

氏 名 李 佳益

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1946 号

学位授与の日付 平成29年3月24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6条第1項該当

学位論文題目 Exploring the factors causing remyelination arrest through
studying Cystatin F gene expression regulatory mechanism

論文審査委員 主 査 教授 深田 正紀
教授 池中 一裕
教授 西田 基宏
教授 飛田 秀樹 名古屋市立大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Demyelinating diseases (eg, multiple sclerosis) is a series of disorders that damage the protective myelin sheath in the central nervous system. During the process of demyelinating disease, demyelination is accompanied by remyelination at an early phase forming the shadow plaque. But at a late stage, remyelination become arrested. Cystatin F, a papain-like lysosomal cysteine proteinase inhibitor, and its main target, cathepsin C, have been demonstrated to be crucial factors in regulating remyelination arrest. It is found that the expression of cathepsin C and cystatin F are profoundly elevated and matched with ongoing demyelination/ remyelination with different kinetics. The balance of cystatin F level and cathepsin C level seems to be a crucial factor to determine whether remyelination continues or not. We have been using a chronic demyelination mouse model, named heterozygous proteolipid protein (PLP) transgenic 4e (*PLP^{4e/-}*) mouse and to study cystatin F function, Flexible Accelerated STOP Tetracycline Operator Knockin system was applied to generate gene overexpression or knockdown mice. We found cystatin F upregulation from 2.5 months of age to 4 months of age and then decreased from 4 months to 8months of age when remyelination is almost blocked. I addressed the reason of the remyelination arrested in the chronic demyelinating disorders. I also clarified the mechanisms decreasing the expression of the beneficial factor cystatin F accompanying the remyelination arrest. If the cystatin F gene regulatory mechanisms are clarified, we may be able to control cystatin F expression, thus overcoming remyelination arrest in demyelinating disorders.

To clarify cystatin F gene regulatory mechanisms, I raised three potential pathways: firstly, as cystatin F is expressed in microglia, decrease in microglia number may result in cystatin F downregulation. Secondly, cystatin F gene expression may be regulated through the decrease in the DNA promoter activity. Thirdly, post-transcriptional regulation is another important regulatory site.

I counted the microglia number in *PLP^{4e/-}* mouse by c-fms in situ hybridization. Microglia number was not decreased from 4 months to 8months in *PLP^{4e/-}* mouse. Secondly, DNA promoter activity influence on cystatin F expression was checked by switching endogenous cystatin F gene promoter to tetO promoter by skillfully use of FAST system. I surprisingly found that cystatin F expression was automatically decreased in CysF-STOP-tetO::Iba-tTA mouse from 3 weeks of age to 2.5 months of age, which suggests cystatin F gene is regulated in post-transcriptional level instead of transcriptional level. The reliability of this result was confirmed by the fact that tTA was stably expressed during this period in CysF-STOP-tetO::Iba-tTA mouse.

Furthermore, I tried to characterize cystatin F mRNA destabilizing/ stabilizing

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

factors. Data showed that the factors specifically regulating cystatin F gene expression is present in microglia but not in astrocyte. The factor(s) seem to be induced when cystatin F gene was expressed independent of mouse age.

Next, I searched for RNA stabilization/destabilization factors that match the above criteria. Two kinds of factors were found to match these condition: one mRNA binding proteins and the other non-coding molecular such as microRNAs. ELAVL-1 is an AU rich elements binding protein that has the function in stabilizing mRNA. I found ELAVL-1 was more abundantly expressed in the cerebellum white matter of CysF-STOP-tetO::Iba-tTA 3 weeks mouse than in 2.5 months mouse. In *PLP^{4e/-}* mouse from 4 months of age to 8 months of age, ELAVL-1 expressed in the microglia was significantly decreased in the thalamus. In vitro study also showed ELAVL-1 siRNA downregulated cystatin F expression. MicroRNAs is another possible regulator of cystatin F mRNA. MicroRNAs cooperating with other factors (eg. Ago2, Not4p et al.) form RNA- induced silencing complex (miRISC). The miRISC recognize the target mRNA (usually 3'UTR) and repress gene translation. MiR29a is a member or miR29 family. Its sequence indicated that miR29a would hybridized with 3'UTR of cystatin F mRNA. In my study, I detected miR29a dramatically increased from 3 weeks to 2.5 months in CysF-STOP-tetO::Iba-tTA mouse. In *PLP^{4e/-}* mouse, miR29a was found to be upregulated from 4 to 8 months old. However, in vitro, mouse NIH3T3 cells transfected with miR29a precursor did not change cystatinF expression compared with the control group. This is the first finding of the role of ELAVL-1 in cystatin F gene regulation.

In summary, cystatin F gene regulatory pathways were explored in this research. Cystatin F gene was post-transcriptionally regulated in *PLP^{4e/-}* mouse. The characters of cystatinF-mRNA stabilizing/ destabilizing factors were described in my work. ELAVL-1 as ARE binding protein stabilized cystatin F mRNA. I demonstrated ELAVL-1 decrease can lead to cystatin F gene downregulation in a post-transcriptional manner. All of these may be useful to develop a new therapy against demyelinating disorders by blocking the remyelination arrest.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

本論文は、慢性脱髄性疾患の髄鞘再生過程に重要な役割を果たす「シスタチンF遺伝子の発現制御機構」を明らかにしたものである。

脱髄性疾患の病態理解においては、髄鞘が変性するメカニズムの解明とともに、髄鞘再生過程が抑制されるメカニズムの理解も重要である。これまでに出願者が所属する研究室では、慢性脱髄巢形成モデルマウス (PLP4eトランスジェニックマウス) を用いて、髄鞘の再生時期にのみ発現し、髄鞘再生が抑制された時期に発現が停止する遺伝子としてシスタチンFを同定し、その機能解析を進めてきた。シスタチンFはシステインプロテアーゼ阻害作用を有し、特にカテプシンCを阻害することにより、IL1 β やTNF α などの炎症性サイトカインの活性化を抑制し、髄鞘再生に重要な役割を果たす。しかし、どのようにしてシスタチンFの遺伝子発現が制御されているかは不明であった。

出願者は、PLP4eモデルマウスにおいて、シスタチンFのmRNAレベルが髄鞘再生期 (2.5~4ヶ月齢) に増加し、その後髄鞘再生能の低下とともにシスタチンFの発現が低下することをin situ ハイブリダイゼーションにより見出した (4~8ヶ月齢)。そこで、出願者はシスタチンFのmRNA発現レベルの制御機構として3つの可能性、すなわち (1) シスタチンFを発現するミクログリア数の減少、(2) シスタチンF遺伝子のプロモーター活性の低下、および (3) mRNA転写後の制御機構、を考えそれぞれについて検証実験を行った。

まず、ミクログリアのマーカーであるc-fmsに対するin situ ハイブリダイゼーションにより、ミクログリアの数が脱髄巢形成時期において減少していないことを見出した。次に、Flexible Accelerated STOP Tet0 (FAST) システムを用いて、シスタチンFの内在性プロモーターの代わりに、ミクログリアで恒常的に発現誘導可能なIbaプロモーターを用いてシスタチンFを発現させた。興味深いことに、シスタチンFのmRNAレベルは3週齢以降に有意に減少することを見出した。一方、アストロサイト特異的にシスタチンFを発現させた場合には、シスタチンFのmRNAレベルの減少は認められなかった。したがって、シスタチンFのmRNAレベルの減少は、シスタチンF遺伝子のプロモーター活性の低下ではなく、ミクログリアにおける転写後のmRNAレベルの制御によるものであることが示された。

次に出願者は、シスタチンF mRNAの安定化および不安定化因子を探索し、その解析をおこなった。データベース検索を駆使して、(1) シスタチンF mRNA安定化候補因子として、mRNAの3'UTR領域に直接結合してmRNAを安定化するタンパク質ELAVL-1と(2) シスタチンF mRNA不安定化候補因子として、マイクロRNA miR29aを単離した。続いて、マウスNIH3T3細胞を用いたin vitroの解析により、ELAVL-1をノックダウンするとシスタチンFの発現が減少したことから、ELAVL-1がシスタチンF mRNAの安定化を担っていることを明らかにした。一方、このin vitroの実験条件下では、miR29aのノックダウンでは、シスタチンF のmRNAレベルに有意な変化は認められなかった。

以上のように、出願者は、慢性脱髄巢形成に重要な役割を果たすシスタチンFの遺伝子の発現制御機構について解析し、mRNA結合タンパク質 ELAVL-1をシスタチンF mRNAの安定化因子として同定した。髄鞘再生に重要な役割を担う「シスタチンFの発現制御機構」

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

を解明した本研究は、多発性硬化症を代表とする慢性脱髄性疾患の病態を理解し、治療戦略を考える上でも極めて優れた研究であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。したがって、本論文は、学位論文として十分な内容を有すると審査委員会において全会一致で判定された。