

### Ⅲ. 病理部セミナー

原爆資料センター病理部セミナー

## 老化促進モデルマウスと 神経研究

日時：平成5年8月13日（金）

15時～17時30分

場所：原爆資料センター・センター長室

## プログラム

### 第1部 特別講演

「促進老化現象のモデル動物としてのSAM」

京都大学胸部疾患研究所

環境生態学部門老化生物学分野

助教授 細川 昌則 先生

### 第2部 話題提供

① 長崎におけるSAMP1TA/Ngsの生態

原爆資料センター病理部

榮 美保子 先生

② SAMP1TA/Ngsの学習障害とゴルジ染色

精神神経科学教室

川口 哲 先生

③ ガングリオシド合成酵素遺伝子のマウス脳に於ける発現

腫瘍医学教室

古川 鋼一 先生

歯学部第二補綴

山本 朗仁 先生

④ 虚血性神経細胞障害とエンドセリン

第二薬理学教室

片岡 泰文 先生

⑤ 神経系細胞の培養と脳内移植

国立療養所川棚病院神経内科

高島 秀敏 先生

## 促進老化現象のモデル動物としての SAM

京都大学胸部疾患研究所

環境生態学部門老化生物学分野 細川昌則

老化促進モデルマウス (SAM) は骨粗鬆症, 学習記憶障害, 老化アミロイド症等の老化関連病態のモデル動物として広く老化研究に用いられてきた。しかしそれらの発症機序の解析がすすむにつれ, それらの病態が加齢にともない顕在化する機構を知るためには, それぞれの臓器, 組織の加齢変化を研究することが必要である事が明かとなった。老化促進モデルマウスはまた促進老化過程のモデル動物と考えられる。これまでの研究において, 促進老化とは, 正常な成長, 成熟の後におこる促進された老化過程と考えてきたが, この促進老化の本態についてはこれまでほとんど研究がなされていなかった。促進老化過程が個体レベルにのみ認められる現象か? 個体の各組織, 臓器に普遍的に認められる現象か? という2点に関して現在検索をすすめている。これまでわかった事は, 骨髄細胞の染色体異常は SAMP1 (促進老化系統), SAMR1 (対照系統) 両系統において加齢とともに増加するが, SAMP1 系では増加の程度は個体の促進老化過程に平行し, 著しい増加を示した。促進老化系の SAMP1 由来培養線維芽細胞は対照の SAMR1 由来細胞と比較して, 促進した培養加齢現象を示した。この事は生体内, 試験管内において, 細胞レベルにおいても促進老化現象が見られる事を示し, 老化の促進機構が内因的なものである事を示唆している。水晶体の蛋白レベルにおける促進老化過程の検索では, 水晶体蛋白の加齢変化には, SAMP1, SAMR1 に差が認められなかった。初期的な検討ではあるが, このことは個体の促進老化を司る責任臓器が存在する事を示唆している。またこれらの結果より, 老化促進モデルマウス (SAM) を用いて, 老化そのものの機構と, その進行を制御する機構を分けて検討できる可能性が示されており, 老化の促進機序についてさらに細胞レベル, 個体レベルでの検討を進める予定である。

## 長崎における SAMP1TA/Ngs の生態

原爆資料センター病理部 榮 美保子

我々は1987年に京都大学胸部疾患研究所より武田薬品中央研究所を通じて、SAM-P/1, SAM-R/1, SAM-P/8の3系統の老化促進モデルマウス(SAM)を分与していただき、当大学の動物実験施設にて兄妹交配により継代維持を行っている。同時に体重、脳重量、老化度の測定、学習能の検定、寿命の観察、形態学的検討等を行なってきた。ところが長崎のP/1は、京都のSAM-P/1と一部異なるところが見られることが明らかとなってきた。SAMP1(表示法が1993年6月からSAM-P/1より正式命名に変更)の最大の特徴は老化アミロイドの沈着であるが、我々のSAMP1TA/Ngs(表示法を正式命名法に沿って変更)では導入当初より好発部位とされる胃粘膜にも全くアミロイド沈着を認めていない。今回SAMP1TA/NgsのapoA-IIのGenetic typeが京都のSAMP1とは異なることがわかった。この事がアミロイド沈着の起こらない原因と考えられる。またステップダウン型一試行性受動的回避学習試験では、3ヶ月齢で学習障害類似の行動パターンがみられるが、学習障害を示すとされているSAMP8と異なり、我々のSAMP1TA/Ngsは5ヶ月齢でむしろより良い学習結果が得られ、以後再び学習障害を示すというパターンを呈した。この様な特徴から、当研究室におけるSAMP1TA/Ngsは従来の京都のSAMP1とは異なる亜型であると考えられる。

## SAMP1TA/Ngs の学習障害とゴルジ染色

精神神経科学教室 川 口 哲

長崎にて飼育している SAMP1TA/Ngs は、3ヶ月齢では学習障害類似の行動を示し、5ヶ月では学習障害は認められず、そして、7ヶ月、10ヶ月と加齢と共に学習障害が観察される特徴を持つ。この SAMP1TA/Ngs の海馬 CA1 領域における錐体細胞の basal dendrite および dendritic spine の加齢による変化を形態学的に定量観察し、SAMP1TA/Ngs に認められる学習障害の特徴を形態学的に考察した。

使用動物は、SAMP1TA/Ngs の3ヶ月、5ヶ月、7ヶ月、10ヶ月齢。学習能の評価方法は金戸らの報告に準じた Step-down 型受動的回避学習試験を、標本作成は迅速 Golgi 法を用いた。統計学的解析には t 検定および Wilcoxon の順位和検定を用いた。

受動的回避学習試験では、5ヶ月齢群が、3、7、10ヶ月齢群に比較して優れており、統計学的に有意な差を示し、形態学的にも5ヶ月齢群の spine の数および密度が他の月齢群と比較して多く、統計学的に有意な差を認めた。

Dendrite および dendritic spine の減少は学習障害と相関することが言われている。受動的回避学習試験において、SAMP1TA/Ngs の学習能の特徴である若年期で学習障害様の行動を示し、成長と共に学習能力は改善し、その後老化と共に再び障害が出現するということが、今回の海馬 CA1 におけるゴルジ染色による形態計測によって形態学的にも確認できた。SAMP1TA/Ngs の学習能の特徴は、ヒトの老化にともなって認められる脳機能障害の出現の過程に似たものといえる。以上より SAMP1TA/Ngs は、促進老化によって認められる自然発生的な脳機能障害のモデル動物のひとつとして有用であると考えられる。

### 【話題提供 ③】

## ガングリオシド合成酵素遺伝子のマウス脳に於ける発現

腫瘍医学教室 古川 鋼一

歯学部第二補綴 山本 朗仁

ガングリオシド糖鎖の合成の基点である GM3→GM2, 及び GD3→GD2 に働く  $\beta$ 1,4 GalNAc 転移酵素遺伝子の発現につき, マウスの脳の *in situ hybridization* 法により検討した。アンチセンス RNA プロブを用いた *in situ hybridization* で本遺伝子は海馬, 歯状回, 小脳プルキンエ細胞, 嗅脳の僧帽細胞などに強い発現が認められた。散在性には大脳皮質や視床下部などにも発現を認めた。グリアが多い部位にはほとんどシグナルを認めず, 総じて本遺伝子がニューロンに限局して発現していることが判明した。本酵素の直接の反応産物である GM2, GD2 ガングリオシドの分布を, 抗体を用いて観察したところ, 本酵素遺伝子の mRNA の発現とは大部分一致しておらず, その理由としてニューロン内の産物の輸送による分布の違いや, GM2/GD2 からより複雑な構造へと変換されることによって抗体で検出できなくなることなどが考えられた。

## 虚血性神経細胞障害とエンドセリン

第二薬理学教室 片岡 泰文

脳循環障害に起因する脳神経細胞障害における中枢エンドセリン (ET) の病態生理学的意義を解明するために遅発性神経細胞死の病態モデルとしての脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いて、組織化学的手法により ET 産生系の変動および NO 合成酵素活性を、また、定量的受容体オートラジオグラフ法により ET 受容体の変動について検討した。一過性全脳虚血はハロセン麻酔下 SHRSP の両側総頸動脈を10分間結紮することにより行った。その結果、神経細胞障害が始まる時期と一致して海馬 CA1 領域のアストロサイトにおいて ET-1 様および ET-3 様の免疫活性が顕著に認められた。さらに、NO 合成酵素活性を調べた結果、同領域のアストロサイトおよびマイクログリアで活性の著明な増加が認められた。また、<sup>125</sup>I-ET-1 をリガンドとして同時期の脳薄切片を用いて受容体結合実験を行った結果、海馬 CA1 錐体細胞層域に最も高密度の<sup>125</sup>I-ET-1 結合が認められ、結合特性から ET<sub>B</sub> 受容体でマイクログリアに存在していた。以上より、一過性脳虚血による神経細胞障害が始まる時期と一致して、アストロサイトで ET 産生系が賦活され、パラクリンのにマイクログリアの ET<sub>B</sub> 受容体を介してマイクログリアを活性化し、さらには NO 合成酵素を活性化して神経細胞の破壊に関与することが推察される。

## 神経系細胞の培養と脳内移植

国立療養所川棚病院神経内科 高島 秀敏

脳内では神経栄養因子、細胞外マトリックス、サイトカインなど多くの物質が、特異的または非特異的に神経細胞に対して作用している。一般的にこれらの物質と神経細胞との関係に関する研究は、胎児脳から初代培養系を用いてなされている。しかし、初代培養は多種類の神経細胞やグリア細胞などの混在する不均一なものであり、神経栄養因子などの神経作用性の物質も、そのごく一部のものしか見つかっていないので、初代培養で得られる情報には限界がある。また、グリア神経間および神経細胞どうしの interaction の存在がそのデータの解釈を複雑なものとしている。

均一な細胞を得るための方法として、温度感受性腫瘍遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて神経細胞に導入し、不死化細胞株を得る方法を紹介し、ラット黒質細胞から得られた神経性不死化細胞株の分化、特に塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) に対する感受性について報告した。また、細胞への神経栄養因子その他の未知の物質まで含めた因子の作用を *in vitro* で見るための方法として、脳内移植の方法を紹介した。移植されたドーパミン神経細胞からの神経突起伸長を刺激する因子が、線条体の一部破壊によってより多く分泌されることを示した。

老化促進モデルマウス (SAM) の脳内変化の手掛かりを得るために、細胞培養や脳内移植は有用な方法と考えられる。