



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アストロサイトの細胞外プリン産生・代謝機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	江口, 遼太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13497号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74747
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryota_EGUCHI_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：江 口 遼 太
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

アストロサイトの細胞外プリン産生・代謝機構に関する研究

ATP やアデノシンなどの細胞外プリンは中枢神経系の重要な神経伝達物質・神経調節物質であり、中枢神経系の生理機能や病態に関与する。細胞外アデノシンは虚血や外傷性傷害などの病態下で蓄積し、神経保護作用を示すと報告されている。細胞外プリン産生では主に、細胞から放出された ATP が細胞外で ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPD) や ecto-5'-nucleotidase (CD73) によりアデノシンへ代謝される。細胞外で増加したアデノシンは主に equilibrative nucleoside transporter (ENT) を介して細胞内へ取り込まれ、adenosine kinase によって AMP に変換されるか、adenosine deaminase (ADA) によってイノシンへ代謝される。このような細胞外プリン産生において、中枢神経系ではアストロサイトが重要な役割を果たす。また、アストロサイトは病態下でその形態や機能が変化することが知られており、プリン代謝に関わる酵素の発現や活性も変化する可能性がある。これまでに、病態下におけるアストロサイトの変化に炎症性サイトカインや成長因子などが関与することが報告されている。そこで本研究では、ラット脊髄培養アストロサイトの細胞外プリン産生・代謝機構の詳細を調べ、その機構に対するサイトカインや成長因子の影響を検討した。

アストロサイトに炎症性サイトカインとして TNF α 、IL-1 β 及び IFN γ （各 10 ng/ml）を、成長因子として epidermal growth factor (EGF) 及び fibroblast growth factor 2 (FGF2; 各 10 ng/ml) を、起炎症性物質として lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/ml) を、分化誘導物質として dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP; 1 mM) をそれぞれ 48 時間処置し、細胞の形態、細胞増殖、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 発現量及び細胞外 Ca²⁺濃度低下による細胞外プリン量の変化を調べた。FGF2 と dbcAMP は、多角形型の培養アストロサイトを複数の突起を持つ形態に変化させた。また、FGF2 は細胞増殖を促進し、dbcAMP は抑制した。さらに、FGF2 と LPS は GFAP 発現を減少させる傾向を示し、dbcAMP は増加させる傾向を示した。TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 及び EGF は明らかな変化を引き起こさなかった。続いて、細胞外 Ca²⁺濃度低下によるプリン量の変化を高速液体クロマトグラフィー法で測定した。Ca²⁺濃度低下により、細胞外プリン量が著しく増加した。ENTPD 阻害薬存在下では、細胞外 ATP と ADP 量が増加し、アデノシン量が減少したことから、

Ca²⁺濃度低下により ATP が放出され、細胞外でアデノシンへ代謝されていると考えられた。また、この ATP 放出とプリン増加は gap junction 阻害薬により抑制された。FGF2 は、gap junction hemichannels (GJ HCs) の発現には影響せずに活性を上昇させ、Ca²⁺濃度低下による ATP 放出を増強した。他の物質はいずれも ATP 放出に影響を与えなかった。

FGF2 処置がアストロサイトの ATP 放出を増強したため、次に細胞外に加えたプリンの代謝を測定し、FGF2 のプリン代謝への影響を検討した。FGF2 非処置 (control) のアストロサイトは、細胞外に加えた ATP をアデノシンへ急速に代謝した。FGF2 は ATP 及び ADP の代謝には影響を与えなかったが、AMP からアデノシンへの代謝を促進した。また、FGF2 はアデノシンからイノシンへの代謝も促進した。これらの代謝を担う酵素である CD73 及び ADA の発現量を調べると、FGF2 により発現が著しく増加していることが示された。ADA は主に細胞内で働くと考えられているが、細胞外に存在することも報告されているため、細胞内外のどちらで働いているか検討した。まず ENT 阻害薬存在下で、control のアストロサイトにおける ADA 活性が抑制されたことから、少なくとも一部のアデノシンは ENT を介して細胞内へ取り込まれ、細胞内の ADA でイノシンへ代謝され、再び細胞外へ放出されると考えられた。一方 FGF2 処置したアストロサイトでは、ENT 阻害薬は ADA 活性に有意な影響を与えなかった。そこでアストロサイトの細胞外液中の ADA 活性及び発現を調べると、細胞外液中に ADA の活性と発現が検出され、それらも FGF2 により増強された。また、細胞外液中の ADA 活性が時間依存性に増加したこと、FGF2 による細胞傷害が認められなかったことから、アストロサイトから ADA が放出されており、FGF2 が ADA の発現だけでなく細胞からの放出も増強していることが示唆された。さらに内因性プリンの細胞外代謝に対する FGF2 の影響を調べるため、Ca²⁺濃度低下による細胞外プリン量の経時変化を測定した。FGF2 はアデノシンの一過性の増加とイノシンの著しい蓄積を引き起こし、細胞外プリン代謝の促進が示された。

これらのアストロサイトに対する FGF2 の効果は、FGF 受容体の 1 つである FGFR1 の阻害薬により消失した。FGF 受容体下流で活性化される細胞内経路には、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路や phosphoinositide-3-kinase (PI3K) /Akt 経路がある。MAPK 経路のうち、MAPK/ERK kinase (MEK) 阻害薬は FGF2 の効果を完全に抑制した。p38 MAPK と Jun amino-terminal kinase の阻害薬は、FGF2 による CD73 と ADA の増強を部分的に抑制した。一方、PI3K 阻害薬は、FGF2 の効果に影響を与えなかった。

以上の結果から、FGF2 はアストロサイトの GJ HCs、CD73 及び ADA の活性や発現を上昇させることで、ATP 放出と細胞外プリン代謝を増強することが明らかになった。また、アストロサイトに細胞外 ADA が存在することが示され、ADA の放出も FGF2 により増強されることが示唆された。FGF2 のアストロサイトに対する効果は、主に FGFR1 と MAPK 経路を介していると考えられる。FGF2 は様々な病態下で産生が増加することから、FGF2 によるアストロサイトの細胞外プリン産生・代謝の制御が中枢神経系の病態形成や神経保護に深く関与する可能性がある。