Osaka University Knowledge Archive

Title	Regulation of FLRG Expression in Rat Primary Astroglial Cells and Injured Brain Tissue by Transforming Growth Factor-β1(TGF-β1)
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、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

【2】

氏　　名	張（チョウ）　桂（ケイ）琴（キン）
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-β1 (TGF-β1) （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-β1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-β1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-β1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が、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週齢ラットの大脳皮質に長さ約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-β1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-β1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-β1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-β1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-β1、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-β1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-β1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-β1、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-β1、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見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考える。