

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

篠原 洋一郎 印

(学位論文のタイトル)

Viral Vector-Based Dissection of Marmoset GFAP Promoter in Mouse and Marmoset Brains  
(マウスおよびマーモセットの脳におけるマーモセット由来GFAPプロモーターのウイルスベクターによる分析)

(学位論文の要旨)

トランスレーショナルリサーチを見据えた疾患の病態解明や治療法開発には非ヒト霊長類が極めて有用であるが、中でもマーモセットはラットと同程度の大きさで、マカクやニホンザルよりはるかに繁殖力が高いため、急速に用いられはじめている。マーモセットの脳に効率的に外来遺伝子を発現させるには、脳組織内で拡散するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが有用であるが、AAVにはパッケージ限界があり、大きな外来遺伝子の搭載が難しい。サイズの小さいプロモーターがあれば、大きな外来遺伝子を発現することが可能となるが、一般的に細胞種特異的プロモーターはサイズが大きい。また、マーモセットの脳で細胞種特異的に働くプロモーターはほとんど調べられていない。そこで本研究では、マーモセットのアストロサイトで特異的に働くコンパクトなプロモーターの開発を目的とした。

マーモセットゲノムからアストロサイト特異的に発現するGFAP遺伝子上流プロモーター領域(cjGFAPプロモーター)のクローニングを行った。6種類の長さ(2.0kb、1.6kb、1.4kb、0.6kb、0.3kb、0.2kb)のGFAPプロモーター領域制御下で緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するレンチウイルスベクターを作成し、3-4週齢の野生型マウスの小脳に投与した。注射後1週間で小脳を取り出し、GFP発現量(プロモーター活性)およびGFP発現細胞におけるアストロサイトの比率(アストロサイト特異性)を解析した。2.0kbと1.6kbのcjGFAPプロモーターは極めて強いプロモーター活性を示したが、1.4kb、あるいは0.6kbまで削ると、2.0kbの20%以下にプロモーター活性が低下した。しかし興味深いことに0.3kb、0.2kbまで短くすると再びプロモーター活性が2.0kbの40%程度まで上昇することが明らかになった。一方、アストロサイト特異性は2.0kbから0.3kbまで短鎖化しても変わらず、90%程度に保たれていた。さらに0.2kbまで削ると、介在ニューロンへの発現が上昇して特異性は70%まで低下した。以上の結果より0.3kbまで削るとプロモーター活性は2.0kbの4割程度まで低下するが、アストロサイト特異性は90%程度に保たれることが明らかになった。次に0.3kbプロモーターが小脳以外の部位でもアストロサイト特異性が保たれていることを確認するため、マウス大脳皮質で検討した。すると大脳皮質では、アストロサイト特異性が見られず、ニューロン優位のGFP発現が観察された。0.3kbまで削ると大脳皮質のアストロサイト特異性に関与する領域が欠損している可能性も否定できないが、マーモセットのGFAPプロモーターをマウスの大脳皮質に用いたため(動物種 mismatches が原因)かもしれない。そこでマウス由来の0.3kb(mGFAP)プロモーターを用いてマウス大脳皮質での発現を再検討したところ、

80%以上のアストロサイト特異性が保たれていた。またヒト由来の0.3kb (hGFAP) プロモーターでマウス大脳皮質を検討すると、マーモセット由来cjGFAPプロモーターを用いたときと同様、ニューロン優位のGFP発現が観察された。以上より0.3kbのGFAPプロモーターのアストロサイト特異性を大脳皮質で維持するには、動物種を合わせる必要があることが示唆された。そこで、マーモセット由来0.3kb cjGFAPプロモーターを搭載したAAVベクターは、マーモセット大脳皮質でもアストロサイト特異性を維持していると考え、cjGFAPプロモーター制御下でGFPを発現するAAVベクターをマーモセットの小脳皮質と大脳皮質に投与した。2-4週間後に脳を取り出し組織学的に解析したところ、両部位ともに90%程度のアストロサイト特異的なGFP発現が観察された。

アストロサイトは脳内で神経伝達物質の再取り込みや、神経細胞への栄養因子供給に重要な役割を果たしており、アストロサイトの障害が神経変性疾患を引き起こすことが明らかになっている。AAVに搭載可能でアストロサイトに外来遺伝子を発現できる0.3kbとコンパクトで、オリジナル(2.0kb)の4割程度のプロモーター活性を維持しているcjGFAPプロモーターは、変性疾患モデルマーモセットの作成やマーモセットを用いた遺伝子治療研究に応用できる可能性があり、極めて有用であると考えられた。