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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：江口　遼太

審査委員
主査　教授　乙黒　兼一
副査　教授　木村　和弘
副査　准教授　山口　聡一郎
副査　助教　長谷部　理絵（遺伝子病制御研究所）

学位論文題名

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調節物質であり、睡眠や痛覚などの中枢神経機能だけでなく腫瘍や虚血などの病態形成にも密接に関与している。細胞外に放出されたプリンは ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase（ENTPD）や ecto-5'-nucleotidase（CD73）などの細胞外代謝酵素によってアデノシンへと速やかに分解される。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。中枢神経系ではアストロサイトがこのプリン代謝に重要な役割を果たしていると考えられているが、アストロサイトは病態や環境の変化によってその形態だけでなく機能も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。このようなアストロサイトの変化には、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。

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・代謝機構に対するサイトカインや成長因子の影響を検討した。まずアストロサイトに数種類の炎症性サイトカインや成長因子などをそれぞれ 48 時間処置し、細胞の形態、細胞増殖、アストロサイトマーカー分子（GFAP）発現量の変化を調べ、特に線維芽細胞成長因子（FGF）2 が顕著な変化を引き起こしていることを見いだした。FGF2 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、また細胞増殖を促進した。そこで次に、細胞外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、細胞外 Ca^{2+}濃度低下によって引き起こされる細胞外プリン濃度増加に対する FGF2 の効果を検討した。FGF2 非処置アストロサイトでは、ENTPD 阻害薬が Ca^{2+}濃度低下による ATP と ADP 量の増加を増強し、アデノシン増加を抑制したこと、また gap junction 阻害薬が ATP 放出を抑制したことから、Ca^{2+}濃度低下時には gap junction hemichannels（GJ HCs）から ATP が放出され、細胞外で

アデノシンへと代謝されていると考えられた。さらに FGF2 は GJ HCs の発現には影響を与えずに活性を上昇させ、Ca^{2+}濃度低下による ATP 放出を増強することを明らかにした。

次に細胞外に加えたプリンの代謝に対する FGF2 の効果を検討した。FGF2 非処置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 からアデノシン及びアデノシンからイノシンへの代謝を促進した。さらにこれらの代謝をそれぞれ担う CD73 及び ADA の発現量を調べ、どちらの酵素も FGF2 により発現が著しく増加していることを示した。また、アストロサイトの ADA 活性は ENT 阻害薬で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、細胞外液中に ADA の活性と発現が検出されること、さらにそれらが FGF2 により増強されることを示し、FGF2 が ADA の発現だけでなくアストロサイトからの放出も増強していることを示唆した。次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、Ca^{2+}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 が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すことを明らかにし、FGF2 によって細胞外プリン代謝が促進されていることを示した。また、アストロサイトに対する FGF2 のこれらの効果は、FGFR1 阻害薬と MAPK/ERK kinase（MEK）阻害薬により強く抑制された。

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を明らかかにした。また、アストロサイトに細胞外 ADA が存在することを示し、ADA の放出も FGF2 により増強されることを示唆した。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。またアストロサイトが放出する細胞外 ADA が存在することを示したことから、本研究成果は中枢神経系におけるプリン代謝機構の生理的・病態生理的役割の解明に大いに貢献した。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者江口遼太氏の学位論文は，北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。