

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591697

研究課題名(和文)アルツハイマー型認知症剖検脳を用いたグルタミン酸興奮毒性の検討

研究課題名(英文)Study of the glutamate excitotoxicity in the hippocampus with Alzheimer's disease

## 研究代表者

水上 勝義 (MIZUKAMI, Katsuyoshi)

筑波大学・体育系・教授

研究者番号：20229686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の神経細胞保持に関連すると推察されるユビキリンとブチリルコリンエステラーゼについて剖検脳海馬を用いて免疫組織化学的検討を行った。ユビキリンはAD病理に対して抵抗性を示す海馬CA2-4領域の神経細胞内で増強した。ブチリルコリンエステラーゼもAD海馬の同部位において神経細胞内とニューロピルで増加した。これらの変化は、AD病理に対する抵抗性を関連する可能性が推察される。今後はこれらの変化と興奮毒性との関連について明らかにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：The postmortem study examined immunohistochemical localization and distribution of ubiquilin (UBL) and butyrylcholinesterase (BChE), in the hippocampus from Alzheimer's disease (AD) dementia cases. All Braak III-IV and the majority of Braak V-VI AD cases had markedly increased UBL immunoreactivity in the nucleoplasm of CA2/3, CA4, and dentate granular neurons. Compared to controls, AD cases had greater BChE immunoreactivity in hippocampal neurons and neuropil, most prominently in CA2/3 pyramidal neurons and stratum oriens. These results suggest that the prominent upregulation of ubiquilin and BChE activity in CA2/3, the region generally considered more resistant to pathology, could reflect a novel compensatory mechanism.

研究分野：老年精神医学

キーワード：アルツハイマー病 神経細胞変性 神経科学 認知症

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症 (AD) は本邦で最も多い、進行性認知症疾患である。AD の神経細胞変性の機序については、アミロイドタンパク (A $\beta$ ) 毒性をはじめ幾つかの病態仮説が提唱されている。なかでも近年 NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤 (メマンチン) が上市され、グルタミン酸神経伝達系を介した Ca<sup>2+</sup> イオンの細胞内流入による神経細胞障害、いわゆる興奮毒性が注目を集めている。これまで研究代表者は、NMDA 型グルタミン酸受容体および AMPA 型グルタミン酸受容体を介した興奮毒性が AD 海馬やマイネルト基底核における神経細胞変性を引き起こしうることを報告してきた。その後抑制系神経伝達系の GABA 伝達系が AD 脳で障害されていることも報告したが、このことは AD 脳にみられる興奮毒性は、グルタミン酸伝達系以外の神経伝達系の障害からも影響される可能性を示唆している。同時に興奮毒性に晒されても変性する神経細胞と変性しない神経細胞が存在する事実から、興奮毒性に対する神経細胞の抵抗性の違いが考えられる。

ほかに神経細胞変性に関連する神経伝達系があるか、また神経細胞の抵抗性を規定するものは何か、これらの点を明らかにすることは、AD の根本的治療や進行抑制に重要と考えられるが、いまだ十分解明されているとは言えない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、グルタミン酸や GABA 伝達系のほかに、AD の興奮毒性に関連する神経伝達系について明らかにする。さらに興奮毒性や神経細胞変性に対して抵抗性を賦与する神経細胞内のシステムについて詳細を解明することである。

神経細胞内で外部からのストレスに抵抗する代表的なシステムとしてユビキチン-プロテアソームシステムがある。このシステムは障害を受けた神経細胞内の蛋白質を認識し除去するシステムであり、このシステムが興奮毒性によって障害された神経細胞の延命に関連する事が考えられる。そこで研究 1 では、AD 脳の神経細胞におけるユビキチン-プロテアソーム系の検討を行う。今回は不要もしくは異常蛋白の認識と運搬などを担うユビキリンの変化について検討する。ユビキリンの変化をみることで、神経細胞内のユビキチン-プロテアソームシステムの活動性のある程度推察することが可能と考えられるからである。興奮毒性に抵抗性を示す神経細胞では、ユビキチン-プロテアソームシステムが活性化し、一方変性する神経細胞ではこのシステムの働きが不十分なことが予想される。本研究では、AD 剖検脳海馬を用いてユビキリンに対する免疫組織化学的検討を行う。抵抗性を示す神経細胞ではユビキリンの免疫染色性が上昇していることが予想され

る。また研究 2 では、グルタミン酸や GABA 伝達系以外に神経細胞変性に関連する神経伝達系の検討として、最近神経可塑性に関連する事が報告されているアセチルコリン伝達系に対する検討を行う。アセチルコリン伝達系の中でアセチルコリンの分解に関与しているブチリルコリンエステラーゼの変化について検討する。すでにブチリルコリンエステラーゼは神経細胞内のみならずグリア細胞にも発現し、AD 脳に特徴的なアミロイド沈着との関連も報告されており、神経可塑性のみならずアミロイド毒性や興奮毒性との関連も推察されるためである。

## 3. 研究の方法

患者の死後、解剖によって得られた健常高齢者と臨床病理診断によって AD と診断された患者の剖検脳海馬を用いる。海馬を 10% ホルマリンでおよそ 14 日間固定した後、脱水過程を経てパラフィンに包埋する。その後 5  $\mu$  厚に薄切し、スライドガラス上に貼った切片を用いる。研究 1 では、ヒトのユビキリン 1 の C 末を認識する一次抗体 (rabbit polyclonal, U7258, Sigma, Lot# E0409, 1:1000) を、研究 2 ではブチリルコリンエステラーゼの N 末に対する一次抗体 (Aviva Systems Biology, catalogue #ARP44208, lot #QC14544, dilution: 1:10) を切片と、摂氏 4 度で一晩反応させる。翌日組織を洗浄し VECATATIN の ABC キットを用いてアビジン-ビオチン標識酵素複合体 (rabbit polyclonal, Avidin : Biotinylated Enzyme Complex, ABC) 法を用いて反応させる。その後ジアミノベンチジンを用いて発色させる。染色切片を光学顕微鏡で観察し画像解析装置で写真撮影し染色強度を測定する。さらに神経細胞内の神経原線維変化と A $\beta$  の確認には、写真撮影後の切片に X-32 を重染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察する。これによって一次抗体で染色された標的蛋白と、神経原線維変化ならびに A $\beta$  との関係を確認することができる。

## 4. 研究成果

(1) 研究 1 (Mizukami K, et al. *Neuropathology* 34:11-18, 2014 に報告) 対象は、Braak staging 0-II までの正常例 5 例、早期 AD 例 7 例、進行 AD 例 11 例の剖検脳海馬である。正常脳においてユビキリンの斂液染色性は、神経細胞体および核に認められた。またニューロピルに線維網を形成していた。AD 海馬において、神経細胞脱落が抵抗性を示す CA2 領域から CA4 領域にかけて、神経細胞内で増加した (図 1 E, F, H, I, K, L)。一方神経細胞変性が強い CA1 領域ではユビキリンは低下した (図 1 B, C)。また神経細胞内の神経原線維変化はユビキリン陽性であったが (図 2 A, B)、神経細胞外のいわゆる ghost tangle はユビキリン陰性だった。また老人斑内の変性突起もユビキリン陽性のも

のがしばしば観察された(図2C,D)。ユビキリン陽性の神経原線維変化(赤+緑)はCA2 CA3で観察されたが、CA1の神経原線維変化はユビキリン陰性であった(図3)。

ユビキリンは不要あるいは異常蛋白質が生じた際に、それを認識し運搬する役割を担っている。したがって、ユビキリンの発現を増加した神経細胞は、細胞内で生じた異常に対する対処能力を発揮していると推察される。以上の結果から、ユビキリンは神経細胞機能の保持のために、神経細胞内で増加しAD病理で異常あるいは不要化した蛋白の除去を行い、ユビキリンを増加させる能力を持つ神経細胞は、AD病理に対する抵抗性が増すことが推察された。

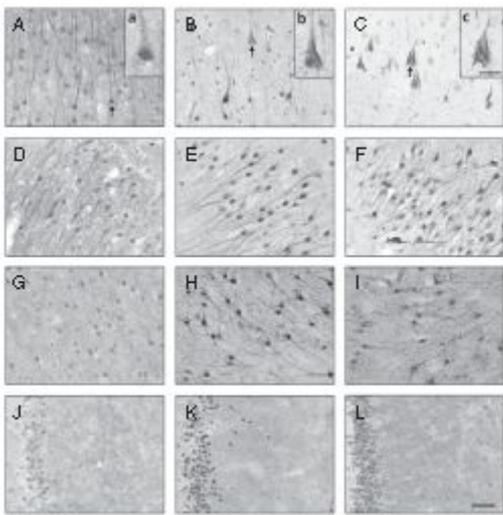


図1 剖検脳海馬のユビキリン染色結果  
A,D,G,J は正常認知機能の高齢者、  
B,E,H,K は軽症AD,C,F,I,L は高度ADの結果

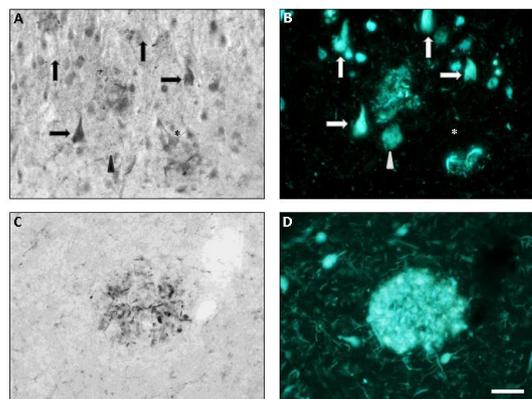


図2 ユビキリンと、老人斑や神経原線維変化との二重染色結果  
図B は神経原線維変化、Dは老人斑  
老人斑と神経原線維変化はユビキリン陽性

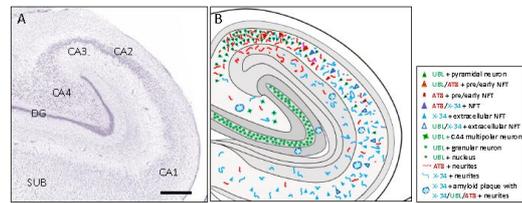


図3 ユビキリン陽性の神経原線維変化の分布

(2)研究2 (Mizukami K, et al. Neuropathology, 2015 [Epub ahead of print]にて報告)

本研究では、臨床病理学的にADと診断された11例と正常高齢者10例の死後解剖により摘出された海馬を用いて、アセチルコリン分解酵素であるブチリルコリンエステラーゼの動向について免疫組織化学的検討を行った。

その結果、正常海馬においては、ブチリルコリンエステラーゼの染色性は歯状回、CA1, CA2-3領域の神経細胞に強く認められた。神経細胞内では、細胞体と近位突起に認められた。また神経細胞外では、ニューロピルに軽度から中等度の染色がみられた。さらにグリア細胞内にもブチリルコリンエステラーゼの染色性が認められた。AD海馬におけるブチリルコリンエステラーゼの染色性は、正常高齢者で観察された分布と類似していた。ただしAD海馬の神経細胞内とニューロピルでブチリルコリンエステラーゼの染色性は増強がみられ、特にCA2-3領域において染色性の増強が顕著であった(図4、図5)。CA2-3領域の増強は、画像解析装置を用いた測定においても有意であった( $P < 0.05$ )。ニューロピルのブチリルコリンエステラーゼ染色はグリアに発現するブチリルコリンエステラーゼを反映するものと推察された。また今回の結果は、AD脳においてブチリルコリンエステラーゼが増加する可能性を示した。なお図4B、図6A,Cにみられるように、老人斑用のブチリルコリンエステラーゼ染色陽性構造物が観察された。そこでアミロイド蛋白質を染色するX-34を用いて二重染色したところ、老人斑の一部にブチリルコリンエステラーゼ陽性構造物が認められる老人斑は80%に及んだ(図6B,D)。老人斑内のブチリルコリンエステラーゼ染色構造物は同時にリン酸化タウの早期の標識蛋白であるAT8抗体に陽性であり、この構造物は変性神経突起と考えられた。AT8は神経細胞内の神経原線維変化を染色するが、AT8陽性の神経原線維変化の10%程度がブチリルコリンエステラーゼ染色陽性であった(図6E,F)。CA1領域の神経細胞内の神経原線維変化はブチリルコリンエステラーゼ染色陰性であり、一方で神経細胞外のghost tangleはAT8陰性であったがブチリルコリンエステラーゼ染色陽性であった。各CA領域における神経原線維変化

や老人斑の標識の強さとブチリルコリンエステラーゼ染色の強さを観察し画像解析装置で検討すると、CA2-3 領域では、神経原線維変化や老人斑の増加とブチリルコリンエステラーゼ染色の増加が相関関係にあった。しかし CA1 領域ではこのような関係は認められなかった。

CA2-3 領域は、AD 海馬において神経細胞変性、脱落が生じにくい AD 病理に抵抗性のある領域である。今回 CA2-3 領域において特異的に AD の神経病理学的変化の増強に一致してブチリルコリンエステラーゼが増強した結果は、ブチリルコリンエステラーゼが神経細胞に変性に対する抵抗性を賦与した可能性が推察される。今回の結果は、アセチルコリン伝達系を通してグルタミン酸伝達系の興奮毒性を軽減する AD 脳の代償機序である可能性が推察された。

今回は神経細胞レベルと神経伝達系レベルにおける興奮毒性に対する代償機序や抵抗性のメカニズムについて検討した。今後はこれらの変化と興奮毒性との関連についてさらに詳細なメカニズムを明らかにすることが求められる。

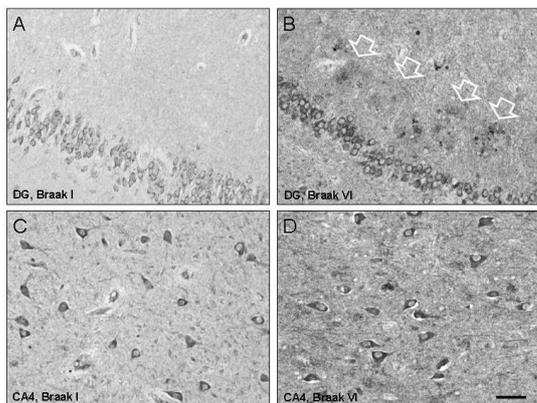


図 4 海馬 CA4 領域のブチリルコリンエステラーゼ染色  
A, C は正常認知機能の高齢者、  
B, D は AD

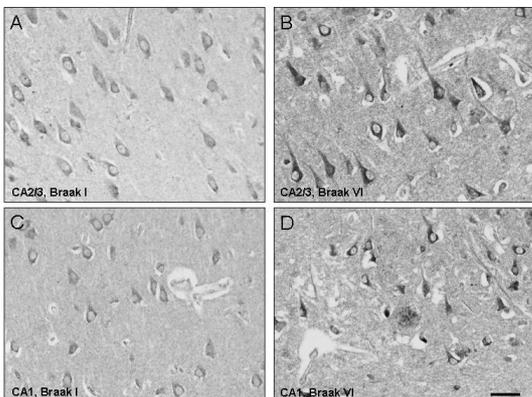


図 5 海馬 CA3-2 領域のブチリルコリンエステラーゼ染色  
A, C は正常認知機能の高齢者、  
B, D は AD

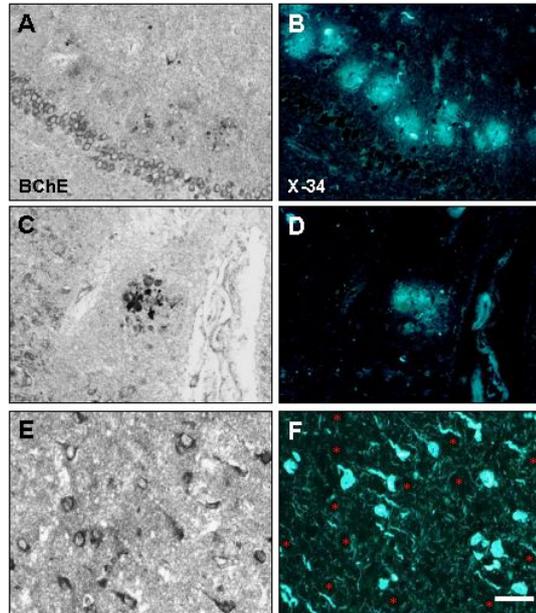


図 6 ブチリルコリンエステラーゼと老人斑や神経原線維変化との二重染色結果  
図 A, B, C, D は老人斑、E, F は神経原線維変化  
老人斑や神経原線維変化の多くはブチリルコリンエステラーゼに陽性である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mizukami K, Abrahamson EE, Mi Z, Ishikawa M, Watanabe K, Kinoshita S, Asada T, Ikonovic MD. Immunohistochemical analysis of ubiquitin-1 in the human hippocampus: association with neurofibrillary tangle pathology. *Neuropathology* 査読有り, 34,2014,11-18, doi: 10.1111/neup.12055.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水上 勝義 (MIZUKAMI, Katsuyoshi)  
筑波大学・体育系・教授  
研究者番号：20229686