



Title	Alzheimer-associated presenilin-1 gene is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia
Author(s)	谷向, 仁
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41762
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

氏 名	谷 向 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Alzheimer-associated presenilin-1 gene is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia (砂ねずみ海馬における一過性脳虚血後のアルツハイマー病関連遺伝子プレセニリン-1の誘導について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 武田 雅俊 (副査) 教 授 遠山 正彌 教 授 杉田 義郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

家族性アルツハイマー病の関連遺伝子としては、Amyloid Precursor Protein (APP) 遺伝子、Presenilin 1 (PS1) 遺伝子、Presenilin 2 (PS2) 遺伝子、Apolipoprotein E (APOE) 遺伝子の ϵ 4 アレルが報告されており、その中でもPS1の遺伝子変異によるものが最も多く報告されている。また遺伝歴以外のアルツハイマー病の危険因子として、加齢、精神遅滞、頭部外傷、母親の出産時年齢、嗜好品、飲料水中のアルミニウム濃度等が考えられている。このような事を背景として、中枢神経系が何らかのストレス状況下におかれた際にPS1の反応を検討することは、遺伝子変異の影響を考察するにおいても重要であると考えられる。本研究では砂ねずみ一過性脳虚血モデルを用いて、PS1 mRNAの反応について検討した。

【方法】

1) 砂ねずみ一過性虚血モデル

体重50-70 gのMongolian gerbilを抱水クロラルにて麻酔した後、直腸温を37.5℃に一定にモニターしながら両側総頸動脈を5分間クリッピングし再灌流させた後に縫合した。偽手術群について同様に両側総頸動脈を剥離後縫合した。虚血後3時間、6時間、1日、2日、3日、7日後に麻酔下にて断頭し、素早く脳を取り出し凍結切片を作成した。

2) 砂ねずみ PS-1 cDNA の作成

ラット PS-1 cDNA の塩基配列より作成したプライマーを用い砂ねずみ genome DNA をテンプレートとして、open reading frameを含む全長の砂ねずみ PS-1 cDNA を、PCR 法にて増幅した。得られた cDNA は coding region のサイズや homology から gerbil の PS1 gene であると判断した。得られた約1.4kbp の cDNA fragment を pGEM vector に挿入した。

3) Northern blot analysis

偽手術群及び虚血後3日群の海馬より mRNA を抽出し、Northern blot を行った。プローブは砂ねずみ PS-1 cDNA をもとに ramdam hexamer 法を用いて³²P ラベルした cDNA probe を作成した。

4) In situ hybridization

pGEM-T vector に挿入した gerbil PS-1 cDNA 及び pBluescript II SK に挿入した GAPDH cDNA をもとに in

vitro transcription kit (Promega) を用いて digoxigenin-label cRNA probe を作成し、100ng/ml の濃度で用いた。シグナル検出にはアルカリフォスファターゼラベルの抗 digoxigenin 抗体を用いた (×500)。発色には NBT、X-phosphate を用いた。部位別の mRNA の変化は densitometer にて定量を行った。

【結果】

Northern blot の結果、偽手術群と比較すると虚血後 3 日群において PS-1 mRNA の明らかな上昇を認めた。

また、in situ hybridization にて偽手術群では、海馬の全領域で PS-1 mRNA の発現は低値であった。虚血群では、6 時間後までは海馬の全領域で大きな変化を認めなかったが、虚血後 1 日目より CA 3 及び dentate gyrus (DG) にて PS-1 mRNA の発現が上昇しはじめ、3 日目にピークを示した。CA 1 領域においては虚血後 7 日までほぼ同じ発現レベルであった。densitometer を用いたコンピュータ解析の結果、DG においては虚血 3 日後には偽手術群の約 3 倍の値を示していた。

コントロールマーカーとして GAPDH の発現を同様に調べた結果、虚血後に起こる遅発性神経細胞死により CA 1 領域での発現が減少したが、CA 3、DG においては偽手術群と比較し発現に明らかな変化を認めなかった。

【総括】

砂ねずみの一過性脳虚血により、海馬の CA 3、DG において PS-1 mRNA の誘導が確認されたが、コントロールとして行った GAPDH では変化を認めなかった。以上のことから、PS-1 mRNA が特異的にこの領域で誘導されたと考えられる。一過性脳虚血後再灌流により CA 1 領域で遅発性神経細胞死 (DND) がおきることが知られている。一方 CA 3、DG は比較的虚血に対して抵抗性がある領域である。従ってこの抵抗性に PS-1 mRNA の誘導が関係しているかもしれない。同様に虚血後に虚血抵抗領域に誘導される遺伝子群の一つに heat shock protein (HSPs) がある。HSPs は虚血後比較的早期に出現する遺伝子群である。今回の実験で PS-1 は HSPs ほど早期ではなく 1 日後より誘導され 3 日後にピークを示したことから、さらなる解析が必要であるが、虚血抵抗領域に誘導されるという共通点から細胞保護作用もしくは虚血による神経損傷からの回復に関与する可能性が示唆された。最近報告された PS-1 ノックアウトマウスは出産されずに胎生の段階で axial skeleton や spinal ganglia に異常を来すことから胎生段階で重要な役割を示す事が考えられているが、我々のデータからも総合すると PS-1 は正常な細胞発達や細胞生存に重要な役割を持つ事が示唆される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、痴呆性疾患の多くを占めるアルツハイマー病に関して、特に家族性アルツハイマー (FAD) からの病態について検討を行ったものである。

FAD の遺伝子変異の多くを占めるプレセニリン 1 (PS-1) 遺伝子の中枢神経系ストレス状況下での動態について、砂ねずみの一過性脳虚血モデルを作成し mRNA 及び蛋白レベルで、それぞれ時間経過をおって検討したところ、mRNA では虚血 3 日後をピークとして、海馬 CA 3、DG 領域にて発現の上昇を認めた。また蛋白レベルでも同時期の発現が上昇していた。CA 1 領域では、共に変化を認めなかった。さらに虚血耐性モデルにて、同様に mRNA の発現を調べたところ、虚血 3 日後にて CA 3、DG 領域に加えて CA 1 領域においても mRNA の発現上昇を認めた。以上のことから、in vivo では中枢神経系ストレス時に、PS-1 mRNA 及び蛋白が誘導される事が示唆された。

次に、PS-1 の誘導の意義について検討を加えるために、Tet/off system を用いて PC12 細胞に PS-1 cDNA をトランスフェクトして、doxycyclin にて PS-1 の発現レベルを調節し、低酸素、低グルコースによるストレス、また PS-1 が主に局在する ER にストレスを与える目的で tunicamycin によるストレスを負荷し、細胞死を評価するために LDH assay を行った。同様に PS-1 の $\Delta 9$ mutation についても検討を行った。WT PS-1 を強制発現させた系では、内因性レベルの発現系に比べ、LDH release が低値であった。また $\Delta 9$ PS-1 では強制発現系及び内因性レベルのものと比較し、有意な差を認めなかった。このことから、誘導される WT PS-1 は細胞保護的に働くことが示唆された。

次に、より生理的条件下での意義を調べるために、PS-1 遺伝子変異導入動物 (I213Th knock in mouse) の初代培養細胞を用いて、同様に tunicamycin によるストレス下での LDH assay を行った。その結果、WT、Hetero 群に比

べ Homo mouse にて LDH の有意な上昇を認めた。

以上のことから PS1 が中枢神経系ストレス時に誘導され、細胞保護的に作用し、PS1 遺伝子変異によりその作用は失われる可能性が示唆された。

本研究は、FAD の病態の一つを示唆し、今後の FAD、及び孤発性の AD についても応用できる研究データであり、学位に値するものと考えられる。