

機関番号：34533

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590098

研究課題名（和文） アストロサイトにおける酸化ストレスによるDNA修復酵素とヌクレオシド輸送体の変化

研究課題名（英文） The change of DNA repair enzymes and nucleoside transporters by oxydative stress in astrocytes

研究代表者

田中 康一（TANAKA KOH-ICHI）

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：30274848

研究成果の概要（和文）：中枢神経系疾患の発生するメカニズムを解明し、その治療を行うことは、高齢化社会が進む中で重要な課題の一つである。本研究では、多くの中枢神経系疾患において関与が指摘されているものの、作用が多様であり未だ多くのことが分かっていない活性酸素種が、DNA 障害に及ぼす影響を調べた。その修復に DNA 材料となるヌクレオシドを取り込む輸送体の機能が、DNA 修復酵素の機能と関連し重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The investigation of the mechanisms occurring the diseases on the central nervous system and the treatment are one of the important subjects, when an aging society would have continued. In this research we studied the influence with DNA injury that reactive oxygen species, which are related with a lot of the diseases on the central nervous system and have many affecting mechanisms that have not understood. We made clear that the mechanisms of nucleoside transporters, which transport substrates of DNA repair material, are related with the function of DNA repair enzymes and made important roles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アストロサイト、酸化ストレス、過酸化水素、DNA 修復酵素、DNA ポリメラーゼβ、ヌクレオシド輸送体、CNT、ENT

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに活性酸素種の処置を施したところ 1mM DBcAMP を 4 日間処置して形態分化し増殖が抑制されたラット培養アストロサイトは未分化のアストロサイトや神経細胞とは異なった細胞死の過程を示すことを明らかにした。また、形態分化したアストロサイトにおいて活性酸素種はヌクレオシド輸送体の活性化を引き起こ

しチミジンの取り込みを促進するが、リボヌクレオシドレダクターゼ阻害薬である Hydroxyurea による影響を全く受けないことから細胞増殖以外の目的で活性化されていることを明らかにしていた。ヌクレオシド輸送体には細胞外液の Na<sup>+</sup>に依存する Concentrative Nucleoside Transporter (CNT) と平衡型の Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT)がありそれ

ぞれにサブタイプが知られており、クロニングが試みられていた。

## 2. 研究の目的

活性酸素種による DNA 障害の修復におけるヌクレオシド輸送体と DNA 修復酵素の意義を明らかにする目的で、培養アストロサイトをを用いてそれらの活性化機構と遅発性細胞死との関連性を検討した。

## 3. 研究の方法

アストロサイトは一次培養を8~14日間、蒔き直し後の二次培養を6~9日間行い、さらに1mM DBcAMPを4日間処置した。チミジン取り込みはHank's 溶液中で<sup>3</sup>H-チミジンを用いたトレーサー実験により測定し、蛋白量はLowry法で定量した。遅発性細胞死は30分間の各処置の解消後、Earle's 溶液でさらに24時間培養し、ヨウ化プロビジウムを取り込ませ、蛍光観察により評価した。遺伝子発現はRT-PCRにより確認した。

## 4. 研究成果

RT-PCRにより培養アストロサイトにはCNT1は存在せず、CNT2、CNT3、ENT1、ENT2が発現していることを明らかにした。

活性酸素種によるヌクレオシド輸送体の関与を過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)によるチミジンの取り込みで評価したところ、膜輸送能は減少するものの酸不溶性画分への取り込みは培養アストロサイトを1mM DBcAMPを4日間処置して形態分化させることにより促進された。また、細胞外液Na<sup>+</sup>の除去、及び、ENT阻害薬であるNBMPR、Dipyridamole、Dilazepにより濃度依存的に抑制され、さらに、細胞外液Na<sup>+</sup>の除去時において、ENT1を阻害する100nM NBMPRではなく、ENT2を阻害する1mM Dipyridamoleによる阻害効果が確認された。チミジンはCNT2からの取り込み感受性が低いことが知られており、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるチミジン取り込みは主にENT2とCNT3を介することが明らかできた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による遅発性細胞死に対するCNT、ENTの関与を細胞生存性を検討したところ、それら輸送体活性を抑制することにより遅発性細胞死は促進された。

DNA 修復酵素としてはポリメラーゼβ(pol β)が知られているが、RT-PCRにより存在することを確認した。そして、pol β阻害薬であるd<sub>2</sub>TTPによりH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるチミジン取り込みは濃度依存的に抑制され、遅発性細胞死は促進された。なお、増殖可能な未分化アストロサイトにおけるチミジン取り込みは増殖に関するリボヌクレオシドレダクターゼ阻害薬である

Hydroxyureaにより抑制されたが、1mM DBcAMPを4日間処置して形態分化し増殖が抑制された培養アストロサイトではHydroxyureaの効果が見られなかったことを明らかにしている。これらの結果から、増殖ではなく修復のための取り込み促進と考えられる。

以上より、培養アストロサイトが活性酸素種で処置された時にヌクレオシド輸送体を介するチミジン取り込みが促進されるのは、障害されたDNAをDNA修復酵素によって修復するためであり、また、その取り込みの低下は遅発性細胞死を促進することを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Koh-ichi Tanaka, Nobue Kitanaka, Junichi Kitanaka, Tomoaki Sato, Takashige Nishikawa, Motoshiko Takemura, Nobuyoshi Nishiyama, Thymidine incorporation via nucleoside transporters on oxidative stress DNA injury.、Journal of Pharmacological Science、査読無、115 Supplement 1、2011、134P-134P
- ② Koh-ichi Tanaka, Nobue Kitanaka, Junichi Kitanaka, Tomoaki Sato, Takashige Nishikawa, Motoshiko Takemura, Nobuyoshi Nishiyama, Role of astrocytic nucleoside transporters on oxidative stress.、Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry、査読有、49 (No. 2, 3)、2010、532-532
- ③ Koh-ichi Tanaka, Nobue Kitanaka, Junichi Kitanaka, Tomoaki Sato, Takashige Nishikawa, Motoshiko Takemura, Nobuyoshi Nishiyama, Thymidine incorporation via nucleoside transporters on oxidative stress injury.、Journal of Pharmacological Science、査読無、112 Supplement 1、2010、190P-190P
- ④ Koh-ichi Tanaka, Nobue Kitanaka, Junichi Kitanaka, Tomoaki Sato, Takashige Nishikawa, Motoshiko Takemura, Nobuyoshi Nishiyama, Involvement of equilibrative and concentrative nucleoside transporters in hydrogen peroxide-induced thymidine incorporation in cultured astrocytes.、Neuroscience Research、査読有、65 Supplement 1、2009、S148-S148
- ⑤ Koh-ichi Tanaka, Tomoaki Sato, Takashige Nishikawa, Junichi Kitanaka, Nobue Kitanaka, Motoshiko Takemura, Nobuyoshi Nishiyama, Regulation by p38 MAPK on hydrogen peroxide-induced thymidine

- incorporation in cultured astrocytes.、  
Journal of Pharmacological Science、査  
読無、109 Suppliment 1.、2009、227P-227P
- ⑥ Koh-ichi Tanaka、Tomoaki Sato、Takashige Nishikawa、Junichi Kitanaka、Nobue Kitanaka、Motoshiko Takemura、Nobuyoshi Nishiyama、Effects of  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitors on hydrogen peroxide-induced thymidine incorporation into cultured astrocytes.、神経化学 Bullketin of the Japanese Society for Neurochemistry、査読有、47、2008、224-224
- ⑦ Koh-ichi Tanaka、Tomoaki Sato、Takashige Nishikawa、Junichi Kitanaka、Nobue Kitanaka、Motoshiko Takemura、Nobuyoshi Nishiyama、Influence of hydrogen peroxide-induced thymidine incorporation on delayed cell death in cultured astrocytes.、Neuroscience Research、査読有、61 Suppliment 1.、2008、S150-S150

[学会発表] (計16件)

- ① 田中康一、チミジン取り込みにおけるヌクレオシド輸送体の詳細、第131回日本薬学会年会、2010年3月30日、静岡県立大学・静岡県コンベンションアーツセンター「グランシップ」・ツインメッセ静岡 (静岡県)
- ② 田中康一、酸化ストレス DNA 障害修復におけるヌクレオシド輸送体を介したチミジン取り込み、第84回日本薬理学会年会、2011年3月22日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ Koh-ichi Tanaka、Profiling of Nucleoside transport on Oxidative stress Injury.、第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会・合同年会、2010年9月15~17日、仙台国際センター (宮城県)
- ④ Koh-ichi Tanaka、Thymidine incorporation via nucleoside transporters on oxidative stress DNA injury.、Neuro 2010・第53回日本神経化学会 (神戸) 大会・第33回日本神経科学大会・第20回日本神経回路学会大会・合同大会、2009年9月2日、神戸国際会議場・神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑤ 田中康一、チミジン輸送における活性酸素種の影響、第5回トランスポーター研究会、2010年7月10~11日、東京医科大学病院本館6階 臨床講堂 (東京都)
- ⑥ 田中康一、培養アストロサイトにおける過酸化水素によるチミジン取り込みの細胞内カルシウムイオンの影響、第130回日本薬学会年会、2010年3月30日、岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ⑦ 田中康一、酸化ストレス障害におけるヌクレオシド輸送体を介したチミジン取り込み、第83回日本薬理学会年会、2010年3月17日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑧ Koh-ichi Tanaka、The Role of Nucleoside Transporters on Oxidative Stress Injury in cultured astrocytes.、第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会・第1回アジア神経精神薬理学会、2009年11月14日、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑨ 田中康一、酸化ストレス障害におけるヌクレオシド輸送体の役割、第11回応用薬理シンポジウム、2009年9月18~19日、静岡県立大学 (静岡県)
- ⑩ Koh-ichi Tanaka、Involvement of equilibrative and concentrative nucleoside transporters in hydrogen peroxide-induced thymidine incorporation into cultured astrocytes.、第32回日本神経科学大会 Neuroscience 2009、2009年9月17日、名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑪ 田中康一、ラット培養アストロサイトのヌクレオシド輸送体の発現と活性酸素種による活性調節、第4回トランスポーター研究会、2009年5月23~24日、東京大学弥生講堂 (東京都)
- ⑫ 田中康一、ラット培養アストロサイトにおける過酸化水素によるチミジン取り込みと遅発性細胞死に対する p38 MAPK の関与、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑬ 田中康一、培養アストロサイトにおける過酸化水素によるチミジン取り込みの p38 MAPK による調節、第82回日本薬理学会年会、2009年3月18日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑭ 田中康一、グリア細胞ヌクレオシド輸送体の病態時の役割、トランスポーターワークショップ IN 福岡、2008年11月2日、福岡大学文系センター4F (福岡県)
- ⑮ 田中康一、培養アストロサイトへの過酸化水素によるチミジン取り込みにおける  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害薬の効果、第52回日本神経化学会 (富山) 大会、2008年9月11日、富山国際会議場
- ⑯ 田中康一、培養アストロサイトにおける過酸化水素による遅発性細胞死に対するチミジン取り込みの影響、第31回日本神経科学大会 Neuroscience2008、2008年7月10日、東京国際フォーラム

[その他]

ホームページ等

<http://www.huhs.ac.jp/images/pdf/yakuga>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中康一 (TANAKA KOH-ICHI)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：30274848

(2) 研究分担者

西山信好 (NISHIYAMA NOBUYOSHI )

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：20201692

佐藤友昭 (SATO TOMOAKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10284887