

論文内容の要旨

論文題目 シュワン細胞における S100B の発現調節と機能解析

指導教員 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 藤原清香

要旨

S100 タンパクは神経系のグリア細胞に豊富に発現する細胞内カルシウム結合タンパクで、組織学的マーカータンパクとしても知られる。なかでも S100B は末梢神経のグリアであるシュワン細胞の特異的マーカータンパクである。しかしシュワン細胞を特徴付けている S100B の誘導メカニズムは未だ明らかではない。本研究では末梢神経におけるシュワン細胞の分化・ミエリン形成に重要な転写因子を中心に、S100B の発現調節機構の解析を行った。

シュワン細胞における Sox10 と各種マーカータンパクについて検討すると、mRNA レベルにおいて Sox10 が S100B に先駆けて発現し、維持されていた。S100B は Sox10 の発現にひき続いて発現量が増加した。S100B がシュワン細胞の分化とともに Sox10 によって誘導されてくる可能性は十分あると考えた。

次に Sox10 が S100B のプロモーターに結合するのではないかと考え、プロモーター解析を行った。Krox20, Oct6, Pax3, Sox10 を導入したところ、Sox10 だけが強い転写活性を有していた。

さらに S100B の配列の上流 1000 塩基のプロモーター部分を徐々に削ったデリレーションコンストラクトを作製し、このデリレーションアッセイから S100B のプロモーターにおける Sox10 のコンセンサスバインディングモチーフと類似の配列が探索したところ、三箇所について認めた。

三箇所の Sox10 のコンセンサスバインディングモチーフ類似の各部分について変異コンストラクトを作製し、これを用いて再びルシフェラーゼアッセイを行った。この変異コンストラクトでは、そのうち二箇所についてシュワン細胞においても、Sox10 を過剰発現した Hela 細胞においても活性低下を認めた。

さらに S100B プロモーターのイントロン領域にも Sox 結合モチーフを一箇所について認め、これについても同様にデリレーション、および変異コンストラクトを作製したところ転写活性の低下を認めた。以上から Sox10 が S100B プロモーターの上流二箇所およびイントロン一箇所の Sox10 応答領域に結合し、発現誘導すると考えた。

続いてシュワン細胞において Sox10 は内在性に発現していることから、Sox10 の発現を抑制するために siRNA を作製した。生後 2 日齢ラットの坐骨神経から採取し、培養したシュワン細胞に、siSox10 と siGFP を導入し、mRNA を回収して real time RT-PCR を行った。まず Sox10 については、siSox10 の導入により siGFP 導入細胞に比較し 6 割強の有意な低下を認めた。S100B については siSox10 は

siGFP に比較して有意な低下を認めましたが、Sox10 によって直接誘導されることがわかっている P0 に比べると、やや反応が劣っていた。この siSox10 をコトランスフェクションさせ、S100B プロモーターの変異コンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。siGFP ではこれまでの変異アッセイと同様の三箇所の変異で活性の低下を認めましたが、siSox10 導入したものでは、全長 1000 塩基の活性が低下し、しかもどの変異コンストラクトもほぼ同レベルの活性を示して、変異コンストラクトにおける有意な低下を認めなかった。

続いて Sox10 遺伝子の過剰発現や RNA 干渉法を用いた発現抑制（ノックダウン）により S100B 遺伝子およびタンパクの発現量への関与を検証した。まず Sox10 発現ベクターを作成し、これをシュワン細胞および ROS 細胞へ導入して Sox10 を過剰発現させたところ、S100B の mRNA の発現が上昇し、またタンパクレベルでの発現も上昇した。一方 RNA 干渉法を用いた Sox10 発現抑制により、S100B の mRNA の発現が低下し、またタンパクレベルでの発現が減少した。

クロマチン免疫沈降法による検討では、Sox10 と S100B を多量に発現しているシュワン細胞の cell lysate を用いたが、これにより in vivo での Sox10 と S100B プロモーターの結合をプロモーターアッセイで判明した三箇所の Sox10 応答領域において確認した。

Sox10 は末梢神経におけるシュワン細胞のミエリン形成に深く関与していることが知られる。こうした Sox10 がシュワン細胞のマーカータンパクである S100B についてもその転写および発現制御に関わっていることが解った。

S100B タンパクは主に中枢神経系における機能について報告されているが、

シュワン細胞においても同様の働きをしているのか検討を行った。

in vitro の実験で、シュワン細胞を増殖条件において培養したものと、分化条件で培養したものでは **S100B** の mRNA の発現量に差があり、増殖条件において **S100B** が低下していた。**S100B** の発現ベクターを C3H10T1/2 細胞に過剰発現させたものと、発現抑制したものでは、発現抑制したもので細胞増殖が促進していた。同様に **Sox10** についても、その発現抑制で **BrdU** アッセイでも **MTT** アッセイでも増殖の促進を認めた。続いてシュワン細胞においても **S100B** の過剰発現と発現抑制で **BrdU** アッセイを行うと、**S100B** 発現抑制で増殖の促進を認めた。同様に **Sox10** についても、その発現抑制で **BrdU** アッセイでも **MTT** アッセイでも増殖の促進を認めた。以上からシュワン細胞において **S100B** は細胞増殖に抑制的に関与し、その上流にある **Sox10** についても同様の結果を得た。

S100B 欠失マウスでは中枢神経系での **MBP** の発現が下がると報告されており、シュワン細胞でもミエリン形成や分化に関わる可能性が考えられた。そこで後根神経節ニューロンとシュワン細胞の共存培養 (**DRG** 分散培養法) を用いて、シュワン細胞のミエリン形成を観察した。シュワン細胞における **S100B** を発現抑制して検討したところ、**S100B** 抑制シュワン細胞でミエリン形成の低下を認めた。従ってシュワン細胞分化において、**S100B** がミエリン形成に促進的な作用を有している可能性が示唆された。

以上よりシュワン細胞の数々の分化にかかわる転写因子の中で **Sox10** が **S100B** の誘導に関与し、**Sox10-S100B** シグナルが細胞増殖やミエリン形成に作用していることが本研究過程において明らかになった。**S100B** は臨床において注

目されているタンパクである。病的状態における Sox 分子の発現解析とあわせて、S100 タンパクの機能の解明につながる可能性がある。

シュワン細胞において Sox10 がシュワン細胞のマーカータンパクとも言われる S100B を直接転写誘導することを明らかにした。さらにシュワン細胞においてこの Sox10-S100B シグナルが細胞増殖とミエリン形成に関与していることを示した。