
原 著

アルツハイマー病脳における神経成長抑制
因子 (GIF) の発現についての研究

新潟大学脳研究所神経内科学部門 (主任: 宮武 正教授)

小林 央

Expression of Growth Inhibitory Factor (GIF)
Gene in Alzheimer's Disease Brain

Hisashi KOBAYASHI

*Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University, Niigata*

(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)

Alzheimer's disease (AD) brain extracts have been found to contain increased neurotrophic activities, which is considered to be related to massive sprouting of cortical neurons in AD brain. The apparently increased neurotrophic activities in AD brain has been shown to be a result of loss of growth inhibitory factor (GIF), which is present in normal adult brain.

In order to study the altered gene expressions of the GIF in AD brains, a fundamental step is to isolate intact messenger RNAs (mRNAs) from postmortem human brains. We studied stabilities of mRNAs in postmortem human brain and showed intact mRNAs expressed in neurons, astrocytes, or oligodendrocytes can be isolated from postmortem brains for up to 12 hours after death.

In AD brains which were pathologically confirmed, the expression of the GIF mRNA was investigated by Northern blotting. AD brains, especially with numerous neurofibrillary tangles, showed dramatically decreased expression of the GIF, which suggests that GIF plays an important role in the pathogenesis of AD.

Key words: Alzheimer's disease, post mortem (brain) Growth inhibitory factor,
RNA

アルツハイマー病, 剖検脳, 成長抑制因子, RNA

Reprints requests to: Hisashi KOBAYASHI,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University, Asahimachi-
dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通 1-757
新潟大学脳研究所神経内科

小林 央

緒 言

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) あるいはアルツハイマー型老年痴呆 (senile dementia of Alzheimer type; SDAT) は、初老期から老年期にかけて痴呆をきたす原因不明の変性疾患である。臨床像や臨床経過から65歳以下で発症するものを AD, 65歳以上のものを SDAT として区別する場合があるが、病理学的に差異が認められないために、同じ疾患単位として扱うことが多い¹⁾。本研究でも、AD と SDAT をあわせて AD と総称することにする。

AD の病理所見の特徴として肉眼的には大脳の萎縮、とくに側頭葉、前頭葉の萎縮があげられる。顕微鏡下には、ニューロンの変性脱落に加えて、アルツハイマー神経原繊維変化 (Neurofibrillary tangle; NFT) と老人斑 (senile plaque; SP) の出現を特徴とする¹⁾。NFT は他の疾患、即ち進行性核上性麻痺 (PSP), パーキンソンニズム痴呆症候群などにおいてもみられるのに対して、老人斑は AD に特異的であるとされる。

NFT の構成単位は paired helical filaments (PHF) からなり²⁾、さらに PHF 内にはリン酸化された異常な tau 蛋白が存在することが明らかにされている³⁾。tau 蛋白に対する抗体を用いて AD 脳の免疫組織染色を行うと、curly fiber と呼ばれる異常な構造物も認められ、これは神経細胞体や樹状突起からの発芽 (sprouting) であると捉えられている⁴⁾。

AD 脳でニューロンの変性脱落がおこる一つの仮説として Appel の神経栄養因子仮説がある⁵⁾。これは中隔野やマイネルト基底核のコリン作動性ニューロンは標的組織である海馬や新皮質でつくられる神経栄養因子によってその生存維持が支えられており、AD ではこの神経栄養因子の合成がうまくいかなくなることによって、ニューロンの変性脱落が起きるとするものである。しかしこれを証明する実験的根拠はなく、この神経栄養因子も見つかっていない。

近年、内田らは幼若ラットの皮質神経の初代培養細胞に、AD 脳と正常対照脳の抽出液を加えると、AD 脳のほうがラット大脳皮質ニューロンの生存を促進し、細胞体から出る突起の数を増やすことを見だし、見かけ上、AD 脳の神経栄養因子活性が高いことを示した。しかもそれが神経栄養因子の増加によるものではなく、神経栄養因子を抑える抑制因子、すなわち成長抑制因子 (growth inhibitory factor; GIF) が低下しているために起きていることを明らかにした⁶⁾⁷⁾。そして AD 脳

では、GIF が低下しているために、神経栄養因子の作用がコントロールされなくなり、異常な神経細胞の sprouting が引き起こされ、その結果、NFT や curly fiber などの異常構造物が蓄積し、ニューロンの疲弊、死を早めてしまうのではないかと推論している⁸⁾。さらに内田らは GIF を単離しそのアミノ酸配列を決めている⁹⁾。

一方、剖検脳を用いて遺伝子の発現を検討するためには、症例により死後剖検までの時間が異なるために、RNA の安定性がきわめて重大な問題となる。

そこで本研究では、最初に剖検脳における RNA の安定性について検討し、そのうえで、臨床及び病理学的に AD と診断できた症例の剖検脳を用いて、ヒト GIF について mRNA のレベルでの発現状態について解析した。

研究材料及び方法

I. 剖検脳における RNA の安定性についての検討

1) 剖検脳

症例は76歳の女性で、臨床診断は歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) であり、肺炎で死亡し、死後5時間後に摘出された脳の前頭葉の皮質と白質部分を使用した。剖検脳における RNA の安定性を調べるために、前頭葉を、1) そのまま液体窒素で急速凍結したもの、室温にてさらに 2) 2時間、3) 4時間、または 4) 7時間放置し、その後同様に急速凍結したものに分けた。

2) RNA の抽出

組織を液体窒素中にて細かく砕いた後、Chirgwin らの RNA 抽出法¹⁰⁾を用いて、Total RNA を抽出し、oligo dT cellulose column chromatography により poly(A)⁺ RNA を精製した¹¹⁾。RNA 量を波長 260 nm で吸光度を測定し、吸光度1単位を RNA 40 μg/ml として計算した。

3) ノーザンプロットハイブリダイゼーション

poly(A)⁺ RNA (5 μg) を 2.2 M の formaldehyde を含む 1.2% のアガロースゲルで電気泳動後¹²⁾、RNA をニトロセルロース膜に移し¹³⁾、³²P でラベルした cDNA プローブ¹⁴⁾ で、50%ホルマリン存在下、42°C でハイブリダイゼーションを18時間行った¹⁵⁾。最終的にニトロセルロース膜を 0.1×SSC (1×SSC=0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate (pH 7.0), 0.1% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム) で60°C, 20分間洗い、-70°C でオートラジオグラフィした。

4) cDNA プローブ

全ての細胞に共通に発現している遺伝子として β -actin¹⁶⁾ を、また neuron, astrocyte, oligodendrocyte にそれぞれ特異的な遺伝子として、それぞれ rat neuron-specific enolase (NSE)¹⁷⁾, rat S-100¹⁸⁾, mouse myelin associated glycoprotein (MAG)¹⁹⁾ の cDNA プローブを使用した。

II. ヒト剖検脳 cDNA ライブラリーの作製

1) cDNA ライブラリーの作製

ヒト剖検脳から良質の cDNA ライブラリーを作製するため、ノーザンプロットで明瞭なバンドを認めたヒト剖検脳の RNA を用いて、 λ -bacteriophage (λ -GEM2, Promega) をベクターとして、cDNA ライブラリーを作製した²⁰⁾。

剖検組織は、49歳女性で重症筋無力症の症例 (case A) と、58歳男性、神経疾患を持たない症例 (case B) の、いずれも死後5時間後の前頭葉の皮質及び白質を用いた。

ライブラリーの作製は oligo-dT に *Xba*I 切断部位をつけた primer adaptor を用いて、逆転写酵素により一本鎖 cDNA を合成し、RNaseH, DNA polymerase I, *E. coli* DNA ligase により二本鎖 cDNA を合成した²¹⁾。T4 DNA polymerase により両端を平滑末端とした後、T4 DNA ligase により *Eco*RI adaptor と結合し、続いて *Xba*I により切断した。ゲル濾過により、余剰の *Eco*RI adaptor を除き、できた二本鎖 cDNA と、*Eco*RI と *Xba*I で切断し脱燐酸化した λ GEM2 vector arm とを T4 DNA ligase により結合させ、*in vitro* packaging した後、*E. coli* LE 392 株を宿主としてライブラリーを作製した。

2) サザンプロットハイブリダイゼーションによる cDNA ライブラリーの評価

作製した cDNA ライブラリーが全長の cDNA を含むかどうかを調べるために、作製したそれぞれの cDNA ライブラリーの DNA を *Eco*RI と *Xba*I で切断し、cDNA 部分を切り出してアガロース電気泳動し、ニトロセルロース膜に transfer した後、 β -actin, NSE, S-100, MAG を cDNA プローブとしてサザンプロットハイブリダイゼーションを行った²²⁾。最終的にニトロセルロース膜を 0.1×SSC, 0.1% SDS で60℃, 20分間洗い、-70℃でオートラジオグラフィした。

III. アルツハイマー病症例

1) 症例1：H.H 86歳 女性

家族歴：家族内に痴呆を呈したものはない。

既往歴：67歳時に胃ガンの手術

現病歴：76歳頃より、計算が遅い、食事の支度ができなくなる、火の始末ができない、裸で外へ出るなどの症状が出現し、徐々に夜間不穏、徘徊がはげしくなり尿失禁も出現してきたため、81歳時三島病院へ入院した。入院時神経学的には意識は清明、高度の痴呆を認め、長谷川式痴呆スケールは0点、脳神経系に異常はなく、筋力の低下や深部反射の左右差、病的反射は認めない。協調運動と知覚は正常。尿、便失禁あり。脳波では diffuse に θ から δ の slow wave を認めた。頭部 CT では前頭葉、側頭葉の萎縮及び脳室拡大を認め、頭部 MRI では前頭葉及び側頭葉の萎縮、脳室拡大、脳室周囲の白質に T2 強調画像で高信号を認めた (Fig. 1)。以上より SDAT と診断され治療を受けていたが、痴呆は緩徐に進行性であり、86歳時肺炎により死亡した。

病理診断：SDAT

2) 症例2：S.F. 81歳 女性

家族歴：特記すべき事なし

既往歴：特記すべき事なし

現病歴：73歳頃より物忘れ、徘徊が出現、その後徐々に夜間徘徊、失禁、夜間譫妄が強くなり、75歳時、三島病院へ入院、神経学的には意識は清明、高度の痴呆を認め、長谷川式痴呆スケールは0点/32.5点、脳神経系は異常を認めず、深部反射は正常、病的反射は認めない。四肢に Gegenhalten を認め、四肢にミオクロスムスが時に出現する。78歳頃より、寝たきりの状態となり、自発言語もほとんどなくなった。頭部 CT では前頭葉、側頭葉に強い脳萎縮を認め、脳室の拡大を認めた (Fig. 1)。81歳時全身状態悪化し死亡した。

病理診断：SDAT

3) 症例3：G.I. 88歳 男性

家族歴：特記すべき事なし

既往歴：特記すべき事なし

現病歴：85歳頃より、物忘れが目だつようになり、過食傾向が出現、三島病院受診、神経学的には意識清明、痴呆を認め、長谷川式痴呆スケールは9.5/32.5点、比較的記憶力は保たれていた。脳神経系、四肢筋力、協調運動には異常を認めず、深部反射正常、病的反射は認めない。頭部 CT では前頭葉、側頭葉に強い脳萎縮を認め、頭部 MRI では前頭葉、側頭葉の高度な脳萎縮と脳室の拡大を認めた (Fig. 1)。88歳で肺炎にて死亡した。

病理診断：SDAT

4) 症例4：K.H. 89歳 女性

家族歴：特記すべき事なし

既往歴：特記すべき事なし

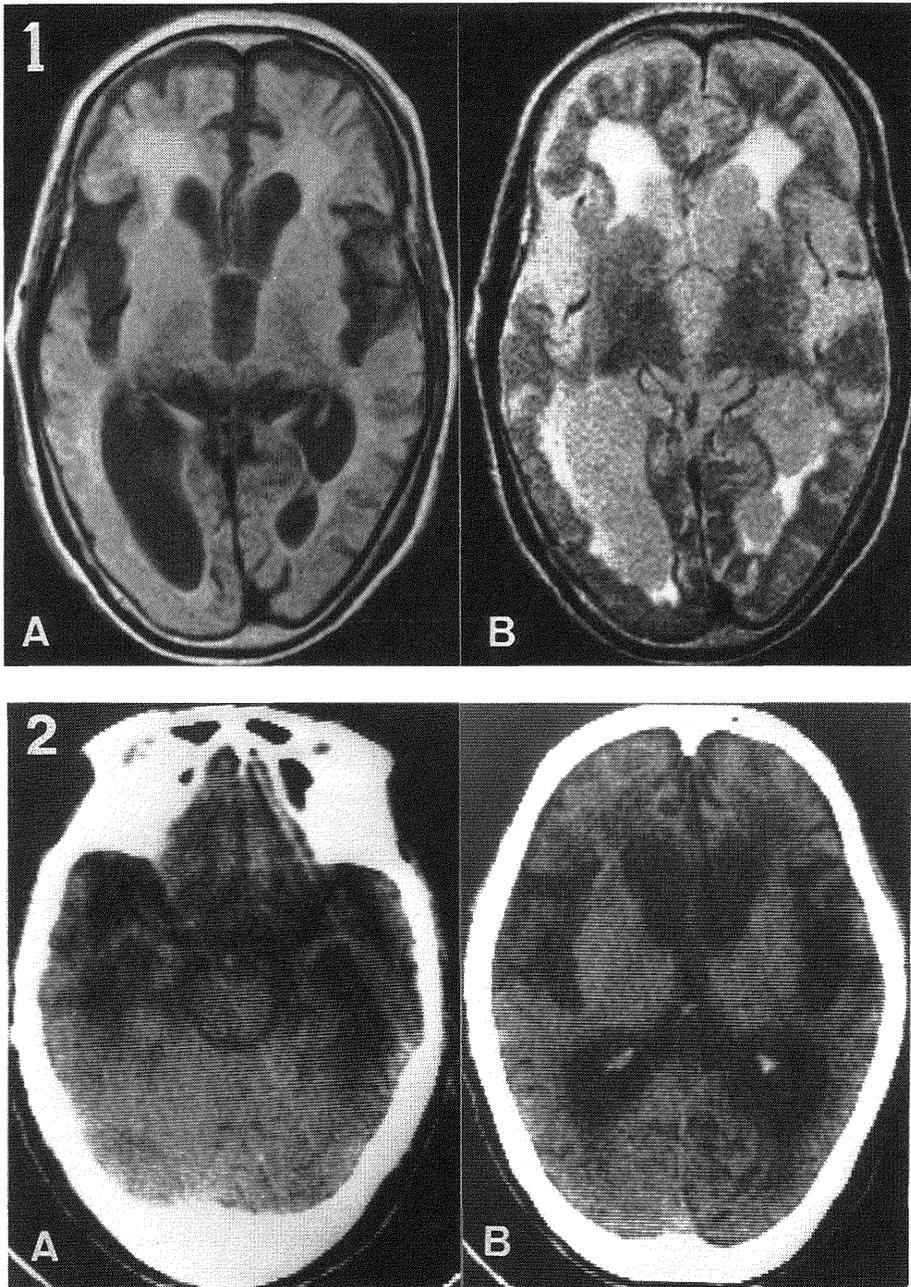


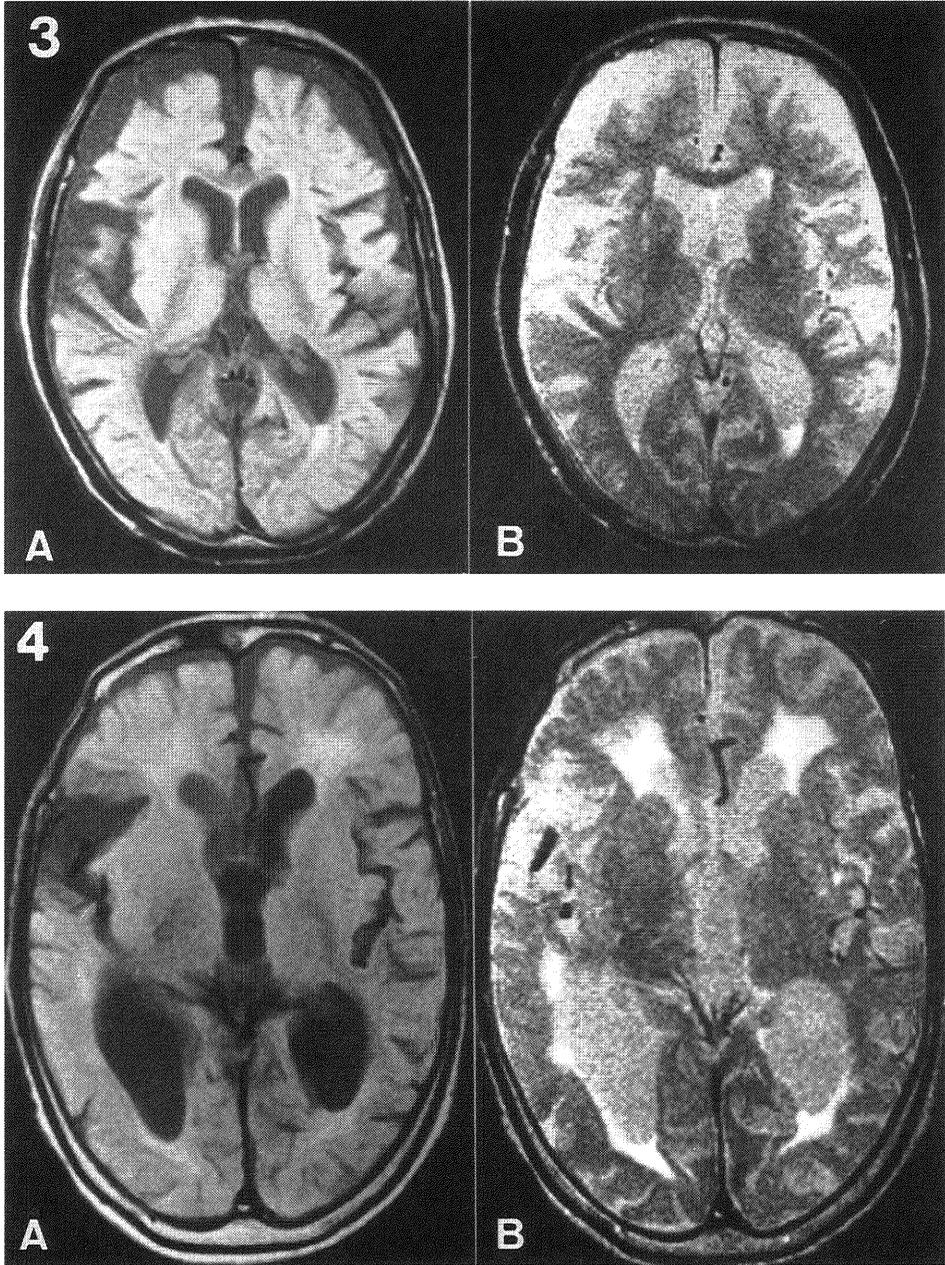
Fig. 1 Brain MRI and Brain CT

No. 1. Case 1. Brain MRI

A: Proton density image (TR 2000msec, TE 38msec)

B: T2-weighted image (TR 2000msec, TE 111msec)

No. 2. Case 2. Brain CT



No. 3. Case 3. Brain MRI

A: Proton density image (TR 2000msec, TE 38msec)

B: T2-weghted image (TR 2000msec, TE 111 msec)

No. 4. Case 4. Brain MRI

A: Proton density image (TR 2000msec, TE 38msec)

B: T2-weghted image (TR 2000msec, TE 111 msec)

現病歴：85歳頃より、物忘れが出現、86歳頃より尿失禁、妄想も加わり、しだいに走行障害もでてきた。同年三島病院入院、神経学的には意識は清明で、中等度の痴呆を認め長谷川式痴呆スケールは 14/32.5 点、脳神経系及び四肢筋力、表在知覚には異常を認めず、深部反射は正常、病的反射は認めない。頭部 CT では中等度の脳萎縮とともに脳白質のびまん性の low density area を認め、頭部 MRI では脳萎縮と大脳白質の high intensity area を認めた (Fig. 1)。その後も痴呆は徐々に進行し89歳時呼吸不全で死亡した。

病理診断：SDAT, multi-infarcts dementia.

5) 症例5：S.S. 83歳 女性

家族歴：特記すべき事なし

既往歴：特記すべき事なし

現病歴：81歳頃より、物忘れが出現、長谷川式痴呆スケールは 5/32.5 点、頭部 CT で前頭葉、側頭葉の脳萎縮を認める。

病理診断：SDAT

6) 症例6：C.I. 73歳 女性

家族歴：特記すべき事なし

既往歴：特記すべき事なし

現病歴：67歳頃より、物忘れが出現、長谷川式痴呆スケールは 12.5/32.5 点、頭部 CT で前頭葉、側頭葉の脳萎縮を認める。

病理診断：SDAT

IV. アルツハイマー病脳における GIF mRNA の発現について

1) 病理組織所見

各々の症例について、RNA 抽出をした部位と反対側の病理標本を使って、老人斑については抗 β 合成ペプチド抗体を用いてギ酸処理後 ABC 法により、NFT については抗ヒト tau 蛋白抗体を用いて ABC 法により、免疫組織染色を行い、老人斑及び NFT の出現頻度を (-) なし、(+) 軽度、(++) 中等度、(+++) 高度、に分けて評価した。

2) 剖検脳より RNA の抽出

症例1から6までのアルツハイマー病脳6例と対照脳3例を用いた。今回は、症例2では後頭葉の、他のAD5例及び対照脳では前頭葉の大脳皮質及び白質部分を検索に用いた。Total RNA の抽出は上記と同様に行った。

3) cDNA プロープ

β -Actin, human glial fibrillary acidic protein (GFAP) 及び作製したヒト脳 cDNA ライブラリーによりクローニングした human GIF の cDNA プロ

ープを用いた²³⁾。

GIF ではホモロジーのあるメタルチオネイン遺伝子²⁴⁾とのハイブリダイズを避けるためにヒト GIF cDNA の 3' 非翻訳領域を PCR 法²⁵⁾を用いて増幅し ³²P でラベルし cDNA プロープを作製した。

4) ノーザンプロットハイブリダイゼーション

上記の剖検脳より、total RNA を抽出し、total RNA 10 μ g を 0.66 M の formaldehyde を含む 1.5% のアガロースゲルに泳動し、ナイロン膜に移した後²⁶⁾、³²P でラベルした cDNA プロープと、7% PEG (ポリエチレングリコール)、10% SDS で65°Cで18時間ハイブリダイゼーションを行った²⁷⁾。最終的にナイロン膜を 0.1 \times SSC, 0.1% SDS で65°C, 30分間洗い、-70°C でオートラジオグラフィした。

また、それぞれのバンドの相対的放射線量を Fuji バイオイメージアナライザー BAS2000 で測定した²⁸⁾。

結 果

1) 剖検脳における RNA の安定性

Total RNA 及び Poly(A)⁺ RNA の量は死後12時間まででは死後時間によっておおきな変化は認められなかった (Table 1)。

ヒト剖検脳において、ノーザンプロットハイブリダイゼーションにより β -actin 及び neuron, astrocyte, oligodendrocyte にそれぞれ特異的な cDNA プロープで、少なくとも死後12時間まで β -actin (1.9 kb), NSE (2.3 kb), S-100 (0.5 kb), MAG (2.5 kb) の明瞭なバンドを認めた²⁹⁾ (Fig. 2)。

2) ヒト脳 cDNA ライブラリー

Table 1 Yields of total and poly(A)⁺ RNA from human brains.

Postmortem Delay after Death (hr)	Total RNA (μ g/g tissue)	Poly(A) ⁺ -RNA (μ g/g tissue)
5	142.9	9.3
7	190.1	8.5
9	163.7	11.0
12	153.2	8.7

Autopsied human brain tissues were stored at room temperature for 0, 2, 4 and 7 hrs (5, 7, 9 and 12 hrs after death) and rapidly frozen in liquid nitrogen. Total RNAs were extracted and poly(A)⁺ RNA was isolated by oligo-dT cellulose column chromatography. Total RNA and poly(A)⁺ RNA were quantitated by A260.

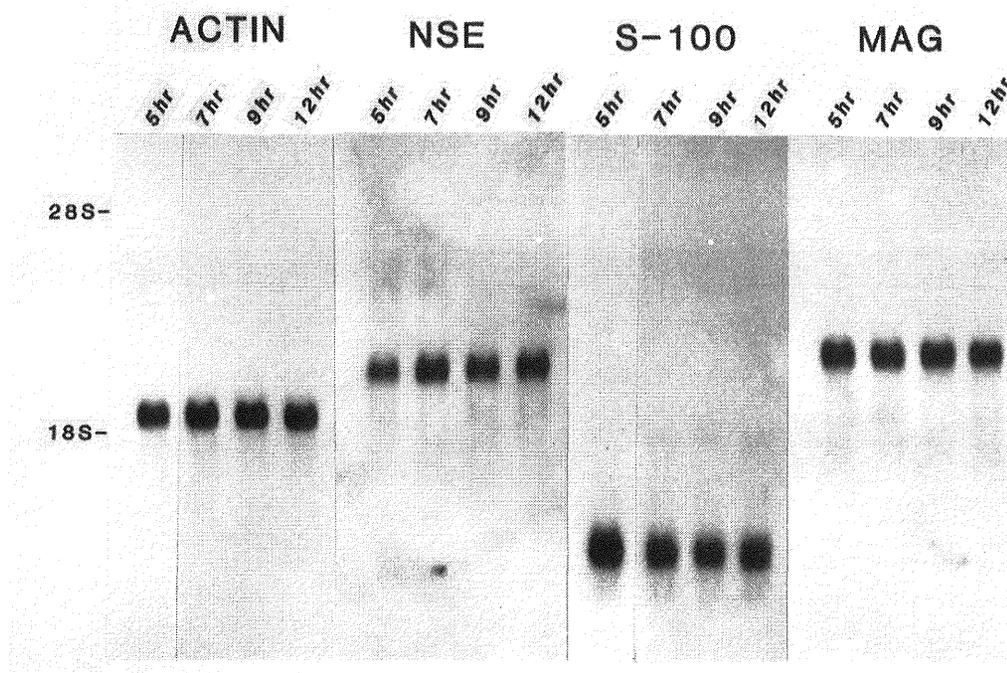


Fig. 2 Northern blot hybridization analysis of poly(A)⁺ RNA from a human brain

Poly(A)⁺ RNAs (5μg) were electrophoresed through 1.2% denaturing agarose gels, blotted onto nitrocellulose membranes and hybridized with ³²P-labeled β-actin, NSE, S-100 and MAG cDNA probes. The nitrocellulose membranes were washed finally with 0.1X SSC, 0.1% SDS at 60°C for 20min.

Table 2 Summary of β and tau deposition and expression of GIF in AD brains.

Case	age	sex	PMI	slice	β-plaque	NFT	GIF/actin
Controls							1.1*
AD1 No.4	89	F	4	F	+++	+	1.2
AD2 No.5	83	F	7	F	++	+	0.8
AD3 No.6	73	F	5	F	++	++	0.5
AD4 No.3	88	M	6	F	+	+	0.4
AD5 No.1	86	F	3	F	++	++	0.6
AD6 No.2	81	F	4	O	+++	+++	0.2

*: the mean value.

The numbers of β-plaque and NFT were rated by immunocytochemistry. Relative radioactivities of the GIF and β-actin bands were determined with Fuji Bioimage Analyser BAS2000. The abbreviations used are as follows:

AD: lane number in Northern blotting

Case: case number

Sex: F-female, M-male

PMI: post-mortem interval (hours)

Slice: F-frontal, O-occipital

β-plaque and NFT: (-); none, (+); mild, (++) moderate, (+++) severe.

GIF/actin: The ratio of the density of GIF band to that of β-actin band in Northern blotting.

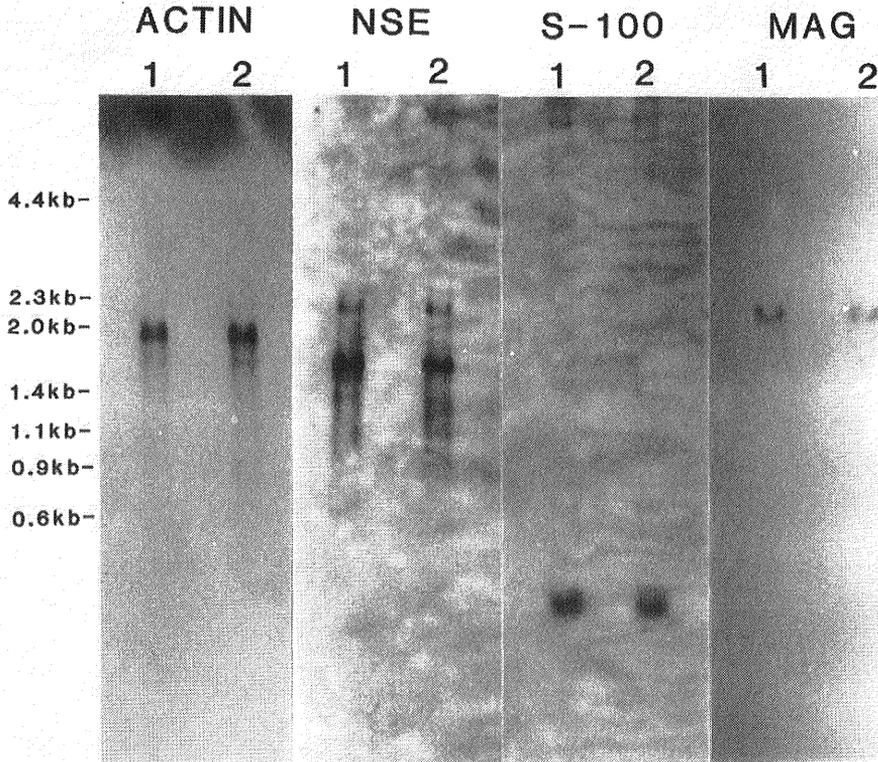


Fig. 3 Southern blot hybridization analysis of total cDNAs of the human brain cDNA libraries

Total DNAs (10 μ g) from two human brain cDNA libraries were digested with *Eco*RI and *Xba*I, separated through a 1% agarose gel, blotted onto a nitrocellulose membrane, and hybridized with ³²P-labeled β -actin, NSE, S-100 and MAG cDNA probes. The nitrocellulose membrane was washed finally with 0.1X SSC, 0.1% SDS at 60°C for 20 min.

lane 1; cDNA library constructed for case A brain.
lane 2; cDNA library constructed for case B brain.

二つの別々の brain より、5 μ g の poly(A)⁺ RNA から作製したライブラリーでは、そのうちの一例の complexity は 1.5 \times 10⁶ で、empty clones の割合は 0.15% であり、無作為に抽出した24個のクローンの平均 insert size は insert が tandem の形で入ったものなどを除くと 660 bp であった。もう一例の complexity は 2.8 \times 10⁶ で、平均 insert size は 443 bp であった。

サザンプロットハイブリダイゼーションにより二例のどちらのライブラリーにおいても、 β -actin (1.9 kb), NSE [2.3 kb; 1.8 kb のバンドは nonneuronal enolase (NNE) のクロスハイブリダイズによるもの], S-100

(0.3 kb; *Eco*RI 切断部位をもつため), MAG (2.5 kb) の明瞭なバンドを認め、作製したライブラリーは、どちらも全長の cDNA を含んだものと考えられた²⁹⁾ (Fig. 3).

3) AD 剖検脳の老人斑及び NFT の出現頻度

それぞれの症例の死後から剖検までの時間及び本研究で使用した部位の病理標本での老人斑 (β -plaque) と NFT の出現頻度を表にして示した (Table 2).

老人斑の出現頻度が多くとも NFT の出現頻度は少ない症例 (症例4) や老人斑も NFT も高度に出現している症例 (症例2) など、症例間で老人斑, NFT の

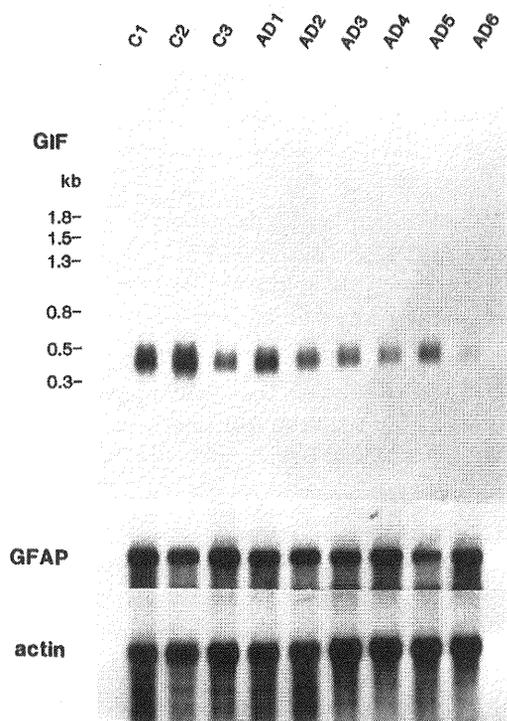


Fig. 4 Northern blot hybridization analysis of GIF mRNA in AD and normal brains

Total RNAs (10 μ g) were electrophoresed through 1.5% denaturing agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized with ³²P-labeled β -actin, GFAP and 3' non-coding region of GIF cDNA probes. The nylon membranes were washed finally finally with 0.1X SSC, 0.1% SDS at 65°C for 30 min.

C1, 2, 3: control brains.

AD: AD brains.

AD1: Case 4. AD2: Case 5. AD3: Case 6. AD4: Case 3. AD5: Case 1. AD6: Case 2.

出現に差が見られた。

4) AD 脳における GIF mRNA の発現について

ノーザンブロットハイブリダイゼーションで β actin をコントロールとして、対照脳に比べ、AD 脳においては、GFAP の発現量に大きな変化は見られなかった。対照脳に比べ、AD 脳では GIF の発現が低下していたが、同じ AD 脳においても、老人斑の出現が多くとも

NFT の出現の少ない症例では、GIF mRNA の発現量は対照脳と比して、軽度の低下であり、それに対して、NFT の出現量の多い症例では GIF mRNA の発現量は著しく低下していることが認められた (Fig. 4) (Table 2).

考 按

ヒト脳における遺伝子の発現状態の研究をするうえで、特に剖検脳を用いる場合は常に RNA の安定性が問題となる。一般に RNA は死後36時間まで安定であるとの報告があるが、それらの多くは二次元電気泳動、*in vitro* translation や、全細胞共通のプロープを用いたノーザンブロットによるものである³⁰⁾³¹⁾³²⁾。脳が種々の heterogeneity のある細胞を含む組織であるにもかかわらず、細胞毎の RNA の安定性の検討はなされていない。本研究では細胞に特異的な cDNA プロープを用いて、ノーザンブロットハイブリダイゼーションにより室温保存された剖検脳から少なくとも死後12時間以内であれば、neuron, astrocyte, oligodendrocyte いずれにおいても標準的な RNA 抽出法で intact な poly(A)⁺ RNA が抽出可能であることを示した。このことから、剖検脳を材料とした、遺伝子の発現状態の検討が可能であると考えられた。

また λ GEM2 ベクターを用いて、二例のヒト剖検脳より別々に cDNA ライブラリーを作製し、その作製したヒト脳 cDNA ライブラリーが全長の cDNA を多く含むことを示した。剖検脳から抽出した poly(A)⁺ RNA を用いて、比較的良好のヒト脳 cDNA ライブラリーを作製することができた。

次に臨床、病理学的に AD と診断した症例について、その脳における GIF の発現状態について検討した。GIF mRNA の発現は、対照脳に比べ AD 脳では低下していることが認められた。この結果は内田らが見いだした AD 脳における GIF 活性の低下が、mRNA のレベルでの低下に基づくものであることを示唆している。しかし、同じ AD 脳のなかにおいても、老人斑が多くとも NFT の出現の少ない症例では変化は少なく、老人斑の出現に加えて NFT の出現頻度の多い症例で、対照脳に比べより著しく発現が低下していたことは、内田らの神経栄養因子活性が、老人斑ではなく NFT や curly fiber の出現と相関する点⁷⁾と一致するものであり、GIF が AD の病態のうえで老人斑の出現よりは NFT の出現により強く関わっていることを示唆している。

また、現在、AD 脳におこってくる病理学的変化は

以下のように考えられている⁷⁾.

- 1) β 蛋白がび慢性に沈着してび慢性老人斑 (diffuse plaque) を形成する³³⁾. このときの老人斑にはまだグリヤ細胞や変性した神経突起は見られない.
- 2) β 蛋白の沈着からかなりの年月を経て, tau 蛋白が沈着して, 老人斑内の変性突起や NFT, curly fiber を形成する.

本研究の結果から考えて, おそらく GIF の発現異常は後者の病理過程に深く関わっているものと考えられる. このことは, AD において痴呆の程度が老人斑の出現頻度ではなく, NFT の出現頻度と関係するとする報告³⁴⁾³⁵⁾ と考え合わせ, GIF が AD の病態の進行に関わる可能性も考えられ興味深い.

今後多数の AD 脳について検討するとともに, S1 nuclease analysis などのより定量的な方法についても検討していきたいと考えている.

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました宮武正教授に心から感謝の意を表します. また直接御指導をいただいた辻省次助手に深く御礼申し上げます. 更に東京大学脳研究施設脳病理学部門井原康夫教授, 東京都老人総合研究所臨床病理学内田洋子先生, 癌研究所生化学部門中村祐輔先生, 新潟大学脳研究所神経内科学部門佐藤修三講師, 関耕二先生, 藤田信也先生, 諸橋イネ子嬢, 畠中喜美嬢, 神経薬理学部門 高橋康夫名誉教授, 崎村建司助教授, 実験神経病理学部門生田房弘教授, 武田茂樹助教授, 高橋均先生, 標本センター小柳清光助教授, 遺伝子実験施設 桑野良三助教授, 東京大学生化学教室濱田博司先生, 三島病院 田中政春院長, 佐渡総合病院神経内科本間義章先生らの諸兄に御指導, 御助言を賜りましたことを深謝いたします.

参 考 文 献

- 1) Tomlinson, B.E. and Corsellis, J.A.N.: Presenile and senile dementia of the Alzheimer type (Alzheimer's disease). In J.H. Adams, J.A.N. Corsellis. and L.W. Duchon (Eds.), Greenfield's Neuropathology, Arnold, London, pp. 971~980, 1984.
- 2) Kidd, M.: Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*, **197**: 192~193, 1963.
- 3) Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R. and Ogawara, M.: Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.*, **99**: 1807~1810, 1986.
- 4) Ihara, Y.: Massive somatodendritic sprouting of cortical neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, **459**: 138~144, 1988.
- 5) Appel, S.H.: A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinsonism, and Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, **10**: 499~505, 1981.
- 6) Uchida, Y., Ihara, Y. and Tomonaga, M.: Alzheimer's disease brain extract stimulates the survival of cerebral cortical neurons from neonatal rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**: 1263~1267, 1988.
- 7) Uchida, Y. and Tomonaga, M.: Neurotrophic action of Alzheimer's disease brain extract is due to the loss of inhibitory factors for survival and neurite formation of cerebral cortical neurons. *Brain Res.*, **481**: 190~193, 1989.
- 8) 内田洋子: アルツハイマー病と神経栄養因子. *神経進歩*, **34**: 651~659, 1990.
- 9) Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. and Tomonaga, M.: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, **7**: 337~347, 1991.
- 10) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**: 5294~5299, 1979.
- 11) Aviv, H. and Leder, P.: Purification of biological active globin messenger RNA by chromatography on oligo-thymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 1408~1412, 1972.
- 12) Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtkey, H.: RNA molecular weight determinations by gel electro phoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**: 4743~4751, 1977.
- 13) Thomas, P.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 5201~5205, 1980.

- 14) **Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.:** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**: 6~13, 1983.
- 15) **Wahl, G.M., Stern, M. and Stark, G.R.:** Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diano benzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 3683~3687, 1979.
- 16) **Hamada, H., Petrino, M.G. and Kakunaga, T.:** A novel repeated element with-Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 6465~6469, 1982.
- 17) **Sakimura, K., Kushiya, E., Obinata, M., Odani, S. and Takahashi, Y.:** Molecular cloning and the nucleotide sequence of cDNA for neuron-specific enolase messenger RNA of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 7453~7457, 1985.
- 18) **Kuwano, R., Usui, H., Maeda, T., Fukui, T., Yamanari, N., Ohtsuka, E., Ikehara, M. and Takahashi, Y.:** Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of cDNA to mRNA for S-100 protein of rat brain. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 7455~7465, 1984.
- 19) **Fujita, N., Sato, S., Kurihara, T., Inuzuka, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.:** Developmentally regulated alternative splicing of brain myelin-associated glycoprotein mRNA is lacking in the quaking mouse. *FEBS Lett.*, **232**: 323~327, 1988.
- 20) **Palazzolo, M.J. and Meyerowitz, E.M.:** A family of lambda phage cDNA cloning vectors, λ SWAJ, allowing the amplification of RNA sequences. *Gene*, **52**: 197~206, 1987.
- 21) **Okayama, H. and Berg, P.:** High efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **2**: 161~170, 1982.
- 22) **Southern, E.:** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503~527, 1975.
- 23) **Tsuji, S., Kobayashi, H., Uchida, Y., Ihara, Y. and Miyatake, T.:** in preparation.
- 24) **Karin, M. and Richards, R.:** Human metallothionein genes—primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature*, **299**: 797~802, 1982.
- 25) **Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.:** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350~1354, 1985.
- 26) **Fourney, R.M., Miyakoshi, J., Day, R.S. III and Paterson, M.C.:** Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus*, **10**: 5~7, 1988.
- 27) **Tokino, T., Takahashi, E., Mori, M., Tanigami, A., Glaser, T., Park, W., Jones, C., Hori, T. and Nakamura, Y.:** Isolation and mapping of 62 new RFLP markers on human chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**: 258~268, 1991.
- 28) **Amemiya, Y. and Miyahara, J.:** Imaging plate illuminates many fields. *Nature*, **336**: 89~90, 1988.
- 29) **Kobayashi, H., Sakimura, K., Kuwano, R., Sato, S., Ikuta, F., Takahashi, Y., Miyatake, T. and Tsuji, S.:** Stability of messenger RNA in post-mortem human brains and construction of human brain cDNA libraries. *J. Mol. Neurosci.*, **2**: 29~34, 1990.
- 30) **Perrett, C.W., Marchbanks, R.M. and Whatley, S.A.:** Characterization of messenger RNA extracted postmortem from the brains of schizophrenic, depressed and control subjects. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **51**: 325~331, 1988.
- 31) **Johnson, S.A., Morgan, D.G. and Finch, C.E.:** Extensive postmortem stability of RNA from rat and human brain. *J. Neurosci. Res.*, **16**: 267~280, 1986.
- 32) **Sajdel-Sulkowska, E., Coughlin, J.F. and Marotta, C.A.:** In vitro synthesis of polypeptides of moderately large size by poly (A)-containing messenger RNA from postmortem human brain and mouse brain. *J. Neurochem.*, **40**: 670~680, 1983.
- 33) **Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M. and Ihara, Y.:** Diffuse type of senile plaques

- in the brains of Alzheimer-type dementia. Acta. Neuropathol. (Berl), 77: 113~119, 1988.
- 34) **Wilcock, G.K. and Esiri, M.M.:** Plaques, Tangles and Dementia, a quantitative study. J. Neurol. Sci., 56: 343~356, 1982.
- 35) 葛原茂樹, 井原康夫, 豊倉康夫, 嶋田裕之: 生理的老化脳と痴呆脳におけるアルツハイマー神経原線維変化の頻度と分布. 脳神経, 41: 465~470, 1989.
(平成3年4月26日受付)
-