



Novel neuron-specific promoter derived from murine cytomegalovirus early gene (M112-113) in transgenic mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 新井, 義文 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1206

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 353号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	新井義文		
論文題目	<p>Novel neuron-specific promoter derived from murine cytomegalovirus early gene(M112-113)in transgenic mice (神経細胞特異的発現を示したマウスサイトメガロウイルス早期遺伝子M112-113プロモーター導入トランスジェニックマウス)</p>		

博士(医学) 新井 義文

論文題目

Novel neuron-specific promoter derived from murine cytomegalovirus early gene (M112-113) in transgenic mice
(神経細胞特異的発現を示したマウスサイトメガロウイルス早期遺伝子M112-113プロモーター導入トランスジェニックマウス)

論文の内容の要旨

[目的]

サイトメガロウイルス (CMV) は胎内感染や免疫不全状態において、脳炎、脳症や精神発達遅滞などの中枢神経疾患を引き起こすことが知られている。中枢神経系神経細胞は CMV が持続感染する代表的な宿主細胞のひとつであり、マウス胎内感染モデルにおける新生仔マウス脳の免疫組織学的検索から、マウス CMV (MCMV) 早期遺伝子 M112-113 (e1) の転写産物抗原が神経細胞では比較的長期にわたって発現することが示されている。しかし、これまで CMV の神経細胞親和性を直接証明する結果は得られておらず、CMV の持続感染あるいは遺伝子発現が如何に脳機能に作用するかという点に関しても明らかでない。

そこで今回私達は早期遺伝子 e1 プロモーター発現の細胞特異性および宿主細胞内転写調節因子との関係を検索すべく、e1 遺伝子プロモーターを導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作成して、個体レベルで MCMV e1 遺伝子の転写活性を解析した。

[方法]

- 1) 導入遺伝子の設計: MCMV Smith 株のゲノムライブラリーから、早期遺伝子 e1 の翻訳転写開始点を含む上流 1572bp の DNA フラグメントをサブクローニングし、その下流に核移行シグナルおよび lacZ を配して導入遺伝子を作成した。
- 2) Tg マウスの作成: BDF1 × BDF1 交配によって得られた受精卵の 1 細胞期前核内に導入遺伝子を注入し、偽妊娠させた ICR マウス卵管内に同受精卵を移植することで Tg マウス作出を行った。
- 3) 導入遺伝子の確認および Tg マウス系統の樹立: 導入遺伝子の確認は、尾から抽出した DNA について導入遺伝子配列を特異的に認識するプライマーセットを用い、PCR による標的遺伝子の増幅の有無によって行った。陽性バンドが得られた個体は C57BL/6 マウスとの交配を重ね Tg マウスの系統を樹立した。発現陽性系統はサザンプロット法により、抽出した DNA を用いて導入遺伝子のコピー数を算定した。
- 4) 導入遺伝子の発現解析: 導入遺伝子の発現はマウスの発育段階 (胎齢 18.5 日、生後 3、7、28 日) に従い、X-gal 組織化学染色および抗 β ガラクトシダーゼ (β -gal) 免疫染色にて検索した。検索個体はエーテル麻酔により安楽死させた後、4% パラホルムアルデヒド (PFA) にて還流固定して全臓器を取り出し、さらに 4% PFA 中に室温 30 分で半固定したものを X-gal 染色用、室温で 7 日間後固定したものを免疫染色用として準備した。発現陽性細胞の細胞特異性を検索するため、それぞれ抗 NSE、抗 GFAP 抗体と抗 β -gal 抗体で免疫二重染色を行った。
- 5) MCMV 脳内感染: 出生母親を同じくするひと腹分の新生仔 Tg マウス群を半数に分け、半数は脳内に MCMV Smith 株 10^5 PFU を直接接種し、残りの半数は感染陰性コントロールとしてウイルス希釈液の

みを脳内に注入した。1週間後に脳組織を取り出して上記と同様の方法で、MCMV感染による導入遺伝子の発現変化を免疫組織学的に観察した。MCMV感染細胞の同定には私達の作成した、MCMV抗原に対するモノクローナル抗体を用いた。

[結果]

遺伝子導入の確認された10系統のうち、4つの系統で発現がみられた。サザンプロット法による導入遺伝子のコピー数はNIH imageにより次のように算定された(Tg-029:10コピー、Tg-041:32コピー、Tg-046:3コピー、Tg-033:12コピー)。

X-gal染色および抗 β -gal染色によって導入遺伝子の発現を調べると、その発現はいずれの系統とも中枢神経系のみで認められた。免疫組織学的に β -gal陽性細胞は抗NSE抗体にて二重染色され、抗GFAP陽性細胞とは二重染色されず、発現細胞は神経細胞であることが確認された。生後4週齢における発現部位は、大脳皮質、海馬、扁桃体、大脳基底核群、小脳皮質・歯状核、脳幹、脊髄後角であった。中枢神経系以外の胸腹部内臓組織、皮膚および軟部組織には発現が認められなかった。

発育段階に沿った発現の変化を胎生期から生後4週まで(胎齢15.5、18.5日、生後3、7、28日)追跡したところ、胎生期には導入遺伝子の発現はほとんどみられず、生後週齢を経る毎に発現陽性細胞数の増加と分布の広がりが観察された。特に大脳皮質、海馬においてその傾向が明瞭であった。

Tgマウス新生仔の脳内にMCMVを感染させると、Tg-046、-033の2系統では感染による β -gal陽性細胞数の増加と分布の広がりが主に大脳皮質や海馬で観察された。Tg-033では非感染状態では導入遺伝子の発現が検知感度以下であったものが、MCMV感染によって発現陽性となる特徴があった。MCMV感染陽性細胞を免疫組織学的に検索したところ、感染細胞は β -gal陽性細胞と同様に大脳皮質、海馬などでみられ、 β -gal陽性細胞とウイルス抗原陽性細胞が二重染色された。他の系統ではMCMV感染の有無による導入遺伝子の発現に明らかな差はみられなかった。

[結論]

MCMV早期遺伝子M112-113は、Tgマウスを用いた個体レベルの発現解析において中枢神経系神経細胞に特異的に発現することが明らかとなった。発現はすべての神経細胞でみられるのではなく、脳の部位によってその発現が異なり、また脳の発育によっても発現の分布や陽性細胞数が変化することが分かった。MCMVの脳への感染においてこの遺伝子転写産物は神経細胞で持続的に検出される傾向があり、この遺伝子発現に関わる神経細胞特異的な転写調節因子の存在が想定される。サイトメガロウイルスが胎内感染や免疫不全状態において中枢神経系に持続的に感染して脳障害を起こしやすいことと関連して、この遺伝子の発現が神経細胞障害の原因になっている可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

サイトメガロウイルス(CMV)は胎内感染や免疫不全状態において、小脳症、精神発達遅滞、脳症などを引き起こすことが知られている。申請者の属する研究室では、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)をマウス胎仔に感染させて、ヒト先天性サイトメガロウイルス感染のモデルとし、母体ウイルス感染による脳障害の発生機構について明らかにしてきている。以前に、MCMVをマウス胎仔に感染させると、脳細胞でも特に神経幹細胞やグリア前駆細胞が障害を受けて細胞数の減少がおり、小脳症となること

が明らかにされている。一方、MCMVの早期核抗原に対するモノクロナル抗体D5を作製し、この抗体を用いて脳におけるMCMVの持続感染を観察したところ、このウイルス蛋白は神経細胞にのみ認められ、前初期抗原が検出される細胞とは細胞種を異にしていることが見出されていた。

そこで、申請者は神経細胞に発現するこの早期遺伝子に注目し、CMVの持続感染と早期遺伝子との関連性を明らかにするために、早期遺伝子e1プロモーターをLacZ遺伝子に連結したコンストラクトでトランスジェニックマウスを作製し、早期遺伝子e1のプロモーター活性を個体レベルにおいて空間的時間的に検討した。

申請者はまずプロモーターの長さの検討を細胞培養レベルで行い、より長い-1,534~+38が転写活性が最大であること、および前初期遺伝子IE3により転写活性化を受けることを確認し、この長いプロモーターをLacZ遺伝子に連結したコンストラクトでトランスジェニックマウスを作製した。申請者自身が10系統のトランスジェニックマウスを作製したところ、4系統がプロモーター活性を示すことが明らかになった。この4系統のトランスジーンのコピー数も定量し、3-32コピーであることを確かめている。

このマウスを用いて、申請者はウイルス早期遺伝子e1プロモーター活性を β -galactosidase(β -gal)蛋白の発現を指標に詳細な検討を行った。 β -gal蛋白の発現は脳、小脳、脊髄などの中枢神経のみで認められ、他の主要臓器は陰性であった。抗 β -gal抗体を用いた詳細な免疫組織染色の結果、中枢神経系で発現している細胞は神経細胞のみであることが明らかになった。

次に、 β -gal蛋白陽性細胞が神経細胞であることを確かめるために、マーカー蛋白抗体との二重染色を行った。抗 β -gal抗体と抗NSE抗体で二重染色される細胞は存在したが、抗 β -gal抗体と抗GFAP抗体で二重染色される細胞はなかった。このことから、早期遺伝子e1は神経細胞の亜集団に発現することが判明した。

さらに、出生直後のトランスジェニックマウスの側脳室にMCMVを注射して感染させた場合の早期遺伝子e1プロモーター活性を観察したところ、低発現のマウス系統でウイルス感染によりこの早期遺伝子の転写活性の著明な増加が観察された。これは、早期遺伝子プロモーターが、ウイルス前初期遺伝子IE産物により活性化されたためと解釈できる。

申請者は、ウイルス持続感染という興味深い現象の解明のために、自らトランスジェニックマウスを作製し、胎生期や出生後の脳を詳細に検討し、早期遺伝子が一部の神経細胞でのみ発現していることを見出した。この結果はウイルスの持続感染が一部の神経細胞で起きやすいことと一致し、またCMVが脳障害を起こしやすいことと関連して、CMV持続感染による脳障害の発生機構を解明する上での重要な手がかりになると高く評価される。また一部の神経細胞には前初期遺伝子には依存せずに、MCMV早期遺伝子e1プロモーターを活性化する因子が存在することが想定されるので、この因子の解明への道を開く研究としても評価できる。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) 作製した10系統のうち4系統しか遺伝子発現を示さなかったのは普通か
- 2) すべての神経細胞が β -gal陽性にならない理由は
- 3) 大脳皮質の6層構造ではどの層に発現しているか
- 4) トランスジーンが発現細胞とD5抗体陽性細胞は同じ分布をするか
- 5) β -gal陽性細胞はドーパミンニューロンとは関係あるか
- 6) ブラインドでウイルス注射を側脳室に行っているが、いつも感染しているのか

- 7) 胎児への MCMV 感染の時、脳はどのような細胞が影響をうけるのか
- 8) MCMV 感染で脳腫瘍はできないのか
- 9) トランスジェニックマウス系統差をどのように解釈するか
- 10) ウイルス感染は神経細胞の移動に影響を与えるのか
- 11) 今回のトランスジェニックマウスと似た染色パターンを示す他のトランスジェニックマウスは報告されていないか

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦直行
副査 福田教夫 副査 難波宏樹