

論文の内容の要旨

論文題目 低温条件下におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の
増殖機構の解析

指導教員 上妻志郎教授、亀井良政講師

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

今田 信哉

オリゴデンドロサイト (oligodendrocyte; OL) は中枢神経系 (central nervous system; CNS) において神経細胞軸索にミエリンを形成するグリア細胞の一種である。その前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell; OPC) は OL だけでなく神経細胞やアストロサイトに分化できる多分化能をもっており、中枢神経障害時の修復再生において中心的な役割を果たしている可能性が高い。

近年、新生児脳障害治療法として有効性が認められた脳低温療法における OPC の性質をマウスの初代培養系を用いて解析した結果、低温において OPC は分化が抑制され増殖することが判明した。

一般的に低温条件は、直接的あるいは間接的なエネルギー供給の減少に関連してアポトーシス・ネクローシスを引き起こし、細胞周期停止を誘導することにより、細胞増殖を抑制すると信じられている。しかしながら、低温は低酸素性虚血性脳障害を受けた動物や人間に対して、神経学的予後を改善するという報告は数多く出ている。低温による神経保護効果のメカニズムは、依然としてよく分かっていないが、神経細胞のアポトーシスの抑制が関わっているのではないとも言われている。

今回の実験では、まずマウスの胎児の脳より OPC を抽出し、各温度条件下で 48 時間培養した。軽度低温 (31~34°C) により OPC は常温 (37°C) と比較

して増殖を認め、31.5°Cで増殖効果は最大となることが判明した。さらに低温下では分化の進んだ多数の長い突起を有する細胞の割合は減少していた。フローサイトメトリーによる細胞周期解析では、OPC 培養 48 時間後に S 期にある細胞が、31.5°Cでは 5.96%、37°Cでは 4.19%と低温で S 期の細胞が有意に多くなっていることが判明した。また BrdU 取り込み細胞数も低温で増加した。

次に 37°Cと 31.5°Cで DNA マイクロアレイ解析をおこなったところ、発現が増加した遺伝子には、種々の細胞において低温で発現が上昇する *Cirbp*(3.92)を始めとして、*Gna13*(4.11), *Cyclin D1*(1.55), *Cyclin D2*(1.63), *Map3k10*(1.67), *Elk4*(1.51)などの細胞増殖、細胞周期回転の亢進を示唆するものや、*Gsta2*(5.30)などの抗酸化作用をもつグルタチオン合成酵素などであった。一方、発現が大きく減少した遺伝子の多くを、成熟オリゴデンドロサイトの marker である *MOBP*(0.03), *MBP*(0.29), *MAG*(0.33), *PLP1*(0.41), myelin sheath の主要構造物である *Claudin 11*(0.31)などが占めた。他には、histone, G protein coupled receptor (178, 65, 177) , Heat shock protein 110, Glutamate receptor, 細胞接着分子である L1 などの発現減少を認めた。これらのデータより低温で OPC の分化は抑制されており、増殖が刺激されている可能性が示唆された。

G 蛋白質 $G\alpha 13$ に関連して細胞内シグナル伝達を担っている分子を明らかにするために 37°Cおよび 31.5°Cで培養した OPC を用いて $G\alpha 13$ に対する抗体で免疫沈降 (IP) を行った。その結果、37°Cでのみ 31kDa 付近にバンドが出現した。このことから、この 31kDa の蛋白質は 37°Cでは $G\alpha 13$ と会合しており、31.5°Cでは解離していると考えられた。またこのバンドは、還元剤である 2-メルカプトエタノールを加えた際は出現しなかったため、これらの蛋白質は S-S 結合 (ジスルフィド結合) により会合していると考えられた。このバンドを切り出し、LC-MS/MS 法で蛋白質分析したところ、ペプチドヒット率の第一位は、Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) であることが判明した。VDAC1 はミトコンドリア外膜に存在する膜蛋白であり、バレル状の立体構造を持ち、アポトーシスに関連する分子として知られている。さらに OPC における VDAC1 の局在をみるために免疫染色を行った結果、細胞質内のミトコンドリア外膜のみならず、細胞膜上にも広く存在することが分かった。

これらの結果より、OPC においては、細胞膜上に VDAC1 が存在し、常温で

は $G\alpha 13$ が会合しているが、低温刺激で VDAC1 から $G\alpha 13$ が解離し、細胞内にシグナルを伝達している可能性が示唆された。

薬剤添加実験では、VDAC1 に対する抗体あるいは VDAC1 を閉鎖する G3139 を添加した場合、37°C においてのみ OPC の増殖が有意に促進された。

プルダウンアッセイでは、small G protein のうち Cdc42 が低温で活性化していた。さらにウエスタンブロット法では、低温では MAP キナーゼ (ERK1/2, JNK/SAPK, p38MAPK) のうち ERK1/2 の活性化を認めた。さらに低温においては、G1 期から S 期への移行に関わる Rb, Cyclin D, CDK4, Cyclin E の活性化を認め、S 期の Cyclin A の活性化も認められた。マイクロアレイでは転写活性因子である Klf4 (1.72) や Tfdp2(2.12) の発現も上昇しており、これらの結果は、OPC の細胞周期回転の亢進を意味すると考えられ、低温での OPC 増殖を支持するものである。

また、Caspase 3, Caspase 9, Bax, Bcl-2, Bcl-xL などのアポトーシス関連蛋白質に関しては、両者で大きな変化はなかったため、低温でアポトーシス経路が抑制され、見かけ上、細胞が増殖したわけではないと考えられる。

すなわち、OPC において、VDAC1— $G\alpha 13$ —Cdc42—ERK1/2—Cyclin D/E といった経路で低温増殖シグナルが伝達されている可能性が示唆された。

今回の実験で OPC は低温で分化が抑制され、増殖性を増すことが判明し、胎児・新生児脳障害における、脳低温療法の有効性が分子細胞生物学的観点からも証明された。またそれは OPC の細胞膜に存在する VDAC1 が温度センサーとなって細胞内へシグナルを伝達することにより起こっていると思われ、VDAC1 が脳障害の薬物治療のターゲットとなる可能性も示された。

OPC は、通常は中枢神経系で脇役として存在しているが、いったん中枢神経系が障害を受けた場合には、主役として障害の修復を担っている可能性が高い。この OPC の性質を十分に理解した上で、臨床において脳障害の治療に活かしていく必要があり、この研究は、今後の脳障害治療法開発における重要な情報を示していると考えられる。

(2795 字)