



Title	Astrocytic Lineage Analysis by Detection of GFAP Promoter Activity in vitro
Author(s)	森田, 規之
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40415">https://hdl.handle.net/11094/40415</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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	もり 森 田 のり 規 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 2 6 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Astrocytic Lineage Analysis by Detection of GFAP Promoter Activity in vitro (グリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) 遺伝子転写活性の可視化によるアストロサイトの細胞系譜の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 早川 徹
	(副査) 教 授 三木 直正 教 授 遠山 正彌

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

大脳皮質のアストロサイトの起原として、ニューロblastの移動のガイドを終えた放射状グリア細胞のトランスフォームがこれまで広く受け入れられてきたが、脳室層や脳室下層においてグリア前駆細胞が存在することを示唆する報告がある。マウス大脳皮質アストロサイトの起原と細胞系譜を明らかにするため、アストロサイト特異的に発現される中間径フィラメント蛋白質であるグリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) に注目し、GFAP 遺伝子の転写が活性化された細胞の出現の時期と局在を、脳初代培養系および脳スライス培養系を用いて検討した。

#### 【方法と成績】

##### GFAP 遺伝子転写活性を可視化する高活性組み換えレトロウイルスの作成

マウス GFAP 遺伝子転写開始部位上流 2.5kb (-2567~+12) を GFAP プロモーターとして用いて GF2.5/pIP300<sup>+</sup> を構築した。新規に作製したベクタープラスマド pIP300<sup>+</sup> は、U3 領域に点突然変異を導入した 3'LTR によって、逆転写の過程で 5'LTR プロモーターを失活させる self inactivating ベクターであり、さらに、効率的なウイルスパッケージングシグナルであるΨ<sup>+</sup>領域を組み込んだ。このことにより、内部プロモーターである GFAP プロモーターの転写活性をレポーター遺伝子産物 β-ガラクトシダーゼの酵素活性として、発色性基質 X-gal を用いた酵素組織化学法によって個々の細胞レベルで鋭敏に検出し可視化することを期待した。リン酸カルシウム法によって GF2.5/pIP300<sup>+</sup> をエコトロピックパッケージング細胞Ψ2 にトランسفクトし、ウイルス産生細胞を樹立した。培養上清から回収した GF2.5/pIP300<sup>+</sup> ウィルスをマウス大脳初代培養細胞に感染させ、X-gal 陽性細胞数を計測したところ従来の GF2.5/pIP200 ウィルスの約 10 倍高い活性をもつことが明らかになった。さらに X-gal 陽性細胞が同時に GFAP 免疫陽性であったことから、2.5kb GFAP プロモーターがアストロサイト特異的に転写を開始させることができた。

##### GFAP 遺伝子の転写が活性化された細胞の出現時期

胎生 13 日 ICR マウス大脳壁由来の初代培養細胞 (ポリエチレンiminコートカバーガラスに  $3 \times 10^5 / \text{cm}^2$  で播種) における GFAP の発現時期を、転写活性の可視化 (X-gal 染色法) と抗 GFAP 抗体 (Labsystems) による免疫蛍光法で比較した。X-gal 陽性細胞が組み換えレトロウイルス感染翌日の胎生 16 日相当から検出された。これらは突起のない球状または扁平な形態を有し、GFAP と MAP 2 の双方に免疫陰性であった。X-gal 陽性細胞であり同時

に GFAP 免疫陽性を呈する細胞は感染翌日ではほとんど認められず、感染後 3 日目から増加した。こうした検出時間の時間差は、GFAP が重合し線維束を形成してはじめて強い免疫染色性を示すためと考えられ、転写活性の可視化によって、免疫染色よりも早い発生段階からアストロサイト前駆細胞を検出できることが明らかとなった。レトロウイルスによる遺伝子の組み込みは増殖細胞の G 2 期になされるため、検出された細胞が胎生 15 日相当の時点で分裂能を有していたと考えられた。

#### 培養マウス大脳壁スライスにおけるアストロサイト前駆細胞の出現部位

胎生 15 日 ICR マウスより厚さ 200  $\mu\text{m}$  の大脳壁スライスを切り出しカルチャープレートインサート (Transwell - COL, Costar) 上に静置培養した。培養開始直前に増殖細胞をプロモデオキシウリジン (BrdU) で標識し、経時に固定後、抗 BrdU 抗体 (Becton Dickinson) による標識細胞の分布を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 (IMT - 2, Olympus; MRC - 500, Bio - Rad) で観察した。培養スライスにおいても神経上皮細胞の脳室層におけるエレベーター運動と増殖、ニューロblast の移動が起こることが明らかとなったことから、組み換えウイルスを感染させた。48 時間後、ニューロン、グリアのいずれも標識可能な BAG ウイルスによる X - gal 陽性細胞は、脳室層から表層に広く分布し、移動中と考えられるニューロblast や球状の細胞が認められた。これに対し、GF2.5/pIP300<sup>+</sup> ウイルスによる陽性細胞は脳室層にあって、突起を持たない球形細胞によるクラスターとして見出されたことから、その場で分裂増殖していると考えられた。

#### 【総括】

- 1) アストロサイト細胞系譜にある細胞が、GFAP 免疫反応性を呈するより約 3 日早くからマウス 2.5kb GFAP プロモーターを活性化することを見出した。GFAP 転写活性の可視化が、免疫染色よりも早い発生段階からのアストロサイト前駆細胞の検出を可能にしたことから、アストロサイトの発生・分化の過程の追跡に適した解析手法であることが明らかとなった。
- 2) マウス胎生 15 日のニューロン産生期に脳室層に存在して分裂増殖するアストロサイト前駆細胞を見出した。その形態、大脳壁における局在や分裂能から、放射状グリア細胞のトランスフォームとは異なる細胞系譜のものであることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

中枢神経系を構成する細胞の起原と系譜を明らかにすることは、神経発生学の中心課題の一つとして位置づけられよう。なかでも、アストロサイトの細胞系譜に関する知見を得ることは、神経膠腫の起原と発生機序を明らかにし、治療法の開発を進めていくうえからも、極めて意義深い。

本研究は、アストロサイトに特異的に発現されるグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) に焦点をあて、その遺伝子転写活性の検出によってアストロサイトの分化過程を解析したものである。マウス大脳初代培養細胞および培養大脳スライスに対して、組み換えレトロウイルスによる遺伝子導入法を用いたプロモーター・アッセイを行い、アストロサイト前駆細胞を抗 GFAP 免疫染色法よりも早い発生段階から検出できることを明らかにした。さらに検出された細胞が、その形態や局在部位、増殖能から放射状グリア細胞とは異なる系譜にあることを示しており、脳室層、脳室下層におけるアストロサイト起原細胞の存在を示唆した結果として注目される。

以上、本研究は神経発生学に重要な知見を加えたものとして、学位の授与に値することを認める。