

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591358  
 研究課題名（和文）  
 DNA損傷に対するオリゴデンドロサイトの脆弱性—老化と認知症との関連について—  
 研究課題名（英文）  
 Vulnerability of oligodendrocyte to DNA damages—Association with aging and dementia—  
 研究代表者  
 中村 祐（NAKAMURA YU）  
 香川大学・医学部・教授  
 研究者番号：70291440

## 研究成果の概要

Neurobasal を主とした無血清培地にて安定にオリゴデンドロサイトを培養が可能であることがわかった。次に、NER による修復される DNA 損傷特異的な抗体を用いることにより、オリゴデンドロサイトは、UV による遺伝子損傷に脆弱性が強いことが判明した。また、細胞表面マーカーにより分化段階を検知することが可能であり、オリゴデンドロサイトの分化段階により、UV による DNA 損傷に対する修復能力に差があることも発見した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

オリゴデンドロサイトのDNA損傷に対する脆弱性メカニズムを明らかにするためには、まず、安定した分化型のオリゴデンドロサイトの培養法を確立することが重要である。しかし、従来の方法ではPDGFを培地から抜いて分化した後1~2日しか安定した状態を保てない。また、培養に用いる血清により結果が異なることがしばしば見られる。このような実験条件では、DNA損傷修復過程を正しく計測することが困難であり、分化後ある一定期間安定した状態で培養することが必要である。本研究では、まず、初代培養分化型オリゴデンドロサイトを無血清の条件の下において安定した状態で培養する方法を検討する。

次に、NERによる修復されるDNA損傷特異的な抗体を用いることにより、オリゴデンドロサイト、神経細胞及びアストロサイトのDNA損傷修復動態を比較し、中枢神経系細胞におけるDNA修復機構の特異性などの種の細胞がDNA損傷に対して脆弱であるかについて解明する。

本研究により、オリゴデンドロサイトのDNA損傷修復動態が解明され、その成果は、脳の老化やADなどの神経変性疾患発症のメカニズムを解明する上で極めて重要であると考えられる。

## 3. 研究の方法

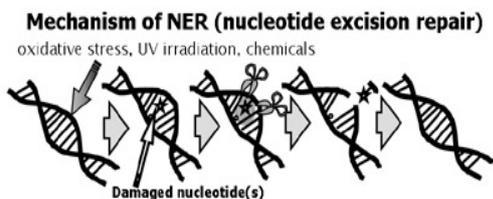
### ①無血清ラット初代オリゴデンドロサイト培養系の確立

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。脳膜を実体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(安藤が担当、伊藤が指導)。分化したオリゴデンドロサイトの検討は、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MBP抗体によるウエスタンブロットも行い、どの条件において、MBPが多く発現されるかについても検討を行う。一方、実験対照として使用する線維芽細胞を胎児の脳以外の組織から樹立する。線維芽細胞は容易に増殖するので、大量培養し、液体窒素に凍結保存する。必要時に解凍し、継代の若い細胞を実験に使用する

## ②ELISA による線維芽細胞集団における CPD および 6-4PP の修復動態の解析

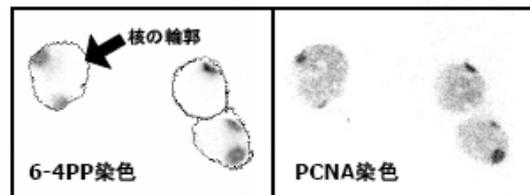
ラット線維芽細胞を 10 cmディッシュに播き、 $10 \text{ J/m}^2$ のUVを照射する。照射直後あるいは修復後、DNAを抽出し、ELISA法を用いてDNA損傷を定量する。



## ③ラット初代オリゴデンドロサイト培養系における細胞種類別 6-4PP 修復活性の測定

樹立したラット初代オリゴデンドロサイトを分化誘導後、細胞をPBSで洗浄した後、UVを照射する( $0-10 \text{ J/m}^2$ )。4%フォルマリン/PBSにて固定を行い、Triton X-100を含むPBSにて浸透化処理した後、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、蛍光標識2次抗体の種類を代えること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、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトにおける6-4PP修復能すなわちNER活性を線維芽細胞の結果と比較し、中枢神経系細胞の修復能力の特異性について明らかにする(安藤、中村が担当)。この結果より、NER活性の細胞種による違いを明らかにすることが可能である。また、この結果の傍証としてアセチルアミノフルオレンDNA付加体、およびエストロゲンDNA付加体に対する抗体を用いて同様の結果が得られるかについても検討を行う。



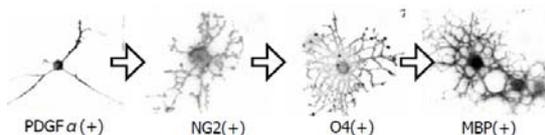
## 4. 研究成果

### ①オリゴデンドロサイトの無血清培地での培養

Neurobasal を主とした無血清培地にて安定に1~2週間の培養が可能であることがわかった。

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。オリゴデンドロサイトの分化度の検討は、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。

オリゴデンドロサイト分化と細胞表面マーカー

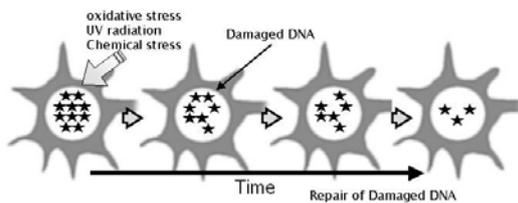


## ②オリゴデンドロサイト、神経細胞及びアストロサイトの DNA 損傷修復動態の比較

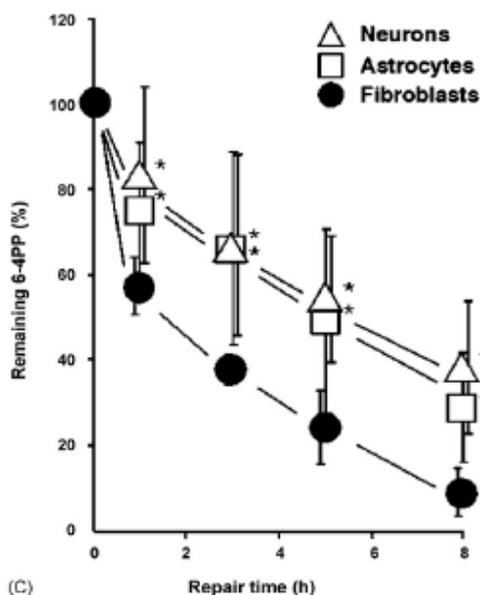
NER による修復される DNA 損傷特異的な抗体を用いることにより、オリゴデンドロサイト、神経細胞及びアストロサイトの DNA 損傷修復動態を比較した。オリゴデンドロサイトは、UV による遺伝子損傷に、他の2種の細胞に比べて著しく脆弱性が強いことが判明した。神経細胞、アストロサイト、線維芽細胞の UV による遺伝子損傷の修復過程(オリゴデンドロサイトは神経細胞、アストロサイトよりも修復が遅い)

## ③オリゴデンドロサイトの分化度による脆弱性

オリゴデンドロサイトには、種々の分化段階があるが、培地の調整により、一定の分化段階にあるオリゴデンドロサイトを得ることが可能である。その分化段階は、細胞表面マーカーにより検知することが可能である。オリゴデンド



ロサイトの分化の段階により、UV による DNA 損傷に対する修復能力に差があることも発見し、分化度が高い方が UV による遺伝子損傷に脆弱であることが判明した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- ① 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)
- ② Miki T, Kuma H, Yokoyama T, Sumitani K, Matsumoto Y, Kusaka T, Warita K, Wang ZY, Hosomi N, Imagawa T, S Bedi K, Itoh S, Nakamura Y, Takeuchi Y, Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus, *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 68(4):484-93, 2008. (査読:有)
- ③ Shinno H, Inami Y, Inagaki T, Nakamura Y, Horiguchi J: Effect of Yi-Gan San on psychiatric symptoms and sleep structure at patients with behavioral and psychological symptoms of dementia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32(3): 881-885, 2008. (査読:有)
- ④ Shinno H, Kamei M, Inami Y, Horiguchi J, Nakamura Y, Successful treatment with Yi-Gan San for rapid eye movement sleep behavior disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32(7): 1749-1751, 2008. (査読:有)
- ⑤ Hirano M, Asai H, Kiriya T, Furiya Y, Iwamoto T, Nishiwaki T, Yamamoto A, Mori T, Ueno S. Short half-lives of ataxia-associated aprataxin proteins in neuronal cells. *Neurosci Lett*. 419(2):184-137, 2007. (査読:有)
- ⑥ Nakamura Y, Homma A, Kobune S, Tachibana Y, Sato K, Takami I, Nagai S, Sakai M, Fukura K, Matsuda H, Hashimoto H, Kusunoki T, the SKETCH Study Group, Reliability Study on the Japanese Version of the Clinician's Interview Based Impression of Change. (2) Analysis of Subscale Items and -Clinician's Impression-, *Dement Geriatr Cogn Disord*, 23:104-115, 2007. (査読:有)

- ⑦ Yamamoto A, Nakamura Y, Kobayashi N, Iwamoto T, Yoshioka A, Kuniyasu H, Kishimoto T, Mori T, Neurons and astrocytes exhibit lower activities of global genome nucleotide excision repair than do fibroblasts, DNA Repair (Amst), 6: 649-657, 2007. (査読：有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 祐 (NAKAMURA YU)  
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 KOUICHI)  
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