN末端領域で細胞骨格と相互作用し、主に樹状突起、スパインで機能していると考えられる。

V6-06

中枢神経系細胞によるアストロサイトのコレステロール代謝の制御

上野 幸子^{1,2}、伊藤 仁一²、長安 祐子²、
横山 信治²

¹名古屋市立大学医学部精神医学教室、²名古屋市立大学医学部第一生化学

アストロサイトはアポリポ蛋白質E(アポE)の分泌と共にコレステロール、燐脂質を放出してHDL様リポ蛋白質を形成し、中枢神経系細胞のコレステロール代謝及び運搬において重要な役割を果たしていると考えられる。我々は中枢神経系組織におけるアストロサイトのアポE分泌とHDL産生の生理的役割を解明するため、神経細胞共存下におけるアストロサイトのアポE分泌とコレステロール代謝変化について検討した。

ラット胎児大脳細胞を一ヶ月間長期混合一次培養したのちアストロサイト単独の二次培養を一週間行ったもの(M/W)を、一次培養一週間、アストロサイト単独二次培養を一週間あるいは一ヶ月間行ったもの(W/WあるいはW/M)と比較した。

M/WではW/W、W/Mに比べてコレステロール合成は約2倍に促進され、さらにLDL負荷によりより効率的にその合成が抑制された。またアポE産生が著しく亢進しこれに伴いコレステロール放出が増加した。この結果M/Wの細胞コレステロール含量はW/Wに比べ約30%低下した。さらにM/Wは外来性アポAⅠ刺激に対する反応性が低下しコレステロール、スフィンゴミエリン放出は促進されなかった。長期混合培養の培養液添加によりW/Wはコレステロール放出、アポE分泌が共に促進された。

これらの結果から、アストロサイトのコレステロール代謝亢進は他の中枢神経系細胞との液性因子を介した相互作用によるものであることが示唆された。

V6-07

HLH型転写因子によるオリゴデンドロサイトの発生分化調節

鹿川 哲史¹、齋藤 哲一郎²、池中 一裕¹¹国立生理学研究所神経情報部門、²国立遺伝学研究所発生工学部門

ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子は、神経初期発生を促進する非常に重要な分子であることが知られている。我々は、グリア細胞の初期発生もHLH型転写因子によって調節を受けているのではないかと考え研究を進めてきた。

最近、中枢神経系グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトの終分化過程が、神経軸索からの Jagged-Notch シグナルによって調節を受けていることが示唆された。Notchシグナルを受け取ったオリゴデンドロサイト前駆細胞には、抑制性に働くbHLH型転写因子HES5の発現が誘導され成熟が抑えられる。このことは、すなわち、オリゴデンドロサイトの成熟には、促進性のbHLH型転写因子による正の調節が必要であることを示唆している。そこで、我々は、オリゴデンドロサイト前駆細胞株CG4のmRNAよりbHLH型転写因子に対するdegenerated PCR primersを用いて、促進性bHLH型転写因子であるMash1を逆転写-PCR (RT-PCR) クローニングすることに成功した。さらに、生後8日目のラット視神経からMash1 mRNAを検出し、オリゴデンドロサイト初代培養細胞にも抗Mash1抗体陽性反応を検出したので、in vivoでもオリゴデンドロサイトの細胞系譜にMash1が発現していることが示された。また、オリゴデンドロサイト前駆細胞を高血清条件で培養するとアストロサイトへと分化することが知られている。この過程ではベーシック領域を持たない、すなわちDNA結合活性を持たない抑制性のHLH型転写因子Id遺伝子ファミリーの発現が誘導されるので、異なる機構でMash1の活性を抑制していることが考えられる。

これらの事実は、オリゴデンドロサイトの発生の少なくともある分化段階においてMash1が中心的役割を担っており、その活性をHES5で抑制すると未分化な状態が保持され、Id遺伝子ファミリーで抑制するとアストロサイトへの分化を促すことを示唆しており興味深い。

V6-08

脳の胎児期に優勢な新規遺伝子Bdm2の発現解析

本郷 茂樹、高橋 隆、西中 直也、竹田 二美代、

竹田 稔

昭和大学医学部生化学

我々は前回Differential Display法によって胎児期脳に高発現する新規Bdm2遺伝子のcDNAクローニングを報告した。今回さらにin situ hybridizationによってBdm2 mRNAの詳細な脳内発現分布を調べた。胎生18日脳においては広範囲に発現が認められたが、生後14日脳では発現がより限局し嗅球、海馬、小脳に強い発現が観察された。

生後14日の海馬ではCA1-CA3野の錐体細胞層、歯状回の顆粒細胞層に、小脳においては外顆粒層、内顆粒層に強いシグナルが認められた。海馬、小脳、嗅球は生後においても神経細胞が産生される領域であり、ノーザンブロットによる発現変化の解析結果等からBdm2は神経細胞の最終分化に関わっていることが示唆される。

次に我々はGST-BDM2融合タンパク質に対する抗体を作製した。ウエスタンブロットによって脳の上清画分に38と36kDaの二種類のBDM2タンパク質が存在することが示された。36kDaのBDM2は胎児期に多く発現がみられ生後低下するが、38kDaのBDM2は生後3日目から増加し始めた。このように脳においてBDM2タンパク質の発現が確認され、神経系の発達にある役割を果たしていると考えられる。

V6-09

神経芽腫サブセットからのオリゴキャップ full-length cDNAライブラリーの作製および シーケンシング

大平 美紀¹、高安 肇¹、影山 肇¹、諸橋 愛子¹、
穴倉 朋胤¹、河本 竹正¹、高田 尚幸¹、
高橋 将人¹、鈴木 稔²、菅野 純夫²、中川原 章¹
¹千葉がんセ・生化、²東大医科研・癌ウイルス

神経芽腫は小児の腹部腫瘍の中で最も多く、神経芽細胞が交感神経系の神経節細胞や副腎髄質へと分化していく過程で発生する。この腫瘍は一歳頃までに出現する場合は予後が良く、腫瘍細胞の自然退縮や分化がしばしば見られる。逆に一歳以降に見つかったものは予後が悪く、N-mycの増幅を高頻度に伴う。このことから、神経芽腫の病態や、各サブセットの生物学的特性には、神経系での分化増殖をつかさどる遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などが密接に関わっているものと予想される。現在知られている例としてはNGFに対するレセプターTRK-Aの発現が予後良好群で高く、腫瘍の分化や自然退縮に役割を担っているらしいこと、また一方予後の悪い群ではTRK-Aの発現は抑えられており、代わってbrain-derived neurotrophic factor のレセプターであるTRK-Bが高発現し、腫瘍の進展に寄与しているらしいことが分かってきた。

我々はこのような神経芽腫をひきおこす遺伝子群を同定するため、予後の良い群と悪い群の患者サンプルからそれぞれcDNAライブラリーを作製し、これらを将来マイクロアレイやDNAチップに応用して各サブセットでの遺伝子発現プロファイルの検討を目指している。現在までに予後良好群のプライマリーサンプルから、オリゴキャッピング法を用いて完全長クローンを多く含むcDNAライブラリー（平均インサート長：約3 kb）を作製し、2400クローンの両端シーケンシングを終了した。最初の1100クローンのホモロジー解析の結果、既知遺伝子は457個（365種類）（40%）であり、新規遺伝子の可能性を持つものは、ESTデータベースのみにあたる308個（27%）、ゲノムシーケンスにあたる219個（19%）、及びno hit 40個（4.0%）を合わせた50%であった。このサブセットのシーケンシングはひとまず終了し、今後は予後の悪い群についてのシーケンシングをすすめていく予定である。また、今回得られた遺伝子のなかで興味深いものについては複数の患者サンプルを用いた半定量PCRを行っており、この結果も合わせて報告する。

P1-01

細胞膜分画に存在するADP-ribosyl cyclase活性の受容体刺激による変化

東田 陽博、横山 茂、橋井 美奈子、星 直人
金沢大学大学院・医学研究科・分子情報医学・細胞遺伝子学講座

トランスミッター受容体刺激後、セカンドメッセンジャーとしての Ca^{2+} が細胞内で増加する。この増加は、細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内イノシトール三リン酸感受性 Ca^{2+} プールおよびリアノジン感受性 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} の動員により生じる。後者は細胞内 Ca^{2+} 増加が Ca^{2+} 動員により生じる(CICR)として知られている。この Ca^{2+} 動員をモジュレートする内在物質としてサイクリックADPリボース (cADPR)がある。cADPRは NAD^+ を基質として、ADPリボシル環状化酵素 (ADP-ribosyl cyclase)により生じる。哺乳動物ADP-ribosyl cyclaseとしてCD38やBST-1が知られているが、ADP-ribosyl cyclaseは膜分画と細胞質の両方に存在する。今回、膜分画に存在するADP-ribosyl cyclaseに注目して受容体がどのようにその活性を調節するか調査した。神経芽細胞腫および心室筋の100,000 g沈渣中の粗膜分画を酵素源として、2mM NGD^+ と0.06 mCi [^3H] NAD^+ あるいは60 mM NAD^+ 存在下、37℃インキュベートした。 ^3H NAD^+ をTCLで分画し、また蛍光分光光度計によりcGDPRの産生を測定した。ムスカリンやアドレナリン受容体刺激により酵素活性が変化したので報告する。

P1-02

ヒトmGluR1a発現細胞及びラット培養大脳皮質細胞におけるCPCCOEtとPHCCCの阻害様式とその性質

丸山 尚治、大沢 ひろみ、塚本 直大、竹内 裕
萬有製薬・つくば研究所

メタボトロピックグルタミン酸レセプター(mGluR)はG蛋白を介したセカンドメッセンジャー系にリンクしているレセプターで、少なくとも8つのサブタイプがクローニングされている。N末の細胞外ドメインが非常に大きいことが、他のG蛋白結合型レセプターとは大きく異なる特徴である。このN末の細胞外ドメインがグルタミン酸結合部位と考えられている。アミノ酸構造を持つ化合物がmGluRに対してagonist、antagonist作用を持つことは知られているが、非アミノ酸構造から成るCPCCOEtとPHCCCがmGluR1に対して阻害作用を示すことが報告されている。今回我々は、CPCCOEtとPHCCCがmGluR1のグルタミン酸結合部位とそれ以外の部位のどちらに対して、影響を及ぼしているのかを調べた。ヒトmGluR1aを発現しているCHO細胞において、グルタミン酸による細胞内 Ca^{2+} 増加反応におけるCPCCOEtおよびPHCCCの影響を調べたところ、それぞれの IC_{50} 値は6.3mM、1.0mMであった。阻害様式を調べるためSchild analysisを行ったところ、アミノ酸構造を持つmGluR1阻害薬である4C3HPGはdose-response curveが右側に平行移動する競合阻害様式を示したが、CPCCOEtとPHCCCは非競合的阻害様式を示した。 ^3H -quisqualateを用いたradioligand binding assayでは、CPCCOEtとPHCCCはいずれも ^3H -quisqualateのbindingを阻害しなかった。また、CPCCOEtによる阻害の可逆性を調べたところ、4C3HPG同様、可逆的な阻害を示した。ラット胎児脳由来の初代培養大脳皮質細胞において、group I mGluR特異的agonist(S)-3,5-DHPGによる Ca^{2+} の上昇をCPCCOEtは100mMで阻害した。以上の結果より、CPCCOEtおよびPHCCCはmGluR1においてグルタミン酸結合部位以外の部位において可逆的な阻害作用を示すことが強く示唆された。またその阻害作用は正常細胞に存在する受容体でも認められた。

P1-03

ラット脳タイプ1シグマ(σ 1)受容体との会合蛋白質の探索と解析

山本 秀子¹、三浦 玲子²、山本 敏文³、
根津 竹哉³、篠原 慶子¹、鷲 直樹¹、山国 徹⁴、
額田 敏秀³

¹ (財) 東京都精神研精神薬理、² 神経化学、³ 横浜市
大院総合理学、⁴ 三菱生命研

σ 1受容体は普遍的に存在することから、細胞の基本機能に関与する可能性が示唆されているが、細胞内における情報伝達機構は明らかにされていない。 σ 1受容体は、ラット脳を0.4%CHAPSで可溶化した画分をセファクリル200HRゲル濾過クロマトにより分離すると、放射性 σ 1選択的リガンド結合実験と σ 1受容体抗体を用いた染色により、200-kDa以上の高分子量の位置に検出される。しかし、精製された σ 1受容体は約30-kDaであることから、細胞内では σ 1受容体は他の蛋白質と複合体を形成して機能していることが推測される。そこで我々は、 σ 1受容体の細胞内情報伝達機構を明らかにするために、GST-(His)₆- σ 1受容体フラグメント (アミノ酸配列118-223) 融合蛋白質を大腸菌に発現させ、そのアフィニティゲルを用いて σ 1受容体と複合体を形成する会合蛋白質を探索した。 σ 1受容体抗体を用いたウェスタンブロット染色から、 σ 1受容体の細胞内局在は、ミクロソーム画分に多く認められ、シナプトソーム画分にも存在することから、ラット脳P₂及びP₃のCHAPS可溶化画分を調製し、GST融合蛋白質アフィニティゲルと反応させた。対照はGSTのみのアフィニティゲルとした。GST融合蛋白質アフィニティゲルのグルタチオン溶出蛋白のSDS-PAGEは、ラット脳P₂画分に σ 1受容体 (膜貫通領域後からC末端) と *in vitro* では複合体を形成する高分子量の蛋白質 (220-kDa以上) が検出され、シナプトソームにおける σ 1受容体は他の蛋白と複合体として存在し、機能する可能性を示唆した。P₃画分ではP₂画分と同位置にbandが検出されたが、さらに高分子量の会合蛋白質も検出された。

P1-04

神経細胞におけるNaポンプアイソフォームのイオン輸送活性制御機構の解析

井上 順雄、曾我 智子、加藤 尚彦
横浜市立大学医学部生化学第一

培養神経細胞に存在するNaポンプアイソフォームのイオン輸送活性の制御機構を解析した。神経細胞型 (α 3型と α 2型) アイソフォームと α 1型アイソフォームの存在量の比は約2:1であるが、無処理、無刺激の条件下 (basalな状態) では、イオン輸送活性の比は約1:2であった。これは、basalな状態において活性が制御され、①神経型が抑制された状態、② α 1型が活性化された状態、③神経型が抑制され α 1型が活性化された状態、のいずれかにあることを意味する。一方、細胞をカルモジュリンアンタゴニストであるW-7で処理すると、全体の活性が約60%に減少したが、アイソフォームのイオン輸送活性の比が変化して、神経細胞型の活性が全体の約2/3になった。これは、basalな状態における活性制御をW-7が解除したことを意味すると考えられる。また、CaMキナーゼの阻害薬であるKN-93によっても、同様の活性の比の変化が起ったことから、basalな状態における活性制御にCaMキナーゼが関与する可能性が示唆された。一方、細胞をグルタミン酸で刺激すると、神経細胞型活性が全体活性の約2/3になり、全体のイオン輸送活性が約1.7倍に上昇した。同様な変化は、KN-93存在下でも起ったが、グルタミン酸刺激に伴うNa⁺流入を阻害するW-7存在下では起らなかった。したがって、グルタミン酸は、basalな状態における活性制御を解除し、細胞内Na⁺濃度を上昇させることにより全体の活性を上昇させることで、両アイソフォームの活性を変化させると推定された。これに対して、細胞をプロテインキナーゼ(PKC)の活性化剤であるPMA、あるいは、プロテインホスファターゼ (PP1とPP2A) の阻害剤であるオカダ酸で処理すると、両アイソフォームの活性が同程度上昇し、全体のNaポンプ活性が、それぞれ、約1.5倍と1.6倍になった。さらに、オカダ酸処理条件下でグルタミン酸で刺激すると、神経細胞型活性と α 1型活性の両方が上昇し、全体のNaポンプ活性が約2.5倍に上昇した。以上の結果から、神経細胞のNaポンプの活性制御に、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化が関与することが示唆された。

P1-05

神経軸索上の電位依存性チャネルのクラスター形成におけるPSD-95ファミリーの役割

馬場 広子¹、石橋 智子^{1,2}、秋田 裕美²、
池中 一裕²、西野 仁雄¹

¹名古屋市立大学医学部第二生理、²国立生理学研究所

Post synaptic density-95 (PSD-95)はシナプス後膜部に存在する蛋白質で、NMDA受容体、電位依存性K⁺ channel、nNOSと結合し、シナプス後膜におけるそれらの分子のクラスター形成に重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、中枢神経系においてPSD-95が軸索部分にも輸送され、juxtaparanodeにおいて電位依存性K⁺ channelと共にクラスターを形成していることを示し、この蛋白質がシナプス後膜のみでなく、軸索部におけるK⁺ channelの局在にも関わっていることを明らかにしてきた。脱髄後の軸索においては、このPSD95およびK⁺ channelのクラスターは消失する。しかし、ウェスタンブロットによる解析結果からは、蛋白質量としては脱髄前後でほとんど変化していないことから、脱髄によってこれらの分子がびまん性に分布するようになったと考えられた。一方、末梢神経軸索においてはPSD-95は中枢神経系と同様にK⁺ channelの存在するjuxtaparanodeの部分にクラスターを形成するのに対し、PSD-95の3つのPDZドメインに共通したアミノ酸配列をもとにして作製した抗体ではランビエ絞輪部にもクラスターが認められた。これは、電位依存性Na⁺ channelが局在する絞輪部分にPSD-95以外のPDZドメインを持つ分子が存在し、蛋白質分子の局在化に関与している可能性が考えられた。

ランビエ絞輪周辺部分へのチャネルのクラスター形成は正常な跳躍伝導のために重要であり、その局在化の鍵をにぎるPSD-95ファミリーがどのようにしてこの部分に集積するのかを現在検討中である。

P1-06

Mitochondria tricarboxylate carrier とホモロジーを示す脳特異的新規遺伝子のクローニング

三宅 進一^{1,4}、玉谷 実智夫^{1,4}、満田 憲昭¹、
佐藤 康二²、谷口 学^{1,4}、河合 良訓³、堀 修^{1,4}、
仙波 恵美子³、遠山 正彌^{1,4}

¹大阪大・医・第二解剖、²浜松医大・第一解剖、

³和歌山県立医大・第二解剖、⁴CREST、JST

我々はラット脳cDNAライブラリーを用い、Mitochondria tricarboxylate carrier proteinと34%のホモロジーを示す翻訳領域を含む新規遺伝子を単離した。この遺伝子はNorthern blot法及びWestern blot法によりmRNAレベル、タンパクレベル共に脳特異的に発現していることが認められた。発生段階でのタンパク発現はadult脳にて最も多く認められた。また、免疫組織化学法により副神経核、舌下神経核、迷走神経背側核、および小脳のベルグマン支持細胞等においてタンパクの発現が認められた。さらに、免疫電顕の結果よりベルグマン支持細胞においてはミトコンドリアの膜に局在していることが明らかになった。今後、この新規遺伝子がコードするタンパク質の機能解析について検討する予定である。

P1-07

グリアセロトニントランスポーターの薬理学的特徴と可視化

稲津 正人、武田 弘志、松宮 輝彦
東京医科大学薬理学教室

セロトニン神経終末の細胞膜には、放出された神経伝達物質を Na^+/Cl^- 依存的に再取り込みし、神経伝達を終了させるセロトニントランスポーターが存在している。セロトニントランスポーターは、神経細胞外のセロトニン濃度を調節する機能蛋白質であり、その発現や活性の調節機構が、神経伝達効率を制御する因子であることが強く示唆されている。近年、中枢神経系において神経細胞と同様にグリア細胞の生理的な役割が注目されており、この細胞に神経伝達物質を細胞間質から取り除く輸送機構の存在が示唆されている。セロトニンのグリア細胞への取り込みは、 Na^+ 依存性でSSRIs感受性との報告があるが、分子レベルでの検討は全く成されていない。そこで今回我々は、培養ラットアストロサイトを用いて、グリアセロトニントランスポーターの薬理学および分子生物学的特徴について神経型セロトニントランスポーターと比較検討した。各種モノアミン取り込み阻害薬の大脳皮質シナプトソームおよびアストロサイトへの $[\text{pH}5\text{-HT}]$ 取り込み阻害作用を検討した結果、両標本における阻害活性は、 5-HT 取り込み阻害薬 $>$ NE取り込み阻害薬 $>$ DA取り込み阻害薬の順であり、 K_i 値に高い相関性を認めた。抗セロトニントランスポーターモノクローナル抗体により、アストロサイトが特異的に免疫染色された。ウエスタンブロット解析により、大脳皮質シナプトソームにおいて118 kDaおよび73 kDaのバンドが、アストロサイトでは、120 kDaおよび73 kDaのバンドが検出された。更に、両標本をPNGase F処理すると73 kDaのバンドのみが検出された。この様な薬理学および分子生物学的特徴より、アストロサイトには神経細胞と類似のセロトニントランスポーターが発現していると考えられる。また、これらの分子量の違いは、異なる糖鎖修飾が関係していることが示唆された。

P1-08

高親和性コリントランスポーターのクローニング

奥田 隆志¹、芳賀 達也¹、金井 好克²、
遠藤 仁²、石原 健³、桂 勲³

¹東京大・医・神経生化学、CREST、

²杏林大・医・薬理、

³遺伝研・構造制御、総研大

コリン作動性神経では、アセチルコリン分解産物のコリンはシナプス前部に存在する高親和性コリントランスポーターによって細胞内に取り込まれ、アセチルコリン合成に再利用される。高親和性コリン取り込みは Na^+ と共役しており、ヘミコリニウム-3によって阻害される($\text{K}_i=10\text{-}100\text{nM}$)。この取り込みはアセチルコリン合成の律速段階であり、シナプス伝達の効率を調節すると考えられている。現在までにGABA、ノルアドレナリン、ドーパミン、グリシン、グルタミン酸など主要な神経伝達物質のトランスポーターのcDNAが単離されているが、コリントランスポーターは単離されていない。我々は線虫 *C.elegans* のゲノム配列から予測される Na^+ 依存性トランスポーターcDNAを1つ1つクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞発現系で高親和性コリン取り込み活性を調べることによって線虫高親和性コリントランスポーターを同定し、*cht-1*(choline transporter-1)と名付けた。次に*cht-1*の塩基配列の相同性を指標にラット脊髄から相同分子(CHT1)をクローニングした。ノーザン解析の結果、脊髄、前脳基底部、線条体、脳幹に局限して転写産物が確認された。CHT1はコリン作動性神経で発現していると推定された。CHT1をアフリカツメガエル卵母細胞で発現させると Na^+ 依存的で、ヘミコリニウム-3($1\mu\text{M}$)で完全に阻害されるコリン取り込み活性が観察された。これらの結果は高親和性コリントランスポーターの性質と一致している。

P1-09

樹状突起に mRNA が局在する新規遺伝子の同定

鈴木 龍雄¹、田 慶宝¹、岡野 照¹、中山 耕造²¹信州大・医・神経可塑性、²信州大・医・二解剖

神経細胞の樹状突起やシナプス後部の入力部位近辺にタンパク合成のための装置があり、そこでのタンパク合成がシナプスの入力で制御されることによりシナプス可塑性発現に関与していることが示唆されている。現在までに樹状突起内に mRNA が局在するとされるタンパク質としては既知のもの約20種と未知のもの約40種が知られている。今回我々はラット全脳から単離したシナプス後肥厚部 (PSD) 画分に付随している RNA を抽出し、600種以上の mRNA を検出した。そのうち現在までに約200種ほどの塩基配列を決定した。ホモロジー検索の結果、42種類の遺伝子が既知、143個が未知の配列であった。既知のものの中には既にその mRNA が樹状突起に存在する事が知られている MAP2 や TrkB が認められた。また、各種レセプターや、いくつかのシグナル伝達に関与する分子も認められた。我々は新規の遺伝子を仮に Dem (Dendritic mRNA) gene と名付けた。それらのうち、34種については in situ hybridization によって mRNA が樹状突起に局在することを明らかにした。また、いくつかの Dem gene の発現は、カイニン酸産生誘発後の脳で up-regulation をうけることがわかった。さらに、特異的プライマーを作成して RT-PCR を行うと、mRNA が樹状突起にも局在するカルモジュリンキナーゼ II a サブユニットの mRNA も PSD 画分に検出された。さらにいくつかの Dem の mRNA も確かに PSD 画分に検出されるし、カイニン酸産生後の脳で up-regulation をうけることも確認された。また、Dem21 についてはラット脳 cDNA ライブラリーより、さらに長い cDNA をクローニングしており、その発現タンパク質に対する抗体による Western blotting では Dem21 protein が PSD 画分に存在する事が明らかになった。これらの結果は、我々の同定した多くの Dem 遺伝子が単に RT-PCR の際の特異的な人工産物ではないことを示唆している。今後、できるだけ多くの新規 Dem gene をクローニングする計画である。

P1-10

成長円錐における alpha-latrotoxin 依存性の伝達物質放出機構

五十嵐 道弘、小宮 義瑋

群馬大・医・分子病理学

成長円錐は成長期神経細胞の軸索先端にあり、軸索成長を担うほか、シナプス前終末の前駆体とも考えられる。演者は成長円錐に SNARE 機構が存在し、軸索成長に関与すること、その調節機構がシナプス終末とは異なることを証明した。今回は、強制的に exocytosis を起こさせる alpha-latrotoxin (LTX) を用いて成長円錐の exocytosis 機構を詳しく解析したので、報告する。

(方法) 生後2日目ラット前脳より調製した単離成長円錐及び成熟ラット脳より調製したシナプトソームを Ca^{2+} -free Krebs-Ringer buffer に懸濁し [^3H]GABA を取込ませ、LTX 添加後の放出 [^3H]GABA 放射活性を測定した。

(結果・考察) 成長円錐には LTX 依存性の伝達物質放出能が確認され、種々のボツリヌス神経毒素に感受性だった。結合実験から、LTX 受容体の量には差がなかったが、LTX 感受性はシナプスの 1/10 であった。成長円錐では LTX 依存性の rab3A の GDP-GTP 型変換が生じにくく、rabphilin-rab3A 複合体形成も極めて少なかった。また rabphilin、rab3-GEP の2種類の蛋白がきわめて少量で、rab3A サイクリングが不完全であることを見出した。さらに成長円錐に rabphilin を導入すると、rab3A サイクリングの効率は上昇した。これらの結果は、成長円錐では SNARE 機構はある程度発達しているが、rab3A サイクリングはシナプス成熟に伴って発達することを強く示していた。

P1-11

新規シナプス小胞タンパク質p36の同定

中山 幸代¹、堀 均¹、韓 春錫²、大倉 多美子³、
阿相 皓晃⁴、植村 慶一²、永沢 秀子¹

¹徳島大・工・生物工学、²慶応大・医・生理、³慶応大・先端医科研、⁴都立老人研・細胞生物

神経伝達物質の開口放出において、重要な役割を担う物質として、種々のシナプス小胞タンパク質が同定されている。我々は、けいれん関連遺伝子PTZ-17の推定タンパク質のC末ペプチドに対する抗体としてAb17を生成し、これによってマウス及びラットの海馬CA3、CA4領域の苔状線維シナプスが強く染色されること、またこの抗原タンパク質の一種がシナプス小胞タンパク質であることを見いだした。そこでこの構造と機能を明らかにするため、Ab17の抗原タンパク質の同定を行った。

Ab17によるラット組織の免疫ブロッティング解析において、約49kDa (p49)と約36kDa (p36)のバンドがみられ、これらはいずれも脳に特異的に発現し、肺、心臓、肝臓、腎臓には認められなかった。このうち、p49はラット脳より調製した細胞質分画に、p36は膜分画に存在していた。特にp36は、6 M塩酸グアニジン・25 mM DTTを含む緩衝液で変性処理したブロット膜上でより強く検出されること、硫酸またはTCA沈殿後に再溶解されにくいことなどから、疎水性が高く、凝集しやすいタンパク質であると予測された。マウス及びラット脳の免疫組織化学染色において、Ab17から得られた抗p36アフィニティー精製抗体でCA3、CA4領域が強く染色される一方、p36非吸着分画では全く染まらなかったことから、この領域に強く発現するタンパク質はp36であると結論づけられた。ラット大脳より精製したシナプス小胞分画に、p36がシナプトフィジン、シナプトタグミンなどと共存したが、SDS-PAGE及び二次元電気泳動上の挙動はこれらとは異なっていた。以上の結果から、p36は新規シナプス小胞タンパク質であることが示唆され、現在、単離及び一次構造決定について検討中である。

P1-12

神経筋シナプス形成のシグナル分子の解析

重本 和宏¹、久保 幸穂²、近藤 郁子¹、
丸山 直紀²

¹愛媛大学医学部衛生学、²東京都老人総合研究所分子病理

胎生期に運動神経終末が筋組織に接触後に働くシナプス形成の初期シグナルとしてシナプス前膜（運動神経終末）から分泌されるアグリンによりシナプス後膜側（筋肉組織）に存在するMusk/Nsk2リセプター型タイロシンキナーゼ(RTK)が活性化され、アセチルコリンリセプター(AchR)、Nsk2/Musk RTK、rapsyn膜蛋白を凝集させることが明らかになっている。我々は、この分子機構を解析するためマウスC2C12培養筋細胞のAchR凝集を、作成したリコンビナントアグリンで誘導する実験系を構築しそれを用いて分子機構を解析している。我々はカイネースドメインを欠く分泌型Musk/Nsk2アイソフォームを発見しているが、今回このアイソフォームの機能とシグナル伝達における意義について解析するために、ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ (hAP-tag) とヒト免疫グロブリンのFcドメインをC末にタグとして付加した(hFc-tag)リコンビナント蛋白を作成した。これらを用いて、C2C12 AchR凝集実験系に投与すると、AchR凝集を濃度依存性に100%抑制することが示されたことから、生体内でアグリンによるMusk/Nsk2RTKの活性化の調節因子として作用することが示唆された。ところでMusk/Nsk2RTKの活性化にはアグリンと分化したC2C12筋細胞で発現している別の分子が必要であるが、その実体は不明である。作成した上記のリコンビナントを用いてMusk/Nsk2RTK活性化の因子について現在解析を行っており、最近の知見に基づき議論したい。

P1-13

シナプトタグミン/ チューブリン相互作用

本多 敦子、西須 英雄、阿部 輝雄
新潟大学脳研究所

神経終末における伝達物質の放出が細胞骨格によって制御されていることを示唆する報告は多いが、その具体的な分子機構に関する知見は乏しい。生化学的、生理学的、遺伝学的証拠から、シナプス小胞の膜蛋白質シナプトタグミン（以下タグミン）は伝達物質放出過程におけるCa²⁺センサーと考えられている。最近の研究はタグミンが伝達物質放出以外のシナプス前部機能にも関与していることを示唆する。われわれはタグミンが細胞骨格蛋白質チューブリンに結合することを報告したが、今回、その相互作用を解析し、SNAREとの関係等を調べたので報告する。

タグミンIはMAPsやタウ蛋白質を含まない精製チューブリンにCa²⁺依存的に結合する。subtilisin処理によりC末端部分を除去したチューブリンには結合しない。われわれはすでにタグミンIがチューブリンのbサブユニットに結合することを報告している。したがって、タグミンIは、MAPsやタウ蛋白質と同様にチューブリンbサブユニットのC末端部分に結合すると考えられる。タグミンIの細胞質部分全体とGSTの融合蛋白質に対して精製チューブリンは強く結合するが、GST-C2AあるいはGST-C2Bには弱い結合しか示さなかった。タグミンIIはIときわめて似た一次構造を持つが、チューブリンの結合はほとんどみられなかった。

タグミンIはsyntaxinおよびSNAP-25に結合することにより、VAMP/synaptobrevin が加わった安定な7S複合体を形成する。ラット脳粗synaptosomes分画のTriton[®] X-100抽出物の抗チューブリン抗体あるいは抗タグミンI抗体による免疫沈降では、チューブリン、タグミンIの他に上記の3種のSNAREsが回収された。したがって、チューブリン/タグミンI相互作用はタグミンIのSNAREsへの結合を妨げない。また、チューブリンの結合はタグミンI分子同士の結合によるmultimerizationに影響しなかった。

P1-14

発育初期における遅い軸索内輸送の変化と細胞骨格成熟過程

津田 守弘、田代 朋子、小宮 義璋
群馬大学医学部分子病態学講座

軸索および神経終末部を構成する細胞骨格蛋白質は全て細胞体で合成され、1日数mmの速度をもつ遅い軸索内輸送により供給されている。我々はこれまで、成長-老化の過程や神経再生過程、薬剤投与後の様々な状況下における遅い軸索内輸送を解析し、これが細胞骨格動態を反映して変化することを示してきた。遅い輸送の速度は成長につれて徐々に遅くなるとされているが、実験上の制約から、発育初期の幼若動物について実測された例は少なく、ラットでは4週齢以前の報告例はない。今回我々は、生後1週齢から3週齢のラット坐骨神経を用いて、細胞骨格蛋白質の動態およびその軸索内輸送を調べ、細胞骨格の発育過程を明らかにするとともに、この時期に増加するニューロフィラメント(NF)の果たす役割について検討した。

1、2、3週齢のラット脊髄前角部にL-[35S]メチオニンを注入し、4-7日後に前根および坐骨神経を摘出して、3mmの連続切片とした。1% Triton緩衝液を用いて各切片中の蛋白質を可溶性と不溶性に分別後、SDS電気泳動で分離し、アクチン、チューブリン、NF蛋白質の放射活性を定量した。

若齢ラットでも、アクチン、チューブリンに加えて、三種のNF蛋白質(H,M,L)が大量に輸送されており、NF集積過程を反映すると考えられる。成熟ラットと比較して輸送速度が全体に速いが、1週齢-3週齢にかけて減速するとともに、NFのサブユニット組成に変化がみられる。重合した細胞骨格に対応する不溶性分画の速度が速く、可溶性分画と差がないこと、可溶性分画に回収されるチューブリンおよびNF-Hが成熟ラットより有意に多いことから、よりダイナミックな構造であることがわかる。これらの結果は、NFの量的、質的变化およびNFと微小管の相互作用の変化を主体として軸索細胞骨格の安定化が起り、輸送が減速することを示唆している。

P1-15

ラット脳から新たに分離したNF-H
C末尾部キナーゼはGSK3 β であった佐々木 孝寛¹、内田 敦子¹、石黒 幸一²、
久永 真市¹¹都立大院・理、²三菱生命研

神経軸索の最も主要な細胞骨格であるニューロフィラメント (NFs) はNF-L、NF-M、NF-Hの三つのサブユニットから構成されている。NF-MとNF-HのC末尾部はside-armを形成し、そこには多数のリン酸化部位が存在する。そのリン酸化はNFs間又はNFと他の細胞内構造との相互作用を制御すると考えられているが、その詳細は解明されていない。リン酸化はKSPの繰返し配列に存在する。KSP配列はKSPXXとKSPXXの2つのモチーフに分けられる。前者はCDK5により、後者はMAPK又はSAPK(JNK)によってリン酸化されることがin vitroで示されている。しかし、神経栄養因子やストレスなどにより一時的に活性化されるMAPKやSAPKはNF-Hを構成的にリン酸化するキナーゼとしては考えにくい。また、SAPKはNF-Hをリン酸化しないことを予備的な実験により確認している。即ち、KSPXX配列をリン酸化する他のキナーゼの存在が考えられた。今回、CDK5、MAPK、SAPK以外のNF-H C末尾部キナーゼを検索したところ、GSK3 β が分離されたので報告する。

KSPXXタイプのリン酸化モチーフが多く存在するラットNF-HのC末尾部全領域 (425~1072 aa) を大腸菌で合成し、精製した後、基質として用いた。成体ラット脳をホモゲナイズした後、100K $\times$ gの遠心分離を行い、その上清画分をDEAEセルロースカラムで分画した。未吸着画分には、CDK5とMAPKがほとんど含まれないにもかかわらず、強いNF-H キナーゼ活性が存在した。この画分をSPセファロースカラムで2つのNF-H キナーゼ活性ピークに分けた。弱いピークは残存するCDK5のものであったが、強いピークは、CDK5でもMAPKのものでもなかった。この活性をヘパリンカラムとSuperose 6を用いて更に分画した。このNF-H キナーゼ活性は20mMの塩化リチウムにより阻害された。Superose 6の活性ピークに一致する47KDaのタンパクはウエスタンブローディングの反応性から、GSK3 β であることが示唆された。GSK3 β がNF-Hをリン酸化するという報告はあるが、リン酸化部位やその役割については全く分かっていない。GSK3 β によるNF-Hのリン酸化部位や生理的リン酸化についても報告する予定である。

P1-16

ミクログリア特異的カルシウム結合蛋白質
Iba1のアクチン結合能の解析佐々木 洋、今井 嘉紀、大澤 圭子、
金澤 裕子、高坂 新一

国立精神神経センター・神経研・代謝

Iba1は脳内でミクログリア特異的に発現する分子量17kDaのカルシウム結合蛋白質である。Iba1の細胞内局在を調べるため、ミクログリア細胞株のMG5を用い抗Iba1抗体による免疫細胞染色を行なった。蛍光標識ファロイジンとの二重染色により、膜ラフリング部位においてIba1とアクチンの共存が観察された。このことから、Iba1はアクチン構造維持に関わる蛋白質であると考えられる。そこでIba1とアクチン細胞骨格の関係を明らかにするため、アクチン結合能を中心に解析を行なった。

アクチンはニワトリ胸筋より精製し、Iba1はGST融合蛋白質として大腸菌で発現させ、酵素処理によりGSTと分離したものを用いた。超遠心によるアクチン線維との共沈実験を行なったところ、Iba1は繊維状アクチン (F-アクチン) に結合して沈殿した。結合の解離定数は約15mMで、Iba1:アクチンのモル比でおよそ1:3で飽和に達した。さらに低速遠心による実験ではF-アクチン単独では大部分のアクチンが上清に残るのに対し、Iba1を加えると多くのアクチンが沈殿することから、Iba1はF-アクチンを架橋する活性を持つと考えられる。また、Iba1のアクチン結合及び、架橋作用にカルシウム依存性は認められなかった。次にIba1ミュータントを作製しアクチン結合、架橋に対する影響を解析した。N末端10アミノ酸を欠失させると結合能が著しく低下し、C末端28アミノ酸を欠いたミュータントでは逆に結合が強くなった。また両ミュータント共にアクチン架橋作用は示さなかった。このことからアクチン結合にはC末端28アミノ酸を除いた部分が必要であり、架橋作用にはN、C両末端が必要であると考えられる。

以上の結果から、Iba1は膜ラフリング部位にあって、アクチン架橋作用を通じアクチン構造の維持に重要な役割を果たす蛋白質である可能性が示唆された。

P1-17

**ミクログリアにおける転写因子NFAT
(Nuclear Factor of Activated T Cells)
とカルシニューリン情報伝達系**

大森 信彦、星川 裕、内野 博之、芝崎 太
東京都臨床医学総合研究所細胞生理学研究室

(背景、目的)

NFATはT細胞活性化に不可欠な転写因子であり、このNFATの活性化では、セリン/スレオニンホスファターゼであるカルシニューリン(Cn)によるNFATの脱リン酸化により核内移行および転写活性の制御が行われている。今回われわれは、ラット前脳虚血モデルにおいて、カルシニューリンの特異的阻害剤であるシクロスポリン(CsA)の投与によりミクログリアの活性化が抑制されることを見出し、ミクログリアにもNFAT/Cn系が存在することが考えられたため以下の検討を行った。

(方法)

1) ラット前脳虚血モデル：雄性Wisterラット（8週齢）を用い、CsA投与群（虚血前後計4回、CsAを10mg/kgにて腹腔内投与）、非投与群の前脳虚血モデルを作製した。虚血後経時的に脳組織凍結切片を作製、蛍光抗体法にて、活性化の指標としてOX-6抗体の免疫反応性を検討した。

2) 培養モデル：マウスミクログリア細胞株、MG5(Ohsawa et al., GLIA 21(1997))を用い、CnA、CnBの存在、A23187 およびCsA処理によるNFATのリン酸化状態の変動をSDS-PAGE、Westernにより解析した。また、タンパク核画分を抽出し、EMSAによりNFATのDNA結合能を検討した。

(結果)

1) ラット前脳虚血モデル：CsA投与群では、OX-6陽性細胞の出現は認められなかった。

2) 培養モデル：CnAおよびCnBの存在が確認された。また、NFATはA23187により脱リン酸化、CsAにより再リン酸化が認められた。EMSAでは、A23187処理後の核抽出画分において、DNA結合能が確認された。

(結語)

ミクログリア活性化制御の新しい情報伝達系として、NFAT/Cnの存在が明かとなった。ミクログリア活性化を病態とする疾患へのカルシニューリン阻害剤の有効性が示唆される。

P1-18

**小脳顆粒細胞死に応答し活性化する
ミクログリア遺伝子gcd-10の同定**

折笠 瑞穂、田中 秀逸、小池 達郎
北海道大・院理・行動知能

生後1週間のラット小脳より単離した小脳顆粒細胞は通常の K^+ 濃度（5.4mM）下で培養すると、2-4DIVで突起伸長・分化し、5-6DIVには約半数が死滅する。我々は小脳顆粒細胞と、細胞分裂阻害剤で増殖を抑えたグリア細胞の共培養系において、神経細胞死に伴い発現が変化する遺伝子を探索した。3DIVの培養細胞をコントロールとし、5DIVで顕著に発現する遺伝子をdifferential hybridization法により検索した結果、細胞死に伴って活性化する6遺伝子が認められた。gcd (granule cell death)-10はそのうちの一つである。この遺伝子は細胞を高 K^+ (30mM)で培養した後、血清及び高 K^+ を除いたアポトーシス系でも顕著に発現が増強したことから、何らかのアポトーシス関連遺伝子であることが示唆された。Northern blotting解析では、約2.4および1.3kbの2つのバンドが認められ、その発現レベルは3DIVではわずかであるが、4DIVから増加し、5-6DIVでピークに達した。

Differential hybridization法で得られたfragmentを元に、5DIVの共培養細胞cDNA libraryよりcloningを行い、1.3kbの塩基配列を決定した。結果、gcd-10のcoding regionは造血細胞由来の2つのマウスhomologueと高い相同性を示した。そのうちの1つLAPTm5は262個のアミノ酸から成るlysosomeに局在する蛋白質である(Adra and Lim, 1996)。この蛋白質のペプチド抗体を用いて免疫染色を行ったところ、小脳顆粒細胞は染まらず、ミクログリアのみが顕著に染色された。従ってgcd-10は小脳顆粒細胞死に応答し、ミクログリアが発現する遺伝子であると考えられる。(LAPTm5抗体は共同研究者であるHarvard大B.Lim氏より供与。)

P1-19

ラット培養ミクログリアにおけるMRF-1のカルシウムによる発現調節

賀谷 直樹、橋本 敦史、田中 秀逸、小池 達郎
北海道大・院理・行動知能

当研究室では、小脳顆粒細胞のアポトーシスにตอบสนองミクログリアで特異的に発現増加する遺伝子 *mrf-1* を単離した (Tanaka et al., 1998)。その発現レベルは、活性化したアメーバ型ミクログリアで高く、静止型ミクログリアで低い。ラット大脳皮質細胞の初代培養系から単離したミクログリアを用いて、MRF-1 の発現レベルについて調べた。Northern blot 解析による *mrf-1* 発現レベルはミクログリアを炎症性サイトカイン IF γ で処理すると増加するが、同じくミクログリアを活性化することで知られる LPS で処理するとむしろ減少した。細胞の NO 産生の活性化剤 SNP や阻害剤 NAME による処理についても *mrf-1* 発現レベルへの影響を調べた。それらの結果から、少なくとも NO 産生活性と *mrf-1* 発現活性との間に相関は認められなかった。また、ミクログリアに Ca^{2+} ionophore や thapsigargin, high- K^{+} 等の細胞内 Ca^{2+} 濃度を高める処理を施すと *mrf-1* mRNA レベルは減少した。この Ca^{2+} ionophore の効果は、MRF-1 タンパクレベルでも Dot blot により定量的に確かめられた。これらの研究から、*mrf-1* の発現調節は神経細胞死にตอบสนอง発現上昇するのに加えて、 Ca^{2+} 依存的に発現減少するメカニズムの存在を示した。

P1-20

培養ミクログリアの生存制御におけるPI 3'-キナーゼとMAPキナーゼの役割

小池 達郎、橋本 敦史、池上 浩司
北海道大・大学院理学研究科生物科学専攻

活性化したミクログリアの生物機能に関しては多くの知見があるが、酸化ストレスや神経細胞死が亢進している環境下でミクログリア自身がどう生存制御されているかに関してはあまり知られていない。このためにはミクログリアの生存を促進している機構をまず明らかにする必要がある。ラット新生児大脳皮質から分離した培養ミクログリアは血清存在化で PI-3' キナーゼの標的である Akt のリン酸化 (ser473) が起こっている。IGF-1 はこれをさらに促進する。PI-3' キナーゼの阻害剤 LY294002 は Akt のリン酸化を消失させると共に用量依存的にミクログリア細胞の極性を消失させ、最終的に細胞死を誘発した。細胞死はアポトーシスの特徴を持ち、カスパーゼ 1 様活性阻害剤で抑制された。一方、MAPKK の阻害剤である U126 は部分的に細胞死を誘導した。両阻害剤による細胞死には加算性が成り立ち、独立な経路として働いていると考えられた。PI-3' キナーゼの阻害剤によるアポトーシスは CSF 1 及び 2 によって用量依存的に抑制された。細胞増殖阻害剤の存在下でも抑制効果はみられた。この抑制効果は U126 により失われた。活性型 MAP-K に対する抗体を用いたウエスタンブロットから、CSF はともに MAPK の活性化 (p44, p42) を促進した。CSF 1 及び 2 は MAP キナーゼ経路を介して生存を促進したと考えられる。一方、S6 キナーゼは生存制御には関与していなかった。

P1-21

**ミクログリア遺伝子 mrf-1 のネクローシスに
応答した発現増加**

田中 秀逸、小池 達郎
北海道大 院 理 行動知能

我々は、神経細胞のアポトーシスに応答して発現の増加するラットミクログリア遺伝子mrf-1を単離した(Tanaka et al., 1998)。この遺伝子発現は、大脳皮質由来の培養ミクログリアにおいて、変性を始めたラット小脳顆粒細胞との共存で顕著に増加する。また、アダルト正常脳内の休止型ミクログリアでの発現も認められている。RT-PCR法を用いて調べたところ、6週令ラットから単離した休止型ミクログリアのmrf-1レベルが、培養下でアメーバ型ミクログリアに分化するのに伴い増加することが確認された。さらに今回は、神経細胞のネクローシスに対する応答について調べた。ラット局所脳虚血により、大脳皮質梗塞周辺部で多くの神経細胞のネクローシスが観察されることが知られている。虚血後1週間の大脳皮質では、梗塞周辺部のミクログリアの顕著な活性化と数の増大も起こるが、それらの細胞での著しいMRF-1発現が免疫組織化学的染色により確かめられた。ラット小脳細胞培養系においても、グルタミン酸による成熟した顆粒神経細胞のネクローシスに伴い、共存ミクログリアでのmrf-1発現増加が起こることがノーザンブロット解析により確かめられた。これらの結果により、ミクログリアが、神経細胞のアポトーシスばかりでなくネクローシスに対しても応答しmrf-1発現を増加させることがわかった。(この研究は加藤宏之氏(東北大 医 神経内科)との共同による。)

P1-22

**ミクログリア活性酸素産生を増強するトリ
プシン処理アルブミン由来サブフラグメン
トの精製**

中村 洋一、司 秋生、片岡 喜由
愛媛大学医学部生理学第一

ミクログリアの活性化は神経細胞障害の結果ではなく、その原因となっている可能性が示唆されているが、その活性化機構については不明な点が多い。我々は破綻した血液脳関門から漏出した血清成分がミクログリアを活性化し、様々な神経毒性のある物質を産生する可能性について検討し、培養ミクログリアのホルボールエステル刺激による活性酸素産生がアルブミンにより著しく増強されることを報告した。

アルブミンをトリプシン処理しても、ミクログリアの活性酸素産生を増強する効果は消失せず、反対に増加した。この結果を利用し、トリプシン処理したアルブミンから活性を持つサブフラグメントを精製し、アルブミン内の活性部位を特定することを試みた。トリプシン分解したウシ血清アルブミンから、ゲル濾過、陰イオン交換、逆相の各クロマトグラフィを順に用いてサブフラグメントを精製した。精製標品の分子量は 5192 ± 1.2 (TOF-Mass分析)で、12個と33個アミノ酸からなる2つのペプチドがジスルフィド結合で繋がったものであった。このペプチドはミクログリアの活性酸素産生を濃度依存的に増強し、そのEC50は $0.1 \sim 0.2 \mu\text{M}$ で、もとのアルブミンのそれとほぼ等しかった。

これらの結果は、血清成分の中のアルブミン分子そのものがミクログリアの活性化を増強していることを強く示唆しており、また、アルブミン分子のごく一部分がその活性化機構に関与していることを示している。この分子構造のさらなる解明により、ミクログリアの異常活性化を抑制する神経細胞障害防御のための新しい手段が開発されることが期待される。

P1-23

Mouse Glia Maturation Factor- β 及び
 γ の cDNA のクローニング

井上 雄一朗¹、浅井 清文¹、藤田 佳織¹、
森川 将行^{1,3}、山本 愛美¹、三浦 裕¹、
河合 洋子¹、森山 明彦²、岸本 年史³、
飯田 順三³、加藤 泰治¹

¹名古屋大学医学部分子医研生体制御部門、²同自然科学研究教育センター、³奈良医大精神医学講座

[目的] 我々は、ヒトグリア細胞成長因子 (Glia Maturation Factor: GMF) - β 及び γ の cDNA の全塩基配列を明らかにし、昨年の本大会で報告した。今回マウス GMF- β 及び γ の cDNA のクローニングを行ったので報告する。

[方法] mouse brain cDNA library を定法に従いスクリーニングした。プローブには、ヒトの GMF- β 及び γ の cDNA を用いた。

[結果及び考察] マウス GMF- β 及び γ の cDNA は各 4,123bp、606bp であった。塩基配列より予測される open reading frame は、両者とも 426bp で、142 アミノ酸残基をコードしていた。これは、ヒトの GMF- β 及び γ と同数であった。FASTA program においてマウス GMF- β と GMF- γ の coding region 内で比較したところ、DNA は 71.1% の相同性を認めた。アミノ酸配列の相同性は 80.2% と高度であった。第 8、87、96 番のシステイン残基は GMF の生物学的活性に重要であると考えられるが、両者で一致しており、ヒトの GMF とも一致していた。ノーザンブロットングでは GMF- β に対応する 4.4kb の mRNA はマウスの心臓、脳、肺、肝臓、腎臓、精巣で主に発現しており、GMF- γ に相当する 0.9kb の mRNA はマウスの心臓、脾臓、肺、精巣で同定された。GMF- γ が限られた臓器で発現しているため GMF- γ の組織での機能が GMF- β と異なっていることを示唆しているのかも知れない。

P1-24

オリゴデンドロサイトの細胞系譜における
スフィンゴミエリン

中井 陽子^{1,2}、伊藤 康一³、桜井 洋子¹、
足立 達美⁴、国本 学⁴、植村 慶一²、阿相 皓晃¹
¹東京都老人総合研究所・神経生物、²慶応義塾大・
医・生理、³東京都臨床医学総合研究所・炎症、⁴国立
環境研究所・地域環境研究

スフィンゴミエリン (SM) は細胞膜に含まれる脂質成分の一つで、特に脳の白質部分に多く存在し、ミエリンを構成する主成分である。これまで、生体膜中の SM を直接検出する方法がなかったが、最近、溶血毒のライセニンが、膜中の SM に極めて特異的に結合し、生体膜上の SM を直接検出できることが明らかになった (Yamaji et al., J. Biol. Chem. 1998)。本研究は、このライセニンを使用して中枢神経系細胞における SM の細胞膜上での存在様式を解析する事を目的とした。培養中枢神経系細胞をライセニンおよび細胞種を同定するための抗体を使用して免疫細胞化学的に染色した。培養神経系細胞は、胎生 18 日目のラット大脳皮質から単離したニューロンおよび発達段階特異的オリゴデンドロサイト (Sakurai et al., J. Neurosci. Res. 1998)、更に生後 1 日目の大脳皮質から単離したアストロサイトをを用いた。特にオリゴデンドロサイトについては、細胞系譜を追って詳細に解析した。培養ニューロンにはライセニンは全く結合しなかった。アストロサイトではオリゴデンドロサイトよりも弱い結合が認められた。A2B5 陽性のオリゴデンドロサイトプロジェクターでは細胞膜へのライセニンの結合が認められず、さらに O4 陽性、O1 陽性、MBP 陽性とオリゴデンドロサイトの分化が進むが、これらの段階ではほとんどすべての細胞に、特に突起部分に明瞭な結合がみられた。以上の結果より、ライセニンの結合がオリゴデンドロサイトの分化のマーカーとなりうる可能性が示され、ミエリン形成に際し、SM が MBP より早い時期に発現し、役割を果たしていることが示唆された。

P1-25

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) ミエリンDM20のcDNAクローニング

遠山 陽子、一宮 智美、吉田 弘美、栗原 正
創価大・生命研・神経化学

Proteolipid protein (PLP) は両生類以上の脊椎動物中枢神経ミエリンの主要な膜タンパクで、爬虫類以上では二者択一スプライシングで生じるDM20と呼ばれるアイソフォームが混在している。一方魚類の中枢神経ミエリンの主要な膜タンパクは従来P0とされてきたが、最近DM20が魚類の中枢神経ミエリンでP0と共存していることが明らかにされた(Yoshida & Colman, 1996)。したがって、魚類のDM20はミエリンタンパクの進化の上で興味を持たれる。今回我々は、モデル動物として最近注目を集めているゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)のDM20について、cDNAクローニングを行なった。まず、ゼブラフィッシュの脳RNAからRT-PCRによりcDNA断片を得た。次に、この断片でcDNAライブラリーをスクリーニングし、多数の陽性クローンを得た。これらのクローンはすべて同一のcDNA由来であった。ゼブラフィッシュから得たcDNAは全長約1.7キロ塩基で、DM20に相当する245アミノ酸残基をコードするORFを持っていた。アミノ酸配列はPLPおよびDM20の特徴である膜4回貫通の構造を備えていた。また、哺乳類DM20とアミノ酸配列が類似していて、このcDNAがコードするタンパクが哺乳類DM20のゼブラフィッシュのホモログであることを示唆した。ノーザンハイブリダイゼーションではゼブラフィッシュの脳に約2キロ塩基の大きさのmRNAを認めた。今後、このcDNAを用いて、ゼブラフィッシュの発生発育過程でDM20の発現・局在の変化を追及していく予定である。

P1-26

マウス脳における新規myelin-associated glycoprotein (MAG) 蛋白質の構造解析

小糸 寿美^{1,2}、岡田 雅人¹、松田 義宏²、
永井 克也¹

¹大阪大・蛋白研・代謝、²国立精神神経センター神経研 免疫

Myelin-associated glycoprotein (MAG) はミエリン特異的蛋白質の1つで、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する構造を持つことやミエリン膜の最内層に局在することから、神経軸索に対する認識や接着に関与することが想定されている。MAGの2つのアイソフォームであるL-MAGとS-MAGはミエリン形成期にはL-MAGが一過性に著しく発現し、成熟期にはL-MAGに代わってS-MAGが主成分となる発現推移を示す。ところが、我々はRT-PCR法による高感度検出を行った結果、これまで発現がないとされてきた胎仔期から新生仔期のマウス脳内にもMAG mRNAが発現していることを見出した。さらに詳細な構造解析により、このMAGの構造は既知のS-MAG配列の5'末端側を一部欠失する新規のmRNA発現型であることが明らかとなり、我々はこのmRNAを5'-deleted MAGと名付けた。昨年の本大会では、5'-deleted MAGがオリゴデンドロサイトの前駆細胞に特異的に発現され、分化の進行に伴って減少する傾向を示し、このことから本分子がオリゴデンドロサイトの分化制御に関わる可能性を示唆することを報告した。今回、5'-deleted MAGから翻訳される蛋白質についてWestern blottingによる解析を試みた。マウス脳標品において抗S-MAG抗体と反応し、S-MAG(100kDa)とは明らかに異なるサイズ(57-60kDa)のバンドを検出した。これらの蛋白質を単離し、構造解析を行った結果、MAG配列を含むことが明らかとなり、5'-deleted MAGから翻訳された蛋白質であることが予想される。この蛋白質について現在までに得られた知見を報告する。

P1-27

オリゴデンドロサイト中のII型ペプチジルアルギニンデイミナーゼとその反応産物の検出

秋山 魁一¹、桜井 洋子²、阿相 皓晃³、千秋 達雄¹¹都老人研生物活性制御、²神経生物

オリゴデンドロサイトは幾つかの分化段階を経て成熟し、中枢神経系のミエリン膜を形成する。重層化したミエリン膜の細胞質側に存在するミエリン塩基性タンパク質 (MBP) には、特定のアルギニンがシトルリンに置き換わった弱塩基性亜成分が含まれる。これはペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) の働きでアルギニン残基が脱イミノ化されたものである。

最大6個のアルギニンが脱イミノ化された成分が見つかっており、酸性脂質粒子の凝集能が元のMBPと著しく異なると言われる。生体内には少なくとも3種類のPADが存在し、脳に見つかっているのはII型のみであるが、それがMBPを産生するオリゴデンドロサイトに局在するという確証は未だ得られていない。今回我々は免疫ブロット法により、桜井等 [1] の方法で単離したラット大脳皮質由来の未熟なオリゴデンドロサイト中にII型PADを検出した。これは免疫細胞化学的染色でも確認された。これとは対照的に、アストロサイトと神経細胞ではいずれの方法によっても陽性反応は認められなかった。各々の細胞のホモジェネートをインキュベートして内在性PADの働きにより産生された脱イミノ化タンパク質の検出を高感度ウエスタン法で調べた場合も、オリゴデンドロサイトのホモジェネートでのみ、陽性反応が認められた。以上の結果から、MBPの脱イミノ化がオリゴデンドロサイトに局在するII型PADの働きによることが明らかになった。微量の脱イミノ化MBPをウエスタンブロット上や組織切片上で特異的に検出する目的で、上で述べたMBP中の6個の脱イミノ化部位の一つに相当する合成ペプチドを酵素的に脱イミノ化したものでモルモットを免疫した。得られた抗血清は、未修飾のMBPより酵素的に脱イミノ化したMBPと優先的反応性を示した。この抗血清を用いて、種々の生体試料中に存在する脱イミノ化MBPの検索を進めている。

(1) Sakurai, Y. et al.: Differentiation of oligodendrocyte occurs in contact with astrocyte, *J. Neurosci. Res.* 52 (1998) 17-26.

P1-28

P0糖蛋白質の微量成分糖鎖構造解析

北村 邦男、坂本 安、閻 剣虹、野村 正彦
埼玉医大・第一生理

末梢神経ミエリンに存在する糖蛋白質であるP0蛋白質とPAS-II/PMP-22蛋白質は接着蛋白質としてミエリンの形成と維持に関与していると考えられている。P0蛋白質に関しては糖鎖部分に関与する接着が報告されている。神経系に存在する接着糖蛋白質の多くはHNK-1エпитープ糖構造として知られている硫酸化グルクロン酸をもった糖鎖を含有しており、この糖鎖の接着機構への関与が示唆されている。我々は、ウシP0蛋白質の糖鎖構造を解析を行い、硫酸化GlcNAcを含有するハイブリッド型の糖鎖骨格に硫酸化グルクロン酸やシアル酸が結合している糖鎖の存在を明らかにしてきた。これらの糖鎖の生合成系はまだ明確になっていないので、今回、ウシP0蛋白質由来の微量糖鎖群を詳細に検討した。また、VosholらはウシP0蛋白質の主たる糖鎖は硫酸化グルクロン酸及びbisecting-GlcNAcをもつ複合型であると報告しているので [J.Biol.Chem., 271, 22957 (1996)]、複合型糖鎖の有無についても検討を行った。その結果、微量成分中には今まで報告されていない糖鎖構造をもつもの数種類と、硫酸化グルクロン酸及びbisecting-GlcNAcをもつ複合型糖鎖1種が極めて微量に存在することを認めた。前者は主成分であるハイブリッド型糖鎖関連のものであり、後者の複合型糖鎖はPAS-II/PMP-22の糖鎖構造と同一であることから、複合型糖鎖はP0蛋白質の成分と考えるよりもPAS-II/PMP-22由来の不純物である可能性が高いと考えられた。

P1-29

ラット小脳白質を認識する抗体12F7の特徴

吉村 和法^{1,2}、山室 裕³、桜井 洋子²、
野村 正彦¹、須川 誠²、阿相 皓晃²

¹埼玉医科大学医学部生理学、²東京都老人総合研究所
神経生物、³日本大学生物資源科学部動物育種学

オリゴデンドロサイトは神経細胞と細胞間相互作用を介して神経細胞の高速な情報伝達を可能にするミエリンを形成する。多発性硬化症やビンズワンガー病では、この白質を形成するミエリンの破壊が認められる。そこで、我々は、ミエリン形成の未成熟オリゴデンドロサイトの分子機構およびデミエリネーションと抗オリゴデンドロサイト抗体の関係を明らかにするために、ラットE18脳由来未成熟オリゴデンドロサイトを用いて抗オリゴデンドロサイトに対するモノクローナル抗体を作成した。

本抗体12F7は成熟ラット小脳を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、その白質を強く認識し、その抗原の分布は抗ミエリン塩基性タンパク質抗体のそれと異なっていた。またこの抗体を産生するハイブリドーマをラット脳室内に注入した後、その脳を形態学的あるいは免疫組織化学的に検討したところ、コントロールと比べて脳室の拡大及び注入した部位の近傍の脳梁に本抗体の免疫反応が観察された。従って抗体12F7は白質のミエリンを特異的に認識する抗体で、ミエリン形成障害（細胞障害）作用がある可能性を示唆した。

P1-30

P19神経細胞分化におけるガングリオシドGT1bとGQ1bの局在について

小山内 たか¹、小谷 政春²

都臨床研・¹生命情報、²腫瘍免疫

多能性幹細胞、P19細胞はレチノイン酸処理により、神経細胞へ分化し、神経分化の実験モデルとしてよく用いられている。以前の我々の研究で、レチノイン酸処理による神経分化マーカーであるガングリオシドGT1bとGQ1bが見い出され、さらに、GT1bとGQ1bの各々の合成酵素活性が未分化細胞より高いことを報告した（BBRC, 241, 327-333, 1997）。

今回はレチノイン酸処理による凝集塊細胞と神経分化細胞について、ショ糖密度勾配遠心法により、ゴルジ装置をシス側とトランス側に分画し、GT1bとGQ1bの各々の合成酵素活性がどちらに局在するかを調べた。GT1b合成酵素活性は凝集塊細胞と神経分化細胞でシス側とトランス側の両方に局在していた。一方、GQ1b合成酵素活性は神経分化細胞で、シス側よりトランス側で顕著に高くなっていた。次に神経分化細胞でのGT1bとGQ1bの局在を調べた。抗GT1b抗体と抗GQ1b抗体、さらに、神経細胞の分化マーカーであるGAP-43とシナプトフィシンの各々の抗体を用いて、免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡写真の染色像によって観察した。その結果、抗GT1b抗体は細胞体、軸索、神経突起を染色していた。それは抗シナプトフィシン抗体の染色像と相似していた。抗GQ1b抗体は細胞体、軸索、神経突起をドット状に強く染色したのが特徴的であった。それは抗GAP-43抗体の染色像と相似していた。なお、GAP-43とシナプトフィシンの蛋白質分子の存在はウエスタンブロット法により確認出来た。

以上の結果から、P19細胞のレチノイン酸処理による神経細胞への分化過程で発現するGT1bとGQ1bはGAP-43とシナプトフィシンの蛋白質分子の近縁に局在していることを示唆した。

P1-31

マウスP19細胞の神経分化における新規転写因子Eosの発現

清澤 秀孔、横屋 幸彦、森 徹自、本間 豊、
金沢 賢也、二階堂 琢也、武田 順子、

竹内 真由美、和中 明生

福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門

Ikarosファミリー (Ikaros, Aiolos, Helios) はリンパ球系の分化制御に関わるzinc finger型転写調節因子をコードする。我々が同定したEosはこのファミリーに属する新規転写因子で主に胎生期神経系に発現する。その構造はN末端に4個のzinc finger、C末端に2個のzinc fingerを有しその間にDNA結合ドメインを持つ。またEosはC末zinc fingerを介して、ホモ/ヘテロダイマーを形成する。神経発生におけるEosの関与を調べるため、神経分化のin vitroモデルであるマウス胚性癌細胞P19をレチノイン酸で神経細胞に誘導し、その過程においてEosの発現を調べたところ、Eosは分化誘導開始1週間頃より発現が観察され始めた。Ikarosファミリーに属する他のメンバーはPCRレベルでこの系において発現が観察されなかった。さらに機能を探る目的でEosをP19細胞に強制発現したところ、レチノイン酸刺激をしない状態でもNeurofilamentの発現が免疫組織化学的に検出できた。この系において現在各種神経分化のマーカー遺伝子の発現を検討中である。またN末半分を欠いたドミナントネガティブ体を同様に強制発現させて神経分化に対する影響も検討中である。

P1-32

ゼブラフィッシュ新規Ikarosファミリー遺伝子の単離

横屋 幸彦、清澤 秀孔、森 徹自、本間 豊、
金沢 賢也、二階堂 琢也、武田 順子、

竹内 真由美、和中 明生

福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門

Ikarosファミリーに属する遺伝子群はZincフィンガー構造を持つ転写調節因子をコードしIkarosをはじめとしてAiolos, Heliosという構造類似のメンバーから形成されておりこれらはリンパ球系組織に特異的に発現する。少なくともIkarosとAiolosに関してはノックアウトマウスやドミナントネガティブトランスジェニックマウスにおいてリンパ球系の発生分化がほとんど起こらないか、あるいは障害されることから脊椎動物の免疫系特にリンパ球系の分化に重要な役割を担っていると考えられる。我々がマウスより単離した新規ファミリーメンバーEos (本学会、清澤ら参照) はN末端に4個、C末端に2個のZincフィンガーを持つこのファミリーの基本構造を有しているが、発生過程において中枢、末梢神経系に主に発現する点で他のファミリーメンバーとは大きく異なる。本研究では神経系の発生過程におけるこの遺伝子の機能を調べる目的で、発生過程における遺伝子操作の容易なゼブラフィッシュのEosホモログの単離同定を試みた。ゼブラフィッシュcDNAライブラリー (Dr. Grunwaldより供与) をマウスEos cDNAをプローブとして弱い条件でスクリーニングしたところ、2個のオーバーラッピングクローンを得た。シークエンス解析の結果、このクローンは既に報告されているゼブラフィッシュのIkarosとは異なる新規のファミリーメンバーをコードしていた。アミノ酸の相同性の点から本クローンはマウスのEos, Heliosに近縁でどちらのホモログであるかは現時点では不明である。現在その発現パターンを検索中である。

P1-33

ヒトNeuroD-related factor (NDRF) のプロモーター領域の同定と解析

北村 健、宮地 隆史、川上 秀史、中村 重信
広島大学医学部内科学第三

NeuroD-related factor (NDRF) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 構造をもつ神経発生過程に関わる転写因子の一つである。アミノ酸配列にて MATH / NEX-1 や NeuroD と高い相同性を示す。成熟マウスでも、海馬や小脳のプルキンエ細胞に強く発現し、記憶への関連も示唆されている。我々はヒト NDRF の遺伝子構造、転写開始点を決定し、プロモーター領域の機能解析を行った。ヒト NeuroD の cDNA の 1.1kb の断片をプローブとし、ヒト PAC ライブラリーをスクリーニングし、NDRF 遺伝子を得た。転写開始点を Cap Site cDNA kit を用いて、oligo-cap method にて決定したところ、転写開始点は 1 か所であった。塩基配列の解析の結果、2 つのエクソンと 1 つのイントロンからなり、イントロンは GT-AG ルールに従っていた。エクソン 1 は 195 塩基からなり、エクソン 1 とエクソン 2 の最初の 5 塩基は非翻訳領域であった。エクソン 2 は蛋白翻訳領域全域と polyadenylation signal を含んでいた。プロモーター領域は TATA-less 構造で、16 個の E box モチーフを認めた。

NDRF の bHLH 領域の下流の 465bp のフラグメントをプローブとして、6 つの細胞系列 (Hela-S3、HIT-T15、IMR-32、SK-N-SY5Y、DAOY、D283) で RNA プロット解析を行ったところ、HIT-T15 と D283 で 3.3 kb の単一のバンドを認めた。

プロモーター機能の解析のために、種々の長さの NDRF の 5' 隣接領域の断片を 9 種類作成し (F1-F9)、ルシフェラーゼ・アッセイを行った。F1-F3 では活性の上昇はなかったが、F4-F6 では 15 倍以上の活性上昇を認めた。また、F7 は最も高い活性を認め、F1-F3 の約 50 倍の活性を認めた。この結果より、少なくとも 2 つ以上 (-120 ~ -195 の間と -451 と -564 の間) の別個の調節部位が存在することが示された。各々の調節部位には E box が一つずつ存在し、何らかの bHLH 蛋白が、この部位に作用し、NDRF の発現を調節することが示唆される。

P1-34

成熟ラットの脳に多く発現される新規遺伝子 Bdm1 の機能解析

大橋 隆、山内 康照、大木 武、中田 規之、
竹田 二美代、本郷 茂樹、竹田 稔
昭和大学医学部生化学

Bdm-1 は胎児脳に比べ成熟脳に多く発現される、既知の遺伝子と相同性のない新規遺伝子である。我々は、これまでに mRNA レベルで Bdm1 は神経細胞の分化に伴い発現が増加することを報告した。今回は、蛋白レベルでの発現について調べ、Bdm1 の解析をさらにすすめた。

ウサギを用いて合成ペプチドを抗原とした抗体を作成し、合成ペプチドを固定化したアフィニティカラムにより精製した。こうして得られた抗体を一次抗体とし、Western blot 法によりラット脳の発育に伴う変化を検索した。また、Bdm1 cDNA を用いウサギ網状赤血球ライセート系で *in vitro* translation も行った。

脳の発育に伴う BDM1 タンパクの発現の変化をみたところ、約 64kDa と 63kDa の 2 つの蛋白が検出され、64kDa は胎生期に多く発現し後に減少するが、63kDa は生後 3 日から発現し始め、発育に伴い増加することがわかった。この際に用いた一次抗体に合成ペプチドを加えると、抗原抗体反応がおき、抗体が失活し蛋白のバンドが消失することから、この抗体が合成ペプチドによって免役されたものであることを確認した。また ORF を含む Bdm1 cDNA の RT-PCR によるクローニングにおいても長さの異なる二種の cDNA が得られた。*in vitro* translation では約 38kDa と 54kDa の蛋白の発現が認められた。Western blot 法によって検出された蛋白と分子量の相違があり、BDM1 は生体内において何らかの修飾を受けている可能性も考えられる。

P1-35

Necdin変異マウスを用いたゲノムインブリ
ンティングの解析

中田 祐二^{1,2}、植月 太一¹、小林 正克¹、
原 とも子¹、吉川 和明¹

¹大阪大・蛋白研・機能制御部門、²日本学術振興会特別研究員

Necdinは分裂を終了したニューロンに発現しており、特に発生段階の視床下部ニューロンにおいてその発現は多い。necdinは細胞周期制御に関わる転写因子E2F1やp53と結合し、その転写活性に抑制的に働くことがわかっている。

昨年、3つのグループからNecdinがPrader-Willi症候群の欠損領域に局在し、その患者脳で発現しておらず、母方に遺伝子刷り込みを受けていることが報告された。Prader-Willi症候群の特徴としては神経系の異常が知られており、とくに視床下部由来の症状を引き起こす。これらの結果よりnecdin遺伝子の欠損はPrader-Willi症候群でみられるような脳の発達異常などを引き起こす可能性がある。そこで、今回私たちはnecdin変異マウスの作製を行った。変異マウス作製に使ったコンストラクトはnecdinのコーディング領域にネオマイシン耐性遺伝子を挿入してnecdin遺伝子を分断したものを用いた。ES細胞にはTT2細胞株のXY、XO染色体型を用いて相同組換えにより変異マウスの作製を行った。また、necdinのプロモーターはTT2細胞で活性を持っていないためネオマイシン耐性遺伝子のプロモーターとしてPGKプロモーターを使用した。その結果、XY細胞由来で1系統、XO細胞由来で4系統のsingle copy insertionの変異マウスがとれた。これらキメラマウスをC57マウスと交配することによりF1マウスを作製した。これらF1変異マウスは致死性を示さなかったのでF1変異マウス同士を交配しnull変異マウスの作製を行った。その結果、necdin変異マウスの生殖能力や発生は正常であることがわかった。次に、これら変異マウスを使い遺伝子刷り込みをmRNAと蛋白質レベルで調べた。さらに免疫染色法で視床下部を抗体染色した結果、父方からnecdin欠損遺伝子が伝わった場合、野生型や母方から欠損遺伝子が伝わった場合とは異なり、mRNAも蛋白質も発現していなかった。necdinが母方の遺伝子からは発現しないことが蛋白質レベルでも初めて確認できた。これまでのところ、necdin変異マウスは正常で、致死性や不妊も示していない。現在、necdinはアポトーシスを誘発する転写因子E2F1、p53と結合することからnecdin変異マウスの脳初代培養細胞系のアポトーシス刺激への反応を検討している。

P1-36

ニューロン増殖抑制因子necdinと核マト
リックス蛋白質hnRNP-Uの相互作用

谷浦 秀夫、浅野 徹、松本 国治、吉川 和明
大阪大学蛋白質研究所機能制御部門

Necdinはレチノイン酸処理をしたマウス胚性がんP19細胞cDNA libraryから神経分化特異的に発現するcDNA cloneとして単離された。Necdin蛋白質は神経系の発生分化に伴って誘導され、ニューロンに特異的に発現している。Necdinを強制発現した細胞はその増殖が抑制される。またnecdinは細胞周期制御に関わる転写因子E2F1やp53と結合し、その転写活性に対して抑制的に働く(Taniura et al. J. Biol. Chem. 273, 720-728, 1998; G. J. Biol. Chem. 274, 16242-16248, 1999)。NecdinのE2F1、p53結合ドメインをbait vectorに組み込みyeast two-hybrid法でレチノイン酸処理をしたP19細胞cDNA libraryをスクリーニングした。得られた全長cDNA cloneは800アミノ酸をコードするmouse hnRNP-Uであった。hnRNP-Uはheterogeneous ribonucleoproteinsの一つで核マトリックスに豊富に存在する。Necdinとの結合領域を決定するためにマルトース結合蛋白質に融合したhnRNP-Uのdeletion mutantsを作製しin vitro binding assayで解析した。NecdinはhnRNP-UのC末端にあるRNA結合ドメインであるRGG boxとは結合せず、アミノ酸614-711の領域がnecdinとの結合に必要であることがわかった。次に核マトリックスへの局在を調べるため遺伝子導入したSaos-2細胞から核マトリックスを調製し免疫組織化学を行った。発現したhnRNP-Uおよびnecdinは核マトリックス画分に取り込まれnecdinも核マトリックス蛋白質であることが示唆された。同様の結果は細胞分画を用いたimmunoblotでも確認された。レチノイン酸処理によりニューロンに分化したP19細胞より核マトリックスを調製し、内在性necdinの局在を調べたところ同様に核マトリックスに存在することがわかった。核マトリックスは核内に存在する蛋白質、RNAからなる骨格構造で、クロマチンを固定化してDNAの複製、遺伝子発現、RNAプロセッシングなどに関与していると考えられている。これらのことからnecdinはhnRNP-Uを介して核マトリックスに結合しニューロン分化過程でクロマチンの高次構造や転写に影響を与えることが推定される。

P1-37

サブプレートニューロンに対するモノクローナル抗体4E1の作製—免疫組織化学的検討—

韓 春錫、石井 加代子、植村 慶一
慶応義塾大医学部生理学教室

大脳新皮質の発生過程において最初期に形成される層の神経細胞は、後続する皮質層の形成や皮質層に投射する神経線維に対し誘導的な役割を果たすと考えられる。新皮質発生の機構を探る目的で最初期層の一つであるサブプレートの神経細胞 (SPニューロン) に対する単クローン抗体の作製を試みた。SPニューロンは胎仔脳の中でも細胞数が僅かであり、均一な抗原を調整することが困難であり、調整の過程で機能発現に重要な微細構造を失う危険性がある。そこで我々は最終分裂時期によって選別した培養SPニューロンを抗原として用いることにした。即ち、胎生12日目のラット胎仔の新皮質を分散培養し、SPニューロンの最終分裂時期以降サイクロフォスファミドを培地に加え、後続して分化する神経細胞とグリア細胞を除去した。このSPニューロンの濃縮された培養細胞に対してマウスの脾臓細胞を *in vitro* で感作し、同種のマウスの腹腔及び血管内に戻した。胎生19日目ラットの脳切片を用いて、SPニューロンに対する免疫反応性によりスクリーニングを行った。その結果得られた単クローン抗体4E1は、サブプレートの比較的下部に位置する一部の細胞を認識した。比較的大型の細胞体が染色され、一部の細胞では突起の起始部も染色された。胎生16日目に於いても既にこれらの陽性所見が認められた。胎生19日目では、外包背側部と扁桃体の一部にも少数の陽性細胞が認められた。これらの発現パターンは4E1陽性の神経細胞は大脳新皮質の層構築への関与を示唆するので、詳細な解析が進行中である。

P1-38

中枢神経系に高発現するDNA組み換え遺伝子 *recA* 様新規遺伝子 (MmTRAD) の *alternativetranscripts* の解析

川端 昌弘、佐伯 清美
岡山大学医学部薬理学教室

減数分裂期の組み換えやイムノグロブリン及びT細胞レセプター遺伝子の組み換えなどの遺伝的多様性の獲得、さらに生存維持のためのDNA修復において、遺伝的組み換えは重要な働きをしている。私たちは中枢神経系の発生・分化における体細胞DNA組み換えの可能性をマウスP19胚性癌細胞を用いて示し、さらにDNA組み換えに関与する新規の組み換え関連蛋白遺伝子 (TRAD/RAD51d) を見出し、その解析を行ってきた。TRAD遺伝子は *recA* 組み換え遺伝子ファミリーに属している。

大腸菌 *RecA* 蛋白、その酵母ホモログ *Rad51* 蛋白および *Dmc1* 蛋白はDNAの組み換え・修復において主要な働きを担っていることが知られており、高等動物においてはそれらのホモログがクローニングされてきた。Trad蛋白はマウスおよびヒトではそれぞれ329個と328個のアミノ酸よりなり、*RecA* 様蛋白ファミリーに共通にみられるDomain IとDomain IIをもっており、さらにDomain IIには2つのヌクレオチド結合コンセンサスmotif Aおよびmotif Bがある。私たちはすでにヒトTRADのmRNAには数種類の *alternative splice variants* があることを報告しているが、本研究においては、マウスTRADのmRNAの *alternative splice variants* の解析を行い、ヒトと同様に複数のvariantsがあることが明らかとなったのでこれを報告する。

P1-39

胎生期マウス脳から単離した未知遺伝子
， O-833， の解析

小野田 学時^{1,2}、本田 岳夫¹、佐藤 博²、
桑野 良三¹

¹新潟大・遺伝子実験施設、²同・医病・薬剤

中枢神経系は神経上皮から形成される神経管に由来し、マウスの場合胎仔期の9～10日目に神経管が形成される。我々はニューン、グリアに分化する以前の未分化細胞に優先的に発現している遺伝子群の探索を行ってきた。胎仔期10.5日マウス頭から友岡らの方法に従って脳培養幹細胞を分離した。この脳培養幹細胞からcDNAライブラリーを調製し、ディファレンシャルスクリーニングを行なった。約1万個のコロニーから初期脳に選択的に発現すると思える5個のクローンを得た。そのうちの3クローン、O-413、O-1878、O-4660については、それぞれHMG-17、リボゾーム蛋白L18、ヒトSG2NAホモログなど既知遺伝子であったが、O-833とO-6451は未知遺伝子であった。今回はO-833について、全長をクロニングし推定される蛋白構造と発現を解析したので報告する。

O-833cDNAは、全長1865bpからなりオープンリーディングフレームは1218塩基対で406アミノ酸残基をコードしていた。推定分子量は、45kDaであった。データベース検索の結果、特徴的な構造がみられた。N末領域はHMG-14に存在するbipartiteな核移行シグナルがあった。O-833の406アミノ酸残基のうちグルタミン酸が110残基(27.1%)を占めていた。また、中央部にはcoiled-coil構造が2ヶ所あり、2量体あるいは他の蛋白と蛋白複合体を形成するのではないかと思われる。

ノーザン分析の結果、O-833mRNAは約1.8kbの単一バンドであった。発生段階別では、脳胎仔期10.5～12.5日に強い発現が見られ成長と共に減少した。神経系以外では、腎臓・肝臓・精巣で一様に発現し、心臓・肺においても弱いながら発現が見られた。これらの臓器での発現の意味、細胞内での局在、相互作用する蛋白の有無について現在検討している。

P1-40

プロテアーゼの内因性インヒビターによる
グリア細胞の分化誘導機構

岩崎 靖乃、熊田 竜郎、中田 智絵、
中平 英子、長谷川 明子、馬場 広子、
池中 一裕

岡崎国立共同研究機構・生理学研究所

グリアの発生機序はニューロンに比べ解析が遅れており、どのような遺伝子が細胞分化カスケードをコントロールしているのか詳細な研究が求められている。我々はアストロサイト前駆細胞を用い、GFAP（アストロサイト特異的な遺伝子）のプロモーターを活性化することを指標にグリア分化誘導因子の探索を行ってきた。その結果、プロテアーゼの内因性インヒビターであるシスタチンCを単離した。

マウス全脳RNAを用いたノーザンブロット解析により、シスタチンCは胎生12日という比較的早い時期から発現することが明らかになった。in situ hybridizationにより発現パターンを解析したところ、胎生14日の脳では、脳室壁近傍に発現が認められるが、脳室壁の中でも非常に限局した領域に限られることが明らかになった。

また、生後7日における発現パターンはGFAPの分布と完全に一致していた。以上の結果は、プロテアーゼの内因性インヒビターであるシスタチンCがアストロサイトの発生初期から関わっている可能性を示唆している。

P1-41

高力価レトロウイルスを用いた海馬錐体細胞内へのIn vivo 遺伝子導入の試み

松川 則之¹、池中 一裕²、河野 真子²、
湯浅 浩之¹、小鹿 幸生¹

¹名古屋市大第二内科、²国立共同研・生理研・神経情報

神経細胞に対するレトロウイルスの感染効率は極めて低く、満足のいく遺伝子導入効率は得られなかった。南木、池中らによりパッケージ細胞の改良と低速遠心濃縮法によって $10^{10} \sim 10^{12}$ cfu/mlの高力価レトロウイルスが得られるようになり、胎生14日齢マウス脳室内注入2日後の脳室壁神経上皮細胞の多くに遺伝子導入が可能であることが示された。一方、レトロウイルスによる遺伝子導入の最大の特徴は、感染細胞ゲノムに直接組み込まれ、安定した遺伝子発現が世代を越えて恒常的に得られることである。今回、我々はこの利点と神経系の発生が正確に胎齢に従うことに着目し、高力価レトロウイルスを用い海馬錐体細胞内への遺伝子導入を試みた。

SV40 プロモータ制御下にLacZ 遺伝子を挿入し広範囲のパッケージングシグナルを有する

SV40/pIP201⁺プラスミドをΨMP34パッケージング細胞に導入し得られた高力価レトロウイルス産生細胞株（池中ら）より、感染性ウイルスを得た。低速遠心法により濃縮したレトロウイルスベクターの $10^7 \sim 10^9$ cfu/個体を胎生12～16日齢マウスの側脳室内に経子宮的に注入した。手術した胎児の年齢により異なるが、30%～70%の正常出生仔を得た。生後30日において、導入された細胞分布をLacZ発現標識にて確認した。その結果、胎生13～15日齢注入マウスでは、錐体細胞層への遺伝子導入効率が、他の時期に比し高い可能性が示唆された。

P1-42

ヒト羊膜細胞における神経幹細胞マーカー遺伝子の発現

稲永 由紀子¹、児矢野 聡¹、内田 彩子¹、
堀越 嗣博¹、中福 雅人²、岡野 栄之³、
桜川 宣男¹

¹国立精神・神経センター神経研究所、²東京大学医学部神経生物、³大阪大学医学部神経機能解剖

我々はヒト羊膜細胞が種々の神経系細胞マーカー（ニューロン、アストロ、オリゴ細胞）の遺伝子を発現し、アセチルコリン、カテコールアミンを合成、分泌する細胞であることを報告した。そこでヒト羊膜細胞が多分化能を持つ神経幹細胞としての特徴を持つかどうかを解析するために、各種の神経幹細胞マーカー遺伝子の発現について検討したので報告する。帝王切開分娩による胎盤より、羊膜細胞を既報のごとく分離、培養した。RT-PCR 法による検索では、Musashi-1、Prox-1、Zic 1、Zic 3の遺伝子発現を確認した。さらに上記4つの遺伝子については、シーケンスで確認できた。免疫組織染色では、Vimentin陽性細胞は40%であった。Musashi 1陽性細胞は、数%存在していた。またProx-1抗体では染色性は認めなかった。Musashi抗体によるwestern blotではMusashi蛋白のイソフォームと思われる位置に相当するバンドが検出された。ヒト羊膜細胞は胎生8日目に、内細胞塊の細胞が2つの細胞層に分化し、その上層のepiblast内に空隙ができて羊膜腔となる。この胚盤葉上層の細胞が羊膜細胞となる。今回この羊膜細胞が、神経幹細胞の遺伝子発現していることを証明したが、自己複製能について検討中である。既報のごとく、羊膜細胞は種々の神経系細胞のマーカー遺伝子を発現し、アセチルコリン、カテコールアミン代謝を持つ細胞である。神経幹細胞遺伝子を発現している羊膜細胞を単離分取することにより、神経幹細胞の性質を検討し、幹細胞の脳内移植法への応用が可能と考える。

P1-43

脳の層構造構築に寄与するリーリンに関連した新規分子mRE-1の単離とその解析

星野 潤^{1,2}、仲嶋 一範³、田畑 秀典¹、
御子柴 克彦^{1,2}

¹理化学研究所脳科学総合研究センター発生神経生物研究チーム、²東京大学医科学研究所化学研究部、
³東京慈恵会医科大学DNA医学研究所分子神経生物学研究部門

大脳皮質の層構造逆転を一つの特徴とし、様々な異常を示すリーラマウスは古くから知られている突然変異マウスの一つである。近年、このマウスの原因遺伝子が単離されリーリンと命名された。その翻訳産物は約400kDaの細胞外基質蛋白質であり、この蛋白質を認識するモノクローナル抗体CR-50（当研究室で作製。）を用いた免疫染色によりリーリンが胎生期、大脳の表層に存在するカハールレチウス細胞で分泌されていることがわかった。このため、リーリンは増殖を終え放射状線維に沿って移動してきた神経細胞の最終的な配置を決める重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。

当研究室ではリーリンの機能をさらに解析するためCR-50以外にもエпитープを異にする数種類の抗体を作製した。このうちリーリン遺伝子のエキソン1に相当する領域を認識する抗体は組織染色においてCR-50陽性部位を含んで、さらに広い領域を認識するため、リーリン遺伝子のエキソン1に相同性の高い領域を有する因子の存在が強く示唆された。よって我々は野生型マウスの全脳から発生段階ごとにtotal RNAを抽出し、リーリンcDNAのエキソン1を含むプローブを用いてノーザンブロッティングを行ったところ、出生直後(P0)の全脳で本来のリーリン遺伝子に由来すると思われるmRNAのバンドとは別に数本のサイズの違うバンドを確認した。そこでP0のマウスの全脳から抽出したmRNAを鋳型に、リーリンcDNAのエキソン1上に遺伝子特異的プライマーを設計して、3'RACE法を行った。

この3'RACE法により我々はリーリン遺伝子に由来する2種類の新たな分子を発見し、その塩基配列の決定を行った。これらの遺伝子はリーリンcDNAのエキソン1のみを含むリーリン遺伝子のオルタナティブスプライシングのアイソフォームであることが判明し、mouse reelin exon1 truncated alternative splicing isoformの略でmRE-1と命名した。

新規分子mRE-1は本来のリーリンの蛋白質部分をほとんどふくまない点からリーリンとは全く違った機能を有しているのではないかと我々は考えている。

P1-44

プロテオーム的な手法によるラット小脳形成期の解析

田岡 万悟、若宮 昭子、磯辺 俊明
東京都立大学大学院理学研究科化学専攻

ラット小脳は規則的な層状構造を持っており、出生後3週間程度で成熟することが知られている。小脳形成期に特異な発現様式を示すタンパク質は小脳の形態形成や神経細胞の分化、シナプス形成に関与していると仮定し、出生後に一過性の発現を示すタンパク質を探索した。小脳に存在するタンパク質を網羅的に解析するために、二次元電気泳動

(2D-PAGE)とMALDI/TOFMSを組み合わせた高分離能で高感度なプロテオームの手法を検討して解析を行った。各日齢で約1200のタンパク質スポットが確認された。主要なタンパク質スポット29種類を同定後、これをパターン比較の指標とし、成熟に伴うタンパク質の量変動を解析した。ほとんどのタンパク質は出生後増加するか変化がない中で、出生後に減少するタンパク質や生後14日を中心に一過性に増加するタンパク質を数種類確認した。

P1-45

ラット大脳皮質培養細胞におけるエタノールによる細胞毒性について

高寺 恒雄、松田 育美、坂本 ゆかり、
大屋 敷 孝雄
北陸大・薬・臨床化学

前回、グルタミン酸レセプターのサブタイプの1つである、NMDAレセプターのアンタゴニスト (MK801) によりNMDAレセプターを遮断するとラット大脳皮質培養細胞においてアポトーシスが引き起こされることを発表した。今回は同様にNMDAレセプターを阻害するエタノールの細胞毒性とそのメカニズムについて調べた。

ラット胎仔 (E18-20) から大脳皮質細胞を調製し、培養10日目の細胞にエタノール処理を1-2日間行った。トリパンブルー染色及びlactate dehydrogenase (LDH)放出量により細胞毒性の程度を測定し、蛍光色素Hoechst 33258による染色及びDNA fragmentationによりその細胞死がアポトーシスであるかどうかを調べた。caspase-3活性の測定は、蛍光ペプチド基質 (Ac-DEVD-AMC) を用いて調べた。細胞内 Ca^{2+} 濃度は蛍光試薬Indo-1を用いてACAS 750による画像解析により測定した。

エタノール (50-300 mM) の濃度依存的にLDH放出量及びcaspase-3活性の上昇がみられた。メタノール及びブタノールによっても同様の結果が認められた。また、エタノールは核の凝集・断片化やDNAの断片化を引き起こした。エタノールの添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度の減少も認められた。このエタノールによる細胞死はcaspase-3 inhibitor (Ac-DEVD-CHO) により抑制された。NMDA添加によりエタノールによる細胞死及びcaspase-3の活性化が抑制され、またinsulin-like growth factor I (IGF-I) によってもエタノールによる細胞死及びcaspase-3の活性化が抑制された。タンパク合成阻害剤であるcycloheximideもエタノール毒性を抑制した。

以上のようにエタノールはMK801と同様にcaspase-3の活性化を伴ったアポトーシス様の細胞死を引き起こした。また、大脳皮質細胞の生存維持にはNMDAレセプター及びIGF-I関連経路の関与が示唆された。

P1-46

低濃度NOによる細胞選択的毒性

湯山 耕平¹、山本 秀子²、中村 和弘¹、
加藤 武¹、山国 徹³、宋 時栄³、山本 敏文¹
¹横浜市大院総合理学、²東京都精神医学総合研究所精神薬理、³三菱化学学生命研

一酸化窒素 (NO) は、細胞内情報伝達をはじめとする種々の生理的機能を持つ、多機能分子として知られている。一方、炎症等の外的ストレスによって誘導される誘導型NO合成酵素は、過剰なNOを発生させることにより細胞毒性を示すことが明らかとなっている。昨年、本学会で、低濃度NOがPC12細胞に対して強い細胞毒性を示すことを報告し、その毒性発現にはNO発生速度と曝露時間が重要であることを示唆した。今回、低濃度NOによる細胞毒性の発現機構を明らかにする目的で、各種クローン化培養細胞を用いNO毒性に対する感受性についての検討を行った。

PC12、NB69、C6およびNG108-15細胞を96穴プレートに培養し、NO発生剤としてNOR3を用い、薬物処理後24時間後の細胞生存率をMTT法により測定した。

PC12細胞と同様、NB69細胞ではNOR3による細胞毒性が観察されたが、C6とNG108-15細胞では細胞毒性が全く観察されなかった。PC12およびNB69細胞で認められた細胞毒性は、Hoechst染色により核でのDNA凝集と断片化が観察されたことから、アポトーシス様の細胞死であると推測された。これらの結果は、PC12とNB69細胞が共にカテコールアミン産生細胞であることから、カテコールアミン産生神経細胞の少なくとも一部は、NO毒性に対する感受性が高い可能性を示唆していると思われる。

P1-47

新規アポトーシス調節タンパク質のクローニングとその機能解析

米田 託成^{1,2}、今泉 和則^{1,2,3}、由井 大錦^{1,2}、
遠山 正彌^{1,2}

¹大阪大・医・機能形態、²CREST・JST、³田辺製薬
(株)・創薬研

apoptosis pathway実行過程に働くcaspaseファミリーやそのcaspaseの機能を調節する一部のタンパク質群に共通にみられるドメイン構造であるCaspase recruitment domain (CARD)はそれらの相互作用を介してアポトーシス誘導シグナルを伝達するための構造として考えられている。このドメイン構造を持つ既知のタンパクとしてはcaspase-1、-2、-4、-5、-9、Ced-3、-4、Apaf-1、ARC、RICK等が挙げられ、いずれもアポトーシスの進行に重要な役割を果たしている。

我々は神経細胞のアポトーシス制御機構に焦点を当て神経細胞に発現するCARDファミリーのクローニングを試みた。方法はCARD配列を用いたホモロジー検索によりCARDを有するESTクローンを取得しその全長を解析するいわゆるESTクローニングを用いた。その結果CARDをN末端側にもつ新規遺伝子RCDを取得した。本遺伝子の塩基配列より推測されるアミノ酸配列ではN末端側にCARDを有する以外特徴的なドメイン構造を認めなかった。ハイドロフォビシティ解析では全体的に親水性で強く疎水性を示す領域は認められなかった。Coiled-coil解析ではCARDに一致して高いスコアを示す領域を認めCARDを介して他の蛋白と相互作用を示す可能性が示唆された。ノーザンブロット解析では神経系のみならず全身臓器において発現を認めた。in vitroでの培養細胞過剰発現系では細胞死調節機能を有していることが認められた。

本学会においてはこの新規CARDタンパクの中樞神経系における発生過程及び成熟期のmRNA発現様式、細胞死制御機構における役割、他の細胞死関連タンパクとの相互作用、細胞内シグナル伝達、および神経細胞死制御における役割、RCD過剰発現マウス(RCDトランスジェニックマウス)等を通し現在までの解析結果を報告する。

P1-48

培養ミクログリアのアポトーシス制御機構-CキナーゼとAキナーゼの役割-

宮崎 博文¹、尾形 直則²、Qiu-Sheng Si³、
中村 洋一³、片岡 喜由³

¹愛媛大学医学部麻酔蘇生学、²同整形外科学、³同第一生理学

ミクログリアは障害された組織の除去に機能しているとされてきたが、ミクログリアの異常活性化は障害の原因にもなりうる可能性が注目されている。アデノシンは虚血再灌流の過程で一過性に上昇することが知られているが、培養ミクログリアにアデノシンを作用させるとアポトーシスを誘導することが最近報告された。本研究ではアデノシンがいかなる機構でミクログリアのアポトーシスを誘導するかについて、ラット培養ミクログリアを用い、細胞質内に遊離する断片化DNAをELISA定量することにより検討した。

2Cl-adenosine (被分解性の低いアデノシンアナログ)を10 micro M添加して誘導されるアポトーシスはCキナーゼ阻害剤であるH7やstaurosporineではほぼ完全に抑制された。Aキナーゼ阻害剤であるH-89は反対にアポトーシスを50%以上増強した。またAキナーゼ活性化剤であるforskolinや、膜透過性の8Br-cAMPは50%以上アポトーシスを抑制した。一方、ミクログリアを前もってlipopolysaccharideで活性化しておいた場合は、2Cl-adenosineによりアポトーシスは誘導されなかった。

以上の結果より、アデノシンによるミクログリアのアポトーシス誘導はCキナーゼの活性化が仲介し、Aキナーゼの活性化により抑制されると考えられる。また、アデノシンがもたらすアポトーシスによるミクログリアの制御は、ミクログリアの活性化状態にも依存していることが示唆される。

P1-49

ラット大脳皮質神経細胞に対する粘菌分化誘導因子 (DIF) の効果

菅野 敏夫^{1,4}、久保 原禪²、黒見 担³、
後藤 文夫⁴、高田 邦昭¹、林 謙介¹

¹群馬大学生体調節研究所細胞構造、²分子調節、³医学部行動生理、⁴麻酔科蘇生科

DIFは細胞性粘菌において柄細胞への分化を誘導する因子である。近年、DIFが哺乳動物の腫瘍細胞に対して細胞増殖抑制、分化誘導などの作用を持つことが報告されている。我々はラット大脳皮質の初代培養神経細胞に対するDIFの効果について調べた。

- (1) 神経細胞に対しても分化促進効果があるかどうかを調べるため、各種の分化マーカーの発現をRT-PCRで調べたが分化促進の効果は認められなかった。
- (2) 成熟した神経細胞にDIFを与えると樹状突起の数珠状化や細胞体の膨張などの細胞変性が見られた。培養初期の未成熟な細胞に対しては高濃度(20 μ M)、数日間でも無効だったが、培養3週目の神経細胞では低濃度(無血清培地では5 μ M、血清培地では10 μ M)、2時間で形態異常が見られた。
- (3) DIFによる変性が過剰なカルシウム流入によるものである可能性を考え、細胞内カルシウム濃度変化を調べた。無血清培地において5 μ MのDIFを与えても細胞内カルシウムは自発的な濃度上昇のレベル以上には上がらなかった。
- (4) DIFによるimmediate early geneの発現誘導を調べた。培養3週目の神経細胞に5 μ MのDIFを2時間作用させると*c-fos*の発現が上昇したが、*zif/268*や*arc*の発現に影響はなかった。10 μ M picrotoxin ではすべての発現が上昇した。
- (5) DIFによる神経細胞からのNO放出を調べた。5 μ MのDIFによってNO放出の上昇を認めた。

以上のことからDIFは神経細胞に過興奮を起こさせることなく細胞変性を誘発すること、それがNOを介している可能性が示唆された。

P1-50

ブレフェルジンによって誘導される神経細胞死におけるcaspase-3の迅速な活性化

中村 祥子、小池 達郎

北海道大学大学院理学研究科行動知能学講座

ブレフェルジンはゴルジ装置を分解し、小胞体からゴルジ装置への順行性輸送を阻害する。ブレフェルジンは種々の癌細胞や、ラットの大脳皮質細胞でアポトーシスを誘導することが報告されている。わたしたちは、ラットの頭頂神経節細胞培養系を用い、ブレフェルジンによって誘導される細胞死について解析した。ブレフェルジンは用量依存的に神経細胞死を誘発した。この神経細胞死ではbis-benzimide染色およびTUNEL染色でもDNA断片化が検出された。この神経細胞死はDNA依存RNA合成阻害剤およびタンパク質合成阻害剤で抑制された。この2つの阻害剤を用いて、コミットメントポイントを調べたところ、ブレフェルジン処理後18~20時間であることがわかった。ブレフェルジンによる神経細胞死には、なんらかの転写産物の関与が示唆された。またcaspase-3のペプチド阻害剤でこの神経細胞死は抑制されるのに対し、caspase-1のペプチド阻害剤では抑制されなかった。caspaseの活性化を測定したところ、この神経細胞死に先立って、caspase-1-like proteasesの活性化はみられなかったが、caspase-3-like proteasesの活性化は検出された。さらにcaspase-3に対する特異的基質により、活性化を確認した。このことからブレフェルジンによる神経細胞死はcaspase-3が関与するアポトーシスであるといえる。さらにこの神経細胞死では、DNAの断片化は、ブレフェルジン処理後約16時間くらいから見られ始め、36時間後くらいにピークに達する。一方、caspase-3はブレフェルジン処理後6時間で、すでに活性化しており、コミットメントポイントである18時間くらいまでcaspase-3の活性化は続いていた。caspase-3様活性ペプチド阻害剤は、ブレフェルジン投与時に同時に加えると細胞死を抑制したが、9時間後投与では細胞死は抑制されなかった。このことから、caspase-3の迅速な活性化と、実際の細胞死の執行までには時間的なズレがあることを見出した。

P1-51

ヌクレオチド除去修復機構関連遺伝子(XPA, CSB)欠損マウスにおけるDNA傷害に伴う中枢ニューロンのアポトーシス

安達 直樹¹、村井 真知子¹、榎戸 靖¹、
吉野 雅文²、中津 可道³、田中 亀代次²、
Gijsbertus T.J.van der Horst³、Jan.H.Hoeijmaker³、
畠中 寛¹

¹大阪大学蛋白研、²大阪大学細生工セ、³Erasmus University Rotterdam

哺乳類のDNA修復機構において、ヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair: NER)は広範な損傷特異性を持つため、特に重要であると考えられている。また神経細胞は分裂後に細胞の代謝がおこなわれないため、DNA損傷の蓄積は分裂する細胞に比べ深刻であり、神経細胞におけるヌクレオチド除去修復機構は極めて重要であると考えられる。

本研究では、ヌクレオチド除去修復関連遺伝子がニューロンのアポトーシスにどのように関与するかを調べるため、ヌクレオチド除去修復機構に欠損を持つヒトの遺伝病、色素性乾皮症(Xeroderma Pigmentosum: XP)やコケイン症候群(Cockayne Syndrome: CS)の原因遺伝子の一つであるXPA遺伝子やCSB遺伝子を欠損したマウスの培養小脳顆粒細胞を用い、DNAに損傷を与える様々な刺激(UV、γ線、H₂O₂)が各遺伝子型ニューロンのアポトーシスに及ぼす効果を調べた。

その結果、UVによるDNA損傷に対しては、XPA遺伝子および、CSB遺伝子欠損マウスともに、野生型マウスと比べ培養ニューロンにおける細胞死がより促進された。この結果はすでに報告されているXPA遺伝子と同様CSB遺伝子も、中枢神経系のヌクレオチド除去修復機構において重要な役割を持つことを示している。また、XPA/CSBダブルノックアウトマウスのUV感受性は、XPA遺伝子および、CSB遺伝子の単独欠損マウスよりもさらに高いことが示された。

P1-52

中枢ニューロンのアポトーシスにおけるシスタチンCの役割

西山 啓次、西尾 チカ、山田 雅司、畠中 寛
大阪大学蛋白研・生合成

我々は胎生ラット培養中枢ニューロンを用いて、高酸素(50%)気相下で誘導されるアポトーシスについての解析を行ってきた。この系は脳における虚血-再灌流系のモデルと考えられる。このアポトーシスの分子機構を解明する目的で遺伝子サブトラクション法を用いて、死に伴って変動する蛋白質の検索を行った。その結果、高酸素負荷に伴いシステインプロテアーゼのひとつであるシスタチンCのmRNAおよび蛋白質の発現上昇が観察された。この発現上昇はニューロンにおいて見られた。シスタチンCは動物のリソソーム酵素であるカテプシンB、H、Lの阻害作用を持つことが知られているが、ニューロンのアポトーシスにおける役割は知られていない。そこで、ヒトシスタチンCを培地に添加し、培養下のニューロンに対する影響を調べた。その結果、細胞死の抑制が観察された。この結果は、シスタチンCが高酸素負荷によって誘導されるアポトーシスを防ぐ働きをもつことが示唆されている。シスタチンCのアポトーシス抑制に対する機能をより詳細に解析するため、現在、ラットシスタチンCを培養ニューロンに強制発現させ、その機能解析を行っている。

P1-53

ラット脳に強く発現するSNF1 family, SNRKの栄養的・環境的ストレスに対する酵素活性の変動

小西 明雄¹、吉田 聖美²、西尾 チカ¹、
山田 雅司¹、畠中 寛¹

¹大阪大学・蛋白質研究所・生合成研究部門、²国立長寿医療研究センター・老年病研究部

培養ラット小脳顆粒細胞は、低カリウム培地で培養するとアポトーシスを引き起こす。我々はこの神経細胞死の実験系において、mRNAの発現上昇がみられる遺伝子としてSNRKを見出した。SNRKは、核移行シグナルやPEST sequence等をもつserine/threonine kinaseで、そのkinase domainは酵母のSNF1や哺乳類のAMPKと相同性を持つ。SNF1 familyに属するkinaseは栄養的・環境的ストレスに対応し、エネルギー代謝と遺伝子発現の両方を調節して細胞を保護する機能をもつと考えられている。実際にSNF1はglucoseの枯渇、AMPKは細胞内のAMP/ATP比率の変化に反応し、その酵素活性を変化させる。これらのことに加えてSNRKが脳に強く発現していることから、糖代謝がもっとも盛んなだけでなく細胞死が起きた場合に新しい細胞で置き換えることができない脳の神経細胞において、栄養的・環境的ストレスから細胞を保護するためにSNRKが重要な役割を担うのではないかと考えている。

我々は、N末端側にFLAGを付加したSNRK(FLAG-SNRK)をCOS細胞、PC12h細胞、ラット初代培養神経細胞に発現させ、低glucose培地での培養などによって栄養的・環境的ストレスを与え、FLAG-SNRKの酵素活性が実際にどのように変化するかを検討したので報告する。

P1-54

老化に伴い変化する脊髄糖タンパク質の解析

佐藤 雄治¹、中野 泰子²、木幡 陽¹、
富田 基郎²、遠藤 玉夫¹

¹都老人研、²昭和大学・薬

生体内のタンパク質の多くは糖タンパク質として存在し、分化や癌化といった変化に伴いその糖鎖構造が変化することが知られている。今回、我々は脳の糖タンパク質に注目し、老化に伴う変化について解析を行った。

まず、糖鎖構造特異的に結合するレクチンを用いてWestern blottingによる解析を行った。若齢(9週齢)、老齢(29月齢)それぞれのラットから脳の各部位を調製し、各々の反応性を比較したところ、ラット脊髄中に老化に伴いレンチルレクチンに対して反応性が増加する糖タンパク質の存在が明らかになった。この糖タンパク質の部分アミノ酸配列を解析したところ、この糖タンパク質がこれまで哺乳類では末梢神経系のシュワン細胞特異的に発現すると考えられていた免疫グロブリンスーパーファミリーの一つであるP0であった。更にP0特異的ポリクローナル抗体を調製し、この抗体を用いてWestern blottingによる解析を行った。その結果、若齢、老齢双方の脊髄中にP0の発現が認められた。レンチルレクチンによる解析の結果とあわせて考えると、この脊髄中P0上の糖鎖が老化に伴って変化していることが明らかになった。

次に、このP0特異的ポリクローナル抗体を用いて本糖タンパク質の組織分布について組織化学的解析を行った。その結果、脊髄の皮質に強い反応性を示す細胞が存在することが明らかとなった。これらの細胞の中で前角に存在するものは運動神経様の細胞体の形態を示し、P0が神経細胞の細胞体に存在する可能性が示唆された。また、この抗P0抗体陽性細胞の細胞数は若齢に比べ老齢では減少していること、更に老齢では若齢に比べ細胞体が萎縮していることが明らかとなった。これら結果から、脊髄中のP0は神経細胞に存在し、これらの神経細胞が関与する機能が老化に伴い変化している可能性が示唆された。現在、ラット脊髄から調製した初代培養細胞を用いて、P0が脊髄中のどのような細胞に存在しているのか更に詳細な検討を行っている。

P1-55

加齢による脳内metallothionein-III mRNA発現の変化

宮崎 育子¹、浅沼 幹人¹、十川 千春²、
田中 健一¹、東 洋一郎¹、小川 紀雄¹

¹岡山大学・分子細胞研・神経情報学、²岡山大学・歯科薬理学

メタロチオネイン (metallothionein: MT) -IIIは成長抑制因子 (GIF) として発見された金属結合蛋白質であるが、他のMT (MT-I, II)とは異なり中枢神経系に特異的に発現している。MT-IIIは神経成長抑制作用を有していることに加え、Alzheimer病 (AD)患者脳で減少していることから、ADをはじめとする神経変性疾患との関連が注目されている蛋白である。昨年われわれは、Parkinson病モデルの線条体ではMT-III mRNA発現がdown-regulationされており、levodopa投与に対する反応性が低下していることを報告した。今回われわれは、老化に伴うMT-IIIの増減および酸化ストレスによるその誘導性の変化を明らかにするために、老齢ラットに菌体毒素lipopolysaccharide (LPS) を投与し脳各部位でのMT-III mRNA発現について経時的に検討した。

若齢 (9週齢)、老齢 (24ヶ月齢)Fischer系ラットにLPS (20 mg/kg)を腹腔内投与し、2時間、6時間後に大脳皮質、線条体、視床+中脳の各脳部位、さらに末梢組織として脾臓を取り出し、total RNAを抽出した。各組織におけるMT-III mRNA発現は、total RNA (0.05 μ g)、ラットMT-III cDNAに特異的なprimerと32P-dCTPを用いてRT-PCRを行い、PCR産物をアクリルアミドゲルで電気泳動し解析した。

MT-III mRNA基礎発現量には各脳部位における老化に伴う変化はなかった。また、脾臓においてはMT-III mRNAの発現は認められなかった。若齢ラットの大脳皮質および視床+中脳では、LPS投与2時間後からMT-III mRNA発現量が増加したが、老齢脳では誘導されず、むしろ抑制される傾向がみられた。一方、線条体では若齢、老齢に関わらずLPS投与によるMT-III mRNA発現の有意な変化はみられなかった。

以上の結果より、老齢脳では酸化ストレスに対するMT-IIIの誘導性が若齢脳と比べると低下していることがわかった。MT-IIIはantioxidantとして神経保護作用を有するとの報告もあり、本検討の結果よりMT-IIIは加齢脳における神経変性に強く関与しているものと考えられた。

P1-56

B型 monoamine oxidase (MAO-B) 阻害剤の慢性投与による老齢マウスの寿命延長作用に対するフリーラジカルの関与について

江頭 亨、高山 房子、山中 康光
大分医科大学薬理学教室

MAO-B 阻害剤であるdeprenyl は、抗うつ薬および抗パーキンソン薬としての可能性があるが、最近この deprenyl には寿命延長効果があるとの報告からその作用機序の解明をフリーラジカルとの関係から試みた。老齢マウスにdeprenyl を長期投与したところ、対照に比べ寿命延長効果が見られたが、この効果がMAO 阻害作用、抗うつ作用またはその他の作用に因るものかを、数種の MAO 阻害剤および抗うつ薬を用いて比較検討した。この効果はMAO-B 阻害剤に特異的であった。2、3の MAO-B 阻害剤投与による寿命延長の作用機序を老化マーカーに対する効果から比較検討した。12ヶ月齢の ddY系雄性マウスに deprenyl、pargyline および Ro.19-6327 を6ヶ月間経口投与した。老齢マウス脳の MAO-A および MAO-B 活性は若年マウスに比較して、それぞれ低値および高値を示すが、これら薬物の慢性投与で MAO-A 活性の増加と MAO-B 活性の著明な低下が見られた。老齢マウス脳の脂質過酸化物の増加に対してこれら3種薬物は有意な抑制効果を示した。一方、これら3種の MAO-B 阻害剤の慢性投与脳で、抗酸化酵素として知られている Mn-SOD および Cu,Zn-SOD の有意な活性増加が認められた。そこで、3種の MAO-B阻害剤の慢性投与脳の Mn-SOD および Cu,Zn-SOD の誘導を検討した。対照群を含むすべての群において Mn-SOD および Cu,Zn-SOD mRNAは検出されたが、群間で mRNA 量には明らかな変化は認められなかった。また、抗体を用いて同様の試料のWestern blottingを行ったところ、すべての群において Mn-SOD および Cu,Zn-SOD タンパクのバンドは検出されたが、群間でタンパク検出量の明らかな変化は認められなかった。このことから、SOD 活性の増加は量的なものではなく、質的な変化によるものと思われる。以上より、MAO-B 阻害剤投与によるマウスの寿命延長作用機序として、慢性投与による老齢マウス脳の MAO-B 活性の低下と MAO-A 活性の増加、脂質過酸化の抑制および SOD 活性の増加が複合的に作用して、フリーラジカル抑制へと移行し、延命効果を示したものと思われる。

P1-57

ラット前頭前野皮質におけるphencyclidine 誘発性ドーパミン遊離に対する抗精神病薬の影響

黒木 俊秀、川原 健、米澤 裕次、田代 信雄
九州大学大学院医学系研究科精神病態医学

Phencyclidine (PCP)とその類似化合物であるketamineを用いた精神分裂病の実験動物モデルでは、特有の行動変化や認知機能の障害とともに、糖代謝の亢進、初期応答遺伝子*hsp-70*や*c-fos*の発現など、種々の神経化学的变化が脳部位特異的に観察される。これらの反応の一部は、clozapineなどの非定型抗精神病薬の前処置により特異的に抑制されることから、同じくPCPによって誘発されるドーパミン(DA)系活動の亢進を介している可能性がある。今回の研究では、ラット前頭前野皮質内側部に選択的なPCP誘発性DA遊離に対する各種抗精神病薬の影響について、脳内微小透析法を用いて検討した。

Clozapine (20 mg/kg, sc)の単独投与は前頭前野皮質のDA基礎遊離を亢進させるものの、その前処置はPCP (7.5 mg/kg, sc)によるDA遊離の亢進には影響を与えなかった。Clozapineの作用部位として皮質のセロトニン(5-HT)2A受容体が示唆されているが、5-HT2A/2Cアンタゴニストritanserin (1, 5 mg/kg, sc)の前処置もPCP誘発性DA遊離に影響を与えず、5-HT2A受容体の遮断はPCPによる前頭前野皮質のDA遊離に影響を及ぼさないと考えられた。一方、定型抗精神病薬haloperidol (1 mg/kg, sc)の前処置はPCP (2.5, 7.5 mg/kg, sc)のDA遊離作用を有意に増強した。Haloperidolの単独投与は前頭前野皮質のDA基礎遊離には有意の影響を及ぼさないことから、PCP誘発性DA遊離に対するhaloperidolの増強効果は、DA-D2受容体遮断を介する機序の他に、NMDA受容体のサブユニットNR2Bの阻害を介する機序も関与している可能性が示唆された。以上のようなPCP 誘発性DA遊離に対するclozapineとhaloperidolの影響の相違は、前述したPCP による糖代謝の亢進や初期応答遺伝子の発現に対して両薬物間で異なる効果の一部に関連していると考えられる。

P1-58

Phencyclidine連続投与によるラット脳内神経栄養因子の変化

高橋 誠¹、豊岡 和彦^{2,3}、染矢 俊幸²、
那波 宏之³

¹国立療養所犀潟病院精神科、²新潟大学医学部精神科、³新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

Phencyclidine (PCP)は幻覚、妄想、情動的引きこもりなど精神分裂病類似の症状を誘発する。PCPはNMDA型グルタミン酸受容体を非競合的に阻害することから、この受容体の機能障害は分裂病に関連する病態のひとつとして注目されている。PCP投与により実験動物に惹起される異常行動は非定型抗精神病薬のクロザピンで改善されるなどの所見から、PCP投与動物は陰性症状も含めた分裂病のモデルと考えられている。我々は神経発達障害仮説に基づき、神経栄養因子の異常が分裂病の病態に関与する可能性を検討するため、PCP連続投後のラットを用いて脳内各領域における神経栄養因子の発現量を解析した。実験には8週齢の雄性Wistarラットを用いた。PCP群にはPCP 10 mg/kg、対照群にはPCPと同容量の生理食塩水を14日間繰り返して皮下投与した。最終投与の24時間後に断頭し氷上にて脳内各領域を分取した。組織をホモジナイズした後、超音波破碎し、酵素免疫測定法(EIA)により神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン3 (NT-3)のタンパク量を測定した。これまでの結果、PCP群の海馬ではBDNFが対照群の61.5%に減少していた($p < 0.05$)。同じサンプルで測定したNGF、NT-3には変化がみられないため、これはBDNFに特異的な変化と考えられる。また、うつ病の動物モデルでも同様に海馬におけるBDNFの低下が報告されていることから、この変化は分裂病の陰性症状を反映している可能性が高いと考えられる。現在、PCPモデルにおけるBDNFの役割を明らかにするため、BDNFにより発現調節されるシナプスタンパクについても変化を検討中である。

P1-59

慢性リチウム投与によるラット海馬グルコ
コルチコイド受容体mRNAの増加

仙波 純^{1,2}、渡辺 秀栄¹、須原 哲也^{2,3}、
赤沼 のぞみ⁴

¹放送大学・教養学部、²科学技術振興事業団・戦略的
基礎研究、³放射線医学総合研究所・高度診断機能研
究ステーション、⁴東京医科歯科大学神経精神医学教
室

リチウムは躁病に有効であるだけでなく、うつ病
に対しても予防効果と抗うつ効果を持つことが臨床
的に確認されている。しかし、リチウムの作用につ
いては、今なお不明な点が多い。今回われわれはリ
チウムを慢性にラットに投与し、海馬・視床下部室
傍核・青斑核でのグルココルチコイド受容体(GR)
mRNAと海馬のミネラルコルチコイド受容体(MR)
mRNAの発現をin situ hybridizationで調べた。

実験にはWistar系雄ラットを用いた。塩化リチウ
ム (1.5 mmol/kg) を1日1回腹腔内に14日間投与
し、最終投与後24時間後に脳を取り出した。GRと
MR mRNAの発現は、c-RNA probeを用いた
non-radioactive in situ hybridizationで測定した。

その結果、リチウム投与によりGR mRNAは海馬
(CA1領域と歯状回) および視床下部室傍核で増加
していたが、青斑核では変化が見られなかった。ま
た、海馬のMR mRNAの発現には変化が見られなかつ
た。

抗うつ薬の慢性投与により海馬のGR結合能やGR
mRNAが増加することが知られていることを考え合わ
せると、以上の結果は、リチウムのうつ病予防効果
や抗うつ効果に関連していることを示唆するもので
ある。

P1-60

慢性リチウム処置のラット海馬スライスに
おけるノルアドレナリン刺激性細胞内カル
シウム反応に対する抑制効果

岡本 泰昌¹、加賀谷 有行¹、日域 広昭¹、
田村 達辞¹、福本 拓治¹、竹林 実¹、
前正 秀宣¹、西田 朗²、堀口 淳¹、山脇 成人¹
¹広島大学医学部神経精神医学講座、
²国立呉病院臨床研究部

躁状態の患者では中枢ノルアドレナリン(NA)神経
系の活性が増強していることが推定されている。そ
の治療薬としてリチウムは高い有効性が知られてい
るが、薬理学的作用機序は明らかでない。そこでわ
れわれはラット海馬スライスを用いて、人工的にNA
の過剰な状態を作成し、慢性リチウム処置の細胞内
カルシウムイオン(Ca^{2+})変化を指標とした情報伝達に
対する効果を検討した。

リチウム慢性処置は、0.2%炭酸リチウムを含有す
る飼料で14日間育成した。リチウム急性処置は、1回
目のNA刺激後にリチウムを含む人工脳脊髄液にて30
分間灌流した後、2回目の刺激を行った。細胞内 Ca^{2+}
濃度は Ca^{2+} 感受性蛍光色素を用い画像解析装置にて
測定した。Gq/11alpha-subunitのタンパク発現量は
Western blottingを用いて検討した。

リチウム慢性処置した海馬スライスにおいて、高
濃度のNA刺激による細胞内 Ca^{2+} 反応性を抑制し、低
濃度のNA刺激では有意な効果を認めなかったことか
ら、この効果は刺激濃度に依存しているものと考え
られた。また急性処置による効果は認められなかつ
たことから、この効果発現には慢性処置が必要と考え
られた。Gq/11 alpha-subunitのタンパク発現量に変
化なかった。

これらの結果から、リチウムはNA神経系が過剰な
状態においてのみ情報伝達を抑制することが明らか
になり、臨床効果との関連性が示唆された。

P1-61

フェンサイクリジンによる最初期遺伝子Arcの発現に対する非定型抗精神病薬の影響

中原 辰雄¹、黒木 俊秀²、本藤 久雄³、
堤 哲之³、橋本 喜次郎³、本村 啓介³、
植木 裕司³、平野 誠³、内村 英幸³

¹九州大学理学研究科、²佐賀医科大学精神医学、

³国立肥前療養所情動行動障害センター

非定型抗精神病薬は錐体外路系副作用が少なく、陰性症状および認知機能障害の改善に有効と報告されている。本研究では、非定型抗精神病薬に共通する脳内作用部位を解明するために、脳内各部位の最初期遺伝子Arcの発現に対する薬剤の影響をフェンサイクリジン(PCP)を用いた精神分裂病の実験動物モデルについて検討した。

〔方法〕Wistar 系雄性ラットにハロペリドール(2 mg/kg)、クロザピン(20 mg/kg)、オラザピン(10 mg/kg)あるいはリスベリドン(2 mg/kg)を投与し、1時間後にPCP(10 mg/kg)を投与した。2時間後に断頭し、前頭葉皮質、側坐核、線条体、海馬、後部帯状回皮質のRNAをAGPC法で抽出し、Arc mRNAをRT-PCRで定量した。

〔結果と考察〕PCPは前頭葉皮質、側坐核および後部帯状回皮質でArc mRNAを誘導し、線条体や海馬での誘導は認められなかった。前頭葉皮質と側坐核におけるPCPによるArcの発現誘導は、クロザピン、オラザピンおよびリスベリドンの前投与によって阻止されたが、ハロペリドールには影響されなかった。後部帯状回皮質におけるPCPによるArcの発現は定型および非定型薬剤の前投与によって消失した。ここで用いた非定型薬剤はハロペリドールよりも5-HT_{2A}受容体遮断作用が強く、PCPによる前頭葉皮質や側坐核のArc誘導には5-HT_{2A}受容体の関与が示唆された。後部帯状回皮質におけるPCPによるArcの発現はPCPのneurotoxicityによるものであろう。以上のようなPCPによるArcの発現誘導に対する定型と非定型抗精神病薬の差異は臨床における効果の相違を反映している可能性がある。

P1-62

5-HT_{1A}受容体を介したストレス適応機構に視床下部-下垂体-副腎皮質系が関与する

辻 稔、武田 弘志、松宮 輝彦
東京医科大学薬理学教室

〔目的〕我々はこれまでに、5-HT_{1A}受容体作動薬をストレス刺激負荷24時間前に単回投与することにより、ストレス刺激の負荷により引き起こされるマウスの情動変化が消失することを報告してきた。この結果は5-HT_{1A}受容体が、ストレス適応機構において重要な役割を担っていることを示唆させるものである。一方、5-HT_{1A}受容体刺激により、視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA axis)が活性化されることが知られている。本研究では、5-HT_{1A}受容体を介したストレス適応機構へのHPA axisの関与を検討した。

〔方法〕実験にはICR系雄性マウス(体重25-30g)を用いた。マウスに60分間の拘束ストレス刺激を負荷し、ストレス刺激開放直後より5分間、マウスの情動変化を当教室で開発した自動hole-board試験装置を用いて測定した。測定項目は、総行動距離、立ち上がり行動の回数と時間およびhead-dip行動(装置に設けられた穴を覗く行動)の回数、時間、潜時とした。5-HT_{1A}受容体作動薬flesinoxanおよび8-OH-DPATはストレス刺激負荷の24時間前に腹腔内投与し、コルチコステロン合成阻害薬metyraponeは5-HT_{1A}受容体作動薬投与の90分前に皮下投与した。〔結果および考察〕拘束ストレス刺激の負荷により、総行動距離、立ち上がり行動およびhead-dip行動すべてが減少した。また、このストレス刺激による情動変化は、flesinoxan(1mg/kg, i.p.)および8-OH-DPAT(1mg/kg, i.p.)の前処置により消失した。さらに、head-dip行動に対する5-HT_{1A}受容体作動薬の効果は、metyrapone(12.5および25 mg/kg, s.c.)の前処置により用量依存的に抑制された。尚、metyraponeの単回投与では、ストレス刺激負荷による情動変化に影響は認められなかった。本研究の結果より、5-HT_{1A}受容体刺激によるHPA axisの活性化が、ストレス適応の形成機構に一部関与していることが示唆される。

P1-63

モルヒネ依存・耐性ラットの中樞神経 Neuropeptide Y遺伝子発現の増加

高木 正仁、許 波、弦巻 立、豊里 晃、
樋口 宗史
新潟大・医・薬理

低用量モルヒネ持続療法は耐え難い癌性疼痛、神経原性疼痛の治療に広く使用されている。鎮痛作用に続いて、モルヒネの高い内因活性より耐性や依存症が生じてくるが、この機構はまだ不明である。近年、Neuropeptide Y (NPY) が痛覚過敏の調節に関わることが報告され、モルヒネ投与が脳内、線条体と海馬でNPYペプチド量を減少させることがわかってきた。NPY神経系が低用量モルヒネの耐性・依存症にどのように関与するかを明らかにする目的で、モルヒネ依存ラット中樞神経系のNPY遺伝子発現を調べた。

(方法) 雄性SDラット8週令に浸透圧ミニポンプで11.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hr}$ で塩酸モルヒネを5日間皮下投与した。耐性・依存性はtail flick test、planter test、respiratory apneaを指標とした。NPY mRNA量の定量はラット脳全細胞RNAあたりのNPY mRNAをNorthern blot分析で測定した。In situ hybridization (ISH) はラットNPY cRNAプローブによりペーリンガーインゲルハイムのプロトコルに準じて測定した。

(結果) 毎時10 μg 、5日間の皮下投与はラットに弱い鎮痛作用をもたらした。しかし、1mg/kgナロキシンの退薬症候や大量モルヒネによる無呼吸への耐性を生じた。このとき、中樞神経系ではNPY mRNA量の増加が線条体では有意に、大脳皮質では中等度見られた。海馬では増加しなかった。ISHによりNPY遺伝子の発現の変化する神経は線条体、大脳皮質の内性神経と考えられた。

(結論) モルヒネ処理はDAの代謝回転、5HTの代謝回転を促進させるが、NPYペプチドレベルの減少にかかわらず、NPY遺伝子発現が線条体、大脳皮質で増加することがわかった。このことは、NPYペプチドの代謝回転が増加していることを示している。低用量モルヒネによる線条体・大脳皮質NPY遺伝子発現の増加はNPYの代謝回転が特に線条体において亢進し、モルヒネの耐性・依存時の行動に関与していることを示唆する。

P1-64

GABA_A 受容体 α 4サブユニット遺伝子新 規多型とアルコール依存症との関連研究

中村 雅之¹、上野 修一¹、三神 正昭¹、
田邊 敬貴¹、有波 忠雄²、石黒 浩毅²、
小宮山 徳太郎³、三ツ汐 洋³、佐野 輝¹

¹愛媛大学医学部神経精神医学、²筑波大学基礎医学系遺伝医学、³国立精神神経センター武蔵病院

GABAA 受容体は抑制性神経伝達物質であるGABAに対応する受容体であり、ベンゾジアゼピン類・バルビツール酸誘導体などの結合部位やCl⁻チャネルと共に、受容体Cl⁻チャネル複合体を形成していることが明らかにされている。この受容体は分子量約50kDのサブユニット5個からなる5量体を成している。また、サブユニットには α ・ β ・ γ ・ δ ・ ϵ などがあり、それぞれのサブユニットには複数のサブタイプが存在する。近年、アルコール依存ラット脳において、GABAA受容体 α 4サブユニットの遺伝子発現増大が報告されている。我々はGABAA受容体 α 4サブユニット遺伝子について多型の有無を検討し、アルコール依存症との関連研究を行った。対象は健常対照者群とDSM-III-Rに基づいて診断を行ったアルコール依存症患者群とし、文書によるインフォームドコンセントを得、採血を行った。常法により白血球から抽出した遺伝子DNAを用いて、SSCP解析および直接塩基配列決定を行ったところ3種類の新規多型を発見した。それら多型のうち、エクソン1の翻訳領域に存在するC114A多型についてPCR-RFLP法によって多型解析を行った。多型解析の結果、患者群と健常対象者群の間で遺伝子型および対立遺伝子の出現頻度に有意差は認められなかった。今回の解析においては症例数が少ないため、今後症例を集積し、他の多型部位との関連も含め、さらなる検討が必要である。

P1-65

ドーパミントランスポーター遺伝子の5' 領域多型についての検討

上野 修一¹、中村 雅之¹、三神 正昭¹、
田邊 敬貴¹、石黒 浩毅²、有波 忠雄²、
小宮山 徳太郎³、三ツ汐 洋³、佐野 輝¹

¹愛媛大学医学部神経精神医学、²筑波大学基礎医学系
遺伝医学、³国立精神神経センター武蔵病院

ドーパミントランスポーターは、ドーパミンニューロンにのみ発現する12回膜貫通型のトランスポーターであり、シナプス間隙に放出されたドーパミンは、前シナプスに存在するドーパミントランスポーターによって特異的に再取り込みされる。この機能性たんぱく質の再取り込みの速度がドーパミン神経での伝達時間に関与し、ドーパミン系神経伝達を調節しているとされる。そのため、この遺伝子は、ドーパミン系に関連した疾患群、すなわち精神分裂病、注意欠陥多動性障害やアルコール関連精神障害の疾患関連遺伝子として重要視されている。昨年の本学会で、我々はヒトドーパミントランスポーター遺伝子 (accession number M95167) の3'非翻訳領域2319のGA多型を報告したが、精神的に健常な対照群とアルコール症患者群を用いて解析を行ったところ、この多型との有意な相関を認めた。今回、ドーパミントランスポーターの発現に影響を与えると思われる5'上流をSSCPを用いて解析したところ新たな変異を見いだした。書面を用いたインフォームドコンセントを行って同意を得て採血を行った健常対照群およびアルコール依存症群を用いてこの領域をPCR-RFLP法で解析している。この多型が、機能性多型かどうかについても検討する予定である。

P1-66

CHO細胞で産生させたAPPの糖鎖の解析

佐藤 雄治¹、Chen Liu²、Boguslaw S. Wojczyk²、
木幡 陽¹、Steven L. Spitalnik²、遠藤 玉夫¹
¹都老人研、²ペンシルベニア大

アルツハイマー病では、アミロイド前駆体蛋白質 (APP)の代謝産物であるベータアミロイドの異常産生それに伴う沈着が、同疾患の発症と強い関連性を示すことが指摘されている。またAPPはアスバラギン結合型 (N型) 及びセリン、スレオニン結合型 (O型) 糖鎖を持つ糖タンパク質であり、これらの糖鎖も翻訳後に付加される。このAPPの代謝異常に糖鎖が関与するかを明らかにする研究の一貫として、本糖タンパク質の糖鎖情報に関する研究を行った。

ヒトwild typeの1つである695アミノ酸残基のAPPをCHO細胞で発現させ、N型およびO型糖鎖の構造を解析した。異なる条件のヒドラジン分解法で遊離させたN型およびO型糖鎖の還元末端を、それぞれトリチウムおよび2-aminobenzamideで還元標識し、各種カラムクロマトグラフィーを用いて分画した。まずN型糖鎖について陰イオン交換カラムにより分画をしたところ吸着画分が得られた。この画分は陰イオンを持つ酸性オリゴ糖画分と考えられる。そこで、この画分をシアリダーゼ消化したところ、すべて中性化したことより酸性荷電はシアル酸によることが判明した。これらのオリゴ糖について、糖鎖構造特異的に結合するレクチンカラムやゲル濾過カラムにより分画後、糖鎖構造特異的exoglycosidaseを用いた酵素逐次分解法により解析した。その結果、N型糖鎖は、母核にフコースを持つあるいは持たない複合型2本鎖、3本鎖構造であることが明らかになった。一方、O型糖鎖についてもN型糖鎖の場合と同様に陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムにより分画した。更に逆相HPLCを用いて分画後、酵素逐次分解法により解析した。その結果、シアル酸を1残基あるいは2残基含むコア1構造であることが分かった。

今後は、これまでに明らかになっている家族性アルツハイマー病に見られるmutantの糖鎖構造を明らかにし、今回明らかとなったwild typeの糖鎖構造との比較を行い、アルツハイマー病患者におけるベータアミロイドの蓄積量及びその発症とAPPの糖鎖構造の関係を探っていきたい。

P1-67

NT2ニューロンのアポトーシスに伴うAPPの蓄積

西村 伊三男^{1,2}、植月 太一¹、原 とも子¹、
吉川 和明¹

¹阪大・蛋白研・機能制御、²学振特別研究員

野生型アミロイド前駆体蛋白質(amyloid precursor protein: APP)をアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させると、ラット脳ニューロンは短期間のうちにアポトーシス様の細胞死を起こす(Nishimura et al. J. Neurosci. 18: 2387-2398, 1998)。また、ヒト胚性ガン細胞由来のNT2細胞をレチノイン酸添加により分化させた分裂終了ニューロンに、APPを発現させた場合にも同様の細胞死がみられる。さらにこの変性に先立ち、caspase3が活性化するとともに断片化した核が観察される。したがって、この変性過程にアポトーシスが関与しているものと考えられる(Uetsuki et al. J. Neurosci., 1999, in press)。最近、NT2ニューロンから血清を除去すると細胞死を起こし細胞b/A4(Aβ)蛋白質が増加し、この過程にcaspase3が関与することが報告されている(Gervais et al. Cell 97: 395-406, 1999)。そこで今回我々は、この細胞死に内在性APPの発現変化が関連しているか否かを検討した。

NT2ニューロンから血清を除去すると、2日後には一部のニューロンが活性型caspase3に特異的に反応するウサギ抗血清により免疫染色され、またこれらのニューロンではHoechst33342により断片化した核が観察された。同時に、APPのC末端に対するウサギ抗血清(AC1)を用いて免疫染色を行うと、一部の変性ニューロンでは免疫陽性の封入体様の構造物が観察された。一方、APPのN末端に対するウサギ抗血清(AN2)およびAβに対するモノクローナル抗体(4G8)では、これらの変性ニューロンの免疫染色性に顕著な変化は認められなかった。またAC1を用いたウェスタンブロットでは、血清除去を行い2日後、4日後のニューロンは血清を除去しないニューロンに比較して、全長型APPの発現量に変化はみられなかった。以上の結果より、血清除去したNT2ニューロンではAPPのC末端断片が蓄積する可能性がある。したがって、ニューロン内におけるAPP C末端断片の蓄積とcaspase3の活性化には密接な関連があることが推定される。

P1-68

カベオラとは異なるコレステロール高含有ドメインにおけるアミロイド前駆体蛋白

林 秀樹、水野 哲也、道川 誠、柳澤 勝彦
国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

アミロイド前駆体蛋白 (APP) はアルツハイマー病で観察される老人斑の主要構成蛋白、アミロイドβ蛋白の前駆体であるが、その生理機能や細胞内局在は明らかではない。最近、APPがカベオラやカベオラ様ドメインと呼ばれる界面活性剤不溶性のコレステロール、スフィンゴ脂質高含有ドメインに存在するという報告がされたが、それに反論する報告もなされるなど、未だ統一的な見解は得られていない。そこで本研究はAPPの細胞膜上における局在を明らかにするために、SH-SY5Y細胞とラット大脳皮質、ヒト野生型APP遺伝子を導入したMDCK細胞とP19細胞から膜分画を行い解析した。MDCK細胞の形質膜をTritonX-100で可溶化後、遠心を行った結果、APPは可溶性画分に回収された。さらに全細胞膜を可溶化後、ショ糖密度勾配遠心を行った分画でも同様に、APPは可溶性高比重画分に回収された。P19細胞とSH-SY5Y細胞、ラット大脳皮質からの全細胞膜のショ糖密度勾配遠心分画の結果、APPの分子量の異なる二つのアイソフォームが検出された。P19細胞とラット大脳皮質の低分子量APPは可溶性高比重画分に、高分子量APPはコレステロール、GM1ガングリオシド高含有不溶性低比重画分に回収された。しかしながら、この画分の両脂質濃度は一般にカベオラやカベオラ様ドメインと考えられる画分より低く、形質膜の画分より高かった。これらのことからAPPはカベオラやカベオラ様ドメインといわれる膜ドメインには存在しないこと、また本研究のP19細胞とラット大脳皮質で観察された高分子量APPを含むコレステロール、GM1ガングリオシド高含有不溶性低比重画分はAPPの成熟と関連する可能性があることが示された。

P1-69

アルツハイマー病脳における アポトーシス
調節タンパク質の変動；加齢による変動と
の相関

藤本 貞毅¹、谷野 浩子¹、守屋 友加¹、下濱 俊²
¹京都薬科大学衛生化学教室、²京都大学医学部神経内
科学教室

アルツハイマー病 (AD) 脳では大脳皮質を中心と
する神経細胞死が起こっているが、この神経細胞死
が発生期及び出生後の発達段階における細胞死と同
様に、アポトーシス (Ap) の性質をもつ可能性が示
唆されている。また、AD は老化とともに増加する疾
患であるが、正常な加齢で Ap 調節タンパク質がどの
ように制御されているのか、これの老化に伴う動態
がADにおける病態に関連するか否かは不明である。
今回、AD 脳での Ap 調節タンパク質の変動および
ラットを用いて加齢に伴う脳内 Ap 調節タンパク質の
変動について検討した。

ヒトについては年齢、死後剖検までの時間に差を
認めないAD群と対照群脳の、ラットについては胎仔
期から96 週齢の、いずれも大脳皮質を試料とした。
Ap調節タンパク質レベルはそれぞれの特異抗体を用
いたWestern-blot法により解析した。

AD 群では対照群に比べ、Ap 抑制作用のある
Bcl-2 α と Bcl-x が、また、Ap促進作用のあるBakと
Bad が、さらに、Ap 実行プロテアーゼである
caspase-3 のタンパク質レベルが増大していた。これ
らAp 調節タンパク質の変動を胎仔期ならびに週齢の
異なるラット脳について調べたところ、発生および
出生後の発達段階でニューロンのApが見られる時期
にBcl-2 α 、Bak、Bad、caspase-3 の発現が著しいことが
認められた。一方、96 週齢でも特にAp 調節タンパ
ク質の増大は認められなかった。

以上の結果、AD が単なる老化の延長ではなく、
AD ではBcl-2 α 、Bad、Bak、caspase-3 などのAp 調節タ
ンパク質の発現を増大させる機構が作動しているこ
とが示唆される。

P1-70

合成amyloid β -蛋白を用いたラットグリア
細胞培養系における老人斑モデル

磯部 一郎、柳澤 勝彦、道川 誠
国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

老人斑(senile plaque, SP)はアルツハイマー病(AD)脳
における特徴的病理変化のひとつで、amyloid β -蛋白
(A β)がその主要構成成分であり、ADの発症および進
行に深く関わっていると考えられているが、その機
序はまだ十分に理解されていない。これまで合成A β
を用いて、その神経細胞等に対する影響を検討した実
験系で、SP様の構造を再現し、その特徴や細胞に対
する影響を研究した例は報告がない。我々は合成A β
1-40と培養ラットグリア細胞を用いて、SPのin-vitro
モデルを確立することを目的に本研究を以下のように
進めた。(1)合成A β を凝集させ、アミロイドを形
成させる際、その大きさがSP内のアミロイド核に類
似したものを作成する。(2)ラットアストロサイトを
主体とし、ミクログリアを含んだ、培養グリア細胞
の系に作成したアミロイド核を加える。(3)アミロイ
ド核およびその周囲のグリア細胞の反応を形態学
的、免疫組織化学的に解析し、脳内のSPと比較す
る。この研究の結果、合成A β 1-40を凝集させる際、
一般に行われているよりも長時間の処理を行うと、
直径10-50mmの球状の凝集が形成されること、その
凝集塊は線維状構造物よりなること、コンゴアレド
染色後、偏光下で、緑色の偏光を発することを確認
した。また、このアミロイド核様凝集物をグリア
細胞培養系に加えると、ミクログリアの集積、アス
トロサイトの線維性形態への変化がみられ、その様
相はSPにきわめて類似していること、さらにミク
ログリアにはMHC class II, inducible NOSなどの発現誘
導、アストロサイトではGFAP反応性の増強など、い
わゆる活性化グリア細胞の特徴が認められるように
なることも確認できた。以上の結果より、我々が確
立したin-vitro SPモデル系は、脳内SPの特徴を再現し
ており、そのアミロイド核の神経細胞およびグリア
細胞への影響を検討する上できわめて有用な実験系
になるものと考えられた。

P1-71

アポリポ蛋白Eのアイソフォーム特異的作用の検討：培養神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロールeffluxに及ぼす影響

道川 誠、范 企文、磯部 一郎、柳澤 勝彦
国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部

【目的】アルツハイマー病(AD)発症の危険因子であるアポリポ蛋白E(apoE)のAD発症に関わる分子機構の解明を目的とする。我々はapoEアイソフォーム特異的に誘導される神経細胞死について主に細胞内のcholesterol代謝に焦点を当てて検討を加えてきたが、今回はさらにcholesterol代謝におけるapoEfamilyの作用をeffluxの側面から検討した。

【対象と方法】胎生17日のラット大脳皮質から培養した神経細胞およびアストロサイトを用いた。

[¹⁴C]acetateで24-48時間ラベルした培養細胞をDMEMで洗浄後、DMEM培地に換え同時にヒトリコンビナントapoE2、apoE3、apoE4を添加し、培地中および細胞中の脂質を抽出後、TLC展開しBAS2500でcholesterol、phosphatidylcholine(PC)、sphingomyelin(SM)

の放射活性を定量した。更にapoEによって誘導される脂質effluxに対するPKC inhibitor、細胞内蛋白輸送阻害剤(brefeldin A、monensin)、およびheparinaseの影響を検討した。脂質を含む培地は濃度勾配法で分画し、各分画の比重、apoE含量および分画中の脂質を定量した。

【結果】apoEは神経細胞およびアストロサイトからcholesterol、PC、SMのeffluxを引き起こした。apoEによるefflux量はアイソフォームの型に依存した(apoE2>E3≥E4)。apoEによって搬出された脂質は培地中でHDLを形成した。PKC inhibitor、brefeldin A および monensin はapoE によるcholesterol effluxのみを選択的に抑制した。Heparinase処理によりapoEによる脂質effluxが抑制された。

【考察】apoEはcholesterolを含む脂質を細胞外に搬出させ(efflux)、HDLを形成すること、apoEのefflux作用の強さはアイソフォーム特異的に異なることが明らかになった。以上の結果は神経細胞内のcholesterol代謝がapoEのアイソフォーム別に異なり、それがAD発症の分子機構に関与する可能性を示している。

P1-72

家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン1変異体の機能解析

片山 泰一^{1,2,3}、今泉 和則^{1,2,3}、佐藤 直也^{1,2,3}、三好 耕^{1,3}、遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大・医・機能形態学、¹田辺製薬・創薬研究所、³CREST, JST

家族性アルツハイマー病 (FAD)にリンクしたプレセニリン1 (PS-1)変異体を発現する細胞では種々の細胞ストレスに対して脆弱性を示すことが知られている。しかしながら、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない。今回、このメカニズムを明らかにする目的でPS-1変異体を発現させた各種細胞を用いて解析を行った。その際、我々はPS-1が小胞体(ER)に局在することに着目し、ERストレスに対するPS-1変異体の影響について検討した。その結果、PS-1変異体を発現する細胞では野生型PS-1発現細胞に比較して各種ERストレスに対し脆弱になっており、この時ER分子シャペロンとして知られるGRP78のmRNA発現レベルが減弱していることを突き止めた。ウイルスを用いてGRP78をこの脆弱になったPS-1変異体発現細胞に導入すると野生型PS-1発現細胞のストレス感受性にまで回復した。ERに折り畳みの不完全な蛋白質 (unfolded蛋白質) が蓄積するとこれを感知するERストレスセンサーIre1pが下流のシグナル伝達系を活性化し、GRP78などのERシャペロン群の転写を誘導する(unfolded protein response,UPR)。次にこのUPR活性化に対するPS-1変異体発現による影響を調べた。その結果、PS-1変異体はIre1pの自己リン酸化を阻害することによってその下流のシグナル伝達を減弱させていることが明らかになった。以上のことからPS-1変異体によるERストレス感受性の増大はGRP78発現誘導機構の障害によってunfolded蛋白質がER内に過剰に蓄積することによると考えられる。

P1-73

孤発性アルツハイマー病とスプライシング異常

佐藤 直也^{1,2,3}、人見 淳一^{1,3}、今泉 和則^{1,2,3}、
遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大・医・機能形態学、²田辺製薬・創薬研究所、
³CREST, JST

家族性アルツハイマー病 (FAD) は、その原因遺伝子として、第 21 染色体上のアミロイド前駆体タンパク質 (APP)、第 14 染色体上のプレセニリン-1 (PS-1)、第 1 染色体上のプレセニリン-2 (PS-2) が同定され、その発症機構が徐々に明らかになってきている。一方、AD の大部分を占める孤発性 AD については、神経病理学的には FAD と同様な所見を示すが発症メカニズムについては不明な点が多い。

我々は、これまでに PS-2 遺伝子の 5 番目のエクソンを欠失したスプライシング変種 (PS2V) が、孤発性アルツハイマー病患者脳の約 70% に発現していることを報告した。今回は、この PS2V がコードすると予想される蛋白質の機能解析を行った。その結果、PS2V は、小胞体 (ER) ストレス応答カスケードを不活性化することが確認された。

そのために PS2V 発現細胞では、ストレス応答蛋白質 GRP78 蛋白質の発現が抑制され ER ストレスに対し感受性を増大すると考えられた。また、多くの PS 遺伝子の変異体と同様に、PS2V 強制発現細胞では A β 1-40 および A β 1-42 の産生が亢進されることも確認した。

以上から、孤発性アルツハイマー病においては PS2V の発現が引き金となり神経細胞死や A β 産生亢進を引き起こしている可能性が示唆された。

P1-74

中枢神経系細胞における 2 種の NPRAP/ δ -catenin アイソフォームの発現解析

川村 勇樹、范 企文、林 秀樹、道川 誠、
柳澤 勝彦、駒野 宏人

国立長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部

NPRAP (neural plakophilin-related arm repeat protein、別称 δ -catenin) は、Armadillo repeat を持つ新規蛋白として報告されている。また、この蛋白は早期発症型家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子 *presenilin-1* のコードする蛋白 (PS1) と結合することが明らかにされつつある。しかしながら NPRAP 機能については未知であり、その機能と FAD との関係も不明である。

NPRAP は脳に特異的に発現しており、すでに神経細胞での発現は確認されているが、グリア細胞における発現は明らかではない。また、NPRAP は cDNA の解析から、マウスでは少なくとも 2 種のアイソフォームが存在し、long form と、その途中の 25 個のアミノ酸が欠けた short form の存在が報告されている。そこで、本研究では、NPRAP の中枢神経系細胞におけるこれらアイソフォームの発現パターンを明らかにすることを目的とし、脳の各部位および初代培養の神経細胞と各種のグリア細胞について RT-PCR 法によりその発現を解析した。その結果、脳のどの部位でもこれら 2 種の NPRAP が発現しており、short form の発現が long form よりも高かった。また、神経細胞のみならずグリア細胞でも両方のアイソフォームが発現していることが明らかとなった。さらに、EC 細胞 (embryonal carcinoma cell) の一つである P19 細胞を用い、この細胞が神経細胞およびグリア細胞へと分化する際の NPRAP の発現についても解析を行った。その結果、レチノイン酸処理によって P19 細胞の分化を誘導すると、2 種の NPRAP の発現は増加し、分化した神経細胞およびグリア細胞で高い発現が認められた。また、この場合においても、short form の発現の方が高かった。これらのことから、2 種の NPRAP アイソフォームは、どちらも脳において広汎にわたり神経細胞やグリア細胞で発現し機能していると考えられる。また P19 細胞の分化初期よりその発現の誘導が認められたことから、NPRAP は中枢神経系細胞の分化にも関与している可能性が示唆された。

P1-75

アルツハイマー・ β アミロイド蛋白質による細胞内カルシウム流入の細胞による差異

川原 正博¹、加藤 みどり^{2,3}、村本 和世¹、
黒田 洋一郎¹
東京都神経科学総合研究所 ¹神経生化学、²解剖発生、³科学技術振興事業団

アルツハイマー・ β アミロイド蛋白質(A β P)は神経毒性を持ち、同病の発症機序に深く関連すると考えられている。演者等は、A β P[1-40]が視床下部神経細胞由来のGT1-7細胞膜上でカチオン選択的なイオンチャネルを形成することを明らかにしており、A β Pが細胞膜上でporeを形成することにより細胞内外のイオンバランスの異常による細胞死を引き起こすのではないかと考えている。このようなpore形成による細胞死は、カエル毒などの種々の抗菌性ペプチドでも報告されている。この現象をより詳細に解析するために、多数のGT1-7細胞の細胞内Ca²⁺濃度の変化をfura-2による同時多点解析法により観察した結果、A β P[1-40]の投与によって、細胞内Ca²⁺濃度の上昇が引き起こされることを明らかにし、昨年の本学会において報告している。同様な細胞内Ca²⁺濃度の変化は、A β P[25-35]、A β P[1-42]によっても観察されたが、毒性を持たないA β P[1-28]、A β P[40-1]では観察されず、nifedipine、nicardipine等のカルシウムチャネル阻害剤では阻害されなかった。また、細胞内Ca²⁺の変化には、細胞によりばらつきが大きく、同一視野内でも全く反応しない細胞から、投与後急速に細胞死を起こす細胞までが観察されたが、細胞1個あたりの平均細胞内Ca²⁺流入量は濃度依存的に増加し、投与後Ca²⁺上昇が生じるまでの潜時は減少した。さらに、GT1-7細胞以外の細胞種を用いてA β Pの作用を比較検討した結果、PC-12細胞、B-50細胞等では顕著な変化は観察されなかった。一方、胎齢18日のラット胎児より得られた海馬初代培養神経細胞において、培養7-10日の短期培養時にはA β P[25-35]による細胞内Ca²⁺濃度の変化はほとんど見られなかったが、3-4週間の長期培養の後には、顕著な細胞内Ca²⁺流入が観察された。これらの結果は、A β Pが膜内に侵入してporeを形成する結果、神経細胞死につながる細胞内Ca²⁺流入が生じるという'アミロイド・チャネル仮説'を支持するものであり、A β Pによる細胞内Ca²⁺濃度の変化には、細胞種および細胞のagingによる差異、同一細胞種でも細胞間のばらつきが大きく、脂質組成を含む細胞膜表面の変化がA β Pの細胞膜への侵入に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

P1-76

アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンとアミロイド前駆体タンパク質のC末端断片の関係について

亀谷 富由樹¹、田中 喜久子¹、宇佐美 美穂子¹、
丸山 敬¹、森 啓²

¹東京都精神医学総合研究所・分子生物、²大阪市立大学医学部老年医学

アルツハイマー病(AD)原因遺伝子産物プレセニリン1(PS1)はアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝に関与し、A β 産生を制御していることが知られている。最近、PS1はAPPをはじめとするタンパク輸送系に関与するという報告がなされる一方、PS1は γ 分泌酵素そのものであるという報告もなされ、APPC末断片の輸送に関与しているのか、あるいは直接代謝に関与しているのか不明である。我々はこれまでPS1とAPP代謝との関連性を解析し、昨年の本学会で、突然変異PS1を発現するPC12D細胞で、APPC末断片の増加傾向が見られることを発表した。本年度はヒトPS1および突然変異型PS1を安定的に発現するPC12D細胞を用いて、PS1とAPPC末断片の細胞内の分布、量的な関係等を解析し、PS1がAPPC末断片の代謝にどのように関与するのか検討する。

ヒトPS1および突然変異PS1を安定的に発現するPC12D細胞を0.25M sucrose溶液でホモゲナイズした後、1,000×gの遠心上清をさらに遠心し、8,000×g沈殿画分(P2)、100,000×g沈殿画分(P3)に分画し、それぞれの画分に含まれるAPPおよびAPPC末断片の存在量、PS1の存在量等を、電気泳動、イムノブロッキング、2次元電気泳動等を用いて解析した。

PS1の発現量とAPPの α および β 分泌酵素による切断活性に関連性は見いだせなかったが、PS1の発現量の多いものほどAPPC末断片の存在量が増加する傾向が見られた。APPC末断片は大部分がP2画分に回収され、PS1の発現量によってP2およびP3画分に回収されるAPPC末断片量比に若干の差が見られた。

現在PS1の突然変異の影響など詳細な解析を行っている。

P1-77

エストロゲン受容体 α 遺伝子多型の転写活性およびアルツハイマー病への関与の検討

丸山 博文¹、田路 浩正¹、川上 秀史¹、
中村 重信¹、佐々木 健²、新井 平伊³、
保田 稔⁴、田中 千賀子⁴、Charles Harrington⁵

¹広島大学医学部内科学第三、²きのこエスポアル病院、³順天堂大精神、⁴兵庫脳研、⁵Aberdeen大

アルツハイマー病(AD)では中枢性コリン作動系の機能低下が示されている。卵巣機能の低下はコリン作動性ニューロンの機能低下に関与している。近年、女性は男性よりAD発症の危険が高く、エストロゲン補充療法はAD発症の危険を低下させると報告されている。さらにエストロゲンはAPP代謝・大脳血流・ニューロン再生・シナプス新芽形成に影響を与える。エストロゲン受容体(ER) α 遺伝子イントロン1内にはrestriction fragment length polymorphisms (RFLPs)が存在し、骨粗鬆症との関連が報告されている。これらのことよりER α 遺伝子多型はADと関連している可能性が考えられるため、この遺伝子多型を示す領域の転写活性への影響を評価した。

ER α 遺伝子イントロン1およびエクソン2を含む1.3Kbの領域をPCR反応で増幅し、ホタルルシフェラーゼ発現のプロモーターベクターに組み込みHeLa S3細胞に一過性に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。本領域の組み込みによりルシフェラーゼ活性は約2倍に上昇し、エンハンサー活性を認めた。またその活性はハプロタイプによって異なっていた。

ERの発現が本領域の多型性により調節され、ADと関連している可能性があると考え、この遺伝子多型の頻度を孤発性AD患者と正常対照者の間で比較した。対象は孤発性AD患者日本人184名・白人167名、正常対照者日本人133名・白人120名。これまでの報告のとおりADにおいてAPOE4の頻度は高かったが、ER α 遺伝子多型の頻度は孤発性AD患者と正常対照者との間に差を認めなかった。しかしながら日本人と白人との間では多型の頻度は同一ではなく人種差が存在した。

以上の結果から本領域のエンハンサー活性は認めしたが、アルツハイマー病への関与は否定的であった。

P1-78

アルツハイマー病の危険因子としてのアンギオテンシンⅠ変換酵素遺伝子多型

宮武 史子¹、会津 善紀¹、胡 建国¹、
中川 八郎¹、中村 重信²、玉岡 晃³、
高橋 良輔⁴、浦上 克哉⁵、東海林 幹夫⁶

¹株式会社ビー・エム・エル 研究開発本部、²広島大学第3内科、³筑波大学神経内科、⁴東京都神経研神経学部門、⁵鳥取大学脳神経内科、⁶群馬大学神経内科

【目的】アンギオテンシンⅠ変換酵素(ACE)遺伝子はイントロン16に287-bpの挿入/欠失(I: insertion / D: deletion)による多型が認められている。最近、アルツハイマー病(AD)とACE遺伝子多型に関連性があることが報告された。そこで、日本人についてAD患者群、non AD群のACE遺伝子多型をPCR法により解析し、ADとの関連性を検討した。

【方法】AD患者群(133例 平均年齢74歳)及びcontrol群としたnon AD群(232例 平均年齢56歳)と nonAD、age-matched群(123例 平均年齢74歳)を対象とした。血液、または脳組織から抽出したDNAのACE遺伝子I(490bp)、D(190bp)が含まれる領域をPCR法により解析し、AD群とnon AD群のACE遺伝子多型(II、ID、DD)及びI、D alleleを統計学的に比較検討した。

【結果】ACE遺伝子多型は、AD群ではII 67例、ID 53例、DD 10例であり、alleleの頻度はI: 0.72、D: 0.28であった。non AD群はII 80例、ID 98例、DD 44例であり、alleleの頻度はI: 0.58、D: 0.42であった。またnonAD、age-matched群におけるalleleの頻度はI: 0.55、D: 0.45であった。 χ^2 統計によりAD群と比較してnon AD群及びnon AD、age-matched群では、遺伝子多型で $P \leq 0.01$ 、allele頻度で $P < 0.01$ の有意な差が認められた。

【結論】AD群ではnon AD群と比較してACE遺伝子多型のI alleleを有する頻度が有意に高かった。現在までADの遺伝的な危険因子とされているのはAPOEのみであるが、ADおよびnon AD群のAPOE遺伝子多型とACE遺伝子多型に関連は認められていないため、APOEと無関係にAD発症に影響を及ぼしていることが推測される。今回の検討は、ACE遺伝子多型のI alleleが新たなADの危険因子となる可能性を示唆している。

P2-01

Group II代謝調節型glutamate受容体を介する中枢acetylcholine遊離機構とN-anisoyl-GABAによる修飾作用

白根 正智, 中村 和雄
日本ロシュ・研究所・CNSラボ

【目的】Aniracetam (DRAGANON®) は、脳血管障害後遺症性精神症候（情緒障害、睡眠障害、問題行動）に対して、高い有用性を示す精神機能障害改善薬である。私達は、主要代謝物のN-anisoyl-GABAおよびp-anisic acidが、aniracetamの脳内活性責任物質としてacetylcholine (ACh) 遊離量を増加することを報告した。今回、その遊離機構を明らかにするため、N-anisoyl-GABA誘発性ACh遊離における代謝調節型(mGlu)ならびにイオン調節型(AMPA) glutamate受容体の関与を、マイクロダイアリシス法により検討した。

【方法】予め、5週間にわたって1%食塩水を負荷した、多発性脳梗塞モデルである脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)を使用した。常法に従って大脳皮質前頭前野にガイドカニューレを挿入し、マイクロダイアリシス用プローブを装着した。

N-Anisoyl-GABAならびに被検薬物を10 μ M eserineを含んだリンゲル液に溶解し、同一プローブを介して局所灌流した(2 μ l/min)。20分間隔で回収した透析サンプル中のACh量をHPLCで定量し、ACh遊離量とした。

【結果及び考察】N-Anisoyl-GABAは、皮質前頭前野のACh遊離を濃度依存的(0.1, 1 μ M)かつ遅発性に増加した。この亢進作用は、mGlu受容体の非選択的拮抗薬 MCPG(300 μ M)とgroup II選択的拮抗薬のMCCG(300 μ M)により完全に遮断された。一方、group I拮抗薬AIDA(300 μ M)は軽度な抑制を示したのみであり、AMPA受容体拮抗薬のYM90K(100 μ M)は無効であった。mGlu受容体作動薬の1S,3R-ACPD(100 μ M)は、N-anisoyl-GABAによる遅発性ACh遊離亢進作用を模倣し、MCCGで完全に拮抗された。AMPA(30 μ M)によるACh遊離は速やかであり、1S,3R-ACPDとは明らかに異なっていた。以上より、N-anisoyl-GABAはgroup II mGlu受容体を介して皮質前頭前野のACh遊離を亢進すると推定された。

P2-02

ドパミンの核内転写因子への直接作用に関する検討

浅沼 幹人, 宮崎 育子, 田中 健一, 小川 紀雄
岡山大学医学部神経情報学部門

ドパミンをはじめとするカテコールアミン類は神経情報伝達において重要な役割を果たしている。しかし、過剰のドパミン、L-DOPAやメタンフェタミンがドパミン神経およびその神経終末の障害を惹起することが知られている。このような神経障害は、フリーラジカル種の発生やアポトーシス関連蛋白の発現に基づくとの報告もあるが、他の作用機序の存在も考えられる。そこで、ドパミンの核内への直接作用の可能性をみるために、転写因子AP-1のDNA結合を指標にしてelectrophoretic mobility-shift assay (EMSA)でドパミンの核蛋白への作用を検討した。

ICRマウスの線条体、黒質を含む腹側中脳(黒質)から核蛋白を抽出した。核蛋白(4 μ g)にドパミン(100 nM-100 μ M)を添加しincubateし、ついで³²P-dCTPで標識したAP-1 binding siteを含む2本鎖DNAとincubateし、DNAに結合したAP-1を4%ポリアクリルアミドゲルによるEMSAで検出した。線条体からの核蛋白にドパミンを添加した場合に、AP-1のDNA結合活性は有意ではないものの上昇する傾向がみられた。一方、黒質の核蛋白を用いたEMSAではドパミン(100 nM-10 μ M)を添加した場合に用量依存的に転写因子AP-1のDNA結合活性は上昇していた。

この結果より、ドパミンが核抽出液中の因子との反応を介してあるいは直接に転写因子に作用し、転写因子のDNA結合活性を調節しうる可能性が示唆された。メタンフェタミンが核内に移行し、転写因子に直接作用するというわれわれの既報とも類似しており、現在培養ドパミン系神経細胞にドパミン、L-DOPAなどのドパミン神経作用薬を添加し、これら作用薬の転写因子-DNA結合への作用、さらにドパミン神経作用薬の細胞下分布について検討している。

P2-03

ドーパミンによるヒトチロシン水酸化酵素1型活性の抑制はN端の特異的部位によって制御される

中島 昭¹、森 啓至¹、金子 葉子¹、鈴木 崇弘²、
永津 俊治²、太田 明¹

藤田保健衛生大・¹医・第1生理、²総医研・分子遺伝

カテコールアミン生合成系の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) は、補酵素の 6R-tetrahydrobiopterin (6RBPH₄) 存在下、L-tyrosine のL-DOPAへの変換を触媒し、その酵素活性は生合成されたカテコールアミンによるフィードバック抑制により制御されている。この抑制に影響を及ぼしているTHのN端部分の特異的部位を特定するため、ヒトTH (1型) のwild-type並びに35、38、44個のアミノ酸を欠失したN端欠損変異体 (del-35、del-38、del-44) をpMALc2ベクターを用いてマルトース結合蛋白質融合体として大腸菌に発現させた後、affinity並びにsize-exclusion chromatography法を用いて4量体成分を精製した。

このwild-typeは、これまで報告されている非融合体として発現されたwild-typeとほぼ同一の酵素活性を示した。N端欠損変異体のL-tyrosineと6RBPH₄のVmaxはwild-typeの約25%を示したが、Km値には差は見られなかった。N端欠損変異体の鉄含量はwild-typeに比し低値を示したが、これらの変異体間では有意な差は見られなかった。del-38とdel-44は、wild-typeとdel-35に比しdopamineによる酵素活性の抑制が有意に低下していた。dopamineとN端欠損変異体をincubateして結合させた後6RBPH₄を添加すると、変異体からのdopamineの解離が観察されたが、その解離量はdel-35に比しdel-38で高値を示した。

以上の結果から、Gly³⁶-Arg³⁷-Arg³⁸配列はdopamineと6RBPH₄のTH分子への競合的結合に影響を及ぼすことにより、dopamineによる酵素活性の抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

P2-04

内因性アルデヒド化合物によるPC12細胞からのドーパミン遊離促進機構の解析

橋本 恒一、矢部 千尋

京都府立医科大学 薬理学教室

我々は第41回神経学会において、ドーパミン(DA)の最初の代謝産物であり内因性のアルデヒド化合物である 3,4-dihydroxyphenyl- acetaldehyde (DOPALD) がPC12細胞からのDAの遊離を促進することを報告した。今回はこのDOPALDによるPC12細胞からのDAの遊離促進の機序について報告する。

DOPALD 10 μ Mまでの濃度ではPC12細胞からのLDHの漏出は認められなかった。また脂質過酸化により生じる別の内因性アルデヒド化合物、4-hydroxynonenal によるPC12細胞からのDAの遊離促進は認められなかった。DOPALDはPC12細胞への [³H] DAの取り込みにも影響を及ぼさなかった。一方、高カリウム(56mM) 刺激によるPC12細胞からのDA遊離促進は、細胞外液からのCa²⁺の除去或いはL型Caチャンネルの拮抗薬であるnifedipineの添加により有意に抑制されたが、DOPALDによるDAの遊離促進は、Ca²⁺の除去或いはnifedipineの添加に影響されなかった。

以上の結果より、PC12細胞からのDOPALDによるDA遊離は、アルデヒド化合物による非特異的な作用ではないこと、またCa²⁺非依存性の機序により誘発されることが示唆された。

P2-05

CALI法の開口分泌機構研究への応用

今泉 美佳¹、岸本 正巳¹、川ノ口 潤¹、
笹川 展幸¹、西木 慎一²、高橋 正身²、
熊倉 鴻之助¹

¹上智大学・生命科学研究所、

²三菱化学・生命科学研究所

開口分泌機構研究に対する新たなブレイクスルーとして、正常な細胞内でレーザー照射により機能分子を選択的に不活性化することが可能な実験法、すなわち、CALI (Chromophore-Assisted Laser Inactivation: レーザー分子機能不活性) 法を応用することを試みた。CALI法は特定分子に対する抗体をマラカイトグリーン(MG)色素で標識し、レーザー照射(620nm)を行うことで、MG色素標識抗体と結合する特定分子のみを変性させて機能的に不活性化させる手法である。今回は、開口分泌への関与が示唆されているSNARE蛋白質の一種、SNAP-25のCALIを行い、副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン(CA)分泌への影響を調べた。選択したSNAP-25に対するモノクローナル抗体、BR05はイムノプロットによりクロマフィン細胞の28kDa蛋白を認識し、また非標識のBR05はCA分泌に影響を及ぼさなかったため、CALI法確立に適した抗体と判断した。MG標識したBR05は、Scrape-loadingにより細胞内へ導入しresealおよびディッシュへの接着のため、6時間培養を行った。蛍光組織化学実験により、約90%の細胞に抗体の導入が確認され、SNAP-25の局在部位である細胞膜直下に蛍光染色が観察された。MG標識抗体を導入した細胞にレーザー照射を行い、アセチルコリン刺激に対するCA分泌に及ぼすCALIの効果を調べた。MG標識BR05導入細胞では、レーザー未照射の場合、分泌に影響及ぼさなかったが、レーザー照射を行うと、CA分泌が有意に低下した。このとき、抗体を導入していないcontrol細胞、およびMG標識control抗体を導入した細胞では分泌機能は阻害を受けなかった。このように、CALI法により開口分泌に関与する機能性蛋白質を不活性化することで、CA分泌機能を抑制する結果が得られたことから、開口分泌の分子機構研究にCALI法は有効であることが示唆された。

P2-06

Catecholamine分泌能の低下したPC12細胞株の解析

笠井 陽子、森島 美絵子、桑原 玲子、
高橋 正身

三菱化学生命科学研究所

PC12細胞は神経伝達物質の放出機構を解析する上で有効なモデルである。私共はこれまでにシングルセルクローニングによって、多くの亜株を分離している。そのひとつPC12-2B3とPC12-1G2は外液のK濃度を高めて脱分極刺激しても、ほとんどdopamineの放出が見られない低分泌能株である。ただし、PC12-1G2はイオノマイシンなどのCaイオノフォアで刺激すると、正常な細胞株と同程度にdopamineを分泌する。これらの低分泌能株ではdopamine含量が正常株と変わらないことから、dopamineは生合成されて、おそらく分泌顆粒に貯蔵されていると思われる。電子顕微鏡による分泌顆粒の形態観察でも、その数と分布に異常は認められなかった。また、Fura-2を用いて、脱分極刺激後の細胞内Ca²⁺動態を調べたところ、12-2B3では正常株と変わらぬCa²⁺流入が認められた。一方、PC12-1G2では脱分極直後の一過性のCa²⁺上昇が失われており、その後の持続的な低いCa²⁺流入しか認められなかった。この一過性Ca²⁺上昇は、正常な細胞をnicardipineで前処理すると消失することから、PC12-1G2ではL型Caチャネルあるいはその制御機構に異常があると推察された。次に、PC12-2B3ではどのような蛋白に変異があるかを調べるために、種々の前シナプス蛋白の抗体を用いたイムノプロットを行った。三つのSNARE蛋白(syntaxin、VAMP-2、SNAP-25)は正常株の半分程度の発現がみられたが、synaptophysinの発現が極めて低下していた。このほかに、catecholamineの再取り込み能が低下している株(PC12-D60)を分離したが、脱分極刺激による分泌は正常な株とほとんど変わらなかった。このようなPC12の変異株は神経伝達物質の放出機構の解明に役立つと考えられる。

P2-07

PC12細胞におけるコンプレキシン
(Complexin)の開口放出制御機構の解明板倉 誠^{1,2}、高橋 聖³、高橋 正身¹¹三菱化学生命研、²東工大生命理工、³高知医大第一生理

神経伝達物質は、神経終末から開口放出によって分泌される。SNAREと呼ばれる蛋白質がこの開口放出機構において重要な役割を果たしていると考えられている。Complexinは約20kDaの極性アミノ酸に富んだ蛋白質で成熟した神経細胞の前シナプスに局在している。またin vitroで α -SNAPのSNARE複合体への結合を阻害することが知られている。当研究室ではComplexin IIが、アブリシアのシナプスにおいて開口放出を抑制することを見いだしている。そこで哺乳類細胞においても同様の作用が見られるかについて検討した。

PC12細胞にComplexinをヒト成長ホルモン(hGH)またはマウスアセチルコリン合成酵素(mChAT)と共発現させ、それぞれhGH、アセチルコリン(ACh)分泌に与えるComplexinの影響を確認した。その結果、Complexin I および IIの過剰発現は、PC12細胞からのhGH、ACh分泌を20-40%程度抑制した。したがってPC12細胞においてComplexinは、AChを含むシナプス様小胞からの分泌、hGHが含まれる有芯顆粒からの分泌、両方とも抑制することがわかった。また、この抑制効果はComplexin I および IIともほぼ同程度でありファミリー分子間の差は認められなかった。

P2-08

ラット脊髄後根神経節培養細胞における
IL-1 β 誘発性サブスタンスP遊離について森岡 徳光、武田 和美、熊谷 圭、秀 和泉、
井上 敦子、仲田 義啓

広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学

一次知覚神経細胞は、サブスタンスPを合成、遊離し、痛覚伝達に関与している。また、インターロイキン1 β (IL-1 β)は免疫担当細胞より分泌され、炎症時における痛覚過敏に関与していることが報告されている。今回、ラット脊髄後根神経節初代培養細胞(DRG細胞)において、IL-1 β によるサブスタンスP遊離のメカニズムについて検討した。

Wistar系雄性成熟ラットより脊髄後根神経節を単離し、酵素処理分散法により初代培養細胞を作成した。サブスタンスP量をラジオイムノアッセイ、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX2) mRNA量をリボヌクレアーゼプロテクションアッセイで解析した。

IL-1 β 0.1ng/ml処置6時間後、DRG細胞培養液中へのサブスタンスP遊離量は無処置群に比べ有意に増大した。このIL-1 β によるサブスタンスP遊離増大はCa²⁺依存性で、IL-1 receptor antagonistにより抑制された。また、IL-1 β の作用は、indomethacin、及びNS-398併用により抑制された。DRG細胞において、IL-1 β 処置後3時間以内にCOX2 mRNA発現が誘導された。また、8-bromo-cAMPあるいは8-bromo-cGMPは、DRG細胞培養液中へのサブスタンスP遊離量を無処置群に比べ有意に増大した。

以上の結果より、DRG細胞において、IL-1 β はCOX2 $\rightarrow$ PGs $\rightarrow$ cAMP系を介したメカニズムによりサブスタンスP遊離を誘発する可能性が示唆された。また、8-bromo-cGMPによってもサブスタンスP遊離が誘導されたことから、DRG細胞においてはNO $\rightarrow$ cGMP系を介したサブスタンスP遊離機構の存在も予想される。

P2-09

豚下垂体から合成ペプチド SucFGRSED-Dns プロセシング酵素の単 離と構造解析

加藤 武¹、山本 賢¹、平野 久²、矢嶋 隆一³、
知久馬 敏幸⁴

¹横浜市大・院・総合理学、²木原生研、³特殊免疫
研、⁴昭和薬科大・薬品分析

これまで、記憶・学習の研究はアセチルコリン、
ドーパミン、グルタミン酸、GABA、など低分子の伝
達物質について多く行われた。近年、種々の細胞外
プロテアーゼが神経可塑性に関わっていること、神
経ペプチド量の調節が痴呆症の改善に重要であるこ
と、などプロテアーゼと記憶との関係が重要視され
ている。神経ペプチド量を調節する生合成酵素の候
補としてサチライシン様酵素 (PC1、PC2、Furin)
が挙げられているのみであり、私達は生理機能が明
らかな神経ペプチド生合成酵素の単離を試みた。

[方法] 豚下垂体を-80℃に保存し、融解後可溶性画
分をイオン交換カラム、ハイドロキシアパタイト、
pHフォーカシング、2次元電気泳動により単離精製
した。酵素活性の測定はHPLC-蛍光法にて行った。

[結果と考察] 今回、新しく合成した蛍光基質
(SucFGRSED-Dns)を用いて豚下垂体より生合成酵素
の単離を試み、2種類の酵素の存在を明らかにし
た。その1つとしてアミノ酸シークエンスより

puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)を同定した。
更に、他の1種は約分子量60kDaのチオール酵素で
あった。後者については、現在アミノ酸シークエン
スを行っている。PSAはエンケファリン変換酵素とし
て単離された酵素であり、神経ペプチド前駆体のア
ミノ末端をプロセシングする酵素である。現在、こ
の酵素の抗体作成とラット脳内分布を検討中であ
る。

今回の私共の研究により、神経ペプチドの生合成
酵素としてサチライシン様酵素以外にも種々存在す
ることが明らかとなった。今後は、記憶と記憶障害
モデル動物を用いて生体内での調節機構を明らかに
する。

P2-10

光感応基を有する新規リジン誘導体を用い たケージドペプチドの合成法の開発とCaM キナーゼII特異的阻害ペプチドAIPへの応用

茂里 康¹、達 吉郎¹、石田敦彦²、亀下 勇²、
藤澤 仁²、湯元 昇¹

¹通商産業省大阪工業技術研究所、²旭川医科大学・一
生化

ケージド化合物とは、生理活性物質を光感応基で
化学修飾し、活性を隠蔽状態にした化合物で、光照
射を行うとその活性が直ちに回復する。以前チロシ
ンを含んだペプチドのケージドペプチド調製法を報
告したが、今回リジンを含んだペプチドのケージド
ペプチド調製法を開発した。ニトロベンジル基
(NB)で保護しておいたリジン (NBリジン) のFmoc
誘導体を合成し、ペプチドの固相合成を行ったとこ
ろ、通常のリジン残基と同様にペプチド合成ができ
ることが判明した。そこでCaMキナーゼII特異的阻害
ペプチドAIP(KKALRRQEAVDAL)のケージド化を試み
た。NBリジンの組み込み数を変えた2種類のNB-AIP
を合成したところ、いずれも紫外光照射で、迅速に
ニトロベンジル基が解離し、AIPが生成した。特に
NBリジンを2個組み込んだものは、強力なケージド
化合物としての特徴を備えていることがわかった。

P2-11

**ラットC6BU-1細胞における
Dehydroepiandrosteroneのcyclic GMP
産生に対する効果**

竹林 実、加賀谷 有行、稲垣 正俊、三好 出、
片桐 秀晃、岡本 泰昌、堀口 淳、山脇 成人
広島大学医学部神経精神医学講座

Dehydroepiandrosterone (DHEA) は、神経ステロイドの一つであり、記憶、不安そして情動などの精神機能との関連が近年指摘されているが、その機序は不明である。

中枢神経における神経ステロイドの細胞内情報伝達系に対する効果を検討することがわれわれの目的である。昨年の本学会において、DHEAは細胞内カルシウム動員には急性効果を示さなかったことを報告した。

今回は、G蛋白活性物質であるNaFの刺激によるcyclicGMP (cGMP) 産生に対する DHEA の効果をEIA法を用いて検討した。NaFの急性処置によりcGMPは濃度依存性に上昇した。この反応はcalmodulin 拮抗薬である W-7 あるいはnitric oxide 産生酵素 (NOS) の阻害薬である N^G -nitro-L-arginineの前処置により消失した。DHEAの急性処置によりNaF刺激性のcGMP産生は濃度依存性に抑制された。しかし、DHEA-sulfateとdexamethasone (DEX) の処置は有意な影響を及ぼさなかった。

NOのドナーである SNP の急性処置はcGMPの上昇を引き起こしたが、DHEA、DHEA-sulfateおよびDEXはいずれも SNP刺激性の cGMPの上昇には有意な影響を及ぼさなかった。

これらの結果から、DHEAは細胞内cGMP動員に対して急性の抑制効果を持ち、その効果はcalmodulin あるいは NOS依存性の経路を介することが推測された。

P2-12

**Dual leucine zipper bearing kinase
(DLK)欠損マウスにおける海馬体・脊髄白質
の発達不全メカニズム**

湯川 和典¹、白澤 信行²、鶴尾 吉宏²、辻 繁勝¹

和歌山県立医科大学、¹第二生理学、²第一解剖学

Dual leucine zipper bearing kinase (DLK)は二つのleucine zipper 様構造とMAP kinase kinase kinase (MAPKKK) 類似の触媒ドメインを有するセリン/スレオニン/チロシンキナーゼである。DLK mRNAは胎仔期の脳、腎、肺、心に検出されるが生後は卵巣と脳にのみ特異的に発現している。DLKは脳神経系シナプス部に多く局在し脱分極によりDLKの脱リン酸化が誘導される。細胞株へのトランスフェクション実験によりRhoファミリーGTPase: Rac/cdc42の下流でSAPK/JNK系及びp38MAPK系を制御する可能性が示されている。SAPK/JNK系とp38MAPK系が神経細胞のアポトーシス過程に関与することよりDLKはアポトーシスとの関連において興味を持たれる。脳神経系の発生過程と生体内神経細胞死におけるDLKの役割を知ることを目的として、DLK遺伝子欠損(DLK(-/-))マウスの脳神経系を組織学的に解析した。DLK(-/-)マウスは生後2日から3週の間に死亡するが、wild typeに比しDLK(-/-)海馬体は狭小化しDLK(-/-)脊髄白質は著明に薄いことが判明した。さらに海馬におけるS100陽性グリアの減少と脊髄白質でのGFAP陽性グリアの著明な減少を認めた。従ってグリア細胞の分化・増殖異常あるいはアポトーシスの異常亢進などがメカニズムとして考えられる。これらの可能性を検討するためにwild type DLK(+/-)海馬とDLK(-/-)海馬由来の培養グリア細胞を用いてグリア細胞の増殖・分化能・アポトーシスについて解析を行っている。また胎生期神経細胞アポトーシスとグルタミン酸による神経細胞死誘発に対する抵抗性ならびにc-Junのリン酸化(活性化)におけるDLKの役割についても解析中であり併せて報告したい。

(本演題は大阪大学微生物病研究所 竹内 理、竹田 潔、審良静男 先生との共同研究である。)

P2-13

PHAPI kinaseとPHAP Iの細胞内リン酸化

下島 桐、萩原 民雄、山科 聡子、今川 浩之、
竹田 二美代、竹田 稔
昭和大学・医・生化

<目的>我々は脳可溶性画分にPutativeHLA-DR Associated Protein I (PHAPI)をリン酸化するprotein kinase活性を見出し、このprotein kinase(PHAPI kinase)がin vitroでPHAP Iの204番目のセリン残基をリン酸化することを報告してきた。今回、このprotein kinaseの精製及び細胞内でのリン酸化について検討した。
<方法>PHAP I kinaseは組換えPHAP Iタンパク質をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ヒトPHAPI cDNA及び部位特異的変異法により作製した変異cDNAをGreen Fluorescent Protein (GFP)遺伝子融合Vectorに組込んだ後、BALB/3T3細胞で発現させGFP蛍光によりタンパク質の局在を観察した。またGFP-PHAP I融合タンパク質を発現した細胞を³²P-orthophosphateでラベルした後、免疫沈降法によりPHAP Iタンパク質のリン酸化を確認した。

<結果・結論>精製したPHAP I kinaseは電気泳動上41及び38 kDaのタンパク質バンドを示し、ゲル内リン酸化反応においては両者にprotein kinase活性が認められた。これらのprotein kinaseには自己リン酸化が認められなかった。BALB/3T3で強制発現させた野生型PHAP Iは核に局在したが、リン酸化部位である204番目のSerをAlaに置換した変異タンパク質は細胞質に存在した。細胞内においては204番目のSerに加え、他の部位がリン酸化されていた。現在、protein kinaseの一次構造の解析を進めているがPHAP Iが我々の見出したp41/38 protein kinaseを含む複数のprotein kinaseにより制御を受けること、204番目のSerのリン酸化はPHAP Iの核への局在を制御している可能性が考えられた。

P2-14

海馬ニューロンにおけるestrogen-nicotineのクロストーク

鬼頭 昭三、新郷 明子
兵庫大学附属研究所

estrogenが記憶学習機能を促進することはよく知られているが、nicotineも短期的に記憶機能を促進したり、ニューロン変性のプロセスに拮抗することが認められている。我々はestrogenもnicotineも共にラット海馬において、AP-1結合活性を上昇させ、c-fos、IGF1 mRNAの発現を誘導することを認めている。一方では、estrogenによるIGF1 mRNA発現はニコチンによって部分的に阻害されるという結果を得ている。

本研究では、このestrogen、nicotine相関について、そのメカニズムを検討するための実験を行った。第一段階としてラット海馬でRNase protection assayによってestrogen受容体mRNA発現の存在を確認した。ラットに β estradiolを全身的に投与すると、用量依存的にestrogen受容体のup-regulationが見られた。nicotineの単独投与によって、ラット海馬でのestrogen受容体mRNAの発現は抑えられた。このestrogen受容体発現の抑制は、estrogenとnicotineを同時投与することによって、一層強められた。

in vivoの実験で得られたこれらの現象のメカニズムを更に詳細に検討するために、ラット胎仔海馬ニューロンを不死化させたH19-7細胞を用いて実験を行った。本研究は喫煙科学財団の助成によりなされたものである。

P2-15

グリア由来培養細胞におけるトロンビン刺激性細胞内カルシウム動員系に対するリチウムとプラスミンの影響

加賀谷 有行¹、岡田 亜希子²、田原 康孝¹、
稲垣 正俊¹、三好 出¹、岡本 泰昌¹、竹林 実¹、
堀口 淳¹、仲田 義啓²、山脇 成人¹

¹広島大学医学部神経精神医学講座、

²広島大学医学部薬効解析科学

感情障害、なかでも躁うつ病において、その患者の血小板におけるトロンビン刺激性細胞内カルシウム動員の亢進していることがいくつかの施設から報告されている。一方、炭酸リチウムは躁うつ病の治療薬として広く用いられているが、その作用機序に関しては未だに不明な点を多く残している。今回、われわれはグリア由来培養細胞を用いて、リチウム前処置後のトロンビン誘発性細胞内カルシウム動員系の変化について検討した。

ラットグリア由来C6細胞を培養し、培養期間中に塩化リチウムを1～10 mM、1～24時間前処置した。その後、細胞にカルシウム感受性蛍光色素 fura-2/AMを負荷し、細胞内カルシウム濃度を測定した。

トロンビン刺激性細胞内カルシウム動員は前処置するリチウムの濃度と時間に依存して抑制された。一方、同じ濃度と時間におけるリチウム前処置では、セロトニン刺激性細胞内カルシウム動員は抑制されなかったことから、リチウムによるトロンビン誘発性細胞内カルシウム動員の抑制はトロンビン受容体の機能の変化によることが示唆された。対照細胞ではトロンビン刺激性細胞内カルシウム動員は他のセリンプロテアーゼであるプラスミンにより著明に阻害されたが、リチウム前処置細胞ではこの阻害が観察されなかった。これらの結果から、リチウムは受容体レベルでトロンビン刺激性細胞内カルシウム動員を抑制することが示唆された。

P2-16

小胞体ストレスセンサーのクローニング

三好 耕^{1,3}、今泉 和則^{1,2,3}、片山 泰一^{1,2,3}、
佐藤 直也^{1,2,3}、人見 淳一^{1,3}、米田 託成^{1,3}、
遠山 正弥^{1,3}

¹大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座A2、

²田辺製薬(株)創薬研、³CREST JST

細胞内カルシウム濃度の攪乱やoxidative stress等各種細胞ストレス下では、小胞体(ER)内でのタンパク質の折りたたみに異常を生じ、折りたたみが不完全なタンパク質(unfolded protein)がER内に蓄積する。unfolded proteinの過剰な蓄積は細胞死を導くことから、生体はその防御機構として、異常なタンパク質をセンサー分子が感知し、分子シャペロン群の転写、翻訳を促進するシステムを活性化する。この系におけるセンサー分子として哺乳類では、IRE1 α 、IRE1 β が最近クローニングされた。我々はヒトIRE1 α の一部に高い相同性を示すマウスESTクローンをデータベース検索により見出し、これをプローブとしてライブラリースクリーニングを行うことにより、ヒトIRE1 α とアミノ酸レベルで約90%の相同性を示すマウスIRE1 α をクローニングした。本演題では中枢神経系におけるIRE1 α mRNAの発現解析と、培養細胞を用いた機能解析について報告する。

P2-17

Cdk5欠損マウス及びCdk5活性化サブユニットp35欠損マウスの生化学的検討

大島 登志男^{1,2}、Veeranna³、H. C. Pant³、
御子柴 克彦¹、A. B. Kurkarni²

¹理化学研究所・脳科学総合研究センター・発生神経生物研究チーム、²GTF, NICDR、³LN, NINDS

Cdk5は他のcyclin-dependent kinaseと高い相同性を有するが、活性化のサブユニットp35及びp39が神経細胞に特異的に発現しており、Cdk5キナーゼの神経細胞特異的な機能が推定された。*in vivo*でのCdk5キナーゼの機能を明らかにするためCdk5^{-/-}、p35^{-/-}マウスを作製しその表現型を解析した。Cdk5^{-/-}マウスは出生前後で致死であるのに比し、p35^{-/-}マウスはadultまで成長し、一部がけいれん発作のためと思われる致死を示した。Cdk5^{-/-}マウスでは皮質層構造異常が脳、小脳、海馬、嗅脳において認められた。p35^{-/-}マウスでは、脳で皮質層構造異常が認められたが、小脳、海馬、嗅脳における異常は極めて軽度であった。これらの皮質層構造の異常は、BrdUによるラベリングの実験などから、脳皮質において本来のinside-outとは逆転した皮質層構造が神経細胞のmigrationの異常により起きる事が明らかになった。またCdk5^{-/-}マウスの小脳においては、プルキンエ細胞のmigrationが障害され、プルキンエ細胞層は形成されなかった。Cdk5キナーゼ活性はCdk5^{-/-}脳では検出感度以下であったが、p35^{-/-}脳では野生型コントロールの5-10%の残存活性が認められた。*in situ* hybridization法によりp35とp39の発現パターンを胎生期の脳で検討したところ、脳皮質を除き両者の発現はほぼ重複していたが、脳皮質においては胎生14日から16日においてp35のみが発現していた。以上の結果から、p35^{-/-}マウスがCdk5^{-/-}マウスに比べて軽症であるのは、Cdk5/p35の欠損をCdk5/p39が機能的に補ったためと考えられた。しかし、Cdk5/p35とCdk5/p39が機能的に全く同一であるかは今後検討すべき課題である。

P2-18

PC12D細胞におけるM1ムスカリン性アセチルコリン受容体の刺激による前初期遺伝子 *zif268* の発現誘導: 低分子量G蛋白質Rhoの役割

平林 敏行、David Saffen
東京大学医学部神経生化学教室

我々は以前、PC12D細胞においてM1ムスカリン性アセチルコリン受容体(M1 mAChR)の刺激によって前初期遺伝子 *zif268* 遺伝子の発現が迅速に誘導されることを報告した(Ebihara, T. and Saffen, D. (1997) J. Neurochem. 68, 1001-1010)。本研究では、M1mAChRの刺激による *zif268* プロモーターの活性化と、その活性化におけるRhoの関与を調べた。

その結果、PC12D細胞においてM1 mAChRの刺激により、*zif268* 遺伝子のプロモーター上にある4つのserum response element (SRE)が活性化され、その活性化は、低分子量G蛋白質Rhoを特異的に不活性化する菌体外酵素C3によって顕著に阻害されることが示された。また、加えるC3の量を変化させて *zif268* SREの活性化に対する影響を調べた結果、過剰量のC3を細胞に加えても *zif268* SREの活性化が3割程度残ることが示された。さらに、この残りの成分は不活性化型(N17)Rasの大量発現によってほぼ完全に阻害された。これらの結果から、M1 mAChRの刺激による *zif268* SREの活性化はRho依存性の成分とRho非依存性の成分から成り、Rho非依存性の成分はRasに依存することが示唆される。

一方、これまでの研究により、Rhoは活性化に伴って細胞質画分から膜画分へ移行することが示されてきた。我々はM1 mAChRの刺激によるRhoの活性化を調べるためにRhoの膜移行を測定した。その結果、M1 mAChRの刺激により、15分以内にRhoの膜移行が誘導された。この結果は、M1 mAChRの刺激によって1時間以内に最大となる *zif268* 遺伝子の発現にRhoの活性化が関与しているという仮説を支持するものである。

以上の結果から、M1 mAChRの刺激によりRhoが迅速に活性化され、Rasと独立のシグナル伝達を経て、SREを介した *zif268* 遺伝子の発現に関与していることが示唆される。

P2-19

PC12細胞におけるMAPキナーゼ経路とプロティンキナーゼA経路のクロストークとニコチン性アセチルコリン受容体の発現調節について中山 均¹、畠中 寛²¹奈良医大・薬理、²大阪大・蛋白研

PC12細胞ではNGFとcAMPはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) α 3mRNAの細胞内レベルを調節する。しかし、NGFとcAMPを起点とする細胞内シグナル伝達系は相互にクロストークしており、その素過程の解析はなかなか困難である。本研究では主にPC12h細胞を用い、NGFとcAMPを起点とする細胞内シグナル伝達系のなかでCREBとMAPキナーゼ (ERK1, 2)のリン酸化を中心に両系のクロストークとそれが α 3mRNAの発現に及ぼす役割について解析した。

PC12h細胞は5%牛準胎児血清、5%馬血清を含むDMEM/ Ham12 培地を用いて、コラーゲンコートしたディッシュ上で培養した。NGFまたはCPTcAMPでPC12h細胞を刺激すると、リン酸化CREB (P-CREB)とリン酸化ERK (P-ERK) がほぼ同程度検出されたが、P-ERKの方が長時間持続した。一方、CPTcAMPでPC12h細胞を刺激するとP-CREBもP-ERKも検出されたが、P-CREBのレベルの方がP-ERKよりはるかに高かった。PC12h細胞の α 3mRNAはNGFによりRas経路を介したアップレギュレーションを受ける。また、CPTcAMPによりAキナーゼを介したダウンレギュレーションを受ける。そこで、PC12h細胞にCPTcAMPを添加した時にP-CREBレベルがほぼピークに達した添加1時間後と、著しくP-CREBレベルが減弱した6時間後に培養液からCPTcAMPを除去した。その後、CPTcAMPを含まない培養液で培養を1日または3日間続けたところ、何れの場合も α 3mRNAはコントロールの80~90%まで回復したので、 α 3mRNAをダウンレギュレーションするにはCPTcAMPは培養液にいれ続ける必要があった。

これらの結果から、PC12h細胞では α 3mRNAレベルに関して、Aキナーゼの下流に負の、また、ERKの下流に正の調節因子が存在するものと思われる。また、NGF経路とcAMP経路のクロストークにより各々の効果が減弱されることも示唆された。

P2-20

ラット脳におけるアデニル酸キナーゼアイソザイムの分布井上 幸江¹、山田 康枝²、三浦 公志郎¹、河田 啓介³、松尾 義久³、篠田 晃³、中澤 淳¹¹山口大学医学部生化学第二、²同・薬理学、³同・解剖学第二

アデニル酸キナーゼ (AK) は、ATP、ADP、AMPの相互変換を触媒する酵素であり、細胞内エネルギーの恒常性維持、ATP生産部位から消費部位への高エネルギーリン酸基の転移、細胞膜局所でのATP $\rightleftharpoons$ ADP 変換に寄与していると考えられている。本酵素には、細胞内局在や組織分布の異なる4種類のアイソザイムが存在する。

我々は、これまでに、ラット脳において、AK1 蛋白は、胎仔18日目から現れ、成長にともなって著しく増加すること。一方、AK2 蛋白は、胎仔脳には存在するが、生後消失すること。AK3 蛋白は、胎仔期から次第に増加すること。また、それぞれAK1 蛋白は細胞質、AK2 蛋白およびAK3 蛋白はミトコンドリアの局在することを明らかにした。

本研究では、免疫組織化学法およびin situ ハイブリダイゼーション法により、脳における各アイソザイムの分布を解析した。その結果、成熟ラット脳において、AK1 は、さまざまな部位の神経細胞に発現がみとめられたが、特に、鼻腔の嗅上皮内の嗅神経細胞や小脳のかご細胞に多く存在した。また、嗅球の嗅神経層や嗅糸球体、小脳や歯状回の分子層、三叉神経節も、強く染色された。これらの結果から、AK1 は、ラット脳において特異的な神経の機能や神経細胞の発達に関与していることが示唆された。

P2-21

CaMキナーゼIVによるカルモデュリンのリン酸化

石田 敦彦、亀下 勇、奥野 幸子、木谷 隆子、
藤澤 仁
旭川医科大学第一生化学教室

CaMキナーゼIVは脳と胸腺に豊富に存在するCa²⁺/カルモデュリン依存性の多機能性プロテインキナーゼであり、CREBなどのリン酸化を介して遺伝子発現の調節に関与していることが知られている。今回我々はCaMキナーゼIVがポリリシン依存的に自らのアクチベーターであるカルモデュリン (CaM) をリン酸化することを見いだした。同一条件下でCaMキナーゼIIもCaMを弱くリン酸化したが、CaMキナーゼI、CaMキナーゼキナーゼ、AキナーゼはCaMを全くリン酸化しなかった。CaMキナーゼIVによるCaMのリン酸化にはポリリシンが必須であり、ポリリシンの代わりにポリアルギニンを用いても同程度のリン酸化が観察されたが、プロタミン、スベルミンやリシン/グルタミン酸/チロシン (3:6:1) の混合ポリマーでは全くリン酸化は認められなかった。またリン酸化の程度は用いたポリリシンの分子量が大きい程、顕著であった。リン酸化反応は比較的遅く、128kDaポリリシン10 μ g/mlの存在下に30℃、60分で0.2 mol/mol程度の取込みが見られた。ホスホアミノ酸分析により、スレオニン残基がリン酸化されていることが判明した。フェニルセファロースカラムクロマトグラフィー及びDEAE-NPR HPLCによりリン酸化CaMを単離して調べたところ、コントロールのCaMに比べてリン酸化CaMはCaMキナーゼI・II・IVの活性化能が何れも低下していた。以上の結果はCaMキナーゼIVがCaMを直接リン酸化することでカルシウム情報伝達系を調節している可能性を示唆するものであり、興味深い。

P2-22

PC12細胞および培養小脳顆粒細胞におけるラブフィリン-3Aのリン酸化の解析

古賀 毅¹、板倉 誠^{2,3}、片岡 正和²、
大西 浩史²、関口 真理子²、山森 早織²、
佐藤 一紀²、高橋 正身^{1,2}

¹東大院・総合文化、²三菱化学生命研、³東工大・生命理工

タンパク質リン酸化は神経伝達物質の放出制御において重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細な機構についてはほとんど明らかにされていない。PC12細胞内のcAMP濃度を高めると、Ca²⁺依存的なドーパミンおよびアセチルコリンの放出が促進するが、この促進はcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)の特異的阻害剤であるH-89によって顕著に抑制された。PC12細胞内でcAMP依存的にリン酸化を受けるシナプスタンパク質を³²Piメタボリックラベリング法により検索したところ、SNAREタンパク質や α -SNAP、シナプトタグミンなどでは有意なリン酸化の亢進はみられなかったが、ラブフィリン-3Aが顕著にリン酸化を受けた。

ラブフィリン-3Aは低分子量Gタンパク質rab3Aに結合するタンパク質として同定され、シナプス小胞上に多く存在することが明らかにされている。in vitroにおいてはPKAによってSer234が、Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIによってSer234およびSer274がリン酸化されることが知られている。今回、Ser234がリン酸化されたラブフィリン-3Aを特異的に認識する抗リン酸化ラブフィリン-3A抗体を作成し、イムノブロット法および蛍光抗体染色法によって解析した結果、PC12細胞をforskolinまたはdibutyryl cAMPで処理するとドーパミンとアセチルコリンの放出促進に伴い、細胞内でラブフィリン-3Aのリン酸化が顕著に亢進することが明らかとなった。このリン酸化は、H-89によってほぼ完全に抑制された。また、培養した小脳顆粒細胞をforskolinやdibutyryl cAMPで処理した場合にもラブフィリン-3AのSer234のリン酸化が有意に亢進することが明らかになった。これらの結果をもとに、神経伝達物質放出の制御におけるラブフィリン-3Aのリン酸化の役割について考察する。

P2-23

ヒト羊膜細胞における神経誘導因子の発現とアクチビンA処理によるnoggin誘導

児矢野 聡、桜川 宣男

国立精神・神経センター神経研究所

我々は、ヒト羊膜上皮細胞が多分化能を有する細胞である可能性が強いことを報告した。最近、神経幹細胞、神経前駆細胞マーカー遺伝子の発現が確認したことより、神経幹細胞の存在が示唆されている。一方羊膜細胞は、胚盤葉上葉が二分して形成されることより、発生初期の神経誘導因子の発現について検討した。さらにアクチビンシグナル伝達系の存在について検索したので報告する。

帝王切開分娩より胎盤を入手し、羊膜細胞を既報のごとくに、分離・培養した。なおインフォームドコンセントを行って、施行した。この羊膜細胞についてRT-PCR法により検討を行ったところ、chordin, noggin, follistatin, BMP-4およびアクチビン受容体 (1, 1B, 2A, 2B)のmRNA発現が確認された。つぎに、培養羊膜細胞をアクチビンで処理したところ、nogginの転写レベルでの発現誘導が確認された。BMP-4, chordin, follistatinの遺伝子発現の変化について検討中である。

Xenopus laevisの神経外胚葉はnoggin, chordin, follistatinなどの神経誘導因子のシグナルにより背側に誘導されると言われている。またXenopusでは、chordinとnogginは異なったシグナル伝達系により、アクチビンによる誘導が行なわれることが報告されている。今回我々はヒト羊膜上皮細胞において神経誘導因子 (chordin, noggin, follistatin)、BMP-4およびアクチビン受容体の遺伝子発現を証明した。また培養羊膜上皮細胞をアクチビンにより処理したところ、noggin遺伝子の発現誘導が確認されたことより、羊膜細胞においてアクチビンシグナル伝達系の存在が示唆された。さらにBMP/noggin伝達系の下流に存在する遺伝子の発現変化について検討中である。

P2-24

舌下神経切断により著明な発現上昇の見られる、Rhoファミリー蛋白TC10の神経系細胞における細胞骨格制御作用

田辺 勝久^{1,2,3,5}、立花 太郎¹、山下 俊英²、
蔡 榮浩^{2,3,5}、米田 悦啓²、遠山 正彌^{2,5}、
越智 隆弘³、木山 博資¹¹旭川医大・第一解剖、²大阪大院・医・機能形態学解剖学第二、³大阪大院・医・器官制御外科学、⁵CREST, JST

軸索切断後5日目のラットの損傷舌下神経核cDNAライブラリーを用い、Expressed-Sequence-Tag法とin situハイブリダイゼーション法を使って、軸索損傷時に発現上昇する遺伝子を27個 (4個の未知遺伝子を含む) 同定した。未知遺伝子の全長配列を決定したところ、その内一つはTC10というRhoファミリー蛋白質であった。他のRhoファミリー蛋白質Cdc42, Rac1, RhoAについても、舌下神経損傷後の発現変化を調べたところ、全て発現の上昇が見られたが、TC10の発現上昇は最も著明であった。ラットの脳における発現はCdc42, Rac1, RhoAの強い発現に比して、Embryo及びAdult共に低レベルであった。TC10の活性型cDNAの組換えアデノウイルスベクターを作製し、神経系の培養細胞に感染させたところ、糸状足、板状足、さらには神経突起様の構造物が観察された。以上の結果から、TC10は、末梢神経再生時特異的に、他のRhoファミリー蛋白質と協調して成長円錐の運動を制御していると考えられた。

P2-25

Mevalonate pathwayの酵素であるIPP isomeraseは神経切断後および生直後大脳皮質の神経細胞で発現が上昇する

森原 剛史^{1,2,3}、今泉 和則^{1,3,4}、米田 託成^{1,3}、
田辺 勝久^{1,3}、武田 雅俊²、遠山 正彌^{1,3}

¹大阪大学第二解剖、²精神医学、³CREST・JST、

⁴田辺製薬（株）創薬研

ラット大脳皮質生直後に高発現される遺伝子をDifferential Display法でスクリーニングした。STOP protein、Thymosin beta、doublecortin、IPP isomeraseといった遺伝子群が単離され8週齢に比べ生直後の大脳皮質において高発現していることが確認された。

これらのうちmevalonate pathwayの酵素の一つであるIPP isomeraseは、近年クローニングされたばかりでmRNAレベルの解析はほとんどされておらず、また神経系ではこれまで全く研究がされていないため、今回注目し解析することにした。Northern blotでは大脳皮質において生後第2週にIPP isomeraseは発現量が最高となった。In situ hybridizationでは大脳皮質の各層で最大の発現を生後7日で示した後、減少した。8週齢になると大脳皮質の発現は著減しており、その一方Corpus callosumなどのoligodendrocyteに発現がみられた。これらよりIPP isomeraseは神経細胞の分化およびミエリン化に関与していると考えられた。

神経細胞におけるIPP isomeraseの高発現は樹状突起が著しく伸長する時期に一致したため、つぎに神経突起再生との関連を舌下神経切断モデルを用いて検討した。切断後神経再生中の舌下神経核の神経細胞でIPP isomeraseの発現が誘導されることが示された。

これらの結果より、IPP isomeraseの神経細胞における機能として神経突起の伸長が示唆された。

P2-26

成体ラット顔面神経核運動ニューロン損傷に対するGDNF組換えアデノウイルス・ベクターの保護効果

坂本 剛^{1,2,3}、渡部 和彦¹、大橋 十也¹、
川添 陽子¹、小柳 清光¹、井上 聖啓²、
細谷 龍男³、衛藤 義勝⁴

¹東京都神経科学総合研究所神経病理、東京慈恵会医科大学・²神経内科、³内科第2、⁴小児科/DNA医学研究所遺伝子治療

グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)は運動ニューロンに対して強力な神経栄養活性を有することから、運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対する治療効果が期待されている。これまで、新生仔ラットの末梢神経切除による顔面神経核、脊髄前角運動ニューロンの変性脱落に対して、GDNF組換えアデノウイルス投与が有効であったとの報告がある。本研究では、成体ラット顔面神経核運動ニューロンの変性脱落に対するGDNF組換えアデノウイルスの保護効果について検討した。12週齢Fisher344雄ラットの右顔面神経を引き抜き除去したのち、茎乳突孔にPBSあるいはヒトGDNF組換えウイルス(AxCaHGDNF)、 β -galactosidase (gal)組換えウイルス(AxCALacZ)を注入した。AxCALacZ投与群では、傷害側の顔面神経核運動ニューロンが β -galで明瞭にラベルされ、組換えウイルスによって同ニューロンに外来遺伝子を導入し得ることが示された。RT-PCRでは、引き抜き損傷後AxCaHGDNF投与により傷害側にヒトGDNF mRNAの発現を認めた。顔面神経核を含む脳幹組織では常にGDNF受容体(GFR α 1,Ret) mRNAが検出され、組換えウイルス接種が運動ニューロンでの外来性ヒトGDNFの産生を誘導し、autocrineあるいはparacrineな形で運動ニューロンに対する神経栄養効果が発現されることが考えられた。そこで、引き抜き損傷2-4週後、灌流固定し顔面神経核を含む脳幹の連続切片を作成、Nissl染色ののち顔面神経核の運動ニューロン数を算定した。PBS投与群では障害側顔面神経核運動ニューロンの脱落消失(4週後28.5 $\pm$ 3.9%)とグリオーススを認めたが、AxCaHGDNF投与群では脱落が有意に抑制された(4週後57.8 $\pm$ 4.4%)。なお、組換えウイルス接種に伴う脊髄組織の傷害反応や炎症反応は認められなかった。本研究により、成人における運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対するGDNF組換えアデノウイルスを用いた遺伝子治療の有効性が示唆された。

P2-27

Haloperidol投与ラットにおける神経栄養因子の脳内動態

豊岡 和彦^{1,2}、高橋 誠²、二村 隆史¹、染矢 俊幸²、那波 宏之¹

¹新潟大学脳研究所分子神経生物学分野、

²新潟大学精神医学教室

精神分裂病の成因として神経発達障害仮説が提唱されている。これは脳神経の発達初期に何らかの異常が形成され、それが思春期以降の精神分裂病発症の基盤となるというものである。この場合神経系の発達制御しているとされる神経栄養因子の機能異常が関与している可能性が考えられる。実際分裂病のモデル動物phencyclidine (PCP)投与ラットがあるが、PCPの急性投与を行ったラットの後部帯状回でBDNF mRNAが増加していたとの報告があり、分裂病の病態とBDNFの関係が示唆されていた。そこで今回、定型的神経遮断薬であるhaloperidolをラットに慢性投与し、Two Sites ELISA法にて脳の各部位のBDNFタンパク量を測定した。ラットに3種類 (1~2 mg/kg、30mg/kg、60mg/kg) 用量で4週間投与を行い、5% Hydroxypropyl-methylcellulose (HPMC) 投与コントロール群と比較した。

Haloperidolは帯状回でのBDNFレベルは有意に減少していた。また通常量のHaloperidol投与では前頭葉皮質でBDNFレベルは減少傾向にあったが、過剰量のHaloperidol投与では前頭葉皮質でBDNFレベルは増加傾向にあった。これに対して海馬のBDNFレベルは、明らかな変化は認められなかった。これらのことにより、haloperidolはBDNFの発現を変化させ、またこの作用はPCPがBDNFの発現に対する作用と逆の方向であると推測された。

P2-28

BDNFによる大脳皮質GABAergic神経細胞のAMPA感受性の亢進

永野 忠聖、難波 寿明、大津 洋、武井 延之、那波 宏之

新潟大・脳研・分子神経生物

ラット大脳皮質初代培養細胞に脳由来神経栄養因子 (BDNF) を投与することによりAMPA型グルタミン酸受容体タンパク質の発現量が増加することが知られている。この現象が大脳皮質内の個々の神経細胞に、どのような生理反応を引き起こすかは明らかでない。今回我々は、ラット大脳皮質培養神経細胞標本を用い、GABAergic神経細胞に対するBDNFの効果を観察した。培養1日目から4日間BDNF

(40ng/ml) を投与した群と無投与群の両群において、顕微鏡下で形態的にGABAergic神経細胞と認められる細胞に対し、AMPA (100 μ M) 及びNMDA

(300 μ M) を局所投与した時の電流量をホールセルパッチクランプ法により測定した。その結果、BDNF投与群ではAMPA電流が6~8倍と顕著に亢進されることが観察された。それに対し、NMDA電流に関しては両群の間に違いは認められなかった。また、免疫細胞化学的二重染色の結果、GABA陽性細胞のGluR1染色性が、BDNF投与により増加する傾向にあった。さらに、高速液体クロマトグラフィーを用い、培養液中にAMPAを投与した際のGABA放出量をBDNF投与群/無投与群と比較しているため、その結果についても報告したい。これらの結果より、BDNFは発達期のGABAergic神経細胞に作用し、AMPA受容体の反応性を増大させると考えられる。

P2-29

BDNF遺伝子発現へのカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの関与

竹内 有輔^{1,2}、山本 秀幸¹、宮川 太平²、
宮本 英七¹
熊本大・医・¹第一薬理、²神経精神

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は中枢神経系に多量に存在し、神経細胞の分化、生存維持に関与するニューロトロフィン的一种である。細胞内Ca²⁺増加に伴うBDNFの発現には、各種阻害剤を用いた実験から、カルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMキナーゼ) の関与が示唆されている。前回、私達はCaMキナーゼIIのデルタサブユニットが小脳の顆粒細胞の細胞質と核内に存在することを見出した。またRT-PCR法により、小脳からデルタ1と核移行シグナル (NLS) を持つデルタ3をクローニングした。これらをNG108-15細胞に発現させると、デルタ1は細胞質に、デルタ3は核内に局在した。今回、細胞内カルシウム増加に伴うBDNF遺伝子の発現について、NG108-15細胞におけるCaMキナーゼIIの一過性発現系を用いて検討した。BDNFのそれぞれのエクソンを検出するプライマーペアを用いてRT-PCRを行うと、小脳とNG108-15細胞では、BDNFのmRNAの中でエクソンIVを含むBDNF (IV-BDNF) mRNAが多量に発現していた。定量RT-PCR法によりBDNFのmRNAの変化について検討した。野生型のNG108-15細胞を電位依存性カルシウムチャンネルを開口させるBay-K8644で処理すると、III-BDNFとIV-BDNFの発現が増加し、さらにデルタ3を過剰発現する細胞では、IV-BDNFの発現が増強された。デルタ1や活性を持たないデルタ3の変異体を過剰発現する細胞では野生型との間に有意差は認められなかった。免疫細胞染色法によりBDNF蛋白質の変化を検討すると、デルタ3を過剰発現する細胞の細胞質がBDNFに対する抗体で強く染色された。同様にNLSを持つアルファBをNG108-15細胞に過剰発現させるとアルファBは核内に局在し、BDNFの発現が細胞質で増加した。これらの結果より、核内に存在するCaMキナーゼIIがBDNF遺伝子の発現調節に関与することが示唆された。

P2-30

脳由来神経栄養因子 (BDNF) の糖代謝制御における神経系の関与

野々村 健¹、小野 道子¹、土田 敦之¹、
山中 貢¹、板倉 康史¹、中川 勉¹、泰地 睦夫¹、
野口 浩²

¹住友製薬 (株) 総合研究センター、²同・臨床開発センター

BDNFは様々な神経障害に対し保護・再生効果を示すことが報告されている。我々は、BDNFが神経栄養因子としての神経系に対する作用に加えて、糖尿病動物に対して血糖降下作用を示し、糖代謝を制御することを発見した。その後、糖代謝制御に対する作用を詳細に検討し、BDNFがインスリン作用を増強すること、膵臓に対する保護作用を示すことなどを明らかにしてきた。今回、BDNFの糖代謝制御メカニズムの検討から、脳神経系の関与を示唆する知見を得たので報告する。

Leptin受容体を遺伝的に欠損し、高血糖、高インスリン血症を示す肥満糖尿病モデルであるdb/dbマウスに対し、BDNFを末梢 (皮下) 投与すると、血糖降下などの糖代謝制御作用が認められる。BDNFの受容体であるtrk Bは、脳における発現が高いことが分かっているが、インスリンが作用し糖代謝制御に直接的に関与する肝臓や筋肉などの組織における発現は明確ではない。そこで私たちは、BDNFの中枢神経系 (脳) を介した作用の有無を検討する為に、BDNFをdb/dbマウス脳室内に投与した。摂食に対する影響を排除する目的から、我々の開発した同期方式ベレット供給装置を用いて厳密なベアフィードを行い、糖代謝制御作用を解析した。その結果、BDNFをdb/dbマウスに対して脳室内投与すると、摂食量が低下するものの、ベアフィード群と比較して有意な血糖降下作用を示すことが明らかになった。その血糖降下作用は投与を休止した後も持続した。また、BDNF投与群の膵臓中のインスリン含量の上昇も観察された。さらに、ベアフィード群では摂食量低下に伴い体温低下が認められるが、BDNFを脳室内投与したdb/dbマウスでは、この体温低下が抑制されることが分かった。以上の結果から、肥満糖尿病モデル動物に対するBDNFの糖代謝制御作用は、中枢神経系 (脳) を介するものであることが分かり、さらに、その作用には自律神経系の制御が関与していることが示唆された。

P2-31

糖尿病によって誘発される中枢神経機能障害に対する4-メチルカテコールの保護効果

鈴木 宣雄、新田 淳美、古川 昭栄
岐阜薬科大学分子生物学教室

近年、糖尿病が痴呆のリスクファクターとしてあげられているが、その原因や理由についての詳細な研究はほとんどなされていない。我々はストレプトゾトシンによって誘発された糖尿病モデルラットで中枢神経機能障害が起こることを見出し、BDNFの発現減少がその原因の一つであることを示唆している。さらに高グルコース (50mg/ml) 存在下で培養したラット海馬ニューロンにアポトーシスやBDNFの発現減少が誘発されるが、BDNFを添加するとアポトーシスが抑制されることを確認している。すなわち、糖尿病に伴う中枢神経機能障害はBDNFによって防御または改善できる可能性があると考えられる。しかしながらBDNFのようなタンパクは血液-脳関門を通過できず、血中でも不安定であるため末梢投与したBDNFに、脳での機能を期待することはできない。そこで本研究では *in vivo* 及び *in vitro* でBDNFの発現を増加させる作用をもつ4-メチルカテコール (4-methylcatechol; 4-MC) について糖尿病や高グルコースによって誘発される神経機能障害やニューロン死に対する効果を検討した。高グルコース条件下で培養した海馬ニューロンは4-MC (0.5mM) を添加すると、アポトーシスが抑制された。一方、糖尿病モデル動物の腹腔内に4-MC (100 μ g/kg/day) を一ヶ月間投与したところ、BDNF及びニューロン機能タンパクの減少がそれぞれ抑制され、糖尿病モデル動物に見られる馴れ行動試験法での学習障害が有意に改善された。以上の結果から4-MCは末梢から脳に移行し脳内でBDNFの発現を増加させ、糖尿病で誘発される中枢神経機能障害に対して防御的に働いていたと考えられる。

P2-32

歯周組織由来培養細胞における神経栄養因子とその受容体のmRNAの発現

篠原 弘明、吉野 宏、藤岡 大助、栗原 英見
広島大学歯学部歯科保存学第二講座

近年、神経栄養因子が末梢神経の標的細胞である非神経脂肪や免疫担当細胞によって産生されていることが明らかとなってきた。そこで我々は神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3) およびそれぞれの受容体であるTRKA, TRKB, TRKCのmRNAのヒト歯根膜細胞 (HPDL)、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、ヒト歯髄細胞 (HPC)、およびヒト歯肉上皮細胞 (HGK) における発現をRT-PCRサザンハイブリダイゼーション法を用いて検索した。

それぞれの細胞は健常者より得たものを、通法に従って培養し、上皮細胞は3代継代したもの、線維芽細胞は5から8代継代したものから細胞を回収し、RNAを抽出した。逆転写した後、半定量的PCRをそれぞれのプライマーを用いて24サイクル行った。PCR産物をvectorにライゲーションし、大腸菌へ導入し、培養後、プラスミドを精製した。cDNA断片はシークエンスを行い、目的の産物であることを確認した。全てのPCR産物は32Pでラベルし、ハイブリダイゼーションを行った。その後、得られたバンドの放射活性はBAS2000イメージングアナライザー (Fujix Co.) によって測定した。

その結果、全ての細胞において、NGF、BDNF、NT-3およびそれらの受容体のmRNAの発現を認めた。しかし、細胞種によってそれらの発現量は様々であった。すなわち、神経栄養因子であるNGFはHPCに、BDNFはHPDLに、NT-3はHPDLおよびHGFに多く発現していた。一方、受容体であるTRKAはHPDLに、TRKBおよびTRKCはHGFに多く発現していた。それぞれの細胞における神経栄養因子と対応する受容体の発現には必ずしも相関は認められなかった。このことは、歯周組織における神経栄養因子が各種細胞間でparacrineによって作用している可能性を示唆している。

これらの結果は、骨芽細胞、破骨細胞、Tリンパ球にも神経栄養因子やそれらの受容体の発現を認めることなどを考え合わせると、歯周病においても神経栄養因子が歯周組織の破壊あるいは再生にそれぞれ場で何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

P2-33

上頸神経節細胞におけるNT3受容体-GDNF受容体の発現調節と相互作用

小林 三和子、松岡 一郎
北海道大学大学院・薬学研究科

成熟した上頸神経節細胞 (SCGニューロン) は、TrkA受容体を発現し神経栄養因子(NGF)に依存して生存する。しかし、分化初期のSCGニューロンはNT3受容体 (TrkC) やGDNFに対するシグナル伝達受容体 (Ret) も発現している。またKOマウスの表現型から、NT3とGDNFもSCGニューロンの生存と分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで今回、SCGニューロンに対するNT3とGDNFの作用を培養下で検討した。

胎生17日目のラットより摘出したSCGニューロンのNT3またはGDNF単独存在下での生存率はそれぞれ20%、10%であった。ところがNT3とGDNFの共存下で培養すると生存率は80%以上となり、両者の間には相互増強作用があることが明らかになった。さらにNT3とGDNFで刺激したSCGニューロンにおけるAktのリン酸化レベルは、単独刺激時に比べて顕著に高いことも確認された。PI3K阻害剤(LY294002)の効果より、NT3とGDNFにより生存しているSCGニューロンはNGFと同様に、PI3K/Aktを介する経路により生存を維持していると考えられる。NT3とGDNF作用の相互増強の機構を明らかにするためにRetのチロシンリン酸化のレベルを調べた。その結果、GDNFによるRetのチロシンリン酸化はNT3によって顕著に増強されることが明らかになった。

一方、われわれはBMP2とレチノイン酸がTrkCの発現を誘導することを報告している。今回これらの因子のGDNF受容体発現に対する効果を調べたところ、レチノイン酸は、GDNF特異的受容体、GFR α 1およびRetのmRNAレベルを、それぞれ4倍、1.5倍に増加させた。またBMP2は単独では受容体の発現に変化を与えなかったが、レチノイン酸のGFR α 1誘導能を増強した。

これらの結果からSCGニューロンの分化過程において、BMP2とレチノイン酸はNT3およびGDNFに対する受容体の発現を誘導し、両神経栄養因子は受容体の相互作用を通じて効果的に生存を維持するというシナリオが考えられる。

P2-34

bFGFの脳室内投与による細胞分化異常とその解析

大宮 誠、新田 淳美、古川 昭栄
岐阜薬科大学・分子生物学教室

脳の未分化幹細胞は発生初期に活発に増殖し、移動しながら分化し脳神経系を構築してゆくが、この過程で神経栄養因子が重要な役割を担っていると考えられている。そこで演者らは塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) に着目し胎仔の脳室に直接投与することで脳形成にどのような影響を及ぼすかを解析した。bFGF投与群では出生後に脳室が拡大し水頭症様の病態が出現することを見出した。免疫組織化学的に解析すると、脳室周囲層に小型のMAP2陽性、GFAP陽性細胞が多数認められた。また、神経幹細胞のマーカーであるネスチンは脳室周囲を含めた大脳皮質全体で発現が認められた。また、神経前駆細胞に特異的に発現するはずのHuタンパク質も分化した神経細胞、グリア細胞に発現するようになった。驚いたことに、アストロサイト様の形態をもつ多数のTH陽性細胞が大脳皮質全体に広く分布していた。

以上の結果から、bFGFは大脳皮質形成過程において未分化幹細胞に作用しタンパク質発現を調節することによって神経細胞やグリア細胞の分化を適切に誘導する役割をもつことが示唆された。また、大脳皮質中に本来発現していないはずの、時期特異的、細胞特異的なタンパク質の陽性細胞が数多く認められたことから、神経細胞、グリア細胞での細胞特異的発現を決定する転写因子の調節に関与している可能性も示唆された。

P2-35

培養マウス小脳顆粒細胞の生存と生存支持因子の性質

藤川 直人、小倉 明彦
大阪大・院理・生物

活動依存的なニューロン生存についての機構解析には、培養ラット小脳顆粒細胞 (CGC) の系がしばしば利用される。このニューロンは通常の低 K^+ 培地 (5 mM K^+ を含む) では長期に生存できず、 K^+ を強化して脱分極状態にしてはじめて生存する。遺伝子改変動物での解析の準備として、これをマウスで再現しようとしたところ、意外にもマウスでは事情が複雑で、C57Bl系マウスCGC (CM-CGC) はラットCGCと同様だったが、Balb-C系マウスCGC (BM-CGC) は低 K^+ 培地中でも生存した。これを、BM-CGCが生存因子を放出しているためと考え、BM-CGCとCM-CGCとを混合して培養したところ、果たして低 K^+ 培地中でCM-CGCも生存した。また、孔径0.2 μm のフィルターで上下に隔てて培養してもBM-CGCはCM-CGCの生存を支持した。しかし、BM-CGCの条件培地には効果がなかった。したがって、想定される生存因子は極めて不安定か、放出後溶存せず細胞外基質等に結合して作用するかのいずれかと考えられる。

BM-CGCが低 K^+ 培地中でこの因子をシナプス活動依存的に放出するの否かを知るために、 Ca^{2+} イメージング法で自発的活動を調べたが、CM-CGCやラットCGCと同程度の低いレベルの自発的活動しか見られなかった。また、培地にテトロドトキシンを添加して自発的シナプス活動を完全に抑えてもBM-CGCは生存した。したがってこの因子は活動非依存的に (構成的に) 放出されていると考えられる。なお、NGF、BDNF、NT3はCM-CGCの生存を支持しなかった。条件培地が無効なことから、生化学的な分画は困難と思われるので、培養下で想定因子を分画する新しい方法を考案した。

阪大遺伝研岡部勝博士、阪大院理富永恵子博士の助力・助言に深く感謝する。

P2-36

老化促進モデルマウス (SAMP8) の海馬における海馬由来神経刺激因子 (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide: HCNP) の加齢変化 (免疫組織学的検討)

湯浅 浩之、松川 則之、片田 栄一、小鹿 幸生
名古屋市立大学医学部第二内科学

海馬由来神経刺激因子 (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide: HCNP) はラット海馬可溶分画から単離、精製されたペプチドである。内側中隔核のコリンアセチル転写酵素 (ChoAT) 活性を増加させることにより、長期増強を調節して記憶形成に重要な役割を果たしていると考えられている。我々は今までに、ラット神経組織中のHCNPおよびHCNP前駆蛋白は新生仔期に最も多く加齢とともに減少する事、また学習記憶障害が早期に出現するSAMP8ではその正常対照であるSAMR1に比べ海馬にHCNPが多量に蓄積し、HCNP mRNAの発現がP8で優位に増強していることについて報告した。

今回、SAMP8の海馬におけるHCNPの加齢変化を免疫組織学的に検討した。胎生18日から生後8月齢の各時点においてSAMP8を左心室から0.01M PBSで灌流後、4% paraformaldehyde、0.1M phosphate bufferで灌流固定し、脳を取り出した。5mm幅に冠状断としBouin液で6時間浸漬固定後、脱水、パラフィン包埋した。5 μm 厚で薄切し、一次抗体として精製抗HCNP抗体 (ウサギ) を二晩反応させ、ABC法を行いDABで可視化した。胎生18日では特異的陽性細胞はみられず、1週齢では海馬錐体細胞 (Py) は染色されないが、上昇層 (Or)、放射状層 (Ra) と網状分子層 (LM) において多数のgliaが陽性であった。3月齢ではCA3-CA4のPyが強陽性でありCA1のPyとその頂上樹状突起も陽性であった。この時期には陽性のgliaは1週齢に比べ減少していた。8月齢ではCA3-CA4のPyは3月齢と差がなかったがCA1のPyは弱陽性であった。3月齢以降の海馬CA3にHCNPが蓄積している事実は、学習記憶障害が出現するこの時期の内側中隔核でのアセチルコリン減少に対し、ChoAT活性を増加させるHCNPの産生が亢進している、という仮説を示唆させるものであった。

P2-37

ACTH₁₋₂₄がアストロサイトの神経栄養因子遺伝子発現に与える影響

小久保 稔^{1,2}、浅井 清文²、青山 峰芳¹、
森川 将行²、河合 洋子²、和田 義郎¹、加藤 泰
治²

名古屋市立大学・医学部・¹小児科、²分子医学研究所
生体制御部門

〔目的〕小児の年齢依存性てんかんである点頭てんかんの治療には、ACTH₁₋₂₄が使われているがその作用機序は未だ不明な点が多い。今回我々は、ACTH₁₋₂₄がアストロサイトに作用しその治療効果を表している可能性があると考え、培養ラットアストロサイトにACTH₁₋₂₄を投与し、アストロサイトが発現する神経栄養因子NGF、BDNF、NT-3、CNTF mRNAの変化について検討した。

〔方法〕胎生20日のWister ratよりNakanishiらの方法でアストロサイトの初代培養を行った。継代2代目でコンフルエントの状態にて無血清培地に変え、その上でACTH₁₋₂₄で刺激した。一定時間経過後にRNAの抽出を行い、RT-PCRにてNGF、BDNF、NT-3、CNTF mRNAの変化を調べた。また、CNTF mRNAについては、ノーザンブロットで確認した。

〔結果〕RT-PCRでは、CNTF mRNAの低下がみられたが、NGF、BDNF、NT-3 mRNAの変化はなかった。ノーザンブロットで確認したところ、ACTH₁₋₂₄刺激後4時間、10 nM以上でCNTF mRNAの低下がみられた。アストロサイトをACTH₁₋₂₄で刺激するとcAMPが上昇するといわれているが、PKAの阻害剤であるH-89ではCNTF mRNAの低下は抑制されなかった。生体内ではACTH₁₋₂₄投与でグルココルチコイドが上昇するが、培養ラットアストロサイトをDexamethazone 1 μ Mで刺激したところ、NT-3 mRNAの上昇がみられた。

〔考案〕ACTH₁₋₂₄投与は、直接および間接的にアストロサイトの神経栄養因子遺伝子発現に影響を与えている可能性があると思われる。

P2-38

海馬ニューロンにおけるIGF1 mRNA発現とestrogen

新郷 明子、鬼頭 昭三、櫻井香織
兵庫大学附属研究所

我々は傷害脳の海馬及び大脳皮質で、estrogenによってIGF-1 mRNA発現が誘導されることを認めているが、この反応の情報伝達経路については不明である。最近、estrogenに対する特異的結合部位が細胞膜上にもあり、G蛋白-cAMP系と共役していることが推定されており、これに伴って、estrogenのnon-genomicな作用とgenomicな作用との間のcross-talkが注目されている。本研究では、ラット胎仔海馬ニューロンを不死化させたH19-7細胞を用いて、実験を行った。第1段階として、H19-7細胞でのestrogen受容体の存在を、in situ hybridizationによって確認した。H19-7細胞のestrogen受容体は、estrogenを加えることによってup-regulationを示した。H19-7細胞にestrogenを加えるとIGF-1 mRNAの発現が誘導され、さらにこの発現はH-8を加えることによって抑えられたが、tamoxifenでは影響を受けなかった。さらに、H19-7細胞にestrogenを加え、gel shift assayによってAP-1結合活性及びCREB結合活性が上昇する事を認めた。

本研究は喫煙科学財団の助成によりなされたものである。

P2-39

Troglitazoneの運動神経細胞に対する神経栄養因子活性

西嶋 千晶、木元 克輔、荒川 義弘
東京大学医学部附属病院分院薬剤部

脳由来神経栄養因子 (BDNF) やインスリン様成長因子-I (IGF-I) の活性にPI-3キナーゼが重要な役割を示すことが明らかとなってきた。一方、糖尿病におけるインスリン抵抗性を改善する薬である troglitazone (TGZ) は、その活性の機序は十分に明らかではないもののPI-3キナーゼの活性化を生じることが知られているため、運動神経細胞等の培養系を用いて神経栄養因子活性について検討した。

TGZ、同じくインスリン抵抗性改善薬である pioglitazone (PGZ)、およびTGZの構造の一部でありビタミンEの基本骨格でもある 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol (chromanol) の3化合物について、運動神経細胞に対する生存効果をラット15日胚運動神経細胞の初代純粋培養系にて評価したところ、培養3日後で対照群(約40%生存)に比し、TGZに最大約85%の生存を支持する活性が見られ、一方PGZでは生存活性は見られず、chromanolではわずかな活性が見られた。TGZの生存活性は、知覚神経など他の神経細胞では明確に見られず、ラット運動神経細胞にかなり特異的な活性であることが分かった。また、ラット運動神経細胞を用いて、IGF-Iをはじめ他の既知因子との組み合わせによる効果についても評価を行った結果、TGZはIGF-Iとの組みあわせで、相加的な効果を示し、その他の因子の中にも、相加的または相乗的な効果が見られるものがあった。また、一方、BDNFやneurotrophin-3では相加効果は見られなかった。TGZおよびIGF-Iによる活性はPI-3キナーゼ阻害剤であるLY294002やwortmanninにより抑制された。

今回の研究でTGZがラット運動神経細胞に対しBDNF等の神経栄養因子に匹敵する強い生存活性を示すことがわかった。TGZの活性がどのような機序に基づくものであるかは、現在のところ不明であるが、低分子化合物で特異性が高ければ、ALS治療等への応用が可能と思われる。

P2-40

ミクログリアの活性化とプロテインキナーゼC

中嶋 一行^{1,2}、本田 静世²、
Lopez-Redondo Fernando²、中村 泰子²、栗原 正¹、
高坂 新一²

¹創価大学生命科学研究所神経化学、²国立精神・神経センター神経研究所代謝

ミクログリアは脳の傷害時および疾患時活性化され、食食細胞や抗原提示細胞として作用すると考えられている。また様々な生理活性物質の産生を行うことにより、神経の変性や修復・再生過程に大きな影響を与える可能性も示唆されている。しかし、このような生体内におけるミクログリア活性化の誘導メカニズムには不明点が多く残されている。

本研究では、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) をミクログリア活性化の指標としてとりあげ、その反応に関わる細胞内シグナル伝達系の解析を行った。uPAはラット顔面神経切断系においてミクログリアの活性化に伴い誘導される分子のひとつである。これまでの検討の中で、比較的高濃度のニューロトロフィン (NT) がuPAの産生を誘導することから、この反応にはNTの低親和性レセプターを介したスフィンゴミエリン代謝系の関与が推測されてきた。実際、スフィンゴミエリンの代謝物であるセラミドを培養ミクログリアに添加すると濃度依存性にuPA産生を増加させることがわかった。また、このセラミドの作用を支持するように、スフィンゴミエリナーゼ処理も同様にuPAの産生を促進させた。しかし、この時、c-Jun N-terminal kinase (JNK) やp38などのMAPキナーゼおよび転写因子であるNFκBの活性化は認められなかった。その一方で、protein kinase c (PKC) の特異的阻害剤であるBisindolylmaleimideはNTおよびセラミドによるuPA産生を濃度依存性に阻害した。

以上の結果より、ミクログリアのuPA産生を伴う活性化には、JNKやp38などのMAPキナーゼおよびNFκBは直接関与せず、PKCの関与が強く示唆された。実際に作用しているPKCのサブタイプとしては、PKCα、PKCδおよびPKCεの可能性が推測されている。

P2-41

周期変動性キナーゼ(Pfk)による BMAL1/CLOCK転写制御系のリン酸化

田丸 輝也・高松 研
東邦大・医・第2生理

哺乳動物の行動を支配する概日リズムの中核は、視床下部の視交叉上核(SCN)に位置する。我々は、SCN核抽出液中に日周期に伴い活性変化するユニークな3種類のSer/Thrキナーゼ(Periodically fluctuating kinase: Pfk: p45、p100、p200)を見出し、とくに概日時計遺伝子の転写制御系との関連性について検討している。

p45Pfkの生体内基質の候補として、概日時計遺伝子産物CLOCK蛋白質がSer/Pro残基の多い領域を高度にリン酸化されることを認めている。そこで今回、p45PfkのBMAL1 (CLOCKと転写複合体を形成する)蛋白質に対するリン酸化活性について検討した。マウスBMAL1の全長を GST-BMAL1(105kDa)融合蛋白質として、Baculo-virus transfer vectorに組み込み、Sf9細胞で発現させた。glutathione Sepharoseによるpull-down assayの結果、精製した GST-BMAL1は、in vitro 翻訳系で合成したマウスCLOCKとの結合活性を保持していた。GST-BMAL1 は、脳からほぼ均一にまで精製したp45Pfkにより、強くリン酸化された。これらのことから、p45PfkはCLOCK、BMAL1の両方をリン酸化することにより、概日時計関連遺伝子転写制御系を上流で修飾している可能性が強く示唆された。

P2-42

マウスBMAL1遺伝子の3種のスプライスバリエーションとゲノム構造の解析

余 旺節¹、池田 正明¹、安倍 博²、本間 さと²、海老澤 尚³、山内 俊雄³、本間 研一²、野村 正彦¹

¹埼玉医大・第一生理、²北海道大・医・統合生理、³埼玉医大・精神科

当研究室によって、ヒト脳ライブラリーから初めてクローニングされた遺伝子BMAL1はbHLH-PAS型転写因子の一つであり、生体リズムにおいて、重要な役割を担っていることが最近明らかになった。BMAL1のサーカディアンリズム発振機構における分子メカニズムを解析するため、マウス脳cDNAライブラリーよりマウスBMAL1 cDNAをクローニングし、3種のスプライスバリエーションを単離した。またマウスBMAL1遺伝子の翻訳領域ゲノム構造を解析し、その構造を明らかにした。

3種のバリエーションの中で、mBMAL1bの翻訳領域は1878塩基からなり、626アミノ酸をコードすると予想されている。mBMAL1b' の翻訳領域の塩基数は1896であり、21bpのエクソン2が挿入される結果、7アミノ酸が挿入されることになり、さらにイントロン9とエクソン10のジャンクションにおいてアクセプターの利用され方が異なるためアラニンが欠落し、全アミノ酸は632残基となる。mBMAL1g' はmBMAL1bと比較するとATGから460~487塩基の28bpが欠落しており、この領域はPAS Aドメインをコードしている直前である。この欠落のためフレームシフトが起こり、mBMAL1bの695塩基の位置がストップコドンとなる。このためmBMAL1g' は222アミノ酸をコードするペプチドと考えられ、両PASドメインを欠落した構造を持つことが予想された。組織発現の違いやアミノ酸配列の違いから、これらのスプライスバリエーションは異なる機能を有するものと考えられた。

直接シーケンシング法によりmBMAL1 ゲノムクローニングの塩基配列を決定した結果、翻訳領域は32kbの長さがあり、17のエクソンより構成されることが明らかになった。他のbHLH-PAS型転写因子を比較したところ、BMAL1とAhrのイントロン/エクソン スプライスパターンが極めて類似していることはわかった。これら2つの遺伝子は同じサブクラスに属し、また共通の遺伝子から発生したことを示唆された。

P2-43

ラット海馬スライスにおける化学的長期増強による脂肪酸及びAcyl-CoAの遊離

張 勤増、酒井 久美子、吉田 敏
大分医大実験実習機器センター

シナプスの長期増強 (long-term potentiation, LTP) についてアラキドン酸 (AA) や一酸化窒素、PAFなどが逆行性メッセンジャーとして知られている。アシル-CoA (Acyl-CoA) は脂質代謝における重要な中間体として働いているが、以前の実験で20:4-CoAなどのacyl-CoAsを海馬スライスに加えると、スライスからのグルタミン酸の遊離が観察できた。今回我々は海馬シナプス内の化学的長期増強において、海馬スライス内 acyl-CoAs 及び遊離脂肪酸の変動に関して検討した。

LTP誘導剤としての Tetraethylammonium chloride (TEA) 25mM を用いて、ラット海馬スライスに加えると、LTP が発現される。2分間、5分間、10分間、15分間、20分間刺激されたスライスのacyl-CoA は oligonucleotide purification cartridge (OPC) により精製し、HPLC で測定した。同時に GCMS でFree fatty acid (FFA) 量を測定した。2分、5分間刺激されたスライスの中のFFAは減少したが、さらに、10分~15分刺激後スライスの中の FFA は増加し、脂肪酸の種類によって出現の位相に差があった。20分間刺激されたスライスの中のFFAはコントロールと比較して減少傾向にあった。しかし、各時間で刺激されたスライスの中のアシル-CoAはコントロールと比較してこの刺激条件下では量のばらつきが大きかったが、2分間刺激したスライスの中の18:0-CoAと20:4-CoAは18:1-CoAに比べ有意に増加していた。これらの結果により、化学的長期増強刺激によって異なるホスホリパーゼが異なる時系列で活性化しFFAの生成が速やかに起こっていることが示された。一方、Acyl-CoA刺激初期には一過的に20:4-CoAと18:0-CoAが増加するが、その後はリン脂質等への取り込みが進むので、遊離脂肪酸ほどの変化としてはあらわれていない可能性がある。

(TEAによる海馬のLTP測定で熊本大学医学部 劉潔、福永浩司両先生に感謝する。)

P2-44

海馬CA1錐体細胞の活動とhippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) 前駆蛋白mRNAの発現

岩瀬 環¹、松川 則之¹、西野 仁雄¹、
岡田 秀親¹、山本 孝之²、小鹿 幸生¹

¹名古屋市立大学・医学部、²福祉村病院・長寿医学研究所

海馬由来神経栄養因子hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)は、新生児ラット海馬から精製・構造決定されたコリン作動性神経栄養因子の一つで、23KDaの前駆蛋白 (HCNP precursor protein) に由来するアミノ酸11個からなるペプチドである。海馬神経細胞の活動は、Long-term potentiation (LTP)などのシナプスの可塑性 (synaptic plasticity) および、記憶の有力なモデルである。NGFやBDNFなどの神経栄養因子が学習記憶機構に重要な働きをすることが示唆されているが、今回、海馬スライスにおいて、Schaffer側枝を電気刺激することによりCA1錐体細胞の活動電位を誘発したもので、さらにテタヌス刺激によりLTPを誘導したもので、in situ hybridizationを用いてHCNP前駆蛋白mRNAの発現量を検討したところ、活動電位を誘発したものおよびLTPを誘導したものの双方でCA1領域で発現が増加するという結果が得られた。NMDA受容体アンタゴニストのD-2-amino-phosphonovaleric acid (APV)ではこのHCNP前駆蛋白mRNAの発現量の増加は阻害されなかった。HCNPの海馬神経細胞からの放出は、NMDA受容体刺激を介する機序であることがわかっているが、前駆蛋白mRNAの発現量の調節は別の機序である可能性が示された。

P2-45

マウスの動機づけにおよぼすhaloperidolの効果：連続強化スケジュールと摂食量による検討

堀 耕治、野村 正彦
埼玉医科大学第一生理

累進比率 (progressive ratio) 強化スケジュール下のマウスの反応停止点 (breaking point) は haloperidol (0.025-0.1mg/kg) によって用量依存的に低下するが、継続反応率 (running rate) は用量と無関係にはば一定の水準で維持されることをわれわれは報告した。このことは、当該の用量域における haloperidolは、運動系に対する影響よりも、いわゆる動機づけに対する影響の方が強いことを示唆する。今回の報告は、以上の効果がただ単に食動因の低下によるものかどうかを、連続強化スケジュールと摂食量によって検討したものである。

連続強化スケジュール：自由摂食時体重の85%に体重を維持したddYマウスを被験体として用いた。装置として、タッチセンサーによって反応プレートに対する接触反応が検出できるオペラント箱を用いた。1日40強化（強化刺激は20mg餌ペレット）からなる連続強化スケジュール訓練を、安定した反応が得られるまで連日訓練した後、haloperidol（腹腔内投与、0.025-0.1mg/kg）テストをおこなった。テストは個体内で反復的におこない、テスト間には3～4日の無投与訓練を挿入した。この結果、反応率は用量に依存せず一定の水準を維持することが示された。

摂食量：自由摂食下で飼育したマウスを24時間絶食させた後、通常の固形飼料を与え、haloperidol（腹腔内投与、0.025-0.1mg/kg）投与時の摂食量を測定した（60分間）。テスト間には少なくとも5日間の自由摂食日を挿入した。この結果、用量間で摂食量に有意差はないことが示された。

以上より、累進比率強化スケジュールに見られた用量依存的な反応停止点の低下は、単なる食動因の低下によってもたらされたものではなく、より高次の動機づけ過程に対するhaloperidolの効果を反映したものであることが示唆された。

P2-46

A β の脳室内注入によって誘発される脳機能傷害：行動学的、神経化学的および組織学的解析

中村 静雄、村山 宣人、案浦 洋一、大野 知親
サントリー生物医学研究所

A β (1-42)の脳室内注入によって惹起される行動学的、神経化学的ならびに組織学的変化についてA β 注入20および80日後に解析した。

【方法】Fischer系雄性(18週齢)を用いた。A β (1-42)を水に溶解し、ミニ浸透圧ポンプ(Alzet 1003D; Alza; CA)を用いて右側脳室内(A;1.2,L;1.5,H;3.7)に植え込んだカニューレを介して1 μ l/hrの速度で3日間かけて注入した(10,20 μ g/body)。自発交替行動はA β 注入20日後および80日後に行い、水迷路学習課題は21日後および81日後よりそれぞれ4日間実施した。行動実験終了翌日に脳を摘出し、生化学(ChAT活性、HC-3結合)および組織学的解析用試料とした。

【結果】両グループとも、自発交替行動および水迷路学習課題に対して用量依存的(10,20 μ g)な空間認知障害がみられ、A β 注入80日後における学習障害はA β 注入20日後のそれよりも顕著であった。A β 注入25日後において、皮質/海馬/線条体のコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性には変化はみられなかったが、コリン取り込み能(HC-3 binding)が海馬において有意に減少していた。これに対して、A β 注入85日後では、ChAT活性の有意な低下が海馬および線条体でみられ、HC-3結合能も皮質、海馬および線条体で有意に減少していた。また、組織学的には用量依存的な脳室拡大がみられ、さらにA β 注入85日後の海馬CA1領域で細胞脱落が認められた。

以上、A β (1-42)を脳室内に注入することによって進展性の脳機能傷害が誘発された。また、このA β 処置ラットはアルツハイマー病でみられる痴呆の進展過程を評価する上で有用な動物モデルとなると考えられた。

P2-47

子宮内胎児発育不全と中枢神経障害

田口 雅之¹、小嶋 久子²、斎藤 克¹、斎藤 真希¹、栗原 正³、西島 正博¹、玉井 洋一²
北里大・医・¹産婦人科・²生化学、³創価大・生命研

子宮内胎児発育不全(以下 IUGR)では妊娠、分娩時に胎児仮死に陥る頻度が高く、長期予後も不良であり周産期管理上の大きな問題である。また、早期発症の IUGR 例ほど中枢神経障害を残す可能性が高いことが問題となっているが、その生化学的背景はほとんど解明されていない。今回、我々はラットの IUGR モデルを作成し、神経特異酵素とミエリンタンパクについて、子宮内環境が胎児に及ぼす影響を検討した。IUGR モデルは Wistar 系ラットに Wigglesworth の変法により作製し神経細胞体の障害の評価として neuron-specific enolase (NSE) と acetylcholinesterase 活性 (AChE) を測定した。髄鞘については、myelin basic protein (MBP)、proteolipid protein (PLP)、2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) の mRNA 発現を Northern hybridization を用いて調べた。AChE 活性は IUGR 例に於て低値を示したが、NSE では差がなかった。mRNA の発現に関しては、PLP のみに抑制が認められた。IUGR 例では中枢神経系に選択的な障害が起こっていることが示唆された。

P2-48

Sandhoff 病モデルマウス由来培養神経細胞ならびにシュワン細胞の形態・機能解析

三五 一憲¹、渡部 和彦²、山中 正二³
東京都神経科学総合研究所 ¹解剖発生、²神経病理、³横浜市立大学医学部第二病棟

Sandhoff 病は、GM2 ガングリオシド分解酵素の先天的欠損により、神経系全般に GM2 ガングリオシドが蓄積する進行性の神経変性疾患である。遺伝子ターゲット法により作製された Sandhoff 病モデルマウスは、生後 3 カ月頃より進行性の運動失調や四肢の筋萎縮をきたし、5 カ月までにすべて死亡した。組織学的には、ヒトの症例と同じように Sandhoff マウスの神経組織に GM2 ガングリオシドの著しい蓄積がみられ、電顕的に細胞内封入体 (membranous cytoplasmic bodies) を認めた。しかしながら、Sandhoff マウスの神経ならびにグリア系細胞の形態・機能異常に関する詳細な報告はない。本研究では、成熟動物後根神経節からの神経細胞ならびにシュワン細胞の培養法を Sandhoff マウスに適用し、これら培養細胞の形態・機能に及ぼす GM2 蓄積の影響について検討した。

生後 4 週ならびに 12 週の Sandhoff マウス及び対照マウスより、頸～腰部後根神経節および連続する末梢神経を採取し分散、初代培養とした。Sandhoff マウス由来神経細胞の多くは、位相差顕微鏡下で細胞体内に多数の顆粒状構造物を認め、これらは蛍光抗体法で GM2 強陽性であった。Sandhoff マウス神経細胞は対照マウス神経細胞と同様に、血清ならびに無血清培養下で神経突起の伸長を認めたが、無血清培養 2 日後の細胞生存率は Sandhoff マウスの方が対照マウスに比べ、有意に低かった。一方、初代培養を抗 Thy1.2 及び補体で反復処理することにより、混在する線維芽細胞を除去してほぼ純粋なシュワン細胞培養系を得た。現在この系の継代をすすめて、Sandhoff マウス由来シュワン細胞株の樹立を目指している。これらの培養細胞系を用いた解析は、Sandhoff マウスの神経形態・機能異常を明らかにする上で有用であると考えられる。

P2-49

胎児期アルコール被曝ラットの中枢ミエリンタンパクへの影響と学習行動について

小嶋 久子¹、堀 耕治²、栗原 正³、白鷹 増男⁴、
中村 和生¹、川島 麗¹、田口 雅之⁵、
野村 正彦²、玉井 洋一¹
北里大・医・¹生化学、²産婦人科、³医療衛生・医情
報、⁴埼玉医大・生理学、⁵創価大・生命研

“胎児性アルコール症候群”では精神運動発達遅延などの中枢神経系の異常が生じる。この異常が起る機構を神経化学的に分子レベルで解析することを目的として、妊娠中のラットにアルコールを強制摂取させ、生まれた仔ラットの脳の生化学的検索を行ってきた。これまでに、たとえ少量のアルコール摂取でも、仔ラット脳の2',3'-環状ヌクレオチド3'-リン酸水解酵素の活性とmRNA発現が著しく低下していること、他にミエリン塩基性タンパク質のmRNA発現も低下していることを報告した。今回、胎児期にアルコール被曝したラットについて、ミエリンの主要構成成分であるプロテオリピドプロテイン (PLP) のmRNA発現を調べるとともに、妊娠中の母親のアルコール摂取が学習行動に与える影響を明度弁別学習実験法で検討した。PLP発現を経時的にノーザンブロット法で調べると、発現量のレベルは対照とあまり変わらなかったが、発現ピークが対照に比較して遅延しているのが観察されて、生化学的なミエリン形成の遅れが示唆された。次に、胎児期にアルコールに大量被曝した群、少量被曝群、および対照群について、生後3ヶ月齢時に学習実験を行った。スキナー箱の前面の白色ランプのON/OFFを弁別する明度弁別学習課題を30日間試行した。学習実験を繰り返し実施中であるが、これまでに得られた結果では、アルコール摂取群と対照群の間に差は認められていない。

P2-50

A群色素性乾皮症原因遺伝子およびB群コケイン症候群原因遺伝子ダブルノックアウトマウスにみられる小脳の発達異常

村井 真知子¹、稲村 直子¹、安達 直樹¹、
榎戸 靖¹、吉野 雅文²、中津 可道²、
Gijsbertus T.J.van der Horst³、Jan.H.J.Hoeijmakers³、
田中 亀代次²、畠中 寛¹
¹大阪大学・蛋白研、²大阪大学・細生工センター、
³Erasmus University

ヌクレオチド除去修復に関与するA群色素性乾皮症 (Xeroderma Pigmentosum Group A: XPA) あるいはB群コケイン症候群 (Cockayne Syndrome Group B: CSB) の原因遺伝子いずれか一方を欠損したマウスでは形態形成や生殖能に異常がみられないのに対し、それらを共に欠くダブルノックアウトマウスでは生後著しい発達不良および運動失調が生じ、生後3週間程で死に至る。一方、ヌクレオチド除去修復活性の低下ならびにUV照射による皮膚癌の高頻度発生はいずれの遺伝子欠損マウスでもみられることから、ダブルノックアウトマウスで生じる表現型はXPA、CSBの持つDNA修復機能以外の何らかの生理機能が補償されなかった結果生じたものであることが予想された。

我々はダブルノックアウトマウスの運動能力の低下に注目し、特に小脳の発達について解析を行った。生後8日目のXPA/CSBダブルノックアウトマウスと正常マウスを比較すると、前者は発育が悪く (体重で約60%、脳重量で約80%)、明らかな運動障害がみられた。また脳全体では中脳丘が大きく露出している一方、小脳は小さく、発達異常が生じている様子が観察された。脳切片を用いた組織化学的および免疫組織化学的解析の結果、ダブルノックアウトマウスでは小脳後葉中部垂溝が形成されず、裂が浅くなっている様子が見られた。また、プルキンエ細胞層の縮小や樹状突起の発達異常に伴う網目構造の乱れが観察された。現在これらの形態異常がニューロblast等の増殖能の変化あるいはそれらのアポトーシスと関連したものであるかについて解析を行っている。

P2-51

ドーパミン神経毒MPP⁺によるアポトーシス誘導の機構

梅沢 倫子、村山 俊彦、野村 靖幸
北海道大院・薬・薬理

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)は、サルやげっ歯類に投与するとヒトのパーキンソン病と類似した変化を引き起こす。MPTPは脳内で代謝されてMPP⁺となり毒性を示すと考えられている。MPP⁺による細胞毒性の機序としては、ミトコンドリア呼吸鎖阻害によるATP枯渇説、酸化ストレス説が提唱されているが、未だに不明な点が多い。本研究ではPC12細胞(ラット副腎褐色細胞腫)を用い、MPP⁺による神経細胞死の機構について検討した。MPP⁺ 48時間処理によるLDH(lactate dehydrogenase)放出はカパーゼ阻害薬(Z-VAD-fmk, 100 μ M)およびNGF(100 ng/ml)前処理により抑制された。また、これらの薬物は酸化ストレスによって細胞毒性を示すH₂O₂による細胞死も抑制した。アクチノマイシン(1 μ M)前処理は、単独で細胞死を引き起こしたが、MPP⁺による細胞死を顕著に抑制した。H₂O₂による細胞死は抑制しなかった。シクロヘキシミド(0.1 μ M)もアクチノマイシンと同様の効果を示した。これらのことから、MPP⁺による細胞死は酸化ストレスによってのみ引き起こされるものではないと考えられた。現在、MPP⁺によるp53などのアポトーシス関連蛋白質の発現変化を検討中である。

P2-52

酸化ストレスと内在性脳内アミン1BnTIQの相乗効果による神経毒性の検討

本田 真知子、古武 弥一郎、太田 茂
広島大学医学部総合薬学科

我々のグループはこれまでに、1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ)が生体内に存在し、パーキンソン病患者の脳脊髄液中で増加傾向にあり、実験動物に連投するとパーキンソニズムを誘発することを明らかにした。しかし、その生体内に存在する濃度と培養細胞に対して毒性を示す濃度には大きな開きが存在する。

一方、パーキンソン病発症原因の一つとして、酸化ストレスが考えられている。この、酸化ストレス負荷の条件下で1BnTIQの毒性検討を行った。

我々は、胎生16日齢のラットより中脳腹側部を摘出し、分離した細胞をDMEM/F-12・5%FBS・5%HS培地にて培養した。培養7日目にグリア細胞の生育を阻害するためにAraCを添加し、培養11日目より薬物の添加を行った。酸化ストレス負荷方法として、t-BuOOHを添加した。薬物添加24時間後にMTT assayを行い、培養細胞に対する薬物の毒性を生細胞数比により検討した。その結果、単独では毒性を発現しない1BnTIQとt-BuOOHを同時に添加することで、細胞に対して毒性を発現するようになった。このことから、酸化ストレスと1BnTIQの細胞毒性には相乗効果があると考えられた。

また、それらの相乗効果による細胞毒性の作用機序を検討するために、5週齢のラットシナプトソームを調製し、酸化ストレス負荷状態での1BnTIQの取り込み活性の測定を行った。この結果、酸化ストレスにより1BnTIQのシナプトソームへの取り込み活性が上昇する傾向が認められた。本結果は、酸化ストレスと1BnTIQの相乗効果の作用機序の1つであると考えられる。

P2-53

新規パーキンソン病発症物質候補の毒性評価

杉谷 誠一郎、太田 茂
広島大学医学部総合薬学科

パーキンソン病は中高年者に多い神経変性疾患であり、現在でもその発症原因は解明されていないが、外因性神経毒の

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridineがヒトに対してパーキンソン病様症状を引き起こすことが発見されて以来、内因性あるいは外因性の神経毒が注目されるようになった。現在では1,2,3,4-tetrahydroisquinoline (TIQ) やその類縁体が生体内に存在しパーキンソン病様症状を引き起こすことが明らかとなっている。

パーキンソン病患者では脂質過酸化が増加することが報告されており、その生成物であるマロンジアルデヒドもパーキンソン病患者の黒質に多く存在することが明らかとなっている。また、パーキンソン病患者において集積するという事実はないが、直鎖アルデヒドも生体内に存在することが確認されている。本研究では脂質過酸化生成物および直鎖アルデヒド (C₆~C₁₂) を原料とするTIQ類縁体も生体内に存在するのではないかと考えTIQ類縁体の構造を設計し化学合成した。

合成したTIQ類縁体の毒性を検討する目的でパーキンソン病の指標のひとつである寡動 (bradykinesia) を観察するためにポールテストを行った。各TIQ類縁体により濃度に違いが観られたがパーキンソン病様症状を引き起こすことが確認された。また、1週間後に同じマウスを用いてテストを行ったところ引き続きパーキンソン病様症状が観察されたことから、これらTIQ類縁体がドーパミン神経に対して不可逆的な変性を与えている可能性が示唆された。

ポールテストの測定後マウスの脳を摘出し脳内に含まれるドーパミン量を測定したところドーパミンおよびその代謝物において濃度依存的な減少傾向が認められた。

以上から脂質過酸化生成物および内在性の直鎖アルデヒドを原料とするTIQ類縁体が新規パーキンソン病発症物質である可能性が示唆された。また、これらTIQ類縁体の構造と毒性との相関から、パーキンソン病様症状の発症にはTIQ類縁体の1位の側鎖の大きさが重要であることが示唆された。

P2-54

MPTPマウスにおけるGDNF受容体Retのdown-regulation

平田 洋子、足立 香代、村口 佐知子、木内 一壽

理化学研究所 バイオミメティックコントロール研究センター 運動遺伝子研究チーム

ドーパミン神経毒のMPTPを投与したサルやマウスおよびマンガン中毒ではParkinson病に類似した症状を呈する。一方、Parkinson病等の神経変性疾患における細胞死にはアポトーシスが関与することが示唆されている(1)。我々はPC12細胞をモデル系として用い、マンガンがアポトーシスを起こし細胞膜のintegrityが維持されている状態でも膜蛋白質である種々の栄養因子の受容体がdown-regulationされることを報告した(2,3)。今回、in vivoモデル系としてMPTPマウスを用いドーパミン神経に存在するグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)受容体、Retの発現を調べた。

[方法] MPTP (30 mg/kg) を2日間または4日間、マウスに皮下投与した。線条体をSDS sample bufferでhomogenizeしWestern blottingでTH (tyrosine hydroxylase) およびRetを解析した。検出はECL法 (Amersham) で行った。TH抗体はモノクローナル抗体 (Boehringer Mannheim) を、Ret抗体はウサキポリクローナル抗体 (C-19, Santa Cruz) を用いた。

[結果と考察] MPTPマウスでTHの蛋白質レベルが対照の40%程度にまで減少したときのRetの蛋白質レベルは5%以下であった。THおよびRetは線条体ではドーパミン神経に局在しており、この結果は神経の変性に先行してその生存に必要な栄養因子の受容体が減少している可能性を示唆している。

[文献]

- 1) Thompson CB, Science 267: 1456-1462 (1995)
- 2) Hirata Y et al., J. Neurochem. 71: 1607-1615 (1998)
- 3) Hirata Y et al., Soc. Neurosci. Abstr. 24: 1553 (1998)

P2-55

ヒトNurr1の遺伝子構造

鳥居 剛、瓦井 俊孝、川上 秀史、中村 重信
広島大学医学部第三内科

Nurr1はリガンド不明の核内レセプターであり、DAニューロンの発生・分化に必須である。昨年まで、我々は、ヒトNurr1遺伝子を単離し、その遺伝子構造を明らかにした。今回はNurr1遺伝子のプロモーター領域に、刺激反応性のNurr1の発現誘導領域を決定したので報告する。種々の長さのNurr1の5'隣接領域を含むdeletion mutantを作成した。pRL-TKを内部コントロールとしてHeLa細胞にcotransfectionし、PMAおよびA23187を含む培地で6時間培養後、細胞を回収し、luciferase活性を測定した。(結果)薬剤刺激にて誘導されたNurr1の転写開始点は、CRE内に1ヶ所同定され、転写因子結合配列(CRE、CArG-like box、Sp-1 site)を含む5'隣接領域は、PMA、A23187刺激によりNurr1遺伝子の転写活性を促進することが示された。(考察)ヒトNurr1は全長約8.3kbの遺伝子で、8つのexonと7つのintronからなる。IntronはGT-AG ruleに従っており、翻訳領域はexon 3から8に渡っている。ヒトNurr1とマウスNurr1の遺伝子構造を比較すると、5'隣接領域の転写調節因子を含めて極めてよく保存されている。本実験により、薬剤刺激によるNurr1の発現誘導には、5'隣接領域の転写因子結合z列が重要な役割をしていることを示した。ヒトNurr1のcDNAにはTINURと呼ばれるisoformがあることから、転写調節因子やalternative splicingなどがNurr1の機能発現に影響する可能性がある。

P2-56

Niemann-Pick病C型モデルマウス(spm)由来培養シュワン細胞株の樹立

渡部 和彦¹、坂本 剛^{1,2}、井田 博幸³、
上原 けい子³、衛藤 義勝³、大野 耕策⁴

¹東京都神経科学総合研究所神経病理、

²東京慈恵会医科大学神経内科、³東京慈恵会医科大学小児科、⁴鳥取大学医学部神経生物

spmマウスはヒトNiemann-Pick病C型(NPC)のモデル動物のひとつであり、常染色体劣性遺伝形質をとり、進行性の肝脾腫と運動失調を呈し生後約12-14週で死亡する。spmマウスでは、ヒトNPCと同様、細胞内に非エステル化コレステロールが蓄積する。組織学的には、肝・脾に多数の泡沫細胞が出現し、脳・脊髄ほぼ全域の神経細胞、後根神経節神経細胞は泡沫状となり、電顕的にmultilamellar inclusionsを認め、同様の変化は末梢神経のシュワン細胞にもみられる。近年、ヒトNPCの原因遺伝子NPC1が同定され、spmマウス肝ではNPC1 mRNAがノザン・プロットで検出されないことが報告された。一方、これまでNPCモデル動物の培養実験系は線維芽細胞が主であり、神経組織の培養は報告がない。本研究では、spmマウス後根神経節由来の培養シュワン細胞株を樹立し検討を加えた。生後8-10週の発症spmマウスより頸～腰部後根神経節および連続する末梢神経を採取し分散、初代培養とした。抗Thy1.2および補体の反復処理にて混在する線維芽細胞を除去しつつ継代を行い、ほぼ純粋なシュワン細胞培養系を得た。このシュワン細胞を8-9ヶ月培養維持したところ、コロニーを形成しはじめ、不死化したと考えられる細胞株(37C9)を得ることが出来た。37C9細胞は蛍光抗体法でS100蛋白、laminin、p75^{NTR}が強陽性であり、RT-PCRではL1、PMP22、GAP43、GDNFが検出された。同細胞はfilipin cholesterol染色陽性であり、胞体内にGM2 gangliosideの蓄積を認めた。電顕的には、胞体内にspmマウスに特徴的なmultilamellar inclusionsを有していた。定量的競合RT-PCRによる解析では、37C9細胞におけるNPC1 mRNA transcriptの発現は正常対照マウス・シュワン細胞株(IMS32)の10分の1程度に減少していた。spmマウスにおけるNPC1遺伝子変異の部位はまだ確定していないが、NPC1 mRNAの発現低下がspmマウス脳組織にも同様に認められ、何らかのmRNA変異に伴うものと推測された。本研究で得られたspmシュワン細胞株は、spmマウスの神経病変を解析する上で有用であると考えられた。

P2-57

筋萎縮性側索硬化症モデルマウス大脳皮質および脊髄組織内ミトコンドリア複合酵素IとIV活性の発育に伴う変動

柴山 健三¹、藤田 公和¹、芳本 信子²、小川 和人¹、

永田 豊¹、宮地 栄一¹

¹ 藤田保健衛生大学・医学部・生理、² 名古屋文理短大

目的：筋萎縮性側索硬化症モデル動物のMndマウスは、生後6ヶ月頃から下肢麻痺が出現し、以後上行性に運動障害が進行し、10ヶ月齢で死亡する遺伝的変異動物である。我々は、発育前半期に脊髄組織内好氣的エネルギー産生系に関与しているミトコンドリア電子伝達系複合酵素(cytochrome c oxidase; CO)活性低下と、異常に発生する活性酸素基(O_2^-)を消去するsuperoxide dismutase活性が高まり、末期にはニューロンの変性・脱落の進行とともに、これら酵素活性が低下して運動麻痺が発現することが示唆された。今回、Mndマウスの発育過程中的脳および脊髄組織内の好氣的エネルギー産生系障害をより詳細に明らかにするために、虚血再灌流障害によってもCOより早期に影響を受けると考えられている電子伝達系複合酵素I (NADH-coenzyme Q reductase; NADH-CQR) 活性を測定し、CO活性値との関連性を比較検討した。

結果と考察：Mndマウスの大脳と頸胸髄組織内NADH-CQR活性値は、対照マウスに比べ5ヶ月齢より減少し始め、7ヶ月齢より有意な低下となった。腰髄組織内NADH-CQR活性値は、対照マウスに比べて3ヶ月齢より有意な低下を示した。このような結果は、Mndマウスでは運動障害症状の発現するよりもかなり以前より、既にニューロン内の好氣的エネルギー産生系の障害が進行して変性・脱落が進行していることが示唆された。

P2-58

Iminodipropionitrileによる脊髄前角細胞NOS活性変化に対するaniracetamの効果

鎗木 真理子、駒井 清暢

金沢大学医学部神経内科

β,β' -iminodipropionitrile (IDPN) は、投与によって生じる軸索内neurofilamentsの蓄積がaxonopathyや運動神経疾患モデルとして知られているが、そのメカニズムの詳細は明らかではない。そこでNOの役割に着目し、IDPN投与ラットにおいてNOS活性を経時的に観察し、同時にaniracetamのNOS活性に対する作用を検討した。

対象と方法：6・7週齢、170・200 gの雌性 Wistar ratを用い、IDPN単独群 (2.0 g/kg 腹腔内単回投与) とaniracetam前処置群 (40 mg/kg, 経口3日間投与) について、IDPN投与後 12、24、48、72 時間の臨床症状と脊髄凍結切片を用いたNADH-diaphorase活性を比較した。

結果：IDPN 投与48時間後には、軽度の自発運動量減少が観察され、72時間後には頸部と体幹に不随意運動(AIM) が出現した。aniracetam投与群では、72時間後のAIMがより少なかった。IDPN群ではNOS活性は一旦低下し、その後48時間、72時間と経過するに従い、多くの脊髄前角細胞に活性の上昇が認められ、これらの細胞では次第に細胞体の変形が見られた。Aniracetam投与群ではこのNOS活性の上昇が軽度であった。

結語：IDPN投与によって臨床的に72時間後から不随意運動が出現し、脊髄前角細胞には投与24・48時間後からNOS活性上昇が認められた。aniracetamは不随意運動の出現を抑制し、また脊髄前角細胞におけるNOS活性の上昇を抑制した。IDPNによる初期変化としてのNOS活性増加が臨床症状出現に関連する可能性があり、aniracetamはこのNOS上昇を抑制することで臨床的效果を有する可能性が示唆される。NOS活性変化と慢性期の軸索内filament蓄積との関連は不明であるが、aniracetamは慢性期の不随意運動をも抑制することから、急性期のNOS活性制御機構に与える効果が、慢性期にいたるメカニズムに何らかの役割を果たす可能性がある。

P2-59

Human NeuroD/BETA2/BHF1遺伝子プロモーターの解析

宮地 隆史、川上 秀史、北村 健、丸山 博文、
中村 重信

広島大学医学部内科学第三

NeuroD/BETA2/BHF1 (以下NeuroD) は小脳に強く発現し、神経の分化・発達に関与するbasic helix-loop-helix構造をもつ転写因子である。現在神経分化に関する種々因子を介したカスケードが解明されつつあるが依然として明らかではない。一方でNeuroDは糖尿病との関連も示唆されている。

前回までに我々はhuman NeuroD遺伝子をクローニングし、その遺伝子構造を決定しエンハンサー活性部位の検討を報告した。今回さらにNeuroD遺伝子のプロモーターの解析を行いその転写調節を検討した。プロモーター領域の解析にはルシフェラーゼアッセイを行った。転写開始点上流の4つのE box (E1~E4 box)を含む種々のフラグメントおよびE boxに点変異を導入したプラスミドをレポーターベクターとして用いた。IMR-32細胞に遺伝子導入し、24~48時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。さらにNeuroDを共発現させて、ヒトNeuroD遺伝子の自己調節能を検討した。

NeuroDの共発現によりE1とE4 boxを介したNeuroD遺伝子プロモーターの転写活性の上昇を認めた。しかし、E1 boxの変異導入により、その活性上昇は認められなくなった。一方、NeuroD発現によるE2 boxおよびE3 boxを介した転写活性の上昇は認めなかったが、E3 boxに変異を導入することによりエンハンサー活性が消失した。

以上よりE1およびE4 boxを介した正の自己調節能が存在することが明らかになった。一方、E3 boxはNeuroDとは異なる因子を介して転写活性を調節する、重要な配列であることが示唆された。NeuroD遺伝子の転写調節に関してE boxを介したNeuroD関与・非関与の調節機構が存在することを示した。今後さらに神経分化のカスケードを明らかにし、神経疾患や糖尿病との関連を検索することが必要である。

P2-60

脳虚血後の海馬における前シナプス蛋白質、NACP/ α -synuclein, SNAP-25およびsynaptophysinの変化

石丸 裕久¹、上田 健治²、高橋 章¹、

Fiorella Casamenti³、Giancarlo Pepeu³、丸山 悠司¹

¹群馬大学医学部神経精神薬理ツムラ、²東京都精神医学総合研究所神経化学、³フィレンツェ大学医学部臨床薬理

NAC (non-A β component of Alzheimer's disease amyloid) はアルツハイマー病脳の精製アミロイドからアミロイド β 蛋白 (A β) に次ぐ2番目の構成成分として同定され、その前駆体蛋白質 (NAC precursor: NACP, aka α -synuclein) はおもに脳の神経終末に存在することがわかっている。今回は砂ネズミ脳虚血モデルを用い、海馬におけるNACPの虚血後変化を免疫組織化学的に検討した。免疫染色は、5分間虚血後6ヶ月目まで経時的に行った。遅発性神経細胞死は虚血後4日目にCA1領域で確認された。この4日目に、非常に強いNACP免疫反応がCA1領域の血管周囲に一時的に見られ、6ヶ月後にはNACP陽性の鎖状および管状構造物が認められた。これらの変化は神経終末の変性に起因していると考えられるが、海馬CA1領域の神経終末は虚血ストレスに対して抵抗性を有すると一般的にいられている。そこで今回はさらに、信頼性のある2種の前シナプス蛋白 (SNAP-25およびsynaptophysin) の抗体を用いて、虚血後の神経終末の状態を観察した。虚血後2日目に、CA1錐体細胞周囲、特にschaffer collateralが終結する放射状層の樹状突起周辺のSNAP-25およびsynaptophysin免疫反応が著名に低下した。また、神経繊維が集結するalveusではSNAP-25免疫反応の消失が認められた。この結果は従来の報告と異なり、虚血後の海馬CA1領域で神経終末の変性が起こること、さらにその変性は遅発性神経細胞死に先行することを意味する。したがって、虚血後のNACPの分布変化は、この神経終末の脆弱性に起因していると考えられる。さらに虚血脳におけるA β 蓄積機構にこのNACPの変化が関与している可能性も示唆される。以上の結果、前シナプスの変性メカニズムの解明は、脳虚血の病態生理を理解する上で非常に重要であると考えられる。

P2-61

糖尿病ラットにおける一過性前脳虚血後の大脳皮質の進行性萎縮

近藤 文雄、小川 紀雄

岡山大学医学部分子細胞研究施設神経情報学部門

コントロール不良の糖尿病患者の脳において様々な機能的、生理学的変化/異常が発生している可能性が示唆されており、種々の糖尿病/高血糖動物モデルにおいて認知能力の低下が証明されているが、それを説明しうる病理的異常や生化学的異常は明らかにされていない。今回われわれは、ストレプトゾトシン(STZ)投与ラットにおいて、一過性前脳虚血後に海馬のアンモン角と大脳皮質が進行性に萎縮を来す現象を発見したので報告する。雄性Wistar rat(8-9週齢)にSTZ(65mg/kg i.p.)を投与し、2日後に椎骨脳底動脈を凝固閉塞し3日後に総頸動脈を動脈瘤クリップを用いて閉塞させ20分間の一過性前脳虚血とした。STZ投与・非虚血群、STZ非投与・虚血群、STZ非投与・非虚血群を対照群とした。

STZ投与・虚血群では、虚血後4週間後より海馬と側頭葉、頭頂葉の皮質で萎縮がみられ、6週後には、前頭葉の皮質にも萎縮が見られた。萎縮性の変化は亜急性進行性であり、8週間後には前頭葉、頭頂葉、側頭葉ともに著明な萎縮を呈しており、海馬では、アンモン角がほぼ消失していた。major histocompatibility complex class II陽性のmicrogliaは、6週以降に前頭葉、側頭葉、頭頂葉の皮質において増加していた。萎縮部位では、変化に先立ってGlucose transporter 1(GLUT1)の減少が見られた。一方、他の3群の対照群においては虚血群における海馬CA1領域に局限した非進行性の萎縮以外の進行性の脳萎縮もGLUT1の減少も認めなかった。GLUT1は脳内へのグルコース取り入れに大きな役割を果たしており、GLUT1の減少が脳萎縮を引き起こした一因であった可能性がある。今回の実験においてカルボキシルメチルリジンの免疫染色と鉄染色をおこなったが、脳萎縮を来した原因と考えられる有意な結果は得られなかった。以上の結果は、糖尿病患者における脳血管障害後の慢性期には進行性の皮質障害を来す可能性があることを示唆する。

P2-62

グルタミン酸取り込み阻害剤は、ラジカル生成促進とグルタチオン枯渇によって培養海馬神経細胞に対する興奮毒性を増強する

水見 敏行、池田 正行、室田 誠逸

東京医科歯科大学 分子細胞機能制御学

グルタミン酸(Glu)トランスポーターは、興奮毒性の発現において重要な役割を果たしており、その阻害剤であるL-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-PDC)は興奮毒性を増強することが知られている。今回、我々はt-PDCの興奮毒性増強における細胞内ラジカル産生系と消去系の変動を検討した。

血清存在下10・14日間培養した海馬神経細胞をGlu(100 μ M)で5分間処理した後、Gluを含まない培養液でよく洗い、t-PDCならびに各種ラジカルスカベンジャーを含む培養液中で24時間培養した。

トリパンブルーを用いて生存細胞数を検討したところ、Glu刺激単独に比べて、t-PDC(200 μ M)は毒性を1.4倍に増強した。MK-801(100 μ M)はt-PDCによる興奮毒性を38%低下させたが、NBQX(100 μ M)は有意な作用を示さなかった。N-acetylcysteine(NAC, 1.8 mM)はt-PDCによる興奮毒性をMK-801と同程度に抑制し、かつ、MK-801存在下においても、相対的な細胞保護効果を示した。Ascorbateならびに α -tocopherolは、t-PDC存在下の興奮毒性増強に対して有意な効果を示さなかった。

DCFDAを用いて細胞内ラジカル産生を検討したところ、グルタミン酸刺激単独に比べて、t-PDC存在下ではラジカル産生が有意に増加した。同時に細胞内の還元型グルタチオンの変動をmBBrによって検討したところ、t-PDC存在下では細胞内グルタチオンの枯渇が観察された。これら細胞内ラジカル産生促進とグルタチオン枯渇は、NAC存在下では観察されなかった。一酸化窒素(NO)の関与を検討したが、t-PDC存在下の興奮毒性増強には、N-Arg等のNO合成酵素阻害剤に効果がみられず、また、培養上清中の窒素酸化物の増加も見られなかった。

以上の結果より、t-PDCによる興奮毒性増強の機序は、単に細胞外のGluを増加させ、NMDA受容体を刺激することのみではなく、細胞内の還元型グルタチオンの枯渇、ならびに、細胞内の非NOラジカルの生成促進を介していると考えられる。また、NACによる細胞保護効果は、細胞内ラジカルの消去系のみならず、産生系の抑制にもよることが示唆された。

P2-63

ラット大脳皮質スライスでの低酸素・無グルコース/再酸素化による組織障害に対するNS-7の保護作用：ナトリウムおよびカルシウムチャンネル遮断作用を介した一酸化窒素合成分酵素活性化抑制作用の関与について

岡 美智子、伊藤 善規、鵜飼 洋司郎
日本新薬・創薬研究所

ラット大脳皮質スライスにおける低酸素・無グルコース処置/再酸素化による組織障害モデルでの、新規急性期脳血管障害治療剤NS-7の作用を検討した。30分間低酸素・無グルコース処置後、3時間の再酸素化を行なうと、3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 還元能の低下が認められた。NS-7はこの組織障害を有意に抑制し、再酸素化後の処置でも有効であった。ナトリウムあるいは、カルシウムチャンネルブロッカーは単独で組織障害抑制する傾向を示し、両者を組み合わせると有意な効果を示した。MK-801およびCNQXを低酸素・無グルコース処置15分前から添加すると組織障害は有意に抑制されたが、再酸素化後からの処置では無効であった。また、NO産生阻害剤を低酸素・無グルコース処置時もしくは処置後から添加すると、組織障害は抑制された。次に、低酸素・無グルコース処置後のスライスでのNO産生量を測定した。NO産生量は、外液中にラット小脳可溶性画分（グアニル酸シクラーゼ含有）、GTPおよびホスホジエステラーゼ阻害剤を添加した時の外液中で産生されるcyclic GMP量を指標として測定した。低酸素・無グルコース処置時および再酸素化時にNO産生量が顕著に増加し、NS-7およびナトリウムならびにカルシウムチャンネルブロッカーは両時期のNO産生亢進を抑制した。しかし、これらの薬物はいずれも、低酸素・無グルコース時におけるグルタミン酸遊離を抑制しなかった。以上の結果から、ラット大脳皮質スライスにおける低酸素・無グルコース処置/再酸素化による組織障害は、グルタミン酸過剰遊離が引き金となり、NMDA型およびAMPA/kainate型受容体の活性化とそれに続くナトリウムおよびカルシウムチャンネルの活性化によりNOSが活性化され、NO産生が亢進することによって引き起こされると考えられた。さらに、再酸素化後の過程においてもNO産生が亢進しており、この時産生されるNOも組織障害的に作用すると考えられた。NS-7の神経保護作用には、ナトリウムおよびカルシウムチャンネル阻害に基づくNO産生亢進抑制作用が関与すると考えられた。

P2-64

慢性脳血流低下動物における細胞内情報伝達系の変化；オートラジオグラフィーを用いた検討

車谷 隆宏、工藤 喬、福所英里子、中村 裕、
谷向 仁、橋本 亮太、武田 雅俊
大阪大・神経機能医学講座・精神医学

緒言：我々は、モンゴルスナネズミの両側総頸動脈をコイル状クリップを用いて狭窄させ、これを数週間飼育することで慢性的に脳血流を低下させた動物モデルを開発し、学習能力の低下や特徴的な白質病変をはじめいくつかの報告を行ってきた。今回は、このモデル動物における神経細胞の機能障害の解明を目的として、細胞内情報伝達系の構成要素である

inositol(1,4,5)trisphosphate (IP₃) receptor, inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate (IP₄) receptor, protein kinase C (PKC)、adenylate cyclaseの量および分布の変化をオートラジオグラフィーを用いて検討した。方法と材料：モンゴルスナネズミ（体重60-80g、雌）の両側総頸動脈にコイル状クリップを装着して狭窄を来し、8週間飼育して慢性脳血流低下（E）群とした。E群19匹、および偽手術を行った対照（C）群10匹を断頭し、迅速に全脳を摘出してドライアイスにて凍結、クリオスタットにて14μm厚切片を作製し、PLLコートスライドガラスに張り付けた。-20℃にて保存した。³HラベルされたIP₃、IP₄、phorbol(12,13)dibutyrate (PDBu)、forskolinをリガンドとして上記切片と反応させ、³H-Hyperfilmをそれぞれ適当な期間露光させた。得られた画像をデジタルデータ化しMacScope2.33を用いて各部位（cortex、CA1、CA3、dentate gyrus、caudate putamen）の平均輝度を計測、各filmごとの標準曲線（スライドと同filmに露光した³H-standardsにより作製）から結合量（nCi / mg wet weight）を算出した。StatView4.5Jを用いて統計処理を行った。

結果と考察：E群においては、脳血流低下の程度を反映して個体間のばらつきが大きかったが、³H-PDBu結合の各部位における低下傾向、および³H-forskolinの各部位における統計的に有意な低下が認められた。さらにC群で認められる両リガンド結合の相関がE群では消失していた。以上のことから慢性脳血流低下モデル動物では細胞内情報伝達系の何らかの障害が存在することが示唆された。

P2-65

Differential Display 法における単離配列解析の改良

東田 道久

富山医科薬科大学・和漢薬研究所・生物試験

未知の機能的遺伝子のクローニングを行なう手法として、differential display 法が用いられている。この手法は、mRNA 発現量の違いを RT/PCR 法に基づいて検出する方法であり、比較的簡便に研究目的に即した因子のクローニングが可能である。しかしながら、いくつかの解決すべき問題点も含まれている。発現量の異なるクローンは PAGE により分離するが、一つバンド中に複数の配列が含まれていることも少なくなく、その確認・分離の必要性や、その後の利便性から、vector に subcloning することが多い。この際通常、常法に従って T-vector への ligation あるいは平滑化処理後の ligation を行なうが、ligation されにくい場合も多く、また組込の方向性や両端の primer の配列が明確でないことなどの問題点も含んでいる。その点を解決する方法として演者は、5' 側に制限酵素認識部位の配列を有した 2-base anchored oligo(dT) primer と別の制限酵素認識部位を有する arbitrary 10-mer primer を用いた RT/PCR を行なっている。この手法は上記の問題点を解決できると共に、PCR 時の T_m 値の制御も行なえる利点を有する。また、単離配列の sense 鎖を RT/PCR 法により決定する手法についても紹介し、differential display 法に関する種々の議論を行なうと共に、あわせてこの方法により単離した脳慢性虚血初期(虚血後 4 日目)の段階で発現変化する数種の遺伝子についての報告も行なう。

P2-66

局所脳虚血・再灌流時の局所脳血流量と小胞体カルシウムイオン取り込み能の検討

傳法 倫久¹、福内 靖男¹、田中 耕太郎¹、野川 茂¹、鈴木 重明¹、二木 啓²¹慶應義塾大学医学部神経内科、²理化学研究所

我々は既に、ラット中大脳動脈閉塞(MCAO)モデル(虚血5時間)の重度虚血領域で、小胞体の Ca^{2+} -ATPase の機能が低下し、虚血性細胞障害と密接な関連を有する事を報告した。今回は、MCAO1.5時間+再灌流3.5時間モデルを用いて、局所脳血流量(ICBF)と小胞体カルシウムイオン取り込み能(Ca^{2+} uptake)を検討した。

(方法) Sprague-Dawley ラット10匹をハロセン麻酔下に血管内ナイロン糸法により中大脳動脈起始部を閉塞し、閉塞1.5時間後糸を抜く事で再灌流させた。再灌流3.5時間の時点で¹⁴C-iodoantipyrine法によりICBFを測定した。連続切片を2組作成し、1組はICBF測定、もう1組はVermaら(1992)の方法を、当方で改変した方法により、凍結脳を用いた Ca^{2+} uptake測定の各実験に供し、それぞれのオートラジオグラムの尾状核-被殻レベルで同一関心領域を設定し、各パラメーターを定量化した。尚解析は、次の3群に分けて施行した。すなわち低灌流動物群(虚血側尾状核外側のICBFが非虚血側尾状核外側のICBFの(平均 $-2 \times$ 標準偏差)未満の動物)、正常灌流動物群(虚血側尾状核外側のICBFが非虚血側尾状核外側のICBFの(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差)の範囲にある動物)、高灌流動物群(虚血側尾状核外側のICBFが非虚血側尾状核外側のICBFの(平均 $+2 \times$ 標準偏差)より大きい動物)の3群である。(結果)尾状核-被殻では、再灌流時のICBFの高低に関わらず虚血側の Ca^{2+} uptakeは非虚血側に比べ有意に低下していた。前頭頭頂葉皮質では、低灌流動物群、高灌流動物群で虚血側の Ca^{2+} uptakeが非虚血側に比べ有意に低下していたものの、正常灌流動物群では差を認めなかった。(まとめ)前頭頭頂葉皮質では再灌流により Ca^{2+} uptakeの低下が抑制されることが認められた。しかし、再灌流時のICBFのレベルによっては再灌流後の Ca^{2+} uptakeの障害の程度に差がみられる事が示唆された。

P2-67

自己免疫性ニューロパチーにおける免疫吸着療法の効果：抗糖脂質抗体の変動と臨床予後池田 順子¹、郡山 達男¹、小塚 和子¹、越智 一秀¹、原田 暁²、中村 重信¹¹広島大学医学部内科学第三、²県立広島病院神経内科

目的：免疫吸着療法(IAT)はギラン・バレー症候群(GBS)や慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)などの自己免疫性ニューロパチーに有効である。IATは自己免疫性ニューロパチーの病因に関連があると考えられている抗糖脂質抗体(AGAb)を速やかに除去する。しかしIAT後のAGAbを長期観察した報告は少ない。そこでIATを施行したGBS、CIDPの臨床効果と血清AGAbの変動について検討した。

対象・方法：GBS 9例、再発性GBS 3例、CIDP 6例。臨床症状はHughes functional grading scaleで評価した。AGAbはELISA法で測定し、初回IAT前後と1クール(4～7回)終了後、follow upについて検討した。

結果：GBSのHughes scaleは、IATにより9例中7例で改善した。AGAbは全例で陽性、IAT後は6例で陰性化した。しかし6例中3例は、follow upで再び陽性になった。3例はIATを施行してもAGAbが陰性化せず持続した。再発性GBSとCIDPの9例中6例でHughes scaleは改善した。AGAbは9例中7例で陽性でIAT後も陰性化しなかった。GBS、再発性GBS、CIDP症例ともに持続、または再上昇する抗体はIgMクラス抗体であった。

考察：IATはAGAbの除去と臨床症状の改善に有効であった。CIDPではAGAbが持続する症例が多く、再発性GBSでも同様であった。このことからIgMクラスAGAbがIAT後も持続する自己免疫性ニューロパチーは再発する可能性が考えられる。GBS症例の中にもIAT施行後もAGAbが持続、再上昇する症例が存在した。AGAbをIAT後にfollow upすることは、自己免疫性ニューロパチーの診断や治療において、重要であると考えられる。

P2-68

ラット急性脊髄損傷モデルに対する性ホルモン投与による神経変性抑制効果小川 和人¹、藤田 公和¹、山内 理充²、安藤 正人²、永田 豊¹、宮地 栄一¹¹藤田保健衛生大学医学部生理学教室、²愛知学泉大学

<目的> 女性ホルモンの 17β -estradiol (17β -E)の投与によって、一過性脳虚血後の海馬組織で生ずる遅発性神経細胞死を抑制することが示唆されている。しかしその薬理的なメカニズムについては未だ詳細な検討が行われていない。本研究は、加圧クリップを用いた圧迫処理によって生じた脊髄損傷に対して、投与した 17β -Eが脊髄内ニューロンの変性を抑制できるかどうかについて検討した。

<方法> 120g強度の脊髄圧迫用加圧クリップ(協和時計工業社製)を用いて、ラットの椎骨を切開し露出させた脊髄を硬膜外より10分間圧迫した。そしてクリップを除去した後、アルゼット浸透圧ポンプ(宝町機械社製)を傷害部付近の皮下に植え込んだ。このポンプからは $10\mu\text{g/day}$ の 17β -Eが傷害部近傍組織に連続的に流出した。術後7日目で摘出した脊髄組織は傷害部と傷害部の頭側および尾側に分割し、神経変性の生化学的マーカーと考えられる組織トランスグルタミナーゼ(TGase)活性値とTGase酵素蛋白量を測定した。

<結果および考察> 圧迫傷害を加えない対照ラット脊髄のTGase活性値は $36\sim 40\text{nmol/mg protein/h}$ であった。圧迫傷害負荷後7日目に摘出した脊髄では、TGase活性値は $68\sim 89\text{nmol/mg protein/h}$ まで上昇した。このTGase活性値は傷害部脊髄で最も高く、傷害部の頭側部位が最も低値であった。脊髄圧迫手術後、 17β -Eを7日間連続投与したラットの脊髄では、40%前後の有意なTGase活性値の低下が観察された。また、TGase酵素蛋白量も同様の減少傾向が認められた。したがって、 17β -Eは脊髄損傷後の神経変性の進行を抑制する効果のあることが示された。

P2-69

グリオーシス特異的遺伝子OASISのヒトホモログの同定

森 徹自、竹内 真由美、二階堂 琢也、横屋 幸彦、清澤 秀孔、和中 明生
 福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門

OASISはDifferential display法を用いてマウス長期培養アストロサイトに発現増強する遺伝子として同定したものでbZip構造を有するアミノ酸507個よりなる新規蛋白をコードする。bZipドメイン周辺でショウジョウバエのBox B binding factor-2 (BBF-2)/dCREB-Aに最も高い相同性を示し、次いで哺乳類のCREB/ATFファミリーメンバーに相同性を示すことからOASISは新規のCREB/ATFファミリーメンバーであると考えられた。OASISは成熟神経系で凍結損傷や機械的損傷を加えた後の反応性アストロサイトで発現誘導されるのでグリオーシスの形成に何らかの役割を担っている可能性が高い。本研究ではOASISのヒト神経疾患への関わりを念頭に置き、ヒトにおけるホモログの単離同定を試みた。マウスOASISアミノ酸配列を用いてヒトESTクローンデータベースをサーチし、高い相同性を示すクローン4個を選択、それらのクローンのシーケンスを決定した。これら4個のクローンはオーバーラップしておりORF全領域をカバーしていたが中間の50アミノ酸をコードする領域が不足していたので両端にプライマーを設定、ゲノムDNA上でPCRを行いこの領域を含むゲノム断片をクローニングした。結果アミノ酸506個よりなるヒトホモログが同定出来た。ヒトOASISはマウスとアミノ酸配列で89.5%の一致率、98.8%の相同性を示した。現在サザン、FISH解析を進めている。

P2-70

単純ヘルペスウイルスを用いたTIMP-2発現defective virus による悪性脳腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討

星 道生^{1,2}、矢崎 貴仁^{1,2}、河瀬 斌²、植村 慶一¹
 慶應義塾大学医学部 ¹生理学、²脳神経外科

【目的】我々は、神経親和性、遺伝子導入効率の高い単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)に着目し悪性脳腫瘍治療の可能性を追求している。腫瘍浸潤抑制効果を持つtissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2)を発現するdefective virus (dvSRaTIMP2)を作成し、helper virusが複製可能な状態および複製不可能な状態での抗腫瘍効果の違いをin vitro Matrigel assayにより検討した。【方法】HSV-1 mutantであるHSV-tsKを用いてdvSRaTIMP2を作成した。まず、HSV-tsKとdvSRaTIMP2のU87に対するcytotoxicityを比較するため、U87に感染後、31.5℃及び37℃で培養し% surviving cellを測定した。次に 8×10^5 のU87をMatrigel coatしたtranswell chamberに播き、control群、HSV-tsK感染群、dvSRaTIMP2感染群につき、31.5℃(MOI=0.1)及び37℃(MOI=1.0)で3日間培養し、%invasionを比較した。【結果】% surviving cellはHSV-tsKとdvSRaTIMP2の間では有意差はなかった。Transwell chamber assayにおいてHSV-tsKが複製可能な37℃で培養した群では、% invasionはcontrol群で $10.2 \pm 1.0\%$ 、HSV-tsK感染群で $9.1 \pm 0.7\%$ と有意な差は見られず($p=0.35$)、HSV-tsK感染群とdvSRaTIMP2感染群($4.5 \pm 0.8\%$)では有意な差が見られた。一方、31.5℃で培養した群では、% invasionはcontrol群 $6.9 \pm 0.7\%$ 、HSV-tsK感染群 $3.4 \pm 0.5\%$ と両者間に有意差を認め、HSV-tsK感染群とdvSRaTIMP2感染群($2.6 \pm 0.3\%$)の間には浸潤を抑制する傾向が見られた。【総括】Helper virusの複製不可能な37℃ではTIMP-2の著明な浸潤抑制効果を示した。一方複製可能な31.5℃ではTIMP-2の効果は有意ではなかったが、helper virusの細胞傷害作用とTIMP-2の浸潤抑制作用の相乗効果が見られた。複製型TIMP-2発現defective virusを用いることで一層効果的な悪性脳腫瘍の治療となる可能性を示唆した。

P2-71

抗てんかん薬ゾニザミドの抗酸化能力のin vivo評価

徳丸 潤¹、植田 勇人¹、横山 秀克²、中島 暉³、土井 拓¹、大矢 博昭²、鎌田 仁²¹宮崎医大精神科、²山形生物ラジカル研、³宮崎医大化

【緒言】ゾニザミド (ZNS)の抗酸化能力に関しては既にin vitro実験結果として、既に報告が成されている。しかし、in vivo条件下では未だその抗酸化能力が評価されていない。今回我々は、spin label剤・トロキシルラジカルを脳内に投与し、マイクロイアリス(MD)法を応用しその消去速度を検討することでZNSの抗酸化能力を評価し、従来のin vitroデータを支持する結果を得ることが出来たので、報告する。【実験方法】ガイドカニュレの留置は脳定位術にて海馬腹側部上部に挿入し、5日間の回復期を設けた後、probeを急性留置した。spin label剤としてトロキシルラジカルである3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine-1-oxyl (carbamoyl-PROXYL)と3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (PCAM)を使用した。carbamoyl-PROXYLは非BBB通過ラジカルであるためprobeを通じて70分間、3ul/minの速度で灌流投与、その後Ringer液で灌流を開始、180分後から20分間隔で灌流液を回収した。ZNS(40mg/kg, i.p.)は最初の回収液採取の20分前に投与した。BBB通過ラジカルであるPCAMは2ml腹腔内投与し、その後3ul/minの速度で回収される灌流液を20分間隔で採取した。ZNS(40mg/kg, i.p.)は最初の回収液採取直の20分前に投与した。引き続き、各々のサンプルのESR計測(TE100, 日本電子)を行い、信号強度(低磁場側のスペクトルのピーク長)の時間変化を記録した。【結果】MD: 計測を行ったすべてのサンプルで信号強度は指数関数的な減衰を示したので、減衰のパラメータとして半減期を用いることにした。海馬腹側部(CA1領域)から回収されるBBB非通過ラジカルcarbamoyl-PROXYLの半減期は対照65.057±2.9489min、ZNS投与群62.043±4.6523minで有意な変化は見られなかったが、BBB通過ラジカルPCAMのシグナル強度半減期は対照群で54.115±2.0196min、ZNS群で39.729±3.8349minであり、ZNSで半減期が短縮した(p<0.01)。【考察】in vitro実験でZNSはcarbamoyl-PROXYL並びにPCAMのシグナル強度に対し影響は及ぼさないことが判明しているため、トロキシルラジカルとZNSの直接的化学反応によりトロキシルラジカルの消去速度が加速された可能性は低い。ZNSによる抗酸化能力の増大に関しては、ZNSは細胞外液に直接投与されたcarbamoyl-PROXYLの半減期には影響を及ぼさず、主に神経細胞膜を通過し回収されるPCAMの半減期を短縮することから、細胞膜内に存在する抗酸化物質に影響しその抗酸化能力が発揮されるのではないかと推測される。

P2-72

外傷性てんかんモデルにおけるてんかん原性焦点獲得のメカニズム

植田 勇人¹、徳丸 潤¹、横山 秀克²、中島 暉³、土井 拓¹、大矢 博昭²、鎌田 仁²¹宮崎医大精神科、²山形生物ラジカル研、³宮崎医大化

【緒言】外傷性てんかんにおけるてんかん焦点の獲得メカニズムに関しては、ヘプロビン中に存在する鉄イオンが、活性酸素種やラジカルの発生に関与し、興奮性アミノ酸放出や脱分極性亢進を惹起するという仮説解釈が存在する。今回我々は、in vivo条件下で鉄イオンを扁桃体に微量注入し同部位におけるグルタミン酸(Glu)遊離動態とラジカル発生捕捉に関する実験を行い、従来のin vitroデータを支持する結果を得ることが出来たので報告する。【実験方法】1)Glu遊離動態: 体重250~300gの雄性Wistar系ラットに対して麻酔下に、微小透析用プローブと鉄イオン微量注入用のガイドカニュレを右側扁桃体に留置した。その後、aCSFにて灌流し酵素蛍光度法[1]を用いたオンラインシステムを利用しGlu動態を鉄イオン注入4時間後まで観察した。Glu動態が安定した後、注入用カニュレを挿入し、FeCl3水溶液1.0ulの注入を行い、その後のGlu遊離動態を観察した。2)ラジカル発生動態: 同系ラットに対し麻酔下に、微小透析用プローブと鉄イオン微量注入用のガイドカニュレを右側扁桃体に留置した。精製したスピントラップ剤POBNのRinger溶液(500mM)の2ul/minの灌流を2時間行った後、FeCl3水溶液を1.0ul注入し、20分間隔で灌流液を回収した。回収毎に電子スピン共鳴(ESR)計測を行った。【結果】1)Glu遊離動態: 鉄イオン注入後より、約10uM前後のGlu上昇が数十分毎に出現してくることが確認された。このGlu上昇は、Ca⁺⁺非依存性であった。2)ラジカル発生動態: 鉄イオン注入後、20~40後よりESRシグナルが検出された。ESRシグナルはaN=15.7G、aHβ=2.5Gの超微細構造を有するため、脂肪酸ラジカル(L[•])であると同定された。【考察】Gluの放出機構はvesicular由来、Gluトランスポーター(EAATs)由来、細胞膜障害由来のものに分類される。鉄イオン注入後のGlu上昇がCa⁺⁺非依存性であったことより、vesicular由来の可能性は低く、EAATsを介した逆向き輸送とラジカル攻撃による細胞障害由来の可能性が考えられる。しかし、in vitro ESRによるラジカル検出の時間分解能が低いため、Glu上昇とラジカル発生に関する時間的前後関係については明らかにすることは出来なかったが、鉄イオン注入後のGluとラジカル発生を捕捉した本研究は、外傷性てんかんの発生機序の生化学的解釈を支えてきたin vitroデータを支持するin vivoデータである。本実験で確認された数十分毎のGlu上昇によって誘導されると思われる扁桃体化学キンドリング効果が、鉄イオン注入後に形成されるてんかん原性異常獲得のメカニズムではないかと考察した。

P2-73

ペンチレンテトラゾールによるキンドリング痙攣とヒスタミン神経系

李 争艶^{1,2}、櫻井 映子¹、Jalal Izadi Mobarakeh¹、
飯沼 一字²、渡辺 武³、渡邊 建彦¹、谷内 一彦¹
¹東北大学医学系・薬理、²東北大学医学系小児、
³九州大・生体防御医学研

ヒスタミン神経系は痙攣に対して抑制的に作用するという幾つかの先行研究が存在する。今回、ヒスタミン神経系と痙攣との関連を明らかにするためにペンチレンテトラゾール (PTZ) によるキンドリング痙攣モデルをヒスタミンH1受容体ノックアウトマウス (H1KO) とICRマウスにおいて作成した。H1KOマウスにPTZ (30mg/kg) 25日間毎日投与してキンドリングモデルを作成して、PTZ投与後30分の痙攣のstagingと持続時間を測定した。野生型 (+/+) は有意にH1KO (-/-) に比べてキンドリング形成が抑制された。またヘテロ (+/-) は野生型とH1KOの間であった。このことは、キンドリング形成にH1受容体が重要な役割を果たすことを意味している。さらにICRマウスのキンドリング痙攣形成時に脳内ヒスタミン含量を測定した。キンドリング完成時に脳内ヒスタミン含量は増加した。増加した脳内ヒスタミン含量が神経由来か肥満細胞由来か現在検討中である。

P2-74

シュワン細胞における抗酸菌感染による神経栄養因子・サイトカインの発現

遠藤 真澄、野間口 博子、小林 和夫
国立感染症研究所ハンセン病研究センター

抗酸菌の一種であるMycobacterium leprae (M.leprae) はシュワン細胞に特異的に感染し、末梢神経炎を引き起こす。神経炎の発症機構は不明であり、化学療法により原因菌を完全に排除しても残存し、適切な治療方法や予防方法も確立されていない。神経組織の再生・修復にシュワン細胞由来生理活性物質は重要な役割を果たしていると考えられているが、M.leprae 感染に伴うその動態は全く不明である。そこで今回我々は、株化したシュワン細胞にM.leprae を感染させ、シュワン細胞由来生理活性物質の発現を解析した。

ラット坐骨神経より樹立したシュワン細胞株にM.lepraeを感染させた後、経時的に細胞より全RNAを分離し、RT-PCR法にて神経栄養因子、それらのレセプター、サイトカイン、ケモカインmRNA発現の感染に伴う変動を解析した。同時にM.leprae 感染シュワン細胞株培養上清を初代培養神経細胞に添加し、突起伸長並びに生存維持に及ぼす影響について検討した。

樹立したシュワン細胞株は、NGF、BDNF、NT-3、GDNF、CNTF、IGF-1、TrkA、p75、gp130、NCAM、IL-1、IL-12、IL-18 並びに RANTES mRNAの構成的発現を認めた。M.leprae 感染に伴いNT-3、GDNF、RANTES mRNA 発現のupregulateを認めた。一方、M.leprae 感染シュワン細胞株培養上清の添加により、初代培養神経細胞の生存率は126%に増加し(p<0.05)、また突起伸長の効果も認めた。

M.leprae 感染に伴う神経炎の組織再生・修復に、シュワン細胞由来生理活性物質が機能している可能性が示唆された。学会ではBCG等他の抗酸菌感染に伴う結果も合わせて考察する。

(厚生科学研究費新興・再興感染症)

編集後記

この度、第42回日本神経化学会の抄録集をお届けできることを幸いに存じます。本学会の初期には、学会抄録を作成するのに多大な労力を払ったことが思い出されます。昨今、コンピューターなどの機器の発達により、抄録集を作成するのに費やされる時間が短縮され、その分研究に勤しめるようになりました。本大会では、出来るだけ多彩なトピックを取り上げ、神経化学の研究で得られた成果がどれだけ社会に役立つかをアピールすることも一つの目的に致しました。

本抄録作成にあたって、数々のご助言を賜ったプログラム委員や組織委員の先生方、裏方として努力してくれた広島大学医学部第三内科のスタッフの方々、教室を取りまく皆様方の一方ならぬご支援に心よりお礼を申し上げます。

9月中旬の広島は眼にも舌にも身体にも心地よい所です。テニスの同好会も予定されておりますし、観光に、味覚に、広島土地を十分に堪能して頂ければ幸いです。

(第42回日本神経化学会会長 中村重信)

静注用人免疫グロブリン製剤

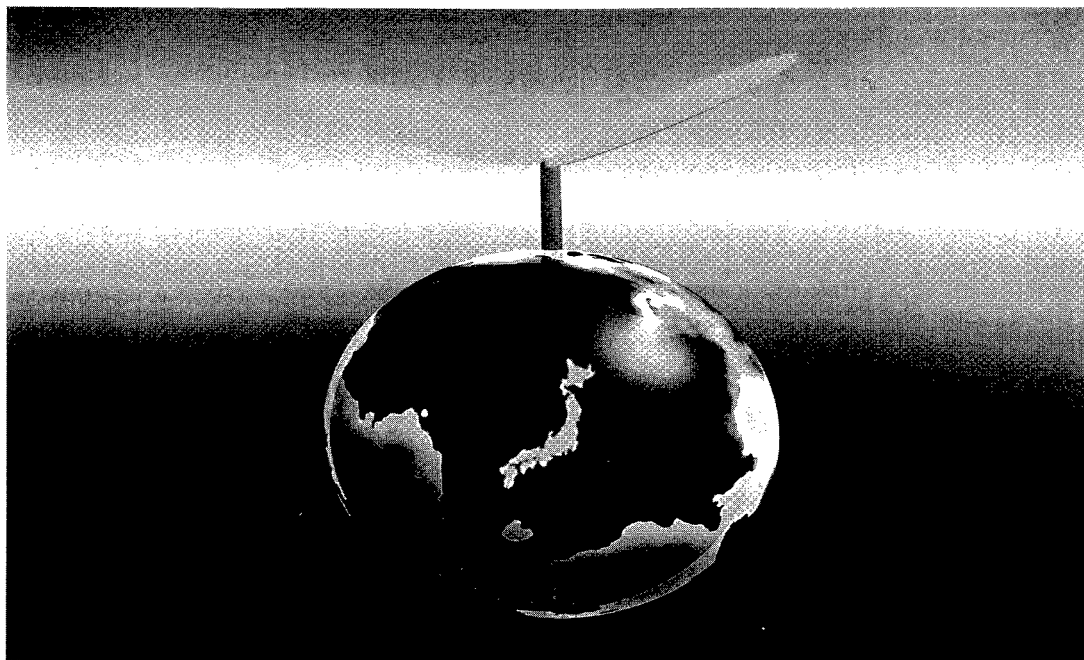
薬価基準収載

指定医薬品

献血グロベニン[®]-I-ニチャリ

〈乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン〉

[本剤は、貴重な血液を原料として製剤化されたものであるので、
その旨を十分留意し、適切な使用について配慮をお願いします。]



禁忌： 本剤の成分に対しショックの既往歴のある患者さんには投与しないでください。

原則禁忌： 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者さんには慎重に投与してください。

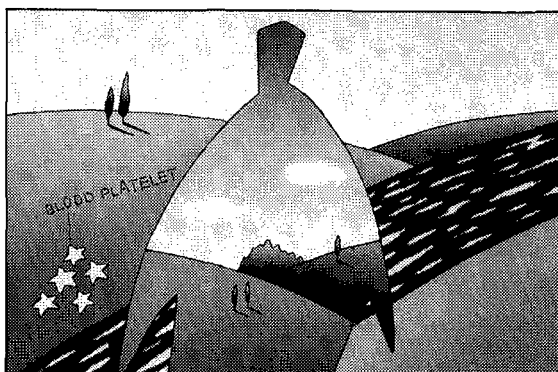


■ 効能・効果、用法・用量、使用上の注意等については、添付文書をご参照ください。

製造（資料請求先）
▲ **日本製薬株式会社**
〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番8号

販売
▲ **武田薬品工業株式会社**
〒540-8645 大阪府中央区道修町四丁目1番1号

1999年5月作成 (K)



血行、良好

血流障害改善のために、 抗血小板療法

〔警告〕

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、無顆粒球症、重篤な肝障害等の重大な副作用が主に投与開始後2か月以内に発現し、死亡に至る例も報告されている(「重大な副作用」の項参照)。

1. 投与開始後2か月間は、特に上記副作用の初期症状の発現に十分留意し、原則として2週に1回、血球算定、肝機能検査を行い、上記副作用の発現が認められた場合には、ただちに投与を中止し、適切な処置を行うこと。本剤投与中は、定期的に血液検査を行い、上記副作用の発現に注意すること。

2. 本剤投与中、患者の状態から血栓性血小板減少性紫斑病、顆粒球減少、肝障害の発現等が疑われた場合には、投与を中止し、必要に応じて血液像もしくは肝機能検査を実施し、適切な処置を行うこと。

3. 本剤の投与にあたっては、あらかじめ上記副作用が発生する可能性があることを患者に説明するとともに、副作用を示唆する症状があらわれた場合には、服用を中止し、ただちに医師等に連絡するよう患者を指導すること。

〔禁忌(次の患者には投与しないこと)〕

1. 出血している患者(血友病、毛細血管脆弱症、消化管潰瘍、尿路出血、喀血、硝子体出血等)〔止血が困難になることが予想される。〕

2. 重篤な肝障害のある患者〔肝障害がさらに悪化するおそれがある。〕

3. 白血球減少症の患者〔本剤の副作用として白血球減少症が報告されているので、より重篤な症状になるおそれがある。〕

4. 塩酸チクロピジンによる白血球減少症の既往歴のある患者〔再投与により白血球減少症を起こすおそれがある。〕

5. 塩酸チクロピジンに対し過敏症の既往歴のある患者

〔効能・効果〕

○血管手術および血液体外循環に伴う血栓・塞栓の治療ならびに血流障害の改善
○慢性動脈閉塞症に伴う潰瘍、疼痛および冷感などの阻血性諸症状の改善
○虚血性脳血管障害(一過性脳虚血発作(TIA)、脳梗塞)に伴う血栓・塞栓の治療
○クモ膜下出血術後の脳血管収縮に伴う血流障害の改善

〔用法・用量〕

○血管手術および血液体外循環に伴う血栓・塞栓の治療ならびに血流障害の改善には、塩酸チクロピジンとして、通常成人1日200～300mg(錠:2～3錠または細粒:2～3g)を2～3回に分けて食後に経口投与する。
○慢性動脈閉塞症に伴う潰瘍、疼痛および冷感などの阻血性諸症状の改善には、塩酸チクロピジンとして、通常成人1日300～600mg(錠:3～6錠または細粒:3～6g)を2～3回に分けて食後に経口投与する。
○虚血性脳血管障害に伴う血栓・塞栓の治療には、塩酸チクロピジンとして、通常成人1日200～300mg(錠:2～3錠または細粒:2～3g)を2～3回に分けて食後に経口投与する。なお、1日200mg(錠:2錠または細粒:2g)の場合には1回に投与することもできる。
○クモ膜下出血術後の脳血管収縮に伴う血流障害の改善には、塩酸チクロピジンとして、通常成人1日300mg(錠:3錠または細粒:3g)を3回に分けて食後に経口投与する。

なお、年齢、症状により適宜増減する。

〔用法・用量に関連する使用上の注意〕
手術の場合には、出血を増強するおそれがあるため、10～14日前に投与を中止すること。ただし、血小板機能の抑制作用が求められる場合を除く(「薬効薬理」の項参照)。

〔使用上の注意〕

1. 慎重投与(次の患者には慎重に投与すること)

- 1) 月経期間中の患者
〔月経血が増加するおそれがある。〕
- 2) 出血傾向ならびにその原因のある患者
〔出血を増強するおそれがある。〕
- 3) 肝障害またはその既往歴のある患者
〔肝障害を起こすおそれがある。〕

- 4) 白血球減少症の既往歴のある患者
〔再び白血球減少症を起こすおそれがある。〕
 - 5) 手術を予定している患者
〔「用法・用量」に関連する使用上の注意の項参照〕
 - 6) 高齢者(「高齢者への投与」の項参照)
2. 相互作用
併用注意(併用に注意すること)
パルビツール酸誘導体、テオフィリン、フェニトイン、抗凝固薬(ワルファリン等)、血小板凝集抑制作用を有する薬剤(アスピリン等)、血栓溶解薬(ウロキナーゼ、アルテプラゼ等)、シクロスポリン

3. 副作用

副作用発生状況の概要

承認前の調査1,120例中報告された副作用は13.7%(153例)で、主な副作用は食欲不振1.5%(17件)、胃不快感1.5%(17件)等の消化器症状、皮下出血1.1%(12件)等の出血傾向であった。承認後における使用成績調査(6年間)6,813例中報告された副作用は6.8%(461例)で、主な副作用は鼻出血0.4%(30件)、皮下出血0.4%(27件)等の出血傾向、食欲不振0.3%(22件)、胃不快感0.3%(22件)、嘔気0.3%(22件)等の消化器症状、GPT上昇0.4%(28件)、GOT上昇0.3%(23件)等の肝機能障害であった。また、顆粒球減少は0.1%(9件)、黄疸は0.1%(4件)であった。

1) 重大な副作用(頻度不明)

- (1) 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)(主徴:血小板減少、破砕赤血球の出現を認める溶血性貧血、動揺する精神・神経症状、発熱、腎機能障害)
- (2) 無顆粒球症(初期症状:発熱、咽頭痛、倦怠感等)
- (3) 重篤な肝障害(初期症状:悪心・嘔吐、食欲不振、倦怠感、痙攣感、眼結膜黄染、皮膚の黄染、褐色尿等)
- (4) 下記の重大な副作用があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止し、適切な処置を行うこと。
 - ① 再生不良性貧血を含む汎血球減少症
 - ② 赤芽球癆
 - ③ 血小板減少症
 - ④ 出血(脳出血、消化管出血等の重篤な出血)
 - ⑤ 紅皮症

〔注〕自発報告において認められている副作用のため頻度不明。

★その他の使用上の注意等につきましては、製品添付文書をご参照ください。

抗血小板剤
指定医薬品

薬価基準収載



パナルジン®錠 細粒10%*
Panalidine® (一般名:塩酸チクロピジン)

* 細粒100g包装は創薬、指定医薬品です。

いのち、ふくらまそう。

第一製薬株式会社

資料請求先
東京都中央区日本橋三丁目14番10号
ホームページアドレス
<http://www.daichipharm.co.jp/>

99.7(A4)

LOK

New Angiotensin II Receptor Blocker

1999

1999



GOOD NEWS

持続性アンジオテンシンⅡ受容体拮抗剤

指定医薬品
要指示医薬品

ブロプレス[®]錠 2・4・8・12

(カンデサルタン シレキセチル錠)

■効能・効果、用法・用量、禁忌・使用上の注意および取扱い上の注意等については、添付文書をご参照ください。

BLOPRESS[®]


武田薬品工業株式会社

〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号
 ホームページ <http://www.takeda.co.jp/> (9904:B52-2)

■(9904:B52-2)

意欲。



脳梗塞後遺症に伴う
慢性脳循環障害による
意欲低下の改善に

禁忌(次の患者には投与しないこと)

頭蓋内出血後、止血が完成していないと考えられる患者〔出血を助長するおそれがある。〕

腦循環・代謝改善劑

薬価基準収載

サアミオン®錠・散

Sermion® (ニセルゴリン製剤)

指定医薬品

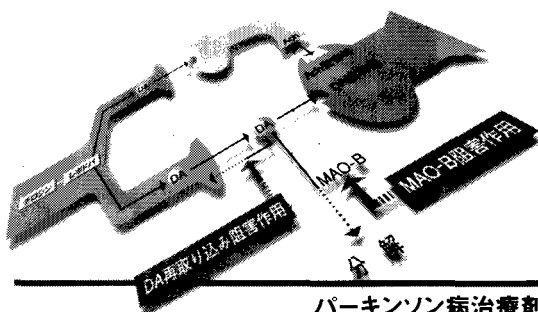
●使用上の注意等については、製品添付文書をご参照ください。

※使用上の注意の改訂には十分ご注意ください。



〈資料請求先〉

田辺製薬株式会社
大阪市中央区道修町3丁目2番10号
<http://www.tanabe.co.jp/>



特 徴

1. 本邦初の選択的MAO-B阻害によるパーキンソン病治療剤です。
2. 脳内ドパミンの代謝を抑えることにより、ドパミン・モジュレーターとして、治療効果を延長します。
(1) ドパミン機能増強作用
(2) ドパミン機能持続作用
3. 副作用発現率は36.3% (488例中177例)でした。(承認時)

■効能・効果

次の疾患に対するレボドパ含有製剤との併用療法
パーキンソン病（過去のレボドパ含有製剤治療において、十分な効果が得られていないもの：Yahr重症度ステージI～IV）

パーキンソン病治療剤

薬価基準収載

劇薬
覚せい剤原料
指定医薬品
要指示医薬品

エフピー錠 2.5
FP (塩酸セレギリン錠)

新発売

■警告

1. 本剤と三環系抗うつ剤（塩酸アミトリプチリン等）との併用はしないこと。また、本剤の投与を中止してから三環系抗うつ剤の投与を開始するには少なくとも14日間の間隔を置くこと。（「相互作用」の項参照）
2. 本剤は用量の増加とともにMAO-Bの選択的阻害効果が低下し、非選択的MAO阻害による危険性があり、また更なる効果が認められないため、1日10mgを超える用量を投与しないこと。（「過量投与」の項参照）

■禁忌（次の患者には投与しないこと）

1. 本剤に対し過敏症の既往歴のある患者
2. 塩酸ベチジンを投与中の患者（高度の興奮、精神錯乱等の発現が報告されている。）
3. 非選択的モノアミン酸化酵素阻害剤（塩酸サフラジン）を投与中の患者（高度の起立性低血圧の発現が報告されている。）
4. 精神分裂病又はその既往歴のある患者（精神症状の悪化が報告されている。）
5. 覚せい剤、コカイン等の中枢興奮薬の依存又はその既往歴のある患者
6. 三環系抗うつ剤（塩酸アミトリプチリン等）を投与中あるいは中止後14日間の患者（「相互作用」の項参照）
7. 選択的セロトニン再取り込み阻害剤（マレイン酸フルボキサミン）を投与中の患者（「相互作用」の項参照）

●その他の使用上の注意等については製品添付文書をご参照ください。また、使用上の注意の改訂に十分ご留意ください。

製造発売元

提携

藤本製薬株式会社 Sanofi-Chinoin

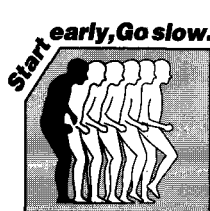
大阪府松原市西大塚1丁目3番40号

【資料請求先】 藤本製薬株式会社 医薬情報室 〒100-0005 東京都千代田区丸の内1丁目1番1号（パレスビル）

☎0120-545-427

Bo

NOVARTIS



持続性ドパミン作動薬

薬価基準収載

パーロデル® 2.5mg

劇薬 指定医薬品 要指示医薬品 注意—医師等の処方せん・指示により使用すること

Parlodel® メシル酸プロモクリプチン錠

精神活動改善剤・パーキンソン症候群治療剤
抗A型インフルエンザウイルス剤

薬価基準収載

シンメトレル® 錠 50mg
錠 100mg
細粒

指定医薬品 要指示医薬品 注意—医師等の処方せん・指示により使用すること

Symmetrel® 塩酸アマンタジン製剤

●各製品の効能・効果、用法・用量、使用上の注意等については、添付文書をご参照ください。

販売（資料請求先）

ノバルティス ファーマ株式会社
東京都港区西麻布4-17-30 〒106-8618

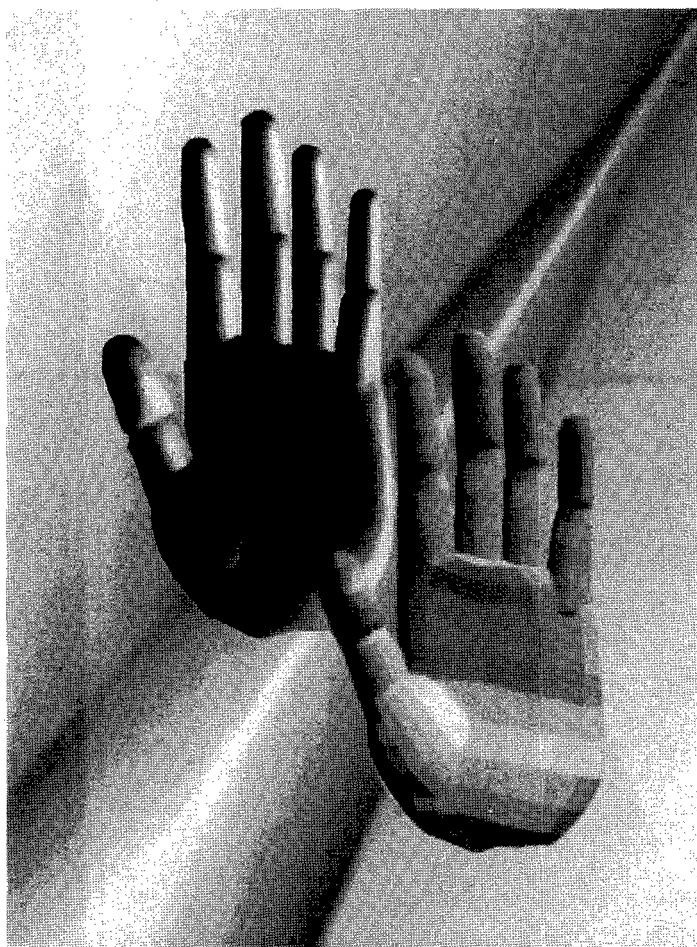
製造 **日本チバガイギー株式会社**
兵庫県宝塚市美幸町10番66号 〒665-8666

神・経・修・復

メチコバルはエーザイが独自に合成・開発した、メコバラミン(メチルB₁₂)製剤です。メチコバルは核酸・蛋白合成・リン脂質合成を促進し、障害された神経を修復します(ラット、*in vitro*)。臨床的には末梢性神経障害に伴うしびれ・痛み・麻痺を改善します。注射は急性期や難治性の神経疾患、入院患者さんに適しています。副作用発現率は経口で〇・九六%(二四六/二五、一八〇例)で、主なものは食欲不振、胃腸障害、悪心、下痢などです。(一九八五年十一月)

又、注射では〇・四五%(十三/二八七二例)で、主なものは発疹などです。(一九九四年四月)

重大な副作用として、注射でアナフィラキシー様反応を起こすことがあります。



効能・効果

末梢性神経障害、
ビタミンB₁₂欠乏による巨赤芽球性貧血(注射液 500 μ g のみ)
[効能・効果に関連する使用上の注意]
本剤投与で効果が認められない場合、月余にわたって漫然と使用すべきでない。

用法・用量

錠 500 μ g：通常、成人は1日3錠(メコバラミンとして1日1,500 μ g)を3回に分けて経口投与する。ただし、年齢及び症状により適宜増減する。
錠 250 μ g：通常、成人は1日6錠(メコバラミンとして1日1,500 μ g)を3回に分けて経口投与する。ただし、年齢及び症状により適宜増減する。
細粒：通常、成人は1日3包(メコバラミンとして1日1,500 μ g)を3回に分けて経口投与する。ただし、年齢及び症状により適宜増減する。
注射液 500 μ g(末梢性神経障害の場合)：通常、成人は1日1回1アンプル(メコバラミンとして500 μ g)を週3回、筋肉内または静脈内に注射する。ただし、年齢及び症状により適宜増減する。
注射液 500 μ g(巨赤芽球性貧血の場合)：通常、成人は1日1回1アンプル(メコバラミンとして500 μ g)を週3回、筋肉内または静脈内に注射する。約2ヵ月投与した後、維持療法として1〜3ヵ月に1回1アンプルを投与する。

使用上の注意

1. 内服剤

1. 副作用

総症例 15,180 例中、146 例(0.96%)の副作用が報告されている。(副作用発現頻度調査終了時)

	0.1〜5%未満	0.1%未満
消化器	食欲不振、悪心・嘔吐、下痢	
過敏症		発疹

2. 適用上の注意

薬剤交付時(錠)

PTP包装の薬剤はPTPシートから取り出して服用するよう指導すること。(PTPシートの誤飲により、硬い鋭角部が食道粘膜に刺入し、更には穿孔をおこして縦隔洞炎等の重篤な合併症を併発することが報告されている)

3. その他の注意

水銀及びその化合物を取り扱う職業従事者に長期にわたって大量に投与することは避けることが望ましい。

2. 注射剤

**1. 副作用

総症例 2,872 例中、13 例(0.45%)の副作用が報告されている。(再審査終了時)

** (1) 重大な副作用(頻度不明)

アナフィラキシー様反応 血圧降下、呼吸困難等のアナフィラキシー様反応を起こすことがあるので、観察を十分に行い、このような症状があらわれた場合には、直ちに投与を中止し、適切な処置を行うこと。

(2) その他の副作用

	0.1%未満	頻度不明
過敏症(注)	発疹	
その他	頭痛、発熱感	発汗、筋肉内注射部位の疼痛・硬結

注) このような症状があらわれた場合は、投与を中止する。

2. 適用上の注意

(1) 投与時

光分解を受けやすいので、開封後直ちに使用するとともに、遮光に留意すること。

(2) 筋肉内注射時

筋肉内に投与する場合は、組織・神経などへの影響を避けるため、下記の点に注意すること。

- 1) 同一部位への反復注射は避けること。なお、未熟児、新生児、乳児、小児には特に注意すること。
- 2) 神経走行部位を避けるよう注意すること。
- 3) 注射針を刺入したとき、激痛を訴えたり、血液の逆流を見た場合には、直ちに針を抜き、部位をかえて注射すること。

(3) アンプルカット時

本品はワンポイントカットアンプルであるが、アンプルのカット部分をエタノール綿等で清拭してからカットすることが望ましい。

* 1997年5月改訂

** 1998年11月改訂

ご使用に際しては添付文書をご参照ください。

末梢性神経障害治療剤



メチコバル®

錠500 μ g・錠250 μ g/細粒/注射液500 μ g

—メコバラミン製剤—



エーザイ

〒112-8088 東京都文京区小石川4-6-10
資料請求先：医薬企画部メチコバル係

H-Ki 0011

〈薬価基準収載〉

伝えるサープル 伝わるシグナル

脳梗塞後遺症に伴う情緒障害
(不安・焦燥、抑うつ気分)の
改善に、サープル。

- 特 性**
1. 脳梗塞後遺症に伴う情緒障害
(不安・焦燥、抑うつ気分)を改善します。
 2. 脳内シナプス伝達を促進します(モノアミン系神経伝達物質の放出を促進します)。
 3. アセチルコリン作動性神経系に作用し、
神経伝達を調節します(ラット)。
 4. 副作用発現率は9.2% (93/1,011例) (臨床検査値異常頻度集計(1993年4月))

禁忌(次の患者には投与しないこと)
妊婦又は妊娠している可能性のある婦人
〔動物実験で胎児毒性(波状肋骨、頸肋
骨痕)が報告されている〕

効能又は効果

下記疾患に伴う情緒障害(不安・焦燥、抑うつ気分)
の改善
脳梗塞後遺症

用法及び用量

通常、成人にはアニラセタムとして1回200mgを
1日3回経口投与する。なお、年齢、症状により適
宜増減する。

〈用法及び用量に関連する使用上の注意〉

投与期間は、臨床効果及び副作用の程度を考
慮しながら慎重に決定するが、投与12週で効果
が認められない場合には投与を中止すること。

使用上の注意

1. 重要な基本的注意

本剤の使用にあたっては、脳梗塞後遺症である
ことを確認すること。確認にあたっては、原
則として頭部CT像等の画像診断が行われている
ことが望ましい。

2. 副作用

承認時までの調査1,011例において、副作用
(臨床検査値異常を含む)は93例(9.2%)に認
められた。主な副作用は、GPT上昇15件
(1.5%)、ALT上昇8件(0.8%)、GOT上昇7件
(0.7%)、発疹7件(0.7%)等であった。なお、
次のような副作用があらわれた場合には、症状
に応じて適切な処置を行うこと。

種 類	0.3～2%未満 又は頻度不明	0.3%未満
精神神経系	興奮、頭痛、頭暈 幻覚*、歩行障害* 頭がぼーっとする* 傾眠*、しびれ感*	めまい、譫妄、不眠 精神不安定 異常行動
消化器	嘔気、食欲不振	嘔吐、下痢、腹痛
過敏症*	発疹	痒痒感
血 液	白血球減少、血小板減少	貧血
肝 臓	GOT上昇、GPT上昇 ALT上昇、LDH上昇 ビリルビン上昇*	γ-GTP上昇
腎 臓	BUN上昇、排尿障害* クレアチニン上昇*	—
そ の 他	倦怠感*	顔面潮紅、耳鳴

注1：投与を中止し、適切な処置を行うこと

※その他の使用上の注意等は添付文書
をご覧ください。

脳血管障害性精神症状改善剤

指定医薬品・要指示医薬品

薬価基準収載

サープル錠 100 200

SARPUL®

アニラセタム

(資料請求先)

富山化学工業株式会社
〒160-0023 東京都新宿区西新宿3-2-5

Roche

<http://www.nipponroche.co.jp/>

脳血管障害性精神症状改善剤
指定医薬品、要指示医薬品

ドラガバ®

錠100・錠200 〈アニラセタム製剤〉

Draganon® Roche 薬価基準収載

注意—医師等の処方せん・指示により使用すること

製造・販売元〈資料請求先〉

日本ロシュ株式会社
〒105-8532 東京都港区芝2-6-1

禁忌、効能・効果、用法・用量、使用上の注意等の

詳細については、製品添付文書をご参照ください。

1999年2月作成

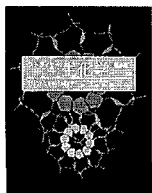
トッパンの自然科学専門書

好評発売中

ストライヤー

生化学 第4版

A4変型版 全5色刷り 上製本 ケース入り
1,152ページ 本体価格 14,563 円+ 税



<原著者>
L. ストライヤー

<監訳者>
入村達郎 (東京大学薬学部教授)
岡山博人 (東京大学医学部教授)
清水孝雄 (東京大学医学部教授)

学生、院生、研究者にバイブルとして愛読されているストライヤー生化学第4版。

この1冊で、生化学・分子生物学のあらゆる分野を十分にカバーできる良書。

第I部 生命の分子設計／第II部 タンパク：高次構造、動態、機能／第III部 代謝エネルギー：生成と貯蔵／第IV部 分子構築のための素材の生合成／第V部 遺伝子：複製と発現／付録

Natureでテキストとして最適と絶賛!!

ニューロンの生物学

A4変型版 並製 カラー図版多数・用語集つき
664ページ 本体価格 8,000 円+ 税



<原著者>
F. デルコミン

<訳者>
小倉明彦 (大阪大学理学部教授)
富永恵子 (大阪大学理学部助手)

本書は学部生向けの神経生物学の教科書として、新しく書き下ろされたものです。この分野を志す学生のファーストテキストとして、また、この科学分野に関心を持つ社会人への解説書として、最適。

第1部 神経生物学を学ぶために／第2部 細胞間コミュニケーション／第3部 感覚系／第4部 運動系／第5部 統合系と動物行動の神経基盤／第6部 神経系の柔軟性／付章



株式
会社

トッパン

〒108-0023 東京都港区芝浦3-19-26 TEL:03-5418-2535 FAX:03-5418-2529
ホームページ <http://toppan-pub.topica.ne.jp/>

人名索引

(A)

Alcino Silva J. WS7-5
 Avraham Hava WS3-1
 阿部 一樹 WS1-6
 安倍 博 P2-42
 阿部 康二 WS2-9 WS2
 阿部 輝雄 P1-13
 足立 香代 P2-54
 安達 直樹 P2-50 P1-51
 足立 達美 P1-24
 足立 芳樹 WS9-6
 相原 雅子 V4-01
 会津 善紀 P1-78
 赤池 昭紀 S7-4
 赤沼 のぞみ P1-59
 秋口 一郎 S3-3
 新郷 明子 P2-38 P2-14
 秋光 知英 S8-PL
 秋田 裕美 P1-05
 秋山 一文 S2-1
 秋山 魁一 P1-27
 亀吉 秀隆 S8-3
 天野 賢示 V5-01
 安藤 正人 P2-68
 安藤 進 V4-04
 案浦 洋一 P2-46
 青山 峰芳 P2-37
 新井 平伊 P1-77 S2
 荒川 義弘 P2-39 WS9-3
 荒木 敏行 V5-09
 荒木 亘 V3-06
 有波 忠雄 P1-64 P1-65 WS8-4
 浅井 清文 P2-37 P1-23 WS8-6
 浅井 聡 WS2-5 WS8-6
 浅見 利雄 WS7-2
 浅野 徹 P1-36
 浅沼 幹人 P2-02 P1-55
 阿相 皓晃 P1-27 P1-29 P1-24
 P1-11

(B)

Banks W. A. WS8-7
 馬場 明道 V6-01
 馬場 広子 P1-40 P1-05 S3-PL
 板東 良雄 V4-06

(C)

Casamenti Fiorella P2-60
 Citron Martin S10-10
 許 波 P1-63
 蔡 榮浩 P2-24
 千葉 賢三 V5-02
 知久馬 敏幸 P2-09

(D)

Davies Alun M WS7-6
 Donati, R. J. WS4-8
 田 慶宝 P1-09
 傳法 倫久 P2-66 V4-03
 土肥 謙二 WS8-7
 土肥 敏博 V1-08
 土井 拓 P2-71 P2-72

(E)

海老澤 尚 P2-42

江頭 亨 P1-56
 遠藤 啓吾 V4-01
 遠藤 玉夫 P1-54 P1-66
 遠藤 之洋 WS9-3
 遠藤 真澄 P2-74
 遠藤 仁 P1-08
 榎戸 靖 P2-50 P1-51
 衛藤 義勝 P2-56 P2-26 WS7-6

(F)

Fernando Lopez-Redondo WS6-4
 P2-40
 藤川 直人 P2-35
 藤木 幸夫 WS3-6
 藤本 勝巳 V1-05
 藤本 貞毅 P1-69
 藤岡 大助 P2-32
 藤澤 仁 P2-10 P2-21
 藤沢 嘉勝 V3-09
 藤田 佳織 P1-23
 藤田 公和 P2-57 P2-68
 福田 宏之 V3-02
 福田 健夫 WS9-1
 福井 文子 V4-04
 福井 裕行 V1-05
 福岡 五龍 S8-3
 福本 拓治 P1-60
 福永 浩司 V1-10 V1-11 V3-03
 V3-04 WS1-4
 福所 英里子 V2-03 P2-64
 福内 靖男 P2-66 V4-03
 古川 昭栄 P2-31 P2-34 WS7-2
 V5-06
 二村 隆史 P2-27
 二木 啓 P2-66

(G)

Gabrieli John D. S10-7
 後藤 文夫 P1-49
 後藤 雄一 S8-2

(H)

Harrington Charles R P1-77
 Hoeijmakers Jan. H. J. P2-50 P1-51
 芳賀 達也 P1-08
 萩野 洋子 S2-5
 萩原 民雄 P2-13
 浜之上 誠 WS7-6
 韓 春錫 P1-11 P1-37
 原 とも子 P1-67 P1-35
 原田 暁 P2-67
 長谷川 明子 P1-40
 長谷川 浩史 V3-01 V3-03 V3-04
 長谷川 光広 WS6-7
 橋井 美奈子 P1-01
 橋本 敦史 P1-19 P1-20
 橋本 亮太 V2-02 V2-03 P2-64
 橋本 恒一 P2-04
 橋本 喜次郎 P1-61
 畠中 寛 P1-53 P2-50 P1-51
 P2-19 P1-52 WS7
 V5-07 V5-08 V5-09
 林 崇 WS7-5
 林 秀樹 P1-68 P1-74
 林 謙介 P1-49 S4-2
 林 美都子 V1-03 V1-06

種木 修 S1-4
 秀 和泉 P2-08 V5-04 WS9-2
 東 洋一郎 P1-55
 東田 陽博 P1-01
 樋口 宗史 P1-63
 樋口 京一 WS5-3
 樋口 真人 V3-08
 永見 敏行 P2-62
 桧井 栄一 V1-04
 平林 敏行 P2-18
 平原 史樹 WS1-6
 平松 緑 V2-08
 平野 久 P2-09
 平野 均 V1-01
 平野 誠 P1-61
 平岡 秀一 S2-2
 平田 牧三 V1-01
 平田 洋子 P2-54
 廣瀬 源二郎 S3-2
 廣瀬 伸一 S8-3
 久永 真市 V6-03 P1-15
 久岡 一恵 WS4-7
 久恒 智博 WS1-3
 久山 哲廣 V1-05
 人見 淳一 P1-73 P2-16
 本多 敦子 P1-13
 本田 真知子 P2-52
 本田 静世 P2-40 WS6-4
 本田 岳夫 P1-39
 本藤 久雄 P1-61
 本郷 茂樹 P1-34 V6-08
 本間 研一 P2-42
 本間 さと P2-42
 本間 豊 P1-31 P1-32 WS6-2
 堀 均 P1-11
 堀 耕治 P2-49 P2-45
 堀 正二 S3-4 WS6-8
 堀 修 P1-06 V4-07
 堀江 秀典 WS6-7
 堀江 正男 WS6-7
 堀口 淳 P2-11 P2-15 P1-60
 堀越 嗣博 P1-42
 堀尾 修平 V1-05
 星 道生 P2-70
 星 直人 P1-01
 星川 裕 P1-17
 星野 潤 P1-43
 細谷 龍男 P2-26
 堀田 凱樹 S4-PL
 (I)
 Islam Ashrafui V2-04
 Ivanova Anna S3-PL
 衣斐 督和 S7-4
 一宮 智美 P1-25
 一瀬 宏 WS2-8
 井田 博幸 P2-56
 井田 逸朗 V4-01
 井出 利憲 S1-1
 五十嵐 道弘 P1-10
 五十嵐 修一 S5-1 S8-1
 井原 康夫 WS5-4 WS3-3 WS4-6
 V3-05
 飯田 順三 P1-23
 飯田 佳代 V2-11

飯沼 一字 P2-73
池田 順子 P2-67 S6-5
池田 穰衛 S5
池田 研二 S4-5
池田 正明 P2-42
池田 正行 P2-62
池上 浩司 P1-20 V2-05
池中 一裕 P1-05 P1-40 P1-41
V6-07 S3 S3-PL
壹岐 大祐 V5-01
今川 浩之 P2-13
今井 嘉紀 P1-16 WS4-3
今泉 和則 P1-73 P1-47 P1-72
P2-25 P2-16
今泉 美佳 P2-05
今村 一之 V2-02
井門 ゆかり WS3-5 追加発言
井本 敬二 S20-4 S5-4
稲垣 正俊 P2-11 P2-15
稲垣 好昌 WS6-7
稲熊 裕 V2-11 V5-05
稲村 直子 P2-50
稲永 由紀子 P1-42
稲津 正人 P1-07
稲生 英俊 WS2-4
井上 順雄 WS1-6 P1-04
井上 敦子 WS9-2 P2-08 V5-04
井上 和秀 WS9-5 V1-07 WS6-4
V5-04
井上 聖啓 P2-26
井上 幸江 P2-20
井上 辰志 WS6-3
井上 登美夫 V4-01
井上 雄一朗 P1-23
入谷 修司 S4-5
石橋 智子 P1-05
石黒 幸一 P1-15
石黒 浩毅 P1-65 P1-64
石黒 啓司 S5-3
石原 健 P1-08
石井 加代子 P1-37
石川 紘一 WS2-5 WS8-6
石川 哲也 WS3-2
石川 保幸 V5-08
石丸 裕久 P2-60
石田 敦彦 P2-10 P2-21
磯部 一郎 P1-70 P1-71
磯辺 俊明 P1-44
板倉 誠 P2-07 P2-22 WS6-9
板倉 徹 WS6 V2-10
板倉 康史 P2-30
伊丹 千晶 WS1-5
伊東 秀記 V2-11
伊藤 仁一 V6-06 V6-04
伊藤 康一 P1-24
伊藤 正利 S8-3
伊藤 誠二 WS9-8
伊藤 正敏 V3-08
伊藤 善規 P2-63
岩井 美和子 V5-05
岩間 久行 V1-02
岩本 郁子 V2-11
岩本 真知子 V4-04
岩崎 靖乃 S3-PL P1-40

岩瀬 環 P2-44
岩田 洋美 S8-3
(J)
日域 広昭 P1-60
(K)
Kulkarni, A. B. P2-17
鍋木 真理子 P2-58
門屋 利彦 WS6-7
鹿川 哲史 S3-PL V6-07
加賀谷 有行 P2-11 P2-15 P1-60
影山 肇 V6-09
景山 卓 WS8-3
貝淵 弘三 V2-03
開地 泰介 S2-5
垣下 浩二 V2-10
垣塚 彰 S5-PL
鎌田 仁 P2-71 P2-72
亀下 勇 P2-10 P2-21
亀谷 富由樹 P1-76
紙野 晃人 S1-2
神島 和代 WS7-7
金井 好克 WS8 WS8-2 P1-08
金沢 賢也 P1-31 P1-32 WS6-2
金澤 裕子 WS4-3 P1-16
神田 隆 WS8-5
金子 勲 WS5-5
兼子 直 S8 S8-5 S8-2
S8-3
金子 葉子 P2-03
菅野 雅元 WS2-1
菅野 敏夫 P1-49
嘉棟 洋陸 WS2-3
笠原 二郎 V1-11
笠井 陽子 P2-06
柏木 雄次郎 V2-03
片田 栄一 P2-36
片桐 秀晃 P2-11
片岡 喜由 P1-48 P1-22
片岡 正和 P2-22
片山 泰一 P1-72 P2-16
加藤 一磨 WS2-7
加藤 尚彦 WS1-6
加藤 兼房 V5-05 V2-11
加藤 みどり P1-75
加藤 聖 V6-02
加藤 泰治 P2-37 P1-23 WS8-4
加藤 尚彦 P1-04
加藤 武 P1-46 P2-09
勝又 隆太 S4-1
桂 勲 P1-08
川端 昌弘 P1-38
川端 輝江 V4-04
川口 三郎 WS6-3
川口 綾乃 WS6-6
川原 正博 P1-75
川原 健 P1-57
川井 千景 WS3-2
河合 洋子 P2-37 P1-23
河合 良訓 P1-06
川上 秀史 P1-77 P1-33 P2-59
P2-55 S7-5 S5-4
WS3-5 追加発言
川俣 貴一 WS7-4

川又 敏男 V3-01 V3-03 V3-04
河本 竹正 V2-04 V6-09
川村 勇樹 P1-74
川野 仁 WS6-7
河野 真子 S3-PL P1-41
川ノ口 潤 P2-05
瓦井 俊孝 P2-55
河瀬 斌 P2-70
川島 麗 P2-49
河田 啓介 P2-20
川添 陽子 P2-26
賀谷 直樹 P1-19
城所 良明 WS1-2
菊地 臣一 WS6-2
木元 克輔 WS9-3 P2-39
吉良 潤一 S6-3 S6 WS3-4
岸本 正巳 P2-05
岸本 年史 P1-23
北田 一博 S8-PL
北川 一夫 S3-4 WS6-8
北村 邦男 P1-28
北村 健 P2-59 P1-33
木谷 隆子 P2-21
北山 滋雄 V1-08
鬼頭 昭三 P2-14 P2-38
木内 一壽 P2-54
木山 博資 P2-24 WS6-1 V4-08
清澤 秀孔 P1-31 P1-32 P2-69
胡 建国 P1-78
木幡 陽 P1-66 P1-54
小林 健一郎 S8-3
小林 和夫 P2-74
小林 正克 P1-35
小林 三和子 P2-33
古賀 毅 P2-22
河野 朋子 WS1-5
郡山 達男 P2-67 S6-5
高坂 新一 WS6-4 WS7-7 WS5-2
WS4-3 V5-04 P1-16
P2-40
小出 玲爾 S5-1 WS2-7
小池 亮子 WS3-5
小池 達郎 P1-50 P1-18 P1-20
P1-19 P1-21 WS7-1
V2-05
小糸 寿美 P1-26
小泉 修一 V1-07
小嶋 久子 P2-49 P2-47 V2-07
小島 正己 V5-07
小久保 稔 P2-37
駒井 清暢 P2-58
駒野 宏人 P1-74
小松 真紀子 V2-08
小宮 義璋 P1-10 P1-14 WS4
V6-03
小宮山 徳太郎 P1-64 P1-65
近 一夫 V4-04
近藤 文雄 P2-61
近藤 郁子 P1-12
小西 明雄 P1-53
小堺 有史 V4-03
古武 弥一郎 P2-52 S7-2
小谷 政春 P1-30
高坂 新一 P2-40

中村 和弘	P1-46			
中村 和生	V2-07	P2-49		
中村 和雄	P2-01			
中村 雅之	S8-2	V4-02	P1-65	
	P1-64			
中村 重信	会長講演	S5-4	S10-1	
	WS3-1	WS1	S7-5	
	S6-5	WS3-5	追加発言	
	WS2-6	P1-77	P1-78	
	P1-33	P2-55	P2-59	
	P2-67			
中村 静雄	P2-46			
中村 祥子	P1-50			
中村 俊	WS1-5			
中村 泰子	P2-40			
中村 洋一	P1-48	P1-22	V4-09	
中村 祐	WS4-4	S10-6	P2-64	
	V2-02	V2-03		
中野 泰子	P1-54			
中野 有香	S10-6			
中尾 直之	WS6-9	V2-10		
中岡 龍貴	V5-01			
中島 昭	P2-03			
中島 健二	WS9-6			
仲田 義啓	WS9	WS9-2	V5-04	
	P2-08	P2-15		
中津 可道	P2-50	P1-51		
中山 耕造	P1-09			
中山 孝	WS1-6			
中山 均	P2-19			
中山 幸代	P1-11			
中澤 淳	P2-20			
中澤 敬信	WS1-3			
難波 寿明	P2-28			
涛川 一彦	V4-08	WS6-1		
直井 信	V2-09	S7-3		
那波 宏之	P2-27	P2-28	P1-58	
	WS7-5			
根津 竹哉	P1-03			
二階堂 琢也	P2-69	P1-31	P1-32	
	WS6-2			
西田 朗	WS4-7	P1-60		
西嶋 千晶	P2-39			
西島 正博	P2-47			
西川 徹	S2	S2-PL	S20-2	
	S2-2	V1-02		
西木 禎一	P2-05			
西村 伊三男	WS2-2	P1-67		
西中 直也	V6-08			
西野 仁雄	P1-05	P2-44		
西尾 チカ	P1-53	P1-52		
西岡 博文	V5-06			
西谷 しのぶ	S1-4			
西山 啓次	P1-52			
新田 淳美	P2-31	P2-34	V5-06	
	WS7-2			
野田 公一	WS3-5	追加発言		
野川 茂	V4-03	P2-66		
野口 浩	P2-30			
野間口 博子	P2-74			
野元 正弘	WS9-1			
野村 正彦	P2-45	P2-49	P1-29	
	P2-42	P1-28		
野村 靖幸	WS1-7	P2-51		

野中 良一	S2・5		
野々村 健	P2・30		
野崎 兼吉	S5・1		
野沢 りさ	WS6・7		
額田 敏秀	P1・03		
沼川 忠広	V5・07		
(O)			
大庭 明生	S3・PL		
小幡 邦彦	S4		
越智 一秀	WS3・5	追加発言	S6・5
	P2・67		
越智 隆弘	P2・24		
尾形 直則	V4・09	P1・48	
小川 祐人	WS6・6		
小川 和人	P2・68	P2・57	
小川 紀雄	P2・02	P1・55	P2・61
小川 智	V4・06	V4・07	
荻田 喜代一	V1・04		
小倉 明彦	P2・35	S20・7	
小倉 博雄	WS2・6		
大橋 隆	P1・34		
大橋 十也	WS7・6	P2・26	
大平 美紀	V6・09		
大木 武	P1・34		
大倉 多美子	P1・11		
大宮 誠	P2・34		
大森 啓充	WS2・6		
大西 浩史	P2・22		
大野 耕策	P2・66		
大野 知親	P2・46		
大沼 徹	S2・3		
大澤 郁朗	WS5・2		
大澤 圭子	WS6・4	WS4・3	P1・16
大島 登志男	P2・17		
大下 智彦	WS3・5	追加発言	
太田 成男	S1・2		
太田 秀臣	V2・11		
太田 茂	S7	S7・2	P2・52
	P2・53		
大谷 義夫	V2・07		
大槻 俊輔	WS6・8		
大矢 博昭	P2・71	P2・72	
大屋敷 孝雄	P1・45		
小鹿 幸生	P2・36	P1・41	P2・44
岡 美智子	P2・63		
岡田 元宏	S8・5		
岡田 亜希子	P2・15		
岡田 秀親	P2・44		
岡田 雅人	P1・26		
岡田 泰伸	S20・6		
岡戸 晴夫	V4・05		
岡本 泰昌	P2・11	P1・60	P2・15
	WS4・7		
岡村 信行	V3・08		
岡野 照	P1・09		
岡野 栄之	WS2・3	WS6・6	P1・42
大川 克也	WS6・7		
奥田 隆志	P1・08		
大熊 康修	WS1・7		
奥村 秀雄	V4・09		
奥村 茂樹	WS4・2		
奥野 幸子	P2・21		
大倉 陸美	S20・3		
大森 信彦	P1・17		

小野 道子	P2-30		
小野 功貴	V3-04		
小野田 学時	P1-39		
小野寺 理	S5-1	WS2-7	S8-1
大沼 佛一	S8-2		
折笠 瑠穂	P1-18		
織内 昇	V4-01		
納 光弘	S6-PL		
小山内 たか	P1-30		
大沢 ひろみ	P1-02		
太田 明	P2-03		
大津 洋	P2-28		
小山 文隆	WS3-3	V3-05	
小山田 正人	WS4-1		
小山田 ゆみ子	WS4-1		
小柳 清光	P2-26		
小沢 寛樹	WS4-8		
(P)			
Pant, H. C.	P2-17		
Pepeu Giancarlo		P2-60	
Pleasure David	S3-2		
(Q)			
范 企文	P1-71	P1-74	
(R)			
Rasenick, M. M.	WS4-8		
Rossor Martin N.	S10-5		
(S)			
Saffen David	P2-18		
Schenk Dale B.	S10-9		
Spitalnik, Steven L.		P1-66	
St. George-Hyslop Peter H.			S10-3
Subramani Suresh		WS3-1	
定方 哲史	V1-12		
鶯 直樹	P1-03		
西須 英雄	P1-13		
斉藤 真子	WS7-5		
斉藤 克	P2-47		
斉藤 真希	P2-47		
斎藤 尚亮	V3-01	S20-3	
斉藤 哲一郎	V6-07		
齋藤 利和	WS4-8		
酒井 偉久子	WS6-7		
阪井 一雄	S20-3		
酒井 久美子	P2-43		
酒井 規雄	S20-3		
坂本 剛	P2-26	P2-56	
坂本 安	P1-28		
坂本 ゆかり	P1-45		
桜川 宣男	P2-23	P1-42	V2-10
櫻井 映子	P2-73		
櫻井 香織	P2-38		
桜井 洋子	P1-27	P1-24	P1-29
三五 一恵	P2-48		
佐野 輝	P1-64	P1-65	S8-2
	S20-1	V4-02	
佐野 護	WS3-2		
笹 征史	S8	S8-PL	
笹原 武志	V2-07		
笹川 展幸	P2-05		
佐々木 文彦	WS4-2		
佐々木 英忠	V3-08		
佐々木 健	P1-77	V3-09	
佐々木 孝寛	P1-15		

佐々木 洋	WS4-3	P1-16			
佐藤 光	WS1-6				
佐藤 晶	S5-1				
佐藤 博	P1-39				
佐藤 一紀	P2-22				
佐藤 直也	P1-73	P1-72	P2-16		
佐藤 俊也	S5-1				
佐藤 雄治	P1-54	P1-66			
佐藤 公造	WS9	WS9-4			
佐藤 康二	P1-06				
沢木 和延	WS6-6				
澤田 秀幸	S7-4				
澤田 誠	WS6-5				
澤村 直哉	V3-05				
佐伯 清美	P1-38				
関口 真理子	P2-22				
関口 正幸	S20-2				
関川 賢二	V2-07				
関野 祐子	S4-2				
仙波 純一	P1-59				
仙波 恵美子	P1-06				
仙波 りつ子	WS9-3	V5-05			
千秋 達雄	P1-27				
瀬尾 寿美子	WS6-1				
芹川 忠夫	S8-PL				
芝崎 太	P1-17				
柴山 健三	P2-57				
重本 和宏	P1-12				
茂里 康	P2-10				
清水 信義	S7-PL				
清水 孝彦	V3-02				
清水 隆雄	WS9-1				
下濱 俊	WS8-3	WS8	S7-4		
	P1-69				
下畑 享良	S5-1	WS2-7			
下島 桐	P2-13				
新納 信江	WS3-4				
篠田 晃	P2-20				
篠原 弘明	P2-32				
篠原 慶子	P1-03				
新家 一男	WS7-4				
塩田 清二	WS8-7				
白井 康仁	S20-3				
白根 正智	P2-01				
白尾 智明	S4-2	V6-05			
白崎 竜一	S4-1				
白澤 信行	P2-12				
白澤 卓二	V3-02				
白鷹 増男	P2-49				
城谷 圭朗	V3-06				
穴倉 朋胤	V6-09				
志知 隆雄	S8-1				
正田 孝明	V3-09				
東海林 幹夫	P1-78				
司 秋生	P1-48	P1-22			
祖父江 元	WS7-8				
祖父江 和哉	WS8-4				
曾我 智子	P1-04				
十川 千春	P1-55				
祖川 由美	V1-09				
相馬 良明	WS6-7				
染矢 俊幸	P2-27	P1-58			
宋 時榮	P1-46				
菅野 純夫	V6-09				
須川 誠	P1-29				
菅原 正伯	WS2-7				
菅原 清	V6-02				
杉谷 誠一郎	P2-53				
杉山 博之	S8-3				
須原 哲也	S2-4	P1-59			
鈴木 宜雄	P2-31				
鈴木 重明	P2-66	V4-03			
鈴木 崇弘	P2-03				
鈴木 龍雄	P1-09				
鈴木 智久	V5-04				
鈴木 康之	WS3-7				
鈴木 稜	V6-09				
(T)					
田畑 秀典	P1-43				
田平 武	S10-4	V3-06			
田淵 明子	V5-01				
立花 太郎	P2-24				
田口 文章	V2-07				
田口 雅之	P2-47	P2-49			
田口 康智	V4-09				
泰地 睦夫	P2-30				
平 英一	WS4-2				
高田 尚幸	V2-04	V6-09			
高寺 恒雄	P1-45				
高木 正仁	P1-63				
高橋 均	S5-1				
高橋 勝宣	V1-02				
高橋 慶吉	V3-06				
高橋 誠	P2-27	P1-58			
高橋 正身	P2-06	P2-22	P2-05		
	P2-07	WS1-1	WS1		
高橋 将人	V6-09				
高橋 良輔	P1-78				
高橋 隆	V6-08				
高橋 聖一	P2-07				
高橋 勤	V2-09				
高橋 泰夫	WS2-5	WS8-6			
高橋 章	P2-60				
高橋 哲哉	S8-1				
高松 研	P2-41	V2-01			
高松 哲郎	WS4-1				
高村 千鶴子	WS5-2				
高野 弘樹	WS3-5				
高野 雅彦	WS6-7				
高島 明彦	WS4-5				
高田 邦昭	P1-49				
高山 房子	P1-56				
高安 盛	V6-09				
高沢 健一郎	WS6-8				
竹葉 淳	V4-09				
竹林 実	P2-11	P1-60	P2-15		
竹田 二美代	P2-13	P1-34	V6-08		
武田 弘志	P1-07	P1-62			
武田 順子	P1-31	P1-32			
武田 和美	P2-08	WS9-2			
武田 雅俊	V2-02	V2-03	P2-25		
	P2-64	WS4-4	S10-6		
竹田 稔	P2-13	P1-34	V6-08		
武田 伸一	V3-06				
竹橋 正則	WS5-6				
武井 延之	P2-28	V5-07			
竹本 研	WS2-2				
竹島 多賀夫	WS9-6				
竹下 歌織	WS6-7				
武富 保	V2-06				
竹内 郁夫	V5-05				
竹内 真由美	P2-69	P1-31	P1-32		
	WS6-2				
竹内 有輔	V1-10	P2-29			
竹内 裕	P1-02				
瀧 龍雄	V2-07				
田熊 一敏	V6-01				
玉井 郁巳	WS8-1				
玉井 洋一	P2-47	P2-49	V2-07		
玉岡 晃	P1-78				
田丸 輝也	P2-41				
玉谷 実智夫	V4-06	V4-08	V5-03		
	V4-07	V4-05	P1-06		
田村 達辞	P1-60				
田邊 敬貴	P1-64	P1-65	V4-02		
	S8-2				
田辺 勝久	P2-24	P2-25			
田邊 勉	S5-5				
田辺 康人	S4-3				
田中 千賀子	V3-01	V3-03	V3-04		
	P1-77				
田中 健一	P2-02	P1-55			
田中 喜久子	P1-76				
田中 亀代次	P2-50	P1-51			
田中 耕太郎	V4-03	P2-66			
田中 将也	V5-04				
田中 静吾	WS5-6				
田中 茂	WS6-8				
田中 秀逸	P1-19	P1-18	P1-21		
	WS7-1				
田中 敏博	S8-2				
田中 稔久	WS4-4	S10-6			
田中 康一	V4-04				
谷口 学	P1-06				
谷口 泰造	V3-01	V3-03	V3-04		
谷向 仁	P2-64				
谷向 知	V3-01	V3-03	V3-04		
谷野 浩子	P1-69				
谷浦 秀夫	P1-36				
田岡 万悟	P1-44				
田代 信雄	P1-57				
田代 朋子	V6-03	P1-14			
達 吉郎	P2-10				
田原 康孝	P2-15				
寺尾 章	S8-2				
寺島 明	V3-01	V3-03	V3-04		
手塚 徹	WS1-3				
戸莉 彰史	WS2-8				
東田 道久	P2-65				
遠山 正彌	P1-47	P1-73	P2-24		
	P1-72	P1-06	P2-25		
	P2-16	V4-06	V4-05		
	V4-08	V4-07	V5-03		
	WS2				
遠山 陽子	P1-25				
田路 浩正	P1-77				
土岐 完	WS4-8				
徳丸 潤	P2-71	P2-72			
富本 秀和	S3-3				
富田 基郎	P1-54				
富吉 勝美	V4-01				
富山 貴美	S1-5				

登島 至	WS2-7				若森 実	S5-4												P1-74	S10-8	WS5
融 道男	S2-PL				脇 初枝	V4-04												谷内 一彦	V3-08	P2-73
戸山 芳昭	WS6-6				脇田 英明	S3-3												矢嶋 隆一	P2-09	
豊岡 和彦	P2-27	P1-58			和中 明生	P2-69	P1-31	P1-32										安田 峯生	WS2-6	
豊里 晃	P1-63					WS6-2												保田 稔	P1-77	
土田 敦之	P2-30				制田 仁	WS2-9												安田 雄	S8-2	
土田 英人	S2-2				渡部 和彦	P2-56	P2-26	P2-48										八代 聖基	V1-03	
津田 誠	WS9-5				渡辺 秀栄	P1-59												矢崎 貴仁	P2-70	
津田 正明	V5-01				渡邊 真知子	WS9-3												横屋 幸彦	P1-32	P1-31 P2-69
津田 守弘	P1-14				渡辺 雅幸	S2-5													WS6-2	
辻 彰	WS8-1				渡邊 建彦	V3-08	P2-73											横山 秀克	P2-71	P2-72
辻 聡	P1-62				渡辺 武	P2-73												横山 茂	P1-01	S20-5
辻 繁勝	P2-12				渡辺 義文	V1-01												横山 信治	V6-04	V6-06
辻 省次	S5	S8-1	WS3-5		(Y)													米田 和広	WS8-4	
	S5-1	WS2-7			矢部 千尋	P2-04												米田 託成	P1-47	P2-25 P2-16
塚本 直大	P1-02				八木 敬子	V3-01												米田 悦啓	P2-24	
塚本 康浩	WS4-2				八木 健	S4-4												米田 幸雄	V1-04	
弦巻 立	P1-63				八木田 佳樹	WS6-8												米谷 美奈子	S8-3	
鶴尾 吉宏	P2-12				山田 浩司	V1-03												米澤 裕次	P1-57	
堤 哲之	P1-61				山田 正夫	S5-2												蔡 荣浩	V5-03	
鳥居 剛	P2-55				山田 雅司	P1-53	P1-52	V5-09										吉田 弘美	P1-25	
坪井 誠二	V1-03				山田 光則	S5-1												吉田 聖美	P1-53	
(U)					山田 猛	WS3-4	WS3											吉田 敏	P2-43	
内田 敦子	P1-15	V6-03			山田 康枝	P2-20												吉川 和明	P1-36	P1-67 P1-35
内田 彩子	P1-42				山口 凜	WS7-5													WS2-2	
内田 洋子	V3-07				山口 淳	V4-05	V4-07	V5-03										芳本 信子	P2-57	
内村 英幸	P1-61				山口 高史	WS4-8												吉村 和法	P1-29	
内野 博之	P1-17				山口 知子	WS7-4												吉村 好之	V1-09	
植田 弘師	WS9-7				山川 和弘	S8-4												吉野 宏	P2-32	
上田 健治	P2-60				山国 徹	P1-46	P1-03											吉野 雅文	P2-50	P1-51
上田 國寛	WS5-6				山森 早織	P2-22												吉岡 亮	S3-2	
植田 勇人	P2-72	P2-71			山本 雅	WS7-5	WS1-3											余 旺節	P2-42	
上原 けい子	P2-56				山本 章嗣	V1-03	V1-06											湯浅 浩之	P2-36	P1-41
上原 孝	WS1-7				山本 秀子	P1-03	P1-46*											湯浅 勝敏	V3-06	
植木 裕司	P1-61				山本 秀幸	V1-10	V3-01	V3-03										湯浅 茂樹	S4-4	
植村 慶一	WS6	P1-24	P1-37			P2-29												由井 大錦	P1-47	
	P2-70	P1-11			山本 愛美	P1-23												湯川 和典	P2-12	
上野 幸子	V6-06				山本 賢	P2-09												湯元 昇	P2-10	
上野 伸哉	WS9-5				山本 直樹	WS8-4	S2-2	V1-02										湯山 耕平	P1-46	
上野 修一	P1-64	P1-65	S8-2		山本 孝之	P2-44												(Z)		
	V4-02				山本 敏文	P1-03	P1-46											善利 史子	S8-3	
植月 太一	P1-35	P1-67	WS2-2		山村 隆	S6-1												前正 秀宜	P1-60	WS4-7
上山 健彦	S20-3				山室 裕	P1-29												張 勤増	P2-43	
鶴岡 涉	WS4-8				山中 貢	P2-30												趙 恒	WS8-6	WS2-5
鶴岡 洋司郎	P2-63				山中 正二	P2-48												周 震宇	V6-02	
梅森 久視	WS1-3				山中 康光	P1-56														
上村 敬一	V2-06				山之内 博	S3-5														
梅沢 倫子	P2-51				山科 聡子	P2-13														
海野 麻未	S2-2	V1-02			山下 拓史	WS3-1														
浦上 克哉	P1-78				山下 敬介	WS2-6														
宇佐美 美穂子	P1-76				山下 俊英	P2-24														
(V)					山内 理充	P2-68														
van der Horst Gijsbertus T. J.		P2-50			山内 卓	V1-09														
	P1-51				山内 俊雄	P2-42														
Veeranna	P2-17				山内 康照	P1-34														
(W)					山脇 正永	WS8-5														
Wojczyk, Boguslaw S.		P1-66			山脇 成人	P2-11	P1-60	P2-15												
和田 千鶴	WS2-7					WS4	WS4-7													
和田 一九	S8-3				山崎 博幸	V6-05														
和田 圭司	S20-2				山崎 眞津美	V5-02														
和田 圭樹	S3-PL				山崎 恒夫	WS4-6														
和田 義郎	P2-37				関 剣虹	P1-28														
若宮 昭子	P1-44				柳原 武彦	S3-4	WS6-8													
					柳沢 勝彦	P1-71	P1-70	P1-68												

キーワード索引

(A)

a-SNAP P2-07
 Ab protein WS5-6
 accumbens WS9-1
 ACE P1-78
 ACE genotype P1-78
 acetyl-L-carnitine V4-04
 acetylcholine V1-01
 acetylcholine receptor P2-19
 acetylcholine synthesis V4-04
 acetylcholinesterase P2-47
 ACh release P2-01
 acidic basic amino acid repeats S5-2
 acidic organelle V1-06
 ACTH P2-37
 actin WS4-3 P1-16 S4-2
 actin binding protein V6-05
 activin signaling pathway P2-23
 acyl-CoA P2-43
 acyl-CoA oxidase deficiency WS3-7
 adaptation P1-62
 adenosine V4-09 P1-48
 adenovirus WS6-1 V3-06
 adenovirus vector WS7-1 V5-09
 WS2-2 P2-26
 adenylate cyclase WS4-8 P2-64
 adenylate kinase P2-20
 ADNFLE S8-3
 ADP-ribosyl cyclase P1-01
 adrenal V1-04
 adrenoleukodystrophy WS3-5 WS3-4
 WS3-5-追
 adrenomyeloneuropathy WS3-5
 adsorptive-mediated endocytosis WS8-1
 adult WS6-8
 adult-onset WS3-5-追
 age-related gene S1-3
 aggregation WS2-7
 aging P1-55 P1-54 P1-69
 P2-36 V6-03 V2-08
 V3-08 WS1-7 S1 -PL
 S1-2 WS5-4
 agrin P1-12
 Akt V2-05 V4-08
 albumin P1-22
 alcohol WS4-7
 alcoholism P1-65 P1-64
 aldehyde dehydrogenase S1-2
 Alexander disease V2-11
 allodynia WS9-8
 α -B-crystallin V2-11
 α -latrotoxin P1-10
 aluminum V3-09
 Alzheimer's disease 会長講演 P1-69
 V2-11 V3-08 V3-09
 WS4-6 P1-67 P1-75
 P1-76 P1-77 P1-68
 P1-73 P1-78 P1-72
 P2-46 P1-74 V3-06
 V3-02 V3-05 WS5-4
 WS4-4 WS3-3 WS5-6
 WS5-5 P1-70 P1-66

amino acids P1-71 S1-2
 amnion WS8-2
 V2-10
 AMPA receptor P2-28 WS7-5
 WS1-5
 amygdala S4-4
 amyloid WS5-6 P1-76
 Amyloid β protein (A β) WS5-PL S1-5
 P1-70 V3-02 WS5-4
 V3-07 V3-05 V3-01
 V3-03 V3-04
 amyloid fibril WS5-PL
 amyloid precursor protein P1-67
 P1-68 P1-76
 WS2-2 WS5-2
 amyotrophic lateral sclerosis WS7-8
 P2-57 WS2-9
 animal model for aging S1 -PL
 animal models WS1-7 WS5-1
 aniracetam P2-58 P2-01
 anti-apoptosis WS7-6
 anti-glycolipid antibody P2-67
 antidepressant drug WS4-7
 antiepileptic drug S8-5
 antioxidants P2-71 WS5-PL
 AP-1 P2-02
 ApoA-II WS5-3
 apolipoprotein V6-06
 apolipoprotein A-I V6-04
 apolipoprotein E P1-71 WS5-PL
 apoptosis P1-52 P1-47 P1-69
 P1-46 P1-67 P1-50
 P1-48 P1-51 P1-45
 P2-50 P2-12 P2-51
 S5-2 WS2-3 P1-18
 S7-3 V2-04 V2-05
 V6-01 V5-08 S5-PL
 S3-1 WS2-6 WS2-4
 WS2-2 WS2-9 S7-4
 WS2-1 WS2-8
 S7 -PL S7-1
 AR-JP P1-61
 Arc P1-74
 armadillo family S6-3
 Asians S8 -PL
 aspartoacylase P1-03
 associated protein P1-65 P1-64
 association study S1-3
 astrocyte P1-71 P1-40 P1-70
 V6-01 V6-04 V6-06
 V6-07 WS8-4 WS6-2
 P1-23 P1-07 V1-10
 V4-07
 asymmetric division S4 -PL
 ATP V4-06 V5-04
 WS9-5 WS6-4
 atypical antipsychotic S2-5
 autoimmune T cells S6-1
 autonomic nervous system P2-30
 autophosphorylation WS1-4 V1-09
 autoradiography P2-64
 autoregulation P2-59
 axonal environment WS6-3
 axonal transport V6-03 P1-14

axotomy WS6-1 P2-24 WS6-7
 (B)
 baculo-virus P2-41
 basic helix-loop-helix (bHLH) P1-33 P2-59
 Bax V4-08
 Bcl-2 V5-03 V4-08 V4-05
 Bcl-x V4-05 V5-03
 BDNF P2-28 P2-27 P2-29
 P2-31 P2-30 V5-07
 V5-08 V5-09 V5-01
 WS1-5 WS9-3 WS7-5
 S4-5 WS7-2 P1-58
 behavioral sensitization S2-1
 benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) S8-2
 β -amyloid WS5-5 P1-75
 P2-46
 β -glucosidase S1 -PL
 β -oxidation enzyme WS3-7
 bFGF WS7-4 P2-34
 BFNC S8-3
 binding protein WS5-2
 Binswanger S3-3 S3-5
 BiP/GRP78 WS7-1
 blood-brain barrier WS8-1
 WS8-7 WS8-4 WS8-3
 S6-5 WS8-2 WS8-5
 blood-spinal cord barrier WS8-7
 BMAL1 P2-42
 brain P1-06 P2-20 P1-69
 P1-38 V2-08 WS5-4
 brain atrophy P2-61
 brain capillary endothelial cells WS8-2
 WS8-1
 brain development P2-25 P1-34
 V6-08
 brain development-related molecule 2 V6-08
 brain ischemia WS8-6 WS2-5
 brain temperature WS8-6
 brain-derived neurotrophic factor V5-05
 brefeldin A P1-50
 BSO V6-02
 (C)
 c-fos V1-12
 c-Met WS7-7
 C6 P2-11
 Ca channel P2-06 S5-5
 V5-05 V4-03
 Ca2+ puff V1-07
 Ca2+ release V1-08
 Ca2+ spark V1-07
 Ca2+-independent activity V1-09
 Ca2+-signaling P2-21
 Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II V1-10 V1-09
 CA3 and CA4 P1-11
 CACNA1A gene S8-1
 CAG repeat expansion S5-5
 CAG repeats S5-3
 caged P2-10
 calcineurin P1-17

calcium	P1-60	P1-45	P1-19	choline transporter	P1-08	(-)Deprenyl	V2-09
	P2-15	P1-75	V1-11	chordin	P2-23	depolarization	V4-09
	V5-01	V2-05	V5-07	CHRNA4	S8-3	depression	V4-01
calcium binding protein	V2-01	P1-16		chromaffin cells	P2-05	desensitization	V1-05
calcium ion uptake		P2-66		chromophore assisted laser inactivation		development	P1-14 P2-50
calcium ionophore		P1-19			P2-05		P2-20 V6-07
calmodulin	P1-04	P2-21		chronic cerebral hypoperfusion		dexamethazone	P2-37
		V1-10			S3-3 P2-64	D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase deficiency	
calmodulin-dependent protein kinase II			P2-10	chronic inflammatory demyelinating			WS3-7
				polyradiculoneuropathy	P2-67	diabetes	P2-30 P2-31 P2-61
CaM kinase II	S2-1	WS1-4		circadian rhythm	P2-41	dialysis electrode	WS8-6
	P2-29	V2-02		clock	P2-41	DIF	P1-49
		V2-05		cloning	P2-16 P1-08 P1-47	differential cloning	S2 -PL
CaM kinase IV	P2-21	V1-11			P1-25 P1-23	differential display	P2-65 V4-07
cAMP	P2-08	WS1-1		clozapine	P1-57 P1-61 S2-5	differential display screening	P2-25
cancer		V4-01		CNS pathways	WS6-3	differential hybridization	P1-39
capsaicin		WS9-8		cognition	V3-08	differentiation	V6-06 P1-40
carbohydrate structure		P1-28		colony-stimulating factor	P1-20		S4-3 WS1-6
CARD		P1-47		commissural axon	S4-1	dihydrolipoamide succinyltransferase	
cardiac arrest		WS8-7		commitment time	S7-2		S1-2
caspase	WS2-2	P1-47	S3-1	complex I	P2-57	disease models	S5 -PL
	S7-4	WS2-3	WS2-1	complex IV	P2-57	DLK	P2-12
caspase-3		P1-67	P1-50	complexin	P2-07	DM20	P1-25
catecholamine		P2-06		compression injury	P2-68	DNA damage	P1-51 P2-50
catecholamine release		P2-05		conditioned medium	V2-10	dominant negative/active	V2-03
caveolae		WS4-8		connexin	WS4-1	dopamine	会長講演 P2-02 P1-57
caveolae-like domain		P1-68		cortical cells	P1-45		P2-04 P2-03 P2-55
CDK4		WS2-4		cortical neuron	V5-09 P1-49		WS9-1 S2-PL S2-5
Cdk5		P2-17		COS1 cell	WS6-7		S2-1
cDNA	P1-23	P1-25		CPCCOEt	P1-02	dopamine D1 receptor	S2-4
cDNA cloning	V6-05	P1-39		CR-50	P1-43	dopamine D2 receptor	S2-4
cell adhesion molecule	WS8-5	WS4-2		CRE	V1-12	dopamine D3 receptor	S2-5
cell cycle		WS2-4		CREB	V5-05 V1-12 WS6-2	dopamine neuron	WS6-9 S7-3
cell death	P1-49	P1-19	WS2-1	CREB/ATF family	P2-69		WS2-8
	WS6-1	WS2-7	S5-1	Creutzfeldt-Jakob disease	V2-07	dopamine transporter	S7-5 P1-65
			WS2-3	cryo-injury	WS6-2	dorsal root ganglia	P2-48 P2-56
cell differentiation		P1-42		CSB	P1-51		WS9-5
cell line		P2-56		culture	P2-39	2D PAGE	P1-44
cell lineage		S3 -PL		cyclic ADP-ribose	V1-08 P1-01	DRD2	WS9-6
cell proliferation		WS1-6		cyclic AMP	V4-03	drebrin	S4-2 V6-05
cell therapy		WS6-5		cyclin D1	WS2-4	Drosophila	WS2-3 WS1-2
cell transplantation		WS6-9		cyclin-dependent kinase	P2-17		S4 -PL
cell-fate determination		S4-3		cyclooxygenase-2	WS9-2 P2-08	DRPLA	WS2-7 S5-1
cellular aging		S1-1		cyclosporin A	P1-17	D-serine	WS5-5 V1-02 S2-2
ceramide		P2-40		cystatin C	P1-52	(E)	
ceramide galactosyltransferase				cytochrome c	V4-05	E box	P2-59 P1-33
deficient mouse		V2-06		cytokines	WS8-5 WS2-8 WS8-3	E2F	P1-36
cerebellar granule cell	P1-18	P2-35		cytoskeleton	WS4-8 P1-14	EGF	WS7-4
cerebellum	P2-50	P1-44	P1-29	cytotoxic T lymphocyte	S6-2	efflux	P1-71
cerebral cortex		P2-34		(D)		EGF-like repeat	WS5-2
cerebral ischemia	WS8-7	V4-03		DAMP	V1-06	E1 mouse	S8 -PL
cerebrocortical slices		P2-63		dark-reared rat	V2-02	embryonic stem cell	WS4-1
cGMP		P2-11		death	V3-06	embryos	WS1-6
channel	会長講演	P1-75		deficient mice	P1-35	emotion	S4-4
channel clusters		P1-05		dehydroepiandrosterone	P2-11	endogenous aldehyde	P2-04
ChAT activity		P2-46		5'-deleted MAG	P1-26	endogenous amine	P2-53 S7-2
chemoattraction		S4-1		δ -catenin	P1-74	endoplasmic reticulum	P2-66
chemokine		P2-74		demyelination	P1-05 P1-29	endothelial cell	S6-5 WS8-4
chemokinesis		WS6-4		dendrite	P1-09		WS8-5
childhood absence epilepsy		S8-4		dendritic spine	S4-2 V6-05	energy metabolism	P2-20
chloroquine myopathy		WS3-3		dentate-rubral tract	WS3-5-追	Eos	P1-32 P1-31
CHO cells	P1-66	WS4-6		dentatorubral-pallidolusian atrophy		epilepsy	S8-4 P2-72 P2-71
cholesterol	V6-04	P1-68			S5-2		S8-5 S8-2 S8-3
	V6-06	P1-71		dependence	P1-63	epileptic model animal	S8 -PL

episodic ataxia	S8-1	genomic	P2-42		V3-08
EPM2A	S8-4	genomic imprinting	P1-35	HNK-1	P1-28
ERAB	S1-2	GFAP	P1-40	hnRNP-U	P1-36
ER stress	P1-73 P2-16	gicerin	WS4-2	homocysteine	WS9-6
	WS7-1 P1-72	giutamate	P2-72	HPLC	V4-09
ESR	P2-72 P2-71	glia	P1-07 P1-40 P2-12	Hsp27	V2-11
estrogen	P2-14 P2-38		P1-23 S4 -PL S3-4	5-HT1A receptor	V1-01 P1-62
estrogen receptor	P1-77	glia maturation factor	P1-23	5-HT2A receptors	V1-01
ethanol	P2-49 P1-45	glial cell line-derived neurotrophic factor		HTLV-I	S6-2 S6 -PL
excitatory amino acid	WS5-5		V5-06	human amniotic epithelial cells	
excitotoxicity	S3-2	glioma	P2-70		P2-23 P1-42
exocytosis	P2-07 P2-05 P1-10	gliosis	WS6-2 P2-69	human brains	V3-08
	P2-06 S8-5	glucocorticoid receptor	P1-59	human chromosome 4q14-p12	P1-64
(F)		glucose deprivation	P1-53	human chromosome 8	S8-2
12F7	P1-29	glucose metabolism	V4-01 P2-30	human homologue	P2-69
facial nucleus	P2-26		S1-4	human leukocyte antigen	S6-3
familial amyloidotic polyneuropathy		glucose transporter	S1-4 P2-61	hunger drive	P2-45
	WS5-1	glutamate	P2-63 P2-62 V1-03	Huntington's disease	S5-3
familial hemiplegic migraine	S8-1		V1-11 V5-07 S2-3	huntintin	S5-3
Fas	S3-1		S7-4 S2 -PL S2-1	hydrocephalus	P2-34
fibril formation	WS5-3	glutamate receptors	S3-2	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	V2-08
fibroblast growth factor	WS8-4	glutamate re-uptake	WS8-6	hyperalgesia	WS9-5
field excitatory postsynaptic potential		glutamate transporter	WS8-6	hyperglycemia	P2-61
	V2-01	glutamic acid-rich protein	P1-39	hypoglossal	WS6-1
filopodia	P2-24	glutathione	V6-02 P2-62	hypoglossal nerve regeneration	P2-25
FK506 binding protein (FKBP)	V1-08	glycine	S2-2	hypoglycemia	V4-04
5' flanking region	P1-65	glycogen synthase kinase 3 β	WS4-4	hypothalamic neuron	P1-35
floor plate	S4-1	glycolipid	S6-4	hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis	
fluorescence-activated cellsorting	WS6-6	glycoprotein	P1-66 P1-54		V4-01
FM 1-43	WS1-2	glycosphingolipid	P1-68	hypoxia	V4-07 V4-06 V4-09
forebrain ischemia	P1-17	GM2 ganglioside	P2-48	hypoxia/reoxygenation	V4-05
free fatty acids	P2-43	GQ1b	P1-30	hypoxic injury	S3-2 P2-63
frontal cortex	V1-01	granule cells	V1-10	(I)	
FTDP-17	WS4-6	green fluorescent protein (GFP)	WS6-6	Iba1	WS4-3 P1-16
full-length cDNA library	V6-09		WS2-7	Id	V6-07
fusion protein	P2-03 P1-03	growth cone	P2-24 P1-10 S4-1	IGF-1	P2-14 P2-38
fyn	WS7-5	GRP78	P1-73		P1-20 V4-08
fyn tyrosine kinase	WS1-3 S4-4	GSK3	P1-15	Ikaros	P1-31
(G)		GST	P1-03	Ikaros family	P1-32
G protein	WS4-8 P1-01	GT1b	P1-30	imaging	V1-07
GABA	S2-3	guidance cues	WS6-3	iminodipropionitrile	P2-58
GABA-A receptor α 4 subunit	P1-64	Guillain-Barré syndrome	S6-4 P2-67	immortalization	WS8-4 S1-1
GABAergic interneuron	P2-28	(H)		immune cells	WS7-2
galactocerebroside	V2-06	haloperidol	P1-57 P2-45 P2-27	immuno-adsorption therapy	P2-67
galectin	WS6-7	HAM/TSP	S6-2 S6 -PL	immunoblotting	V1-04
ganglioside	WS7-3 P1-30	helix-loop-helix	V6-07	immunohistochemistry	P1-37 P2-36
gap junction	WS4-1 V6-02	hepatocyte growth factor (HGF)	WS7-7	immunophilins	V5-06
gcm	S4 -PL	herpes simplex virus type-1	P2-70	immunoprecipitation	V1-04
GDNF	P2-33 P2-26 WS6-9	Hes5	V6-07	immunosuppressants	V1-08
	WS7-8 S7-4	[3H] HC-3 binding	P2-46	in situ hybridization	P1-63 P2-44
GDNFR- α	WS7-8	High density lipoprotein (HDL)	P1-71		V6-08
gene delivery	WS6-5	high-density oligonucleotide DNA array		in vitro	P2-48
gene expression	WS2-5		WS2-5	inclusion body myositis	WS3-3
gene isolation	P2-69	high-glucose	P2-31	infection	P2-74
gene locus	S8-2	hippocalcin	V2-01	infetal antigen	V3-07
gene targeting	WS5-1 WS3-4	hippocampal cholinergic neurostimulating peptide		inflammation	WS9-3
gene therapy	P2-26 P2-70		P2-36 P2-44	inhibition	P2-03
	WS5-3 WS6-9	hippocampal slice	P2-44	iNOS	V2-07
gene-targeted mouse	V2-07	hippocampus	WS6-8 P2-38 P2-14	inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) receptor type 1	
genetherapy	P1-41		P1-41 P2-12 P1-11		WS2-6
genetic factor	S7-5		P1-59 P2-43 V1-07	insertion mutation	S1-PL
genetics	S7-1		WS1-4	insulin receptor tyrosine kinase substrate	
genipin	V5-02	histamine	V3-08 P2-73		S5-2
		histamine H1 receptors	V1-05 P2-73	intercellular communication	WS4-1

interleukin-1 β	WS9-2	P2-08	memory	V2-01	P2-09	P2-44	N-methyl(R)salsolinol	S7-3	V2-09
internalization		V1-05	metabotropic glutamate receptor				N2a		V2-03
intraventricular administration		P2-34			P1-02	P2-01	Na pump		P1-04
ion channel	S8-5	V1-03	metallothionein-III			P1-55	Na ⁺ /Ca ²⁺ channel blocke		P2-63
	S20-1	S20-7	methamphetamine			S2-1	NAC		WS5-6
IP3		P2-64	4-methylcatechol			P2-31	NACP		P2-60
IP4		P2-64	metyrapone			P1-62	NAP-25		P2-05
IRE1		P2-16	mevalonate pathway			P2-25	NB69 cell		P1-46
Irelp		P1-72	mice		P2-73	P2-45	neccidin	P1-36	P1-35
ischemia	P2-61	P2-60	microarray			WS4-7	necrosis		P1-21
	P1-21	S3-4	microdialysis	P2-71	P2-72	S2-5	negative symptom		S2-4
ischemic reperfusion injury		P2-66	microglia	P1-18	P2-40	P1-20	neocortex		P1-37
isomerization	S1-5	V3-02		P1-22	P1-21	P1-48	NER		P1-51
IUGR		P2-47		P1-16	P1-19	P1-70	nerve fiber		S3-5
(K)				V3-01	V5-04	V3-04	nestin		WS6-6
kainate		S3-2		WS6-4	WS4-3	S3-3	neural differentiation	P1-34	P1-30
KCNQ3		S8-3		WS3-4	P1-17	WS6-5	neural inducers		P2-23
kinase		WS1-1	microvesicle			V1-06	neural information signaling		S20-1
kinase activity		P1-53	middle cerebral artery occlusion			P2-66			S20-7
kindling		P2-73	migraine			WS9-6	neural precursor cells		P1-39
kinetic model		WS5-PL	Miller Fisher syndrome			S6-4	neural stem cell		WS6-6
Klotho gene		S1 -PL	Mini-Mental State Examination			V3-08	neural stem cells		P1-42
knockout mouse	P2-73	P2-17	mitochondria			P1-06	neurite	WS3-2	V2-03
		V2-01	Mnd mutant mouse			P2-57	neurite extension		WS4-2
			molecular chaperone			V4-06	neurite outgrowth	V5-02	V1-09
(L)			molecular cloning			WS6-2	neuro2A		V3-03
L-DOPA		WS8-3	molecular pathogenesis	S20-1		S20-7	neuroblastoma	V2-03	V6-09
L-serine		V1-02	monoclonal antibodies			P1-37		V1-09	V2-04
Lafora disease		S8-4	morphine			P1-63	NeuroD		P1-33
learning	V2-01	P2-49	motivation			P2-45	NeuroD-related factor (NDRF)		P1-33
Lewy body		S7 -PL	motoneuron	P2-26	P2-39	P2-58	NeuroD/BETA2/BHF1		P2-59
linkage analysis		S8-2	motor coordination			WS2-6	neurodegeneration	WS4-5	P1-69
lipid		P1-75	motor neuron	WS2-9	WS7-8	S4-3			S5-PL
lipid peroxidation	P1-56	P2-53	mouse		P1-62	P2-48	neurodevelopment		S4-5
lithium	P1-60	P1-59			P1-38	WS8-7	neurofilament	P1-14	P1-15
local cerebral blood flow		P2-66	mouse brain			P1-56		V2-02	V6-03
local protein synthesis		P1-09	mouse cerebellum			WS2-6	neurogenesis	WS6-8	P1-33
long term potentiation	P2-44	P2-43	mouse hippocampus			WS2-5	neuromuscular synapse		P1-12
	V2-01	WS1-4	mouse neuron			P2-35	neuron	P1-52	P1-04
longevity		P1-56	mouse senile amyloidosis			WS5-3		P1-50	V5-01
longitudinal axis		S4-1	MPP+			P2-51		V3-06	V1-02
low-density membrane domain		V3-05	MPTP			P2-54		WS1-6	WS7-6
LY294002		P1-20	mRE-1			P1-43	neuron degeneration		P2-57
lysosome		P1-18	mrf-1			P1-21	neuronal cell death	V2-04	P1-53
(M)			mrf-1			P1-19			WS2-4
M1 muscarinic acetylcholine receptor		P2-18	mRNA		P2-47	P1-09	neuronal cell survival		P2-48
			MTHFR			WS9-6	neuronal death	WS7-1	S5-4
Machado-Joseph disease	S5 -PL		multiple sclerosis		WS8-5	S6-5			WS6-5
macrophages	WS7-2				S6-1		neuronal degeneration	WS2-3	P2-68
magnetic resonance imaging	S6-3		Musashi 1			P1-42	neuronal differentiation		P1-31
	WS3-5-追		muscarinic receptor			P1-01	neuronal migration		S4-4
MALDI-TOF mass spectrometry	V2-06		Musk/Nsk2 RTK			P1-12	neuronal P/Q type calcium channel		
mania	P1-60		mutant			P2-03			S8-1
MAO-B inhibitor	P1-56		mycobacterium leprae			P2-74	neuronal survival		P2-35
MAP kinase	P2-19	P1-20	myelin	P1-25	P1-28	P1-27	neuropathology		S4-5
	V5-02	V3-04		P2-47	P2-49	P1-29	neuropathy		S6-4
MAP1B		V3-07				S3-4	neuropeptide Y		P1-63
MAPKAP kinase-2		V2-11	myelin basic protein			P1-27	neuropeptides	S4-5	P2-09
MARCKS	V3-04	V3-01	myelin lipids			V2-06			S2 -PL
Mash1		V6-07	myelin-associated glycoprotein			P1-26	neuroprotection	V2-10	V2-09
mass spectrometry		P1-44	myelinated axons			P1-05			S7-4
matrix metalloproteinase		P2-70	myelination			P2-25	neurosteroid		P2-11
membrane protein		P1-11	(N)				neurotoxicity	P2-54	P2-52
membrane rufflings		P1-16	N-anisoyl-GABA			P2-01	neurotoxin	S7-3	V2-09

			S7-2	p38		V5-08	plasticity	WS1-7	V2-02
neurotransmitter			WS1-1	p39		P2-17	pleiotropic effect		WS7-7
neurotrophic factor	P2-74	P2-35		p53	P1-36	P2-51	PLP		P2-49
	P2-37	V5-06		p75		WS7-6	PMP20		WS3-1
neurotrophin	P2-32	P2-27	WS7-3	pain	WS9-1	WS9-4	PMP70		WS3-5
	WS1-1	WS7-2	WS2-8	pain-regulation		WS9-7	poly-L-lysine		P2-21
			WS9-3	paired-pulse facilitation		V2-01	polyglutamine	S5 -PL	WS2-7
NF κ B	V6-01	V5-03	WS7-6	paraquat		V6-02			S5-3
			V4-05	Parkin		S7-1	polyglutamine disease		S5-1
NFAT (nuclear factor of activated T cells)				Parkin gene		S7 -PL	polyglutamine repeat		S5-4
			P1-17	Parkinson's disease	会長講演	P2-52	polymorphism	P1-77	P1-65
NG108-15 cell			P2-29		V5-06	S7-2		P1-64	V4-02
NGF	WS7-1	V5-07	WS7-4		WS8-3	WS6-9	positron emission tomography		V3-08
nicotine			WS2-14		V2-09	V2-10	postmitotic neuron		WS2-2
nicotinic			P2-19		S7-4	S7-1	postmortem brain		S2-3
Niemann-Pick type C disease			P2-56	parkinsonism		S7 -PL	postsynaptic density		P1-09
nigral neuron			S7 -PL	pathogenic genes		P2-53	Prader-Willi syndrome		P1-35
nitric oxide synthase			WS1-6	PC12 cell	P2-51	WS4-2	prefrontal cortex	S2-3	P1-57
	P2-58		P2-63		V1-07	P2-04	presenilin		P1-76
						P2-06	presenilin 1		P1-74
NMDA channel			WS1-3			P2-22	presenilin 2	P1-73	V3-05
NMDA receptor	S2-2	P1-45		PC12D cell		WS3-2	presynaptic	WS1-1	P2-22
	WS1-5	S4-4	V1-04	PC12h cell		V5-02	primary culture		P1-49
NO		V5-08	P1-49	PCR-RFLP		P1-65	primary cultured neuron		P1-02
NO synthase			V5-02	PDGF		WS7-5	primary sample		V6-09
NO-toxicity			P1-46	PDGFR α		S3 -PL	prion		V2-07
nociceptin	WS9-7	WS9-8		PDZ domain-containing protein		P1-05	processing enzyme		P2-09
nociceptin-receptor knock-out mice		WS9-7		pentylentetrazole		P2-73	proinflammatory cytokine		S6-2
nociception	WS9-3	WS9-1	WS9-5	peptide	P2-10	P2-36	proliferative lifespan		S1-1
node of Ranvier			P1-05	peptidylarginine deiminase		P1-27	promoter	V4-02	P2-59
noggin			P2-23	peridontal cell		P2-32	prostaglandin		WS9-8
noradrenaline			P1-60	peripheral nerve		WS6-7	protease		V6-01
Northern (blot) analysis			P1-39	peripheral nociception test		WS9-7	protease inhibitor		P1-40
NPRAP			P1-74	peroxin		WS3-6	protein deimination		P1-27
NT3			P2-33	peroxisomal disorder		WS3-7	protein kinase	S8-5	P2-41
nuclear transport			P2-13	peroxisomal membrane protein		WS3-1		P2-13	P1-04
nuclear matrix			P1-36	peroxisome	WS3-1	WS3-2	protein kinase C	P2-40	V1-05
nuclear receptor			P2-55	peroxisome biogenesis disorders		WS3-6	Protein L-isoaspartyl methyltransferase		
nucleus	P2-02	P2-29	V1-10	peroxisome gene targeting		WS3-4			S1-5
Nurr1			P2-55	PET		S2-4	protein phosphatase		P1-04
(O)				PEX		WS3-1	protein structure		WS5-3
olanzapine			P1-61	PEX genes		WS3-6	protein synthesis		P2-51
oligo-capping			V6-09	phagocytosis		WS4-3	proteolipid protein	S3 -PL	S3-4
oligodendrocyte	P1-24	P1-29		PHCCC		P1-02			S6-1
	P1-26	P1-27	V6-07	phenacyclidine	P1-57	P1-61	proteome		P1-44
	S3 -PL	S3-1	S3-5			P2-27	Prox-1		P1-42
	S3-4	S3-3	S3-2	phenytoin		WS2-6	PS1		P1-72
oocytes			WS1-6	PHF		WS3-3	PSA		P2-09
opioid receptor			WS9-4	Phosphatidylcholine		P1-71	PSD-95	WS1-3	P1-05
optico-spinal multiple sclerosis			S6-3	phosphorylation	P2-22	P2-13	pur alpha		V1-12
ORP150			V4-06		P2-21	P1-15	pyramidal tract		WS6-3
oxidative stress	P2-52	P1-55			V2-11	V1-05			
oxygen metabolism			S1-4		WS4-6	WS4-4	(Q)		
(P)				physiological role		WS9-7	quinolinate		V1-02
P-glycoprotein			WS8-1	PI-3 kinase	P1-20	V2-05	(R)		
P/Q type Ca2+ channel			S5-4		P2-39	V4-08	Rab3A cycling		P1-10
P0			P1-54	Pick disease		V3-09	rabphilin-3A		P2-22
P0 protein			P1-28	pineal		V1-03	Rac		WS4-3
P19 cell			P1-31	pinealocyte		V1-06	racemization	S1-5	WS5-5
P19EC cells			P1-30	PKA	V4-03	P2-22	RAD51		P1-38
P2X receptor			WS9-5	PKC	P2-64	V3-01	radical	P2-62	P2-72
P2X7			V5-04	PKC- α		V3-03	rat	P2-31	P1-60
p35			P2-17	plasmin		P2-15	rat brain		P1-03
				plasminogen activator		P2-40	rat cerebral cortex	P2-25	P1-02

rat dorsal root ganglion	P2-08	WS9-2	SNRK	P1-53	Toki-shakuyaku-san	V2-08
reactive oxygen species	V6-01		sodium channel	V4-03	tolerance	P1-63
RecA	P1-38		somatosensory cortex	WS1-5	tract involvement	WS3-5-道
recurrent Guillain-Barré syndrome	P2-67		somatostatin	V1-12	TRAD	P1-38
receptor	V1-03		sphingomyelin	V2-06 V6-04	transcription	V6-07 V5-01
receptor-effector coupling	WS4-8			P1-71 P1-24	transcription factor	P1-31 P2-02
recombinant expression	S5-4		sphingomyelinase	V6-04		P2-41 P2-55
recombination	P1-38		spinal cord	P1-54 P2-68 P2-12	transduciton	P2-14 P2-38
recycling	WS1-2			WS9-1 S4-3 WS9-8	transgenic mouse	WS2-9 V3-05
reeler	P1-43		spinal cord neuron	V4-09	transglutaminase	P2-68
reelin	P1-43		spinocerebellar ataxia 6 (SCA6)	S8-1	translocation	P2-18
regeneration	WS6-1 P2-24			S5-5 S5-4	transmitter release	P1-13
	WS6-7 WS6-5		splice variant	P2-42 P1-73	transplantation	V2-10
reinforcement schedule	P2-45		splicing	P1-43	transport	P1-50
release	WS9-2 P2-04		spontaneously epileptic rat (SER)	S8 -PL	transporter	会長講演 WS8-2 P2-62
Ret	P2-54 P2-33	WS7-8	Src-family kinase	WS7-5	S20-1 S20-7	WS8-1
retinal horizontal cell	V6-02		SSCP	P1-65		P1-07
retinoic acid	V2-04 P2-33		SSCP method	S6-1	transthyretin	WS5-1
retrovirus	P1-41 S3 -PL		stem cell	S4 -PL	tremor rat	S8 -PL
Rho	P2-24 P2-18	V2-03	strain dependency	P2-35	tricarboxylate carrier protein	P1-06
rhythm	P2-42		stress	P1-62	triplet repeat expansion	S5-2
risk factor	P1-78		subplate	P1-37	Trk	WS7-3
risperidone	P1-61		substance P	WS9-2 P2-08	troglitazone	P2-39
Rosenthal fiber	V2-11		substantia nigra	P2-02	tubulin	P1-13
RT-PCR	V1-04		sulfated glucuronic acid	P1-28	two-hybrid system	WS5-2 WS4-5
ruffling	WS6-4		superoxide	P1-22	type-1 sigma receptor	P1-03
ryanodine receptor	V1-08		superoxide dismutase	P1-56	tyrosine hydroxylase	P2-34 P2-03
(S)			survival	P1-20 P2-39	tyrosine kinase	WS7-3
S-MAG-like structure	P1-26		Survivin	V2-04	tyrosine phosphorylation	WS1-3
Sandhoff disease	P2-48		sympathetic neuron	V2-05	T α -1	WS6-6
SCG neuron	P2-33		synapse	P1-11	(U)	
schizophrenia	P1-58 P2-27		synaptic plasticity	S4-2 P1-09	U0126	P1-20
	S2-3 S2-2		synaptic vesicle	P1-13 P1-11	unrestricted axonal regeneration	WS6-3
	S2-4 S2 -PL			WS1-2	UPR	P2-16
schwann cell	P2-56 P2-74		synaptogenesis	S4-2	uptake	P2-62
schwann cell lines	P2-48		synaptophysin	P2-60	(V)	
seizure	P2-73		synaptosomes	V4-04	V-ATPase	V1-06
senescence-accelerated mouse (SAM)			synaptotagmin	P1-13	vascular cell adhesion molecule-1	S6-5
	V2-08 WS1-7		synergistic effect	P2-52	vascular dementia	V3-09
	P2-36 S1-4		synuclein	S7-1 P2-60	very long-chain acyl-CoA synthetase	WS3-4
senile dementia	WS1-7		system L	WS8-2 WS8-3		
senile plaque	P1-70		(T)		voltage-gated K ⁺ channels	P1-05
sequencing	V6-09		T cell receptor	S6-1	voltage-gated Na ⁺ channels	P1-05
serotonin	V1-01 P1-07		T cells	WS7-2	von Willebrand factor	S6-5
serotonin (5HT) receptor	WS9-6		tactile sense	WS9-3	(W)	
serum amyloid P component	WS5-1		tau	WS4-4 WS3-3 WS4-6	water maze	P2-46
serum deprivation	P1-67			S1-5 WS4-5	Werner syndrome	S1-3
serum response element	P2-18		tauopathy	WS4-4	West syndrome	P2-37
sex hormone	P2-68		telomerase	S1-1	Western blot analysis	V6-08 P1-34
SH3 domain	V6-05		telomere	S1-1	white matter	S3-5 S3-3
shibire	WS1-2		tetraethylammonium	P2-43	(X)	
shizophrenia	S4-5		tetrahydroisoquinoline	S7-2 P2-52	XPA	P1-51
Shp-2	V5-09		TH	P2-54	(Z)	
SHRSP	P2-01		thiol-specific antioxidant protein	WS3-1	zebrafish	P1-32 P1-25
siganl transduction	P1-01 WS7-7		thrombin	P2-15	Zellweger syndrome	WS3-6
	WS7-4 WS7-3 WS1-3		thyrotropin-releasing hormone receptor	V4-02	zif268	P2-18
silent synapse	WS1-5			WS4-1	zonisamide	P2-71
single-stranded DNA binding protein			tight junction	P2-53		
	V1-12		TIQ derivatives	P2-56		
SNAP-25	P2-60		tissue culture	P2-70		
snare	P2-07 P2-06		tissue inhibitor of matrix metalloproteinase	P2-70		
SNARE mechanism	P1-10			P2-70		
SNAREs	P1-13		TNF	S3-1 V5-03		
SNF1 family	P1-53		TNF-α	V2-07 V5-04		

神経化学 38巻 第3号

平成11年9月1日発行

編集兼発行者 日本神経化学会

代 表 者 三木 直正

発 行 所 日本神経化学会

〒113-8622 東京都文京区本駒込5-16-9

財団法人 日本学会事務センター内

印 刷 所 (株)タカトープ rintメディア