

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591272  
 研究課題名（和文） アルツハイマー病の神経細胞変性における興奮毒性に関する研究  
 研究課題名（英文） The role of excitatory toxicity on neurodegeneration in the brain with Alzheimer's disease  
 研究代表者  
 水上 勝義（MIZUKAMI KATSUYOSHI）  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授  
 研究者番号：20229686

## 研究成果の概要：

アルツハイマー病脳の神経細胞変性の機序を興奮毒性の観点から免疫組織化学的手法を用いて検討した。まず GABA 受容体  $\gamma$  サブユニットの AD 脳海馬における変化を検討した。その結果  $\gamma$  サブユニットは AD 病理に対して防御的に働き、 $\gamma$  サブユニットの低下と神経細胞の変性が関連することが推察された。AD 脳海馬におけるカルシウム結合蛋白（parvalbumin と calbindin）の変化をみた研究では、個々のカルシウム結合蛋白は AD 脳において異なる変化を示すこと、calbindin 陽性細胞の方が、AD 脳において抵抗性を示すことが示唆された。最後に、神経可塑性に関与するセロトニン 1A 受容体の AD 海馬における変化について検討した。その結果、セロトニン 1A 受容体は、高度の AD でも比較的よく保たれることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,400,000 | 0       | 1,400,000 |
| 2007年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,400,000 | 600,000 | 4,000,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経学

キーワード：老年精神医学

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は現在世界的にもっとも患者の多い認知症疾患であり、本邦にお

いても認知症疾患のおよそ半数を占める。AD 脳では、アミロイド  $\beta$  蛋白が沈着し、神経原線維変化が神経細胞内に形成され、神経細胞

が死に至り、その結果、進行性の脳萎縮が生じる。しかしながら、その神経細胞変性の機序に関する詳細は未だ解明されていない。アミロイドβ蛋白の神経細胞毒性（アミロイド仮説）が有力視されているが、アミロイドβ蛋白を脳内に蓄積させたモデル動物では、神経原線維変化が形成されないことから、アミロイド仮説だけでは、AD 脳における神経細胞変性の全貌を説明することが困難である。このため、アミロイド仮説に代わる、あるいはアミロイド仮説とリンクした病態仮説から、AD 脳における神経細胞の変性機序を解明することは、根本治療薬の開発にも通じる重要な検討課題である。

## 2. 研究の目的

AD の病態仮説には、アミロイド仮説のほかにもいくつかあるが、その中で特に注目されるのは、興奮毒性仮説がある。これは神経細胞内に興奮伝達系の刺激が亢進し、神経細胞内のカルシウムイオンが増加し、その結果細胞内の蛋白質の異常リン酸化などが生じ、結果としてタウ蛋白質のリン酸化（神経原線維変化の形成）やアポトーシスを介した神経細胞死に至るといった病態仮説である。これまで興奮毒性仮説については、おもに興奮性神経伝達系であるグルタミン酸受容体の変化を中心に検討されてきた。しかし神経細胞の機能は、興奮伝達系と抑制系のバランスのもとに調節されており、抑制性伝達系が障害されても、興奮毒性が亢進すると考えられる。

そこで本研究では、抑制性伝達系の障害が興奮毒性を増幅し神経細胞変性を来すとの仮説をたてそれを検証することを目的とし、(1),(2),(3)の3つの実験を行った。

## 3. 研究の方法

(1)AD 脳における、抑制性伝達系の GABA 受容体の変化と神経細胞変性との関連の検討するために、AD 患者 12 例の死後脳海馬と同年齢の健常高齢者 4 例の死後脳海馬を 40 μ 厚に薄切した。神経原線維変化の広がりにより、Braak stage I-VI まで分類し、I,II を病理学的に軽度、III,IV を中等度、V,VI を高度とした。軽度にはすべて健常対照群が該当した。薄切切片を用いて、GABA 受容体 γ 1/3 サブユニットを認識する特異抗体、γ 2 サブユニットを認識する特異抗体を用いて、アビディン・ビオチンコンプレックス法による免疫組織染色を行った。

γ 1/3 サブユニット抗体により免疫染色された切片上に、X-34 という蛍光色素を用いて重染色した。X-34 は、神経原線維変化や老人斑に反応し、傾向発色する新たに開発された試薬である。これを用いることにより、γ 1/3 サブユニットの発現と神経原線維変化との関連を検討することが可能となる。同様に、γ 2 サブユニット抗体により免疫染色された切片上に X34 を重染色し、γ 2 サブユニットの発現と神経原線維変化との関係を検討した。

(2)次に、神経細胞内にある興奮毒性を中和する蛋白質（カルシウム結合蛋白質）の発現と神経細胞の変性との関連について検討した。この実験では、parvalbumin というカルシウム結合蛋白質と calbindin というカルシウム結合蛋白質に注目し、これらの特異抗体を用いて AD 患者の死後脳海馬と健常高齢者の死後脳海馬の薄切切片上で免疫染色を行った。そして AD 脳海馬における、それぞれのカルシウム結合蛋白質の変化を観察した。

(3)さらに今回は AD 脳におけるセロトニン

神経伝達系の変化についても検討した。セロトニン1A受容体は、認知機能に関係するだけでなく、神経可塑性に重要な役割を担っていることが近年明らかになってきた受容体である。したがって、セロトニン1A受容体の変化を検討することも、AD脳における神経細胞の変性機序を検討する上で重要である。ところが、これまでの報告では、AD患者に対してPETリガンドを用いてセロトニン1A受容体を計測した報告や、死後脳を用いて、放射性リガンドをもちいた結合実験は行われているものの、AD脳で保たれると報告と低下するという報告があり、結果は一致していない。そこで、この実験では、セロトニン1A受容体サブユニットに対する特異抗体を用いて、AD死後脳海馬と健常高齢者の死後脳海馬の薄切切片を用いて免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1)健常高齢者の海馬の神経細胞は $\gamma$ 1/3も $\gamma$ 2も発現していた。AD海馬では、進行しても生存する神経細胞は $\gamma$ 1/3サブユニットの神経細胞内の発現がむしろ亢進していた。また $\gamma$ 2もADで残存する神経細胞ないで強く発現した。ただし $\gamma$ 1サブユニットとは異なり、進行しても染色性は亢進することはなかった。

またX34との重染色の結果から、 $\gamma$ 1、あるいは2サブユニットを発現している神経細胞には神経原線維変化が生じないが、これらのサブユニットを失った神経細胞内には神経原線維変化が形成されることが明らかとなった。すなわち $\gamma$ サブユニットにAD病理に対して神経細胞を防御する作用があること、またそれを失うと興奮毒性が亢進し神経原線維変化が形成されるなどの可能性が

示唆された。

従来の我々の研究から、GABA受容体の各サブユニットはAD脳において異なる反応を示すことが報告されている。すなわち $\alpha$ 1は進行と共に著明に低下、 $\beta$ 2は比較的保たれ、 $\beta$ 3は減少する。一方今回の $\gamma$ サブユニットは維持されるか、むしろ増加する。AD病理に対してGABA受容体の各サブユニットが異なる反応を示す理由は未だ明らかではない。今後はこの違いがなぜ起きるのか、また特に神経細胞に対して防御的に働く受容体蛋白質の、防御機構の詳細を明らかにすることは重要な課題である。

今後は、 $\gamma$ サブユニットなど、神経細胞に対して防御的に働くサブユニットを中心に、防御機構の解明を進める必要がある。

(2)健常高齢者の海馬において parvalbumin 陽性の神経細胞は、非錐体細胞の神経細胞体および突起に認められた。ADの進行と共に、parvalbumin 陽性の神経細胞は萎縮し、歯状回やCA1領域では、parvalbumin 陽性の神経細胞数も減少していた。一方 calbindin は、非錐体神経細胞の他に、顆粒細胞や錐体細胞にも認められた。また parvalbumin と異なり、AD病理の進行にかかわらず細胞数は保たれていた。またCA2領域の一部の神経細胞では calbindin の染色性はむしろ増強していた。現在カルシウム結合蛋白質と神経細胞変性についてさらに詳細に検討を続け、論文を作成中である。カルシウム結合蛋白質は神経細胞内のカルシウムイオンの緩衝作用から興奮毒性を緩和させる働きをもつと考えられている。今回の研究では、個々のカルシウム結合蛋白質陽性細胞が、AD脳において異なる反応を示すことが示唆された。また少なくとも calbindin 陽性神経細胞は、AD脳において抵抗性を示すことが示唆された。今後、

AD の進行抑制に対してカルシウム結合蛋白からのアプローチも重要と考えられる。

(3)健常高齢者の海馬において、セロトニン 1A 受容体の染色性は、CA1 や CA2 領域、ならびに歯状回の分子層のニューロピルに強く認められた (図 1 A)。強拡大で観察すると、非錐体神経細胞の細胞体や神経突起が強い染色性を示したが、さらに CA1,CA2 領域の錐体神経細胞の細胞体や神経突起にも染色性が認められた。AD 病理の進行にもかかわらず、セロトニン 1A 受容体の染色性には大きな変化がみられず、高度の例においても、セロトニン 1A 受容体の染色性はよく保たれていた (図 1 B,C)。しかしながら、最も進行した例では、海馬の神経細胞が著明に減少し、それとともにセロトニン 1A 受容体の染色性も著明に減少した (図 1 D)。従来の PET を用いた研究では、早期の AD 患者の海馬においてもセロトニン 1A 受容体の発現が減少することが報告されている。結果が異なる理由は明らかではない。AD 海馬では、残存する神経細胞はセロトニン 1A 受容体を発現するが、神経細胞数自体減少するので、PET で低下として示される可能性や、海馬は低下していないが、隣接する海馬傍回における低下を反映している可能性などが推察される。いずれにしても本研究の結果から、セロトニン 1A 受容体は AD 脳において、比較的保たれることが示唆された。

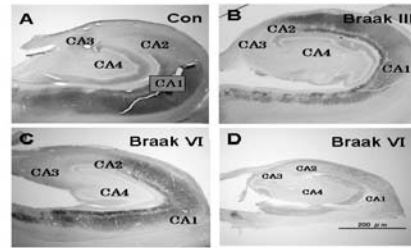


図 1

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Iwakiri M, Mizukami K, Ikonovic MD, Ishikawa M, Abrahamson EE, DeKosky ST, Asada T. An immunohistochemical study of GABA receptor gamma subunits in Alzheimer's disease hippocampus: relationship to neurofibrillary tangle progression.

Neuropathology 2008 Nov 19. [Epub ahead of print] (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

①水上勝義、石川正憲、岩切雅彦、朝田隆. アルツハイマー病における parvalbumin および calbindin D28k の免疫組織化学的検討. 第 47 回日本神経病理学会、岡山、2006 年 5 月 24 日.

②Mizukami K, Ikonovic MD, Ishikawa M, DeKosky ST, Asada T. Immunohistochemical study of the serotonin receptor in the

hippocampus of Alzheimer' s disease. The  
6th annual meeting of International  
College of Geriatric  
Psychoneuropharmacology, October 3-6,  
2006, Hiroshima

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 勝義 (MIZUKAMI KATSUYOSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

准教授

研究者番号 : 20229686

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし