



# Brain-specific carboxypeptidase b : selective down-regulation in ependymal cell by irradiation and altered $\beta$ -amyloid processing

河邊, 哲也

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2819

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002819>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 105 】

氏 名 ・(本 籍)            河 邊   哲 也                            (和歌山県 )

博士の専攻分野の名称    博士 (医学)

学 位 記 番 号            博い第1500号

学位授与の 要 件        学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付        平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

BRAIN-SPECIFIC CARBOXYPEPTIDASE B:SELECTIVE DOWN-

REGULATION IN EPENDYMAL CELL BY IRRADIATION AND

ALTERED  $\beta$ -AMYLOID PROCESSING

(脳特異的カルボキシペプチダーゼ B: 上室細胞における X 線照射後の  
選択的 DOWN-REGULATION と  $\beta$ -アミロイドプロセッシングの変化)

審 査 委 員

主 査    教 授    杉 村   和 朗

          教 授    黒 田   嘉 和

          教 授    前 田   盛

## 目 的

上衣細胞は特定のニューロンとグリヤの幹細胞であることが最近明らかにされた。上衣細胞は、外部刺激または環境に反応して増殖し、ニューロン及びグリヤに分化する。ヒト脳カルボキシペプチダーゼ B (HBCPB) は、一群のニューロン細胞質と上衣細胞で発現する脳プロテアーゼであり、その C-末端に C14-モジュールと呼ばれる特異的ペプチドを持つ。In vitro で  $\beta$ -アミロイド前駆物質蛋白 (APP) を切断し、APP の  $\beta$ -アミロイド (A $\beta$ ) 含有 C-末端フラグメントを形成する。上衣細胞における HBCPB の作用を検討することはニューロンの分化増殖を解明する上で重要な研究課題と考えられた。またマウス脳においては HBCPB-ホモログ蛋白が、抗 C14 モジュール抗体を使用した免疫組織化学で検出された。このことにより抗 C14 モジュール抗体を用いて HBCPB ホモログ蛋白のマウス脳での発現を検討することが可能となり、今回外的ストレス（電離放射線）への HBCPB ホモログ蛋白の反応について解析を行った。

## 対象および方法

マウス頭部に 10Gy の電離放射線を照射し、照射後 1、2、4、6、8 時間、1、2、5 及び 9 日に断頭の上、脳を摘出し、以下の検討における検体として使用した。マウス脳室上衣領域のアポトーシスは TUNEL 法により共焦点レーザー顕微鏡を用いて視覚化した。TUNEL 陽性核を示している細胞の百分率を apoptotic index とした。同時にマウス脳室上衣細胞近傍領域で HBCPB 特異的エピトープを検出する対 C14 モジュール抗体を一次抗体とし、ローダミン標識の二次的抗体を使用し免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡でこれらの経時的変化

を観察した。さらに、ウェスタンブロット法、抗 C14 モジュール抗体、抗 APPCT (C 端認識) 抗体を用いて、マウス脳におけるその活性の経時的変化を解析した。

## 結果

マウス脳の HBCPB-ホモログ蛋白の分布を、抗 C14 モジュール抗体を用い、免疫蛍光共焦点レーザー顕微鏡検査にて分析した。抗 C14 免疫活性は、一群のニューロンの細胞質（例えば海馬錐体細胞、梨状皮質ニューロン、及び上衣細胞下領域ニューロン）で検出されるが、海馬の顆粒層状ニューロンでは検出されない。グリヤに関しては、脳室系の上衣細胞が広範に免疫活性を示した。しかしミクログリヤ及びアストロサイトは、この免疫活性を示さなかった。

また、共焦点レーザー顕微鏡を使用し、抗 C14 モジュール抗体（赤）、TUNEL 測定法（緑）、及びマージ像（黄色）から分析した結果、照射後上衣細胞の C14 免疫活性は一時的に減少した。すなわち照射後の 4 時間後には上衣細胞の免疫反応性は低く、照射後 12 時間では初期の状態に戻った。一方、ニューロンの C14 免疫活性は 24 時間ほとんど一定だった。観察した照射後の 24 時間では、C14 免疫活性を持ちかつ TUNEL 陽性の細胞は、ほとんど検出されなかった。しかし、上衣細胞下に認められるアポトーシス細胞は照射後に増加した。Apoptotic index（上衣細胞下の TUNEL 陽性アポトーシス細胞の比率として示される）は、照射後 4-8 時間でピークとなることを示している。図からの推定では、index は照射後 6 時間でほぼ 25%であり、そして照射後 24 時間で初期値にもどっている。

マウス前脳部ホモジェネート蛋白のウェスタンブロットによる経時的分析で

は、C14 免疫活性による 28kDa バンド（マウス脳 CPB の成熟型に相当）は、照射直後は一時的に初期値のおよそ半分まで減少しているが、その後数時間のうちに急に増強している。APPC T 免疫活性による 12kDa の APPC 端側フラグメントは、照射後 6-8 時間で最大となり 24 時間で初期値に戻った。

## 結語

上衣細胞がニューロンの幹細胞であり、上衣下の領域から神経膠細胞に分化するものの細胞として神経分化の意味で重要である。また、上衣細胞は放射線感受性が高いことも知られており、放射線による脳障害の原因として上衣細胞は大きな意義があると考えられる。その上衣細胞の放射線感受性について検討を行うために今回 HBCPB-ホモログ蛋白を用いて実験を行った。

マウス脳 CPB ホモログは脳内の一部のニューロンおよび上衣細胞にのみ存在していたが、放射線照射後のマウス脳 CPB ホモログ発現はニューロンと上衣細胞では異なった反応を示していた。X 線照射後マウス脳 CPB ホモログの発現量が上衣細胞でのみ一時的減少を認めたが、ニューロンでの発現量は変わらなかった。したがって、ウエスタンブロットで認められる免疫活性減少は上衣細胞での発現減少を反映していると推定される。この細胞選択的 down-regulation の生理的重要性は未解明であるが、抗 C14 モジュール抗体によって検出されるマウス脳 CPB ホモログは、上衣細胞の増殖及び分化のマーカー蛋白としての候補といえる。経時的に上衣細胞下領域におけるプロテアーゼ発現及び apoptotic index の変化を解析すると、プロテアーゼ発現調節は apoptotic index のピークの 2-3 時間前である。この時間のずれは、マウス脳 CPB ホモログが上衣細胞においてア

ポトーシスの制御に関わっている可能性を示唆する。即ち、放射線によって誘発された APP プロセッシングの変化、上衣細胞に特異的な発現変化、および放射線誘導アポトーシスとの関連は、中枢神経系の重要な生理的機能との関連を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1485号	氏名	河邊哲也
論文題目	BRAIN-SPECIFIC CARBOXYPEPTIDASE B: SELECTIVE DOWN-REGULATION IN EPENDYMAL CELL BY IRRADIATION AND ALTERED $\beta$ -AMYLOID PROCESSING 脳特異的カルボキシペプチダーゼ B: 上衣細胞における X 線照射後の選択的 DOWN-REGULATION と $\beta$ -アミロイドプロセッシングの変化		
審査委員	主 査 杉村和朗 副 査 黒田嘉和 副 査 前田 盛		
審査終了日	平成 15 年 2 月 20 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】 上衣細胞は特定のニューロンとグリアの幹細胞であることが最近明らかにされた。上衣細胞は、外部刺激または環境に反応して増殖し、ニューロン及びグリアに分化する。ヒト脳カルボキシペプチダーゼ B (HBCPB) は、一群のニューロンと上衣細胞で発現する脳プロテアーゼであり、その C-末端に C14-モジュールと呼ばれる特異的ペプチドを持つ。In vitro で  $\beta$ -アミロイド前駆物質蛋白 (APP) を切断し、APP の  $\beta$ -アミロイド (A $\beta$ ) 含有 C-末端フラグメントを形成する。上衣細胞における HBCPB の作用を検討することはニューロンの分化増殖を解明する上で重要な研究課題と考えられた。またマウス脳において HBCPB-ホモログ蛋白が、抗 C14 モジュール抗体を使用した免疫組織化学で検出された。今回、抗 C14 モジュール抗体を用いて放射線照射後の HBCPB ホモログ蛋白のマウス脳での発現を検討した。

【方法】 マウス頭部に 10Gy の電離放射線を照射し、脳を摘出し検体として使用した。マウス脳室上衣領域のアポトーシスを、TUNEL 法を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また TUNEL 陽性細胞の百分率を apoptotic index とした。同時にマウス脳室上衣細胞近傍領域で抗 C14 モジュール抗体を一次抗体とし免疫蛍光染色を行い、これらの経時的変化を観察した。さらに、ウェスタンブロット法にて、抗 C14 モジュール抗体、抗 APPCT (C 端認識) 抗体を用いて、マウス脳におけるその活性の経時的変化を解析した。

【結果】 マウス脳の HBCPB-ホモログ蛋白の分布を分析したところ、抗 C14 免疫活性是一群のニューロンの細胞質および脳室系の上衣細胞で検出された。また、放射線照射後に上衣細胞の C14 免疫活性は一時的に減少した。すなわち照射 4 時間後には上衣細胞の免疫反応性は低く、照射 12 時間後では初期の状態に戻った。一方、ニューロンの C14 免疫活性は、ほとんど一定だった。そして上衣細胞下のアポトーシス細胞は照射後に増加した。Apoptotic index は、照射後 4-8 時間でピークとなり、そして照射後 24 時間で初期値にもどる。

マウス前脳部ホモジェネート蛋白のウェスタンブロットによる経時的分析では、C14 免疫活性による 28kDa バンド (マウス脳 CPB の成熟型に相当) は、照射直後は一時的に初期値のおよそ半分まで減少しているが、その後数時間のうちに急に増強している。それに対応するように、APPCT 免疫活性による 12kDa の APPCT 端側フラグメントは、照射後 6-8 時間で最大となり 24 時間で初期値に戻った。

【考察】 上衣細胞はニューロンの幹細胞であり、上衣下領域から神経膠細胞に分化する細胞として神経分化の意味でも重要である。また上衣細胞は放射

線感受性が高いことも知られており、放射線による脳障害の原因として上衣細胞は大きな意義があると考えられる。その上衣細胞の放射線感受性について検討を行うために今回 HBCPB-ホモログ蛋白を用いて実験を行った。

マウス脳 CPB ホモログは脳内の一部のニューロンおよび上衣細胞にのみ存在していたが、放射線照射後のマウス脳 CPB ホモログ発現はニューロンと上衣細胞では異なった反応を示した。X 線照射後マウス脳 CPB ホモログの発現量が上衣細胞で一時的減少を認めたが、ニューロンでの発現量は変わらなかった。したがって、ウエスタンブロットで認められる免疫活性減少は上衣細胞での発現減少を反映していると推定される。この細胞選択的 down-regulation の生理的重要性は未解明であるが、抗 C14 モジュール抗体によって検出されるマウス脳 CPB ホモログは、上衣細胞の増殖及び分化のマーカー蛋白としての候補といえる。経時的に上衣細胞下領域におけるプロテアーゼ発現及び apoptotic index の変化を解析すると、プロテアーゼ発現調節は apoptotic index のピークの 2-3 時間前である。この時間のずれは、マウス脳 CPB ホモログが上衣細胞においてアポトーシスの制御に関わっている可能性を示唆する。

【結語】放射線によって誘発された APP プロセッシングの変化、上衣細胞に特異的な発現変化、および放射線誘導アポトーシスとの関連は、中枢神経系の重要な生理的機能との関連を示唆するものである。

本研究は、上衣細胞における X 線照射後の脳特異的カルボキシペプチダーゼ B の選択的 DOWN-REGULATION と  $\beta$ -アミロイドプロセッシングの変化の解明について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。