

氏 名 熊 田 竜 郎

学位（専攻分野） 博士(学術)

学位記番号 総研大甲第355号

学位授与の日付 平成10年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 Isolation and characterization of factors
regulating astrocyte development by a novel
expression cloning method

論文審査委員 主 査 教 授 小幡 邦彦
教 授 池中 一裕
助 教 授 森 泰生
教 授 岡野 栄之（大阪大学）

論文内容の要旨

中枢神経系では、共通の前駆細胞である神経上皮細胞から、各々の細胞系譜に特異的な遺伝子発現が行われることによって、多種多様な細胞が発生・分化する。アストロサイトに特異的に発現するグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 遺伝子の発現は、この細胞系譜への分化の有効な指標となる。したがって、GFAP 遺伝子の発現を誘導する分子を得ることは、アストロサイトの分化のメカニズムを分子レベルで解析するために有用であると考えられる。そこで、彼はアストロサイトへと分化を誘導する因子をコードする遺伝子を単離することを目的として、GFAP プロモーターの活性化を指標とした新規機能発現クローニング法を開発した。

神経情報部門では、温度感受性 SV40T 抗原を持つトランスジェニックマウスであるイモートマウスより未分化なアストロサイト前駆細胞株、HB108-10 株が樹立されている。この細胞株は、GFAP プロモーターの下流にレポーター遺伝子である lacZ 遺伝子を持つ融合遺伝子が組み込まれており、32°Cでは lacZ 遺伝子の発現は認められないが、分化誘導条件 (39°C) に培養することで初めて GFAP プロモーターの活性化による lacZ 遺伝子の発現が行われる。このアストロサイト前駆細胞株に対し、分化因子をコードする cDNA を導入すれば、分化を誘導させない条件下 (32°C) においても、lacZ 遺伝子の発現が認められるものと考えられる。そこで、彼は、この細胞株にマウス大脳の cDNA ライブラリーを導入し、これによって b-ガラクトシダーゼ (b-Gal) 陽性となる細胞を選別し、これらの細胞から PCR 法によって cDNA を回収するストラテジーをとった。

受容細胞株への cDNA ライブラリー導入には、レトロウイルスを用いた。レトロウイルスによる遺伝子導入では、受容細胞に対して障害性を示さずに、目的の遺伝子を 1 コピーのみゲノム上に組み込むことができる。したがって、分化の過程における細胞においても cDNA ライブラリーのスクリーニングが可能となる。

しかしながら、この機能発現クローニング法を用いてライブラリーをスクリーニングする上で、克服すべき 3 つの問題点があった。(1) cDNA を持つレトロウイルスを、いかに効率よく受容細胞へ導入するか、(2) 少数の b-Gal 陽性となる細胞を、多数の陰性細胞の中からどのようにして選別し、単離・培養するか、(3) 少数の受容細胞からいかにして cDNA を回収するか、という点である。

彼は、これらの問題点を克服し、機能発現クローニング法を確立した。まず、アストロサイト前駆細胞株への導入効率を高めるため、ウイルス調製法の改良を行い、より高力価のウイルスを得ることを可能にした。また、ライブラリー導入により b-Gal 陽性となる少数の細胞を選別するため、b-Gal の蛍光基質である FDG によって細胞を生染色し、セルソーター (FDG-FACS) を用いることによって、この細胞の分別を行った。ソーティング後の細胞はコンディション培地を利用することで低密度で単離・培養すること、さらに、プロウイルスとして組み込まれている cDNA は、RT-PCR 法を用いることで、わずか 10 個の細胞からも増幅することに成功した。

この新たに確立した方法を用いてアストロサイト分化因子のクローニングを行ったところ、シスタチン C をコードする 1 つの cDNA がアストロサイト前駆細胞株において GFAP プロモーターの活性化を引き起こすことを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

中枢神経系では、共通の前駆細胞である神経上皮細胞から、各々の細胞系譜に特異的な遺伝子発現が行われることによって、多種多様な細胞が発生・分化する。アストロサイトに特異的なグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 遺伝子の発現は、この細胞系譜への分化の有効な指標であり、GFAP 遺伝子の発現を誘導する分子は、アストロサイトの分化において、重要な役割を演じていると考えられる。そこで、熊田君はこのような因子をコードする遺伝子を単離することを目的として、GFAP プロモーターの活性化を指標とした新規機能発現クローニング法を開発した。

池中らにより樹立されたアストロサイト前駆細胞株、HB108-10 株は、GFAP プロモーターの下流に lacZ 遺伝子を持つ融合遺伝子が組み込まれており、この lacZ 遺伝子の発現は分化誘導条件 (39°C) では起こるが、32°C では認められない。この細胞株に、分化因子をコードする cDNA を導入すれば、分化を誘導させない条件下 (32°C) においても、lacZ 遺伝子の発現が認められるものと考えられる。そこで、熊田君は、この細胞株にマウス大脳の cDNA ライブラリーを導入し、これによって β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) 陽性となる細胞を選別し、これらの細胞から PCR 法によって cDNA を回収するストラテジーをとった。

受容細胞株への cDNA ライブラリー導入には、レトロウイルスを用いた。レトロウイルスによる遺伝子導入では、受容細胞に対して障害性を示さずに、目的の遺伝子を 1 コピーのみゲノム上に組み込むことができる。したがって、分化の過程における細胞においても cDNA ライブラリーのスクリーニングが可能となる。

しかしながら、この機能発現クローニング法を用いてライブラリーをスクリーニングする上で、克服すべき 3 つの問題点があった。(1) cDNA を持つレトロウイルスを、いかに効率よく受容細胞へ導入するか、(2) 少数の β -Gal 陽性となる細胞を、多数の陰性細胞の中からどのようにして選別し、単離・培養するか。(3) 少数の受容細胞からいかにして cDNA を回収するか、という点である。

熊田君は、これらの問題点を克服し、機能発現クローニング法を確立した。まず、アストロサイト前駆細胞株への導入効率を高めるため、ウイルス調製法の改良を行い、より高力価のウイルスを得ることを可能にした。また、ライブラリー導入により β -Gal 陽性となる少数の細胞を選別するため、 β -Gal の蛍光基質である FDG によって細胞を生染色し、セルソーター (FDG-FACS) を用いることによって、この細胞の分別を行った。ソーティング後の細胞はコンディション培地を利用することで低密度で単離・培養すること、さらに、プロウイルスとして組み込まれている cDNA は、RT-PCR 法を用いることで、わずか 10 個の細胞からも増幅することに成功した。

この新たに確立した方法を用いてアストロサイト分化因子のクローニングを行ったところ、シスタチン C をコードする 1 つの cDNA がアストロサイト前駆細胞株において GFAP プロモーターの活性化を引き起こすことを明らかにした。

本論文は発生神経生物学の主要課題であるアストログリア細胞の分化機構を研究し、分化を検定するきわめて有効な方法を開発し、それを用いた検索解析により分化因子としてシスタチン C を見いだしたもので、学位論文として十分な学問的内容を有するものである。

また、審査委員会は、熊田竜郎氏の提出論文の内容および関連事項と医学生物学一般の知識について、試問を行った。発表内容は明解で水準も高く、各委員よりの質問に対する回答は的確であったので、研究内容および研究技術等の関連事項についてもよく把握しており、理解力が優れていると判定した。また背景となる研究分野についての一般的質問についても満足すべき回答が得られたので、十分な学識を有すると判定した。博士論文の英語も適正であり、語学力も十分と判定した。

以上により、熊田竜郎氏の論文内容、学識、語学力ともに博士（学術）を授与するに値すると判定した。