

Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウスの
中枢神経系における軸索変性と
アミロイド関連蛋白蓄積との関連性

1997

市原伸恒

博士論文

Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウスの
中枢神経系における軸索変性と
アミロイド関連蛋白蓄積との関連性

麻布大学大学院獣医学研究科

市原伸恒

(指導：鹿野 胖 解剖学第一講座教授)

目次

第1章 序論

第1節	Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウス	2
第2節	Alzheimer病の病理組織学的特徴と関連蛋白	6
第3節	薄束路	12
第4節	本研究の目的	16
Figures		18

第2章 GADマウスにおける軸索変性に伴うAPPの蓄積

第1節	緒言	29
第2節	材料と方法	30
第3節	結果	38
第4節	考察	42
第5節	小括	47
Figures		48

第3章 APPの蓄積に続くAmyloid β -Protein ($A\beta$ P) の蓄積

第1節	緒言	54
第2節	材料と方法	55
第3節	結果	59
第4節	考察	61
第5節	小括	67
Figures		68

第4章 薄束核における軸索変性初期の形態変化

第1節	緒言	72
第2節	材料と方法	73
第3節	結果	75
第4節	考察	80
第5節	小括	84
Figures		85

第5章	軸索変性とユビキチンとの関連性	
第1節	緒言	95
第2節	材料と方法	96
第3節	結果	100
第4節	考察	103
第5節	小括	107
Figures		108
第6章	総括	115
参考文献		119
謝辞		134

第 1 章

序 論

第1節 Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウス

Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウスは、1984年に名古屋大学農学部において発見された神経軸索変性を主病変とするミュータントマウスである(116)。その由来は、CBA/NgaとRFM/Ngaとの交配実験中にそのF1同士の交配から得られたマウスにおいて、行動異常を示す個体が発見されたことに始まる。現在、由来する系統において21代以上兄妹交配を繰り返し近交系を育成した系統と、B6の近交系にもどし交配を繰り返し、congenic系を育成した系統の2種類が実験に供されている。この2系統間に、臨床症状や病理組織学的変化に差は認められない。本ミュータントの遺伝形式は常染色体劣性遺伝であることが明らかになり、またその遺伝子座は第5染色体に存在することが判明している(115)。生後4週齢頃までは、その発育状態や行動によりGADマウスと正常マウスを区別することはできない。生後4週齢以降になると、感覚性失調の姿勢により(17)、その両者の区別が可能になる。すなわちマウスの尾を持ち、吊り下げた時に、正常マウスは後肢をただ側方に伸展させるのみであるが、GADマウスは後肢を腹部前方で交差させ、抱き込む姿勢をとる。しかし歩行時には、その歩様や姿勢に異常は認めない。運動性失調は生後12週齢頃より出現する。それは、歩行時に後肢足底を上方に向けたまま、後肢を引きずる症状として確認できる(Fig.1)。生後16週齢前後からは筋肉の萎縮に伴って後躯の削瘦が顕著

になり、振戦や歩行時によろめくなどの症状も現れる。GADマウスの体重は、生後10週齢頃から徐々に減少し、生後15週齢では正常マウスの体重の7割前後まで減少する(98)。その後、症状はゆっくりと進行し、多くのGADマウスは生後24週齢前後で衰弱死に至る(116)。GADマウスでは、1年以上の生存例はない。以上の病勢は、臨床的に大きく4期に分けられる(113)。それは生後4週齢から始まる初期、生後9週齢から始まる進行期、生後18週齢から始まる臨界期、生後32週齢から始まる終末期である。

病理組織学的には、腰髄レベルの脊髄神経節に存在する一次知覚神経細胞の中枢ならびに末梢端で変性が生じる。この神経細胞は、軸索を中枢端である延髄薄束核へ伸ばし、樹状突起を末梢端である後肢筋中における筋紡錘内のらせん終末まで伸ばしている。延髄薄束核では、生後4週齢前後から軸索に変性が生じる。その変性は、軸索が異常に腫大した好酸性球状構造物(Spheroid)の出現、星状膠細胞の増生(gliosis)、脱髄などを主病変とする(Fig.2,3)。Spheroidの電顕観察では、その内部にミトコンドリアやelectron dense body, フィラメント構造物, 大小様々な膜様構造物などが充満していることがわかる(43,67)(Fig.4)。Spheroidの出現頻度を経時的に計測すると、生後4週齢で薄束核に多数のSpheroidを認め、その後、出現頻度の高い部位が加齢に伴って頸髄, 胸髄, 腰髄の順に薄束を下行していくことがわかる(43)(Fig.5)。このことから軸索終末部が変性を起こしながら細胞本体に近づいていく、いわゆる Dying -Back タイ

プの逆行性軸索変性であると(9)、推測されている。それを裏付けるように、生後32週齢のGADマウスにおける薄束核では星状膠細胞の増生は認められるが、Spheroidはほとんど存在せず、瘢痕化している。末梢側では、生後20日齢過ぎより後肢筋中の筋紡錘内において、らせん終末に変性が生じる(71)。ここでは樹状突起終末部の激しい再生機転が見られるが、それは一時的なもので、ついには変性に陥る。以上のようにGADマウスでは、薄束核から細胞体へ向かっての軸索における変性と、筋紡錘内でのらせん終末から細胞体へ向かっての樹状突起における変性が同時進行する。このような変性過程は central and peripheral distal axonopathy と呼ばれる(96)。加齢の進んだ個体におけるSpheroidの分布を調べると、軸索変性部位は、後脊髄小脳路や錐体路、三叉脊髄神経路、三叉神経路核など広範囲に及んでいることがわかる(43,111,113)。また腰髄前角に存在する運動神経細胞の軸索終末部である運動終板においても、変性が生じる(65)。一次知覚神経細胞本体は生後18週齢前後より若干の萎縮を示すのみである。薄束核内の二次知覚神経細胞には、形態異常は認めない(43)。

本ミュータントの特徴である延髄薄束核におけるSpheroidの出現は、ヒトを含む様々な動物で加齢現象の一つとして知られている(5,14)。また、Spheroidの出現を認めるヒトの遺伝病としては、infantile neuroaxonal dystrophy や Hallervorden-Spats 病が知られている(13,85)。常染色体劣性遺伝に従う脊髄小脳変性症の一つである

Friedreich失調症は、Spheroidは出現しないものの、その変性部位は薄束、後脊髄小脳路、錐体路であり、GADマウスの軸索変性が生じる部位と類似している(76)。これまで本ミュータントの原因に関しては、明らかになっていない。しかし、GADマウスにおける軸索変性は加齢現象の一側面を反映していると同時に、いくつかのヒトの疾患と類似した点を有しており、神経系の加齢ならびにヒトの遺伝性神経変性症の発生機序解明に貴重な動物モデルになりうると考えられる。

第2節 Alzheimer病の病理組織学的特徴と関連蛋白

本研究の対象になるアミロイド関連蛋白は、Alzheimer病と密接な関係を有する蛋白質である。ここでは、そのAlzheimer病の病理組織学的特徴と関連蛋白について説明する。

Alzheimer病の病理変化は、1906年にドイツの精神科医である Alois Alzheimer が、初めて痴呆と関連づけ文献に記載した(103)。それは56才の痴呆症状を示し死亡した女性の脳組織標本に、Bielschowsky 鍍銀染色を施し、観察した結果であった。それまで同様の病理変化については知られていたが、それらを痴呆と関連づけ記載したのは Alzheimer が初めてであった。それ以来、Alzheimer病の病理像は免疫組織化学的手法の発達と共に詳しく解明され、蛋白レベルでの関連物質の解明も進んでいる。その病理組織学的特徴は、細胞外における老人斑の形成と神経細胞内での神経原線維変化、ならびに神経細胞の脱落である(103)。神経細胞の脱落は、老人斑の形成と神経原線維変化がおよぼす結末であると考えられている。ここでは、老人斑と神経原線維変化の病理組織学的特徴ならびにこの2つの病変に関連する物質について説明する。

i. 老人斑

老人斑は、Bielschowsky 鍍銀染色標本の光顕観察において、直径が数 $10\mu\text{m}$ の円形を呈する嗜銀性構造物として観察される。その老人斑の中心にはアミロイド線維の塊であるアミロイド核が存在し、腫大神経突起が老人斑周囲を花卉のように取り囲む。老人斑の電顕観察では、アミロイド核の周囲に小膠細胞や反応性星状膠細胞を認め、腫大神経突起内には多数のミトコンドリアや膜様構造物、electron dense body などが存在している (48)。1984年にGlennerらが脳血管アミロイドより Amyloid β -Protein ($A\beta P$) を抽出し、そのアミノ酸配列を解明したことから (27)、老人斑に関する研究は急激な進歩をしている。Glennerらが得た $A\beta P$ に対する抗体が作製され、この抗体を用いた免疫染色において老人斑が染色されることがわかり、老人斑の成分が $A\beta P$ であることが判明した。またその結果より、Bielschowsky 鍍銀染色で観察できるアミロイド核を伴う老人斑 (核化老人斑) の他に、アミロイド核を伴わない老人斑 (びまん性老人斑) や腫大神経突起に乏しくアミロイド核のみからなる老人斑など、様々な形態を呈する老人斑の存在が明らかになった。このような老人斑が、時系列的にどのような順序で生じるのかということが論議の対象になったが、今ではびまん性老人斑は核化老人斑の初期像であると考えられている (109,110)。

分子生物学的研究から、 $A\beta P$ はアミノ酸695個から成る大きな蛋白質の一部であることが判明し、この蛋白質はAmyloid Precursor Protein

(APP) (アミロイド前駆体蛋白質) と名付けられた (40)。その後の研究により、APPには選択的スプライシングにより、いくつかのアイソフォームが存在することが判明した (44)。アミノ酸695個からなるAPP695、アミノ酸751個からなるAPP751、同様にAPP770、APP714などである。このうちAPP695は神経組織、特に神経細胞で特異的に発現しているのに対して、APP751やAPP770は体内の様々な組織の細胞で発現しており、神経組織では主にグリア系の細胞に存在する (2)。APP751とAPP770は、そのアミノ酸配列中にkunitz型プロテアーゼインヒビターの領域を有しているため、老人斑形成時におけるA β Pの沈着に大きな役割をしているのではないかと考えられている。

APPは、そのアミノ酸配列のN末を細胞外に、C末を細胞内にもつ膜貫通蛋白である。APPのアミノ酸配列中において、A β Pは膜貫通領域を含む部分に相当する (40)。A β Pは分子量約4kDの蛋白質で、アミノ酸数が40ないし43個で構成される。A β Pの全長が体内に存在するためには、A β Pのアミノ酸配列の両末端でAPPより切断されることが必要である。当初APPは、その代謝過程でA β Pのアミノ酸配列の内部で切断されるとされ、A β Pの全長を有するものは、正常な細胞では存在しないと考えられていた。しかしその後の研究で、全長からなるA β Pが培養細胞や正常なヒトの脳脊髄液にも存在することが明らかになり (31,90,91)、正常な生理状態においても分泌されていることが判明した。その分泌過程は、エンドソーム/ラ

イソソーム系の代謝経路により分泌されている説が有力視されている。しかしその過程において、どのような酵素が関与しているかは明らかになっていない。Alzheimer病における病理変化の最も初期のものが、老人斑形成に先立つA β Pの沈着と考えられている。したがってA β Pの分泌ならびに沈着の機序を解明することが、Alzheimer病の原因を知る上で非常に重要な事であると考えられる。また近年、老人斑のその他の構成成分として、non-amyloid component (NAC), α -1-antichymotrypsin, apolipoprotein E, トランスサイレチンなどが同定され (28,59,79,104,)、これらの物質がA β Pの沈着にどのように関与しているかが、大きな関心を呼んでいる。

ii. 神経原線維変化

神経原線維変化は、Bielschowsky鍍銀染色標本において、神経細胞体に嗜銀性線維状構造物の塊が出現するものとして観察される。その構造は特徴的で、電子顕微鏡観察では多数の線維が平行に走って束をなしていることがわかる。個々の線維は、太さ10nmの2本のフィラメントが80nmの周期でよりあった形態をしており、Paired Helical Filaments (PHF)と呼ばれる(103)。PHFは様々な溶媒や界面活性剤に難溶性であり、このことが細胞内に蓄積する理由であると考えられている。PHFを構成する主成分は異常なリン酸化をしたタウ蛋白質 (PHFタウ) であることがわかっ

た(35,47,56)。また、その他の成分としてユビキチンがこれまで同定されている(66)。PHFの抗体を用いた免疫組織化学的研究により、神経細胞体以外にもPHFを有する構造物が確認された(3)。それは neuropil thread または curly fiber と呼ばれ、神経原線維変化では細胞体内にPHFが蓄積するのに対して、neuropil thread はPHFが神経突起内に生じるものである。

タウ蛋白質は微小管結合蛋白の一つで、微小管の重合促進と安定化に働く蛋白である。またユビキチンは細胞内の異常蛋白に結合し、非リソソーム系蛋白分解の酵素群に対して標識となる物質である。これらが構成成分として、PHFが蓄積する機序としては、次のように考えられている。それは、まずタウが異常なリン酸化を受けPHFタウとして細胞内に蓄積した後、それを分解するために生じるユビキチン化や、一部のプロテアーゼ等の働きにより、その構造が変化し不溶性のPHFが形成されるというものである。

神経原線維変化は、アミロイド沈着に起因する変化であると考えられている。その理由は、神経原線維変化の認められる脳では必ず老人斑が存在する、痴呆症状を示さない老人の脳において、老人斑は存在するのに神経原線維変化は伴わない所見が多数存在する、アミロイド塊を形成したA β Pがタウのリン酸化を促進するなどの報告があるからである。Alzheimer病では大脳皮質の第3層と第5層に神経細胞の変性、脱落が顕著であるが、これらの部位は神経原線維変化や curly fiber の分布と一致する。このことは、

神経原線維変化が神経細胞死と密接に関連していることを示している。

第3節 薄束路

本研究は、GADマウスの中枢神経系における軸索変性とアミロイド関連蛋白の関係を調べることを目的としている。GADマウスの軸索変性は中枢神経系において広範囲にわたり生じるが、本研究では特に薄束路に注目した。

i. 薄束路

薄束路は、後肢における固有深部感覚を上位中枢神経系まで伝える神経路である。この神経路は、第7胸髄レベルより尾側の脊髄神経節内に存在する一次知覚神経細胞の軸索により構成される。この細胞の樹状突起は後肢筋中の筋紡錘内で、らせん終末を形成する。軸索は脊髄内に入り、さまざまな経路をたどる。その主な経路は、一次知覚神経細胞からの軸索が脊髄に入り、①薄束を延髄薄束核まで上行するもの（薄束路）、②後脊髄小脳路の起始核である胸髄クラーク核まで上行した後、クラーク核の二次知覚神経細胞とシナプス結合を形成し、小脳へ知覚情報を伝える経路（後脊髄小脳路）③脊髄前角で運動神経細胞とシナプス結合するもの（反射弓を形成）などである。薄束路を形成する軸索は脊髄薄束を腰髄、胸髄、頸髄と経た後、延髄の薄束核に至り、ここで二次知覚神経細胞とシナプス結合する。薄束核からは内側毛帯、視床を経て大脳皮質感覚野へ知覚情報を伝える。

ii. 一次知覚神経細胞

一次知覚神経細胞は、光顕観察により形態学的に大きく2種類に分類される。HE染色標本の観察において、大きく明調な細胞と小さく暗調な細胞である (Fig.6)。電顕観察では、細胞小器官の分布様式により、研究者により様々に細かく分類されている (16,38,95)。一般的には、光顕で明調に観察される細胞をA群としてさらにA1,A2,A3の3つに分類し、また暗調な細胞をB1,B2,Cの3つに分類し、計6種類に分類されている (95)。また様々なニューロペプチドの局在や軸索における逆行性色素を用いた実験結果から、薄束路を上行する軸索は、大きく明調な細胞すなわちA群の細胞の軸索であると考えられている (24,106)。

iii. 脊髓薄束

脊髓薄束は、脊髓背側を背正中溝を挟む形で存在し、くさび形を呈する。この部位を走行する線維は、より尾側の脊髓節から進入した軸索ほど、薄束の内側すなわち背正中溝寄りを走行する特徴がある。また頸髄に入ると薄束の両外側に、楔状束が明らかになる。楔状束には、前肢からの固有深部感覚を伝える軸索が走行する (Fig.7)。

iv. 延髄薄束核

脊髓を上行してきた薄束は、延髄に入ると最後野を挟む形で頭方に向か

い左右に別れながら隆起し、薄束結節を形成する (Fig.7)。同様に、上行してきた楔状束は、薄束結節の外側やや頭方に楔状束結節を形成する。薄束結節内に薄束核が、また楔状束結節内に楔状束核が存在する。その横断面観察では、薄束は延髄に入ると薄束核になり、左右に別れながら背側に局限して大きくなる (Fig.8)。その両外側には楔状束が存在する。薄束核が頭方になるにつれ小さくなるのと同時に、楔状束が楔状束核へと移行する。楔状束核も薄束核同様に背側に局限して大きくなり、徐々に左右に別れていく。

薄束を上行してきた軸索は、薄束核に入ると小さな束を形成して、背側から腹側へ下行する (Fig.9)。そして二次知覚神経細胞とシナプス結合する。シナプス結合は軸索と樹状突起間もしくは軸索と細胞体間において形成されるが、薄束核には1つの軸索終末部と複数の樹状突起がシナプス結合するシナプス複合体 (multiple synapses) または糸球体構造

(glomerulus) とも呼ばれる特殊な構造が存在する。シナプス複合体は薄束核のほかにも外側膝状体や脊髄後角などで知られている構造である (72)。薄束核では、一次知覚神経細胞の軸索のほかにも、脊髄後角から上行してくる二次知覚神経細胞の軸索、錐体路の側副枝、薄束核に存在する二次知覚神経細胞の軸索の側副枝などが、二次知覚神経細胞とシナプス結合するために終止する。そのなかでも脊髄薄束を上行してきた一次知覚神経細胞の軸索の終末部がシナプス複合体を形成すると考えられている。

二次知覚神経細胞の核は、その核膜がしばしば深い陥入を示す。またそ

の細胞質には、発達したゴルジ体が核を取り囲むように存在する。二次知覚神経細胞の軸索は、内弓状線維と呼ばれ反対側に入り、内側毛帯を形成したのち視床の後外側腹側核において三次知覚神経細胞に知覚情報を伝える。

第4節 本研究の目的

GADマウスは、軸索変性を呈するミュータントマウスである。その軸索変性は部位特異的であり、かつその経時的な変化も上行性知覚神経路である薄束路を中心に詳しく解明されている。従って軸索変性に伴う様々な病態変化を探る上で、その有用性は大きい。

現在、Alzheimer病の病態は、蛋白レベルで徐々に解明されつつあるが、いまだ残されている問題も多い。その理由の一つは、適当な実験動物が存在しないことが挙げられる。ヒトと同様な病理変化が見られる動物の報告は多いが、それらは野生動物やイヌ、サル類等であり(26,61,89)、一般的な研究者にとってその扱いは難しい。また、これらの動物は寿命が長く、その変化は加齢の進んだ個体で認められるもので、その最も初期の変化を探るのは困難である。そこで広く実験動物として用いられており、研究者も扱いやすく、変化を短期間に観察できる齧歯類における実験系が広く望まれている。ヒトや上述の動物でみられるA β P沈着では、その沈着部位周辺に変性した軸索を伴うことがあり、これらの軸索とA β P沈着との関連性を示す報告がなされている(54,82)。また加齢やAlzheimer病を始めとした神経変性症にみられる軸索変性においてAPPやユビキチンの蓄積が生じることが報告されている(11,42,73,74)。従って、GADマウスの軸索変性に際しても、同様な変化が生じている事が予想される。

変性軸索は、微細構造学的に Reactive, Regenerative, Degenerative, Dystrophic の4型に分類されることが報告されている (53)。GADマウスで生じる変性軸索は、Dystrophic 型に類似しており、これがGADマウスの名称の由来にもなっている (70)。また老人斑周囲に出現する変性軸索も、Dystrophic 型に類似していることが報告されている (48)。このように変性軸索に関する形態学的側面からも、GADマウスに生じる軸索変性に伴い、APPやユビキチンの蓄積、およびA β P沈着と類似した変化が生じている可能性が示唆される。もしGADマウスで生じる軸索変性に際して、同様の変化が生じているのなら、軸索変性とこれらの物質との関係について、その初期の変化を観察することが可能である。本研究の目的は、GADマウスの軸索変性と、APP, A β Pならびにユビキチンのアミロイド関連蛋白との関連性を調べるものである。

Fig.1 生後12週齢GADマウス

歩行時には、後肢足底を上方に向け後肢を引きずる。

Fig.2 生後9週齢GADマウス 薄束核のHE染色所見

大小様々な変性軸索 (Spheroid) (矢印) が存在する。

bar=30 μ m

Fig.3 a 生後32週齢正常マウス 頸髄のクリューラー・バレラ髄鞘染色
所見

薄束 (矢頭) は、ほとんどが有髄線維で占められているため
染色され、暗調である。

b 生後32週齢GADマウス 頸髄のクリューラー・バレラ髄鞘染色
所見

薄束 (矢頭) は脱髄により、明調である。

bar=100 μ m (Fig3a, Fig3b共通)

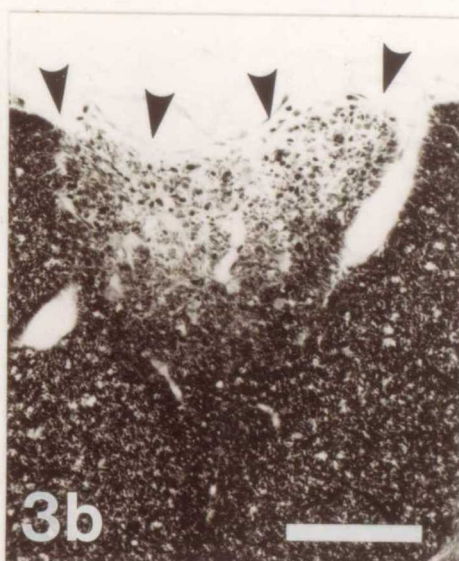
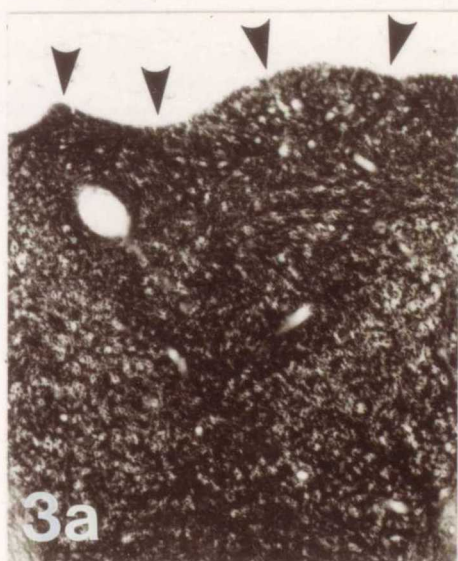
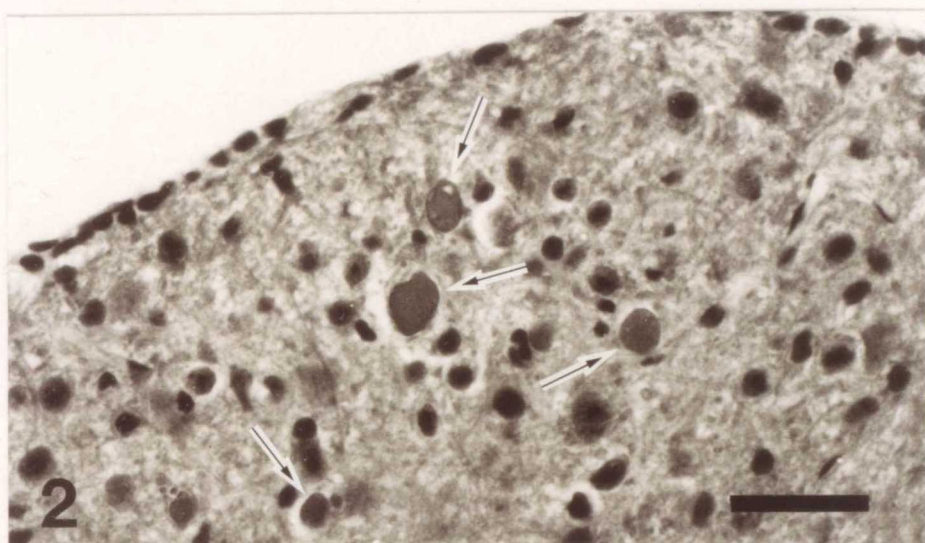
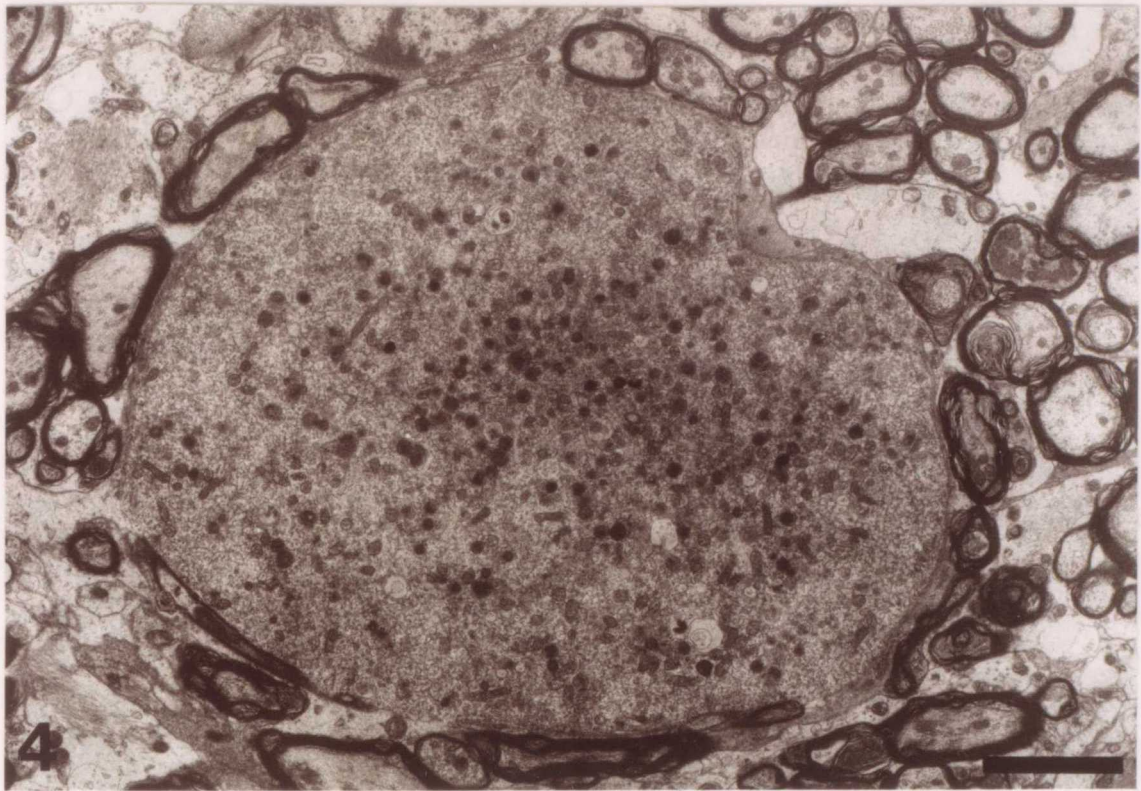
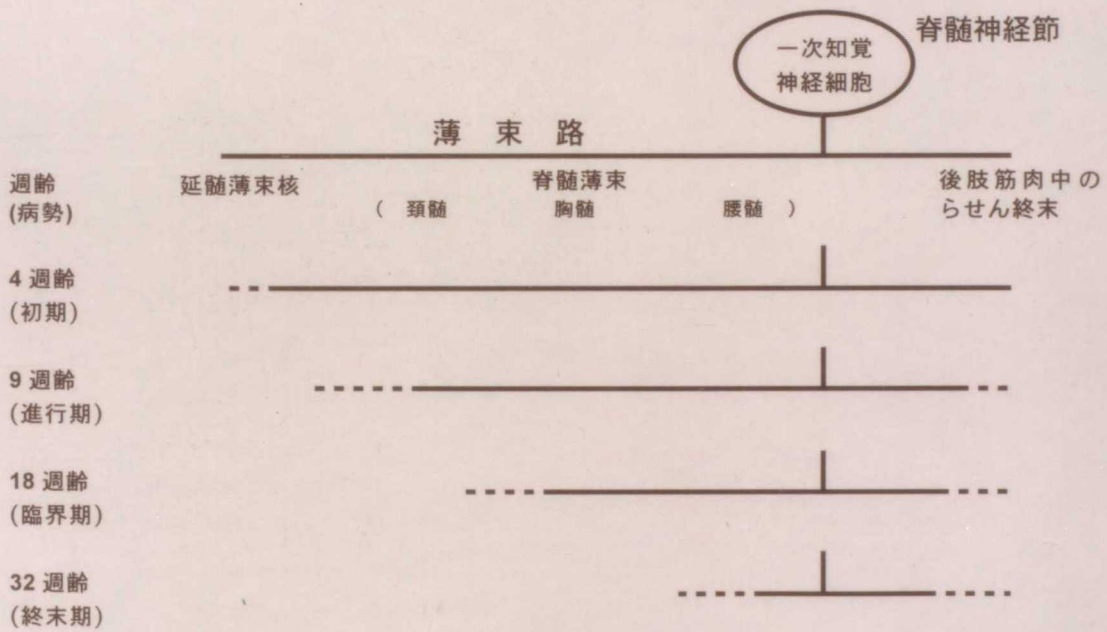


Fig.4 生後18週齢GADマウス 薄束核のSpheroid電顕像
腫大したSpheroid内にミトコンドリアやelectron dense
bodyなどが集積している。周辺には正常な軸索がみられる。
bar=24 μ m

Fig.5 GADマウスの薄束路における退行性軸索変性の経時的変化(図)
破線部は、退行していく軸索ならびに樹状突起の終末部を表す。



GADマウスの薄束路における退行性軸索変性の経時的変化



5

Fig.6 生後9週齢正常マウス 脊髄神経節のHE染色所見
脊髄神経節内に存在する一次知覚神経細胞は、大きく明調な細胞
(矢印) と小さく暗調な細胞 (矢頭) に大別される。
bar=60 μ m

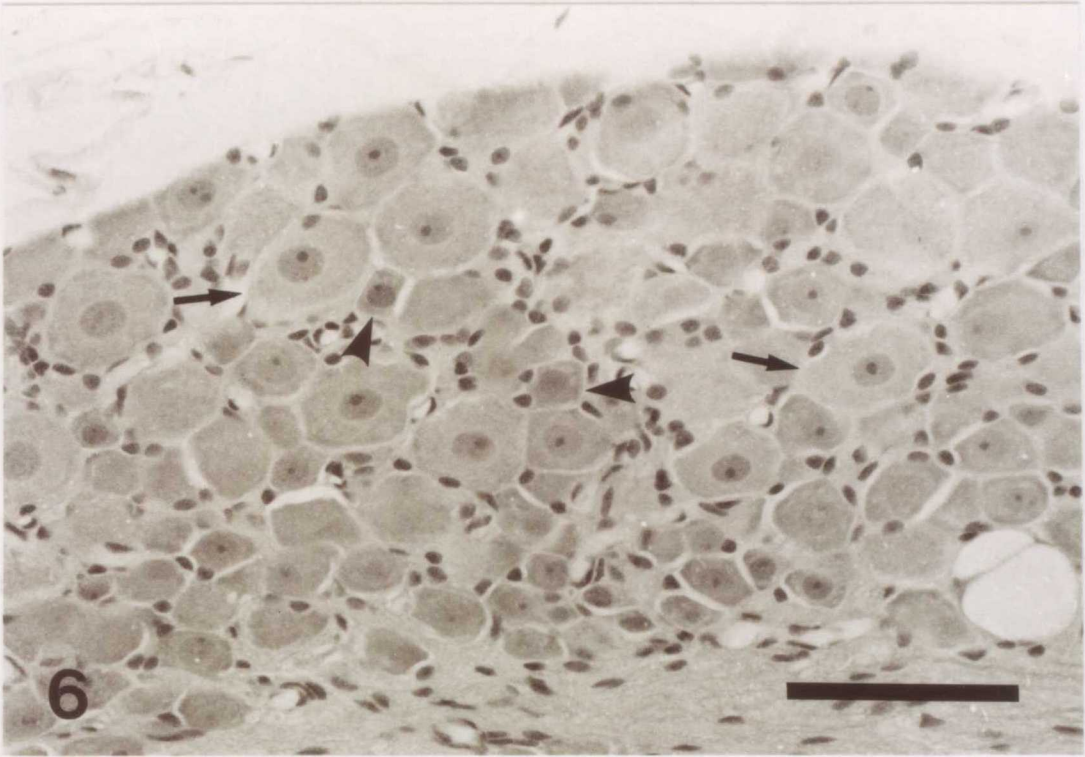
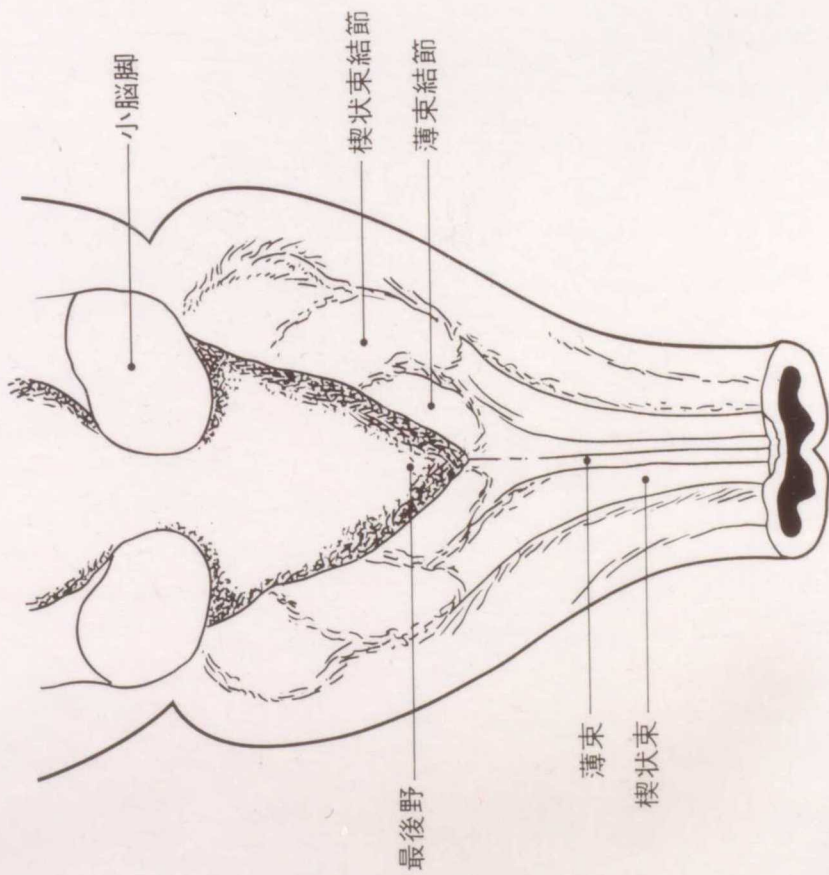


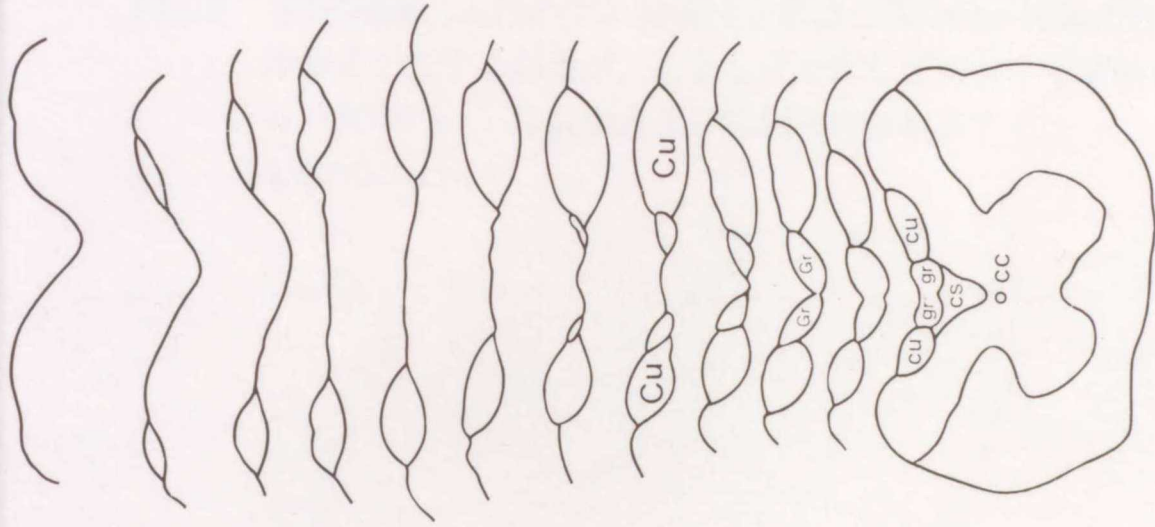
Fig.7 頸一延髄の背面図

Fig.8 頸一延髄横断面における後索核の位置的關係図
Gr:薄束核, Cu:楔状束核, gr:薄束, cu: 楔状束
cs:皮質脊髓路（錐体路）, cc:中心管



頸-延髄の背面。小脳は取り除いている。

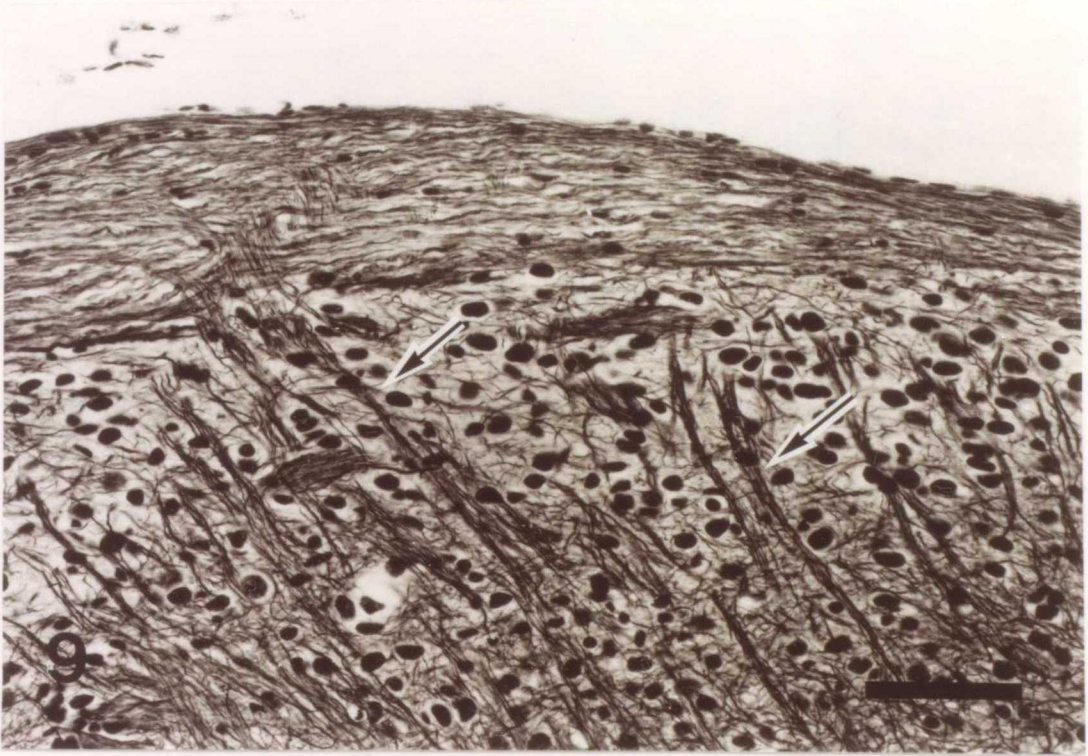
7



頸-延髄横断面における後索核の位置的関係

8

Fig.9 生後9週齢GADマウス 薄束核縦断面のBodian鍍銀染色所見
背側を走行する軸索が、小さな束をなして背側から腹側に走行する（矢印）。 写真の右側が吻側方向に相当する。
bar=50 μ m



第 2 章

GAD マウスにおける
軸索変性に伴う APP の
蓄積

第1節 緒言

Amyloid Precursor Protein (APP)は、Alzheimer病において出現する老人斑の主成分である Amyloid β -Protein (A β P)の前駆体蛋白質として知られている。この蛋白質は神経系のみならず様々な組織の細胞において発現しているが(2)、その機能や代謝経路は明らかになっていない。またAPPは、Alzheimer病を始めとして様々な動物の加齢現象や神経変性症、実験動物に対するイボテン酸の注入実験等に際して出現する変性軸索内に蓄積することが知られている(11,42,55,68,73,74)。さらにAPPの蓄積は、実験動物の脳に針を刺し、障害を与えた際に生じる変性の極めて早い時期から反応性星状膠細胞に生じる事が報告されている(77,94)。このような神経細胞ならびに反応性星状膠細胞に生じるAPP蓄積の機序は、不明である。本章では、このミュータントの生後早期から長期間にわたって軸索変性が進行する薄束路に注目し、APP蓄積の経時的変化を免疫組織化学的に調べる。

第2節 材料と方法

本実験では、2種類の抗APP抗体を用いた免疫組織化学染色とAPPの輸送に関与するクラスリン被覆小胞を確認するための抗クラスリン抗体を用いた免疫組織化学染色、GADマウスの変性の程度を確認するためのHE染色、ならびに抗Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

I. 抗APP抗体ならびに抗GFAP 抗体を用いた免疫組織化学染色とHE染色に関する材料と方法

1. 供試動物

供試動物には、国立精神・神経センター モデル動物開発部もしくはエーザイ株式会社筑波研究所実験動物施設において、SPF条件下で飼育された生後4, 9, 18および32週齢のGADマウス (gad/gad) ならびに対照正常マウス (gad/+ もしくは +/+) 各雌3個体を用いた。これらのマウスは、不断給餌ならびに不断給水、温度 $23 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、午前8時点灯午後8時消灯の明暗サイクルで飼育された。

2. 固定法, 採材ならびに保存法

マウスを抱水クロラル (1.2 g/kg B.W.) 麻酔下で、Zamboni液 (4% paraformaldehyde + 0.3% picric acid / 0.1M PBS ; 4°C, pH7.4) を、左心室より灌流固定した。灌流後、マウスから実体顕微鏡下で、脳、脊髄および腰髄レベルの脊髄神経節を採材した。これらの組織を同固定液で一晩浸漬固定した後、マウスの脳脊髄アトラスに従い (93)、延髄、第4ないし5頸髄、第5ないし6胸髄、第2ないし3腰髄に相当する部位を切り出した。これらの組織ならびに脊髄神経節は、4°C下において5% Sucrose / 0.01M PBS 中に18時間浸漬した。続いて組織を10% Sucrose / 0.01M PBS、15% Sucrose / 0.01M PBS、20% Sucrose / 0.01M PBS の順序で各12時間浸漬した後、防腐剤として0.01%の割合でアジ化ナトリウムを添加した20% Sucrose / 0.01M PBS において、実験に供するまで4°C下で保存した。

3. 切片の作製法

本実験では、凍結浮遊切片ならびにパラフィン切片を用いた。以下にその作製方法を記す。

(1) 凍結浮遊切片の作製法：保存した組織を、アルミホイルで作製したカップ内のO.C.T. Compound (Miles社 Cat. No.4583) に埋め、液

体窒素中で十分に冷却されたイソペンタン中で、急速凍結した。凍結包埋されたブロックから、クリオスタット（BRIGHT社）を用い、厚さ20 μ mの切片を作製し、その切片を0.01M PBS 中に浮遊させた。

(2) パラフィン切片の作製法：保存した組織を、真空自動固定包埋装置（サクラ精機社）により、上昇系列エタノール、トルエン、パラフィンの順序で浸透させた後、パラフィン包埋した。パラフィン包埋されたブロックから滑走式マイクロトーム（大和工機社）を用い、厚さ6 μ mの切片を作製し、これらの切片を 2% 3-Aminopropyltriethoxysilane / acetone (Aldrich社 Cat. No.11,339-5) をコートしたスライドガラスに貼り付けた。また反応産物の組織内局在性を調べる目的で、一般染色に供するため、連続切片を作製し同様に載物した。

4. 免疫組織化学染色法

(1) 浮遊切片の免疫組織化学染色法：切片を、内在性の膜蛋白を軽度に変性させることにより、以後の反応液の浸透性を良くするため、4 $^{\circ}$ C下で0.3% TritonX-100 / 0.01M PBSに一晩処理した。続いて切片を0.01M PBSで洗浄し、3% H₂O₂ / Methanolで5分間処理することにより内在性ペルオキシダーゼを不活化した後、再び0.01M PBSで洗浄した。その後、切

片を一次抗体の非特異的結合を防止するため10%skim milk（雪印乳業株式会社）、25%Block Ace/dH₂O（大日本製薬株式会社 Cat. No. UK-B25）ならびに10%正常ヤギ血清に、室温で各1時間反応させた後、一次抗体と4℃下で一晩反応させた。その後、切片を界面活性作用により十分な洗浄を行うため0.05%Tween 20/0.01M PBSならびに0.01M PBSで洗浄し、二次抗体の非特異的結合を防止する目的で10%Block Ace/dH₂Oで30分処理した後、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体と室温で1時間反応させた。反応後、切片を0.01M PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンに室温で1時間反応させ、0.01M PBSで洗浄した。引き続いて、0.02% 3,3'-diaminobenzidine/0.05M Tris-HCl (pH7.6)（Sigma社 Cat. No. D-5637）を用いて発色し、0.01M PBSで洗浄した後、90%Glycerol/0.01M PBSを用い封入した。10%正常ヤギ血清、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体ならびにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンに関しては、ヒストファインSAB-PO(R)キット（株式会社ニチレイ、Code No.424031）を、使用した。

(2) パラフィン切片の免疫組織化学染色法：切片を脱パラフィンした後、3%H₂O₂/Methanolを用い5分間処理し、内在性ペルオキシダーゼを不活化した後、0.01M PBSで洗浄した。続いて、内在性の膜蛋白を軽度に変性させることにより、以後の反応液の浸透を良くする目的で 0.3%

TritonX-100/0.01M PBSで5分間処理した。その後の発色までの染色過程は、前項の浮遊切片の免疫組織化学染色方法と同様に行った。発色後は、マイヤー・ヘマトキシリンによる核染色を行った後、アルコールで脱水後、キシレンで透徹し、封入した。

(3) 本研究で使用した一次抗体

a. 抗APP抗体

抗PN-II抗体：APP695のアミノ酸配列1から596の部分とそれに続くAβPのアミノ酸配列1から16の部分、計アミノ酸612個からなる合成ペプチドを、抗原として家兎で作製されたポリクローナル抗体。
本抗体は1%Bovine Serum Albumin(BSA) /PBSにより、500倍に希釈して使用した。

抗GID抗体：APP695のアミノ酸配列175から186の部分の合成ペプチドを抗原として家兎で作製されたポリクローナル抗体。本抗体は1%BSA/PBSにより、400倍に希釈して使用した。

b. 抗GFAP抗体：Rabbit anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein (ZYMED社 Cat. No. 08-0063)

本抗体は希釈を行わず、使用した。

(4) 陰性対照：切片を一次抗体の代わりに正常家兎血清と反応させた。

5. HE染色法

パラフィン切片を脱パラフィンした後、流水水洗し、dH₂Oに5分間浸漬した。続いて切片をマイヤー・ヘマトキシリン液で5分間染色した後、20分間流水水洗し、エオジン・フロキシリン液で1分間染色した。染色後、切片をエタノールで脱水し、キシレンで透徹後、封入した。

6. 観察法

染色後の浮遊切片ならびにパラフィン切片は、光学顕微鏡（オリンパス社 BH2 DO-1）を用いて観察を行った。

II. 抗クラスリン抗体を用いた免疫組織化学染色に関する材料と方法

1. 供試動物

供試動物には、国立精神・神経センター モデル動物開発部において、SPF条件下で飼育された生後20週齢のGADマウス (gad/gad) ならびに対

照正常マウス (gad/+ もしくは +/+) 各雌3個体を用いた。これらのマウスは、不断給餌ならびに不断給水、温度 $23\pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、午前8時点灯午後8時消灯の明暗サイクルで飼育された。

2. 固定法, 採材ならびに保存法

マウスを抱水クロラル (1.2 g/kg B.W.) 麻醉下で、4% paraformaldehyde / 0.1M PBS (4°C , pH7.4) を、左心室より灌流固定した。灌流後、マウスから実体顕微鏡下で、脊髓を採材した。組織を同固定液で一晩浸漬固定した後、マウスの脳脊髓アトラスに従い (93)、第4ないし5頸髄に相当する部位を切り出した。以後の保存までの処理は、本節 I.

2. と同様に行った。

3. 凍結切片の作製法

保存した組織を、アルミホイルで作製したカップ内の O.C.T. Compound (Miles社 Cat. No.4583) に埋め、液体窒素中で十分に冷却されたイソペンタン中で、急速凍結した。凍結包埋されたブロックから、クリオスタット (BRIGHT社) を用い、厚さ $10\ \mu\text{m}$ の切片を作製し、2% 3-Aminopropyltriethoxysilane / acetone (Aldrich社 Cat. No.11,339-5) をコートしたスライドガラスに貼り付けた。

4. 免疫組織化学染色法

切片を、内在性の膜蛋白を軽度に変性させることにより、以後の反応液の浸透性を良くするため、4℃下で0.3%TritonX-100/0.01M PBSに10分間処理した。続いて切片を0.01M PBSで洗浄し、25%Block Ace/dH₂O（大日本製薬株式会社 Cat. No. UK-B25）ならびに10%正常家兎血清に、室温で各1時間反応させた後、抗ウシクラスリンポリクローナルヤギ抗体（Sigma社 Cat. No. C-8034）と4℃下で1晩反応させた。一次抗体は1%BSA/PBSにて100倍に希釈して用いた。反応後、切片を界面活性作用により十分な洗浄を行うため0.05%Tween 20/0.01M PBSならびに0.01M PBSで洗浄し、2次抗体の非特異的結合を防止する目的で10%Block Ace/dH₂Oで30分処理した後、FITC標識抗ヤギ IgG 家兎抗体（Zymed社 Cat. No. 61-1611）で1時間反応させた。反応後の切片は0.01M PBSで洗浄し、90%glycerol/0.01M PBSで封入した。

5. 陰性対照

切片を一次抗体の代わりに正常ヤギ血清と反応させた。

6. 観察法

染色後の切片は蛍光顕微鏡（オリンパス社 BHS-RFK）を用い、観察した。

第3節 結果

1. HE染色所見

GADマウスの軸索変性は、一次知覚神経の中継核である薄束核で最も早期に観察された。その変性は好酸性でエオジンに強染する腫大した軸索 (Spheroid) と、その周辺での顕著な星状膠細胞の増生 (gliosis) の所見で特徴づけられた。大小のSpheroidは生後4週齢GADマウスの薄束核に多数認められたが、これらのSpheroidは一般に、均一にエオジンに強染し、球形をとることが多く、後にみられたようなcore (芯) を有するものや大型瘤状の成熟した形態を示していなかった。薄束核でのSpheroidの出現頻度は生後18週齢まで増加したが、その後32週齢ではむしろ減少していた。GADマウスの薄束核におけるグリア増生は、生後4週齢で既に軟膜直下に始まっていたが、まだ薄束核内全域には及んでいなかった。生後9週齢以降、星状膠細胞の増生は薄束核内全域に及び、大型の二次神経細胞の周辺に多数の星状膠細胞の細胞を認めた。

GADマウスにおけるSpheroidの出現は病勢進展とともに脊髄へ移行し、しかも、それは頸髄、胸髄、腰髄の順に移行した。従って、腰髄の変性は最も軽度であり、また生後後期まで認められなかった。生後18週齢以降からは、後脊髄小脳路や三叉神経路核、錐体路などでも同様な軸索変性を認めたが、前述の薄束路に比べ軽度であった。正常マウスでは、生後32週齢

の薄束核でSpheroidを認めたのみであった。

HE染色において、GADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各週齢3個体全てに認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

2. 抗GFAP免疫組織化学染色所見：生後4週齢GADマウスの薄束核は正常マウスより強い免疫反応を示し、その反応は18週齢まで増加した。生後4週齢での強い反応は軟膜直下で顕著であったが、加齢と共に、薄束核全体に網目状に広がった。GADマウスで観察できた強い免疫反応を示す反応性星状膠細胞は、太い突起を有していた。生後32週齢では18週齢とほぼ同じ程度の反応を示した。またこの反応は加齢と共に、脊髓薄束を下行し、生後32週齢では腰髄まで広がり、また脊髓薄束での反応は加齢と共に増した。正常マウスでは、どの週齢においても薄束核背側辺縁に弱い反応を呈する星状膠細胞が存在するのみであった。

抗GFAP免疫組織化学染色において、GADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各週齢3個体全てに認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

3. 抗APP免疫組織化学染色所見：正常マウスでは、薄束核ならびに脊髄薄束において、びまん性に弱い免疫反応を認めた(Fig10a, Fig11a)。抗GID抗体ならびに抗PN-II抗体の染色性は、正常マウスにおいては同様であった。GADマウスでは、生後4週齢の薄束核で既に正常マウスより強い免疫反応を示した。その反応は変性部位に広がり、HE染色所見や抗GFAP免疫染色所見から判断すると、形態的にその反応が変性軸索および反応性星状膠細胞に存在していることがわかった (Fig10b,11b)。変性軸索は様々な染色性を有していたが、大きいSpheroidほどその反応は強い傾向を示した。GADマウスでの変性部位においては、抗GID抗体が星状膠細胞をやや強く染める傾向があったのに対し、抗PN-II抗体は細胞体ならびに軸索を強く染めた。以上のようなGADマウスの薄束核における反応は、生後18週齢までは週齢が増すに連れ強くなったが、32週齢ではその反応は弱くなった。脊髄では、生後9週齢の頸髄から薄束核と同様な反応を示し、以後この反応は18週齢、32週齢と加齢とともに頸髄から下位の薄束を逆行性に広がっていた (Fig. 11bならびにTable. 1)。GADマウスの脊髄神経節の一次知覚神経細胞体では、生後4週齢から正常マウスより強い免疫反応を示し、また週齢を重ねるごとにその反応性は増した。正常マウスの反応は、小型細胞では強く、大型細胞では弱い傾向があったが、GADマウスでは小さな細胞と大きな細胞の両者が共に強い反応を呈していた (Fig. 10cならびに10d)。生後18週齢以降のGADマウスでは、後脊髄小脳路や三叉神経路、脊髄後角

においても、正常マウスと比べ強い反応が現れた。一次抗体に代わり、正常家兎血清で処理した陰性対照には、特異的反応産物は存在しなかった。

抗APP免疫組織化学染色において、GADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各週齢3個体全てに認められた。しかし生後18週齢ならびに生後32週齢のGADマウスの腰髄薄束における反応の強さには、若干の個体差が認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

4. 抗クラスリン免疫組織化学染色結果：抗クラスリン抗体に対する反応において、生後20週齢の正常マウスとGADマウスの間に差は認められなかった。頸髄薄束では、他の白質と同様に抗クラスリン反応がびまん性に広がっており、頸髄前角の運動神経細胞や後角の小型の細胞の細胞質がやや強い反応を示した。また脊髄前角の運動神経細胞の周囲にやや強い反応を認めた。

抗クラスリン免疫組織化学染色において、GADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各週齢3個体全てに認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

第4節 考 察

本研究により、GADマウスに生じる軸索変性に伴い、変性軸索ならびに星状膠細胞にAPPが蓄積していることが示された。その蓄積は、軸索変性が生じている生後4週齢の薄束核から始まり、軸索変性が広がるのと同様に、薄束核から脊髄薄束を頸髄や下位脊髄へと及んでいた。また加齢とともに軸索変性が生じていた後脊髄小脳路や三叉神経路などでも、その軸索変性の出現と共にAPPが蓄積していた。この事はGADマウスにおけるAPPの蓄積が、軸索変性と直接関連性があることを示している。

変性軸索内に生じるAPP蓄積の機序は明らかでないが、APPの機能もしくは代謝の異常に大きく関わっているものと考えられる。最近では、APPはシナプスに存在し、カルシウム濃度を調節することによりシナプス周囲のグルコース濃度変化やグルタミン酸の毒性からシナプスを保護しているということが提唱されている (60,86,105,117)。さらにシナプスの変化が神経細胞やグリア系の細胞におけるAPPの発現を増加させるという報告や (53)、神経線維を挫滅させた後、細胞本体でのAPPの発現をmRNAレベルで調べ、その発現レベルが上昇することを確認し、APP遺伝子発現の調節においてneuron-target interaction の重要性を説く報告がなされている (87)。以上のことから、GADマウスでは、退行性の軸索変性の過程の中でも、とくにシナプスの崩壊がAPP蓄積に大きく関与しているものと

思われる。シナプスの崩壊からAPPの蓄積に至るその過程は、以下の様に推測される。まず生後4週齢以前の薄束核において一次知覚神経細胞の軸索終末部と二次知覚神経細胞との間のシナプス結合が崩壊する。その結果、APPが正常な機能を果たせず、軸索終末部に軽度に蓄積を始める。その変性初期には、APPが本来シナプスで機能していることを考えると蓄積したAPPが正常に代謝されることも考えられる。しかし変性が進行すると代謝能力を上回る蓄積、または代謝機能の低下により、代謝されないAPPもしくは異常な代謝を受けたAPPが蓄積を始める。今回の実験では、GADマウスの一次知覚神経細胞体の免疫反応は早期より正常のものより強く、また加齢と共にその反応は強くなっていた。GADマウスでは退行性軸索変性が起きるため、変性軸索はその標的器官である二次知覚神経細胞と結合を保つことは不可能になる。その結果APP遺伝子発現の調節に障害が生じ、一次知覚神経細胞においてAPPを過剰に発現し蓄積が生じているのではないかと考えられる。

APPは脊髄神経節内の一次知覚神経細胞体から速いタイプの軸索輸送により、順行性に運ばれていることが報告されている(19)。さらにAPPの輸送には、クラスリン被覆小胞やlate endosomeが関与し、モーター蛋白の1種であるキネシンにより細胞本体から軸索の終末部まで、軸索輸送されていることが明らかにされている(21)。GADマウスは、その軸索変性の原因として軸索輸送の障害が予想されており、これらの物質が関与してい

る可能性も考えられる。しかしGADマウスでは、坐骨神経の結紮実験において、キネシンの機能異常は認めていない(98)。また本実験において60日齢GADマウスと正常マウスの間に、抗クラスリン反応の差は認められなかった。だが、クラスリンの実験ではポリクローナル抗体を使用したため、その遺伝子の点突然変異などの場合、機能に異常が生じていても免疫組織化学的には差が現れないことも考えられる。またlate endosomeに関しては何も情報が得られていないため、これらの物質に関しては今後さらに検討を加える必要がある。

星状膠細胞に関しては、神経系における変性時に反応性星状膠細胞にAPPが蓄積することが知られているが、その機序は未だ解明されていない。しかし老人斑周囲には、反応性星状膠細胞ならびに活性化した小膠細胞が存在しており、これらの細胞が、自らの細胞内もしくは老人斑周囲の変性軸索内に蓄積したAPPの代謝に関係し、老人斑形成に大きく関与していると考えられている。GADマウスにおいて、軸索変性に伴う星状膠細胞におけるAPPの増加が、星状膠細胞で発現されたものであるか否かはわからない。GADマウスの変性軸索の電顕所見では、その周囲に星状膠細胞の突起がすき間無く埋めていることがわかる。GADマウスのSpheroidにおける抗APP抗体に対する反応は、Spheroidが大きいほど強い反応を示す傾向があった。このことはAPPが比較的変性軸索の終末部近くにおいても蓄積していることを示している。APPは軸索内を輸送する途中のシナプス前神経末端

で代謝をうけるという報告があり (1)、もしGADマウスの変性軸索内に蓄積したAPPが、シナプス前神経末端で正常な代謝もしくは異常な代謝により、細胞外に分泌されるとすると、分泌されたAPPを変性軸索周囲を埋めている星状膠細胞が取り込み、蓄積に至っていることも考えられる。星状膠細胞におけるAPPの発現の有無は、今後 in situ hybridization などの分子生物学的手法により解明することが必要である。

GADマウスの薄束核での免疫反応は、生後32週齢では低下していた。その理由の1つとしては、生後32週齢の薄束核では、変性軸索は頸髄薄束へ下行したため、ほとんど存在しないことが挙げられる。つまり免疫反応を有する変性軸索の数の減少が、反応の低下として現れたものと考えられる。また星状膠細胞での反応も低下する。このことは、星状膠細胞におけるAPPの蓄積が、変性軸索の存在と大きく関係があることを示唆している。

本実験においては、抗GID抗体ならびに抗PN-II抗体の二つの抗体を用いた。これらの抗体の性質については既に報告されている (100,101)。その両抗体の染色性は、正常マウスでは、違いはなくびまん性に弱い反応があった。正常な神経組織において抗APP抗体を用いた免疫組織化学染色の結果には、神経細胞のみが反応陽性を示すものや、神経細胞と神経膠細胞の両者が反応陽性を示すものなど様々な報告がある (8,41,63,69)。このような違いは、用いた抗体のAPPに対する認識部位の違いにあると考えられる。今回の研究では、びまん性にその反応が広がっていた。その反応は

APPが、神経細胞、神経膠細胞の両者において発現していることや軸索内を順行性に移動していることなどから、特異的反応陽性の染色所見であると考えられる。また変性部位では抗GID抗体と抗PN-II抗体の反応性の違いが生じていた。この両抗体ともAPP695のアミノ酸配列の合成ペプチドを抗原として作製された抗体である。同じAPP695のアミノ酸配列の中でも、抗体作製時に抗原とする部位で染色性が異なるのは、APPの代謝に関係があるものと思われる。

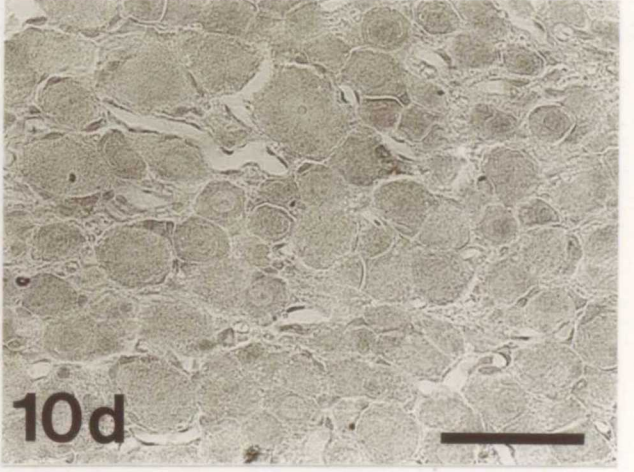
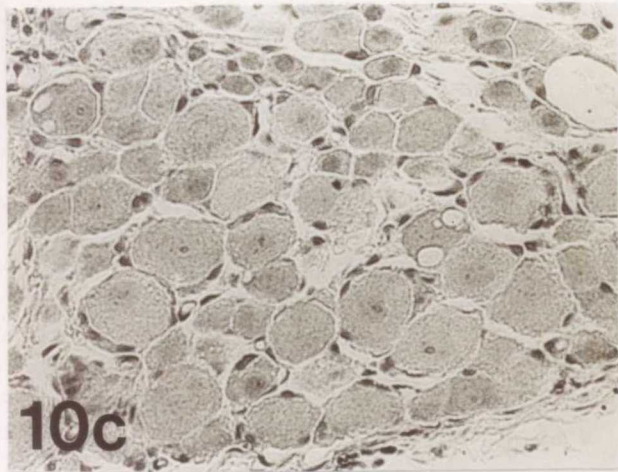
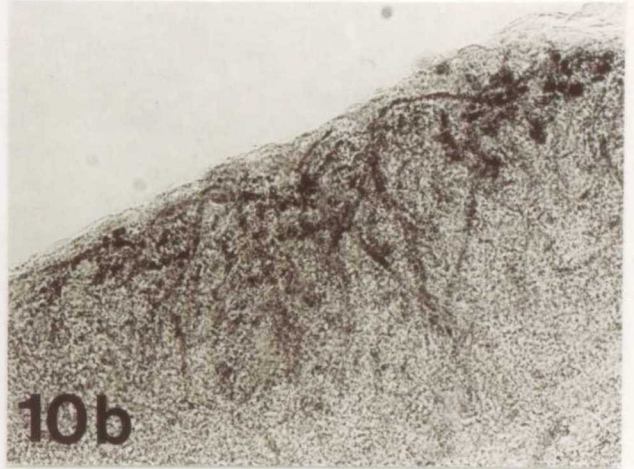
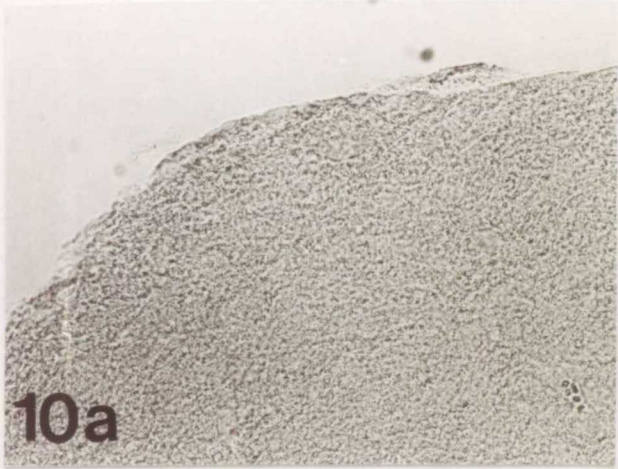
本ミュータントの軸索変性部位における、電顕観察や免疫組織化学的手法を用いたこれまでの実験結果から、活性化した小膠細胞の存在などの小膠細胞に関する変化は、認められていない。今回の実験においても、APPが蓄積したのは軸索ならびに星状膠細胞であると考えられる。しかしAPPの代謝については、小膠細胞が非常に大きな役割をはたしている可能性もあるため、GADマウスにおけるAPP蓄積と小膠細胞の関係については今後検討が必要な点であると思われる。

今日までAPPの機能に関しては、その構造からレセプター説や接着因子説が提唱され、また各細胞に普遍的に存在することから細胞増殖やカルシウム代謝に関与する物質ではないかなどの説が考えられている。GADマウスにおいて生後早期より、その軸索変性部位にAPPが蓄積することは非常に興味深いものであり、GADマウスは、APPの生理的機能や蓄積のメカニズムを知るうえで、非常に有用性が高いミュータントであると考えられる。

第5節 小 括

本研究では、GADマウスの薄束路における軸索変性と抗APP免疫反応との関連性を経時的に調べた。APPの反応は既に生後4週齢での薄束核において認められた。その反応部位は変性軸索と星状膠細胞であった。また生後4週齢以降、軸索変性部位の広がり方と一致して、その反応も薄束路を広範囲に広がっていた。変性軸索が退行する生後32週齢の薄束核では、その反応は減じていた。このことからGADマウスの軸索変性とAPP蓄積には強い関連性があることが判明した。

- Fig.10 a 生後18週齢正常マウス 薄束核の抗GID抗体免疫染色所見
薄束核にびまん性に反応がある。
- b 生後18週齢GADマウス 薄束核の抗GID抗体免疫染色所見
薄束核の中でも、特に星状膠細胞の突起に強い反応が生じている。
- c 生後9週齢正常マウス 脊髄神経節の抗PN-Ⅱ抗体免疫染色所見
小さい細胞に強い反応がある。それに対して大きな細胞の反応は
弱い傾向がある。
- d 生後9週齢GADマウス 脊髄神経節の抗PN-Ⅱ抗体免疫染色所見
細胞の大きさに関らず、強い反応がある。
- bar=50 μ m (Fig.a, Fig.b, Fig.c, Fig.d共通)



- Fig.11 a 生後32週齢正常マウス 頸髄薄束の抗PN-Ⅱ抗体免疫染色所見
薄束にびまん性に弱い反応がある。
- b 生後32週齢GADマウス 頸髄薄束の抗PN-Ⅱ抗体免疫染色所見
薄束の背正中溝近くにおいて、びまん性に強い反応がある。
- bar=80 μ m (Fig.a, Fig.b共通)

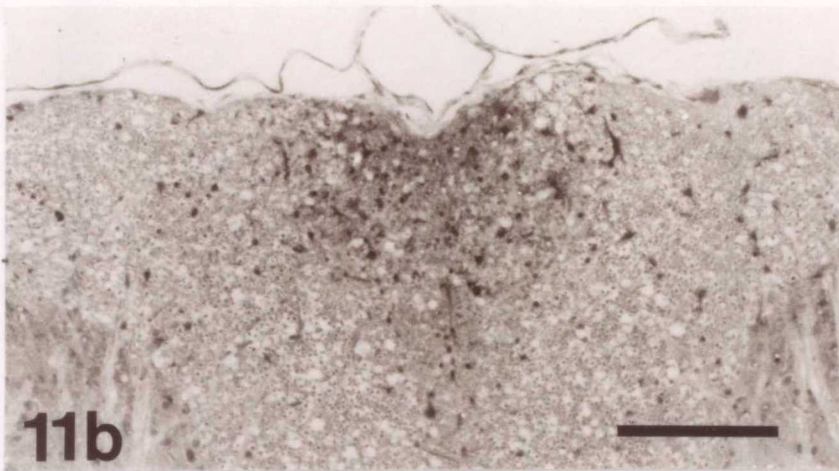


Table.1 GADマウスの薄束路における Amyloid Precursor Protein (APP) の免疫染色結果の経時的変化

生後4週齢		生後9週齢		生後18週齢		生後32週齢	
薄束核	頸髓 胸髓 腰髓	薄束核	頸髓 胸髓 腰髓	薄束核	頸髓 胸髓 腰髓	薄束核	頸髓 胸髓 腰髓
+	± - -	++ + - -	++ + - -	++ ++ + ±	++ ++ + ±	++ ++ + ±	++ ++ + -

* : +++ ~ ++ は強陽性, + ~ ± は陽性から弱陽性, - は陰性を表す

第 3 章

APPの蓄積に続くAmyloid
 β -Protein (A β P) の蓄積

第1節 緒言

Amyloid β -Protein ($A\beta P$) はAPPの内部に含まれる蛋白質で、Alzheimer病患者や高齢者の脳にみられる老人斑における主成分である。またAlzheimer病では $A\beta P$ の沈着、即ち老人斑の形成は、極めて初期の変化であるとする説が有力視されている。つまり、 $A\beta P$ の沈着がAlzheimer病の原因に最も近い変化であり、この疾患の発症機序を知るうえで重要な意味を持つものである。しかしAPPから $A\beta P$ が切断され、分泌される機序は明らかでない。前章において、GADマウスの軸索変性に伴い、変性軸索ならびに星状膠細胞にAPPが蓄積していることを明らかにした。特に、GADマウスの薄束路においてはAPPの蓄積が長期にわたって観察されることより、その蓄積に続いてAmyloid β -Protein ($A\beta P$) の蓄積が生じていることが予想される。GADマウスの中樞神経系の軸索変性とその周辺組織での $A\beta P$ 蓄積に何らかの関連性があるならば、GADマウスが、APPから $A\beta P$ が産生される機序を明らかにするうえで、重要な役割を果たすことができるかもしれない。

本章では軸索変性に伴うAPP蓄積に続く、 $A\beta P$ の蓄積の有無を免疫組織化学的に検討する。

第2節 材料と方法

本実験においては、2種類の抗A β P抗体を用いた免疫組織化学染色と、アミロイドを染色し偏光の有無によりアミロイドの存在を確認するコンゴアレッド染色ならびにチオフラビンS染色を行った。

1. 供試動物

第1章 第2節 I.1. と同様の動物を用いた。

2. 固定法, 採材ならびに保存法

第1章 第2節 I.2. と同様に行った。

3. 切片の作製法

第1章 第2節 I.3. (2) と同様に行った。

4. 免疫組織化学染色法

パラフィン切片の免疫組織化学染色：切片を脱パラフィンした後、3% H₂O₂/Methanolを用い5分間処理し、内在性ペルオキシダーゼを不活化した後、0.01M PBSで洗浄した。以後の反応液の浸透を良くする目的で0.3% TritonX-100/0.01M PBSで5分間処理した。その後の染色過程は、第

1章 第2節 1.4.(2) における10%skim milk処理以降の染色過程と同様に行った。また陽性対照の切片では脱パラフィン後、A β Pの抗原性を賦活化するために(45)、95%蟻酸/dH₂O (WAKO Cat. No. 066-00466)で10分間処理した後、内在性ペルオキシダーゼの不活化以降の染色過程を行った。

(3) 本研究で使用した一次抗体

affi-28 : A β Pのアミノ酸配列1-28の合成ペプチドを抗原として作製されたポリクローナル抗体(71)。使用時には1% BSA/PBSを用い700倍に希釈をして用いた。

抗A/ β 4₁₋₄₂ポリクローナル抗体 : A β Pのアミノ酸配列1-42の合成ペプチドを抗原として作製されたポリクローナル抗体(Boehringer Mannheim Biochem.; Cat. No. 1381431)。使用時には1%BSA/PBSを用い、20倍に希釈をして用いた。

(4) 陰性対照 : 切片を一次抗体の代わりに、吸収実験後の上清と反応させた。

抗体の吸収実験方法：抗 A/ $\beta 4_{1-42}$ ポリクローナル抗体とそれに相補的な合成ペプチド50倍量（Research Biochemical社 Cat. No. A-189）を4℃下で12時間反応させた。続いてその反応液を冷却超遠心器を用い、51000rpmの回転数で4℃下で1時間遠心し、上清を陰性対照の反応液とした。

5. コンゴレッド染色法ならびに観察法

切片を脱パラフィンならびに十分な流水水洗後、1%コンゴレッド水溶液と1時間反応させた。続いて、切片を水酸化カリウムアルコール溶液で処理した後、80%エタノールで分別した。分別後、流水水洗し、アルコールで脱水後、キシレンで透徹し封入した。観察は、偏光装置（オリンパス社 AH2-KPO, AH2-AN45）を用い行った。

6. チオフラビンS染色法ならびに観察法

切片を脱パラフィンならびに十分な流水水洗に続いて、1%チオフラビンS水溶液と30分間反応させた。流水水洗後、切片を1%酢酸水で分別した。その後、切片を流水水洗し、アルコールで脱水後、キシレンで透徹し封入した。観察は、偏光装置（オリンパス社 AH2-KPO, AH2-AN45）を用い行った。

7. 陽性対照

Alzheimer病患者の脳皮質（年齢・性別不詳）のパラフィン切片を用い、2種類の抗A β P抗体を用いた免疫組織化学染色、コンゴレッド染色ならびにチオフラビンS染色における陽性対照とした。

第3節 結 果

薄束路でのA β Pの免疫反応は、GADマウスのみ認められた。その陽性反応は、生後9週齢以降の薄束核ならびに頸髄の薄束で観察された。HE染色所見や抗GFAP免疫染色所見から判断すると、反応を呈する構造物は、形態的にSpheroid（変性軸索）ならびに星状膠細胞であった。Spheroidでの反応性は様々であったが、大きい軸索ほど強い傾向を示していた。薄束核における反応は、生後9週齢より18週齢にかけて強くなったが、生後32週齢では逆に弱くなった。薄束核と同様の反応は、加齢に伴い薄束を頸髄や下位脊髄へと広がっていき、また加齢とともに強くなった。この傾向は軸索変性の進行やAPPの染色性とよく一致していた。脊髄神経節の一次知覚神経細胞は、どの時期においても、免疫反応を認めなかった。同一抗体を用いたAlzheimer病患者脳陽性対照では、直径50 μ m前後の大きさで、中心に強い反応を示す凝集したアミロイド核をもつ核化老人斑や、核化老人斑よりも大きくアミロイド核を有さないびまん性老人斑が、大脳皮質全体に混在していた（Fig.12d）。核化老人斑の多くは大脳皮質深層に分布していた。本実験で用いた2つの抗A β P抗体の反応性に差はなく、一次抗体を除去した陰性対照では、陽性反応は認められなかった。

GADマウスのA β Pは、コンゴレッド染色ならびにチオフラビンS染色において、偏光を呈さなかった。Alzheimer病患者脳で同一染色を施し

た切片では、核化老人斑のアミロイド核は円形の強い偏光を示したのに対して、びまん性老人斑の多くは、偏光を呈さなかった。GADマウスの薄束核にみられたAβP反応もびまん性に広がり、コンゴレッド染色とチオフラビンS染色で偏光を呈さない結果と一致していた。GADマウスならびに正常マウスの脊髄後角の第IからIII層と三叉神経路核に極めて弱いAβP反応が認められた。

抗AβP免疫組織化学染色、コンゴレッド染色ならびにチオフラビンS染色においてGADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各週齢3個体全てに認められた。しかし生後18週齢ならびに生後32週齢のGADマウスの腰髄薄束における反応の強さには、若干の個体差が認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

第4節 考 察

GADマウスの薄束路において、APPの蓄積に続いてA β Pの蓄積が確認された。GADマウスの薄束核では、APPの蓄積は生後4週齢から生じていたが、A β Pの蓄積は生後9週齢から認められた。このようにAPPの蓄積に続いて、時を前後してA β Pの蓄積が始まっていた。またA β Pの分布は、APPの分布と同様に加齢と共に、薄束核から脊髄薄束を頸髄、胸髄へと逆行性に広がっていた。その蓄積部位はAPPの場合と同様に、変性軸索ならびに星状膠細胞であった。これらの事はA β Pの蓄積が、軸索変性に伴い蓄積したAPPが代謝された結果として生じたことを示している。現在、APPからA β Pが産生される代謝経路に関しては2説ある。即ち、一度細胞膜上に発現したAPPが再度クラスリン被覆小胞内に取り込まれ、細胞内で代謝されることが知られているが、その経路において、取り込まれたAPPがライソソームで代謝された結果A β Pが生じるか(12,29)、もしくはライソソームに至る前の late endosome の段階で生じるもののいずれかとされている(6,30,31,89)。APPは、クラスリン被覆小胞もしくは late endosome の形態で、軸索輸送により軸索終末部まで運ばれ、シナプスで何らかの機能を果たすとされている(60,90,105)。また老人斑に沈着するA β Pは、変性した軸索終末部から分泌されたA β Pによるものではないかという報告がある(61,62,82)。これらの事から、A β PがAPPの何らか

の異常により、変性軸索内で産生されることが示唆される。以上のことから GADマウスにおける Spheroid（変性軸索）内での A β P 蓄積の機序としては次のような事が推測できる。まずシナプスの崩壊に始まる軸索変性が生じる。その結果、本来軸索終末部まで輸送され、シナプスで何らかの機能を果たす APP が、その変性軸索の終末部に蓄積する。さらに軸索変性が長期にわたるため、APP の異常な蓄積に伴い、その代謝に異常を来し、その変性軸索内において A β P の産生に至る。GADマウスの変性軸索内において A β P が産生されることは、薄束核で A β P の蓄積がみられる生後 9, 18 および 32 週齢のいずれの週齢においても、脊髄神経節内の一次知覚神経細胞で A β P の免疫反応がみられないことから裏付けられる。

星状膠細胞における A β P の蓄積も同様に、APP の蓄積や異常な代謝に起因するものと思われる。軸索変性に伴い、その周囲で増生する反応性星状膠細胞において APP が多量に蓄積する。本来は正常な代謝を受けるべき APP が、星状膠細胞の APP の代謝能力を上回る蓄積により分解し切れず、異常な代謝により A β P の産生に陥ったのではないかと考えられる。また星状膠細胞に関して興味深いのは、ニューロペプチドであるサブスタンス P (Substance P) が、A β P の細胞毒性から細胞を保護する作用を有しているという報告である (49)。GADマウスの軸索変性部位では、変性軸索を取り囲むように存在している星状膠細胞が、サブスタンス P を産生している (112)。このことは星状膠細胞が軸索変性に際し、星状膠細胞自身が軸

索の変性に及ぼすA β Pの作用を軽減し、何らかの防衛反応を示していることが考えられる。

GADマウスの薄束路では、生後32週齢になると上位の薄束核におけるA β Pの反応が低下し、A β Pが蓄積しているSpheroidが頸髄より下位の脊髄へと移動した。薄束核で反応が低下した理由としては、A β Pが蓄積している変性軸索が退行したこと、星状膠細胞における反応が軸索の退行消失と並行して低下することや、星状膠細胞に蓄積していたA β Pが分解された等が考えられる。A β Pは正常な細胞においても産生されていることから

(90,91)、本来細胞自体にA β Pを代謝、分解する経路を有している可能性があり、GADマウスの反応性星状膠細胞に蓄積したA β Pは、分解されたことが考えられる。A β Pの分解経路に関しては不明な点が多く、現在、A β Pを分解する酵素として、インシュリン分解酵素(50)、ゼラチナーゼA(107)などが候補に挙げられている。GADマウスの軸索変性に伴うA β Pの蓄積に関して、これらの酵素が関与しているのか否かは、今後解明しなければならぬ重要な点である。

A β Pの沈着による老人斑は、ヒトを始めとしてサル類、イヌ、クマ、ネコなどで形成されるが(26,89,97)、これらの老人斑はコンゴレッド染色ならびにチオフラビン染色において偏光を呈する。コンゴレッド染色ならびにチオフラビン染色は、 β -sheet構造にこれらの色素が結合することにより、陽性を呈する染色である。またこの染色は、A β Pが線維状を呈

し、さらにその線維が凝集すると、非常に強い偏光を呈するようになる。これらの現象は老人斑において、A β Pの線維化ならびに凝集の程度が低いびまん性老人斑はコンゴレッド染色に際し弱い偏光を示すかもしくは偏光を示さないが、核化老人斑はコンゴレッド染色に際し強い偏光を示すことから裏付けられる。本実験において、GADマウスのA β Pは、コンゴレッド染色ならびにチオフラビンS染色において偏光を示さなかった。これらの染色において老人斑とGADマウスにおけるA β Pの偏光の有無は、A β Pのアミノ酸の一次構造の違いに由来すると思われる。偏光を示す老人斑が形成される動物のA β Pのアミノ酸の一次構造は、ヒトのものと全く同じであり(39,40,87)、アミノ酸配列中2カ所に β -sheet構造を有する。しかしマウスのA β Pのアミノ酸配列は、N末から5,10,13番目のアミノ酸が、これらの動物の配列とは異なっており(108)、ヒトなどで2カ所存在する β -sheet構造のうち、1つが α -helix構造となる。A β Pが凝集する程度は、 β -sheet構造によるところが大きく、ヒトなどのA β Pでは2カ所の β -sheet構造を有する事により、高次構造にも影響を与え、非常に凝集しやすくなっている。実際に、1つの β -sheet構造しか有さないマウスのA β Pは、in vitroにおいて凝集能は極めて低いことが示されている(18)。このようなことから、GADマウスのA β Pは、アミノ酸の一次構造の違いがさらに高次構造に影響をし、A β Pの凝集が行なわれず、コンゴレッド反応やチオフラビン反応が陰性を示すものと考えられる。

Alzheimer病においては、A β Pの沈着（老人斑の形成）が一連の変化をもたらし、最終的に神経細胞死を引き起こすという考えが主流である（33,88）。GADマウスでは長期にわたり変性軸索や星状膠細胞にA β Pが蓄積するにもかかわらず、一次知覚神経細胞や星状膠細胞に細胞死は認められない。A β Pの毒性に関しては、凝集していないA β Pと、凝集しているA β Pの細胞に対する毒性を比較し、凝集をしているA β Pのほうが毒性が強いという報告がなされている（7）。GADマウスでは、蓄積するA β Pがコンゴレッド染色陰性である事に加え、変性軸索の電顕観察においてアミロイド線維ならびにその凝集像を確認していない。従ってGADマウスの薄束核に生じるA β P蓄積は、線維構造を形成していないpre amyloidの状態であると考えられる。即ち、GADマウスでは、A β Pが蓄積しても、 β -sheet構造の少ない一次構造により効果的にA β P線維化せず、また老人斑でみられるような凝集も起こさなかったものと考えられる。

これまでマウスの中樞神経系においてA β Pの蓄積が確認されたのは、senescence-accelerated mouse（SAMマウス；加齢促進マウス）における報告のみである（102）。この報告ではA β Pの蓄積は、大脳皮質や海馬、小脳など広範囲にわたり、小型顆粒状構造物として分布している。GADマウスでは、変性軸索および星状膠細胞の分布と深い関連性をもってA β Pの蓄積を認めた。このような反応性の違いは、SAMマウスでは顕著な軸索変性を認めず、A β Pの蓄積部位やその蛋白質としての構造がGADマウ

スとは本質的に異なっているためと考えられる。しかし、後にSAMマウスのA β Pの蓄積部位には、A β PがAPPから切り出される際にそのC末端を切断する酵素として考えられているプロリルエンドペプチターゼも共存していることが報告され(25)、同様の酵素がGADマウスでも活性を有するか否かは今後検討する必要がある。

第5節 小 括

GADマウスの薄束路において、APPの蓄積に続いてA β Pの蓄積が生じていることを免疫組織化学的に明らかにした。A β Pの免疫反応はSpheroidとその周辺で増生する星状膠細胞で強陽性であった。従ってGADマウスでみられる薄束路でのA β Pの蓄積は、その軸索変性の進行と並行して生じており、薄束核で始まって次第に下位の脊髓薄束に及んでいた。GADマウスで蓄積するA β Pは、コンゴレッド染色やチオフラビンS染色において偏光を示さず、凝集していなかった。

- Fig.12 a 生後32週齢GADマウス 頸髄薄束のHE染色所見
- b 生後32週齢GADマウス 頸髄薄束の抗A β P抗体染色所見
薄束にびまん性に反応がある。また星状膠細胞の突起に反応がある（矢頭）。
- c 生後32週齢GADマウス 頸髄薄束の抗A β P抗体染色陰性対照所見
免疫反応は認めない。
- d ヒトAlzheimer病患者の大脳皮質の抗A β P抗体染色所見
核化老人斑（矢印）とびまん性老人斑（矢頭）に反応がある。
bar=50 μ m (Fig.a, Fig.b, Fig.c, Fig.d共通)

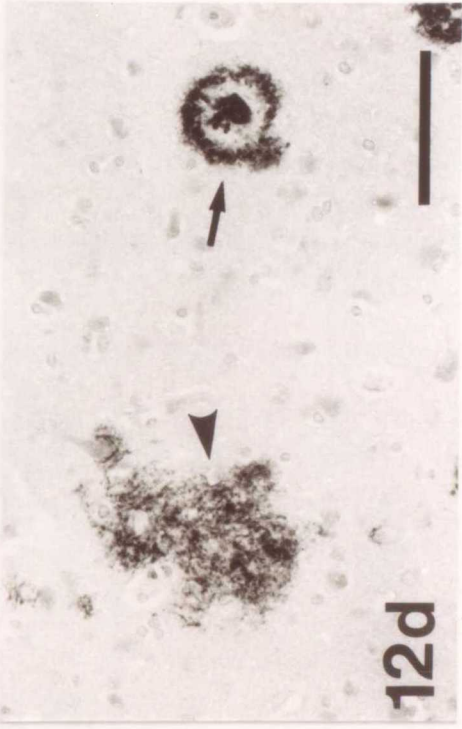
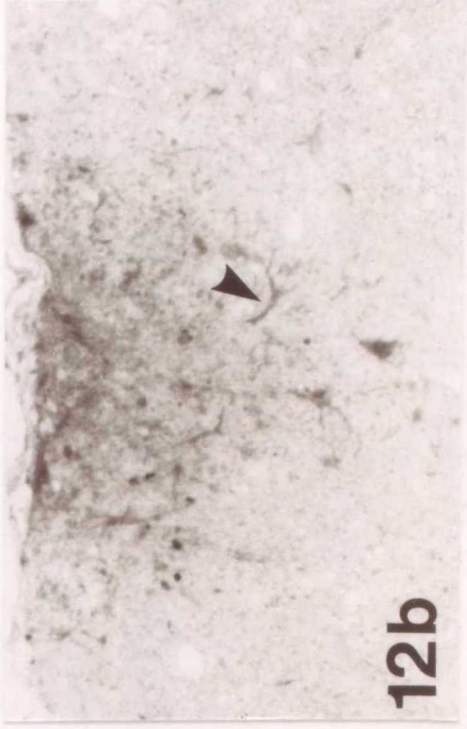


Table. 2 GADマウスの薄束路における Amyloid β -Protein
(A β P) の免疫染色結果の経時的変化

生後4週齢		生後9週齢		生後18週齢		生後32週齢	
薄束核	頸髄 胸髄 腰髄	薄束核	頸髄 胸髄 腰髄	薄束核	頸髄 胸髄 腰髄	薄束核	頸髄 胸髄 腰髄
—	— — —	++	+	±	—	++	+++ ++ +
*	— — —	++	+	±	—	++	+++ ++ +

* : +++ ~ ++ は強陽性, + ~ ± は陽性から弱陽性, — は陰性を表す

第 4 章

薄束核における軸索変性 初期の形態変化

第1節 序 論

GADマウスの薄束路において、軸索変性に伴いAPPならびにA β Pが蓄積することが判明した。またその蓄積の過程において、シナプスの崩壊が重要な意味を持つことが示された。しかし、これまでのGADマウスにおける変性軸索の観察は主に成齢の個体を用いたものであるため、シナプスの崩壊から始まる軸索変性が、どのような形態変化を経てSpheroid 形成に至るかは明らかにされていない。本章では、生後早期の軸索変性について微細構造学的に検討する。

第2節 材料と方法

1. 供試動物

供試動物は、国立精神・神経センターモデル動物開発部またはエーザイ株式会社筑波研究所実験動物施設において、SPF条件下で飼育された生後10, 20, 30, 35, 40日齢のGADマウス (gad/gad) ならびに対照正常マウス (gad/+もしくは+/+) の各雌3個体を用いた。これらのマウスは、不断給餌ならびに不断給水、温度 $23 \pm 4^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、午前8時点灯午後8時消灯の明暗サイクルで飼育された。またGADマウスと正常マウスとの判別は、GADマウスが感覚性失調の姿勢を示し始める生後30日齢以前には不可能である。従って本ミュータントの遺伝形式が劣性遺伝であることを踏まえ、実験に供したGADマウスのうち生後10日齢ならびに20日齢の個体については、遺伝子型がホモタイプ (gad/gad) 同士の個体による交配で得られたマウスを用いた。

2. 固定法，採材ならびに保存法

マウスをエーテル麻酔下で放血死させ、実体顕微鏡下で延髄を取り出した。採取した組織は、3%Glutaraldehyde/0.1M PBS (4°C , pH7.4) で4時間浸漬固定し、PBSで洗浄後、包埋可能な大きさに切り出した。この際、35日齢の個体については薄束核の長軸方向に切断し縦断面観察用に、

またそれ以外の日齢の個体については横断面観察用に切り出した。その後、組織は0.1M PBSにおいて、実験に供するまで4℃下で保存した。

3. 超薄切片の作製法

保存した組織を、1%オスミウム酸水溶液で2時間後固定し、アルコール脱水に続き常法通りEpon包埋した。包埋されたブロックから厚さ1 μm の厚切り切片を作製し、その切片をトルイジンブルー・アズールII染色した後、顕微鏡観察した。顕微鏡観察後、ブロックからウルトラミクロトーム (ULTRACUT E; Reichert-Jung社) を用い超薄切片を作製した。

4. 染色法

得られた超薄切片を0.5%酢酸ウラン/70%エタノールで20分間染色した後、 dH_2O を用い洗浄した。続いて0.1%クエン酸鉛/ dH_2O で10分間染色し、 dH_2O を用い洗浄後、観察に供した。

5. 観察法

染色後の切片は、H-7000型透過型電子顕微鏡 (日立製作所) を用いて、加速電圧100kVの条件で観察した。

第3節 結 果

1. 光顕観察

正常マウス：生後10日齢の薄束核では、有髄線維は僅かに認められる程度であり、二次知覚神経細胞は小さく未発達で、突起を伸展させているものを認めなかった。また薄束核内全体に明調な部位が、モザイク状に分布していた。生後20日齢になると有髄線維は増加したが、未だ成齢と比べるとその出現頻度は低かった。二次知覚神経細胞は次第に大型となり、突起も認められた。またモザイク状に分布する明調な部位は10日齢に比べると、ややその出現頻度は減少した。生後30日齢以降になると、有髄線維の出現頻度は、ほぼ成齢のものと同程度になり、薄束核内全域に分布するようになり (Fig.13a)、二次知覚神経細胞は、成齢の薄束核におけるものと、同程度に発達していた。また明調な部位は、薄束核背縁近くに観察できるのみになった。

GADマウス：GADマウスの薄束核では正常マウスでの組織構造に加え、20日齢の個体よりSpheroid (変性軸索) が観察された (Fig.13b)。厚切り切片のトルイジンブルー・アズールⅡ染色では、変性軸索は濃青色から淡青色の様々な染色性を示し、その形は大小様々な類円形で、その細胞質に黒い顆粒を有していた。その黒い顆粒の数は、数個から10数個まで様々であったが、Spheroidが大型である程増える傾向を示した。生後20日齢の

GADマウスでみられたこれらの軸索は、成齢でみられる均一無構造もしくは芯を有するSpheroidとは、多数の顆粒を持つという点で異なっていた。顆粒を持たず青色で均一に染色される、いわゆる成熟したSpheroidは生後40日齢の個体から観察された。GADマウスにみられるSpheroidは、週齢を追うごとにその出現頻度を増していた (Fig. 13c)。またこれら変性軸索の分布様式に、薄束核内における位置的特異性や二次知覚神経細胞ならびに血管との特別な関連性はなかった。

光顕観察において、GADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各日齢3個体全てに認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

2. 電顕観察

正常マウス：生後10日齢の薄束核は殆ど無髓線維で占められ、有髓線維に乏しかった。二次知覚神経細胞の核は陥凹に乏しく、類円形を呈していた。シナプス結合は多くは認められず、神経線維間は神経膠細線維で確認できる星状膠細胞の突起で占められていた。このことより光顕で観察した明調な部位は、星状膠細胞の細胞突起で占められた部分であることがわかった。生後20日齢になると、有髓線維が急増し、シナプスも多数認められた。また薄

束核の特徴である、1つの軸索終末部が複数の樹状突起とシナプス結合するシナプス複合体 (multiple synapses) も、この日齢より観察できるようになった。二次知覚神経細胞の核は、複雑な陥凹を示すようになっていた。星状膠細胞は生後10日齢のものほど顕著ではないが、その細胞突起が薄束核内をモザイク状に占めていた。生後30日齢以降になると、有髄線維は成齢のものと同程度に分布し、二次知覚神経細胞は、しばしば太い軸索丘を形成し、その核は深い陥入を示した。またシナプスも顕著になり、多数のシナプス小胞を有する多くの軸索終末部を認めた。星状膠細胞の細胞突起は、生後20日齢以前の薄束核に比べ、それほど顕著には存在せず、また核が円形で、明るい細胞質を有する星状膠細胞の細胞体が、しばしば軟膜直下に確認できた。

GADマウス：正常マウスと同様な基本的組織形態に加え、生後20日齢の個体より多数の腫大した変性軸索を認めた。光顕観察でみられた Spheroid (変性軸索) に加え、実際には様々な程度に腫大した Spheroid を観察できた。この構造物が軸索であるということは、シナプス結合を有するか、もしくは髄鞘を有していることから確認できた (Fig.14, 15)。シナプス結合を有し腫大の程度が軽度な軸索終末部では、electron dense bodyが出現し、ミトコンドリアが集積していた。このような形態を示す軸索終末部はシナプス複合体にしばしば認められた (Fig.14)。腫大が進んだものではミトコンドリアやelectron dense bodyに加え、ニューロフィ

ラメントや太さ40nm前後の特殊なフィラメント様構造物の存在が顕著であった (Fig.16a)。このフィラメント様構造物は、電子密度の高い部位と低い部位とが交互に現れる所見をしばしば示した。さらに腫大の進んだ軸索では、以上の変化に加えて、内部に不定形の電子密度の低い物質を有する空胞やフィラメント構造物の集積を認め、全体の電子密度が増し、軸索内は暗調となっていた (Fig.17)。変性軸索におけるシナプス結合は、腫大が軽度のものには認められたが、進行に伴いその出現頻度は減少した。しかし稀に、シナプス結合を保ったまま、腫大が著しく進んだ変性軸索も存在していた

(Fig.18a)。electron dense bodyは、その形態が一様ではなく、明らかに周囲に一層の膜に包まれているものやその周縁が不明瞭なもの、層状を呈しているもの等があり、またその色調も濃淡様々で、個々の同定は難しい。Spheroid内のミトコンドリアは、正常のものとは比べてやや小型である傾向があったが、特に形態異常を認めなかった。また一部では、ミトコンドリア様の形態を示すelectron dense bodyや膨化や空胞化を示すミトコンドリア様の構造物等も認められた。フィラメント構造物は、その走行に方向性はなく複雑に走行し、分枝するものも存在していた (Fig.16b)。星状膠細胞の細胞突起が、しばしば腫大の進んだ変性軸索を取り囲む所見が、生後30日齢よりしばしば観察された (Fig.18b)。二次知覚神経細胞や星状膠細胞、血管内皮細胞の細胞質ならびにその突起に、変性軸索で観察できたようなミトコンドリアの蓄積やelectron dense body、フィラメント構

造物の出現は認められなかった。

電顕観察においてGADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各日齢3個体全てに認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

第4節 考 察

今回の実験の結果からGADマウスの軸索変性は生後20日齢より生じていることが判明した。その変性は、生後 20日齢において既に多数の Spheroid（変性軸索）を認めたことより、生後10日齢から20日齢にかけて急に生じるものと思われた。本研究の結果より、GADマウスの変性初期の形態変化は次のように大きく3期に分類できる。第1期：軸索終末部は軽度に腫大し、シナプス結合を有し、その内部にはelectron dense bodyやミトコンドリアが集積する。第2期：腫大が進み、シナプス結合は維持できない。変性軸索内には、electron dense bodyやミトコンドリアに加え、フィラメント状構造物が集積を始める。第3期：さらに腫大が進み、これまでの構造物に加え、不定形の物質を含む空胞が存在しているのが多く観察され、また全体の電子密度が増す。以上のような変化を経て、これまで観察されている成熟したSpheroidの形成に至るものと考えられる。また本実験では以上のような軸索変性の過程が明らかになったことに加え、変性した軸索終末部の多くがシナプス複合体を形成する軸索終末部に多いことを明らかにした。この構造は小脳の苔状線維や外側膝状体、脊髄後角などでも知られている構造であり（20,32,83,84）、薄束核においては腰髄の脊髄神経節から直接至る一次知覚神経細胞の軸索がこの複合体を形成することが知られている（24）。シナプス複合体は1つの軸索終末部が複数の樹状突起とシ

ナプス結合を形成するもので、長い軸索を有する知覚神経細胞の軸索終末部に多くみられる構造である。シナプス複合体で変性が生じやすいことは、長い軸索において、軸索輸送に際して大きな負担がかかることと関係があると考えられる。

正常な動物においても、薄束核は加齢に伴い軸索変性が生じることが様々な動物で多数報告されている（14,22,23,36,52,78）。なぜこの部位に軸索変性が生じるのかは、明らかではない。しかし、その変性はシナプス複合体を形成する軸索終末部に多くみられることより、加齢にともない軸索輸送の機序に異常をきたし、変性に至るという説が広く受けいられている。特に腰髄の脊髄神経節に存在する一次知覚神経細胞は、延髄までの長い軸索を有しており、その軸索輸送に際しては相当な負担がかかるものと考えられる。また同時にこの細胞は、末梢側へも非常に長い樹状突起を出している。このように両末端に向け、長い神経突起を出すため軸索輸送の異常が顕著に現れるものと考えられる。加齢に伴う軸索変性についてはラットの薄束核において詳しく報告されている（23,24）。それによると、老齢ラットでもシナプス複合体を形成する軸索終末部における腫大、その内部におけるミトコンドリアや膜に包まれた電子密度の高い物質の出現など認めている。これらの変化は今回得られたGADマウスの変性過程の一連の変化と類似している。また薄束核における軸索の変性は、VitaminE欠乏によって引き起こされることが知られている（52）。しかしGADマウスにおいては、 α

-tocophenolの濃度を、血中、脳脊髄、肝臓について調べたが、有意差は得ていない(114)。

GADマウスにおけるSpheroidの周囲にはしばしば星状膠細胞の突起がその周囲を取り囲むように分布している。中枢神経で実験的薬物投与により生じた軸索変性において、軸索終末部では再生の機序が働くが、軸索終末部の周囲を取り囲むように伸びてくる星状膠細胞の突起に阻まれ再生が効果的に行なわれず、その結果Spheroidの形成に至るのではないかという報告がなされている(4)。GADマウスの軸索変性においても同様の現象が起きていることが推測される。しかし本ミュータントの軸索変性に伴って増生する星状膠細胞には、サブスタンスPの発現やAPP, A β Pの蓄積が生じていることを考慮すると、単なるグリア瘢痕ではなく、さらに重要な他の働きをしているものと考えられる。

GADマウスの軸索変性が生じる過程において、特徴的な所見としてelectron dense bodyならびに特殊なフィラメント構造物の出現が挙げられる。electron dense bodyは様々な形態を示し、それらの同定は難しいが、一層の膜に包まれている点や内部に空胞を有する点や、層状を呈する場合があるなどの構造を総合すると、ライソソームであると考えられる(51,72)。ライソソームと類似するelectron dense bodyの一部には、ミトコンドリア様の構造を示すものが存在する。これがライソソームがミトコンドリアを処理している所見なのか、もしくはミトコンドリア自身が変性

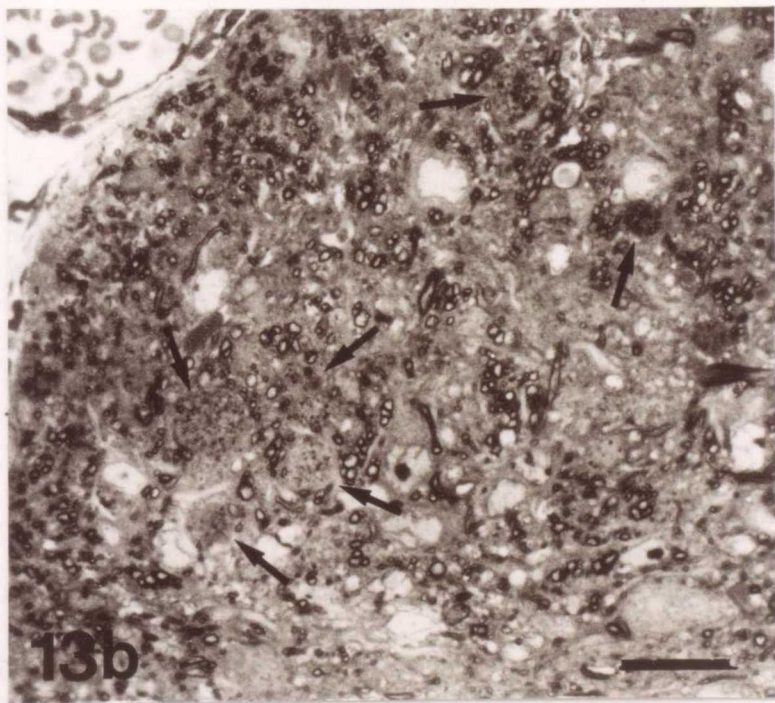
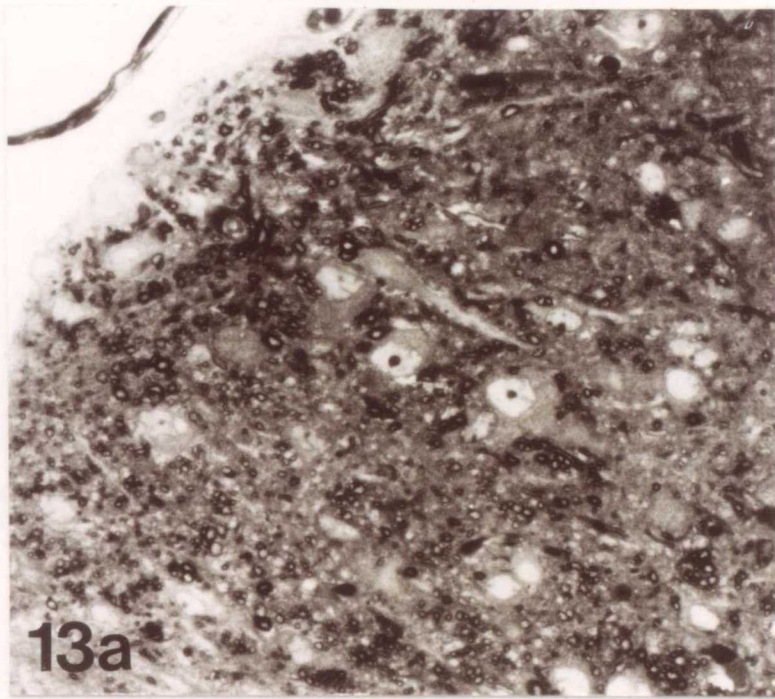
していく過程なのかは、明らかでない。今後、electron dense body に関しては、ライソソームに存在する酵素を対象とした免疫電顕等の手法を用い、厳密な同定が必要である。

今回得られた結果の中で、もう1つの特徴的な構造物としてGADマウスの変性軸索内でみられた特殊なフィラメント様構造物が挙げられる。この構造物は、正常マウスの軸索内で観察されるニューロフィラメントや微小管よりも太く、正常な構造物とは異なることがわかる。変性軸索内に観察されたフィラメント構造物が、微小管やニューロフィラメントの構造に異常が生じた物なのか、微小管やニューロフィラメントに他の蛋白質などが修飾したものなのか、また正常でみられる構造物とは全く無関係なものなのかは明らかでない。また電子密度の高い部位と低い部位とが交互に現れる所見より、複数の微小管やニューロフィラメントなどの正常な構造物がより合わさって構成されていることも考えられる。この構造物の詳しい微細構造学的検討は今後の課題である。またAlzheimer病においてフィラメント状構造物として観察されるPHFは、タウ蛋白質が異常にリン酸化されフィラメント状を示す構造物である。その形成過程において、凝集したA β Pがタウ蛋白質に異常なリン酸化を引き起こすとの報告もある(34)。GADマウスにおいて蓄積するA β Pは凝集していないものと考えられたが、この点についても今後検討を加える必要があるであろう。

第5節 小 括

GADマウスの薄束核における軸索変性初期の変化を微細構造学的に検討した。最も初期の変化は、軸索終末部の腫大と共に始まるライソソームならびにミトコンドリアの集積であった。腫大が進むと、ライソソームやミトコンドリアの集積と同時に、ニューロフィラメントや微小管とも異なる特殊なフィラメント構造物が出現していた。さらに腫大が進むと、これらの変性軸索内の構造物の出現頻度が増し、また電子密度も増加した。GADマウスではこれらの変化を経てSpheroidの形成に至る。また以上の変化は、老化現象でも変性が生じることが知られている、長い軸索の終末部であるシナプス複合体で顕著であった。

- Fig.13 a 生後30日齢正常マウス 厚切り標本観察横断像所見
b 生後30日齢GADマウス 厚切り標本観察横断像所見
黒い顆粒を有する変性軸索が観察できる（矢印）。
bar=100 μ m (Fig.a, Fig.b共通)
- c 顕微鏡観察における変性軸索の出現頻度（グラフ）



光顕観察における変性軸索の出現頻度

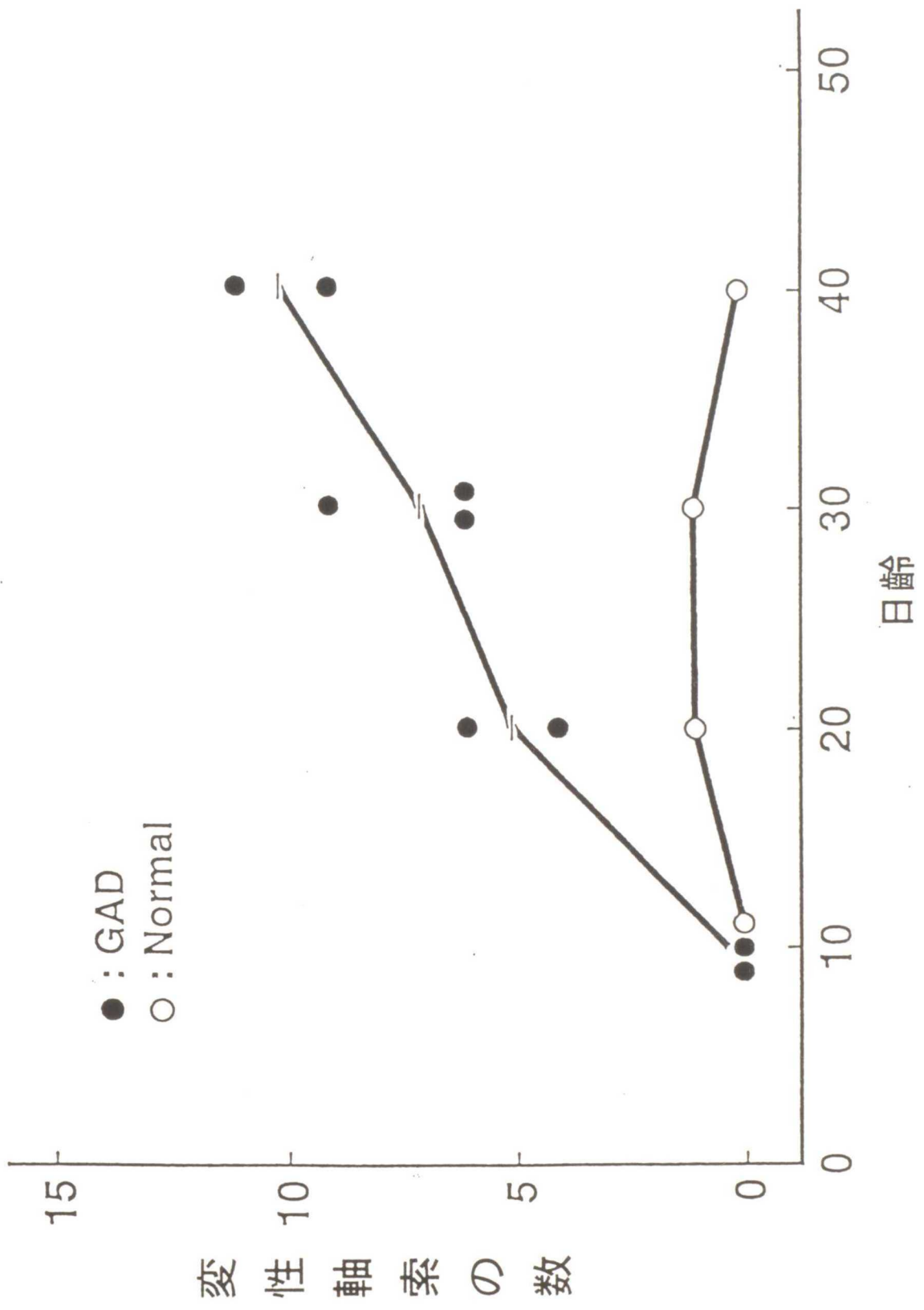


Fig.14 生後30日齢GADマウス 電顕観察横断像所見

2つの軸索終末部が観察できる（星印）。これらの軸索終末部は複数の樹状突起とシナプス結合（矢頭）をしており、シナプス複合体を形成している。またその内部にはelectron dense body（矢印）が存在している。

bar=1 μ m

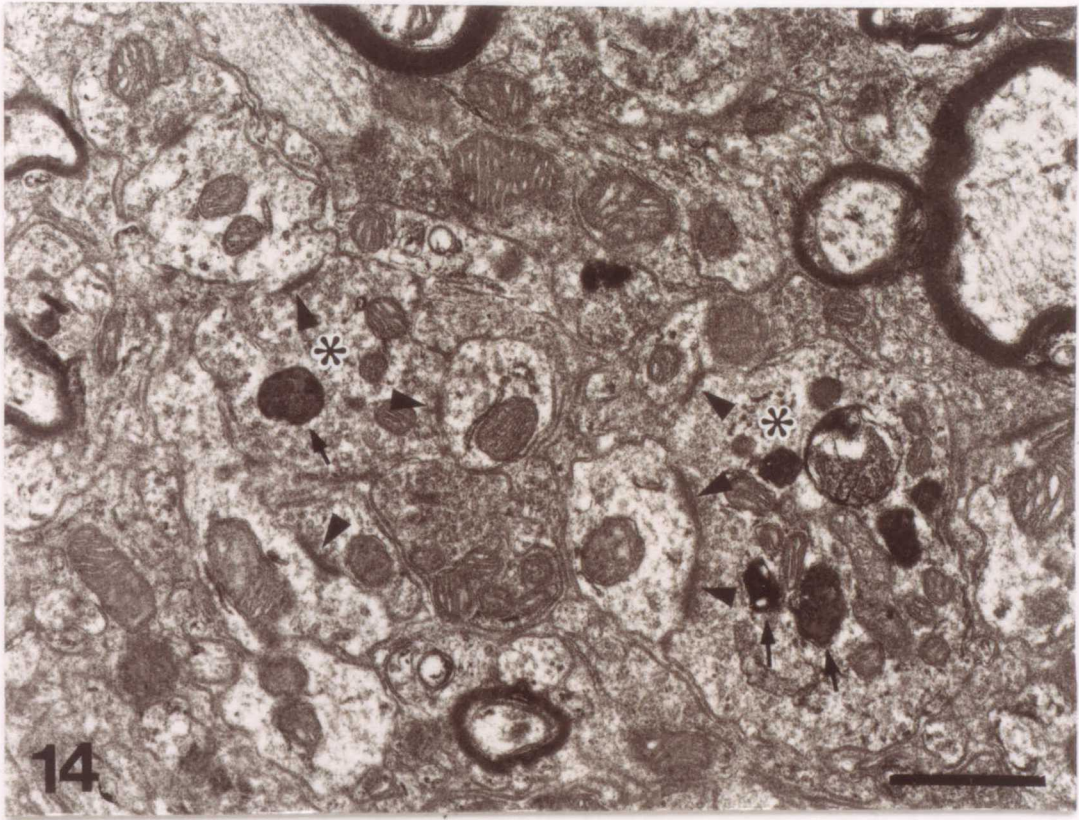


Fig.15 生後30日齢GADマウス 電顕観察横断像所見
内部にミトコンドリアやelectron dense bodyを有し、ミエリン（矢頭）に包まれた変性軸索。
bar=2 μ m

Fig.16 a 生後30日齢GADマウス 電顕観察横断像所見
たくさんのフィラメン状構造物を有する変性軸索。
bar=2 μ m

b Fig.16aの一部拡大
錯走するフィラメント状構造物（矢頭）が存在する。
bar=1 μ m

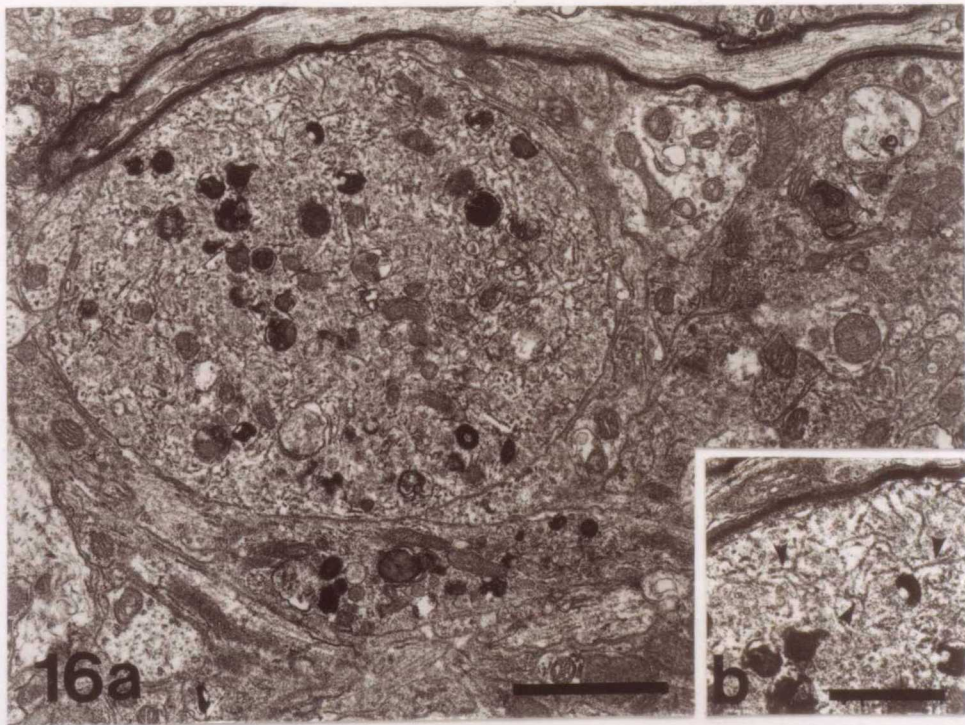
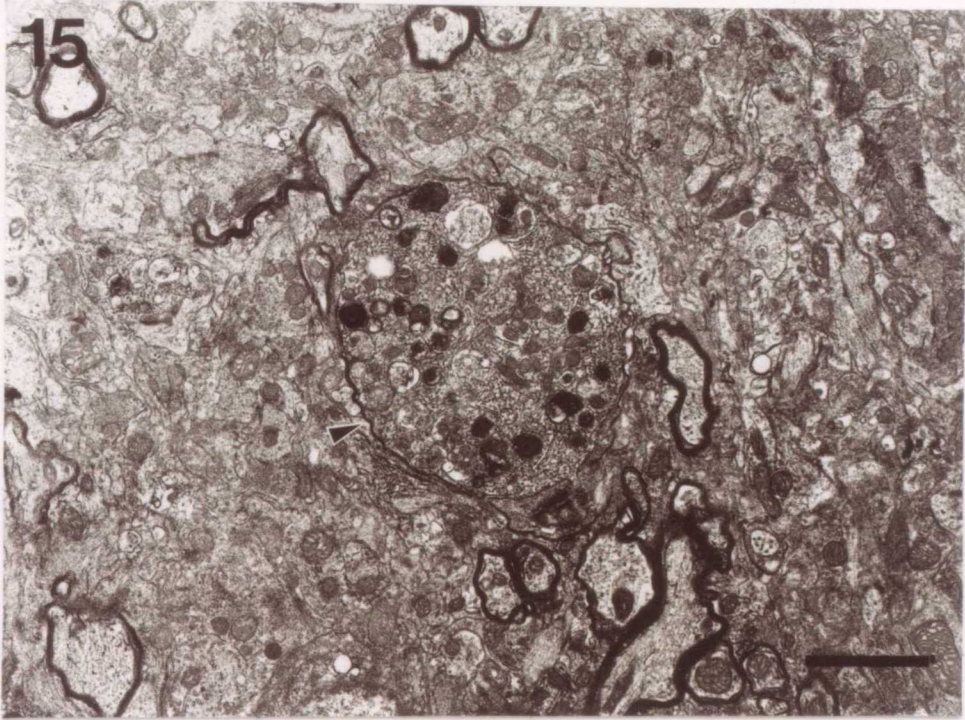


Fig.17 生後40日齢GADマウス 電顕観察横断像所見

electron dense bodyの出現頻度が増し、また変性軸索全体の電子密度が増加している。また内部に不定形の電子密度を有する構造物が存在している（矢印）。

bar=1 μ m

Fig.18 a 生後35日齢GADマウス 電顕観察縦断像所見

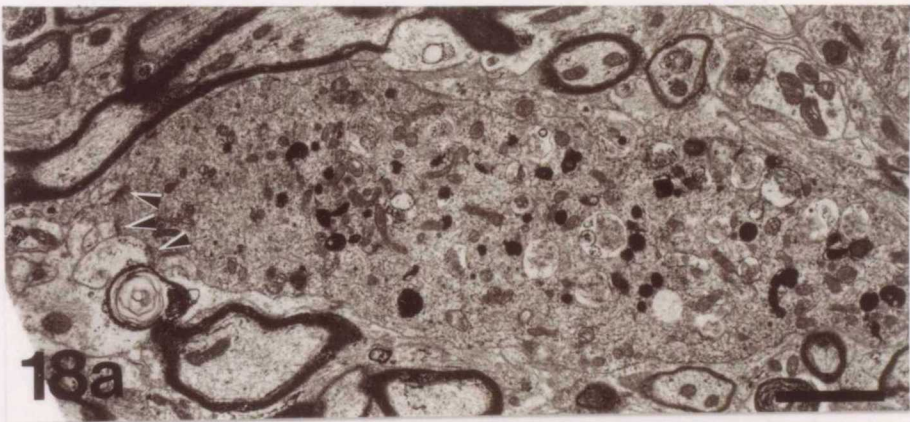
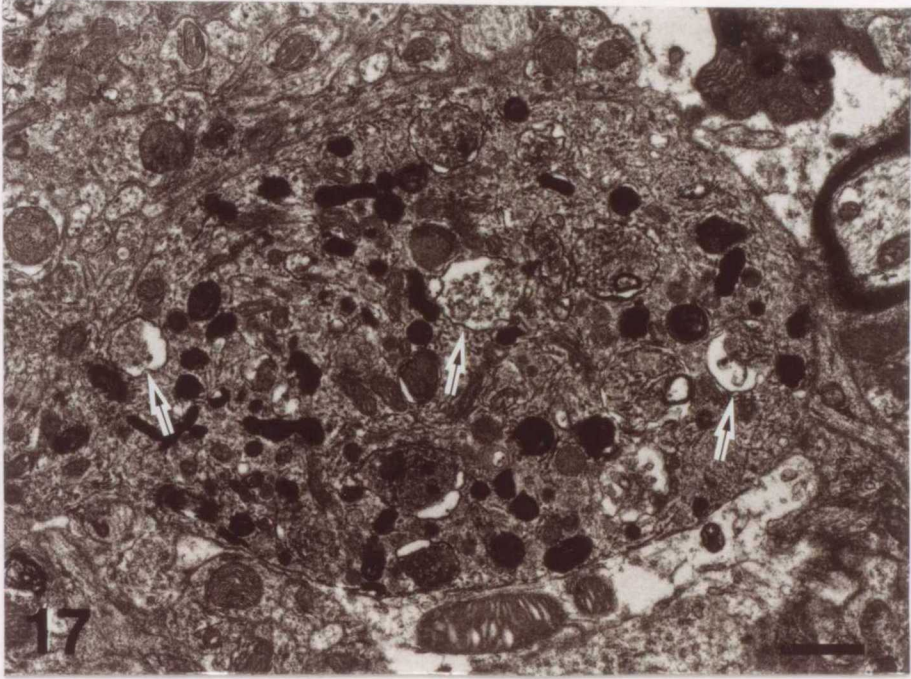
シナプス結合（矢頭）を維持しながら、顕著に腫大している変性軸索。

bar=2 μ m

b 生後35日齢GADマウス 電顕観察縦断像所見

変性軸索の周囲に星状膠細胞の突起（星印）が取り囲むように存在している。

bar=2 μ m



第 5 章

軸索変性とユビキチン との関連性

第1節 序 論

ユビキチンは、Alzheimer病における Paired Helical Filaments (PHF) の構成成分として同定された76個のアミノ酸からなる蛋白質で、そのアミノ酸配列は種を越えて高く保存されている (35,75)。ユビキチンは、細胞内のATP依存性非ライソソーム蛋白分解系において異常蛋白質と結合し、以後の反応に際してこれらの蛋白質の標識となる (10,37)。このことから免疫組織化学の分野において異常蛋白蓄積の指標として広く用いられている。神経系においては、PHFのみならず、パーキンソン病やピック病で見られる封入体、アレキサンダー病のローゼンタール線維、運動ニューロン病の脊髄前角の運動神経細胞内の線維性封入体におけるフィラメント状細胞内成分がユビキチンと結合していることが、免疫組織化学的に明らかにされている (57,58)。前章まで、GADマウスの軸索変性初期から、変性軸索内にライソソームや異常なフィラメント構造物が存在していることを明らかにした。また変性初期の変性軸索内のライソソームの出現頻度は、これまで報告されている成齢で見られる Spheroid のものよりも高い。これらのことより、加齢の進んだ変性軸索においては、ライソソーム系による分解系に代わる別の分解系が働いていることが考えられる。そこで本実験は、ユビキチンに注目し、GADマウスの軸索変性においてユビキチンがどのように関与しているかを免疫組織化学的手法により明らかにするものである。

第2節 材料と方法

本実験では、パラフィン切片を用いた顕微鏡観察用免疫組織化学染色と電顕観察用免疫組織化学染色（免疫電顕染色）を行った。

I. 顕微鏡観察用免疫組織化学染色に関する材料と方法

1. 供試動物

第1章 第2節 I. 1. と同様の動物を用いた。

2. 顕微鏡用材料の固定法，採材ならびに保存法

第1章 第2節 I. 2. と同様に行った。

3. パラフィン切片の作製法

第1章 第2節 I. 3. (2)と同様に行った。

4. パラフィン切片の免疫組織化学染色法

第1章 第2節 I. 4. (2)と同様に行った。

5. 本研究で使用した一次抗体

抗ウシ ユビキチン・ウサギポリクローナル抗体 (DAKO社
Cat. No. Z0458)

抗ウシ ユビキチン・ウサギポリクローナル抗体 (Biomeda社
Cat. No. 221M)

両抗体とも使用時には1%BSA/PBSで1000倍に希釈して使用した。

6. 陰性対照：切片を一次抗体の代わりに正常家兎血清と反応させた。

II. 電顕観察用免疫組織化学染色に関する材料と方法

1. 供試動物

供試動物には、国立精神・神経センターモデル動物開発部もしくはエーザイ株式会社筑波研究所実験動物施設において、SPF条件下で飼育された生後20週齢のGADマウス (gad/gad) ならびに対照正常マウス (gad/+ もしくは +/+) 各雌2個体を用いた。これらのマウスは、不断給餌ならびに不断給水、温度 $23 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、午前8時点灯午後8時消灯の明暗サイクルで飼育された。

2. 固定法, 採材ならびに保存法

第1章 第2節 I.2. と同様に行った。

3. 切片の作製法

固定後の組織よりPL1000型 Vibratome (盟和商事株式会社) を用い、厚さ40 μm の浮遊切片を作製し、得られた切片をPBS中に浮遊させた。切片は薄束核ならびに脊髄薄束の縦断面観察用と横断面観察用の2種類を作製した。

4. 染色法

第1章 第2節 I.4. (1)と同様に行った。一次抗体は抗ウシ ユビキチン・ウサギポリクローナル抗体 (DAKO社 Cat. No. Z0458) を、1%BSA/PBSで1000倍に希釈したものを使用した。

5. 包埋法

発色後の切片を、1%オスミウム酸/ dH_2O で1時間、後固定した後、エタノールで脱水、プロピレンオキサイドで置換し、トルエンで40%に希釈したシリコン (信越化学工業株式会社 KE-106, CAT-RG) をコートしたスライドガラスならびにカバーガラスを用い、Epon樹脂で封入した。封入後、切片を36°Cで一晩、続いて60°Cで二晩、硬化させた。

6. 超薄切片作製法ならびに染色法

硬化した切片を光顕観察後、スライドガラスならびにカバーガラスから剥離し、電顕観察部位を切り出し、超薄切片を作製した。得られた超薄切片は、無染色もしくは0.1%クエン酸鉛/dH₂Oによる単染色を施し、観察に供した。

7. 観察法

H-7000型 透過型電子顕微鏡（日立製作所）を用いて、加速電圧100kVの条件で観察した。

第3節 結果

1. 光顕観察所見

正常マウスでは、神経細胞ならびに神経膠細胞の細胞質や核が抗ユビキチン抗体に対し免疫反応陽性を示したが、主に軸索で構成される白質に反応産物は認められなかった。生後4週齢GADマウスの薄束核は、既に変性軸索が生じていたのかかわらずそれらの軸索は反応陰性であり、正常マウスと同様な染色結果を示した。生後9週齢以降のGADマウスでは、薄束核や脊髓薄束の軸索変性部位に多数のユビキチン陽性の点状構造物（Dot Like Structures; DS）が存在していた（Fig.19 b）。DSの大きさは、直径が2~5 μ mと様々であった。生後9週齢におけるDSは、延髄薄束核、小脳前葉の第1~3小葉と後葉の第8小葉の白質および下小脳脚、延髄の脊髓小脳路、脊髓の後脊髓小脳路、胸髄核（Clarke核）へ至る後脊髓小脳路に分布していた。生後18週齢になると、これらの部位のDSの出現頻度が増すと同時に、その出現部位を広げていた。薄束路でのDSの分布は、薄束路を薄束核から腰髄薄束まで下行しており、脊髓薄束におけるDSの出現頻度は頸髄、胸髄、腰髄の順序で増していた。さらにDSは、脊髓前角の運動神経細胞周囲から脊髓と延髄にかけての錐体路、中脳の大脳脚へ至る錐体路ならびに胸髄核にも分布していた（Fig. 20bおよびTable. 3）。生後32週齢ではその分布はさらに広範囲に広がり、外側嗅索、外側・内側膝状体、上丘、視床、

海馬采および大脳皮質の上位感覚神経路でもDSが観察された。変性軸索は必ずしもユビキチン陽性ではなく、殆どの大型の変性軸索 (Spheroid) は一般に免疫反応を認めないことが多かった。小型のSpheroidは、しばしば反応産物が芯 (core) を形成していた。DSは、正常マウスにおいてはわずかに生後18週齢以降の薄束核ならびに小脳核において認められた。GADマウスと正常マウスの間に、薄束核における二次知覚神経細胞や星状膠細胞の核や細胞質での反応性に差は認められなかった。

顕微鏡観察において、GADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各週齢3個体全てに認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

ii. 免疫電顕観察所見

免疫電顕観察により、顕微鏡で観察されるDSがミエリンに囲まれた軸索に存在することがわかった (Fig. 22a)。反応陽性を示した軸索は、周囲の正常な軸索と比べ径を増し、腫大をしていた。ユビキチン反応は、軸索内においてしばしばフィラメント状を呈していたが (Fig. 22b)、フィラメント状の反応産物の走行に一定の方向性はなかった。縦断切片では、その反応は比較的腫大の程度が軽い部位から徐々に腫大部へ移行する部位で強く (Fig. 22c)、この反応はさらに軸索終末部に近づくと弱くなった (Fig.

22d)。正常ならびにGADマウスの神経細胞や神経膠細胞の核にびまん性に弱い反応産物を認め、星状膠細胞の細胞質には斑点状の陽性反応を認めた。

電顕観察においてGADマウスもしくは正常マウスで得られた各々の結果は、実験に供した両マウスの各2個体全てに認められた。また対照正常マウスとして用いた、遺伝子型が gad/+ と +/+ の個体間で、得られた結果に差は認められなかった。

第4節 考 察

本実験により、GADマウスの軸索変性部位はユビキチン反応陽性となり、顕微鏡観察では点状構造物（DS）として、感覚系神経路のみならず運動系神経路にも広く分布することが明らかになった。GADマウスの薄束核では、DSは既に変性軸索が生じている生後4週齢では存在せず、生後9週齢から出現していた。このことは、軸索変性初期の薄束核における変性軸索は、ユビキチン化されないか、もしくは免疫組織化学では検出できないほど軽微な程度のユビキチン化をしていることを示唆している。前章において、生後20日齢のGADマウスの薄束核における変性軸索終末部に、既に多数のライソソームが出現していることを観察した。以上のことから、GADマウスにおける軸索変性の初期では、異常蛋白の蓄積が予想されるが、それらに対しては、ライソソームによる蛋白分解系が主体となって働いていると思われる。

ユビキチンは、しばしばフィラメント状細胞内成分と結合していることが、免疫組織化学的に明らかにされている。GADマウスの軸索変性においてニューロフィラメントや他のフィラメント構造物の集積は、腫大が進むに連れ顕著になった。これらのフィラメント成分の蓄積とライソソームの出現の関係より、ユビキチン化が何故生後9週齢以降から、GADマウスの変性軸索に生ずるかを考察すると次のようになる。生後4週齢のGADマウス薄束核には多数の大小の変性軸索（Spheroid）を認め、初期の形態変化ではこれ

らの腫大部に多数のフィラメント構造物とライソソームを含んでいた。変性初期の段階では腫大部に異常なフィラメント成分が蓄積し、直ちにユビキチン化されても多数のライソソームに取り込まれすみやかに分解されるため、ユビキチン化したフィラメントの蓄積として観察されなかったのであろう。生後9週齢以降の変性進行に伴いライソソームの分解能力を上回るフィラメント成分の蓄積、もしくは変性進行によりライソソーム分解系が不活化し、フィラメント成分の集積が促進し、ユビキチン化した異常蛋白として蓄積してくるものと考えられる。このようにライソソームによる蛋白分解系の異常により、ユビキチン化された異常なニューロフィラメントの蓄積が促進されるという報告がある(64,80)。GADマウスではユビキチン化されているフィラメント成分が何であるかは、明らかでないが、異常蛋白のユビキチン化の機序を探るうえで非常に興味深い結果である。

ユビキチン反応は変性軸索内の比較的腫大が軽度な部位で認められ、腫大した終末部であるSpheroidはその殆どがユビキチン反応陰性であった。ユビキチン反応が腫大が軽度な部位に生じていたことは、腫大が顕著なSpheroidと比較して、この部位におけるユビキチンの活性が強いのか、もしくはユビキチン化を受けやすいフィラメント成分や他の異常蛋白質が蓄積していたと考えられる。

今回の実験でGADマウスの中樞神経系においてユビキチン陽性のDSが、かなり広範囲に分布していた。薄束路、後脊髄小脳路および錐体路における

分布は、これまで明らかにされているGADマウスの軸索変性部位と一致している。さらにDSは、これらの軸索変性部位において病勢の進展に伴い進行性に蓄積することより、DSの出現頻度が軸索変性の程度を表していることがわかる。薄束路におけるDSの分布は、一次知覚神経細胞の終末部が存在する薄束核から細胞本体へ向かい脊髄薄束を広がった。また後脊髄小脳路では、胸髄核にある二次知覚神経細胞の軸索が脊髄、延髄を通り小脳へ至るが、DSの分布は小脳から始まり延髄、脊髄へと、この神経路を逆行性に広がった。運動系神経路である錐体路では、大脳皮質の一次運動神経細胞から伸びる軸索が、中脳、延髄、脊髄後索を通り、脊髄前角の運動神経細胞まで達する。この神経路におけるDSの分布は、末梢端である脊髄前角の運動神経細胞周囲より始まり、以後細胞本体に向かい錐体路を逆行性に及んでいった。週齢を重ねると、これらの神経路でのDSの出現頻度が増すと同時に、その分布は感覚系の視床、大脳皮質感覚野、嗅覚・視覚・聴覚の各神経路などにも広がった。以上のことより、GADマウスの中樞神経系では、このミュータントの特徴であるDying Backタイプの軸索変性が運動系神経路である錐体路でも生じているのと同時に、一次知覚神経細胞の変性が、二次さらには三次感覚神経細胞にまで広がっていくことがわかる。すなわちGADマウスでは、感覚神経系と運動神経系において軸索遠位端より起こる継シナプス的に広がる退行性軸索変性 (transneuronal degeneration) の過程が進行している。自然発症により、短期間にこのように広範囲かつ選択的に変

性が広がっていく実験系についてはこれまで報告はなく、継シナプス的に変性が広がる機序を探るうえで非常に興味深いものである。またヒトの正常な老化に際しても大脳皮質や海馬において同様のユビキチン陽性の点状構造物が存在し、それが軸索であることが確認されている(15)。このことはヒトの加齢現象として、薄束核だけでなく広い範囲で軸索変性が生じている可能性を示しており、GADマウスの病理変化が神経系における老化現象の一面を反映していることを裏付けるものである。

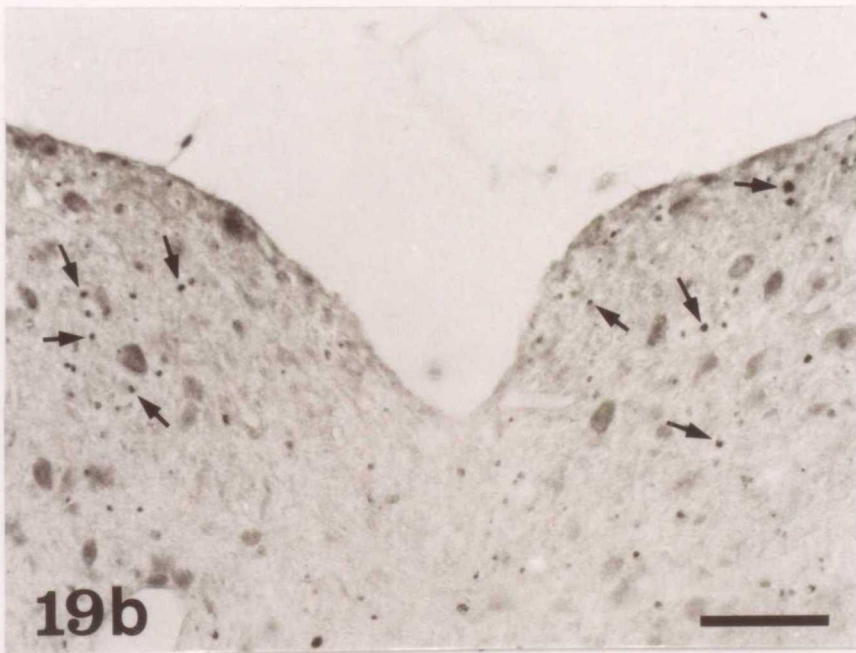
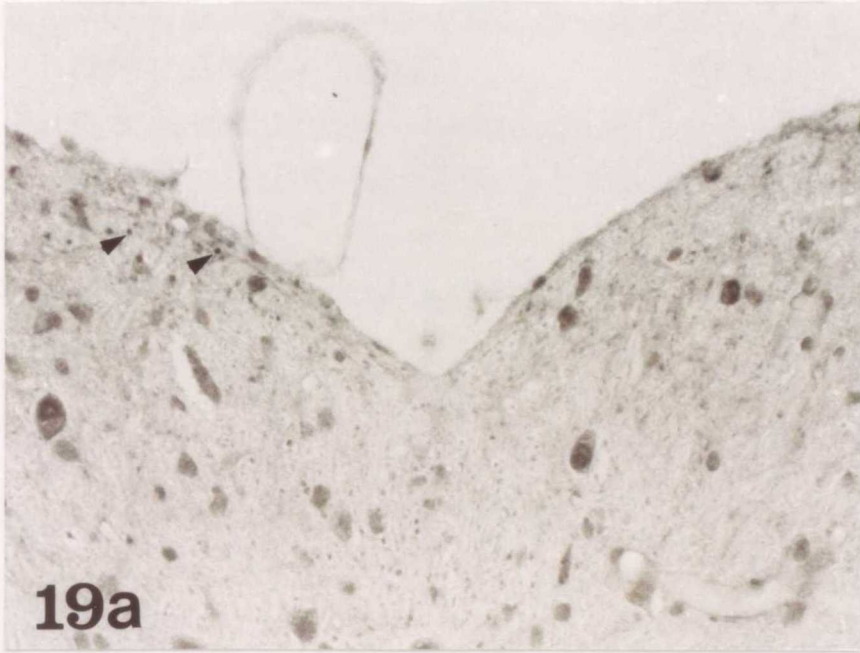
第5節 小 括

GADマウスの軸索変性部位において、生後9週齢よりユビキチン陽性点状構造物（DS）を認め、それが軸索であることが判明した。しかし変性軸索終末部のSpheroidは反応陰性であった。DSの分布は、軸索変性が薄束路，後脊髄小脳路において逆行性に進展するのと同様に、これらの神経路を広がっていた。また運動系神経路である錐体路でもDSが出現し、その分布は逆行性に広がっていた。これらのDSの出現頻度は週齢を重ねるごとに増していたと同時に、生後32週齢になるとDSは視床，上丘，大脳皮質感覚野および聴覚，視覚，嗅覚神経路など知覚系神経路や海馬采など幅広く分布していた。これらよりGADマウスの運動神経系ならびに感覚神経系では、継シナプ斯的に退行性軸索変性が広がっていることが明らかとなった。

Fig.19 a 生後18週齢正常マウス 薄束核の抗ユビキチン抗体染色所見
神経細胞や神経膠細胞の細胞質や核が陽性反応を示す。
この週齢では軟膜下にわずかにユビキチン陽性点状構造物
(矢頭)を認める。

b 生後18週齢GADマウス 薄束核の抗ユビキチン抗体染色所見
左右の薄束核にユビキチン陽性点状構造物 (DS) (矢印)が
多数存在する。

bar=25 μ m (Fig.a, Fig.b共通)



- Fig.20 a 生後32週齢正常マウス 錐体路の抗ユビキチン抗体染色所見
神経細胞や神経膠細胞の細胞質や核が陽性反応を示すがユビ
キチン陽性点状構造物はない。
- b 生後32週齢GADマウス 錐体路の抗ユビキチン抗体染色所見
錐体路白質にユビキチン陽性点状構造物 (DS) (矢印) が
多数存在する。
- bar=25 μ m (Fig.a, Fig.b共通)

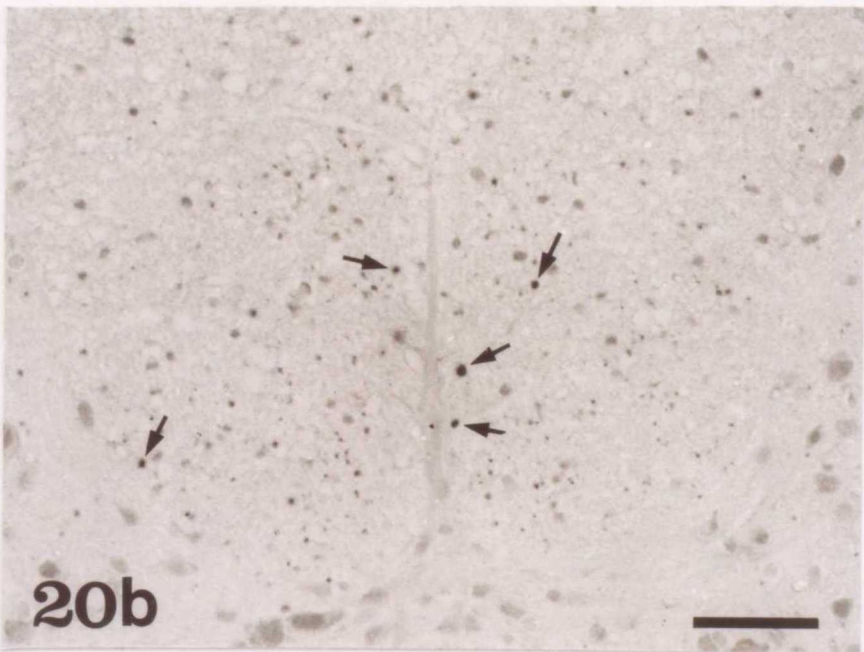
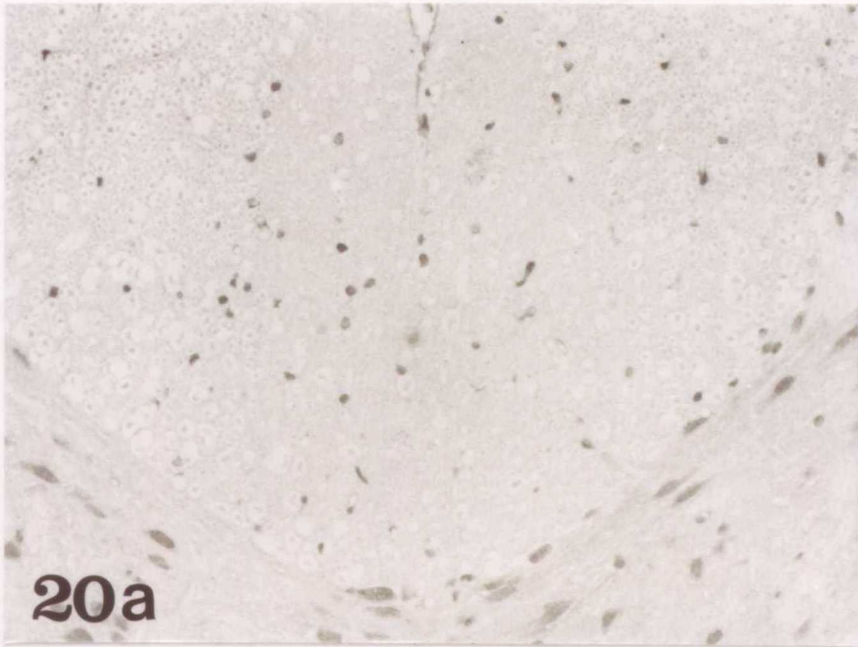
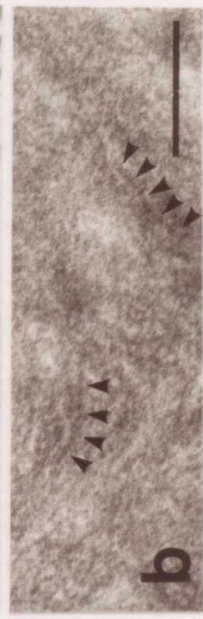
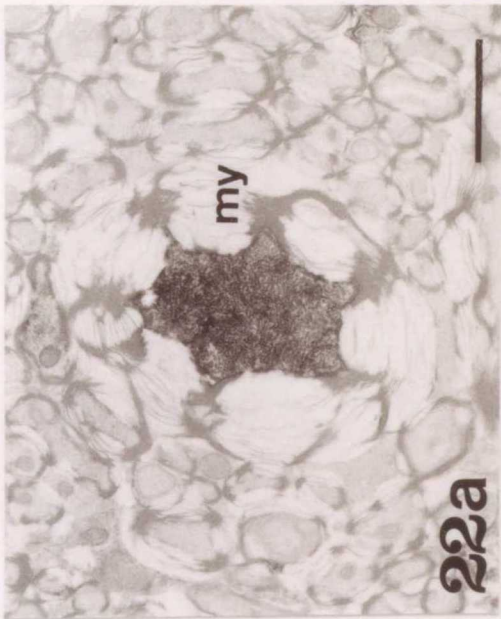
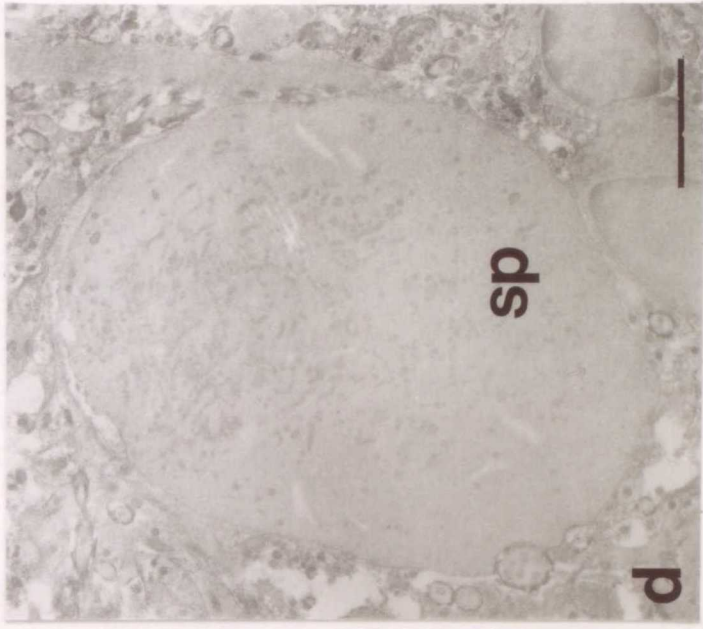


Table. 3 ユビキチン陽性点状構造物(DS)の分布とその経時的変化

部位 週 齢	薄 束 路		後 脊 髓 小 腦 路		錐 体 路				
	延髓	脊髓	小腦	延髓	脊髓	脊髓前角	脊髓後索	延髓	中腦
4	-*	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	+	+	-	±	-	-	-
18	++	+	++	++	+	+	±	±	-
32	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++	+

* : 単位面積(10 μm²)当りのDS数 - : 0, ± : 1-3, + : 4-10, ++ : 11-30, +++ : >30 を表す

- Fig. 22 a 生後20週齢GADマウス 頸髄薄束の抗ユビキチン抗体免疫電顕所見
髄鞘 (my) に囲まれた反応陽性を示す変性軸索。周囲の軸索と比べて腫大している。
bar=5 μ m
- b 生後20週齢GADマウス 頸髄薄束の抗ユビキチン抗体免疫電顕所見
ユビキチン化したフィラメントが走行する (矢頭)。
bar=0.5 μ m
- c 生後20週齢GADマウス 頸髄薄束の抗ユビキチン抗体免疫電顕所見
軸索が腫大するに伴い、反応陽性を示す。右側が尾側に相当。
bar=5 μ m
- d 生後20週齢GADマウス 薄束核の抗ユビキチン抗体免疫電顕所見
Spheroid (sp) は、陽性反応を示さない。
bar=1 μ m



第 6 章

総 括

本研究の結果より、GADマウスの薄束路における軸索変性は以下のような変化を伴っていることが明らかになった。軸索変性は、生後10日齢から20日齢にかけて一次知覚神経細胞の軸索終末部が存在する薄束核より生じる。シナプス複合体を形成する軸索終末部が腫大を始め、多数のライソソームの出現とミトコンドリアの集積がみられる。軸索終末部では、異常蛋白の蓄積が予想されるが、それらは主にライソソームによる分解を受ける。さらに軸索終末部の腫大が進むと二次知覚神経細胞とのシナプス結合が崩壊し、ニューロフィラメントや特殊なフィラメント構造物が蓄積を始める。シナプス結合の崩壊に伴い、一次知覚神経細胞でのAPP産生が亢進し、脊髄神経節内の細胞体でのAPPの蓄積が始まり、また軸索終末部においてシナプスを介して二次知覚神経細胞に作用するAPPが、その機能を果たせず徐々に軸索終末部に蓄積を始める。またシナプス結合の崩壊により生じた空間に、星状膠細胞の細胞突起が進入し、軸索の終末部や二次知覚神経細胞を取り囲む。星状膠細胞においてもAPPが蓄積するが、そのAPPが星状膠細胞自身が産生したものなのか、または、取り込んだものなのかは明らかでない。軸索終末部ならびに星状膠細胞では、APPから正常な代謝によりA β Pが産生されるが、蓄積が軽度なためA β Pの蓄積には至らない。生後4週齢から9週齢にかけて、軸索終末部はさらに腫大を増し、薄束路を薄束核から脊髄薄束へ向かい下行し始める。変性軸索内ではニューロフィラメントや特殊なフィラメント構造物の集積が顕著になることによりユビキチンが活性化する。活

性化したユビキチンは、主に異常なニューロフィラメントや特殊なフィラメント構造物に結合し、蓄積を始める。また軸索終末部や星状膠細胞ではAPPの蓄積が進み、その結果ライソソームでのAPPの代謝に異常をきたし、A β Pが蓄積し始まる。生後9週齢から18週齢にかけて、APP, A β P, ユビキチン等のいわゆるアミロイド関連蛋白の蓄積が顕著になると同時に、その蓄積を伴いながら軸索終末部はさらに脊髓薄束を下行する。また一次知覚神経細胞でのAPPの蓄積はさらに進行する。生後18週齢から32週齢にかけての薄束核は、アミロイド関連蛋白を蓄積した変性軸索の殆どが脊髓薄束へ下行したため変性軸索は存在せず、変性軸索が退行消失した後を星状膠細胞の細胞突起が占めている。その結果、薄束核のAPPならびにA β Pは全体的に減少する。以上のような変化、特にAPPならびにA β Pの蓄積は、シナプスの変化が神経細胞やグリア系の細胞におけるAPPの発現を増加させるという報告や(53)、APP遺伝子発現の調節において neuron-target interaction の重要性を説く報告(87)がなされているのに加え、本実験において生後早期よりシナプスの崩壊に続く、退行性の軸索変性が生じる薄束路でのみに認められたことより、軸索変性に起因する変化であると考えられる。

本研究では、GADマウスを用いて軸索変性の初期病変とアミロイド関連蛋白蓄積の関連性を明らかにした。現在ヒトのAlzheimer病に代表される神経変性症では、A β Pの沈着と共に変性軸索や星状膠細胞の増生が生じ

ていることが知られているが、その因果関係は明らかでない。またAPPからどのような代謝を経て、A β P産生に至るのかも不明である。これらが明らかにされない理由として、ヒトにおいては初期病変をとらえることが、困難であることがあげられる。GADマウスでは、軸索変性が生じた結果、アミロイド関連蛋白が蓄積することが示された。同様の現象が、ヒトにおけるA β P沈着の初期病変として生じていることが考察される。今後は、GADマウスを用い、APPやA β Pの蓄積と変性軸索周囲に増生する星状膠細胞との関連性や、APPからA β Pが産生される機序等の不明な点について、解明していきたい。

参 考 文 献

1. Amaratunga, A. and Fine, R. E. 1995. Generation of amyloidogenic C-terminal fragments during rapid axonal transport in vivo of β -amyloid precursor protein in the optic nerve. *J. Biol. Chem.* 270 : 17268-17272.
2. Arai, H., Lee, V. M.-Y., Messinger, M. L., Greenberg, B. D., Lowery, D. E., and Trojanowski, J. Q. 1991. Expression pattern of β -amyloid precursor protein (β -APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Ann. Neurol.* 30 : 686-693.
3. Barcikowska, M., Wisniewski, H. M., Bancher, C., and Grundke-Iqbal, I. 1989. About the presence of paired helical filaments in dystrophic neurites participating in the plaque formation. *Acta Neuropathol.* 78 : 225-231.
4. Blakemore, W. F. and Cavanagh, J. B. 1969. "Neuroaxonal dystrophy" occurring in an experimental "Dying Back" process in the rat. *Brain* 92 : 789-804.
5. Brannon, W., McCormick, W., and Lampert, P. 1967. Axonal dystrophy in the gracile nucleus of man. *Acta Neuropathol.* 9 : 1-6.
6. Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P., and Yankner, B. A. 1993. Generation of β -Amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 : 2092-2096.
7. Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., and Yankner, B. A. 1995. β -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14 : 879-888.

8. Card, J. P., Meade, R. P., and Davis, L. G. 1992. Immunocytochemical localization of the precursor for β -amyloid in the rat central nervous system. *Neuron* 1 : 835-846.
9. Cavanagh, J. B. 1964. The significance of the "dying back" process in experimental and human neurological disease. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 3 : 219-267.
10. Ciechanover, A. and Schwartz, A. L. 1994. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *Faseb J.* 8 : 182-191.
11. Cochran, E., Bacci, B., Chen, Y., Patton, A., Gambetti, P., and Autilio-Gambetti, L. 1991. Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 139 : 485-489.
12. Cole, G. M., Huynh, T.V., and Saitoh, T. 1989. Evidence for lysosomal processing of amyloid β -protein precursor in cultured cells. *Neurochem. Res.* 14 : 933-939.
13. Cowen, P. and Olmsted, E. V. 1963. Infantile neuroaxonal dystrophy. *J. Neuropatol. Exp. Neurol.* 22 : 175-236.
14. Dayan, A. D. 1971. Comparative neuropathology of aging. Study on the brains of 47 species of vertebrates. *Brain* 94 : 31-42.
15. Dickson, D. W., Wertkin, A., Kress, Y., Ksiezak-Reding, H., and Yen, S.-H. 1990. Ubiquitin immunoreactive structure in normal human brains. Distribution and development aspects. *Lab. Invest.* 63 : 87-99.
16. Duce, I. R. and Keen, P. 1977. An ultrastructural classification of the neuronal cell bodies of rat dorsal root ganglion using zinc iodine-osmium impregnation. *Cell. Tiss. Res.* 185 : 263-277.

17. Duchen, L. W., Strich, S. J., and Falconer, D. S. 1964. Clinical and pathological studies of an hereditary neuropathy in mice (*Dystonia musculorum*). *Brain* 87 : 367-378.
18. Dyrks, T., Dyrks, E., Masters, C. L., and Beyreuther, K. 1988. Amyloidogenicity of rodent and human β A4 sequences. *FEBS Lett.* 324 : 231-236.
19. Edward, H. K., Sangram, S. S., David, R. A., Lee, J. M., Andreas, W., Konrad, B., Peter, F., Colin, L. M., and Donard, L. P. 1990. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 : 1561-1565.
20. Famiglietti, E. V. Jr. and Peters, A. 1972. The synaptic glomerulus and the intrinsic neuron in the lateral geniculate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 144 : 285-334.
21. Ferreira, A., Caceres, A., and Kosiki, K. S. 1993. Intraneuronal compartment of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 13 : 3112-3123.
22. Fujisawa, K. 1967. An unique type of axonal alteration (so-called axonal dystrophy) as seen in Goll's nucleus of 277 cases of controls. A contribution to the pathology of aging process. *Acta Neuropathol.* 8 : 255-275.
23. Fujisawa, K. and Shiraki, H. 1978. Study of axonal dystrophy I. Pathology of the neuropil of the gracile and the cuneate nuclei in aging and old rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4 : 1-20.
24. Fujisawa, K. and Shiraki, H. 1978. Study of axonal dystrophy II. Dystrophy and Atrophy of the presynaptic boutons. A dual pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 6 : 387-393.
25. Fukunari, A., Kato, A., Sakai, Y., Yoshimoto, T., Ishiura, S., Suzuki, K., and Nakajima, T. 1994. Colocalization of propyl endopeptidase and amyloid β -peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci. Lett.* 176 : 201-204.

26. Giaccone, G., Verga, L., Finazzi, M., Pollo, B., Tagliavin, F., Frangione, B., and Bugiani, O. 1990. Cerebral preamyloid deposits and congophilic angiopathy in aged dogs. *Neurosci. Lett.* 114 : 178-183.
27. Glenner, G. G. and Wong, C. W. 1984. Alzheimer's disease : Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 : 885-890.
28. Golabek, A., Marques, M. A., Lalowski, M., and Wisniewski, T. 1995. Amyloid beta binding proteins in vitro and in normal human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 191 : 79-82.
29. Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., and Younkin, S.G. 1992. Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255 : 728-730.
30. Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. 1993. β -amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 268 : 3021-3024.
31. Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teolow, D. B., and Selkoe, D. J. 1992. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359 : 322-325.
32. Harding, B. N. 1973. An ultrastructural study of the centre median and ventrolateral thalamic nuclei of the monkey. *Brain Res.* 54 : 335-340.
33. Harrigan, M. R., Kukel, D.D., Yeh, J., and Yankner, B. J. 1995. β -Amyloid is neurotoxic in hippocampal slice cultures. *Neurobiol. Aging* 16 : 779-789.

34. Harrigan, M. R., Kukel, D. D., Nguyen, L. B., and Malouf, A. T. 1995. β - amyloid fibrils induced tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14 : 879-888.
35. Hasegawa, M., Morishima, K., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., and Ihara, Y. 1992. Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 267 : 17047-17054.
36. Hashimoto, P. H. and Palay, S. L . 1965. Peculiar axons with enlarged endings in the nucleus gracilis. *Anat. Rec.* 151 : 454-455.
37. Hershko, A., Eytan, E., and Ciechanover, A. 1982. Immunochemical Analysis of the turn over of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. *J. Biol. Chem.* 257 : 13964-13970.
38. Jacobs, J., Carmichael, N., and Cavanagh, J. B. 1975. Ultrastructural changes in the dorsal root and trigeminal ganglia of rats poisoned with methyl mercury. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 1 : 1-19.
39. Johnstone, E. M., Chaney, M. O., Norris, F. H., Pascual, R., and Little, S. P. 1991. Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Mol. Brain Res.* 10 : 299-305.
40. Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 : 733-736.
41. Kawarabayashi, T., Shoji, M., Harigaya, Y., Yamaguchi, H., and Hirai, S. 1991. Amyloid β /A4 protein precursor is widely distributed in both the central and peripheral nervous systems of the mouse. *Brain Res.* 552 : 1-7.

42. Kawarabayashi, T., Shoji, M., Yamaguchi, H., Tanaka, M., Harigaya, Y., Ishiguro, K., and Hirai, S. 1993. Amyloid β protein precursor accumulates in swollen neurites throughout rat brain with aging. *Neurosci. Lett.* 153 : 73-76.
43. Kikuchi, T., Mukoyama, M., Yamazaki, K., and Moriya, H. 1990. Axonal degeneration of ascending sensory neurons in gracile axonal dystrophy mutant mouse. *Acta Neuropathol.* 80 : 145-151.
44. Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. 1988. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331 : 530-532.
45. Kitamoto, T., Ogomori, K., Tateishi, J., and Prusiner, S. B. 1987. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab. Invest.* 57 : 230-236.
46. Koike, F., Kunishita, T., Nakayama, H., and Tabira, M. 1988. Immunohistochemical study of Alzheimer's disease using antibodies to synthetic amyloid and fibronectin. *J. Neurosci.* 85 : 9-15.
47. Kondo, J., Honda, T., Mori, H., Hamada, Y., Miura, R., Ogawara, M., and Ihara, Y. 1988. The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1 : 827-834.
48. 小柳新策 1990. 老人斑の超微形態. 神経進歩 34 : 350-363.
49. Kowall, N. W., Beal, M. F., Busciglio, J., Duffy, L. K., and Yankner, B. A. 1991. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 : 7247-7251.
50. Kurochkin, I. V. and Goto, S. 1994. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 345 : 33-37.

51. Lake, B. D. : Lysosomal and peroxisomal disorders In *Greenfield's Neuropathology*, eds by Adams JH, Duchen LW, ed 5. Oxford Blackwell, 1992
52. Lampert, P. W. and Pentschew, A. 1964. An electron microscopic study of dystrophic axon in the gracile and cuneate nuclei of vitamin E-deficient rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 23 : 60-77.
53. Lampert, P. W. 1967.. A comparative electron microscopic study of reactive, degenerative, regenerative, and dystrophic axons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26 : 345-368.
54. Lee, J. M., Carlos, A. P., Linda, C. C., and Donald, L. P. 1994. Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaque and amyloid deposits in the aging cerebral cortex. *Am. J. Pathol.* 145 : 1358-1381.
55. Lee, J. M., Sangram, S. S., Edward, H. K., Linda, C. C., Tammy , L. D., Andreas, W., Konrad, B., Colin, M., and Donard, L.P. 1991. Amyloid precursor protein in aged nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 : 1461-1465.
56. Lee, V. M.-Y., Balin, B. J., Otvos, L., and Trojanowski, J. Q. 1991. A68. A major subunit of paired helical filaments and derivatized form of normal tau. *Science* 251 : 675-678.
57. Lowe, J., Blanchard, A., Morrell, K., Lennox, G., Reynords, L., Billett, M., Landon, M., and Mayer, R. J. 1988. Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion body of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick 's disease, and Alzheimer's disease, as wee ll as rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and Mallory bodies in alcoholic liver disease. *J. Pathol.* 155 : 9-15.

58. Lowe, J., Lennox, G., Jefferson, D., Morrell, K., McQuire, D., Gray, T., Landon, M., Doherty, F. J., and Mayer, R. J. 1988. A filamentous inclusion body within anterior horn neurons in moter neurone disease defined by immunocytochemical localization of ubiquitin. *Neurosci. Lett.* 94 : 203-210.
59. Ma, J., Yee, A., Brewer, H. B., Das, S., and Potter, H. 1994. Amyloid-associated protein alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372 : 92-94.
60. Mark, P. M., Bin, C., Alan, R. C., Fred, S. E., Ivan, L., and Russell, E. R. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating role for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron* 10 : 243-254.
61. Martin, L. J., Sisodia, S. S., Koo, E. H., Cork, L. C., Dellovade, T. L., Weidemann, A., Beyreuther, K., Masters, C., and Price, D. L. 1991. Amyloid precursor protein in aged nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 : 1461-1465.
62. Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N., and Beyreuther, K. 1985. Neuronal origin of a cerebral amyroid: neurofibriallary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 4 : 2757-2763.
63. McGeer, P. L., Akiyama, H., Kawamata, T., Yamada, T., Walker, D. S., and Ishii, T. 1992. Immunohistochemical localization of beta-amyloid precursor protein sequences in Alzheimer and normal brain tissue by light and electron microscopy. *J. Neurosci. Res.* 31 : 428-42.
64. Migheli, A., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., Mocellini, C., Vigliani, M., and Schiffer, D. 1990. Ubiquitinated filamentous inclusion in spinal cord of patiants with motor neuron disease. *Neurosci. Lett.* 114 : 5-10.

65. Miura, H., Oda, K., Endo, C., Yamazaki, K., Shibasaki, H., and Kikuchi, T. 1993. Progressive degeneration of moter nerve terminals in GAD mutant mouse with hereditary sensory axonopathy. *Appl. Neurobiol.* 19 : 41-51.
66. Morishima-Kawashima, M., Hasegawa. M., and Takio, K. 1993. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10 : 1151-1160.
67. Mukoyama, M., Yamazaki, K., Kikuchi, T., and Tomita, T. 1989. Neuropathology of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse - an animal model of central distal axonopathy in primary sensory neuron. *Acta Neuropathol.* 79 : 294-299.
68. Nakamura, Y., Takeda, M., Niigawa, H., Hariguchi, S., and Nishimura, T. 1992 Amyloid β -protein precursor deposition in rat hippocampus lesioned by ibotenic acid injection. *Neurosci. Lett.* 136 : 95-98.
69. Naves, F. J., Calzada, B., Cabal, A., Alonso-Cortina, V., Del Valle, M. E., Fernandez-Sanchez. M. T., and Vega, J.A. 1994. Expression of β -amyloid protein (APP) in human dorsal root ganglia. *Neurosci. Lett.* 181 : 73-77.
70. 小田健一郎, 山崎一斗, 三浦裕之, 遠藤知代子, 柴崎浩, 菊池建機 1991. Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウス - "Dying Back" 軸索変性モデル - 神経研究の進歩 35 : 95-105.
71. Oda, k., Yamazaki, K., Miura, H., Shibasaki, H., and Kikuchi, T. 1992. Dying back type axonal degeneration of sensory nerve terminals in muscle spindles of the gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 139 : 265-281.
72. 小川和朗, 鈴木昭男, 清寺真 他編 1984 人体組織学, 神経 朝倉書店
73. Ohgami, T., Kitamoto, T., and Tateishi, J. 1992. Alzheimer's amyloid precursor protein accumulates within axonal swellings in human brain lesions. *Neurosci. Lett.* 136 : 75-78.

74. Ohgami, T., Kitamoto, T., Weidmann, A., Beyreuther, K., and Tateishi, J. 1991. Alzheimer's amyloid precursor protein-positive degenerative neurites exist even within kuru plaques not specific to Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 139 : 1245-1250.
75. 岡部哲郎 1988. ユビキチンの構造と機能 細胞工学 Vol.17 : 52-57.
76. Oppenheimer, D. R. and Esiri, M. M. : Friedreich's Ataxia. In *Greenfield's Neuropathology*, eds by Adams JH, Duchen LW, ed 5. Oxford Blackwell, 1992
77. Otsuka, N., Tomonaga, M., and Ikeda, K. 1991. Rapid appearance of β -amyloid precursor protein immunoreactivity in damaged axons and reactive glial cells in rat brain following needle stab injury. *Brain Res.* 568 : 335-338.
78. Pentschew, A. and Schwarz, K. 1962. Systemic axonal dystrophy in vitamin E deficient adult rats. *Acta Neuropathol.* 1 : 313-334.
79. Pericak-Vance, M. A., Johnson, C. C., Rimmler, J. B., Saunders, A. M., Robinson, L. C., D'Hondt, E.G., Jackson, C.E., and Haines J. L. 1996. Alzheimer's disease and apolipoprotein E-4 allele in an Amish population. *Ann. Neurol.* 39 : 700-704.
80. Perry, G., Friedman, R., Shaw, G., and Chau, V. 1987. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 3033-3036.
81. Podlisny, M. B., Tolan, D. R., and Selkoe, D. J. 1987. Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 138 : 1423-1435.
82. Probst, A., Langui, D., Ipsen, S., Robakis, N., and Ulrich, J. 1992. Deposition of β /A4 protein along neuronal plasma membranes in diffuse senile plaques. *Acta Naeuropathol.* 83 : 21-29.

83. Rafols, J. A. and Valverde, F. 1973. The structure of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. A Golgi and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 150 : 303-332.
84. Ralston, H. J. 1979. The fine structure of laminae I, II and III of the macaque spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 184 : 619-642.
85. Rozdilsky, B., Cuming, J. N., and Huston, A. F. 1968. Hallervorden-Spatz disease-late infantile and adult types. *Acta Neuropathol.* 10 : 1-6.
86. Schubert, D. 1991. The possible role of adhesion in synaptic modification. *Trends Neurosci.* 14 : 127-130.
87. Scott, J. N., Parhad, I. M., and Clark, A. W. 1991. β -amyloid precursor protein gene is differentially expression in axotomized sensory and motor systems. *Mol. Brain. Res.* 10 : 315-325.
88. Selkoe, D. J. 1994. Alzheimer's disease: A central role for amyloid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53 : 438-447.
89. Selkoe, D. J., Bell, D. S., Podlisny, M. B., Price, D. L., and Cork, L. C. 1987. Conservation of brain amyloid protein in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* 235 : 873-877.
90. Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D. J., Lieberburg, I., and Schenk, D. 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* 359 : 325-327.
91. Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X.-D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B., and Younkin, S. G. 1992. Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science* 258 : 126-129.

92. Shivers, B. D., Hilbich, C., Multhauo, G., Beyreuther, K., and Seeburg, P. H. 1988. Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J.* 7 : 1365-1988.
93. Sidman, R., Angevine, J. B., and Pierce, E. T. 1971. Atlas of the mouse brain and spinal cord, Harvard University Press, Cambridge, 1971
94. Siman, R., Card, J. P., Nelson, R. B., and Davis, L. G. 1989. Expression of β -amyloid precursor protein in reactive astrocytes following neuronal damage. *Neuron* 3 : 275-285.
95. Sommer, E. W., Kazimierczak, J., and Droz, B. 1985. Neuronal subpopulation in the dorsal root ganglion of the mouse as characterized by combination of ultrastructural and cytochemical features. *Brain Res.* 346 : 310-326.
96. Spencer, P. S. and Schaumburg, H. H. 1984. Experimental models of primary axonal disease induced by toxic chemicals. In *Peripheral Neuropathy*, eds by Dyck, P. J., Thomas, P.K., Lambert, E. H., Bunge R, ed 2. Saunders, Philadelphia
97. Struble, R. G., Price, D. L. Jr., Cork, L. C., and Price, D. L. 1985. Senile plaques in cortex of aged normal monkeys. *Brain Res.* 361 : 267-275.
98. Suh, J.-G., Oda, K., Tanaka, K., Yorifuji, H., Tomita, T., and Wada, K. 1994. Pathophysiological study of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. *Biomed. Res.* 15 : 241-246.
99. Suh, J.-G., Yamazaki, K., and Tomita, T. 1994. Breeding of the gad-mdx mouse : influence of genetically induced denervation on dystrophic muscle fibers. *Lab. Ani.Sci.* 44 : 42-46.
100. Tagawa, K., Maruyama, K., and Ishiura, S. 1992. Amyloid β /A4 precursor protein (APP) processing in lysosome. *Ann. NY. Acad. Sci.* 674 : 129-137.

101. Tagawa, K., Yazaki, M., Kinouchi, T., Maruyama, K., Sorimavhi, H., Tsutiya, T., Suzuki, K., and Ishiura, S. 1993. Amyloid precursor protein is found in lysosome. *Gerontology*. 39 : 24-29.
102. Takemura, M., Nakamura, S., Akiguchi, I., Ueno, M., Oka, N., Ishikawa, S., Shimada, A., Kimura, J., and Takeda, T. 1993. β /A4 Protein like immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am. J. Pathol.* 142 : 1887-1897.
103. Tomlinson, B. E. 1992. : Ageing and the dementias In *Greenfield's Neuropathology*, eds by Adams, J. H. and Duchen, L. W., ed 5. Oxford Blackwell
104. Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, V., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 11282-11286.
105. Walter, S., Reinhard, P., Andreas, W., Heinrich, D., Gerd, M., Colin, L. M. and Konrad, B. 1991. Localization of Alzheimer β A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* 563 : 184-194.
106. Willis, R. E, Jr. and Coggeshall, R. E. 1991. *Sensory mechanisms of the spinal cord.* ed 2. New York Plenum
107. Yamada, T., Miyazaki, K., Koshikawa, N., Takahashi, M., Akatsu, H., and Yamamoto, T. 1995. Selective localization of geletinase A, an enzyme degrading β -amyloid protein, in white matter microglia and in Schwann cells. *Acta Neuropathol.* 89 : 199-203.
108. Yamada, T., Sasaki, H., Furuya, H., Miyata, T., Goto, I., and Sakaki, Y. 1987. Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149 : 665-671.

109. 山口晴保 1990. 老人斑の免疫組織化学. 神経進歩 34 : 383-395.
110. Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M., and Nakazato, Y. 1988. Diffuse type of senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 77 : 113-119.
111. Yamazaki, K., Kobayashi, A., Kumazawa, A., Wakabayashi, T., and Kikuchi, T. 1991. Axonal degeneration in the central nervous system of gracile axonal dystrophy mouse (GAD) progresses like in human spinocerebellar ataxias. *Biomed. Res.* 12 : 143-148.
112. Yamazaki, K., Moriya, H., Ichihara, N., Mitsushio, H., Inagaki, S., and Kikuchi, T. 1993. Substance P-immunoreactive astrocytes gracile sensory nervous tract of spinal cord in gracile axonal dystrophy mutant mouse. *Mol. Chem. Neuropathol.* 20 : 1-20.
113. Yamazaki, K., Moriya, H., Wakabayashi, T., and Kikuchi, T. 1990. Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in the central nervous system of GAD (gracile axonal dystrophy) mice. *Biomed. Res.* 11 : 145-149.
114. Yamazaki, K., Mukoyama, M., Kikuchi, T., Sakakibara, A., and Tomita, T. 1989. Effects of dietary vitamin E supplement on gracile axonal dystrophy (gad) mice. *Exp. Anim.* 38 : 195-200.
115. Yamazaki, K., Sakakibara, A., Tomita, T., Mukoyama, M., and Kikuchi, T. 1987. Location of gracile axonal dystrophy (GAD) on chromosome 5 of the mouse. *Jpn. J. Genet.* 62 : 479-484.
116. Yamazaki, K., Wakasugi, N., Tomita, T., Kikuchi, T., Mukoyama, M., and Ando, K. : Gracile Axonal Dystrophy (GAD), a new neurological mutant in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187 : 209-215.

117. Yamazaki, T., Selkoe, D. J., and Koo, E. H. 1995. Trafficking of cell surface β -amyloid precursor protein : retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J. Cell. Biol.* 129 : 431-442.

謝 辞

本研究を終えるにあたり、10年間もの長い間熱意をもってご指導くださいました鹿野胖教授、いつもあたたかい目で見守ってくださいました浅利昌男教授、2人の解剖学第1講座の先生に厚く感謝の意を表します。また本論文の審査にあたり副査を引き受けていただき、ご指導いただきました本学解剖学第2講座江口保暢教授、生理学第2講座渡植貞一郎教授ならびに病理学第1講座野村靖夫教授に心より感謝いたします。さらに大学とは違う、研究所という環境で実質5年間もの間ご指導してくださいました、国立精神・神経センター神経研究所モデル動物開発部部長 菊池建機先生には、いくら紙面を使っても書ききれないほどの沢山の知識、技術、研究するという楽しみを教えてくださいました。本当にありがとうございました。また同モデル動物部研究員の菊地寿枝さん、僕と同じ立場で東北大大学院からきている研究生の中林修さん、マウスの管理を完璧にこなしてくれました志鎌昌子さん、研究を行いやすいように配慮くださいました赤間和子さん、他にも沢山のモデル動物開発部の方々のおかげで本研究ができました。それからもちろん、麻布大学解剖学第1講座室生の人々、とりわけ同期である三浦浩史さんには迷惑ばかりかけてしまい、感謝の念でいっぱいです。また最後に、10年間もの大学生活を許してくれた船橋の両親に、心から感謝いたします。

平成 9 年 1 月 14 日

麻布大学長 中村 経紀 殿

下記の論文を主体とし、市原伸恒 の学位申請論文とすることを
承諾します。


記

Nobutsune Ichihara, Jiang Wu, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of
amyloid β -protein in ascending gracile tract of gracile axonal
dystrophy (GAD) mouse
Brain Research 695 : 173-178, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tateki Kikuchi
Ubiquitin immunoreactivity in the central nervous system of
gracile axonal dystrophy (GAD) mouse
BRAIN and NERVE 47 : 881-885, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Abnormal ubiquitination of dystrophic axons in central nervous
system of gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse
ALZHEIMER'S RESEARCH in press

所属 国立精神・神経医療一

氏名 菊池建機 

平成 9 年 1 月 18 日

麻布大学長 中村 経紀 殿

下記の論文を主体とし、市原伸恒 の学位申請論文とすることを
承諾します。

記

Nobutsune Ichihara, Jiang Wu, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of
amyloid β -protein in ascending gracile tract of gracile axonal
dystrophy (GAD) mouse
Brain Research 695 : 173-178, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tateki Kikuchi
Ubiquitin immunoreactivity in the central nervous system of
gracile axonal dystrophy (GAD) mouse
BRAIN and NERVE 47 : 881-885, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Abnormal ubiquitination of dystrophic axons in central nervous
system of gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse
ALZHEIMER'S RESEARCH in press

所属 中国长春白求恩医科大学第一临床医学院

氏名 吳 江

眞

平成 9 年 1 月 14 日

麻布大学長 中村 経紀 殿

下記の論文を主体とし、市原伸恒 の学位申請論文とすることを
承諾します。

記

Nobutsune Ichihara, Jiang Wu, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of
amyloid β -protein in ascending gracile tract of gracile axonal
dystrophy (GAD) mouse
Brain Research 695 : 173-178, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tateki Kikuchi
Ubiquitin immunoreactivity in the central nervous system of
gracile axonal dystrophy (GAD) mouse
BRAIN and NERVE 47 : 881-885, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Abnormal ubiquitination of dystrophic axons in central nervous
system of gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse
ALZHEIMER'S RESEARCH in press

所属 国立精神神経医療研究センター 疾病管理部

氏名

崔 得 華
chui de hua

平成 9 年 1 月 20 日

麻布大学長 中村 経紀 殿

下記の論文を主体とし、市原伸恒 の学位申請論文とすることを
承諾します。

記

Nobutsune Ichihara, Jiang Wu, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of
amyloid β -protein in ascending gracile tract of gracile axonal
dystrophy (GAD) mouse
Brain Research 695 : 173-178, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Abnormal ubiquitination of dystrophic axons in central nervous
system of gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse
ALZHEIMER'S RESEARCH in press

所属 エーガイ株式会社 筑波研究所
研究開発調査指導部

氏名 若林 庸夫



平成 9 年 1 月 27 日

麻布大学長 中村 経紀 殿

下記の論文を主体とし、市原伸恒 の学位申請論文とすることを
承諾します。

記

Nobutsune Ichihara, Jiang Wu, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of
amyloid β -protein in ascending gracile tract of gracile axonal
dystrophy (GAD) mouse
Brain Research 695 : 173-178, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tateki Kikuchi
Ubiquitin immunoreactivity in the central nervous system of
gracile axonal dystrophy (GAD) mouse
BRAIN and NERVE 47 : 881-885, (1995)

Jiang Wu, Nobutsune Ichihara, De Hua Chui, Kazuto Yamazaki,
Tsuneo Wakabayashi, Tateki Kikuchi
Abnormal ubiquitination of dystrophic axons in central nervous
system of gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse
ALZHEIMER'S RESEARCH in press

所属 エーガイ株式会社筑波探索研究所

氏名 山崎 一斗

