

新潟大学脳研究所  
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」  
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的相関性の検討

研究代表者 大滝 博和<sup>1)</sup>

研究分担者 柿田 明美<sup>2)</sup>

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 amyloid 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。本年度はマウスを用い、経目的にアミロイド前駆タンパク質 (APP) と  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) を immunoblotting により調べ、Pin1 KO のアミロイド凝集体の性質を明らかにするとともに、細胞内封入体の役割を考察した。

### A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病に代表とされる神経変性疾患は脳内に不溶性のタンパク質が凝集することが知られている。そして家族性患者の解析やその遺伝子を改変した動物を用いて多くの研究が行われている。しかし、家族性の患者は全体の約5%程度と考えられ、ほとんどの患者の発症に至る過程は、いまだ不明ともいえる。

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) 構造を触媒する酵素である。アミロイド前駆タンパク質 (APP) やタウタンパク質も Pin1 が修飾することが示され AD などとの関連が示唆されている。そして Pin1 遺伝子欠損 (KO) マウスは、加齢に伴い神経異常を呈する報告もある。一方、アルツハイマー病や前頭側頭葉認知症 (FTD) 患者の Pin1 のメチル化および酵素活性の解析によると、健常人に対して AD は Pin1 活性が高く、FTD は活性が低いと報告されている。

申請者は、マウス脳を組織学的に調べたところ、視床に老人斑とは異なる染色性を持つアミロイ

ド陽性凝集体を見出した。このアミロイドの凝集体は、Pin1 KO マウスで有意に大きい。更に、それは神経の細胞質内に存在していた。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と比較したところ、筋硬直性ジストロフィ (MD) 患者のエオシン陽性封入体と類似した形態学的染色性を有することを明らかにした。本年度はマウス脳を用い、視床およびそれら封入体が観察されない大脳皮質をホモジネートし immunoblotting により調べた。

### 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承認を「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」においても受けた。

動物実験においても、前職の昭和大学および現職である東京薬科大学における遺伝子組換え実験計画書、動物実験委員会の動物実験計画書の機関承認およびを受けた。

### 【マウスの脳組織の採取】

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、深麻酔下にて放血致死させた後に脳を取り出し、実体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°C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 (含むプロテアーゼ阻害薬) 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、得られた沈査は不溶性画分とし、8M Urea にて可溶化させた。これらを immunoblotting に用いた。Immunoblotting には 4-20% ミニプロテイン TGX Stain-Free ゲル (Bio-Rad) を用い、PVDF メンブランに転写した。ブロッキング後、rabbit 抗 amyloid precursor protein, C-terminal 抗体もしくは抗 rabbit anti-amyloid 1-14 抗体にて反応させ、化学発光により検出した。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から半定量を行った。

## 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アミロイドの量的変化を調べた。可溶性画分において APP (C 末端領域を認識する抗体) は、加齢に従い増加した。KO マウスのそれは、野生型に比べ有意に高いが、300 日齢を最大に低下した。一方、不溶性画分では有意差を認めなかった。同様に野生型の可溶性画分において amyloid (1-14)は加齢に従い増加し、KO と有意な差は認めなかった。しかし、不溶性画分では、野生型に比べ 300 日齢以降で有意な増加を認めた。これは Pin1 KO の視床において amyloid の凝集体が量的にも増加している可能性を示唆する。

## 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に加齢変化により検討した。今回、immunoblotting により詳細に検討したところ、野生型の APP(C-terminal)は加齢にしたがい増加していることが認められた。Pin1 KO は可溶性の APP が有意多かった。一方、amyloid(1-14)は Pin1 KO の不溶性画分において有意に増加しており、増加した APP もしくは産生した  $\beta$ -amyloid が何らかの形で細胞内に取り込まれ凝集している可能性が示唆された。AD 患者や関連動物はオートファージに異常がある事が示されている。これらの機構を調べることにより  $\beta$ -amyloid の細胞内凝集機構や MD のエオシン陽性封入体の凝集機構を明らかにできるかもしれない。

## 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. Ohtaki H, Miyamoto K, Suzuki K, Yoshikawa A, Dohi K. Induction of Purkinje cell degeneration in mice after heat exposure. SFN2024, Chicago, IL, 2024.10

2. 大滝 博和, 瀬戸口潔, 澤晴香, 菅原和寛, 由井真佳, 舘澤英里香, 笠井清花, 長沼諒, 林明子. 実験的末梢神経脱髄炎におけるマクロファージの動態と食食作用の検討. 第 97 回日本生化学会大会, 横浜, 2024.10
3. 柳澤 薫, 宮本和幸, 若山吉弘, 荒田 悟, 鈴木恵輔, 中村元保, 山荷大貴, 宮崎拓郎, 本田一穂, 土肥謙二, 大滝 博和. 実験的熱中症後の内皮アクアポリン1トランスジェニックマウスにおける肝障害. 第 37 回日本酸化ストレス学会関東支部会, 東京, 2024.12
4. Murakami Y, Takahashi H, Oba S, Sato T, Ono K, Kakita A, Uchida T, Ohtaki H., Does thalamic amyloid precursor protein (APP) contribute to neuroinflammation with aging? Anatomy – Physiology - Pharmacology Week in 2025 (APPW2025), 千葉, 2025.3
5. 大滝 博和, 宮本 和幸, 柳澤 薫, 若山 吉弘, 荒田 悟, 宮崎 拓郎, 本田 一穂, 土肥 謙二. Aquaporin 1 の血管内皮における高発現は, 熱中症後の肝障害を悪化させる. 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3
6. 佐藤 龍也, 内田 隆史, 小野 賢二郎, 柿田 明美, 大滝 博和. 加齢に伴う脳内グリア細胞の組織学的変化および Pin1 遺伝子欠損の影響. 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3
7. 澤 晴香, 瀬戸口 潔, 由井 真佳, 長沼 諒, 林 明子, 山口 宜秀, 大滝 博和. マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 の M1, M2 型への誘導とその食食作用の検討. 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3
8. 関 駿介, 水間 颯一郎, 大滝 博和, 山口 宜秀. L-MPZ 特異的リン酸化部位欠失 (S297A)マウスの坐骨神経における形態学的異常の解析. 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3
9. 水間 颯一郎, 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 の生理的機能解析. 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3
10. 西岡 利穂, 森屋 七海, 水間 颯一郎, 大滝 博和, 山口 宜秀. L-MPZ 変異マウスにおけるミエリン関連タンパク質の定量解析. 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3
11. 高橋 日向, 村上 友貴矢, 大羽 俊太, 澤 晴香, 内田 隆史, 小野 賢二郎, 柿田 明美, 大滝 博和. 視床のアミロイド凝集体は加齢により変化するか? 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3
12. 菅原 和寛, 瀬戸口 潔, 笠井 清花, 舘澤 英里香, 大滝 博和, 林 明子. マウス坐骨神経 Lysolecithin 脱髄部に集積する CD68 陽性細胞の解析. 日本薬学会第 145 年会, 福岡, 2025.3

#### G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし