



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アドレナリン受容体によるアストロサイトの突起形態制御機構の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	北野, 泰佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14543号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81684
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Taisuke_Kitano_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：北 野 泰 佑

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

アドレナリン受容体によるアストロサイトの突起形態制御機構の解明

星状膠細胞（アストロサイト）は中枢神経系（CNS）の最も豊富なグリア細胞であり、複数の微細な突起を介して神経細胞や血管と連絡し、CNS機能を制御する。また、アストロサイトの突起形態は生理的神経活動下や病態下で変化し、これが生理的・病態生理的なCNS機能の変化に密接に関与すると考えられている。

ノルアドレナリンはCNSの主要な神経伝達物質であり、様々なCNS機能やCNS疾患病態に関与する。アストロサイトはアドレナリン受容体（AR）のすべてのサブタイプ、すなわち α_1 -、 α_2 -および β -ARを発現しており、それぞれのARは異なるシグナルを伝達する。例えば、 β -ARはアデニル酸シクラーゼ / cAMPシグナルを活性化するのに対し、 α_2 -ARはそれを抑制する。これまで、 β -ARの活性化およびcAMPシグナルが、*in vitro*や*in situ*でアストロサイトの突起形成や伸張を誘導すること、*in vivo*病態下での突起の肥大化に関与することが報告されている。一方で、アストロサイトの突起形態制御における α -ARの役割はほとんど検討されていない。ノルアドレナリンは β -ARよりも、 α -ARに高い親和性を持つ。そのため、ノルアドレナリンが β -ARを活性化する時には α -ARも活性化し、 β -ARとは異なるシグナルを介してアストロサイトの突起形態に影響を与える可能性がある。そこで本研究では、新生ラットの脊髄および大脳皮質由来の培養アストロサイトを用いて、その突起形成に対する α -ARの役割を薬理学的手法により検討した。アストロサイトの突起形成は、中間径フィラメント glial fibrillary acidic protein (GFAP) 染色およびF-アクチン細胞骨格染色により評価した。

脊髄および大脳皮質培養アストロサイトは、 α_1 -、 α_2 -および β -ARをタンパク質レベルで発現していた。いずれの培養アストロサイトも突起を伴わない多角形の形態をしていたが、ノルアドレナリン（1 μ M）および β 作動薬イソプロテレノール（1 μ M）の3時間処置により、細胞体の縮小と突起形成が誘導された。誘導された突起は、GFAP陽性の主突起およびGFAP難染色性かつF-アクチン陽性の微細突起から成り、*in vivo*アストロサイトに類似した構造を有していた。ノルアドレナリン（1 μ M）およびイソプロテレノール（1 μ M）が誘導する突起形成細胞の割合は、処置3時間後までにピークとなり、その後徐々にコントロールのレベルに戻った。ま

た、ノルアドレナリンおよびイソプロテレノールは細胞内 cAMP レベルを増加させ、この増加反応は処置 30 分後までにピークとなった。これらの薬物の突起形成および細胞内 cAMP に対する効果は、脊髄アストロサイトに比べて、大脳皮質アストロサイトで大きくかつ持続的であった。また、イソプロテレノールは、ノルアドレナリンよりも効果が強く、その差は脊髄で有意に大きかった。

さらに、アデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin (0.1–10 μM) と細胞膜透過性 cAMP 類似体 dibutyryl cAMP (0.01–1 mM) の 3 時間の処置は、主突起および微細突起の形成を誘導し、濃度依存的に突起形成細胞割合を増加させた。この結果から、ノルアドレナリンやイソプロテレノールによる突起形成は、細胞内 cAMP の増加によって誘導されることが示唆された。

次に、ノルアドレナリン誘導突起形成および細胞内 cAMP 増加に対する、AR 拮抗薬の効果を検討した。脊髄アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (1 μM) による突起形成は、 β 拮抗薬プロプラノロール (10 μM) により消失し、 α_1 拮抗薬プラゾシン ($\geq 1 \mu\text{M}$) および α_2 拮抗薬アチパメゾール (10 μM) により増強された。また、ノルアドレナリン誘導 cAMP 増加は、プロプラノロールにより消失し、アチパメゾールにより促進された。大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン誘導突起形成は、プロプラノロールにより消失したが、プラゾシンおよびアチパメゾールにより増強されなかった。

さらに、イソプロテレノール誘導突起形成および細胞内 cAMP 増加に対する、 α 作動薬の効果を検討した。脊髄アストロサイトにおいて、 α_1 作動薬フェニレフリン (1 μM) および α_2 作動薬デクスメドミジン (1 μM) は単独では突起形成に影響しなかった。デクスメドミジンはイソプロテレノール (1 μM) または forskolin (0.5 μM) による突起形成を抑制した。また、デクスメドミジンは、イソプロテレノール誘導 cAMP 増加を抑制する傾向を示した。一方で、フェニレフリン (1 μM) はイソプロテレノール誘導突起形成および細胞内 cAMP 増加に影響しなかった。大脳皮質アストロサイトにおいても、デクスメドミジンはイソプロテレノール誘導突起形成を抑制した。これらの結果から、 β -AR の活性化は細胞内 cAMP 増加を介して突起形成を誘導し、 α -AR、特に α_2 -AR は、これを抑制的に制御することが示唆された。また、 α_2 -AR による突起形成抑制には、アデニル酸シクラーゼ / cAMP シグナルの抑制が関与することが示唆された。

次に、 α_2 -AR による突起形成抑制に細胞内 cAMP 増加の抑制以外の機構が関与するのかを検討した。まず、細胞膜透過性 cAMP 類似体 dibutyryl cAMP が誘導する突起形成に対して、 α_2 作動薬の効果を検討した。脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、デクスメドミジン (1 μM) は dibutyryl cAMP (0.1 または 0.3 mM) による突起形成を抑制した。この抑制効果は、アチパメゾール (10 μM) により阻害された。

さらに、先行研究で報告されているアデノシンや Rho キナーゼ阻害薬 Y27632 による cAMP 非依存的突起形成に対して、 α_2 作動薬の効果を検討した。脊髄アストロサイトにおいて、アデノシン (30 μM) および Y27632 (10 μM) は、細胞内 cAMP にほとんど影響せずに、主突起および微細突起の形成を誘導した。脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、デクスメドミジン (1 μM) は、アデノシン

および Y27632 による突起形成も抑制し、これらの抑制効果はアチパメゾール (10 μM) により阻害された。

以上の結果から、ラット脊髄および大脳皮質培養アストロサイトにおいて、 β -AR はアデニル酸シクラーゼ / cAMP シグナルにより突起形成を誘導する一方で、 α -AR はその突起形成を抑制することが明らかとなった。特に、 α_2 -AR は、アデニル酸シクラーゼ / cAMP シグナルの抑制および cAMP 非依存的な機構によって、突起形成を抑制することが示された。これらの結果は、ノルアドレナリンが α -および β -AR を介してアストロサイトの突起形成を双方向性に制御するという、これまでにない新たな知見を提供する。また、 α_2 作動薬や拮抗薬は CNS 作用薬として獣医療や医療で汎用されており、本知見は臨床的にも重要である。ノルアドレナリンによるアストロサイトの突起形態制御機構は α -および β -AR の機能的発現バランスにより調節され、この機構が CNS の生理機能や病態形成に深く関与する可能性がある。