

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 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700325

研究課題名（和文）ヌクレオシドトランスポーターを介したアデノシン取込みによるニューロン新生調節機構

研究課題名（英文）Regulation of hippocampal neural stem/progenitor cell proliferation and differentiation by adenosine via equilibrative nucleoside transporter 1

研究代表者

守屋 孝洋 (MORIYA TAKAHIRO)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80298207

研究成果の概要（和文）：ヌクレオシドトランスポーターENT1 を介したアデノシン取込みが神経幹細胞の機能においてどのような役割を果たしているのかを明らかにし、その作用機構を解明した。ENT1 は未分化な神経幹細胞に高発現し、細胞内に取り込まれたアデノシンは AMP および ADP に代謝され、ピリミジン生合成経路を阻害してその増殖を抑制した。この ENT1 を介したアデノシン取り込みによる増殖抑制は睡眠剥奪による海馬歯状回のニューロン新生低下に関与している可能性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that ENT1-mediated uptake of adenosine suppressed the proliferation of neural stem cells by inhibiting de novo synthesis of pyrimidine. Furthermore, we revealed that ENT1-mediated uptake of adenosine is involved in sleep-deprivation induced suppression of neurogenesis in the hippocampus.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：アデノシン、アデノシントランスポーター、ENT1、ニューロン新生

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は増殖能と多分化能を有する未分化細胞であり、個体発生時における神経系の構築だけでなく、成体脳、特に海馬歯状回や嗅球におけるニューロン新生を担っている。神経幹細胞の増殖活性やニューロンへの分化は様々な生理的及び病態生理的要因により制御されていることが報告されているが、その分子基盤の全容は完全には明らかになっていない。

一方、アデノシンはプリンヌクレオシドの

一種であり、細胞膜上の受容体へ結合して様々な生体反応を調節する。中枢神経系においてもアデノシンはニューロンやグリア細胞に作用し、神経伝達物質の遊離調節やニューロン保護作用 (Todorov et al., Nature, 1997) など重要な役割を果たしている。しかしながら現在のところ、ニューロン新生を担う神経幹細胞の機能に対するアデノシンの作用は十分には理解されていない。

これまで我々は、神経幹細胞の増殖能や分化能に対する生理活性物質の調節作用を解

析し、メラトニンや J₂ 型プロスタグランジンが神経幹細胞の機能を調節していることを報告してきた。また、マウス海馬由来の培養神経幹細胞を用いた検討により、アデノシンが神経幹細胞の細胞死を惹起することなく、濃度依存的にその増殖活性を抑制することを見出した。一般的に、アデノシンの生理作用は4種類のGタンパク質共役型受容体(A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃)を介して惹起されるが、神経幹細胞に対するアデノシンの作用はこれらの膜受容体を介さない経路によってもたらされていることが観察された。最近、アデノシンは細胞膜上のアデノシントランスポーターによって細胞内に取込まれることが報告されている(Choi et al., Nature Neurosci., 2004)。我々は神経幹細胞におけるアデノシントランスポーターの発現と増殖抑制作用における関与を検討したところ、アデノシントランスポーターの1つである受動拡散型ヌクレオシドトランスポーター-1(Equilibrative nucleoside transporter 1; ENT1)が神経幹細胞に強く発現し、ENT1阻害薬がアデノシンの細胞内取込みとアデノシンによる増殖抑制を阻害することを見出し、アデノシンによる神経幹細胞の増殖抑制にはENT1を介したアデノシンの細胞内取込みが関与していることを明らかにした。しかしながら、ENT1を介して細胞内に取込まれたアデノシンがどのような分子メカニズムにより神経幹細胞の増殖を抑制するのかについては明らかになっていない。一方、脳虚血や神経炎症などの脳病態時にはアデノシンの細胞外濃度が上昇するとともに(Martin et al., *Glia*, 2007)、成体脳内のニューロン新生が変化することが報告されているが。しかしながら、このような中枢疾患に伴うニューロン新生の変化に、ENT1を介したアデノシンの神経幹細胞内への取込みが関与しているかどうかは不明である。以上のような背景から、神経幹細胞の増殖能に対するアデノシンの作用機構を分子レベルで解析し、さらにENT1とアデノシン細胞内取込みが、生体のニューロン新生においてどのような役割を果たしているのかを詳細に検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ENT1を介したアデノシン取込みによる神経幹細胞の増殖抑制の分子基盤を明らかにするとともに、ENT1を介したアデノシンの細胞内取込みと増殖抑制が、生体内のニューロン新生においてどのような寄与をしているのかをENT1遺伝子欠損マウスを用いて探ることである。この目的を達成するために次の3つの項目について検討を行う。

(1) 神経幹細胞におけるENT1の発現解析お

よび活性調節機構の解析

胎生および成体マウスの線条体、海馬、側脳室下帯から神経幹細胞を分離培養し、RT-PCRを用いてENT1 mRNAの発現を検討する。また、ウェスタンブロットおよび免疫組織染色を用い、胎生および成体マウス脳内の神経幹細胞におけるENT1タンパク質の発現を解析する。

(2) ENT1を介したアデノシン取込みによる神経幹細胞増殖抑制の分子機構の解明

まず、アデノシンの増殖抑制におけるENT1の関与を確かめるために、野生型およびENT1遺伝子欠損マウス(Dr. D-S Choiより譲渡済み)由来の培養神経幹細胞を用いて検討する。一方、細胞内に取込まれたアデノシンは、①アデノシンキナーゼによってアデノシン-1-リン酸(AMP)に代謝された後、AMP依存性キナーゼ(AMPK)を活性化する経路と、②ピリミジン de novo 合成経路(ADPリボースピロホスファターゼ、PRPP合成経路)を抑制してDNA合成に必要なウリジン等のピリミジンを減少させる経路の2つが知られている。神経幹細胞におけるアデノシンの増殖抑制がどちらの経路によってもたらされているのかを、マウス海馬歯状回由来の培養神経幹細胞を対象にし、特異的阻害薬、細胞増殖アッセイ、核酸定量法等を用いて明らかにする。

(3) 生体内のニューロン新生におけるENT1を介した増殖抑制の役割の解明

中枢におけるアデノシンの細胞外濃度は脳虚血や神経炎症などの神経変性疾患時や睡眠が剥奪された場合に増加することや、これらの病態はニューロン新生の変化を伴うことが報告されている。そこでフラワーポット法による睡眠剥奪モデルを作成し、野生型マウスとENT1遺伝子欠損マウスの間で海馬歯状回における神経幹細胞の増殖活性およびニューロン・グリア新生における差異を検討する。これによりENT1を介したアデノシン取込みの脳内ニューロン新生における生理的・病態生理的役割を明らかにする。また、ENT1はアデノシンだけでなく臨床で使用されている抗ウイルス薬や抗がん剤(ヌクレオシド誘導体)も基質にすることを踏まえ、これらの薬物の副作用としてのニューロン新生障害におけるENT1の寄与をENT1欠損マウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞の培養：神経幹細胞は胎生15.5日目のマウス海馬よりニューロスフェア法によって分離培養し、5日間培養した一次スフェアを実験に用いた。増殖因子としてEGF 20 ng/mLおよびFGF2 20 ng/mLを用いた。

(2) ENT1 mRNAの発現解析：培養神経幹細胞を播種し、1% FCSによって分化誘導を行い、

0、2、4、6日後に回収し、RT-qPCR法によってENT1およびENT2-3のmRNAの定量を行った。

(3) アデノシンの細胞内取り込み解析：³H-アデノシンを培養液中に添加し、任意時間のインキュベーションを行い、メディウムを除去したのちに細胞を可溶化し、液体シンチレーションカウンターによって細胞内に取り込まれた³H-アデノシンを定量した。

(4) 培養神経幹細胞の増殖アッセイ：培養神経幹細胞の増殖はWST-8アッセイおよびBrdU免疫染色法によって評価した。

(5) マウス海馬歯状回の神経幹細胞の増殖評価：マウス海馬歯状回の神経幹細胞の増殖はBrdU免疫染色法およびリン酸化ヒストンH3抗体による免疫染色法によって行った。マウスにBrdUを腹腔内投与(50 mg/kg)し、その2時間後に4% PFA溶液を還流固定し、脳を摘出した。海馬を含む厚さ40 micromの脳スライスを作成し、抗BrdU抗体もしくは抗pH3抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。蛍光顕微鏡によって海馬歯状回・顆粒細胞下層の陽性細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) マウス海馬由来の神経幹細胞におけるENT1の発現解析および活性調節機構の解析

マウス海馬から神経幹細胞を調整し、増殖条件および分化条件下におけるENT1ならびにENT2、ENT3、ENT4のmRNA発現を解析したところ、ENT2-4は未分化状態ではほとんど発現せず、分化に伴い、その発現が上昇するのに対し、ENT1は未分化状態で多く発現し、分化に伴い、その発現は低下した。さらに、ENT1欠損マウス由来の神経幹細胞において、アデノシンの増殖阻害曲線は右方シフトしており、アデノシン耐性であることがわかった。さらに、³H-アデノシン取込みを指標にしてトランスポーター活性を調べたところ、未分化な神経幹細胞におけるENT1特異的なアデノシン取込みが明らかになった。

(2) ENT1を介したアデノシン取込みによる神経幹細胞増殖抑制の分子機構の解明

薬理的・生化学的解析により細胞内に取り込まれたアデノシンがどのようなメカニズムで増殖を阻害しているのかについて解析を行った。まずアデノシンによる増殖阻害が膜受容体に依存しないことを確認するためにアデノシン受容体の広域アンタゴニストのCGS15943の効果を検討したが、CGS15943はアデノシンによる増殖抑制に全く影響を与えなかった。さらに、A1およびA3アゴニストのNECA、A1アゴニストのN6CHA、A2A、A3アゴニストのCGS21680のいずれの処理も神経幹細胞の増殖に影響を与えなかった。次に細胞内アデノシンをAMPに代謝するアデノシンキナーゼの阻害薬、ITUの効果を検討し

たところ、ITUはアデノシン取り込みに影響を与えることなく、アデノシンによる増殖阻害作用を濃度依存的に抑制した。AMPおよびADPはピリミジンの新規合成経路を阻害することが知られているので、ピリミジン核酸のウリジンを前処理したところ、ウリジン処理はアデノシン取り込みに影響を与えることなく、アデノシンによる増殖阻害作用を濃度依存的に抑制した。一方、AMPはAMP依存性キナーゼを活性化し、細胞分裂を抑制することが広く知られているので、ウェスタンブロットによってアデノシン処理がAMP依存性キナーゼを活性化するのかどうか検討したところ、神経幹細胞においてアデノシン刺激はAMP依存性キナーゼを活性化していることが確認できた。ところがAMP依存性キナーゼ阻害薬のAraAはアデノシンによる増殖阻害作用に対して全く影響しなかった。したがって、AMP依存性キナーゼはアデノシンによる神経幹細胞の増殖抑制には関与していないことが示唆された。以上より、ENT1を介して取り込まれたアデノシンは、アデノシンキナーゼによってアデノシン-1-リン酸(AMP)に代謝された後、ピリミジンde novo合成経路を抑制して増殖を阻害していることが明らかとなった。一方、高い細胞内AMP/ATP比で活性化されるAMP依存性キナーゼはアデノシン処理で活性化されるもののアデノシンによる増殖抑制には関与していないことが明らかになった。

(3) 生体内のニューロン新生におけるENT1を介した増殖抑制の役割の解明

脳内でアデノシンレベルの上昇する睡眠剥奪はマウスの海馬神経幹細胞の増殖を阻害する可能性を検討した。まず、ラットでニューロン新生の低下をきたすことが報告されているREM睡眠剥奪がマウスの海馬歯状回の神経幹細胞の増殖を阻害するかどうか検討した。REM睡眠剥奪は水のはったケージ内に直径2 cmのプラットフォーム上でマウスを飼育することによって行った。その結果、72時間のREM睡眠剥奪は野生型マウスにおいてBrdU陽性細胞数を減少させることが明らかになった。今後、ENT1欠損マウスにおいてREM睡眠剥奪がどのような影響を与えるのかを検討することによって、睡眠障害に伴うニューロン新生障害におけるENT1の役割を明らかにする必要がある。

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 5件)

1. 守屋孝洋、中枢神経系作用薬の時間治療への応用の可能性、ファルマシア、査読無、47巻、2011年、618-622

- 2 . Sakayori M, Maekawa M, Numayama-Tsuruta K, Katura T, Moriya T, Osumi N, Distinctive Effects of Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid on Neural Stem/Progenitor Cells, Genes to Cells, 査読有、16 巻、2011 年、778-790
DOI: 10.1111/j
3. 守屋孝洋、Period 遺伝子の発現制御を介した概日時計のリセット機構に関する研究、日薬理誌、査読無、135 巻、2010 年、230-234
4. Tahara Y, Hirao A, Moriya T, Kudo T, Shibata S、Effects of medial hypothalamic lesions on feeding-induced entrainment of locomotor activity and liver Per2 expression in Per2::luc mice、J Biol Rhythms、査読有、25 巻、2010 年、9-18
- 5 . Katura T, Moriya T, Nakahata N、15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 Biphaseically Regulates the Proliferation of Mouse Hippocampal Neural Progenitor Cells by Modulating the Redox State、Mol Pharmacol、査読有、77 巻、2010 年、601-611
<http://molpharm.aspetjournals.org/content/77/4/601.long>

[学会発表] (計 6 件)

1. 守屋孝洋、前川知子、中畑則道、神経幹細胞のリズムと抗うつ薬、第 18 回日本時間生物学会学術大会・シンポジウム (招待講演)、2011 年 11 月 25 日、名古屋
2. 守屋孝洋、前川知子、中畑則道、神経幹細胞の概日リズムの制御機構と生理的役割、第 64 回日本自律神経学会総会・シンポジウム (招待講演)、2011 年 10 月 27 日、秋田
3. 守屋孝洋、ERK1/2 を介した胎生マウス線条体原基由来神経幹細胞の体内時計のリセット機構、第 17 回日本時間生物学会学術大会、2010 年 11 月 21 日、早稲田大学国際会議場 (東京)
4. 守屋孝洋、拡散性ヌクレオシドトランスポーター1 (ENT1) を介したアデノシン取込みによる海馬ニューロン新生調節機構、第 61 回日本薬理学会北部会、2010 年 9 月 10 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)

5. 守屋孝洋、受動拡散型ヌクレオシドトランスポーター1 を介したアデノシンによる神経幹細胞の増殖制御機構、第 33 回日本神経科学大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 3 日 神戸コンベンションセンター (神戸市)

- 6 . Moriya T、Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)-mediated resetting of the circadian clock of the mouse embryonic brain-derived neural stem/progenitor cells、SRBR 12th Biennial Meeting、2010 年 5 月 23 日、Sandestin Golf and Beach Resort (米国・フロリダ州・デスティン)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
守屋 孝洋 (MORIYA TAKAHIRO)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：80298207
- (2) 研究分担者 ()
研究者番号：
- (3) 連携研究者 ()
研究者番号：