

## 中枢神経系グリア細胞発生・分化の分子機構の解明

Analysis of molecular mechanism governing development of glial cell in the central nervous system.

代表研究者 岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・教授 池中一裕  
(Kazuhiro Ikenaka, Professor, Institute for Physiological Sciences, Okazaki National Research Institutes.)

Molecular mechanisms governing glial development in the central nervous system have been investigated. A new approach for identifying factors involved in astrocyte differentiation was developed. We established an immortalized cell line (HB108-10), which expresses the lacZ gene under control of GFAP promoter, thus lacZ expression can be used as a marker for astrocyte development in this cell line. HB108-10 is presumed to be immortalized from astrocyte precursor cells and does not express the lacZ gene when cultured at 32°C. However, when the temperature is shifted to 39°C, it will resume differentiation and expresses the lacZ gene. We introduced cDNA library inserted in a retroviral vector into HB108-10 cultured at 32°C. Cells which began to express the lacZ gene were considered to have resumed differentiation and were collected by FACS after labeling the lacZ-positive cells by a fluorescent substrate, FDG. The cDNA insert was recovered by PCR and was shown to encode cystatinC. We are currently investigating how cystatinC, a cysteine protease inhibitor, is involved in astrocyte development.

Oligodendrocytes are the myelinating cells of the CNS. To characterize the oligodendrocyte lineage in vivo, we performed in situ hybridization using the probes for mRNA encoding PDGF $\alpha$  receptor mRNA, and PLP/DM-20 mRNA encoding PLP and DM-20, two isoforms of the myelin proteolipid protein, structural proteins of the CNS myelin. Direct comparison of the two markers on the adjacent paraffin sections revealed that cells containing PDGF $\alpha$ R transcript were different from the PLP/DM-20 expressing cells. To reject the possibility that the PLP/DM-20 expressing cells were not related to the oligodendrocyte lineage, we made use of the mRNA encoding UDP-galactose ceramide galactosyltransferase (CGT), the established marker for premyelinating oligodendrocytes. Obvious regional overlap between PLP/DM-20 and CGT transcripts strongly suggested the oligodendrocyte origin of the PLP/DM-20-expressing cells. Therefore, in the embryonic CNS, the expression of PLP/DM-20 and PDGF $\alpha$ R mRNAs marked different populations of the oligodendrocyte precursors.

The role of the PDGF $\alpha$ R expression in the oligodendrocyte progenitors has been characterized, while the significance of the early PLP/DM-20 expression is not yet clear. PLP/DM-20 gene is expressed and abnormality in the PLP mutants found before the myelinating period, suggesting premyelinating function of the PLP/DM-20 gene product. Previously we showed that the PLP gene expression is directly associated with secretion of a factor, which increases the number of oligodendrocytes. We showed that this activity is mediated by a fragment containing C-terminal portion of PLP or DM-20, secreted into the medium. Furthermore, a synthetic peptide corresponding to 215-232 residues of PLP/DM-20 also exhibited a similar activity. The combined evidence suggests that PLP/DM-20 gene products can regulate the development of distinct oligodendrocyte lineage in the developing CNS.

### 研究目的

脳神経系には大きく分けて、神経細胞とグリア細胞の2種類の細胞群が存在する。神経細胞は神経伝達を担当するという明白な機能を有するが、グリア細胞は脳血管関門を構築し、神経細胞に栄養を供給するほか、その機能はあまり知られていなかった。しかし、近年グリア細胞は、神経芽細胞の移動をガイドす

ること、各種成長因子やサイトカインを放出し脳内のホメオスタシス等に寄与すること、およびシナプス伝達効率の長期増強や抑圧にも不可欠であることなど、想像以上に多機能で、非常に重要な役割を果たしている細胞であることが示されてきた。しかし、哺乳類グリア細胞系譜は系統だって研究されておらず、その発生・分化機構はほとんど分かっていない。本研究においてはアストロサイトとオリゴデンドロサイト系譜の多様性について詳細に解析し、機能との対応づけを行う。また、それぞれの細胞系譜において、その発生・分化の機序を、遺伝子発現制御の観点から解析する。

## 研究経過および成果

### 1) アストロサイトの分化誘導に必要な転写因子の検索

現在、神経系発生過程の分子機構解明研究の主流は前駆細胞に新たに発現する転写因子を同定し、その下流にある遺伝子を探索する方法である。しかし、申請者らはグリア特異的に発現する構造蛋白質遺伝子からその上流の転写因子を決定していくことによって分化決定因子に迫ろうとしており、GFAP (グリア線維性酸性タンパク質) の遺伝子を活性化する転写因子をクローニングすることを当面の目標として新しいクローニング法の開発を行った。

#### ・アストロサイト細胞株の樹立

われわれはGFAP遺伝子の発現について検討し、そのプロモーター活性はアストロサイト細胞系譜において、非常に早い時期から活性化されることを既に見いだしている。そこで、GFAPプロモーター活性を指標にアストロサイト前駆細胞を不死化させることを試みた。イモートマウスは、温度感受性SV40 Large T抗原を持つトランスジェニックマウスであり、マウスの体温である39度ではSV40 Large T抗原が不活化しているためマウスは正常に生育する。しかし、イモートマウスの細胞を32度で培養するとSV40 Large T抗原が活性を取り戻し、細胞は高い確率で不死化される。GFAPプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてLacZを組み込んだレトロウイルスを、生後2日齢のイモートマウスの脳の培養細胞(32℃)に感染させた。G418で感染細胞のみを選択した後、βガラクトシダーゼの蛍光基質であるFDGを反応させ、Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS)にてFDG陽性細胞と陰性細胞を各々分取した。32℃でFDG陽性である細胞を株化して成熟アストロサイト細胞株とした。FDG陰性細胞群を株化した後その一部を39℃で培養し、分化誘導後のみにX-Gal陽性となる細胞を、未分化アストロサイトの細胞株と同定した。これらの細胞はGFAP遺伝子を活性化させる機能分子のクローニングを行うのに有用である。

#### ・レトロウイルスベクターを用いた発現クローニング法の確立

上記の細胞株を用いてGFAP遺伝子をonにする転写因子をクローニングする目的で、レトロウイルスベクターによる機能発現クローニング法の検討を行った。レトロウイルスベクターは直ちにゲノムに組み込まれるため、細胞分裂により導入遺伝子が失われることがない。また、単一コピーで導入されるために、求める形質を持った細胞を単離・精製し、導入遺伝子を回収するだけで目的遺伝子をクローニングすることができる。しかし、レトロウイルスベクターは力価が低く、実用的ではなかった。我々はまずポリオーマ初期遺伝子を従来のウイルス産生細胞に組み込むことによって、一過性発現系におけるウイルス力価を $5 \times 10^6$  CFU/mlにまで引き上げることを可能にし、cDNAクローニングに耐えられるようにした。

生後12日齢マウス脳よりポリA<sup>+</sup>RNAを調整し、cDNAとした後レトロウイルスベクターに組み込んだ。このcDNAライブラリーをわれわれの開発したバッカージング細胞(MP34)に導入し、レトロウイルスcDNAライブラリーを作製した。このものを先に示した未分化アストロサイト細胞株に感染させ、GFAPプロモーター活性上昇を指標にアストロサイトの分化を調節する因子のクローニングを行った。この方法は従来の、核内蛋白質とDNAの”結合”を指標とした転写因子のクローニング法と比較して、機能を指標にできる点がこの方法の大きな利点であり、他の遺伝子に対する転写因子の検索にも応用できるものと思われる。

GFAPプロモーターを活性化させ、β-ガラクトシダーゼ陽性になった細胞をFDG-FACSにより選別し、増殖させた後cDNAをPCRにより増幅させ回収した。塩基配列を決定したところ、シスタチンC (Cystatin C: CysC) であることが判明した。CysCはアストロサイトに発現していることが知られているので、現在このもののアストロサイト分化に及ぼす影響につき検討中である。

### 2) オリゴデンドロサイト分化・成熟因子の解析

・ミエリン塩基性タンパク質(PLP)遺伝子産物によるオリゴデンドロサイト分化促進。

PLP遺伝子はミエリン形成期以前からアストロサイトなどに発現し、オリゴデンドロサイトの分化促進あるいは生存維持に機能していることが示唆された。我々は、本研究において、このようなPLP産生細胞から放出される液性因子の本体を明らかにすることによって、PLP遺伝子の変異に伴うオリゴデンドロサイト分化異常の生じる機序を理解することを考えた。

まず、PLP遺伝子発現に伴うオリゴデンドロサイト分化・生存活性がPLPのC末端を認識するAA3抗体

(264-276アミノ酸残基を認識)によって中和されるが、AH7-2a(209-217アミノ酸残基を認識)では中和されないことを明らかにした。さらに、PLPの合成ペプチドを作製してその活性をみることにより、PLP蛋白分子の液性因子としての活性領域を調べた。その結果、PLP合成ペプチド(215-232)が、精製PLP/DM20と同様に、添加された脳初代培養系において、オリゴデンドロサイトの数を増加させる活性を持つことを明らかにした。また、このペプチドには2個のシステイン残基があり、不安定であるが、システインをセリンに置換したペプチドでも活性があり、しかも安定であることを見いだした。

### 3) オリゴデンドロサイト発生・分化過程の形態学的解析

#### ・オリゴデンドロサイトの細胞系譜

オリゴデンドロサイトは中枢神経系ミエリン形成細胞であり、神経上皮細胞由来である。しかし、脳内のどの領域から発生し、移動して分化・成熟するのか、未だ明らかとされていない。本研究においては、オリゴデンドロサイトの前駆細胞を発生段階の早期から検出することが示された2種類のプローブ{Platelet Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) -cDNAおよびPLP-cDNAを用いて、マウス脳内オリゴデンドロサイトの細胞系譜を解析した。

胎仔期マウス脳内においてPDGFR $\alpha$ -mRNAとPLP/DM20-mRNAを産生している細胞は異なった細胞であることが示された。さらに、延髄領域ではPLP/DM20-mRNA産生細胞が、また視神経においてはPDGFR $\alpha$ -mRNA産生細胞がオリゴデンドロサイトに分化することが示され、脳内の領域によってオリゴデンドロサイトの系譜が異なることが明らかとなった。

オリゴデンドロサイト前駆細胞はPDGFによってその分化・増殖が制御されていることが知られているが、今回新たにオリゴデンドロサイト前駆細胞であることが示された延髄におけるPLP/DM20-mRNA産生細胞はPDGF受容体を発現しておらず、PDGFによる制御を受けられない。前述のようにPLP遺伝子が細胞に発現すると、そのC-末端端60アミノ酸残基を含んだ領域は細胞外に分泌され、オリゴデンドロサイトの分化・増殖を制御し得ることが示された。

以上の結果より、脳内においてオリゴデンドロサイトには少なくとも2種類の異なった細胞系譜が存在することが明らかとなり、その内一つはPDGFにより細胞数が制御され、他方はPLP遺伝子産物の断片により制御されていることが示唆された。

#### ・CGT遺伝子発現調節機構の解析

オリゴデンドロサイトは分化の最終段階でミエリン形成を行う。その際、多くのミエリン蛋白質遺伝子の発現を誘導もしくは著しく上昇させる。セラミドガラクトース転移酵素(CGT)遺伝子の発現を解析した結果、本遺伝子はこのミエリン形成期に新たに誘導のかかるものであることが明らかとなった。そこで、オリゴデンドロサイトがミエリン形成を行う際の分子機構を理解する目的で、CGT遺伝子の発現調節機構の解明を試みた。

まず、CGT遺伝子の構造を決定するために、コスミドベクターを用いたマウスゲノムライブラリーからCGT遺伝子断片をクローニングし、転写開始部位を決定した。プロモーター領域の塩基配列を決定した後、様々な5'末端から+49の部分を作りだし、ホタルのルシフェラーゼを含む発現ベクターに組み込んだ。これらをCG4細胞(オリゴデンドロサイト前駆細胞株)とNIH3T3細胞に導入し、そのルシフェラーゼ活性を指標としてプロモーター活性を測定した。プロモーターアッセイの結果、CGT遺伝子の組織特異的な発現に携わる配列は-309から-99の領域に存在することが分かった。コンピューター検索により、この領域にはミエリン構成蛋白であるMBP、PLPにおいて既に組織特異的な発現にかかわることが示唆されている配列や、SP1のように広範に発現されている転写因子の結合部位が複数存在していることが分かった。ゲルシフトアッセイにおいて認められた-141から-99の領域への蛋白質の特異的結合は、この領域が機能的なエレメントを含んでいる可能性を強く示唆していた。

#### 今後の課題と発展

上述の1)~3)ごとに述べる。

- 1) アストロサイト分化因子のクローニング方法を開発したので、シスタチンC以外の因子もクローニングする。また、シスタチンCのアストロサイト分化誘導機構を解明する。
- 2) PLP遺伝子産物断片受容体の同定をはじめ、そのシグナル伝達機構の解明。また、他の生理活性の検索。
- 3) オリゴデンドロサイトの系譜に少なくとも2種類あることを示したので、その系譜ごとの生理学的性質の解明。また、ミエリン形成誘導機構の解明。

発表論文リスト

Yonemasu, T., Nakahira, K., Okumura, S., Kagawa, T., Espinosa de los Monteros, A., de Vellis, J. and Ikenaka, K. (1998) The Proximal Promoter Region is Sufficient to Regulate the Tissue-Specific Expression of UDP-Galactose: Ceramide Galactosyltransferase Gene. *J. Neurosci. Res.*, 52., 757-765

Miyamura, T., Morita, N., Baba, H., Hase, S., Kajimoto, T., Tsuji, S., Kawata, M., Kato, I., Mikoshiba, K. and Ikenaka, K. (1998) Metabolic labeling of a subset of glial cells by UDP-galactose: implication for astrocyte lineage diversity. *J. Neurosci. Res.*, 52., 173-183

Yoshimatsu, T., Tamura, M., Kuriyama, S. and Ikenaka, K. (1998) Improvement of retroviral packaging cell lines by introducing the polyomavirus early region. *Human Gene Therapy.*, 9., 161-172

池中一裕、熊田竜郎、南木浩二、(1998) グリアを中心とした脳の分子生物学 *NEUROLOGICAL SURGERY.* 26, 297-301

中平健祐、藤本一朗、岩崎靖乃、池中一裕、(1998) Neuron-gliaの細胞系譜 *脳の科学*、20, 353-359

Wakazono, Y., Kurahashi, T., Nakahira, K., Nagata, I., Takayama, C., Inoue, Y., Kaneko, A. and Ikenaka, K. (1997) Appearance of a fast inactivating voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in developing cerebellar granule cells in vitro. *Neurosci. Res.*, 29., 291-301

Kagawa, T., Mekada, E., Shishido, Y. and Ikenaka, K. (1997) Immune system-related CD9 is expressed in mouse CNS myelin at a very late stage of myelination. *J. Neurosci. Res.*, 50., 312-320

Baba, H., Nakahira, K., Morita, N., Tanaka, F., Akita, H. and Ikenaka, K. (1997) GFAP gene expression during development of astrocyte. *Dev. Neurosci.*, 19., 49-57

Morita, N., Nakahira, K., Baba, H., Akita, H., Kumada, T., Ogawa, M., Nakajima, K., Kawata, M., Mikoshiba, K. and Ikenaka, K. (1997) Astrocytic lineage analysis by detection of GFAP promoter activity in vitro. *Dev. Neurosci.*, 19., 210-218

池中一裕、(1997) Myelin proteolipid protein (PLP) *Molecular Medicine Vol.34 臨時増刊号 ノックアウトマウス・データブック*, 342-343

Yamada, M., Kagawa, T. and Ikenaka, K. (1996) Development and Differentiation of Oligodendrocytes. *Jpn. J. of Physiology.*, 46., 105-110

Fujimoto, I., Oiki, S., Kondo, T., Katada, T., Kato, H., Taguchi, T., Kasai, M., Okada, Y., Mikoshiba, K. and Ikenaka, K. (1996) GTP-binding protein activation underlies LTP induction by Mast Cell Degranulating peptide. *Neurosci. Res.*, 25., 229-237

Kagawa, T., Oba, A., Okumura, S. and Ikenaka, K. (1996) Localization of mRNA for UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase in the brain during mouse development. *Dev. Neurosci.*, 18., 309-318

Yamaguchi, Y., Ikenaka, K., Niinobe, M., Yamada, H. and Mikoshiba, K. (1996) Myelin proteolipid protein (PLP), but not DM-20, is an inositol hexakisphosphate binding protein. *J. Biol. Chem.*, 271., 27838-27846

鹿川哲史、池中一裕、(1996) ミエリンプロテオリピド蛋白質 *CLINICAL NEUROSCIENCE.* 14, 246-247

池中一裕、山田真久、山口宜秀、鹿川哲史、(1996) ミエリンプロテオリピド蛋白質遺伝子発現異常とミエリン形成異常 *ブレインサイエンス*, 7, 273-280