

(ERK) リン酸化型蛋白レベルは、5mmol/l NaF 曝露の 30 分後より増加し、2 時間後にコントロールレベルに戻り、8 時間後より再度増加した。各 MAPK の総蛋白レベルには、NaF 曝露の影響は認められなかった。JNK 阻害剤 SP600125 および ERK キナーゼ (MEK1/2) 阻害剤 U0126 処理により、5mM NaF 曝露による細胞質ヌクレオソーム量増加は、各々、67、38% 抑制された。p38 阻害剤 SB203580 処理による細胞質ヌクレオソーム量の変動は認められなかった。

〔考察〕

NaF 曝露は、MDPC-23 細胞においてアポトーシスを引き起こした。アポトーシス出現に先行して、MAPK ファミリーのリン酸化が認められたが、JNK と p38 が持続性であるのに対して、ERK は 2 相性であったことから、NaF 曝露による各 MAPK 活性化に至る機序は異なる可能性がある。また、JNK および MEK1/2 阻害剤によりアポトーシスが抑制されたことから、NaF 曝露は JNK および部分的に ERK 経路に依存したシグナル伝達系によりアポトーシスを引き起こすと考えられた。

〔結論〕

NaF 曝露は、象牙芽細胞様細胞株において、JNK および部分的に ERK 経路に依存したアポトーシスを惹起する。

論文審査の要旨

フッ化物は齲蝕予防に広く使用されているが、その毒性、特に象牙芽細胞に対する障害性は明らかではない。本研究では、フッ化ナトリウム (NaF) を曝露した MDPC-23 象牙芽細胞様細胞において、caspase-3 活性上昇、切断型 PARP 出現、DNA 断片化、細胞質ヌクレオソーム量増加などのアポトーシスを示唆する所見が認められた。さらに、MAP キナーゼファミリーの活性化を認め、このうち、JNK 阻害剤および ERK キナーゼ阻害剤により、NaF 曝露による細胞質ヌクレオソーム量増加が抑制された。以上の結果から、MDPC-23 細胞において、NaF 曝露は JNK および ERK 経路に依存したアポトーシスを惹起することが考えられた。本研究は、NaF 曝露による象牙芽細胞に対する障害性を in vitro で細胞内シグナル伝達系に着目して明らかにした点が高く評価される。本研究結果に基づき、動物実験によるフッ化物曝露の象牙質・歯髄複合体への影響についての検討が待たれる。

氏名	小田 絵里
学位の種類	博士 (医学)
学位授与の番号	甲第 495 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻、博士課程修了者)
学位論文題目	Possibility of newborn screening for Pompe disease in Japan (日本での Pompe 病スクリーニングの可能性)
主論文公表誌	Molecular Genetics and Metabolism 投稿予定
論文審査委員	(主査) 教授 大澤真木子 (副査) 教授 山口 直人, 高桑 雄一

論文内容の要旨

〔目的〕

Pompe 病は、ライソゾーム内の酸性 α -グルコシダーゼ酵素 (GAA) の欠損によりグリコーゲンが骨格筋や心筋に蓄積する難治性の疾患である。近年、酵素製剤が承認され、早期発見・治療が重要となっている。本症には、Pseudodeficiency 呼ばれる鑑別を要する集団が存在し、日本人では比較的高頻度といわれる。Pseudodeficiency

では GAA 活性が正常の 15~30% と低値を呈し、2 種類の遺伝子多型 p. [G576S ; E689K] をそれぞれホモ接合体で持つが本症は発症しないことが報告されている。本研究では、pseudodeficiency の解析も含め、日本における Pompe 病スクリーニングについて検討する。

〔対象および方法〕

本研究の承諾を得た Pompe 病患者 29 名、保因者 5 名、健康対照者 496 名を対象とする。方法は、人工蛍光基質を用いて、対象の血液ろ紙における酵素活性を測定する。①GAA 活性：酸性条件下で、アカルボースによる GAA 異性体を阻害下グルコシダーゼ活性。②t-GAA 活性：酸性条件下でのグルコシダーゼ活性。③NAG 活性：中性条件下でのグルコシダーゼ活性。①~③の活性値を用いて、%阻害率 = (t-GAA 活性-GAA 活性)/t-GAA 活性×100, NAG/GAA 比 = NAG 活性/GAA 活性を算出し、スクリーニングのカットオフラインを GAA 活性<8% かつ NAG/GAA 比>40 かつ%阻害率>65% と設定し解析を行う。またすべての血液ろ紙において PCR ダイレクトシーケンス法による p.G576S 多型解析を行う。

Pseudodeficiency 率を既報告の 4%、日本人における保因者率 0.5% と仮定し、日本でのスクリーニングは実現の可能性を検討した。

〔結果〕

すべての患者の検出は可能であったが、正常対照群 1 名と保因者 1 名も陽性となった。この結果よりこの方法を用いた日本人集団におけるスクリーニングの偽陽性率の推定は 0.37% となり、日本でのスクリーニングは実現可能であることが示唆された。

〔考察〕

本研究では、新たなカットオフラインを設定することにより、患者全員をスクリーニング陽性者と判定できた。また、酵素低下を示す保因者や pseudodeficiency もほぼ正常群に分類可能であった。しかし、スクリーニング陽性者の中に、pseudodeficiency が紛れ込む可能性は否定できず、リンパ球や皮膚線維芽細胞での酵素活性測定で精密検査を行い、その際に p.G576S 多型解析を行うことが有用であると思われた。

〔結論〕

Pompe 病の早期診断・早期治療が求められる現在、Pompe 病スクリーニングを GAA 活性、阻害率、GAA/NAG 比を組み合わせて実施し、さらにスクリーニング陽性者の中で pseudodeficiency と Pompe 病患者を見分けるために、p.G576S 多型変異解析を含めて複合的に精査することが重要である。

論文審査の要旨

Pompe 病は、ライソゾーム内の酸性 α -グルコシダーゼ酵素 (GAA) の欠損によりグリコーゲンが骨格筋や心筋に蓄積する疾患である。近年、酵素製剤が承認され、早期発見・治療が重要となっている。本症には、GAA 活性が正常の 15~30% と低値を呈し、2 種類の遺伝子多型 p. [G576S ; E689K] をそれぞれホモ接合体で持つが本症は発症しないとされている pseudodeficiency と呼ばれる鑑別を要する集団が存在し、日本人では比較的高頻度といわれる。本研究では、pseudodeficiency の解析も含め、日本における Pompe 病スクリーニング実施の可能性について検討し、日本でのスクリーニングは実現可能であることが示唆された。また、新たなカットオフラインを設定することにより、患者全員をスクリーニング陽性者と判定でき、酵素低下を示す保因者や pseudodeficiency はほぼ正常群に分類可能であった。以上より本論文は価値がある。