

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591521

研究課題名（和文） オリゴデンドロサイトのDNA損傷に対する脆弱性
—ADとの関連について—研究課題名（英文） Vulnerability of Oligodendrocytes to DNA damages
-Association with AD-

研究代表者

中村 祐 (NAKAMURA YUU)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70291440

研究成果の概要（和文）：樹立した各分化段階にあるラット初代培養オリゴデンドロサイトにUVを照射した（0-10 J/m²）。抗MBP抗体、抗GFAP抗体、および抗6-4PP抗体を1次抗体として免疫細胞蛍光染色を行った。核DNA蛍光量あたりの6-4PP蛍光量を、照射直後、および各修復時間サンプルにおいて計算し、各分化段階にあるオリゴデンドロサイトの6-4PP修復能すなわちNER活性を測定し、オリゴデンドロサイトの分化に伴う修復能力の変化について検討した結果、NER活性は細胞分化により変化することが示唆された。この分化による修復活性の違いについて検討を行ったところ、PCNAなどの修復関連蛋白の発現量の差があり、様々な修復関連蛋白の発現量の差が修復力の差に繋がるのではないかと推測された。

研究成果の概要（英文）：Established primary cultured oligodendrocytes in each stage were exposed to UV (0-10 J/m²). Afterwards, they were stained by anti-MBP, GFAP, and 6-4PP antibodies. Fluorescence amount of 6-4PP per fluorescence amount of nuclear DNA was calculated just after UV radiation and at each repair point, and the change of repair activity along with the differentiation stages was studied. NER activity was observed to be changed by differentiation. Furthermore, we investigated the mechanism of the difference of repair activity, and found the difference of the expressions of repair-associated proteins such as PCNA, indicating the difference of the expressions of repair-associated proteins might lead to the difference of repair activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：老年精神医学、神経化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、精神神経科学

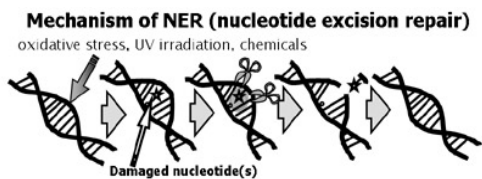
キーワード：オリゴデンドロサイト、NER、DNA損傷修復、分化、脆弱性、アストロサイト、神経細胞、無血清培地

1. 研究開始当初の背景

認知症の大部分を占める遅発性アルツ

ハイマー型認知症(AD)の病因はほとんど解

明されていない。老化は遅発性 AD 発症に関与する要因として影響が最も強いと考えられているが、脳の老化の分子生物学的なメカニズムに関しては知見が非常に少ないのが現状である。脳の老化のメカニズムを探ることは AD の病態解明と予防・治療法の開発に不可欠であり、また、他の遅発性神経変性疾患の病態解明にも重要であると考えられる。中枢神経系は主に神経細胞とグリア細胞からなっているが、研究が進んでいないのはグリア細胞のひとつであるオリゴデンドロサイトである。その理由は初代培養を行うことが非常に困難であるからである。オリゴデンドロサイトは中枢神経系にあって軸索の保護などを通して、神経機能の維持や神経細胞の生命維持に関わっていると考えられる。また、統合失調症を含めて多くの中枢神経疾患



の病態に関連があるのではないかと推測されている。しかし、今までに脳の老化の観点からオリゴデンドロサイトについて研究したものは極めて少ない。

脳は血流が豊富で酸素代謝が最も盛んであることから、酸素ラジカルなどにより中枢神経系細胞の DNA は恒常的に損傷を受けていると考えられる。塩基除去修復 (base excision repair, BER) やヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair, NER、下記図参照) などの DNA 損傷を効率的にかつ正確に修復する機構の存在は、高次神経活動の維持にとって必要不可欠である。

これら修復機構の機能低下や破綻は脳の老化や遅発性の神経変性疾患の発症に繋がるのではないかと考えられる。オリゴデンドロサイトの初代培養は困難で

あり、培養オリゴデンドロサイトの性状についての検討は他の中枢神経系細胞に比べると極めて少ない。また、オリゴデンドロサイトの DNA 損傷に対する脆弱性についてもほとんど報告がない。

2. 研究の目的

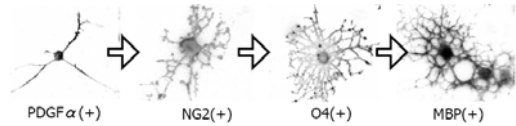
すでに我々は無血清培地において初代培養神経細胞及びアストロサイトに関して、UV により生成される DNA 損傷の修復について検討を終了しており (*DNA repair, 2007*)、中枢神経系細胞においては NER に関連する DNA 損傷修復が遅く、神経細胞及びアストロサイトは NER を必要とする DNA 損傷に脆弱であることを確認している。一方、オリゴデンドロイトについて DNA 損傷修復について詳細に検討した先行研究はない。すでに我々はオリゴデンドロサイトの NER を必要とする DNA 損傷修復能力を検討したところ、オリゴデンドロサイトは極めて NER を必要とする DNA 損傷に脆弱であるという結果を得ている。オリゴデンドロイトが DNA 損傷に対して脆弱である分子メカニズムを解明することは、中枢全体で NER を必要とする DNA 損傷に対しての脆弱性、そして、老化の分子メカニズムを知る上で極めて重要である。

3. 研究の方法

①無血清培地における各分化段階にあるラット初代オリゴデンドロサイト培養系の確立

ジエチルエーテル麻酔下で妊娠 16 日目のラットの胎児より大脳部分を取り出す。脳膜を實體顕微鏡下で丁寧に剥離した後、DNase, Trypsin 存在下で細胞を分散させる。メッシュを通した後、ガラスボトムディッシュ (PLLコート) に細胞を播き、10%FBS(DMEM)の培地にて培養を行う。2度のパッセージの後、無血清培地に移行し、分化誘導を行う。この際に、無血清培地に添加する因子についての検討を行う。特に

PDGF、NT-3について投与の時期、期間について詳細に検討し、分化したオリゴデンドロサイトが最も安定する条件を検索する。分化したオリゴデンドロサイトの検討は、抗PDGF α 抗体、抗NG-2抗体、抗O1抗体、抗O4抗体、抗MBP抗体による免疫細胞化学染色を行い、形態と染色性の両面から検討する。また、抗NG-2抗体、抗O1抗体、抗O4抗体によりImmunopanningを行い、



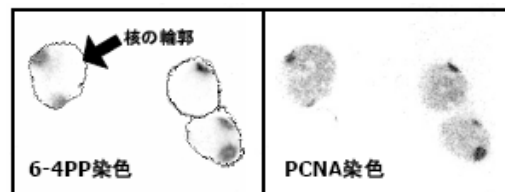
各分化段階におけるオリゴデンドロサイトを培養する。オリゴデンドロサイトにおけるImmunopanning法に最適な条件を探索する。

②ラット初代培養オリゴデンドロサイトにおける各分化段階別 6-4PP 修復活性の測定

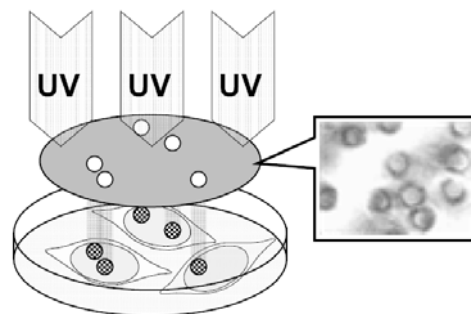
①で樹立した各分化段階にあるラット初代培養オリゴデンドロサイトにUVを照射する(0-10 J/m²)。4%フォルマリンにて固定を行い、Triton X-100を含むPBSにて浸透化処理後、抗MBP抗体、抗GFAP抗体、および抗 6-4PP抗体を1次抗体として用い、蛍光標識2次抗体を用いて免疫細胞蛍光染色を行う。この際には、マウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体の組み合わせにより、二重染色を行う。また、核の染色はDAPIを用いて行い、核染色を含めて三重染色する。核DNA蛍光量あたりの6-4PP蛍光量(100細胞以上)を、照射直後、および各修復時間サンプルにおいて計算する。こうして、各分化段階にあるオリゴデンドロサイトの6-4PP修復能すなわちNER活性を測定し、オリゴデンドロサイトの分化に伴う修復能力の変化について明らかにする(亀井、中村が担当)。この結果より、NER活性の細胞分化による違いを明らかにする。

③オリゴデンドロサイトのUV脆弱性メカニズムのマイクロポアUV照射法による検討

マイクロポアUV照射法*と細胞免疫化学染色を用いることによりDNA損傷に関連して働く蛋白の動態を調べることが可能である。核内に形成されたUVにより損傷したDNAは抗6-4PP抗体などのDNA損傷特異的抗体により染色する事が可能である。また、同時にPCNAなどのDNA損傷修復蛋白に対する抗体により2重染色を行うことにより、損傷の修復過程とDNA損傷修復蛋白の動態を調べることが可能である。まず、分化型ラット初代培養オリゴデンドロサイト(MBP+)にマイクロポアUV照射を行い、10分から24時間経過後に固定し、XPC、XPB、PCNAに対する抗体と抗6-4PP抗体により2重染色を行う。こ



れにより、分化型オリゴデンドロサイトにおいて修復過程のどの辺りに分化型オリゴデンドロサイトのUVに対する脆弱性の原因があるかを検討する。更に、各分化段階にあるオリゴデンドロサイトにおいて同様の検討を行い、どの分化段階において修復蛋白の動態が変化するかにつ



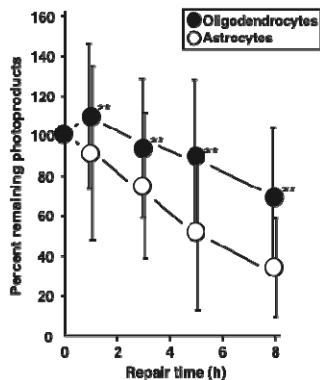
いて検討を行う。

*** マイクロポアUV照射法:**細胞を径35mm のガラスボトムディッシュに培養し、培養液を洗浄した後、注意深く、孔の径が5 μ mのpolycarbonate isopore membrane filter (Millipore)を細胞に被せる。その後、UVを照射することにより、細胞は小孔を通過したUVのみの照射を受けることが可能となる。この方法により核のサイズより遙かに

小さいUVの照射エリアを得ることができ、核内の一部分にDNA損傷を形成することが可能となる (Katsumi S, et al., J. Invest. Dermatol. 17:1156, 2001)。この方について我々は既に神経細胞及びアストロサイトで試し、一定の成果を収めている (DNA repair, 2007)

4. 研究成果

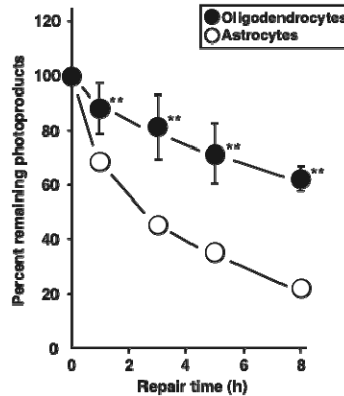
無血清培地における各分化段階にあるラット初代オリゴデンドロサイトを培養する系の確立を行った。妊娠16日目のラットの胎児より大脳部分を取り出し、DNase, Trypsin 存在下で細胞を分散させた。メッシュを通した後、ガラスボトムディッシュ (PLL コート) に細胞を播き、10%FBS(DMEM)の培地にて培養を行った。2度パッセージの後、無血清培地に移行し、分化誘導を行った。PDGF, NT-3 について投与の時期、期間について詳細に検討した。分化したオリゴデンドロサイトの検討は、抗 PDGF α 抗体、抗 NG-2 抗体、抗 O1 抗体、抗 O4 抗体、抗 MBP 抗体による免疫細胞化学染色を行い、形態と染色性の両面から検討した結果、純度の高いラット初代オリゴデンドロサイトを培養することが可能となった。



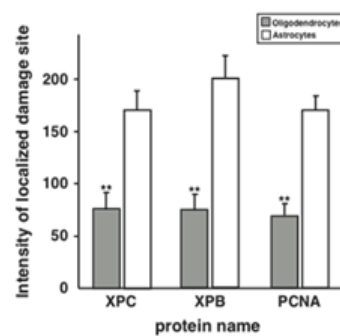
樹立した各分化段階にあるラット初代培養オリゴデンドロサイトにUVを照射した (0-10 J/m²)。抗 MBP 抗体、

抗GFAP抗体、および抗 6-4PP抗体を1次抗体として免疫細胞蛍光染色を行った。核DNA蛍光量あたりの 6-4PP蛍光量 (100 細胞以上) を、照射直後、および各修復時間サンプルにおいて計算し、各分化段階にあるオリゴデンドロサイトの 6-4PP修復能すなわちNER活性を測定し、オリゴデンドロサイトの分化に伴う修復能力の変化

について検討した結果、NER活性は細胞分化により変化することが示唆された。この分化による



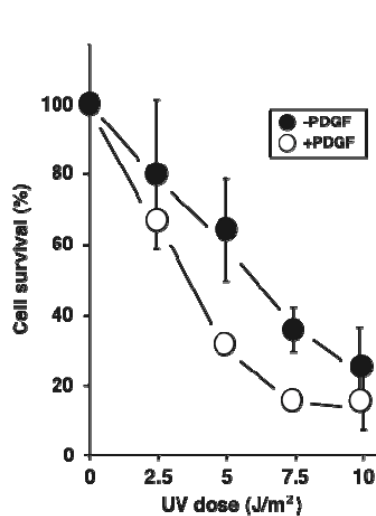
修復活性の違いについて検討を行ったところ、PCNAなどの修復関連蛋白の発現量の差があり、様々な修復関連蛋白の発現



量の差が修復力の差に繋がるのではないかと推測された。

さらに、OPC の DNA

修復能力についての検討を行った。BrdU を使用して PDGF の添加による分化が DNA 損傷に与える影響を調べた。PDGF の添加による分化誘導により OPC の UV に対する脆弱性が明らかとなった。そのメカニズムを調べる目的で p53 を介した apoptosis を Pifithrin- α



によって抑制した時の生存率に与える影響を調べたところ、Pifithrin- α より PDGF の添加による分化誘導関係なく、

細胞死が抑制され、これらのメカニズムに p53 を介した apoptosis が関与していること

が示された。

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 件)

Shinno H, Inami Y, Inagaki T, Kawamukai T, Utani E, Nakamura Y, Horiguchi J: Successful treatment with levothyroxine for idiopathic hypersomnia patients with subclinical hypothyroidism. General Hospital Psychiatry, 31(2):190-193, 2009. (査読：有)

Shinno H, Oka Y, Otsuki M, Tsuchiya S, Mizuno S, Kawada S, Inami T, Sasaki A, Hineno T, Sakamoto T, Inami Y, Nakamura Y, Horiguchi J. Proposed dose equivalence between clonazepam and pramipexole in patients with restless legs syndrome. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 34(3):522-526, 2010. (査読：有)

Shinno H, Kamei M, Maegawa T, Satake A, Inami Y, Horiguchi J, Nakamura Y. Three patients with cancer who developed rapid-eye-movement sleep behavior disorder. J Pain Symptom Manage. 40(3):449-452, 2010. (査読：有)

Shinno H, Yamanaka M, Ishikawa I, Danjo S, Nakamura Y, Inami Y, Horiguchi J. Successful treatment of restless legs syndrome with the herbal prescription Yokukansan. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 34(1):252-253, 2010 (査読：有)

Shinno H, Ishikawa I, Yamanaka M, Usui A, Danjo S, Inami Y, Horiguchi J, Nakamura Y. Effect of levothyroxine on prolonged nocturnal sleep time and excessive daytime somnolence in patients with idiopathic hypersomnia. Sleep Med. 12(6):578-583, 2011. (査読：有)

Nakamura Y, Fujii A, Graf A, Imai Y, Kim H, Mori J, Shigeta M, Shirahase T, Homma A. A 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy, safety, and tolerability of the rivastigmine patch in Japanese patients with Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord EXTRA, 1:163-179, 2011. (査読：有)

Nakamura Y, Homma A. Does the Use of Nursing Care Services Reduce Information about Dementia Patients Provided by Their Caregivers? Dement Geriatr Cogn Disord EXTRA (in press) (査読：有)

[その他]

ホームページ:

<http://www.kms.ac.jp/~psy/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 祐 (NAKAMURA YUU)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：70291440

(2) 研究分担者

伊藤 康一 (ITO KOICHI)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：30291149

森 俊雄 (MORI TOSHIO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10115280

熊 宏美 (KUMA HIROMI)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90464362