

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390317

研究課題名（和文） 精神疾患におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の役割

研究課題名（英文） Role of oligodendrocyte precursor cells in the pathogenesis of psychiatric disorders

研究代表者

楯林 義孝（TATEBAYASHI YOSHITAKA）

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：80342814

研究成果の概要（和文）：精神疾患脳におけるグリオシスの欠如は神経病理学的研究から常に指摘されてきた。新しい培養法を用いてグリオシス由来細胞の一つと考えられるオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）の機能解析を行なった。OPCは、重要な神経伝達物質の一つであるグリシンの細胞外濃度を調節している可能性が判明した。これらの発見は、今後、精神疾患治療薬開発の基礎になる知見と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Loss of gliosis is a major neuropathological hallmark of psychiatric disorders. We have investigated the nature of oligodendrocyte precursor cell (OPC), an origin of gliosis. We found that OPC may be a regulator of glycine in the CNS. This finding may be useful for the development of novel treatment for psychiatric disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：精神医学

キーワード：オリゴデンドロサイト前駆細胞、グリオシス、統合失調症、双極性障害、うつ病、グリシン

1. 研究開始当初の背景

精神疾患脳におけるグリオシスの欠如は神経病理学的研究から常に指摘されてきた。この意義はほとんどわかっていないものの、精神疾患の発病原因として神経変性よりも神経発達異常がより重要であるという発達異常仮説の基礎となっている。しかし、最近、活性型アストロサイトの由来が徐々に明らかにされつつあり、グリオシス欠如の意義について新たに再考できる時期が来ている。

初期研究によると、プロテオグリカンの一種である NG2 を表面抗原に持ち、核転写因子 olig2 で標識されるある種のグリア前駆細胞がそれら活性型アストロサイトの由来細胞である可能性が指摘されている。すなわち、グリオシス欠如はそれらのグリア細胞の異常（例えば減少）を反映している可能性も考えられる。

2. 研究の目的

われわれは平成 19 年度まで NG2 を表面抗原に持つオリゴデンドロサイト前駆細胞 (NG2-OPC) の機能を、介在神経細胞分化能を中心に研究してきた。NG2-OPC が活性型アストロサイトの由来細胞であるとの結論はまだ得られていないが、この細胞は (血清などの) 刺激により GFAP 陽性になる。さらにわれわれは最近、NG2-OPC がさまざまな形で神経細胞のグルタミン酸伝達に関与する証拠を得ている。今回、それらの研究を進展させ、精神疾患における NG2-OPCs の機能、特にグルタミン酸伝達系における機能解明とその異常の精神疾患へ及ぼす影響について 3 年間の研究を行った。それによってグリオーシス欠如の背後にあるグリア細胞異常の意義について再考できる基礎作りを行った。

3. 研究の方法

5 ヶ月齢雌 SD ラットを脱血し、4%パラホルムアルデヒドで還流固定後一晩後固定を行った。その後 30%スクロースで脱水した後 OTC コンパウンドに包埋して脳標本を作製した。pH を段階的に変え免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で画像を撮影した。成体ラット脳海馬を酵素処理後、ステップグラジュエントを用いて NG2 細胞を分離、FGF2 含有無血清培地で培養増殖を行なった。Gly の取り込みは RI ラベルされた Gly を使用し、トップカウント (PerkinElmer) で細胞内の放射活性を測定した。グリシンの放出は、細胞外液を自動アミノ酸分析機 (Hitachi) で測定した。

4. 研究成果

(1) 成体ラット海馬における GlyT1 の免疫組織染色の検討

GlyT1 は抗体や界面活性剤などの染色方法

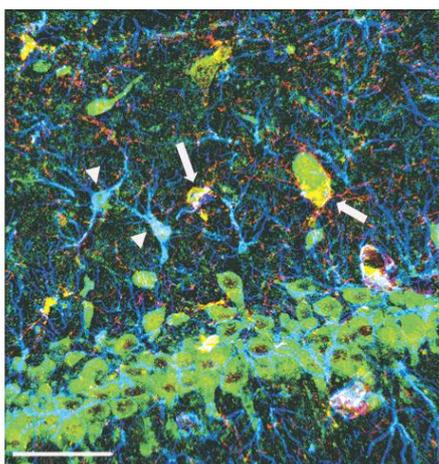


Figure 1 Characterization of GlyT1-expressing cells in adult rat hippocampus. Arrows: GlyT1-expressing NG2 cells Arrow heads: GlyT1-expressing astrocyte Scale bars represent 50um.

の改良により、アストロサイト及び神経細胞に発現していることが証明された。その方法を用いて NG2 細胞のマーカーである PDGF receptor α (PDGFRA) を染色したが十分な染色像が得られなかったため、NG2 細胞が PDGFA 陽性になりかつ従来から GlyT1 の発現が確認されているアストロサイトが GlyT1 陽性になる条件を検討し観察を行った。その結果、海馬各領域において 30~50% の NG2 細胞に GlyT1 が発現していた (Figure 1)。

(2) NG2 細胞による Gly 制御

① NG2 培養細胞における GlyT1 の発現

成体ラット海馬から抽出・培養した NG2 培養細胞を GlyT1 抗体を用いて免疫化学染色を行ったところ、培養 30 分後に 94.4 \pm 5.5%、14 日後に 100% の細胞が GlyT1 陽性であった (Figure 2)。今後、GlyT1 陽性 NG2 細胞のモ

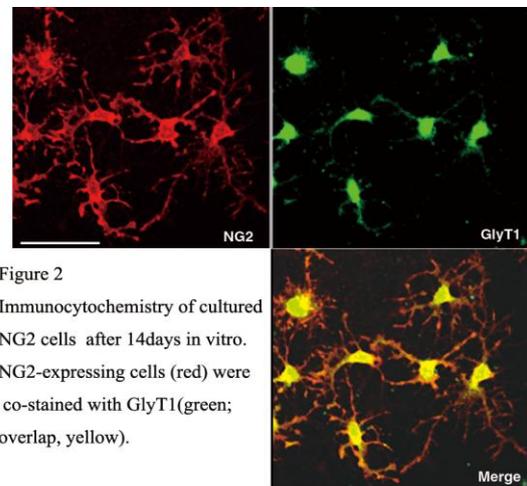


Figure 2 Immunocytochemistry of cultured NG2 cells after 14days in vitro. NG2-expressing cells (red) were co-stained with GlyT1(green; overlap, yellow).

デル系として実験に使用した。

② NG2 細胞の Gly 取り込み作用

GlyT1 はナトリウムイオン依存的な Gly の取り込みを行い、サルコシンは選択的にその

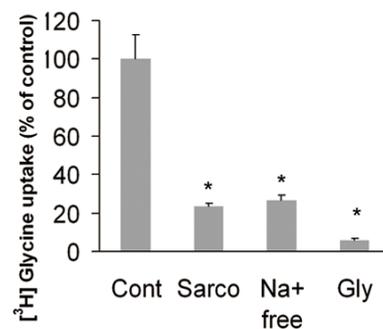


Figure 3 Detection of [³H] glycine uptake of adult NG2 cells from hippocampus in vitro. Control(Cont) sarcosine(Sarco) non-immunolabeled glycine(Gly) **p*< 0.03

機能を阻害することから、トリチウムラベルされた Gly ($[^3\text{H}]\text{-Gly}$) を用いて NG2 培養細胞への取り込み実験を行った (Figure 3)。 $[^3\text{H}]\text{-Gly}$ を添加した NG2 培養細胞の放射活性を 100% としたとき、サルコシンで約 75% ($23.7 \pm 1.2\%$)、ナトリウムイオンを含まないバッファーで約 70% ($26.4 \pm 3.0\%$) 減少していた (Figure 3)。また非放射性 Gly を過剰に添加時にも、取り込まれる $[^3\text{H}]\text{-Gly}$ が 90% 以上 ($5.7 \pm 1.2\%$) 減少していた。よって NG2 培養細胞は GlyT1 を介して Gly を取り込む機能を持っていると考えられる。

③ NG2 細胞の Gly 放出作用

GlyT1 は強力な脱分極あるいは細胞内におけるナトリウムイオンの増加により逆向き輸送を行い、細胞外に Gly を放出することが知られている。NG2 培養細胞における Gly の逆向き輸送機構を調べた。

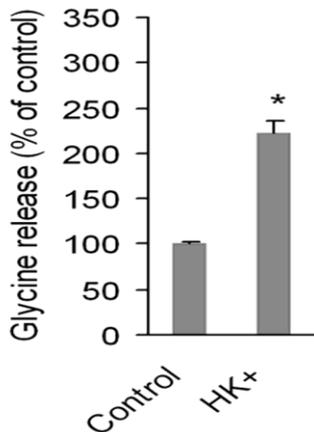


Figure 4 Depolarization induced the reverse transport of glycine. Control: Krebs'-Ringer's buffer, HK+: 50mMKCl containing Krebs'-Ringer's buffer * $p < 0.7 \times 10^{-4}$

③-1 脱分極刺激と AMPA/KA 受容体を介した Gly の放出

最初に高カルシウムによる脱分極刺激を行った (Figure 4)。NG2 培養細胞がコントロールバッファー中に放出した Gly 濃度を

100% コントロールとしたとき、脱分極刺激は約 2.2 倍 (223.1 ± 12.0

%) Gly を放出させていた。

NG2 細胞は AMPA 受容体を発現していることが知られている。AMPA 受容体は細胞内にナトリウムイオンを流入することから、NG2 培養細胞をグルタミン酸受容体作動薬であるグルタミン酸 (Glu)、AMPA 及びカイニン酸 (KA) で刺激し、細胞外の Gly を測定した。脱分極実験と同様にコントロールバッファーにおける Gly 濃度を 100% としたとき、Glu ($185.1 \pm 10.5\%$)、AMPA (10 μM : $130.7 \pm 2.1\%$, 100 μM : $285.7 \pm 18.8\%$)、KA ($153.0 \pm 10.7\%$) でそれぞれ Gly 濃度が有意に上昇し、AMPA 受容体の阻害薬である NBQX によりコントロールレベルに低下した (Figure 5)。NMDA は加えても変化はなかった。よって、細胞外グルタミン酸は AMPA あるいは KA 受容体を介して Gly を放出していると考えられる。

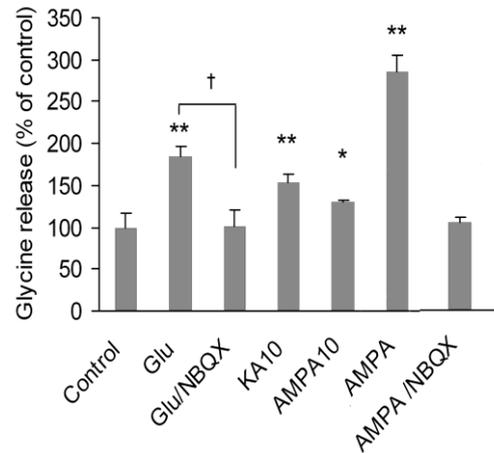


Figure 5 Effects of the reverse transport of glycine in cultured NG2 cells. Control: Krebs'-Ringer's buffer, Glu: glutamic acid, AMPA10: 10 μM AMPA, AMPA: 100 μM AMPA, NBQX: AMPA receptor antagonist, KA10: 10 μM kainic acid. * $p < 0.03$, ** $p < 0.009$ (vs. control), † $p < 0.003$ (vs. Glu)

③-2 カルシウム透過性 AMPA 受容体 (CaPARs) を介した Gly の放出

NG2 細胞はニューロンとシナプスを形成しカルシウム透過性 AMPA 受容体 (CaPARs) を介して長期増強が誘導されることが知られている。そこで、Gly の放出に CaPARs が関与するかを調べた (Figure 6)。前実験同様コントロールバッファー中の Gly 濃度を 100% とした。AMPA 刺激 ($216.3 \pm 39.4\%$) に対して CaPARs 阻害薬である PhTx ($139.5 \pm 12.3\%$)、NAS (50 μM : $151.4 \pm 5.6\%$, 250 μM : $131.5 \pm 5.6\%$) で Gly

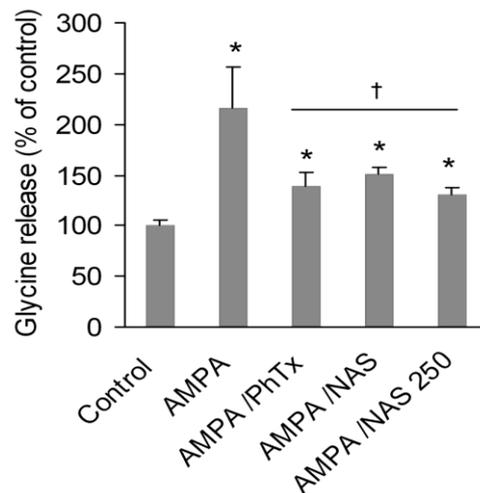


Figure 6 Proportions of glycine levels induced by Ca-permeable AMPA receptors (CaPARs). CaPARs inhibitors, philanthotoxin-433 (PhTx 50 μM) and 1-naphthylacetyl spermine (NAS 50, 250 μM) significantly reduced glycine levels induced by 100 μM AMPA (vs. condition buffer, * $p < 0.008$; vs. AMPA, † $p < 0.05$).

の放出が減少した。

また、30 分間継続的に AMPA で刺激すると Gly を放出し続けていた (Figure 7)。よって、NG2 培養細胞には NG2 細胞同様 CaPARs が存在し Gly 放出に関与しており、長期増強が誘導された NG2 細胞では Gly を放出させている可

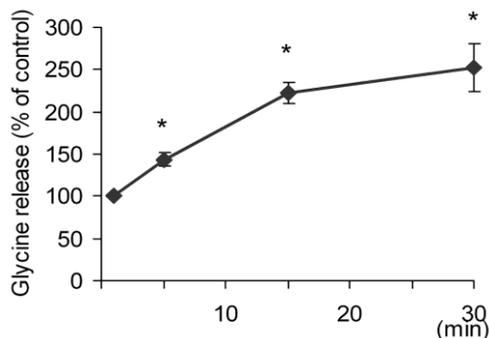


Figure 7 Time course of glycine release induced by AMPA at 1, 5, 15 and 30 min, respectively. * Indicates significant difference as compared with each time % of controls

(vs. condition buffer, * $p < 0.002$).

能性が考えられる。

③-3 GABA による Gly 放出効果

NG2 細胞は抑制性ニューロンから GABA 系入力を受け、AMPA 受容体刺激を抑制することが報告されている。GABA の作用を調べるため、NG2 培養細胞に AMPA、GABA を添加し Gly 放出に対する効果を調べた (Figure 8)。AMPA 刺激により放出される Gly の量を 100% としたとき 0.5mM GABA 添加では変化がなかったが 5mM GABA では約 20% ($81.2 \pm 9.3\%$) 有意に減少させていた。GABAA 受容体作動薬ムシモールは 50uM では変化がなかったが 1mM で約 20% ($77.9 \pm 6.2\%$) 程度減少させていた。これは 5mM GABA 添加時と同程度の効果を示し、

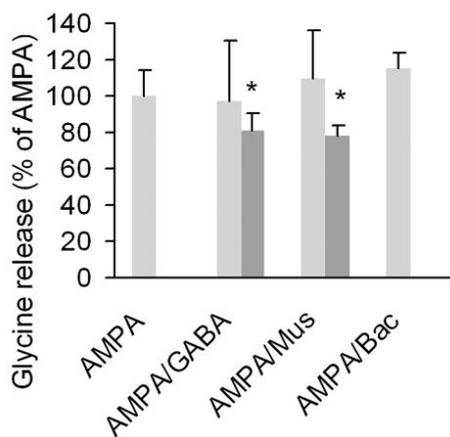


Figure 8 Effects of GABAergic signaling on the operation of GlyT1 in NG2 cells. AMPA/GABA (gray bar: 100uM AMPA /0.5mM GABA, dark gray bar: 100uM AMPA/5mM GABA), AMPA/Mus (gray bar: 100uM AMPA/50uM musimol, dark gray bar: 100uM AMPA/50uM musimol), AMPA/Bac (100uM AMPA /50uM baclofen) (vs. AMPA: * $p < 0.05$)

GABAA 受容体を介して抑制効果があったと考えられる。よって、AMPA 受容体刺激により Gly が放出されるときに GABA による抑制効果は低く、GABA の細胞外濃度に関わらず NG2 細胞は Gly 放出機能を持っていると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 楯林義孝、林義剛 (2011) 気分障害の死後脳研究. *精神医学* 査読有り 53:393.
- ② Nihonmatsu-Kikuchi N, Hashimoto R, Hattori S, Matsuzaki S, Shinozaki T, Miura H, Ohota S, Tohyama M, Takeda M, Tatebayashi Y. (2011) Reduced rate of neural differentiation in the dentate gyrus of adult dysbindin null (sandy) mouse. *PLoS One*. 査読有り 6(1):e15886
- ③ Hayashi N, Igarashi M, Imai A, Osawa Y, Utsumi K, Ishikawa Y, Tokunaga T, Ishimoto K, Harima H, Tatebayashi Y, Kumagai N, Nozu M, Ishii H, Okazaki Y (2010) Psychiatric disorders and clinical correlates of suicidal patients admitted to a psychiatric hospital in Tokyo. *BMC Psychiatry* 査読有り, 10:109.
- ④ Miyasaka T, Sato S, Tatebayashi Y, Takashima A (2010) Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. *FEBS Lett* 査読有り 584:3227-3232
- ⑤ Hirai K, Kuroyanagi H, Tatebayashi Y, Hayashi Y, Hirabayashi-Takahashi K, Saito K, Haga S, Uemura T, Izumi S (2010) Dual role of the carboxyl-terminal region of pig liver L-kynurenine 3-monooxygenase: mitochondrial-targeting signal and enzymatic activity. *J Biochem* 査読有り 148(6):639-650
- ⑥ 林直樹, 五十嵐雅, 今井淳司, 大澤有香, 内海香里, 石川陽一, 大島淑夫, 徳永太郎, 石本佳代, 田直子, 針間博彦, 楯林義孝, 熊谷直樹, 野津眞, 石井秀宗, 岡

崎祐士 (2009) 自殺関連行動を呈する精神科入院患者の診断と臨床特徴: 都立松沢病院入院例の検討. *精神神経学雑誌* 査読有り 111:502-526

- ⑦Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2008) Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol* 査読有り 67:78-84

[学会発表] (計6件)

- ①Tatebayashi Y (2010) NG2 cells: A novel therapeutic target for mood disorders? Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]
- ②楯林義孝, 菊池尚美, 林義剛, 伊東多恵子, 篠崎たき子 (2010) 海馬オリゴデンドロサイト分化とアルツハイマー病. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]
- ③楯林義孝, 菊池尚美, 篠崎たき子 (2009) 気分障害脳特異的な脂肪酸異常. 第6回日本うつ病学会総会, 東京 [2009/07/31]
- ④楯林義孝 (2008) NG2細胞は精神疾患の治療ターゲットになるか?. 第51回日本神経化学学会大会, 富山 [2008/09/12]
- ⑤菊池尚美, 林義剛, 篠崎たき子, 楯林義孝 (2008) 精神疾患におけるNG2コンドロイチン陽性細胞関連分子の定量. 第7回成体脳のニューロン新生懇談会, 東京 [2008/03/22]
- ⑥菊池尚美, 篠崎たき子, 林義剛, 楯林義孝 (2008) 精神疾患脳内におけるNG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカンと関連分子の変動. 第3回日本統合失調症学会, 東京 [2008/03/15]

[図書] (計3件)

- ①楯林義孝 ほか (2008) うつ病治療の実際. In: *松沢臨床精神医学セミナーvol.1* (松下正明監修, 岡崎祐士編), pp60-73. 東京: 日本評論社
- ②楯林義孝 ほか (2008) 閉経期のうつ病. In: *これだけは知っておきたい女性とうつ病* (神庭重信編), pp131-144. 大阪: 医薬ジャーナル社

- ③楯林義孝 ほか (2008) うつ病と神経可塑的变化. In: *シリーズ脳科学6, 精神の脳科学* (甘利俊一監修, 加藤忠史編), pp125-156. 東京: 東京大学出版会

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楯林 義孝 (TATEBAYASHI YOSHITAKA)
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員
研究者番号: 80342814

(2) 研究分担者

菊池 尚美 (KIKUCHI NAOMI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員
研究者番号: 30450589