

P236 血液脳関門を介したクレアチンの脳への供給メカニズムの解明

立川正憲¹、大槻純男^{1,2,3}、高長ひとみ^{1,2,3}、細谷健一^{2,4}、寺崎哲也^{1,2,3}

(1 東北大院薬、2 CREST・JST、3 東北大未来研、4 富山医薬大薬)

クレアチンは、脳内 ATP の恒常性維持に重要な役割を果たし、Huntington 病や筋萎縮性側索硬化症モデルにおいて、神経保護効果を示すことが報告されている。本研究では、クレアチンの血液脳関門 (BBB) を介した脳への供給メカニズムを解明することを目的とした。我々は、*in vivo* 解析から、循環血中のクレアチンが BBB を介して脳内へ供給されることを示唆した。さらに、条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞株 (TM-BBB) にクレアチン輸送担体 (CRT) が発現し、クレアチンを能動的に取り込むことを明らかにした。以上の結果から、クレアチンは BBB に発現する CRT を介して脳へ供給されると考えられる。

P237 脳毛細血管周皮細胞株の樹立と機能評価

中島恵美^{1,2}、飯笹 久^{1,2}、浅島朋子¹、細谷健一^{2,3}、上田正次⁴、帯刀益夫^{2,3}、寺崎哲也^{2,3}

(1 共立薬大、2 CREST・JST、3 東北大、4 YSNT 研)

血液脳関門の構造と機能に対する周皮細胞の役割は不明である。本研究は、温度感受性 SV40 T 抗原遺伝子導入ラットから条件的不死化周皮細胞株を樹立し、その機能を評価することを目的とした。遠心密度勾配法にて調製した脳毛細血管を酵素処理し、得られた初代培養細胞を 33°C で継代培養後、コロニーを単離した。樹立した脳周皮細胞株 (TR-PCT1) には、周皮細胞マーカー、機能的 T 抗原が発現し、マトリックスへの Ca 沈着、サイトカイン応答性の α -SMA 発現変化が見られた。TR-PCT1 はケモカイン受容体、本態性高血圧候補遺伝子、動脈硬化関連遺伝子をも合わせ持つ新規の多機能性脳周皮細胞株である。

P238 条件的不死化ラット網膜毛細血管ペリサイト株 (TR-rPCT) の樹立

近藤徹¹、細谷健一^{2,3}、大槻純男^{1,2,4}、高長ひとみ^{1,2,4}、矢内信昭⁵、上田正次⁶、帯刀益夫⁵、寺崎哲也^{1,2,4}

(1 東北大院薬、2 CREST・JST、3 富山医薬大薬、4 東北大未来研、5 東北大・加齢医学研、6 YSNT 研)

ペリサイト (周皮細胞) は血液網膜関門 (iBRB) を取り囲み、iBRB の機能保持に関与していると考えられる。本研究では、tsA58 TG rat から網膜毛細血管ペリサイト株 (TR-rPCT) を樹立することを目的とした。単離したクローンは節状の多重層形態を示したこと、および節状部位が von Kossa 染色によって陽性であったことから、ペリサイトの特性を示した。さらに α -smooth muscle actin が検出されないことから *in vivo* の網膜毛細血管ペリサイトの性質を示した。以上から、TR-rPCT は *in vivo* および *invitro* の機能を少なくとも一部保持した細胞株であることが示唆された。

P239 小胞体熱ショック類縁蛋白を用いた神経細胞死の抑制

北尾康子¹、小澤健太郎¹、遠山正彌^{2,3}、堀修¹、小川智^{1,3}(1 金沢大医、2 阪大院医、3 CREST・JST)

アストログリアは神経細胞と発生を同一にしながらも、きわめて虚血に強く、また、種々のストレス環境にあって神経細胞を保護する機能を持っている。我々は、培養アストログリアより新規ストレス蛋白 ORP150 (150 kDa oxygen regulated protein) の分離に成功した。ORP150 は小胞体に局在する熱ショック類縁蛋白であり、これを欠く細胞では低酸素などの小胞体ストレスで細胞死が加速されることが分かっている。ヒトおよびげっ歯

類の脳虚血で、ORP150 は神経細胞に誘導もされるが、その発現量は少なく、発現期間はグリア細胞に比べて短いことが分かっており、一方、ORP150 を強制発現させた神経細胞は低酸素環境に対して抵抗性を示し、さらに、そのトランスジェニックマウスの神経細胞は明らかに虚血に対して抵抗性を示し、虚血耐性が生じている。さらに、ORP150 を強制発現させたトランスジェニックマウスでは虚血ストレスだけでなく、グルタミン酸毒性に対しても抵抗性を示すことが分かってきた。これに反して、ORP150 ノックアウトマウスでは、同部位で明らかにグルタミン酸に対する感受性が亢進していた。以上の事実は、神経細胞にとって興奮性アミノ酸が小胞体ストレスを惹起すること、さらに小胞体のストレス蛋白がグルタミン酸による神経細胞死を抑制していることを示している。我々は、現在、アデノウイルスを用いてラットの神経細胞に ORP150 を遺伝子導入することにより、虚血やグルタミン酸毒性に対する抵抗性を付与することができるかを検討中である。最終的にこのような遺伝子導入法をヒトに応用できるかは、今後の検討に待たなければならないが、ORP150 の神経細胞における発現量を増加させる薬剤のスクリーニングも平行して行っており、これらのアプローチによって神経細胞を虚血にだけでなく興奮性アミノ酸による神経細胞死から救済しうる方法を見いだしたい。

P240 孤発性アルツハイマー病における PS2 スプライシング変種の発現機構

眞部孝幸^{1,2} (1 阪大院医, 2 CREST・JST)

近年、多くの神経変性疾患において特定遺伝子のスプライシング異常が報告されている。例えば、ALS 患者におけるグルタミン酸トランスポーターEAAT2 遺伝子、前頭側頭型痴呆(Front Temporal Dementia and Parkinsonism; FTDP) における tau 遺伝子および家族性アルツハイマー病における Presenilin-1 (PS1) などである。このうちアルツハイマー病 (AD) は比較的若年で発症する家族性 AD(FAD) と高年齢になって発症する孤発性 AD (SAD) に分類される。近年の分子遺伝学の進歩により、家族性 AD (FAD) の原因遺伝子が3種同定された。その内、第14番染色体に存在する presenilin-1(PS1) 遺伝子変異が原因となるケースが最も多い。我々は PS1 の遺伝子変異による神経細胞死のメカニズムに着目し解析を進めた結果、PS1 変異体は小胞体に存在するストレスセンサー IRE1 のリン酸化障害を引き起こし神経細胞死を誘発することを見出した。つまり、AD は小胞体機能障害が引き金になっていると考えられる。一方、SAD についてはその病理像が FAD と同様であるにも関わらず発症原因が不明であった。我々は最近、SAD 患者脳においては PS2 のエクソン5を欠失したスプライシング変種が高頻度に発現していることを見つけだし、この翻訳産物は強制発現させると細胞死を誘発し易くなることを明らかとした。これらの結果は FAD においては PS1 の変異体が、SAD においては PS2 のスプライシング変種が共に小胞体を起源とする細胞死を引き起こし、痴呆の原因となっていることを意味する。そこでこれらの翻訳異常産物による神経細胞死の機序あるいは翻訳異常産物の出現する機構を明らかにすればその機序の抑制により神経細胞を死から守ることができ、痴呆から救済しうると考え、研究を進めている。今回は、このスプライシング変種由来の蛋白質 (PS2V) を特異的に検出するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作成し免疫組織学的にアルツハイマー病脳での発現を検討した。その結果、PS2V は健常脳では全く検出されなかったが、孤発性アルツハイマー病患者脳13例中13例とも検出できた。また、PS2V 出現メカニズムを解明する目的で、PS2 pre-mRNA に結合して PS2 の正常なスプライシングを阻害するような物質、つまり選択的スプライシングを起こさせる因子の同定を試みた。まず低酸素刺激した SK-N-SH 細胞から細胞核抽出液を調製後、この抽出液を用いて独自の pre-mRNA 結合実験法を構築し、PS2 pre-mRNA に結合する約 20 kDa 蛋白質の存在を確認した。また、この結合蛋白質は PS2 pre-mRNA 中に存在する特徴的な配列に特異的に結合していることも明らかとなった。この結合蛋白質をその結合活性を指標に単離精製を行い、ペ