Osaka University Knowledge Archive

Title	Induction of 72-kDa Inducible Heat Shock Protein (HSP72) in Cultured Rat Astrocytes After Energy Depletion
Author(s)	藺牟田, 直彦
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41703
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【85】

氏　　名	藺牟田　直　彦（いむた　なおひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　14514　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Induction of 72-kDa Inducible Heat Shock Protein (HSP72) in Cultured Rat Astrocytes After Energy Depletion （ラット培養アストログリア細胞におけるエネルギー負荷とHSP72の発現について）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　柳原　武彦 （副査） 教　授　堀　正二　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

虚血環境下における遺伝子発現の制御は，脳血管障害の遺伝子治療を考える上で必須のテクノロジーである。その第一歩として，脳虚血における heat shock protein（HSP）72によるストレス応答を，レポーター遺伝子をラットアストログリア細胞（AST）およびトランスジェニックマウスへ導入することにより検討した。

【方法ならびに成績】

ヒト由来のHSP72プロモーター遺伝子と luciferase 遺伝子より，HSP reporter 遺伝子を作成，lipofection 法を用いて新生ラット由来の AST の primary culture に導入した。HSP promoter 活性は Luciferase の活性と 3 H－leucin の TCA 不溶分画への取り込みとの比で評価した。AST を低酸素暴露した後再酸素化すると再酸素化後 4－6 時間で極大（500－1000倍）となり，その時期は細胞内の ADP／ATP 比が最大，energy charge が最小となる時点と一致した。一方，HSP promoter の活性は，再酸素化だけでなく，低酸素環境下にある AST に iodo acetic acid（IAA）などの解糖代謝阻害剤を与えることによっても，ADP／ATP 比及び energy charge に対し指数関数的に上昇したが，propionic acid などの蛋白変性剤ではその上昇は見られなかった。Cycloheximide（10mg／ml）は再酸素化時の蛋白新生を抑制することによって，エネルギー代謝を一時的に改善するとともに，heat shock factor（HSF）の活性化も抑制し，再酸素化に伴う蛋白質新生の増加がAST でのエネルギー負荷の増大を引き起こし，HSP promoter の活性化を促すことが示唆された。また，Heat shock element（HSE）を用いたゲルシフトアッセイは，低酸素・再酸素化によって HSF が活性化されることを示したが，低酸素下で IAA を与えることによっても HSF の活性化が認められた。低酸素下で IAA に長期暴露する事によって，細胞内エネルギー代謝の負荷を増大させると，ADP／ATP 比が50％以上となった時点で，ゲルシフトアッセイで HSF の活性化を認めるものの，luciferase 活性の増加にいたらず，この閾値で転写活性と翻訳との解離がおこることが示された。また，再酸素化した AST を NP－40（1％）にて可溶化し，ショ糖勾配中で超遠心し各分画を HSP72抗体を用いた Dot blot に供すると，HSP72は主に polysome 分画に存在することが示されたが，再酸素化直前に quercetin を加えることによって HSP72の発現を抑えると，polysome 分画における 3 H－leucin の TCA 不溶分画への取り込みが低下した。

この虚血レポーターの in－vivo における発現を確認するためには，導入効率の問題から genomic model が必要

と考えられた。そこで次にSV40の核移行シグナルを付けたHSPプロモーター遺伝子と，β-galactosidase遺伝子（lacZ）とを組み合わせたレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（Tg）の作成を試みた。マウス新生児脳より得たASTのcultureを再酸素化や砒素などのストレスに暴露すると，核から抽出したlacZの活性は上記のAST初代培養系のluciferaseの場合と同様の傾向，すなわち再酸素化後6時間で極大を示した。このcultureを用いてX－gal stainingを行ったところ，再酸素化後に核に限局した青染，すなわちlacZの発現を認めた。さらに片側中大脳動脈（MCA）2時間結紮および再潅流24時間のMCA occlusion（MCAO）modelにて，虚血側のcortexからcingulate，caudate putamenにかけてX－gal stainingにてlacZの発現が主としてグリア細胞の核において示された。これはC57 black mouseのMCAOを抗HSP72抗体にて免疫染色した場合の発現部位とほぼ一致し，このTgのストレス応答を定量化，可視化できるモデル動物としての有用性も確認された。

【総括】

ストレス蛋白のプロモーターを用いたレポーター遺伝子のtransfection系やそれを導入したトランスジェニックマウスは，虚血ストレス応答の解析に有用であることが示唆された。それを応用した一例として，vitroにおいてHSP72は再酸素化時にエネルギー依存性に発現し，酸素下の環境にreadaptationするために必要な蛋白合成をサポートしていることが証明された。

これらのテクニックはストレス応答の簡便な定量化，可視化も可能とすることで脳血管障害の研究に有用であり，また治療に関しても今後新たにstress specificな遺伝子治療薬などの可能性を示唆するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

虚血環境下における遺伝子発現の制御は，脳血管障害の遺伝子治療を考える上で必須のテクノロジーである。本研究はその第一歩として，脳虚血におけるheat shock protein（HSP）72によるストレス応答を，レポーター遺伝子をラットアストログリア細胞（AST）およびトランスジェニックマウスへ導入することにより検討したものである。

本研究では，まずヒト由来のhsp72プロモーター遺伝子とliciferase遺伝子により，HSP reporter遺伝子を作成，lipofection法によりラットASTのprimary cultureへ導入した。その細胞を24時間低酸素後再酸素化すると，HSP promoter活性はエネルギー負荷（ADP／ATP，energy charge）にdependして大きくなり，再酸素化後4～6時間で極大となった。またHSP抗体によるdot blot法にて，この時のHSP72は主としてASTのpolysome分画にあって再酸素化による蛋白合成をサポートしていることが示唆された。

このレポーター遺伝子のin vivoにおける発現を見るためには，導入効率の問題からgenomic modelを作成することが適当と考えられた。そのため次にSV40核移行シグナルを付けたhsp72 promoter遺伝子＋β-galactosidase遺伝子（lacZ）のレポーター遺伝子を作成し，トランスジェニックマウス（Tg）の作成を試みた。Tgの新生児脳より得た培養ASTは各種ストレス負荷に対し，上記luciferase活性と同様のlacZ活性の変化を示した。またTgの片側中大脳動脈閉塞にて核lacZの発現が強い領域（細胞）は，HSP72の発現の発現する領域とほぼ一致した。

本研究では，ストレス蛋白のpromoterを用いたレポーター遺伝子の人為的な導入により，虚血ストレス応答の数理的な解析が可能であることをhsp72 promoterを用いて証明した。この過程においてストレス応答をより簡便に定量化，可視化可能な実験系の確立に成功した。この系は，脳虚血の研究に役立つだけでなく，今後の展開として，虚血環境下での人為的な遺伝子発現の制御による脳血管障害の治療に結びつくことも期待される。以上より本研究は，脳血管障害の遺伝子治療の先駆けとなるきわめて先駆的かつユニークな研究であり，学位に値すると考えられる。