学位論文題名

培養グリア細胞における毛様体神経栄養因子の
発現調節機構の解析

毛様体神経栄養因子(CNTF)は、毛様体神経に対して生存維持活性をもつ因子として同定された分子量約22 kDaの蛋白質である。最近、CNTFが種々の神経系細胞に対する広範囲な作用をもつことが、おもに *in vitro* の系を用いて明らかにされた。一方、*in vivo* の中枢神経系においては、大脳皮質の損傷時にNGFの発現増大とともに静止時にはほとんどみられなかったCNTFの発現が増大することが報告された。傷害時のNGFの発現増大は神経損傷の修復再生に寄与していると考えられており、中枢神経系におけるCNTFの機能も損傷の修復と関連している可能性がある。また、静止時に高いCNTFの発現がみられる嗅球では、その一次感覚入力である嗅神経が、神経細胞としては唯一生涯を通じて脱落新生を繰り返していることが知られていることから、中枢神経系におけるCNTFの機能は、脳組織の損傷修復と密接な関係にあると推測される。そこで、CNTFの発現がどのようにして調節されているかを明らかにすることは、中枢神経系における損傷修復の機構を理解する上で重要であると考えられる。

ラット新生児の嗅球より得た初代培養グリア細胞では、静止時において高いレベルのCNTF-mRNAの発現がみられた。一過性のNGF-mRNAの発現を誘導するアデニル酸シクラーゼ活性化剤フォルスコリン(FK, 20 μ M)を9時間作用させると培養嗅球グリア細胞におけるCNTF-mRNAの発現はコントロールの20%以下まで減少し、24時間後にいたるまで回復しなかった。このことから、培養グリア細胞における細胞内cAMP濃度の上昇は、NGF-mRNAの発現を増大させる一方で、CNTF-mRNAの発現減少を引き起こすことが明らかとなった。また、アデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている種々の神経伝達物質や神経ペプチド、特に下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)やVIPなどの神経ペプチドが強いCNTF-mRNA発現減少効果を示すことを見いだした。嗅球においては、PACAP受容体やVIP受容体が強く発現していることが知られており、*in vivo* においてもCNTF-mRNAはPACAPやVIPによって負の発現調節を受ける可能性が示唆された。CNTF-mRNAの発現減少に対する、蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)の効果を検討したところ、CHXはFKの効果をほとんど解除しなかった。このことから、FKによるCNTF-mRNAの発現減少には新たな遺伝子発現非依存的な機構が大きく寄与していることが示唆された。定常的に発現しているmRNAが減少する場合、遺伝子の転写が抑制される機構とmRNAの分解が促進される機構とが考えられる。そこで、転写阻害剤アクチノマイシンD(AD)を用いてCNTF-mRNAの安定性を測定したところ、CNTF-mRNAの半減期は約7時間であることが明らかとなった。一方、AD存在下FKを作用させると、CNTF-mRNAの半減期は約10時間となり、FKによる遺伝子発現非依存的なCNTF-mRNAの発現減少には分解促進機構は存在しないことが示唆された。そこで、蛋白質合成に依存しないCNTF-mRNAの発

現減少には CNTF 遺伝子の転写抑制の機構が示唆された。一方、FK を単独で作用させた場合は、CNTF-mRNA の半減期が短く (約 4.7 時間) なることが見いだされ、CNTF-mRNA の分解促進が起こっていることが示唆された。さらに AD 存在下では FK による分解促進は解除され、分解の促進は新たな遺伝子発現を介した系であることが示唆された。

PKC 活性化剤である PMA は、培養大脳皮質グリア細胞における NGF-mRNA の発現を増大させることが知られている。一方、CNTF-mRNA の発現は、PMA(0.1 $\mu\text{g/ml}$) によって一過性に減少した後増加に転じ、24 時間後には静止時の約 4 倍まで増大することが明らかとなった。次に、PMA による CNTF-mRNA の発現変化に対する CHX の作用について検討した結果、PMA による CNTF-mRNA の発現変化には新たな蛋白質合成を介した系が関与していることが示唆された。

脊髄に入力する後根神経節細胞を切断することによって、脊髄のグリア細胞において転写因子である c-Jun の発現が増大することが報告されている。また、CNTF 遺伝子の転写開始点近傍には、AP-1 配列が存在することなどから、培養グリア細胞における CNTF-mRNA と Jun ファミリーの発現変化を比較検討した。培養グリア細胞の細胞内 cAMP 濃度上昇によって、静止時に高かった c-jun の発現が CNTF-mRNA の発現と同様に減少していることが見いだされた。一方、PMA は、c-jun の発現を一過性に増大させることが明らかとなった。このとき、静止時にはみられなかった junB の発現が一過性に増大することが見いだされた。このことから、PMA による一過性の CNTF-mRNA の発現減少は、Jun B の一過性の発現による転写抑制機構が関与している可能性が示唆された。そこで、junB に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの PMA による CNTF-mRNA の発現減少に対する効果を検討したところ、junB のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CNTF-mRNA の発現減少を解除することを見いだした。これらのことから、PMA による CNTF-mRNA の発現変化には、JunB の発現を介し CNTF-mRNA の発現減少を引き起こす機構があると考えられる。また、JunB の発現は一過性であるため、JunB の減少に従って c-Jun による CNTF-mRNA の発現上昇が引き起こされると推測される。

本研究により、培養グリア細胞は、静止時において CNTF-mRNA を定常的に発現しており、NGF-mRNA の発現を増大させるシグナルに対して、NGF-mRNA とは異なった CNTF-mRNA の発現変化を引き起こすことが明らかとなった。このときの発現調節機構を解析した結果、CNTF-mRNA の発現調節には Jun ファミリーが関与することが示唆された。

PKC の活性化により、CNTF-mRNA および NGF-mRNA の発現増大がみられ、これに jun ファミリーの発現増大が関与していることから、PKC 活性化に伴う変化は、*in vivo* における損傷時のグリア細胞でみられる変化と共通した部分をもつ可能性がある。CNTF の発現を誘導する機構には PKC の活性化から jun の発現にいたる経路が重要であると考えられるが、この経路は他の細胞内情報伝達経路とクロストークしていることが知られており、*in vivo* において CNTF の発現を増大させる経路が PKC 以外の系による調節を受けている可能性も検討する必要がある。今後、傷害によって変動する遺伝子や蛋白質の発現と CNTF の発現を比較検討することにより、中枢神経系の損傷修復における CNTF の役割が明らかにされることが期待される。

学位論文内容の要旨

学位論文審査の要旨

主査 教授 栗原 堅三
副査 教授 野村 靖幸
副査 助教授 三宅 教尚
副査 助教授 徳光 幸子

学位論文題名

培養グリア細胞における毛様体神経栄養因子の 発現調節機構の解析

申請者は長年にわたり中枢神経系における神経栄養因子について研究を行ってきたが、今回毛様体神経栄養因子の発現調節機構に関する研究成果がまとまったので、学位論文を提出した。

毛様体神経栄養因子(CNTF)は、毛様体神経に対して生存維持活性をもつ因子として同定された分子量約22 kDaの蛋白質である。最近、CNTFが種々の神経系細胞に対する広範囲な作用をもつことが、おもに *in vitro* の系を用いて明らかにされた。最近、大脳皮質の損傷時に NGF の発現増大とともに静止時にはほとんどみられなかった CNTF の発現が増大することが報告された。傷害時の NGF の発現増大は神経損傷の修復再生に寄与していると考えられており、中枢神経系における CNTF の機能も損傷の修復と関連している可能性がある。また、静止時に高い CNTF の発現がみられる嗅球では、その一次感覚入力である嗅神経が神経細胞としては唯一生涯を通じて脱落新生を繰り返している。このことから中枢神経系における CNTF の機能は、脳組織の損傷修復と密接な関係にあると推測される。そこで、CNTF の発現がどのようにして調節されているかを明らかにすることは、中枢神経系における損傷修復の機構を理解する上で重要であると考えられる。そこで本研究においては主にラット新生児の嗅球より得た初代培養グリア細胞を用いて CNTF-mRNA の発現調節機構を解析した。

NGF の発現を誘導する各種サイトカインは、培養嗅球グリア細胞における CNTF-mRNA の発現を必ずしも増大させず、bFGF や EGF のように逆に減少させる

ものもあった。これらの結果から、NGF と CNTF は異なる発現調節を受けることが示唆された。

一過性の NGF-mRNA の発現を誘導するアデニル酸シクラーゼ活性化剤フォルスコリン(FK,20 μ M)を9時間作用させると培養嗅球グリア細胞における CNTF-mRNA の発現はコントロールの20%以下まで減少し、24時間後にいたるまで回復しなかった。このことから、培養グリア細胞における細胞内 cAMP 濃度の上昇は、NGF-mRNA の発現を増大させる一方で、CNTF-mRNA の発現減少を引き起こすことが明らかとなった。また、アデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている種々の神経伝達物質や神経ペプチド、特に下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)やVIPなどの神経ペプチドが強いCNTF-mRNA発現減少効果を示すことを見いだした。嗅球においては、PACAP受容体やVIP受容体が強く発現していることが知られており、*in vivo*においてもCNTFがPACAPやVIPによる負の発現調節を受ける可能性が示唆された。蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)および転写阻害剤アクチノマイシンD(AD)を用いてCNTF-mRNAの発現減少の機構を検討したところ、この機構には新たな遺伝子発現非依存的なCNTE遺伝子の転写抑制が大きく寄与していることが示唆された。

PKC活性化剤であるPMAは、培養大脳皮質グリア細胞におけるNGF-mRNAの発現を増大させることが知られている。一方、CNTF-mRNAの発現は、PMA(0.1 μ g/ml)によって一過性に減少した後増加に転じ、24時間後には静止時の約4倍まで増大することが明らかとなった。このPMAによるCNTF-mRNAの発現増大はCHXによって完全に抑制され、新たな蛋白質合成を介した系が関与していることが示唆された。

脊髄に入力する後根神経節細胞を切断することによって、脊髄のグリア細胞において転写因子であるc-Junの発現が増大することが報告されている。また、CNTF遺伝子の転写開始点近傍には、AP-1配列が存在することなどから、培養グリア細胞におけるCNTF-mRNAとJunファミリーの発現変化を比較検討した。PMAは、c-junの発現を一過性に増大させることが見いだされた。このとき、静止時にはみられなかったjunBの発現が一過性に増大することが見いだされ、一過性のCNTF-mRNAの発現減少には、JunBによる転写抑制機構が関与している可能性が示唆された。そこで、junBに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド存在下でPMAを作用させたところ、CNTF-mRNAの発現減少を解除することが見いだされた。これらのことから、PMAによるCNTF-mRNAの発現変化には、JunBの発現を介してCNTF-mRNAの発現減少を引き起こす機構があると考えられる。また、JunBの発現は一過性であるため、JunBの減少に従ってc-JunによるCNTF-mRNAの発現上昇が引き起こされると推測される。これは、細胞内cAMP濃度上昇によって、静止時に高かったc-junの発現がCNTF-mRNAの発現と同様に減少していることやCHXによってPMAのCNTF-mRNA発現増大が解除されることとも良く関連している。

以上のように、申請者は毛様体神経栄養因子の発現調節機構において数多くの新

しい知見を得ており、本論文は博士の学位を与えるにふさわしいものと判定した。