

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500436

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイトの髄鞘化と軸索保護におけるプロスタグランジンの役割の解明

研究課題名(英文)The role of prostaglandins in myelination and axonal protection by oligodendrocytes

研究代表者

千葉 陽一 (CHIBA, Yoichi)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：30372113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタグランジン(PG) F2 がオリゴデンドロサイトの生理的機能に関わっているとの仮説を検証した。中枢神経系の主なPGF2 合成酵素であるprostamide/PGF synthaseがオリゴデンドロサイト系譜細胞に存在し、PGF2 が合成されていること、PGF2 に反応してオリゴデンドロサイトで細胞内Caが上昇することを示した。Prostamide/PGF synthaseノックアウトマウスを用いた初代培養実験から、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化初期段階の生存維持にPGF2 が必要であることが示唆された。一方、OPCからの成熟過程にはPGF2 の存在は必須ではなかった。

研究成果の概要(英文)：Physiological roles of prostaglandin (PG) F2alpha in central nervous system have not been elucidated. We studied the function of PG2alpha in oligodendrocyte-lineage cells, since our previous study revealed oligodendroglial localization of prostamide/PGF synthase, a major PGF2alpha-producing enzyme in mouse central nervous system. We confirmed expression of prostamide/PGF synthase, production of PG F2alpha, and an increase in intracellular calcium concentration in response to exogenous PGF2alpha, in oligodendrocytes. PGF2alpha seemed to be essential for survival of oligodendrocyte-lineage cells in their early development, since oligodendrocyte precursors from prostamide/PGF synthase-knockout mice were not able to survive without PGF2alpha supplementation. In contrast, oligodendrocyte-lineage cells from knockout mice showed normal maturation in response to differentiation stimuli.

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：オリゴデンドロサイト プロスタグランジンF2alpha

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系には脂質メディエーターが豊富に存在することが知られている。中でもプロスタグランジン (PG) 類は、睡眠や体温調節などの生理的機能に加え、興奮毒性刺激の際に大量に産生され、病的な状態においても何らかの機能を持つと考えられる。しかし、PG 類の中でも中枢神経系における産生量が多い $PGF_{2\alpha}$ に関しては、その生理的機能や病態時における役割はほとんど未知である。

(2) 我々は、中枢神経系における $PGF_{2\alpha}$ の主要な合成酵素として報告された prostamide/ PGF synthase が、成獣マウスの中枢神経系では主に髄鞘に局在し、培養成熟オリゴデンドロサイトのミエリン塩基性蛋白 (MBP) 陽性の突起部分を中心に発現していることを報告した。

(3) 以上の背景から、 $PGF_{2\alpha}$ がオリゴデンドロサイトにおいて何らかの生理的機能に関わっているとの仮説を立て、これを検証するため本研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) オリゴデンドロサイトの分化に伴う $PGF_{2\alpha}$ の合成や受容に関わる分子の発現変化を明らかにする。

(2) $PGF_{2\alpha}$ 受容体のアゴニスト・アンタゴニストによりオリゴデンドロサイトの形態・機能が変化するか否かを明らかにする。

(3) prostamide/ PGF synthase ノックアウトマウス由来のオリゴデンドロサイトの形態・機能の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 生後 0 ~ 2 日の Wistar rat 新生仔大脳皮質から混合グリア初代培養を行い、10 日後に 200 rpm で 18 時間振盪することによりオリゴデンドロサイト系譜細胞を単離した。PDGF, basic FGF を添加した無血清培地で培養することによりオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) を、甲状腺ホルモンと CNTF を添加した無血清培地で培養することにより成熟オリゴデンドロサイトを得た。

(2) prostamide/ PGF synthase ノックアウト (KO) マウス、および野生型 (WT) マウスの胎生 17 日齢の胎仔大脳皮質より細胞を単離し、10% FBS 添加 DMEM で 1 晩培養後、PDGF, bFGF 添加無血清培地に置換することによりオリゴデンドロサイト系譜細胞を得た。再播種時に PDGF, bFGF 添加無血清培地で培養して OPC を、甲状腺ホルモンと CNTF 添加無血清培地で培養して成熟オリゴデンドロサイトを得た。また、WT マウスおよび KO マウスの胎生 17 日齢胎仔大脳

皮質より神経細胞を、生後 0 ~ 2 日新生仔大脳皮質よりアストロサイト、ミクログリアを得て解析に用いた。

(3) 上記の方法で単離した細胞を用いて、prostamide/ PGF synthase および FP 受容体の発現につき、RT-PCR, ウェスタンブロット、免疫細胞化学により検討した。また、我々のグループで開発した $PGF_{2\alpha}$ を免疫組織化学的に検出する方法を培養細胞に応用し、オリゴデンドロサイトにおける $PGF_{2\alpha}$ の産生を免疫細胞化学的に検討した。また、Fluo-4 でラベルした OPC および成熟オリゴデンドロサイトに $PGF_{2\alpha}$ を作用させ、細胞内カルシウム濃度の変動を、蛍光顕微鏡を用いたライブイメージングで観察した。

(4) WT マウスと KO マウスから単離したオリゴデンドロサイト系譜細胞の分化誘導に対する反応を比較するため、分化誘導 6 日後に細胞を固定し、オリゴデンドロサイトの分化マーカーであるミエリン塩基性蛋白 (MBP) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、陽性細胞率を計測した。

4. 研究成果

(1) 我々のグループで新たに作製した prostamide/ PGF synthase に対する抗体の特異性を、吸収試験、WT および KO マウス脳組織を用いたウェスタンブロット、テトラサイクリン誘導性 prostamide/ PGF synthase 発現 HEK293 細胞を用いたウェスタンブロットおよび免疫細胞化学により確認した。そのうえで、ラットおよび WT マウス由来のオリゴデンドロサイト系譜細胞における prostamide/ PGF synthase の発現をウェスタンブロットで調べたところ、OPC の段階でも弱い発現がみられ、成熟オリゴデンドロサイトではより強い発現が確認された。RT-PCR でも、OPC の段階から prostamide/ PGF synthase mRNA の発現が認められた。また、中枢神経系の他の細胞にも prostamide/ PGF synthase 蛋白および mRNA の発現が確認された。特に大脳皮質、海馬の神経細胞における発現はオリゴデンドロサイト系譜細胞より強くみられた。アストロサイト、ミクログリアにも弱い発現が蛋白と mRNA の両方で確認された。いずれの細胞種についても、KO マウス由来の細胞では蛋白、mRNA とも発現が確認されなかった。

(2) オリゴデンドロサイト系譜細胞における FP 受容体 mRNA の発現を RT-PCR で調べたところ、OPC の段階では発現が弱く、成熟オリゴデンドロサイトで発現が上昇する傾向がみられた。 $PGF_{2\alpha}$ の結合による FP 受容体の活性化は細胞内カルシウムの上昇を引き起こすので、Fluo-4 によるカルシウムイメージングにより FP 受容体がオリゴデンドロサイト系譜細胞で機能しているかどうか

を調べた。培養成熟オリゴデンドロサイトに $1 \mu\text{M}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ を作用させたところ、速やかに Fluo-4 の細胞内蛍光の増強がみられ、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ に反応して細胞内カルシウム濃度が上昇したことが示唆された。一方、OPC に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を作用させても Fluo-4 の細胞内蛍光にほとんど変化はなかった。

(3) Prostamide/ PGF synthase の作用により、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ と prostamide $\text{F}_{2\alpha}$ が生成する。オリゴデンドロサイトで発現している prostamide/ PGF synthase が実際に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を合成しているかどうかを確認するため、培養 OPC と成熟オリゴデンドロサイトをカルボジイミドで固定し、免疫細胞化学的に $\text{PGF}_{2\alpha}$ の証明を試みたところ、OPC、成熟オリゴデンドロサイトの両方で陽性像が確認された。

(4) Protamide/ PGF synthase KO マウスと WT マウスそれぞれの E17 胎仔よりオリゴデンドロサイト系譜細胞を単離し培養を試みたが、WT と同様の方法では KO 由来のオリゴデンドロサイトは培養が不可能であった。具体的には、細胞を 10% FBS 添加 DMEM で一晩培養後、PDGF, bFGF 添加無血清培地に置換すると、WT 由来の細胞は OPC の形態を示す細胞が増殖するのに対し、KO 由来の細胞は 24 時間でほぼ死滅した。そこで、KO 由来の細胞の培養の際に、無血清培地に $1 \mu\text{M}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ を 24 時間ごとに加えると、無血清培地下で 48 時間にわたり OPC 様細胞が生存、増殖を維持することができた(図 1)。この時点で再播種し、OPC 増殖条件、分化誘導条件で培養を続けたが、この際には $\text{PGF}_{2\alpha}$ を添加しなくても KO 由来細胞の生存、増殖、分化を維持することができた。E17 胎仔大脳皮質由来の細胞は、培養条件を変えれば神経細胞にも分化しうる細胞である。以上の結果は、OPC の分化初期、特に神経前駆細胞から OPC に分化するまでに、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の存在が生存維持に必須である段階が存在する可能性を示唆するものと考えられる。

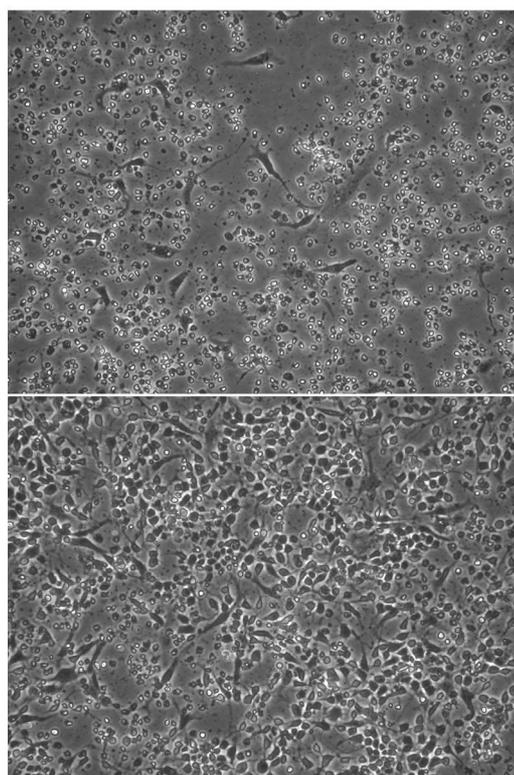


図 1 . Prostamide/ PGF synthase KO マウス由来のオリゴデンドロサイト系譜細胞初代培養。(上) $\text{PGF}_{2\alpha}$ を添加していない無血清培地に置換 24 時間後の位相差顕微鏡像。アストロサイト様の細胞が少数残るのみで、OPC 様の細胞は死滅している。(下) $1 \mu\text{M}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ を添加した無血清培地に置換 24 時間後の位相差顕微鏡像。2 ~ 3 本の突起を有する OPC 様細胞が生存・増殖している。

(5) OPC から髄鞘を形成する成熟オリゴデンドロサイトへの分化過程に prostamide/ PGF synthase に由来する $\text{PGF}_{2\alpha}$ あるいは prostamide $\text{F}_{2\alpha}$ がどのように影響するかを調べるため、WT および KO マウス由来の OPC を分化誘導条件で 6 日間培養し、最も分化の進んだオリゴデンドロサイト系譜細胞に発現する MBP に対する抗体で免疫染色し、陽性細胞率を計測した。MBP 陽性率は WT 由来細胞では $39.1 \pm 4.5\%$ であったのに対し、KO 由来細胞では $35.7 \pm 1.5\%$ で、両群間に有意差はみられなかった ($n = 3$: 図 2)。この結果から、オリゴデンドロサイトの分化成熟の段階では、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ あるいは prostamide $\text{F}_{2\alpha}$ は直接関与しないことが示唆された。

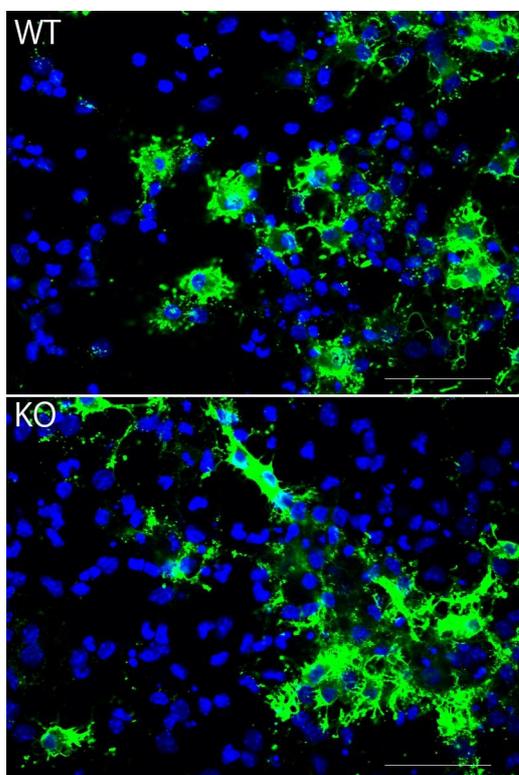


図2 . 6日間分化させた WT (上段) および KO (下段) マウス由来オリゴデンドロサイト系譜細胞の MBP 免疫染色 (緑) . 青色は核 (DAPI) . スケールバー: 50 μ m.

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4件)

Chiba Y, Komori H, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Kawamura N, Adachi K, Nanba E, Hosokawa M, Enokido Y, Kouchi Z, Yoshida F, Shimada A. Niemann-Pick disease type C1 predominantly involving the frontotemporal region, with cortical and brainstem Lewy bodies: An autopsy case. *Neuropathology* 34(1):49-57, 2014. 査読有 . doi: 10.1111/neup.12047.

Yoshikawa K, Kita Y, Furukawa A, Kawamura N, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Takei S, Maruyama K, Shimizu T, Shimada A. Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic progressive neuronal death. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88:373-381, 2013. 査読有 . doi: 10.1016/j.plefa.2013.02.007.

Takei S, Hasegawa-Ishii S, Uekawa A, Chiba Y, Umegaki H, Hosokawa M, Woodward DF, Watanabe K, Shimada A.

Immunohistochemical demonstration of increased prostaglandin F_{2a} levels in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 218: 295-304, 2012. 査読有 . doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.013.

Chiba Y, Takei S, Kawamura N, Kawaguchi Y, Sasaki K, Hasegawa-Ishii S, Furukawa A, Hosokawa M, Shimada A. Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 559-571, 2012. 査読有 . doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01229.x.

[学会発表](計6件)

石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽二、細川昌則、池原進: 脳と免疫系の接点としての脈絡叢間質および付着部における細胞動態とサイトカイン発現 . 第54回日本神経病理学会 . 2013年4月25日 . 東京都 .

Takei S, Hasegawa-Ishii S, Uekawa A, Chiba Y, Umegaki H, Hosokawa M, Woodward DF, Watanabe K, Shimada A: Immunohistochemical demonstration of enhanced prostaglandin F_{2a} production following kainic acid-induced seizures in rat hippocampus. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 29 August, 2012, Kyoto.

千葉陽二、小森拓、吉田太、足立香織、難波栄二、武井史郎、石井さなえ、河内全、榎戸靖、細川昌則、島田厚良: 前頭側頭葉優位の脳萎縮を呈した若年型Niemann-Pick病C型の一剖検例 . 第53回日本神経病理学会 . 2012年6月30日 . 新潟市 .

島田厚良、石井さなえ、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽二、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進: 老化促進モデルマウスにみられる骨髄由来細胞の脳実質へのリクルートの亢進 . 第53回日本神経病理学会 . 2012年6月30日 . 新潟市 .

Takei S, Hasegawa-Ishii S, Uekawa A, Furukawa A, Chiba Y, Kawamura N, Hosokawa M, Woodward DF, Watanabe K, Shimada A: Immunohistochemical demonstration of enhanced prostaglandin F_{2a} production following kainic acid-induced seizures in rat hippocampus. 12th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases, 19 September, 2011, Seattle, USA.

武井史郎、石井さなえ、上川篤志、千葉陽一、河村則子、Woodward DF、渡部紀久子、島田厚良：カイン酸誘導てんかん発作に伴う海馬プロスタグランジン F_{2α} 産生更新の免疫組織学的解析． 第 52 回日本神経病理学会． 2011 年 6 月 4 日．京都市

6．研究組織

(1)研究代表者

千葉 陽一 (CHIBA, Yoichi)
香川大学・医学部・講師
研究者番号：3 0 3 7 2 1 1 3

(2)連携研究者

渡部 紀久子 (WATANABE, Kikudo)
甲子園大学・栄養学部・教授
研究者番号：9 0 2 1 1 6 7 2 2

三浦 公志郎 (MIURA, Koshiro)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：3 0 2 8 4 2 4 3

島田 厚良 (SHIMADA, Atsuyoshi)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長
研究者番号：5 0 3 1 1 4 4 4