

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

Pin1 遺伝子欠損マウスとヒト神経変性疾患の病理的相関性の検討

研究代表者 大滝 博和 1)
研究分担者 柿田 明美 2)

1) 東京薬科大学・薬学部・機能形態学, 2) 新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

Pin1 はアミロイド前駆タンパク質 (APP) やタウタンパク質代謝の律速酵素である。代表者は Pin1 KO マウスの脳の視床に巨大な抗アミロイド抗体陽性反応の出現を認めている。本研究の目的は APP 抗体陽性反応物の実態解明とヒト神経変性疾患への関連を明らかにすることである。昨年までに Pin1 KO の APP 陽性反応はヒト筋硬直性ジストロフィ (MD) 患者の剖検脳のエオシン好性視床封入物と類似する病理学的特徴を有することを示した。本年度は、その APP の加齢変化と視床における神経炎症の可能性をマウス脳を用い検討した。

A. 研究目的

神経変性疾患は超高齢社会を迎え増加している。しかし、その発症や進展の機構はいまだ十分に解明されておらず、その予防・治療は明らかとなっているものは少ない。Pin1 は多様なタンパク質のリン酸化スレオニン（もしくはセリン）とプロリン（pThr[Ser]-Pro）構造を触媒する。特に、アミロイド前駆タンパク質 (APP) やタウタンパク質の触媒を Pin1 が担っていることが示され AD などとの関与が示唆されている。また Pin1 遺伝子欠損 (KO) マウスは加齢性の神経異常を呈するとの報告があり、アルツハイマー病や前頭側頭葉認知症 (FTD) の Pin1 のメチル化および酵素活性の解析により AD は Pin1 の活性が高く、FTD は活性が低いと報告されている。

申請者は、Pin1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた脳の 600 日以上にわたる加齢変化を解析したところ、視床に老人斑とは異なる染色性を有する APP 陽性反応物の存在を見出した。このような仕様におけるアミロイド陽性反応はこれまで報告がない。しかし、これまでの報告により視床におけるエオシン陽性封入体が報告されている。そして、

新潟大学脳研究所が所有する脳神経変性疾患に関わる剖検脳を用いて調べたところ、筋硬直性ジストロフィ (MD) 患者のエオシン好性視床封入物においても同抗体を用いて視床に APP 陽性反応が認められたとともに、Pin1 KO マウスの視床をエオシン好性視床封入体に特徴的な病理学的特徴を示した。本年度はそのアミロイド陽性反応の変化や RIPA 不溶性画分におけるそれらの変化を immunoblotting により調べた。更に、視床におけるこれら陽性反応の増殖と視床の炎症等が関連するか調べた。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

ヒト神経変性疾患患者の剖検脳の使用は、昭和大学医学研究科「ヒトを対象とする研究等に関する倫理委員会」の承認後、昭和大学医学研究科長の研究実施許可の後に行った。また、代表者の移動に伴い同申請は「東京薬科大学ヒト組織等を研究活用するための倫理審査」においても承認を受けた。

Pin1 KO マウスの動物実験は、Pin1 KO マウスを飼育し、それらの試料を採取した研究代表者の

前職である昭和大学の第二種使用等拡散防止措置計画および昭和大学動物実験計画の機関承認の後に実験を行った。

【マウスの組織切片の作成】

150, 300, 600 日齢付近のマウスの脳は、生理食塩水および 10%中性緩衝ホルマリンの還流固定後にパラフィン切片を作成した。また、Immunoblotting に供する試料は、同日齢の脳を顕微鏡下にて大脳皮質、海馬、視床に分取し液体窒素にて急速凍結し、実験を行うまで-80℃に保存した。

【immunoblotting】

大脳皮質・海馬および視床は重量のおよそ 10 倍量の RIPA buffer (含むプロテアーゼインヒビター) を用い、ガラスダウンスホモジナイザーにてホモジネートした。それらを 15,000rpm で 60 分間遠心分離し上清を可溶性画分とし得た。沈査は再びホモジネートし同様に遠心分離を行い、それら沈査は不溶性画分とした。不溶性画分はさらに 8M Urea にて可溶化した。それらを immunoblotting 試料として実験に供した。Immunoblotting には 4-20% ミニプロティアン TGX Stain-Free ゲル (Bio-Rad) を用いた。電気泳動後、PVDF メンブランに転写し、UV 照射処理により総蛋白質量の検出を行った。ブロックエース (KACKAC) にてブロッキング、そして、rabbit anti-amyloid precursor protein, C terminal antibody にて反応させ、HRP-goat anti-rabbit IgG, mouse anti-GAPDH antibody にて反応させた。Super signal west Dura Extended Duration substrate にて化学発光させた。

標的タンパク質バンドのシグナル強度および総タンパク質のシグナル強度は Image Lab Image Lab を用いて定量した。

【Iba1 免疫染色】

視床におけるアミロイド封入体の増加が神経炎症があるか調べるために、マイクロリア・マクロファージのマーカーである Iba1 に対する抗体 (rabbit anti-Iba1 antibody, Fuji Film Wako, 500 倍希釈) にて免疫染色しその後画像解析ソフト Fuji にて陽性領域を定量した。簡潔に示すと、

クエン酸による抗原の賦活化後、5% NHS/PBST にてブロッキングを行った。その後、Iba1 抗体、biotinylated goat-anti rabbit IgG にて反応させた。可視化は ABC 法により行った。

C. 研究結果

これまで我々が、視床におけるアミロイドの封入体のサイズが Pin1 KO マウスにおいて有意に大きくなっていることを明らかにしてきた。しかし、量的に増加しているという証拠はない。そこで、immunoblotting により視床における封入体が増加しているか、視床において何らかの理由により増加しやすくなっているかを検討するために比較的溶化能の高い RIPA buffer を用いて得た可溶化画分とその不溶性画分において APP 量を調べた。その結果、当該方法により得られた可溶性画分と不溶性画分両画分で 100kd-120kd に APP 抗体に反応するバンドを認めた。これらは APP の予想されるサイズであり全長の APP が検出されていると予想された。これらを野生型および Pin1 KO において比較したところ可溶性画分において APP の有意な増加を認めた。一方、不溶性画分 (Urea 可溶性画分) において両者の有意な差は認めなかった。しかし、一方で、可溶性タンパク質でありハウスキーピングタンパク質として用いられる GAPDH のシグナルもいくつかの不溶性画分において認められ画分方法の再検討の必要性も考えられた。

次に、アミロイド封入体が増加している視床が何らかの神経機能に影響しているかもまた不明である。そこで、ミクログリアのマーカーである Iba1 を免疫染色することにより視床において神経炎症が起きているか調べた。その結果、150 日齢の視床において Iba1 陽性反応が有意に高く、300 日以降も有意な変化は認めなかった。一方、野生型の視床は 150 日から経日的に増加した。

D. 考察

これまでの研究から、我々は Pin1 KO マウスにおいて有意にサイズが大きくなるアミロイド封入体が筋硬直性ジストロフィ患者の脳に増加するエオシン陽性視床封入体と病理的特徴が極めて近いことを示した。更に、これまで筋硬直性ジ

ストロフィのエオシン陽性視床封入体は、アミロイド陽性ではないとされて来た。しかし、本研究によりこれら封入体が視床に何らかの影響を与えているかはいまだ不明である。本研究は、このアミロイド封入体の性質と視床においてこれら封入体が神経機能に影響を与えているかをマウスの脳の加齢変化により検討した。

視床を RIPA 可溶性と不溶性画分に分画し immunoblotting にて APP を調べたところ、Pin1 KO マウスは、600 日齢の可溶性画分において有意な APP の増加を認めた。一方、不溶性画分において、その違いは認められなかった。その要因の一つとして本来であれば不溶性画分に含まれない GAPDH のシグナルが確認されており不溶性画分の分画の再検討をする必要があると考えられる。

一方、免疫染色において Iba1 陽性反応を調べたところアミロイドの有意な増加に先立ち 150 日齢において既に Iba1 陽性反応の有意な増加を認めた。これは、アミロイド封入体サイズの有意な増加に先立ち神経炎症が生じていることが示唆される。神経炎症の原因はまだ不明であるが、何らかの視床の変容が神経炎症を引き起こし視床のアミロイドの増加を引き起こしていることが示唆される。今後はどのような原因がこの増加に寄与したか明らかにする必要がある。

E. 結論

MD 患者の視床封入体の役割はわかっていないが、MD 患者も中枢神経症状（認知症状、性格変化）などが報告されており、Pin1 KO マウスを解析すること、視床に蓄積する APP の原因の解析は MD 患者の中枢神経症状の原因を明らかにするきっかけとなるかもしれない。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Yoshikawa A, Ohtaki H, Miyamoto K, Kim S, Hase K, Yoshida M, Kamijo S, Kamimura S, Koiwa N, Izumizaki M. Three-dimensional kinematical analysis revealed spatiotemporal

changes in ankle motor function in both the unaffected and affected sides of brain damage mice after undergoing therapeutic mild-intensity running SFN2023, Washington DC, 2023/11/11-15

2. 田邊諒, 山荷大貴, 宮本和幸, 土肥謙二, 大滝博和. 熱暴露を行ったマウスは小脳プルキンエ細胞数が経時的に減少する. 第 129 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 沖縄, 2024/3/21-23
3. 水間颯一郎, 高村敬太, 森屋七海, 大滝博和, 山口宜秀. 末梢神経髄鞘形成期におけるリン酸化 L-MPZ とリン酸化 MPZ の局在解析. 日本薬学会第 114 年会, 横浜, 2024/3/28-31
4. 大羽俊太, 佐藤龍也, 田中志弥, 内田隆史, 小野賢二郎, 柿田明美, 本田一穂, 大滝博和. Pin1 KO の視床におけるアミロイドとミクログリアの活性化の変化. 日本薬学会第 114 年会, 横浜, 2024/3/28-31
5. 経口補水液 (ORS) はマウス熱中症後の多臓器不全を改善する. 大滝博和, 田邊諒, 宮本和幸, 鈴木恵輔, 山荷大貴, 本田一穂, 土肥謙二. 日本薬学会第 114 年会, 横浜, 2024/3/28-31
6. 舘澤英里香, 由井真佳, 長沼諒, 笠井清花, 瀬戸口潔, 林明子, 山口宜秀, 大滝博和. 脱髄部に局在する CD68+細胞の同定と RAW264.7 のミエリンデブリス貪食能. 日本薬学会第 114 年会, 横浜, 2024/3/28-31

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし