The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2
Author(s)	松﨑, 伸介
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45468
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

【114】

氏　　名	松　崎　伸　介（まつざきしんすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１９３４７　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学　位　論　文　名	Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2 （プレセニリン２スプライシング変種の産生は金属負荷によって促進される）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　遠山　正彌 （副査） 教　授　武田　雅俊　　教　授　吉峰　俊樹

論　文　内　容　の　要　旨

〔目　　的〕

アルツハイマー病（以下 AD）発症機構について長年多くの研究者が取り組んできたがその分子メカニズムは未だ解明されていない。現在、アミロイドβタンパク質のもつ細胞毒性が原因であるとするアミロイド仮説、リン酸化タウの集積による細胞機能異常を原因とするタウ仮説が主流となっている。我々の教室では、AD 発症に小胞体（以下 ER）ストレスが関与するという ER 仮説のもと検討を進めてきた。その結果、遺伝性のある家族性 AD において原因遺伝子の１つであるプレセニリン１（以下 PS1）の変異体発現細胞が ER ストレス脆弱性を示すこと、遺伝性の無い孤発性 AD では原因遺伝子の１つプレセニリン２（以下 PS2）遺伝子のスプライシング異常により産生されるエクソン５を欠いたスプライシング変種（以下 PS2V）が家族性 AD における PS1 変異体と同様 ER ストレス脆弱生を引き起こすことを報告した。一方、AD の歴史をさかのぼるとアルミニウム（以下 Al）との関連性が疫学的に唱えられているが、有力な科学的証拠が提示されず、Al 原因説は収束へと向かい始めている。そこで我々は、Al と孤発性 AD 発症に関与するのかどうかを PS2V の観点から検討を試みた。

〔方法ならびに成績〕

まず、Al により PS2V の発現がどのように変化するのかを RT-PCR 法によって確認した。その結果、Al を負荷していないコントロール群では低酸素負荷 16 時間以降に確認される PS2V 発現を Al 負荷群（25/250μM）では低酸素負荷 12 時間程度で確認した。この結果は、Al が PS2V 発現時間を促進していることを示唆している。また、孤発性 AD は長期にわたる病態であることから、Al 脳症との区別を目的に Al 高濃度一過性負荷を用いず、低濃度 Al 持続的負荷を行うこととした。そこで、2.5/25μM のアルミニウムマルトール（Al-malt）を含む培地を用いて SK-N-SH 細胞を３ケ月間培養し実験に用いた。それらの細胞を用いて低酸素による PS2V 発現を確認したところ、どちらの培養条件でも低酸素負荷１時間後には PS2V 発現を確認できた。また、我々の過去の検討において、低酸素ストレスにより誘導される HMG-Ala 蛋白質が PS2 pre-mRNA と結合することで PS2V が産生されることから、HMGAla 蛋白質が Al によって誘導されているか否かを HMGAla 抗体を用いたウェスタンブロティング法を用いて確認した。その結

果、Al 長期負荷群・一過性負荷群ともにコントロール群に対して低酸素負荷による HMGAla タンパク質の発現上昇を認めた。次いで、この HMGAla 蛋白質が PS2-pre-mRNA に結合しているかどうか、S^{35} で標識した結合領域の配列を用いたバインディングアッセイにて確認した。その結果、低酸素 Al 負荷群で明らかな結合能上昇が確認された。すなわち、Al を負荷することによって PS2V 産生に関与する HMGAla 蛋白質産生が上昇し、さらに、その蛋白質が PS2-pre-mRNA に結合することで PS2V 産生が促進されることを明らかにした。また、この産生された PS2V が ER ストレスを介した細胞死を引き起こすか否かを確認するため細胞死アッセイのを行った。細胞死アッセイは Hoechst 33342 と Propidium iodide の共染色にて double positive なものを死細胞としてカウントすることとした。その結果、ER ストレスであるツニカマイシン負荷を行ったところ、Al 長期負荷群において低酸素下での細胞死の促進を確認した。すなわち、Al 長期負荷により促進される PS2V の産生と並行して細胞死が促進することが確認された。このことから、Al 暴露が HMGAla を誘導し、PS2V 産生を促進することで ER ストレス脆弱生を引き起こすことが明らかとなった。また、PS2V の見地から考えた場合、孤発性 AD 発症に Al が関与する可能性を示唆した。さらなる検討により鉄・銅・亜鉛といった Al 発症と関連性を示唆されている金属群において PS2V 発現を確認したところ、それら金属においても PS2V 発現の促進を認めた。さらに、金属負荷を行うことで定常酸素状態においても PS2V 発現を誘導することを確認した。

〔総　　括〕

本研究において、Al は低濃度（数 μM 程度）であっても長期間暴露により神経系細胞における HMGAla 誘導を促進すること、その結果産生される PS2V は ER ストレス脆弱性を引き起こし、ER ストレスによる細胞死を促進することを明らかにした。さらに、鉄・銅・亜鉛といった AD 発症への関与が示唆される他の金属において PS2V 発現促進が起こることを明らかにした。これらの結果より、低酸素及び金属負荷によるヒドロキシラジカルの誘導が PS2V 発現に関与している可能性が示唆された。さらに、孤発性 AD 発症と Al の関連性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

孤発性アルツハイマー病（SAD）において小胞体機能異常を引き起こし細胞死へと誘導するする SAD 関連因子 PS2V の観点からアルミニウム（Al）と SAD の関係を調べている。その結果、Al 負荷により低酸素負荷により発現する HMGAla 蛋白質が早期に誘導され、スプライシング異常を引き起こし、PS2V 発現を促進することを示した。また、この PS2V は小胞体機能異常を引き起こし、小胞体ストレスを介した細胞死を促進することを明らかにした。このことは、Al が SAD のリスクファクターであることを示唆している。さらに、他の金属負荷においても同様に PS2V 発現が促進していた。これらの結果は、金属が SAD のリスクファクターであることを示唆している。

今論文は、Al 及び他の金属が PS2V を介して細胞死を促進することを示し、金属が SAD 発症に関与することを科学的に示している。よって、学位の授与に値すると考えられる。