



Title	Regulation of FLRG Expression in Rat Primary Astroglial Cells and Injured Brain Tissue by Transforming Growth Factor- β 1(TGF- β 1)
Author(s)	張, 桂琴
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43924
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	張 桂 琴
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 17572 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Regulation of FLRG Expression in Rat Primary Astroglial Cells and Injured Brain Tissue by Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) (ラット初代培養アストログリア細胞及び脳損傷組織における TGF- β 1 による FLRG の発現の制御)
論文審査委員	(主査) 教授 内山 安男 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 遠山 正彌

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

アクチビンは、TGF スーパーファミリーの一つとして、生殖細胞増殖、神経細胞の生存維持と分化誘導、B 細胞の apoptosis 誘導、中胚葉の誘導作用及び臓器の左右非対称性の決定など、様々な生理活性を有していることが知られている。アクチビンの機能調節に関与する因子として、フォリスタチンが知られている。フォリスタチンはフォリスタチンモジュールと呼ばれるシステインを豊富に持つ構造 (FS module) を 3 つ有し、この領域を介してアクチビンと結合する。アクチビンの生理活性はフォリスタチンと結合することによって抑制される。

FLRG (follistatin-related gene) は、1998 年に、転座を起こしている遺伝子としてヒトの慢性リンパ球性白血病患者の染色体から同定された。FLRG タンパク質はシグナル配列を有する分泌性の糖タンパク質で、C 末端に 2 つの FS module を有し、これを介してアクチビンや BMPs (bone morphogenetic proteins) と結合し得ることから、フォリスタチンファミリーに属するタンパク質の一つと考えられている。また、FLRG mRNA の転写活性は、TGF- β 1 やアクチビンにより上昇することが報告され、その発現調節系も明らかになってきた。しかし、FLRG の生体内における生理機能はほとんど解明されていない。

本研究は神経組織、特にアストログリアにおける FLRG mRNA およびタンパク質の発現調節、また、脳障害モデルを用いた FLRG の発現誘導を解明することを目的とした。

【方法ならび成績】

< 1 > ラット組織における FLRG の発現

ラットの各組織における FLRG mRNA の発現をノーザンブロット法およびリアルタイム定量 PCR 法 (quantitative real-time PCR, QPCR) で検討した。その結果、FLRG mRNA の発現量は精巣と副腎で高く、フォリスタチンは卵巣で高いことがわかった。しかし、脳組織におけるこれらの mRNA 量は、低い値を呈した。そこで、ラット脳における発現を詳細に検索するために、胎仔から初代培養アストログリアと神経細胞をそれぞれ分離培養し、FLRG、フォリスタチン、アクチビン A の発現様式を検索した。その結果、FLRG mRNA の発現量はアストログリ

アに高く、同細胞の培養上清中には FLRG タンパク質が分泌されることがわかった。さらにアストログリアにおける FLRG mRNA およびタンパク質の発現は TGF- β 1 により濃度依存的に誘導されることが明らかになった。また、神経細胞では、FLRG やフォリスタチンの発現は低い、アクチビン A の発現は高かった。

< 2 > 脳損傷モデルにおける FLRG の発現

脳損傷モデルとして 8 週齢ラットの脳皮質に長さ約 5 mm、深さ 2 mm の切開 (penetrating injury) を加え、その後の時間経過に伴う FLRG、フォリスタチン、アクチビン A、TGF- β 1 の各 mRNA の発現量を QPCR 法で検討した。その結果、FLRG、アクチビン A、TGF- β 1 の各 mRNA の発現量は損傷後 1 日目より有意に増加し、FLRG と TGF- β 1 の mRNA 量は 4 日目にピークをとり、10 日目まで高値を示した。フォリスタチン mRNA の発現は障害側で有意に低下していた。さらに、FLRG を発現する細胞を同定するため、抗 FLRG 抗体および抗 GFAP 抗体を用いた蛍光 2 重染色を施行した所、損傷後 7 日目のグリオーシスが著しい損傷部周辺において、GFAP 陽性細胞の突起に FLRG タンパク質の免疫陽性反応が認められた。

【総括】

FLRG は、その分子構造よりフォリスタチンと相同性の高いタンパク質である。しかし、成熟ラットの末梢組織における FLRG とフォリスタチン mRNA の分布を調べた結果、両者の発現は必ずしも一致しないことが分かった。

本研究では、FLRG とフォリスタチン mRNA の発現が低い神経組織に着目し、FLRG mRNA の発現とその制御を検討した。FLRG mRNA はラット胎仔より得た初代培養アストログリアで発現が高く、そのタンパク質産物は培地に分泌されることが明らかとなった。また、mRNA の発現とタンパク質の分泌は TGF- β 1 により容量依存的に制御されることもわかった。さらに、脳損傷モデルを用いて調べた所、その修復過程で、FLRG、TGF- β 1、アクチビン A の各 mRNA は発現誘導され、FLRG タンパク質もアストログリアに認められたが、フォリスタチン mRNA の発現は抑制された。これらの結果は、脳損傷後の修復過程においては、これまで考えられていたフォリスタチンよりむしろ FLRG がアクチビン A の結合蛋白として働き、その機能発現を制御していることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

FLRG (follistatin-related gene) は、ヒト慢性リンパ球性白血病患者の染色体で転座遺伝子として同定され、フォリスタチンファミリーに属する糖タンパク質の一つであり、フォリスタチンと同様にアクチビンの機能調節に関与することが知られている。しかし、中枢神経系における FLRG の分布と発現調節については全く研究がなされてこなかった。

本論文は、中枢神経系における FLRG の発現とその制御因子について検討した研究である。この目的で、ラット胎仔より得た初代培養アストログリアとニューロン、および成熟ラットの脳損傷モデルを用いて検討した。その結果、FLRG mRNA は培養アストログリアで発現が高く、そのタンパク質産物は培地に分泌されることが明らかになった。また、アストログリアにおける FLRG mRNA とタンパク質の発現は、TGF- β 1 により濃度依存的に誘導されることが分かった。培養ニューロンにおいても FLRG mRNA の発現は認められたが、その量は低く、TGF- β 1 や他の神経栄養因子によって発現量の変化は見られなかった。さらに、脳損傷 (penetrating brain injury) モデルで、TGF- β 1、アクチビン A、フォリスタチンおよび FLRG の各 mRNA の発現を検討した所、TGF- β 1、アクチビン A と FLRG は損傷の治癒過程で反対側の対照領域と比べ、有意に高い発現誘導が認められた。しかし、フォリスタチンの発現はむしろ抑制されることが分かった。また、免疫染色で検討した結果、FLRG タンパク質は GFAP 陽性のアストログリアの突起に見られた。これらの所見は、脳損傷後の修復過程においては、FLRG がアクチビン A の結合蛋白として働き、その機能発現を制御していることを示唆している。

上記研究は、FLRG の中枢神経系における発現調節の制御機構を培養系と脳損傷モデルで検討した最初の報告であり、今後、FLRG の生理機能を解析する上で重要な位置を占めることが示唆され、学位に値するものとする。