

学 位 論 文 題 名

Investigation into Astrocyte-derived Novel Genes Induced by Treatment with Beta-amyloid

(β -アミロイド処理により発現誘導される
アストロサイト由来新規遺伝子に関する研究)

学位論文内容の要旨

【序論】

アルツハイマー病 (AD) 脳における神経病理学的変化として、神経細胞の脱落、神経原繊維変化、 β -アミロイド ($A\beta$) を含有する老人斑の出現とともに、グリオシスが認められる。多数の活性化アストロサイトが老人斑を取り囲んで突起伸長を伴った形態学的変化を起こし、様々な炎症性メディエーターを病巣周辺で産生するという現象は、老人斑周辺でのアストロサイトの活性化が近傍の神経細胞とその環境を変化せしめ、AD 病態の進行に深く関与する可能性を示している。老人斑の構成成分の中でも $A\beta$ が AD の病態進行に主要な役割を果たしており、脳内で最大比率を占める細胞種アストロサイトへの $A\beta$ の作用は、AD 病態の悪化に大きく影響すると考えられる。しかしながら $A\beta$ によるアストロサイトを介した病態進行に関する分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では、AD 病態に関与するアストロサイト由来因子を明らかにする目的で、cDNA サブトラクション法により、 $A\beta$ 反応性アストロサイト遺伝子ライブラリーを構築し、 $A\beta$ 処理により発現変動する遺伝子群を探索・同定して、機能解析を行った。

【結果と考察】

1. cDNA サブトラクション法を用いた $A\beta$ 処理による発現変動遺伝子群の同定

凝集 $A\beta$ で処理したラット胎児由来アストロサイトと、未処理の同細胞との間で、cDNA サブトラクションを実施し、両者間で発現変動を示す遺伝子を抽出した。発現誘導遺伝子群の中には、AD 患者脳脊髄液での分泌上昇が報告されているプロスタグランジン E2 の合成酵素 (PGES)、AD 患者脳での活性上昇が報告されている細胞外マトリクス (ECM) 分解酵素群の ADAMTS-4 が含まれており、いずれもラットにおいては未報告の遺伝子であった。これらラットオーソログのアミノ酸配列を同定すると共に、 $A\beta$ 処理による mRNA の発現誘導を明らかにした。

2. $A\beta$ 処理により発現誘導される新規遺伝子 Lib の同定

$A\beta$ 処理により強く発現誘導される約 5.6 kb の mRNA に由来するサブトラクティッド cDNA フラグメントは、BLAST サーチにおいて他の遺伝子との相同性を示さなかった。 $A\beta$ 処理したラットアストロサイト cDNA のファージライブラリーを作製し、サブトラクティッド cDNA フラグメントをプローブとしてその全長 cDNA を単離し、塩基配列を同定するとともに、5'-RACE 法にて本 cDNA が全長遺伝子であることを確認した。次に、ラット当該遺伝子 ORF 領域配列をもとにヒトゲノム配列を調査したところ、Chr.3q29 領域にヒトオーソログが存在することが判明し、胎児脳由来 poly (A)⁺ RNA を鋳型に RT-PCR 法にてヒト遺伝子を単離し、配列を決定した。得られた遺伝子は、典型

的なシグナル配列、ロイシンリッチリピート (LRR) の N 末端側に付随するモチーフ、15 回の LRR、LRR の C 末端側に付随するモチーフ、および 1 回の膜貫通ドメインからなる新規 LRR スーパーファミリー遺伝子であることが判明した (ラットでは 578 アミノ酸、ヒトでは 581 アミノ酸からなる)。この新規遺伝子を Lib (a LRR protein induced by beta-amyloid-treatment) と名づけた。

3. Lib 蛋白質の特性解析

Lib の C 末端に DsRed を融合させたラット Lib 蛋白質をラットグリオーマ C6 細胞に一過的に発現させ、共焦点顕微鏡観察を行ったところ、アミノ酸配列からの予測通り、Lib はタイプ I 細胞膜貫通蛋白質であることが明らかになった。LRR 蛋白質は細胞膜表面でホモもしくはヘテロで会合する例が多く報告されている。そこで次に、Flag あるいは V5 のタグ配列を C 末端にそれぞれ融合した Lib 蛋白質を作成し、COS-7 細胞に一過的に共発現後、細胞膜表面のビオチン化、引き続き、抗 Flag 抗体による免疫沈降解析を行い、Lib 蛋白質が細胞表面でホモ会合していることを明らかにした。ヒト組織でのノーザンブロッティングによる Lib の発現解析では、胎盤で強い発現を示す他は総じて発現が低く、脳では検出限界以下であった。また、TNF- α 、IL-1 β および IFN γ の 3 者で C6 細胞を処理後に、Lib mRNA 発現量の経時的変動を解析したところ、処理後 6 時間をピークとする一過的な発現上昇が検出された。以上の結果から、Lib は、脳では定常状態で発現が低く抑えられ、一方、炎症時等では誘導される遺伝子であると考えられる。

4. 癌組織における Lib の発現解析

Lib は、15 回繰り返しの LRR を有することから、細胞 - 細胞間、細胞 - 細胞外マトリクス (ECM) 間の相互作用において機能する因子ではないかと考えられる。このような相互作用は癌細胞の増殖時に特に必要とされることから、外科的摘出癌組織由来 mRNA パネルを用いて、Lib の各組織癌での発現解析を行った。その結果、乳癌において、隣接する正常組織に比べて癌組織において Lib が 3 倍以上の発現亢進を示す解析患者の割合が 70 % を超え、また、乳癌切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析においても同程度の割合で Lib mRNA の強い発現が認められた。以上の結果から、Lib が、診断マーカーとして用いられる可能性、ならびに、乳癌転移に関与する可能性が示された。

5. AD 脳における Lib の発現解析

次に、AD 脳での Lib の発現を解析した。はじめに、非 AD 脳を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行ったところ、Lib mRNA の発現は神経細胞では認められたが、アストロサイトでは認められなかった。一方 AD 脳では、神経細胞での Lib mRNA の発現が検出されない部位が存在し、その箇所では神経細胞とは異なる形態の Lib mRNA 発現細胞が出現し、特に老人斑周辺に認められた。また、脆弱化した神経細胞にも僅かに Lib mRNA の発現は認められた。さらに、老人斑周辺の Lib mRNA 発現細胞は GFAP 陽性の活性化アストロサイトであることが明らかになった。

6. Lib によるグリア細胞の移動促進と Lib 蛋白質と ECM 構成分子との相互作用解析

細胞膜表面に存在する LRR 蛋白質は細胞外蛋白質/ECM と相互作用することが報告されていることから、老人斑に隣接して存在する活性化アストロサイトでの Lib の発現は、アストロサイトの病巣への集積メカニズムに関する可能性を示唆している。そこで、Lib 蛋白質を発現するヒトグリオーマ U87MG および H4 細胞を用い、マトリゲルインベージョン解析を行ったところ、両細胞で Lib 発現による ECM 間隙でのグリア細胞移動の促進が認められた。さらに、リコンビナント Lib 蛋白質が ECM 構成分子と直接的に相互作用するか否かを抗 Lib ポリクローナル抗体を用いたプロットオーバーレイ結合解析法にて調べたところ、Lib はラミニン、コラーゲンタイプ IV、および、フィブロネクチンに対する結合活性を示した。

【まとめ】

1. $A\beta$ 処理により発現誘導される新規遺伝子 PGES、ADAMTS-4、Lib を同定した。
2. Lib の発現は乳癌組織で特異的かつ高い比率で上昇している。
3. 老人斑に隣接する活性化アストロサイトでの Lib の発現が認められる。
4. Lib は ECM 間隙でのグリア細胞移動を促進し、かつ、ECM 構成分子に対する結合活性を有することから、アストロサイトの細胞移動ならびに移動後の老人斑周辺での集積維持において、ECM-細胞間の接着制御に関与する分子であると推論される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 助 教 授 松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

Investigation into Astrocyte-derived Novel Genes Induced by Treatment with Beta-amyloid

(β -アミロイド処理により発現誘導される
アストロサイト由来新規遺伝子に関する研究)

アルツハイマー病 (AD) 脳における神経病理学的変化として、神経細胞の脱落、神経原繊維変化、 β -アミロイド (A β) を含有する老人斑の出現とともに、グリオシスが認められる。多数の活性化アストロサイトが老人斑を取り囲んで突起伸長を伴った形態学的変化を起こし、様々な炎症性メディエーターを病巣周辺で産生するという現象は、老人斑周辺でのアストロサイトの活性化が近傍の神経細胞とその環境を変化せしめ、AD 病態の進行に深く関与する可能性を示している。老人斑の構成成分の中でも A β が AD の病態進行に主要な役割を果たしており、脳内で最大比率を占める細胞種アストロサイトへの A β の作用は、AD 病態の悪化に大きく影響すると考えられる。しかしながら A β によるアストロサイトを介した病態進行に関する分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では、AD 病態に関与するアストロサイト由来因子を明らかにする目的で、cDNA サブトラクション法により、A β 反応性アストロサイト遺伝子ライブラリーを構築し、A β 処理により発現変動する遺伝子群を探索・同定して、機能解析を行った。

1. cDNA サブトラクション法を用いた A β 処理による発現変動遺伝子群の同定

凝集 A β で処理したラット胎児由来アストロサイトと、未処理の同細胞との間で、cDNA サブトラクションを実施し、両者間で発現変動を示す遺伝子を抽出した。いずれもラットにおいては未報告の遺伝子であった。これらラットオーソログのアミノ酸配列を同定すると共に、A β 処理による mRNA の発現誘導を明らかにした。

2. A β 処理により発現誘導される新規遺伝子 Lib の同定

A β 処理により強く発現誘導される約 5.6 kb の mRNA に由来するサブトラクティッド

cDNA フラグメントは、BLAST サーチにおいて他の遺伝子との相同性を示さなかった。その全長 cDNA を単離した。得られた遺伝子は、典型的なシグナル配列、ロイシンリッチリピート (LRR) の N 末端側に付随するモチーフ、15 回の LRR、LRR の C 末端側に付随するモチーフ、および 1 回の膜貫通ドメインからなる新規 LRR スーパーファミリー遺伝子であることが判明した (ラットでは 578 アミノ酸、ヒトでは 581 アミノ酸からなる)。この新規遺伝子を Lib (a LRR protein induced by beta-amyloid-treatment) と名づけた。

3. Lib 蛋白質の特性解析

Lib はタイプ I 細胞膜貫通蛋白質であることが明らかになった。LRR 蛋白質は細胞膜表面でホモもしくはヘテロで会合する例が多く報告されている。そこで次に、Flag あるいは V5 のタグ配列を C 末端にそれぞれ融合した Lib 蛋白質を作成し、COS-7 細胞に一過的に共発現後、Lib 蛋白質が細胞表面でホモ会合していることを明らかにした。また、TNF- α 、IL-1 β および IFN γ の 3 者で C6 細胞を処理後に、Lib mRNA 発現量の経時的変動を解析したところ、処理後 6 時間をピークとする一過的な発現上昇が検出された。以上の結果から、Lib は、脳では定常状態で発現が低く抑えられ、一方、炎症時等では誘導される遺伝子であると考えられる。

4. 癌組織における Lib の発現解析

Lib は、15 回繰り返しの LRR を有することから、細胞 - 細胞間、細胞 - 細胞外マトリクス (ECM) 間の相互作用において機能する因子ではないかと考えられる。このような相互作用は癌細胞の増殖時に特に必要とされることから、外科的摘出癌組織由来 mRNA パネルを用いて、Lib の各組織癌での発現解析を行った。その結果、乳癌において、隣接する正常組織に比べて癌組織において Lib が 3 倍以上の発現亢進を示す解析患者の割合が 70 % を超え、また、乳癌切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析においても同程度の割合で Lib mRNA の強い発現が認められた。以上の結果から、Lib が、診断マーカーとして用いられる可能性、ならびに、乳癌転移に関与する可能性が示された。

5. AD 脳における Lib の発現解析

次に、AD 脳での Lib の発現を解析した。はじめに、非 AD 脳を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行ったところ、Lib mRNA の発現は神経細胞では認められたが、アストロサイトでは認められなかった。一方 AD 脳では、神経細胞での Lib mRNA の発現が検出されない部位が存在し、その箇所では神経細胞とは異なる形態の Lib mRNA 発現細胞が出現し、特に老人斑周辺に認められた。また、脆弱化した神経細胞にも僅かに Lib mRNA の発現は認められた。さらに、老人斑周辺の Lib mRNA 発現細胞は GFAP 陽性の活性化アストロサイトであることが明らかになった。

6. Lib によるグリア細胞の移動促進と Lib 蛋白質と ECM 構成分子との相互作用解析

細胞膜表面に存在する LRR 蛋白質は細胞外蛋白質 / ECM と相互作用することが報告されていることから、老人斑に隣接して存在する活性化アストロサイトでの Lib の発現は、アストロサイトの病巣への集積メカニズムに関する可能性を示唆している。そこで、Lib 蛋白質を発現するヒトグリオーマ U87MG および H4 細胞を用い、マトリゲルインベージョン解析を行ったところ、両細胞で Lib 発現による ECM 間隙でのグリア細胞移動の促進が認

められた。さらに、リコンビナント Lib 蛋白質が ECM 構成分子と直接的に相互作用するか否かを抗 Lib ポリクローナル抗体を用いたプロットオーバーレイ結合解析法にて調べたところ、Lib はラミニン、コラーゲンタイプIV、および、フィブロネクチンに対する結合活性を示した。

このように、佐藤 一紀は精力的に Lib の機能解析を行ない、多くの成果をあげた。これらの業績は佐藤 一紀子に博士（薬学）の学位授与に十分値し、推薦するものである。