

氏名 (本籍)	酒井 秀樹 (愛知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 383 号
学位授与日付	平成 10 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	<b>Molecular cloning and differential expression of the genes during glioma cell differentiation</b>
	1) Identification of differentially expressed mRNAs during rat C6 glial cell differentiation by mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR (RAP)
	2) Molecular cloning of a cDNA encoding a serine protease homologous to complement C1s precursor from rat C6 glial cell and its expression during glial differentiation
審査委員	(主査) 教授 坂井 昇 (副査) 教授 野澤 義則 教授 岡野 幸雄

### 論文内容の要旨

悪性グリオーマは外科的切除や放射線・化学療法などの様々な補助療法に抵抗を示し、いまだ十分な治療成績をあげることでできない予後不良の疾患である。これはグリオーマの発生する臓器が全摘出不可能な中枢神経系であることに加え、著しい浸潤・増殖能などの生物学的特性が治療を困難にしているためである。しかし今日まで、これらの生物学的特性獲得の詳しいメカニズムやグリオーマの発生機序そのものについて明らかにされていない。同時に、グリオーマの発生母地と考えられているグリア細胞自体の機能や細胞分化に関してもいまだ未知な点が多く残されている。

グリオーマ細胞は *in vitro* で dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) やレチノイン酸などの薬剤により人為的に分化誘導できることが知られている。なかでも、ラット C6 グリオーマ細胞の cAMP による分化誘導の実験系はアストロサイトへの細胞分化モデルとして広く用いられている。かかる観点から、グリア細胞の分化のメカニズムをこのようなモデル実験系を用い分子レベルで解析することは、グリオーマの発生機序や生物学的特性の解明にとって有意義かつ重要であると思われる。現在、グリオーマ細胞において、癌遺伝子をはじめとするいくつかの遺伝子異常がすでに知られてはいるが、グリオーマの発生機序や生物学的特性の詳細は明らかにされていない。そこで今回申請者らは、この C6 グリオーマ細胞分化誘導モデルにおいて、mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR (RAP) 法を用いて分化誘導に伴う遺伝子発現レベルでの変化をスクリーニングし、グリオーマの発生や進展に関わりうる未知遺伝子の探索を行った。

#### 研究方法

1) ラット C6 グリオーマ細胞の分化誘導と total RNA 抽出: subconfluent にまで培養した C6 細胞を 1mM dbcAMP および 0.25mM theophylline を添加した serum free DMEM に培養液交換し分化誘導した。分化誘導後、経時的に C6 細胞から total RNA を抽出した。また、分化誘導前の細胞をコントロールとし同様に total RNA を抽出した。

2) RAP 法: 抽出した total RNA を random primer を用い逆転写反応により cDNA に変換し、これを  $^{32}\text{P}$  ラベルした 8 種類の arbitrary primer を使用して RAP 法で解析した。PCR 産物を 6% 変性アクリルアミドゲル上で電気泳動し、その autoradiogram から興味ある変化を示すバンドをゲルより切り出した。このゲル片より DNA を抽出し再増幅の後これをサブクロニングした。ついでサブクロニングした cDNA 断片を probe として RAP 法でみられた発現量の変化を Northern blot 法にて確認した。同時に C6 細胞のアストロサイトへの分化の指標として glial fibrillary acidic protein (GFAP) および S100B protein の遺伝子発現も検討した。さらに Northern blot 法と RAP 法の結果が合致した cDNA clone に対しては nucleotide sequencing を行いインターネット上にて homology search した。

3) cDNA クローニングおよびラット脳における遺伝子発現の検討: homology search の結果、C6 細胞分化誘

導にて発現誘導される新規遺伝子の1つをRT-PCR法およびrapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を用いてcDNAクローニングした。また、この遺伝子のラットの各臓器における遺伝子発現をNorthern blot法およびRT-PCR法にて検討した。さらに、この遺伝子の*in vivo*における発現の変化を調べるため胎生18日、生後0、7、14日のラット全脳よりtotal RNAを抽出し、RT-PCRおよびPCR Southern hybridization法を行った。

#### 結果

1) RAP法によるC6細胞分化誘導時の遺伝子発現変化のスクリーニング：8種類のarbitrary primerを用いたRAP法により約600本のバンドを観察した。この中から8個のcDNA断片をサブクローニングしたが、Northern blot法とRAP法の結果が一致したのは4個であった。homology searchの結果これらcDNA断片のうち、2個は既知の遺伝子でcalnexinおよびtriose phosphate isomerase遺伝子であった。残り2個は新規遺伝子でありそれぞれハムスター補体C1s proteaseとウサギdystrobrevin遺伝子と高い相同性を示した。

2) ラット補体C1s protease遺伝子のcDNAクローニングとその臓器別発現：ハムスター補体C1s protease遺伝子に高い相同性を示したcDNA断片のcDNAクローニングを行ったところ、この遺伝子は694アミノ酸から成る蛋白質をコードをしていることが明らかになった。アミノ酸配列の1次構造からこの蛋白質はN末端にシグナルペプチドを有する分泌型セリンプロテアーゼであり、この遺伝子を*r-gsp*遺伝子と命名した。*r-gsp*遺伝子はcDNAの1次構造およびその相同性から、ラットの補体C1s protease遺伝子であると推測された。また、臓器別発現では脳を含む多くの臓器で発現が確認され、とくに肝臓および脾臓に強く発現していた。

3) ラット脳発達における*r-gsp*遺伝子の発現量変化：出生前後のラット脳を用いたPCR Southern hybridization法の結果から、この*r-gsp*遺伝子は出生後、脳の発達に伴って発現量が上昇することが明らかになった。この発現量の変化はGFAPやS100B protein遺伝子の発現変化とよく一致していた。

#### 考察

今回の研究によりRAP法を用いてグリオーマ分化誘導に関わる遺伝子を4個明らかにした。これら遺伝子のうち今までグリア細胞の分化に関与していることを報告されたものはなかった。これらの遺伝子が、グリア細胞の分化やグリオーマの生物学的特性にどの程度関わっているかはさらに検討が必要であるが、この細胞分化モデルにおける遺伝子発現の変化をスクリーニングする方法としてRAP法は有用であった。

また、本研究ではグリオーマ細胞分化誘導に関連する遺伝子として*r-gsp*遺伝子が新たにクローニングされ、これはラットの補体C1s protease遺伝子と高い相同性を示した。C1s proteaseは補体系のclassical pathwayといわれるprotease cascadeに属するセリンプロテアーゼである。最近、このC1s proteaseが補体系以外にも様々な蛋白質を分解することが知られ、その機能が注目されつつある。一方、中枢神経系においてセリンプロテアーゼファミリーに属する多くのプロテアーゼが神経細胞の分化・発達、神経活動、神経可塑性などに関与していることが知られている。今回クローニングされた*r-gsp*遺伝子においても、その遺伝子発現がラット脳の発達にともない増加することから、グリア細胞の分化などの脳の機能や発達にこのセリンプロテアーゼが関与している可能性が示唆された。また、分化誘導前のC6細胞では*r-gsp*遺伝子の発現が少ないものの分化誘導刺激で著明に発現誘導されることから、この遺伝子が未分化な腫瘍細胞としてのC6グリオーマ細胞の生物学的特性にも何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 酒井秀樹はラットC6グリオーマ細胞の分化誘導に関わる遺伝子を、mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR (RAP) 法を用いて探索した。その結果、グリオーマ細胞分化誘導関連遺伝子として*r-gsp*遺伝子をクローニングし、そのcDNAの1次構造を明らかにした。さらに、*r-gsp*遺伝子はラット補体C1s protease遺伝子と相同性が高く、この遺伝子がグリア細胞の分化に関与している可能性を示した。本研究の成果は脳神経外科および分子腫瘍学の発展に少なからず寄与するものと認められる。

#### [主論文公表誌]

Molecular cloning and differential expression of the genes during glioma cell differentiation

1) Identification of differentially expressed mRNAs during rat C6 glial cell differentiation by mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR (RAP)

平成9年9月発行 Neuroscience Letters 229 : 93~96

2) Molecular cloning of a cDNA encoding a serine protease homologous to complement C1s precursor from rat C6 glial cell and its expression during glial differentiation

印刷中 GENE