The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	家族性アルツハイマー病線維芽細胞における細胞周期依存性カルシウム動態異常
Author(s)	楯林, 義孝
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38937
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【59】

氏　　名	楯林義孝（たてばやしよしたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11297　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**家族性アルツハイマー病線維芽細胞における細胞周期依存性カルシウム動態異常**
論文審査委員	（主査） 教　授　西村　健 （副査） 教　授　柳原　武彦　　教　授　荻原　俊男

論文内容の要旨

【目的】

アルツハイマー病（Alzheimer' s disease；以下AD）の病理過程に関してカルシウム（Ca）動態異常について検討され，特にAD脳の特徴とされる神経細胞の変性消失過程にCaの関与が推定されている。それを新鮮な脳材料を用いて調べることはできないが，最近，皮膚由来のAD線維芽細胞について各種の異常が報告されている。そのため本実験では，家族性AD（FAD）の2家系を含む8例のAD患者より採取培養した線維芽細胞を用い，ADにおけるCa動態を中心に検討を行った。

【方法ならびに成績】

1）線維芽細胞株の樹立

FAD患者4例（2家系2例ずつ，2家系とも早発性FAD，OS-1家系はAPP遺伝子にHardy typeの点突然変異を有する，OS-2家系は原因遺伝子不明），孤発性AD（以下SAD）患者4例（家族歴なし），健常対照者4例より本実験の目的と意義を十分に説明し同意を得た上で皮膚を採取し線維芽細胞を得た。細胞はDMEM＋10% FCSにて継代培養した。

2）Caピークの測定

細胞をCa測定用ディッシュに約3000個の割合でまき各種条件にて培養後，メリディアン社ACAS470を用いて細胞内Ca濃度を測定した。測定前に1 μMのindo-1-AMを30～60分間負荷した後，Hanks-HEPES EGTA bufferにて十分に洗浄し，Hanks-HEPES buffer（Ca^{2+}(＋)or(－)）に交換後，細胞内Ca濃度を測定した。細胞はブラジキニン（BK）100nM，バソプレッシン（VP）100nM，及び10% FCSで刺激した。

細胞をディッシュにまいて48時間後にCa^{2+}-free状態でBK100nMで刺激すると，FAD線維芽細胞のみCaピークの低下が認められた。同様の傾向がVP100nM，10% FCS刺激でも認められた。ところが外液に1mMのCa^{2+}を加えるとこの差は消失し全ての細胞が同等の反応を示した。

測定までの時間を16～168時間と変化させ，Ca^{2+}-freeの状態でBK100nMで刺激すると，Caピークの変動がFAD線維芽細胞に認められた。その変動は5日目にはほぼ消失し，それ以降は健常細胞と同様の反応を示した。変動の形より細胞周期の関与が示唆された。

3）同調細胞のCaピークの測定

細胞の周期を無血清法によりG_0〜G_1期，過剰チミジン（2.5mM）またはヒドロキシウレア（1mM）によりS期，トリコスタチンA（150ng／ml）によりG_2期，コルセミド（1.5μg／ml）または3-(1-Anilinoethyliene)-5-benzylpyrrolidine-2, 4-dione（TN-16）（3μg／ml）によりM期にそれぞれ同調した。同調細胞をCa^{2+}-freeの状態でBK100nMで刺激すると，S期において48時間後に認められたのと同様のCaピークの低下がFAD細胞に認められた。ところが，G_1期，G_2期，M期ではその様なピーク低下は認められず，すべての細胞が同等の反応を示した。

【総括】

1) AD（2家系のFADを含む）患者及び健常対照者より線維芽細胞株の初代培養を行った。
2) FAD線維芽細胞では，測定外液をCa^{2+}-freeにすると，BK100nM，VP100nM，10%FCS刺激時のCaピークが低下していた。
3) Caピークの低下は測定外液に1mMのCa^{2+}を加えると消失し，小胞体付近に異常が存在することが示唆された。
4) Caピークの低下は細胞周期に依存しておりS期に細胞を同調させた時，最も顕著に再現性よく出現した。
5) FAD線維芽細胞において細胞周期依存性のCa動態異常が存在し，その異常が小胞体付近に存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，アルツハイマー病患者由来の線維芽細胞におけるカルシウム動態異常を蛍光画像解析装置を用いて解析したものである。

以前より，アルツハイマー病線維芽細胞におけるカルシウム動態異常に関する報告はあるが，それらのデータに対する否定的な報告も多く，確かな評価は得られていない。本研究は，それらを解明する目的で計画され，その結果，カルシウム動態異常が家族性アルツハイマー病線維芽細胞に顕著に出現すること，それらがCa^{2+}-freeという測定条件でのみ，増殖あるいは細胞周期に依存して出現することを初めて明らかにしたものである。

本研究の結果は，遺伝的に負荷のある家族性アルツハイマー病患者の脳以外の末梢組織にカルシウム動態異常が存在することを示し，アルツハイマー病の病理過程の理解に新しい示唆を与えた点に意義があり，本研究は学位の授与に値すると判断される。