



Title	Modulation of Astrocyte Proliferation by Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27Kipl
Author(s)	小口, 健
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43679
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	こ ぐち けん 小 口 健
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学 位 論 文 名	Modulation of Astrocyte Proliferation by Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27 ^{Kip1} (サイクリン依存性キナーゼインヒビター p27 ^{Kip1} によるアストロサイト増殖の調節)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 佐古田三郎 (副査) 教 授 吉 峰 俊 樹 教 授 遠 山 正 彌

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ヒトを含む哺乳類の中樞神経系では神経が再生されないために種々の疾患で麻痺等の重篤な後遺症が残る。障害された軸索の再生伸展を阻害する因子は種々あり、アストロサイトが増殖・肥大したものである反応性グリオシスによる軸索伸展の物理的なブロックもその一つである。しかし、反応性グリオシスの制御機構については十分解明されておらず、これを制御することが可能となれば、臨床的にも多大な利益が得られる可能性がある。そこで私はアストロサイトの増殖抑制について検討した。

【方法並びに成績】

in vitro でアストロサイトが増殖を停止するコンタクトインヒビションの系において、サイクリンAが減少し、サイクリン依存性キナーゼインヒビター p27^{Kip1}が増加していることに着目した。これよりアストロサイトの増殖機構にサイクリンA及びp27が深く関与しているものと推察され、アストロサイトの増殖停止はp27の発現量が増大した結果であることが予想された。p27ノックアウトマウス及びp27発現ベクターを用いてアストロサイトの増殖制御にp27が関与している事の証明及びp27による反応性増殖の抑制が可能かどうか検討した。

1) in vitro gliosis モデル

in vitro にて野生型マウス由来とp27ノックアウトマウス由来のアストロサイトとを培養し、BrdUの取り込み率を指標としてアストロサイトの増殖率を免疫染色を用いて検討した。その結果低密度培養では両者に差は認めなかったが、高密度培養ではp27ノックアウトマウス由来のアストロサイトは野生型マウス由来のアストロサイトに比べ増殖率が約2倍と高かった。また、この時、p27ノックアウトマウス由来のアストロサイトは野生型マウス由来のアストロサイトに比し、サイクリンAの発現が増大しており、p27ノックアウトマウス由来のアストロサイトはコンタクトインヒビションがかかりにくく、増殖停止シグナルに対して抵抗性であると思われた。

次いでp27の過剰発現が直接アストロサイトの増殖を抑制するかを検討した。p27発現アデノウイルスベクターを作成し、野生型アストロサイトに過剰発現させると増殖率は著明に低下し、p27によりアストロサイトの増殖が抑制される事が証明された。また、この時サイクリンD、Eの発現量には変化ないが、サイクリンAの発現が低下してい

ることが示された。

Scratch wound を用いた in vitro のグリオーシスのモデルでは、wound 辺縁で p27 の発現が低下し、増殖率が増加した。また、ウェスタンブロットにて p27 の発現低下は一過性であり、アストロサイトが再度増殖し、接触することにより再び増加することが判明した。この系において wound 作成と同時に p27 を過剰発現させると、wound 辺縁でも BrdU の取込み率は増加せず、in vitro のグリオーシス抑制に p27 が有効であることが示された。

2) in vivo gliosis モデル

マウス大脳皮質に stab wound を作成し、免疫染色を用いて反応性アストロサイトについて wound 作成後 2 日、4 日、7 日、10 日、14 日で各々評価した。野生型マウスでは GFAP 陽性 BrdU 陽性のアストロサイトは 2 日後から出現、4 日で最大となり、10 日ではほぼ消失したが、p27 ノックアウトマウスにおいては 10 日においても GFAP 陽性 BrdU 陽性のアストロサイトを認めた。p27 の欠失により反応性グリオーシスが遷延したものと思われた。

次いで stab wound を作成すると同時に高力価のアデノウイルスを注入、p27 を過剰発現させた状態で、wound によるアストロサイトの増殖について検討した。p27 の過剰発現により wound 辺縁の GFAP 陽性 BrdU 陽性のアストロサイトは著減し、in vivo にても p27 の過剰発現により反応性グリオーシスの出現が抑制されることが示された。

【総括】

p27 ノックアウトマウス由来のアストロサイトは弱いコンタクトインヒビションを示し、野生型マウス由来のアストロサイトに p27 を過剰発現させる事により増殖が抑制された。以上より、p27 がアストロサイトのコンタクトインヒビション及び増殖抑制に直接関与していることが証明された。また、in vitro、in vivo の反応性グリオーシスモデルにおいても p27 が関与しており、その過剰発現により反応性増殖の抑制が可能であることが示された。さらにこの p27 によるアストロサイトの増殖停止のメカニズムの一部にサイクリン A 蛋白の発現低下が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

臨床的に様々の神経変性疾患、腫瘍、外傷等において反応性グリオーシスが認められるが、その意義や形成機構については不明なことが多い。

本研究ではサイクリン依存性キナーゼインヒビター、p27^{Kip1} がアストロサイトのコンタクトインヒビション及び反応性増殖の抑制に直接関与していることを in vitro、in vivo の実験系で明確にした。

in vitro において p27 のノックアウトマウス由来のアストロサイトではコンタクトインヒビションが弱く、また増殖期のアストロサイトに p27 を過剰発現させると増殖を抑制することを示した。また in vivo においても p27 ノックアウトマウスでは stab wound 後のアストロサイトの反応性増殖は遷延し、in vitro と同じく p27 を過剰発現させると反応性アストロサイトの増殖が抑制されることを示した。これらから、p27 がアストロサイトの増殖制御に直接関与しており、p27 を用いることにより反応性アストロサイトの増殖抑制が可能であることを明らかにした。また、p27 によるアストロサイトの増殖抑制のメカニズムの一部にはサイクリン A 蛋白の発現抑制が関与していることも明らかにした。

以上のように反応性グリオーシスの形成機序の一部を明らかにし、その抑制を可能にしたことにより臨床応用への道を示した。

よって本研究は学位に値すると考える。