

平成 22 年 3 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390307  
 研究課題名 (和文) 周産期白質障害における微小環境と神経再生に関する研究  
 研究課題名 (英文) Studies on microenvironment and neural regeneration of periventricular leukomalacia  
 研究代表者  
 上妻 志郎 (KOUZUMA SHIROU)  
 東京大学・医学部附属病院・教授  
 研究者番号:30143457

## 研究成果の概要：

早産・低出生体重児における脳性麻痺の主たる病理所見である脳室周囲白質軟化症 (PVL) ではオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が広範囲に壊死脱落していることが知られている。PVL 発症のメカニズムを分析し、その予防・治療法を開発するため、本研究においては OPC の分化・増殖に関する因子の解析を行った。OPC は低温培養で分化は抑制され、G 蛋白質の G<sub>13</sub> が細胞膜上に存在する VDAC1 (voltage dependent anion channel 1) と解離し、MAP キナーゼを活性化することで増殖することが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,500,000円	0円	6,500,000円
2007年度	6,100,000円	1,830,000円	7,930,000円
2008年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
年度			
年度			
総計	13,800,000円	2,190,000円	15,990,000円

研究分野：胎児・新生児医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：周産期、脳障害、低温、オリゴデンドロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

早産・低出生体重児における脳性麻痺の主要な原因である PVL (periventricular leukomalacia) では、脳室周囲の OPC (oligodendrocyte progenitor cell) が広範囲に壊死脱落している。OPC は成人の脳にも存在し、増殖能を持っており、オリゴデンドロサイト以外にも神経細胞やアストロサ

イトなどに分化する能力を持っていることが判明しており、脳障害の修復に深く関わるものとして注目を集め始めている。また、PVL の動物モデルに OPC を移植し、神経学的予後が改善したという報告も出ており、OPC による脳障害治療の期待が高まっている。

PDGF や bFGF、甲状腺ホルモン、レチノイン酸、CDK 阻害剤である p27kip1、甲状腺ホルモン 1 受容体などが内因性の OPC 増殖因

子の候補といわれてきた。しかしながら、OPCの内因性の分化・増殖機構についての詳細は未だ不明である。

近年、成人の虚血性脳障害などで行われている低温療法が、新生児の中等度から高度の低酸素虚血性脳症に対しても神経後遺症と死亡のリスクを低減する効果的な治療法であると報告されている。しかしながら、その細胞分子機構については様々な説があるものの、未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

当初はラット胎児の子宮内炎症モデルを用いて、PVL 発生メカニズムの解明と治療法の開発を行うことを目的として本研究を開始したが、研究遂行過程において、OPC が低温環境により増殖することを発見した。OPC における内因性の分化・増殖機構に関わる知見が得られる可能性が高いと考えられるため、OPC に対する低温の増殖作用について細胞分子生物学的検討を行うことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) OPC 初代培養

妊娠 15 日目の ICR マウスの胎児の脳半球より清和らの方法により OPC を分離・培養して実験に使用した。この方法では OPC の純度は 95%以上であり、OPC の性質も保たれている。

### (2) 免疫細胞染色

培養された細胞が OPC であることを確認するためにカバーガラス上で培養した細胞を固定し、免疫細胞染色を行った。Gangliosides(A2B5)、sulfatide(04)、galactocerebroside(01)はいずれもオリゴデンドロサイトを標識するが、A2B5 は perinatal progenitor を、04 は late progenitor を、01 は mature myelinating oligodendrocyte を認識するものであり、これらに対する抗体を用いて細胞の分化度を評価した。

### (3) BrdU 取り込み実験

OPC の増殖能を評価するためカバーガラス上で培養した細胞に対して、BrdU 取り込み実験を行った。

### (4) フローサイトメトリー

31.5 と 37 での OPC の細胞周期を解析す

るためにフローサイトメトリーを行った。

### (5) DNA マイクロアレー解析

E15 マウス胎児より得られた OPC を 31.5 と 37.5 にて 48 時間培養した後、セルスクレイパーで細胞を回収し RNA を抽出し、マイクロアレー解析 (Gene Chip R Mouse Genome 430 2.0 Array) を行い、遺伝発現の変動を調べた。31.5 群と 37.5 群間で変動のある遺伝子を抽出するため、フィルタリングで得られたプローブセットを用いて、統計検定 SAM (significance analysis of microarray) を行った。統計検定結果から、多重性を考慮した False Discovery Rate < 0.05 を満たす変動が認められたプローブセットを抽出した。変動倍率 Fold Change に基づき、グループを設定した。

### (6) 免疫沈降法と LC-MS/MS による蛋白質分析

31.5 において遺伝子発現が 4.11 倍に増加した Gna13(G13 蛋白質 サブユニット; G13) に結合している蛋白質群を調べるために、G13 抗体を用いて免疫沈降法を行った。電気泳動後、CBB で染色し、バンドの含まれたゲルを切り出し、LC-MS/MS 分析によって、蛋白を同定した。ウエスタンブロット法により small G 蛋白質やアポトーシス関連蛋白質の G13 との結合についても検討した。

### (7) 薬剤添加実験

OPC の低温増殖における細胞内シグナル伝達経路を調べるため、G13 が関連する既知の LPA 経路を参考にして薬剤添加実験を行った。用いた薬剤は LPA、Clostridium botulinum C3 exoenzyme (Rho inhibitor)、Y27632 (ROCK inhibitor)、PDGF-AA (血小板由来増殖因子)、PTx (Gi inhibitor)、LPS、cyclic GMP、ATK (PLA2 inhibitor)、G3139 (VDAC1 inhibitor)、VDAC1 Antibody、Normal Rabbit IgG

### (8) ウエスタンブロット法による蛋白質発現分析

ウエスタンブロット法により 31.5 と 37 での蛋白質発現について調べた。それぞれのサンプルは電気泳動後、PVDF メンブレンに転写し、以下の抗体を用いてイムノブロットを行った。

G13、RhoA、Rac1、Cdc42、VDAC1、cyclin D1、Phospho-Cyclin D1、cyclin E、total and phosphorylated MAPKs、Phospho-Rb、CDK4、Caspase 3、Cleaved Caspase 3、Caspase 9、

Bax, Bcl-xL, Bcl-2, cyclinA, CDK2

#### (9) プルダウンアッセイ

Rho-GTPase family の活性をみるためにプルダウンアッセイを行った。ウエスタンブロット法にて、Rho A, Rac 1, Cdc42, RhoGAP 抗体を用いて検出した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 低温培養は OPC の増殖を促進する

31-34 においては常温 (37 °C) と比較して細胞数は増加し、31.5 °C で極大値を取った。低温では、分化の進んだ多数の長い突起を有する細胞の割合は減少していた。BrdU を取り込む細胞数は低温で有意に増加し、これらの細胞は OPC マーカーを発現しており、成熟細胞のマーカーは陰性であった。また、低温においては、S 期の細胞が有意に多くなっていた。

##### 2) DNA マイクロアレー解析 -- 低温では OPC の増殖が促進され、分化は抑制される

低温で発現が増加した遺伝子には、種々の細胞で低温で発現が上昇することが知られている Cirbp, Gna13, cyclin D1, cyclin D2, Map3k10, ELK4 などの細胞増殖、細胞周期回転の亢進を示唆するもの、Gsta2 などの抗酸化作用をもつグルタチオン合成酵素などであった。低温で減少したものは、OPC の分化に関する遺伝子が多くを占めた。

##### 3) G 13 と VDAC1 は常温下では会合し、低温化では解離する

低温で遺伝子発現が増加した G 蛋白質 サブユニットの G 13 に関連して、細胞内シグナル伝達を担っている分子群を明らかにするため、G 13 に対する抗体で免疫沈降を行った。37 °C でのみ 31kDa 付近にバンドが認められ、31.5 °C では G 13 と会合し、31.5 °C では解離する蛋白であると考えられた。LC-MS/MS 法で蛋白分析をしたところ、ペプチドヒット率の第一位は VDAC1 であることが判明した。免疫細胞染色により、VDAC1 は細胞質のミトコンドリア外膜のみならず、細胞膜上にも広く存在することが確認された。

G 13 に対する抗体で免疫沈降 & ウエスタンブロットを行い VDAC1 は確認され、small G 蛋白質である Rho A, RAC1, CDC42, RhoGAP と G 13 との結合も確認された。また VDAC1 に対する抗体で免疫沈降を行うと、Bax, Bcl-2, Bcl-xL などのアポトーシス関連蛋白が共沈してくることも確認された。

##### 4) 低温刺激により G 13 が活性化され、細胞内に増殖シグナルを伝達する

Y27632 (ROCK inhibitor)、PTx (G<sub>i</sub> inhibitor)、LPS、cyclic GMP、LPA 添加では OPC の細胞数に有意な変化は認めなかった。C3 添加では 37 °C でのみ増殖が促進された。PDGF では 31.5 °C と 37 °C の両方で増加が促進された。ATK では両方で増殖が抑制された。VDAC1 抗体、VDAC1 阻害剤では、37 °C においてのみ、OPC の増殖が有意に促進された。

##### 5) 低温刺激における OPC 増殖シグナル伝達経路 G 13 Cdc42 ERK1/2 cyclin D/E

ウエスタンブロット法により、各種蛋白質発現を調べたところ、低温において、G<sub>1</sub> 期から S 期への以降を制御している cyclin D、Cdk4、cyclin E の、また S 期に増加する cyclin A の発現が認められた。MAP キナーゼのうち、低温において ERK1/2 の強いリン酸化を認めた。また、低温で癌抑制蛋白である Rb のより強いリン酸化を認めた。一方、Caspase 3、Cleaved Caspase 3、Caspase 9、Bax、Bcl-xL、Bcl-2 などのアポトーシス関連蛋白では大きな変化を認めなかった。プルダウンアッセイでは small G 蛋白質の Rho family に属する Cdc42 が低温で活性化していた。以上の結果より G 13 Cdc42 ERK1/2 cyclin D/E という経路でシグナルが伝達されている可能性が示唆された。

以上より、OPC の細胞膜上にある VDAC1 の制御機構について、仮説を立ててみると、常温では細胞質内の G 13 が会合し VDAC1 は開口しているが、低温など細胞外環境の変化によって、VDAC1 の構造が変化して、G 13 が VDAC1 から解離することで G 13 が活性化し、細胞増殖シグナルが発せられていると考えられる。それと同時に、アポトーシスの内因性ミトコンドリア経路も抑えられている可能性もある。

さらに、活性化した G 13 は small G 蛋白質である Cdc42 に作用し、活性化した Cdc42 は MAP キナーゼである ERK1/2 を活性化し、これが核内の Cyclin D/E に作用して、低温下で OPC の増殖を促進していると考えられる。それと同時に OPC の分化は抑制される。

今回の研究では、脳障害修復の主力を担っている可能性の高い OPC の低温増殖機構を in vitro で詳細に解析することにより、VDAC1 の OPC における細胞内局在と低温増殖機構への関与を見出し、低温刺激 G 13 Cdc42 ERK1/2 cyclin D/E という細胞内シグナル伝達経路で OPC が増殖している可能性を示した。

本データは、早産・低出生体重児の脳性麻痺の主要な原因である PVL の治療戦略を立てる上で重要な手掛かりになると考えられる。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

「 第 60 回日本産科婦人科学会 . 平成 19 年 4 月 . 横浜

Oligodendrocyte の温度感受性に関する研究 .

今田信哉、亀井良政、上妻志郎、武谷雄二、阿相皓晃

第 61 回日本産科婦人科学会 . 平成 20 年 4 月 . 京都

Oligodendrocyte の温度感知機構 .

今田信哉、亀井良政、上妻志郎、武谷雄二、阿相皓晃

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

上妻志郎 ( KOUZUMA SHIROU )  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号 : 30143457

##### (2) 研究分担者

藤井知行 ( FUJII TOMOYUKI )  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 40209010

亀井良政 ( KAMEI YOSHIMASA )  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 00251265