

## 論文要旨

様式 4-2

# Hydrogen peroxide-induced thymidine incorporation into cultured rat astrocytes

(培養ラット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の誘導)

所属・職 医歯学総合研究科・教授  
(指導教員 西川 殷 維 教授)

申請者氏名 田 中 康 一

ラジカル反応性の高い活性酸素種は脳虚血・再灌流障害や老化過程に関与すると考えられている。その作用点は細胞膜や蛋白質など種々に及ぶが、その中で DNA に着目し、特に活性酸素種に高い感受性を示す中枢神経系において酸化ストレス障害からの修復機構を検討した。中枢神経系の構成細胞の中で、アストロサイトは通常時に神経細胞の活動を環境面において整えるだけでなく、脳障害時には反応性アストロサイトへと形態変化し、多くの栄養因子を分泌するなど脳機能の修復にも関与することが示唆されている。今まで中枢神経系の研究では神経細胞の動態が注目されてきたが、アストロサイトを活性化することにより中枢神経障害からの修復を目指すという新しい視点に立つと、中枢神経系の修復機構を探る上で、数においては神経細胞の10倍存在し機能的にも重要な役割を果たすアストロサイトの重要性が示唆される。

そこで、中枢神経障害からの修復機構を解明する一端として、培養アストロサイトと神経細胞を用い、その分化過程における酸化ストレスによる障害とその DNA 障害の修復に関わるチミジン取り込み機構について検討した。

### 方法

#### 培養アストロサイト・神経細胞の調製

アストロサイト・神経細胞の調製は、生後0日齢のSD系ラット大脳皮質から行った。細胞がコンフルエントになってから各種の実験に用い、特に、アストロサイトを形態分化させる場合には、培地に1 mM ジブチリルサイクリック AMP (DBcAMP) を添加し、さらに4日間培養した。

#### チミジン・ウリジン取り込み

ハンクス液で洗浄後30分間37℃でプレインキュベートした後、 $^3\text{H}$ チミジン、 $^3\text{H}$ ウリジンを添加した。反応終了後、酸不溶性画分の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測し、蛋白質量をLowry法で求めた。

### 結果と考察

培養アストロサイトはDBcAMPの処置時間に依存して、未分化な扁平な形態から分化したグリア突起を有する *in vivo* に近い分化した形態へと変化し、それとともにチミジン取り込みは著しく減少した。過酸化水素の処置によるチミジン取り込みは、未分化なアストロサイトでは抑制されていたが、DBcAMPの前処置時間が15時間以上の形態分化した状態のアストロサイトでは促進された。このチミジン取り込みは過酸化水素の処置時間の経過とともに減

少しだが、形態分化したアストロサイトにおいてこの取り込み活性を薬理的処置によりさらに上昇させると遅発性細胞死が抑制されることを既に示している。また、未分化なアストロサイトはそのまま培養を続けることにより細胞密度を増加させたが、DBcAMP を処置したアストロサイトは細胞密度を増加させなかった。過酸化水素による DNA へのチミジンの取り込みの意義を検討する目的で、DBcAMP の処置群と未処置群における細胞増殖に関与するリボヌクレオシドレダクターゼに対する阻害薬であるヒドロキシ尿素の効果を検討した。ヒドロキシ尿素は、未分化な状態のアストロサイトにおいては過酸化水素の処置の有無に関わらず濃度依存的にチミジン取り込みを抑制したが、DBcAMP により形態分化したアストロサイトにおいては、過酸化水素の未処置では高濃度のヒドロキシ尿素においてチミジン取り込みの 25% の抑制がみられたものの、過酸化水素の処置時には変化が認められなかった。DNA へのチミジンの取り込みと比較する目的で、RNA へのウリジン取り込みを検討した。過酸化水素は DBcAMP により形態分化したアストロサイトの RNA へのウリジン取り込みは刺激せず、むしろ逆に抑制し、過酸化水素の効果におけるアストロサイト核酸塩基輸送活性のチミジンに対する選択性が明らかとなった。一方、神経細胞では過酸化水素未処置群においても時間経過とともにチミジンとウリジンの両取り込みとも減少し、さらに過酸化水素処置群においては著しく取り込みが減少し、過酸化水素に対して神経細胞はアストロサイトに比べて脆弱であることが示唆された。これらの結果はアストロサイトが活性酸素種による障害からの高い回復能を持ち合わせ、また、神経伝達物質除去や神経栄養因子産生などを介して神経細胞に保護的な役割を担っていることから、中枢神経系の修復において重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

以上より、予め DBcAMP で前処置され形態分化した培養アストロサイトにおいて過酸化水素によりチミジン取り込みが特異的に促進されるが、それは増殖とは関連せず、過酸化水素による障害からの修復など、増殖以外を目的とする現象であることを明らかにした。また、アストロサイトの核酸塩基輸送体は形態分化とともに活性調節を受けながらその機能を変化させ、中枢神経障害からの修復機構に重要な役割を担っていることが示唆される。

(Journal of Pharmacological Sciences, 102巻, 3号, 2006年掲載)

論文審査要旨および担当者

様式 15

報告番号	歯論第 62 号	氏名	田中康一	
論文審査担当者	主査	西川 殷 維		
	副査	植村 正 憲	原田 秀 逸	吉原 俊 博

## Hydrogen peroxide-induced thymidine incorporation into cultured rat astrocytes

(培養ラット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の誘導)

本研究では、活性酸素種に高い感受性を示す中枢神経系において酸化ストレス障害からの修復機構を DNA 修復に関わるチミジン取り込み機構に着目して検討した。中枢神経系の構成細胞の中で、アストロサイトは通常時に神経細胞の活動を環境面において整えるだけでなく、脳障害時には反応性アストロサイトへと形態変化し、多くの栄養因子を分泌するなど脳機能の修復にも関与することが示唆されている。本研究はこれまでの神経細胞の動態のみに着目する研究ではなく、神経細胞の活動を支えているアストロサイトを活性化することにより中枢神経障害からの修復を目指すという新しい視点に立っている。

アストロサイト・神経細胞の調製を、生後 0 日齢の SD 系ラット大脳皮質から行い、細胞がコンプレントになってから各種実験に用い、特に、アストロサイトを形態分化させる場合には、培地に 1 mM ジブチリルサイクリック AMP (DBcAMP) を添加し、さらに 4 日間培養している。ハンクス液下で、 $[^3\text{H}]$ チミジン、 $[^3\text{H}]$ ウリジンを添加し、反応終了後、酸不溶性画分の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測、蛋白質量を Lowry 法で求めている。

培養アストロサイトは DBcAMP の処置時間に依存して、未分化な扁平な形態から分化したグリア突起を有する *in vivo* に近い分化した形態へと変化するが、このときチミジン取り込みは著しく減少した。過酸化水素の処置によるチミジン取り込みは、増殖の盛んな未分化なアストロサイトでは抑制されていたが、DBcAMP の前処置により形態分化したアストロサイトでは過酸化水素の処置の初期において促進された。このチミジン取り込みは過酸化水素の処置時間の経過とともに減少したが、形態分化したアストロサイトにおいてこの促進された取り込み活性を薬理的処置によりさらに上昇させると遅発性細胞死が抑制されることを既に示しており、障害修復との関連性を示唆した。細胞増殖に関与するリボヌクレオシドレダクターゼの阻害薬であるヒドロキシ尿素は、未分化なアストロサイトでは過酸化水素の処置の有無に関わらず濃度依存的にチミジン取り込みを完全に抑制したが、DBcAMP の前処置により形態分化したアストロサイトでは、過酸化水素の未処置では高濃度のヒドロキシ尿素においてチミジン取り込みを若干抑制したものの、過酸化水素の処置時には変化させなかった。このことから、DBcAMP の前処置により形態分化した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促進は、細胞増殖とは関連しないことを示した。過酸化水素は DBcAMP の前処置により形態分化したアストロサイトの RNA へのウリジン取り込みは刺激せず、むしろ逆に抑制し、過酸化水素の効果におけるアストロサイトヌクレオシド輸送活性のチミジンに対する選択性を明らかにした。アストロサイトと比較して脆弱である神経細胞では過酸化水素未処置群においても時間経過とともにチミジンとウリジンの両取り込みとも減少し、さらに過酸化水素処置群においては著しく取り込みが減少した。

以上より、本論文は予め DBcAMP の前処置により形態分化した培養アストロサイトにおいて過酸化水素によりチミジン取り込みが特異的に促進されるが、それは増殖とは関連せず、過酸化水素による DNA 傷害からの修復など、増殖以外を目的とする現象である可能性を示唆

している。また、アストロサイトのヌクレオシド輸送体は形態分化とともに活性調節を受けながらその機能を変化させ、中枢神経障害からの修復機構に重要な役割を担っていることが示唆されている。

本研究は中枢神経障害からの修復を目指す研究において、アストロサイトの活性化を介するという新しい視点に立っており、過酸化水素によるチミジン取り込み促進の特異性とその意義を詳細に検討している。さらに、アストロサイトヌクレオシド輸送体を介する中枢神経保護薬の開発など今後の研究の展開が期待される可能性があり、極めて重要な情報を提供しているものと思われる。

よって、本審査委員会は本論文が学位論文として十分に価値あるものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨および担当者

様式16

報告番号	歯論第62号	氏名	田中康一	
論文審査担当者	主査	西川殷維		
	副査	植村正憲	原田秀逸	吉原俊博
<p>審査委員会は、平成19年2月23日（金）、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めると共に、これと関連する中枢神経疾患と細胞機能との関係、ヌクレオシド輸送と細胞増殖・蛋白質合成・細胞機能修復機構との関連などについても試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。</p> <p>なお、第1外国語（英語）については、平成18年12月13日（水）に施行された学位取得のための第1外国語試験に合格していることが確認され（平成18年外国語試験合格第242号）、また、第2外国語試験（独語）についても独文和訳の結果から、大学院博士課程修了者と同等の学力があると判断された。</p> <p>以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者と同等、あるいはそれ以上の識見を有するものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格をもつものと判断した。</p>				