

プロテアーゼと糖鎖構造物質の脳病変への関与とそれらの法医病理診断への応用

著者	西 克治, 大久保 岩男, 種子島 章男, 山本 好男, 牛山 郁子, 高瀬 泉
発行年	2007-06
その他の言語のタイトル	Some enzymes in the cerebrospinal fluid and glyco-conjugates may be useful to diagnose brain disorder
URL	http://hdl.handle.net/10422/6417

プロテアーゼと糖鎖構造物質の脳病変への
関与とそれらの法医病理診断への応用

研究課題番号 15390212

平成15年度～平成18年度
科学研究費補助金 基盤研究(B)
研究成果報告書

滋賀医科大学附属図書館



2006014478

平成19年 6 月

研究代表者 西 克治

国立大学法人滋賀医科大学医学部教授

目次

はしがき	2
研究組織	3
研究経費	4
研究成果概要	5
研究発表	6
研究成果概要	8
研究成果	11

はしがき

本研究では、脳疾患として臨床的に診断されている症例の病理学的変化を明らかにするのではなく、法医解剖時に遭遇する、詳細不明の症例に対する法医病理学的な解決方法を模索することを目的としている。すなわち、死後脳での法医病理学的診断方法を開発しようとするものである。目的解決手段として、人脳組織から漏出物質が含まれ、人脳機能に関連する物質を産生するとされている脈絡叢からの漏出物質が含まれ、解剖検査時の開頭検査に伴い体外に流出し、廃棄の対象となっている脳脊髄液を研究素材とした。脳脊髄液に含まれている物質を精製・単離し、アミノ酸組成と遺伝子配列を決定すると共に、それらの物質に対する抗体を作成し、得られた抗体を用いた免疫組織化学的方法により、それらの物質の脳での局在を知り、物質の脳機能との関連、脳疾患との関連を検討した。また、市販の糖鎖関連レクチンや抗体を用い、脳の機能発達と複合糖鎖の関連、糖鎖と脳疾患との関連も検討した。脳疾患の検討を進めるため、他の臓器等にも含まれる蛋白分解酵素の精製と性状解析も行った。

研究組織

研究代表者:西 克治(滋賀医科大学医学部教授)

研究分担者:大久保岩男(滋賀医科大学医学部教授)

研究分担者:高津光洋(東京慈恵会医科大学医学部教授)

研究分担者:池本桂子(国立南花巻病院医師・

現福島県立医科大学助教授)

研究分担者:種子島章男(滋賀医科大学医学部助教授)

研究分担者:山本好男(滋賀医科大学医学部講師)

研究分担者:牛山郁子(滋賀医科大学医学部助手)

研究分担者:高瀬泉(滋賀医科大学医学部助手)

研究協力者 中川季子

高群(山本)愛子

山崎滋、

森元聡

小林晶)

研究費

平成 15 年度	4,100 千円
平成 16 年度	3,200 千円
平成 17 年度	3,800 千円
平成 18 年度	3,800 千円

研究成果概要

研究発表

1. A.K. Kobayashi, A. Takamure, I.Takase, C.Uemura, T.Nakagawa, Y.Yamamoto, S.Yamasaki, A.Morimoto, K.Ikemoto, S.Rand, H.Spalthoff, B. Annuss, K.Nishi.
Expression of prostaglandin D2 synthase in human cerebellum and medulla oblongata. - An immunohistochemical examination.-. Published 2006.
<http://www.thorax.us/forensic-medicine.html>
2. A.K.Kobayashi, I.Takase, A.Takamure, Y.Yamamoto, I.Ohkubo, K.Nishi. Co-expression of COX-2 and L-PGDS in Brain. Proceeding of XX Congress of International Academy of Legal Medicine, Budapest,Hungary,August 23-26,29006. MEDIMOND S.r.l, G823C0221
3. A.K.Kobayashi, I.Takase,T.Kitamura, A.Takomure, T.Nakagawa, M.Ohyagi, A.Morimoto, S.Yamasaki, Y.Yamamoto, I.Ohkubo, K.Nishi. Immunohistochemical characteristics of necrotic area in the old-infarction area of human brain by using of antibodies against Cystatin C, Vathepsin B, Puromycin sensitive alanyl aminopeptidase and Prostaglandin D2 synthase – A preliminary examination.Published in 2007.
http://www.geradts.com/nil/ij/vol-008_no_001/papers/paper001.html
4. K.Nishi, A.Tanegashima, Y.Yamamoto, I.Ushiyama, K.Ikemoto, S.Yamasaki, A.Nishimura, S.Rand, B.Brinkmann. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. Legal Med. 5, 117-131,2003.
5. T.Chiba, Y-H Li, T.Yamane, O. Ogikubo, M.Fukuoka, R.Arai, S.Takahashi, T.Ohtsuka, I.Ohkubo, N.Matsui. inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptidase. Peptides. 24,773-778, 2003.

6. K.Ikemoto, A.Nishimura, T.Oda, I.Nagatsu, K.Nishi., Number of striatal D-neurons is reduced in autopsy brains of schizophrenics. *Legal Med.* 5,S221-S224, 2003.
7. K.Nishi, A.Tanegashima, Y.Yamamoto, I.Ushiyama, S.Yamasaki, Y.Nishikawa, I.Ohkubo., Histochemical characteristics of perivascular space in the brain with an advanced edema. *Legal Med.* 5, S280-S284, 2003.
8. P.Minnasch, Y.Yamamoto, I.Ohkubo, K.Nishi., Demonstration of puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase in Alzheimer disease brain. *Legal Med.* 5, S285-S287,2003.
9. A.Nishimura, K.Kurokawa, K.Ikemoto, Y.Yamamoto, S.Rand, B.Brinkmann,K.Nishi, S.Fujiwara. Ultrastructural characteristics of the carbohydrate deposits detected in the molecular layer of the dentate gyrus in the hippocampal formation of patients with schizophrenia. *Acta Crim., Japon.*, 70, 11-15, 2004.
10. K.Nishi, S.Rand, T.Nakagawa, A.Yamamoto, S.Yamasaki, Y.Yamamoto, Akobayashi, M.Kane, A.Morimoto, H.Spalthoff, B.Annuss, ABO Blood typing from Forensic Materials. – Merits and demerits of detection methods utilized in our laboratories, and biological significance of the antigens. Published in 2005.
http://www.gerads.com/anil/ij/vol_006_no002/papers/paper001.html
11. K.Takeuchi, H.Araki, T.Sakaue, Y.Yamamoto, M.Fujiwara, K.Nishi, I.Ohkubo., Porcine germinal angiotensin I-converting enzyme:Isolation, characterization and molecular cloning., *Comparative Biochemistry and Physiology.* 146,215-226,2007.
12. Y.Morita, H.Araki, T.Sugimoto, K.Takeuchi, T.Yamane, T.Maeda, Y.Yamamoto, K.Nishi, M.Asano, K.Shirahama-Noda, M.Nishimura, T.Uzu, I.Hara-Nishimura, D.Koya, A.Kashiwagi, I.Ohkubo., Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. *FEBS Letters.*, 581,

13. ヒト脳脊髄液からの Cystatin C の精製と免疫組織化学に関する研究。中南智佳、山本好男。
2003 年印刷
14. 池本桂子、上野照子、石橋一寿、永津郁子、西村明儒、西克治、小野武年、西条寿夫、渋谷治男、胎生期ストレスがカテコールアミン(CA)ニューロンの発達に与える影響:形態的アプローチ。脳と精神の医学。4, 323-330, 2003.
15. 間藤光一、鈴木満、池本桂子、西克治。ヒト死後脳における大脳白質グリア細胞構築——基本構造としての interfascicular glial rows と perivascular glial rows——。脳と精神の医学。15, 95-104, 2004.

研究成果概要

A. 精製物質、抗体作成と局在・機能検討

1. 精製と抗体作成

脳脊髄液中に存在している物質で比較的多量検出されるものを精製し、生化学的性質を検討すると共に精製物質を抗原として家兎に免役し、各々に対する抗体を作成した。今回の検討では、prostaglandin D2 synthase(β trace), Cystatin C(γ trace)と phosphatidylethanolamine binding protein(h-3)が精製され、抗体の作成に成功した。精製方法と抗体作成に関し、Cystatin C(γ trace)の場合を別項に記載する。その他、puromycin-sensitive-alanyl-aminopeptidase の存在も明らかとし、肝臓組織から抽出したもので抗体を作成した。Dipeptidyl peptidase IIIを精製、抗体を作成し、ラット脊椎での分布を検討し、また、Legumain として知られる asparaginyl endopeptidase を精製死、抗体を作成、マウス腎臓での機能を検索し、人と臓器形態が極めて類似しているブタ精漿から angiotensin I 変換酵素を単離、抗体を作成した。いずれも今後の人での検討の基礎資料となると期待される。

2. 局在と機能・法医病理診断への応用

睡眠調節物質(早石修ら)とされている prostaglandin D2 synthase(β trace)は早石らの報告にある脈絡叢細胞以外にも、小脳プルキンエ細胞、小脳歯状核細胞及び延髄諸核の神経細胞においても発現されていることが明らかとなった。prostaglandin D2 synthase(β trace)は生合成過程の上流にある COX-2(市販抗体を使用)と共存しているところから、これらの部での存在は確実なものと推察され、小脳・延髄神経回路をつかさどる部位での局在は、prostaglandin D2 が睡眠中の姿勢制御等に機能を発揮していることを示唆している。また、乳児解剖事例では、プルキンエ細胞での発現が顕著ではないところから、乳幼児突然死症候群診断の一助となる可能性を有している。乳幼児突然死症候群での関連を今後とも検討を継続したい。

prostaglandin D2 synthase 抗体染色は、脳出血部周辺に、出血早期から prostaglandin D2 synthase が発現されていることを示し、Cystatin C 抗体での反応性は見られず、比較的新しい脳

挫傷部の法医病理学的診断や脳挫傷部位の特定に prostaglandin D2 synthase 抗体が有用であることを示唆する結果が得られた。症例数を増し、研究継続を行いたい。

Cystatin C (γ trace) 抗体は、小脳及び大脳の古い脳梗塞部位を特異的に染め出し得た。市販の Cathepsin B 抗体の染色と協同することにより、梗塞部位と正常部位との境界が明らかにできることを示唆する結果が得られた。prostaglandin D2 synthase と Cystatin C は相反する動きを呈するようであり、今後、症例をまして検索を継続したい。

phosphatidylethanolamine binding protein に関しては、今回の検討では、現時点で、明確な有用性を見出せてはいない。今後の検討において、法医病理学的意義を見いだしたい。

puromycin-sensitive-alanyl-aminopeptidase 抗体は、アルツハイマー患者脳の老人斑部分に染色性を示し、老人斑部での蛋白分解酵素の役割分担の存在を示唆した。puromycin-sensitive-alanyl-aminopeptidase は死後経過と共に脳組織や脈絡叢細胞から逸脱し脳脊髄液中に蓄積されることも明かとなり、死後12時間〜72 時間の間で、焼死や溺死以外の死体で、春期と秋期では蓄積量と時間経過に相関性が見られることも明らかとなった。さらに、心筋梗塞時に心筋細胞から逸脱するトロポニン分子が血流に乗り、脳脊髄液中に漏出してこることも見いだされ、心筋梗塞発症後4乃至5時間生存し、死亡した例では脳脊髄液中のトロポニンを生前の心筋梗塞検出キットで検出すれば、解剖検査ができない状況、例えば、検死・検案を委ねられる警察医も診断が可能となり、警察医による検案制度の向上が計られると期待される。

B. 糖鎖構造物質と脳機能・脳疾患

糖鎖構造物質に関しては、市販の血液型抗体や糖特異的レクチンを用い検索した。ABO 式血液型抗体と脳の反応性は、脳下垂体前葉と中葉部を除き、脳実質には見られなかった。血管内皮細胞部分に ABO 式血液型抗原が検出されたが、他臓器の血管内皮細胞と抗原発現様式が相違しているように思われた。巷間、血液型と性格に関して種々いわれているが、偽科学であることが確認された。

ABO 式血液型抗原は、ほ乳類の分泌細胞にも見られ、日本猿、イヌ、ネコ、ラット、家兎の味蕾細胞に発現されていることが確かめられた。化学受容器であり、神経細胞終末部である味蕾細胞での ABO 式抗原の種を超えた発現は、これらの抗原に未だ知られていない生命現象との関わりを示していると思われる。

一方、ABO 式血液型類似抗原である Lewis x 抗原は、新生児期から老年期の脳、小脳に著しく多量発現されていた。時に小脳顆粒細胞層には顕著であった。新生児期の脳ではこの抗原は、脳神経細胞の細胞膜部分に明瞭に発現され、生後数ヶ月で、この部の発現は見られなくなり、ほぼ同時期から、アストロサイトに発現が顕著となる。加齢と共にアストロサイトからミクログリア細胞にも発現をしめし、高齢者や認知症患者脳では、ミクログリアでの抗原発現が顕著であった。この抗原は、延髄部分の諸核神経細胞での発現は見られなかった。この抗原は、大脳や小脳の発達と分化に密接に関連していると思われる。また、生後、3 乃至 4 ヶ月ころに神経細胞での発現が見られなくなることは、このころに多発する乳幼児の突然死との関連も窺われる。

統合失調症患者や認知症患者脳の海馬顆粒細胞層の分子層部分にレクチンや抗コンドロイチン硫酸抗体に陽性を示す球形の沈着物が光学顕微鏡レベル、電子顕微鏡レベル共に見いだされ、脳神経細胞の分化過程における糖代謝の異状(糖の転移・輸送、分解・輸送などの異状)がこの沈着物質を生み出していることが示唆された。沈着物が存在すると、その部位でのシナプス機能に少なからず影響を与えると思われる。この部位でのコンドロイチン硫酸合成が統合失調症で過剰になっているとの外国研究者の報告も見られ、統合失調症の死後脳での診断の可能性が示された。