



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14543
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81964
Type	doctoral thesis
File Information	Taisuke_Kitano.pdf



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
(Adrenergic regulation of the process formation
by astrocytes)

北野 泰佑
Taisuke KITANO

目次

I. 緒言	1
II. 方法	3
A. 実験動物	3
B. アストロサイトの分離培養法	3
C. アストロサイトの突起形成の評価法	3
D. 免疫細胞染色法	4
E. 細胞内 cAMP 測定法	4
F. RNA 抽出および cDNA 合成	6
G. リアルタイム PCR 法	6
H. ウェスタンブロット法	8
I. 試薬	8
J. 統計処理	10
III. 結果	11
A. 脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの性状比較	11
B. 脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの形態と細胞内 cAMP に対するノルアドレナリンおよび β 作動薬の効果	11
1. 形態に対するノルアドレナリンおよび β 作動薬の効果	11
2. 細胞内 cAMP に対するノルアドレナリンおよび β 作動薬の効果	13
3. 形態に対するアデニル酸シクラーゼ活性化薬および細胞膜透過性 cAMP 類似体の効果	13
C. 脊髄および大脳皮質培養アストロサイトにおけるアドレナリン受容体サブタイプの発現比較	20
D. 培養アストロサイトの突起形成と細胞内 cAMP レベルの制御におけるアドレナリン受容体サブタイプの役割	20
1. ノルアドレナリンによる突起形成誘導と細胞内 cAMP 増加に対する AR 拮抗薬の効果	24
2. β 作動薬による突起形成誘導と細胞内 cAMP 増加に対する α 作動薬の効果	24
E. α_2 -AR を介した細胞内 cAMP 非依存的な突起形成抑制	28
1. 細胞膜透過性 cAMP 類似体による突起形成に対する α_2 作動薬の効果	32
2. cAMP 非依存的な突起形成に対する α_2 作動薬の効果	32
3. cAMP 非依存的な突起形成に対するノルアドレナリンの効果	35
IV. 考察	38
V. 結論	45
謝辞	48

引用文献	49
英文抄録	57

略語表

ADO	adenosine
AR	adrenoceptor
ATIP	atipamezole
cAMP	cyclic AMP
CNS	central nervous system
DEX	dexmedetomidine
dibutyryl cAMP	N6,2'-O-dibutyryladenosine-3',5'-cyclic monophosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPCR	G-protein-coupled receptor
HBSS	Hanks' balanced salt solution
ISO	isoproterenol
NA	noradrenaline
PBS	phosphate-buffered saline
PBST	phosphate-buffered saline/Triton X-100
PHE	phenylephrine
PLL	poly-L-lysine
PRAZ	prazosin
PROP	propranolol
ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase
TBST	Tris-buffered saline/Tween-20

I. 緒言

星状膠細胞（アストロサイト）は中枢神経系（CNS）における最も豊富なグリア細胞であり、複雑な突起を伴う細胞形態により特徴付けられる。生体内のアストロサイトは、中間径フィラメント *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) を含む主突起と、そこから複雑に分岐するアクチン細胞骨格からなる微細突起を持ち、この突起を介して CNS 機能を制御する (Bernardinelli *et al.*, 2014a)。例えば、アストロサイトの突起は血液脳関門の構成要素としてその機能制御に重要な役割を果たす (Abbott *et al.*, 2006)。また、アストロサイトの突起は、ニューロンと連絡し、“tripartite synapse” の一部としてシナプス機能の恒常性維持に寄与する (Allen and Eroglu, 2017)。生体内でアストロサイトは互いに排他的に位置し、1つのアストロサイトは微細突起を介して多数のシナプス（齧歯類で数万~数十万個）の機能を制御する (Bushong *et al.*, 2002)。このように、アストロサイトの突起形態は CNS 機能に密接に関与する。興味深いことに、アストロサイトの突起形態は CNS 領域間や、動物種間で異なり、ヒトのアストロサイトは齧歯類のものよりも、多くの突起を伴う複雑な構造を持つ (Matyash and Kettenmann, 2010; Chai *et al.*, 2017)。また、アストロサイトの突起は分単位、時間単位の短時間で動的に変化し、神経活動に伴った可塑性を示すことが報告されている (Theodosis *et al.*, 2008; Bernardinelli *et al.*, 2014b; Stogsdill *et al.*, 2017)。さらに、様々な CNS 疾患の病態下や加齢に伴い、アストロサイトの突起の肥大化（いわゆるリアクティブ化）や萎縮がみられる (Tynan *et al.*, 2013; Pekny and Pekna, 2014; Rodríguez-Arellano *et al.*, 2016)。このようなアストロサイトの突起形態の多様性と CNS 機能は密接に関連しており、その突起形態を制御する機構が注目されている。

ノルアドレナリンは CNS における主要な神経伝達物質の 1 つであり、覚醒、記憶、痛み反応など様々な生理機能を制御するとともに (Benarroch, 2018)、アルツハイマー病やパーキンソン病などの様々な CNS 疾患の病態に関与する (Peterson and Li, 2018)。これらの CNS における生理機能や疾患において、アストロサイトの突起形態の変化が報告されている (Zhou *et al.*, 2019)。ノルアドレナリン作動性ニューロンは CNS のほぼ全域に投射し (Benarroch, 2018)、放出されたノルアドレナリンは拡散性伝達によりニューロンだけではなくアストロサイトにも作用する (Fuxe *et al.*, 2015)。アストロサイトは、G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) である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 - (G_q 共役型)、 α_2 - (G_i 共役型) および β -AR (β_1 -および β_2 -AR; G_s 共役型)、を発現している (Salm and McCarthy, 1992; Hertz *et al.*, 2010)。これまで、ラット脊髄由来グリオーマ細胞および大脳皮質培養アストロサイトにおいて、 β -AR の活性化が、アデニル酸シクラーゼ / サイクリック AMP (cAMP) シグナルを介して、突起形成を誘導することが報告されている (Shain *et al.*, 1987; Vardjan *et al.*, 2014)。また、 β -AR の活性化は、成熟ラット大脳皮質スライス標本のアストロサイトの微細突起を伸張させることも報告されている (Sherpa *et al.*, 2016)。さらに、*in vivo* において、病態下でのアストロサイト突起の肥大化が、 β 作動

薬や拮抗薬によりそれぞれ誘導あるいは抑制されることや (Sutin and Griffith, 1993; Hodges-Savola *et al.*, 1996)、ノルアドレナリン作動性神経により制御されることが報告されている (Griffith and Sutin, 1996)。

このように、アストロサイトの突起形態制御における β -AR の役割を示す多くのエビデンスがある一方で、 α -AR の役割はほとんど知られていない。マウス大脳皮質ニューロン・アストロサイト共培養において、ノルアドレナリンがアストロサイトの突起構造を消失させたという報告もある (Bar El *et al.*, 2018)。そのため、ノルアドレナリンのアストロサイトの突起形態への効果は、突起形成を誘導する β -AR の観点からだけでは説明できない。また、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 (Zhang *et al.*, 2004)。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、 α -AR は β -AR とは異なる細胞内シグナルを伝達する (Horvat *et al.*, 2016)。特に、 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 (Ruck *et al.*, 1991; Enkvist *et al.*, 1996)。

ノルアドレナリンのアストロサイトの突起形態に対する効果を完全に理解するためには、 α -AR の役割を検討することが必要不可欠である。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。

II. 方法

A. 実験動物

本研究は北海道大学大学院獣医学研究院・獣医学部において行う実験動物に関するガイドラインに従って行った（動物実験計画書承認番号：19-0009）。実験には自家繁殖した新生ラット（Wistar、雌雄、3–5 日齢）を用いた。親ラットは日本クレア（東京、日本）より購入した。

B. アストロサイトの分離培養法

アストロサイトの培養には、10% fetal bovine serum (FBS、Life Technologies、東京、日本)、100 µg/ml streptomycin および 100 U/ml penicillin G (富士フイルム和光純薬、大阪、日本) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 (DMEM、富士フイルム和光純薬) を用いた。新生ラットを断頭して安楽死処置し、大脳皮質および脊髄を摘出した。二価陽イオンを含まない Hanks' balanced salt solution (HBSS、富士フイルム和光純薬) 中で、大脳皮質および脊髄から髄膜を丁寧に除去し、角膜尖刀を用いて細切した。続いて papain (10 U/ml、Worthington Biochemical、NJ、USA) および DNase (0.1 mg/ml、Roche Diagnostics、Risch-Rotkreuz、Switzerland) を含む HBSS 中で室温、20 分間静置した後、酵素含有液を除去して培養液を加え、ピペッティングにより攪拌して細胞を分離した。細胞懸濁液を poly-L-lysine (PLL、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) 処理した T-75 あるいは T-25 フラスコに播種し、1–2 時間後に培養液を交換した。培養は 37°C、5% CO₂ 下で行い、2–3 日おきに培養液を交換した。7–9 日後、細胞が 80–90%コンフルエンスになったら 37°C、250 rpm で 12 時間以上振盪することでアストロサイト以外の細胞をフラスコ底面から剥離した。残ったアストロサイトをトリプシン処置により回収し、PLL 処理した培養プレートあるいはカバーガラスに 7.9×10^3 cells/cm² で播き直して培養した。培養 3 日後の細胞を実験に用いた。薬物処置を行う実験では、細胞を FBS 非含有 DMEM 中で、37°C、5% CO₂ 下で 1 時間静置した。AR 拮抗薬は、この培地交換のタイミングで処置した。その後、ノルアドレナリンや AR 作動薬などの薬物を一定時間処置し、解析に用いた。

C. アストロサイトの突起形成の評価法

カバーガラス上で培養したアストロサイトを phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄、pH 7.4) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS 中で室温、20 分間静置し、固定した。PBS で洗浄後（3 分間以

上×2回)、0.1% Triton X-100 含有 PBS (PBST) 中で室温、5 分間静置し、透過処理を行った。PBS で洗浄後 (3 分間以上×2 回)、Phalloidin-iFluor 488 reagent (1:1,000; ab176753; Abcam, Cambridge, UK) および 1%ウシ血清アルブミンを含む PBS 中で、室温、遮光環境にて 1 時間静置し、細胞骨格である F-アクチンを染色した。PBS で洗浄後 (3 分間以上×2 回)、DAPI-Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) で封入し、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE、大阪、日本) で蛍光観察し、20 倍対物レンズを用いて蛍光画像を取得した。本研究では、細胞体の短径よりも長い突起を持つ細胞を「突起形成細胞」と定義し (図 1)、画像中の全細胞に対する突起形成細胞の割合を算出することで、突起形成を定量的に評価した。細胞の突起形成の有無の判定は目視で行い、ImageJ software (National Institutes of Health) のセルカウンタープラグインを用いて分類、計測した。突起形成細胞割合は、ランダムに取得した 6–9 枚の画像において、合計 360 個以上の細胞から算出した。

D. 免疫細胞染色法

カバーガラス上で培養したアストロサイトを PBS で洗浄し、GFAP のみの染色または GFAP と β_1 -AR の共染色では -20°C メタノールで 1 分間、GFAP と F-アクチンの共染色では 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS 中で室温、20 分間静置し、固定した。PBS で洗浄後 (5 分間以上×3 回)、10%ヤギ血清を加えた PBST 中で室温、30 分間静置し、ブロッキングを行った。続いて一次抗体を加えた 1%ヤギ血清含有 PBST 中で 4°C 、一晚静置した。一次抗体として mouse 抗 GFAP 抗体 (1:50-100; 11051; Immuno-Biological Laboratories、群馬、日本)、rabbit 抗 GFAP 抗体 (1:500; G9269; Sigma-Aldrich) あるいは rabbit 抗 β_1 -AR 抗体 (1:100; ab3442; Abcam)を用いた。細胞を PBS で洗浄後 (5 分間以上×3 回)、Alexa Fluor 555 あるいは 488 結合二次抗体 (1:500) を加えた 1%ヤギ血清含有 PBST 中で室温、遮光環境にて 30 分間静置した。PBS で洗浄後 (5 分間以上×3 回)、アクチン細胞骨格と共染色する場合には、前述のファロイジン溶液中で遮光環境にて 1 時間静置し、PBS で洗浄した (3 分間以上×2 回)。染色後の細胞を DAPI Fluoromount-G で封入し、共焦点顕微鏡 (LSM-700; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) またはオールインワン蛍光顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した。

E. 細胞内 cAMP 測定法

アストロサイトを培養した 12 穴プレートに、0.1 M HCl を 100 μl /well 加え、室温で 20 分間静置した。セルスクレーパーで細胞を剥離し、細胞懸濁液が均一になるまでピペティングした。細胞懸濁液を 4°C 、 $1,000 \times g$ で 10 分間遠心し、上清をサンプルとして採取した。cAMP 濃度 (pmol/ml) の測定は Cyclic AMP EIA Kit (581001; Cayman Chemical、

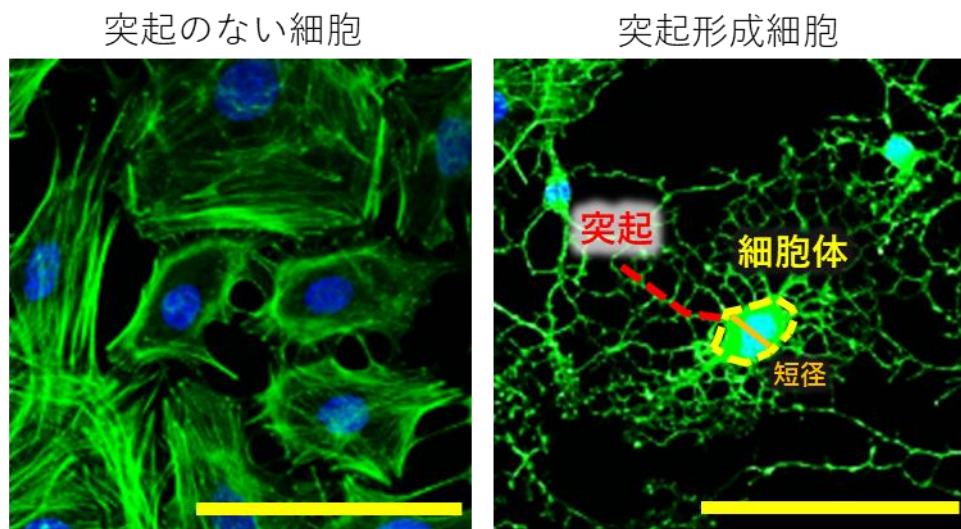


図 1. 突起形成細胞の判定基準

突起のない細胞（左）と突起形成細胞（右）の典型的なアクチン染色画像（緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m）。細胞体の短径よりも長い突起を持つ細胞を突起形成細胞として判定した。

Ann Arbor, MI, USA) を用いて、競合 ELISA 法により行った。また、各プレートからタンパク定量用サンプルを採取し、タンパク質濃度を Lowry 法 (Lowry *et al.*, 1951) に従い DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いてマイクロプレートリーダー (SH-9000Lab; Corona Electric, 茨城、日本) で測定した。定量した cAMP 量 (pmol/well) およびタンパク質量 (mg/well) より、タンパク重量あたりの cAMP 量 (pmol/mg) を算出した。

F. RNA 抽出および cDNA 合成

6 穴プレートで培養したアストロサイトを RNAiso Plus (タカラバイオ、滋賀、日本) で溶解し、5 分間静置した後、クロロホルムを加えて 15 秒間激しく振盪した。室温で 10 分間静置し、4℃、12,000 × g で 15 分間遠心後、3 相に分かれたサンプルから水相を回収した。水相にイソプロパノールを加えて混合し、室温で 10 分間静置した。4℃、12,000 × g で 10 分間遠心し、上清を除去した。沈澱した白色ペレットを 75%エタノールで洗浄し、4℃、12,000 × g で 5 分間遠心してエタノールを除去した後、10 分間程度乾燥させ、RNase free の蒸留水で溶解した。RNA 溶液を 65℃、5 分間静置し、氷上で急冷した。溶液の RNA 濃度は分光光度計 (NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により 260 nm における吸光度を測定して算出した。

得られた RNA サンプルからの cDNA 合成は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301; TOYOBO, 大阪、日本) とサーマルサイクラー (PC320; ASTEC, 福岡、日本) を用い、添付の使用説明書の手順に従って行った。cDNA 最終反応液量 1 µl あたり、RNA を 40 ng 含む割合で試薬を混合し、逆転写反応を行った。

G. リアルタイム PCR 法

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (QPS-201; TOYOBO) を用いて、PCR 最終反応液量 1 µl あたり、cDNA 液を 0.1 µl 含む割合で試薬を混合し、リアルタイム PCR を行った。使用したプライマーの塩基配列は表 1 に示した。AR に対するプライマー配列は、先行研究 (Koppel *et al.*, 2018) で用いられたものと同じものを用いた。PCR は Eco Real Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて、95℃で 60 秒間 (initial denature) の後、95℃で 15 秒間 (denature)、表 1 の温度で 45 秒間 (anneal, extension) を 1 サイクルとして、40 サイクル行った。融解曲線分析により PCR 産物の確認を行った。*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* をリファレンス遺伝子として、 $\Delta\Delta Ct$ 法により、大脳皮質アストロサイトに対する脊髄アストロサイトの AR mRNA 発現を相対定量した。

表 1. リアルタイム PCR 法で使したプライマーの塩基配列

標的遺伝子 (Rat)	プライマー配列 (上; forward、下; reverse)	増幅産物 サイズ (bp)	Annealing 温度 (°C)
<i>adrenoceptor alpha 1A</i>	5'-AGAAGAAAGCTGCCAAGACG-3' 5'-GAAATCCGGGAAGAAAGACC-3'	104	60
<i>adrenoceptor alpha 1B</i>	5'-TCTTATGTTGGCTCCCCTTC-3' 5'-ACGGGTAGATGATGGGATTG-3'	138	60
<i>adrenoceptor alpha 1D</i>	5'-TGAGGCTGCTCAAGTTTTCC-3' 5'-GCCAGAAGATGACCTTGAAGAC-3'	165	61
<i>adrenoceptor alpha 2A</i>	5'-TTCCTGAGAGGGAAGGGATT-3' 5'-AGTTACTGGGGCAAGTGGTG-3'	176	61
<i>adrenoceptor alpha 2B</i>	5'-AATTCTCTGAACCCCCAAGC-3' 5'-CAAGTTGGGAAGACAACCAG-3'	147	60
<i>adrenoceptor alpha 2C</i>	5'-GGTTTCCTCATCGTTTTCA-3' 5'-GAAAAGGGCATGACCAGTGT-3'	150	61
<i>adrenoceptor beta 1</i>	5'-GCTCTGGACTTCGGTAGACG-3' 5'-ACTTGGGGTCGTTGTAGCAG-3'	248	61
<i>adrenoceptor beta 2</i>	5'-AGCCACCTACGGTCTCTGAA-3' 5'-GTCCCGTTCCTGAGTGATGT-3'	208	61
<i>adrenoceptor beta 3</i>	5'-TCGTCTTCTGTGCAGCTACG-3' 5'-ATGGTCCTTCATGTGGGAAA-3'	150	61
<i>glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)</i>	5'-GCAAGAGAGAGGCCCTCAG-3' 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'	74	61

H. ウェスタンブロット法

6 穴あるいは 12 穴プレートで培養したアストロサイトを PBS で 2 回洗浄後、プロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma-Aldrich) を含む radio immuno precipitation assay buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, pH 7.5) で溶解した。採取したサンプルを超音波装置で破碎し、 $10,000 \times g$ 、4°C で 10 分間遠心後の上清をタンパク質サンプルとして用いた。サンプルのタンパク質濃度は DC Protein Assay Kit を用いてマイクロプレートリーダーで測定した。このサンプルをローディングバッファー (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 12.5% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 100 mM DTT, pH 6.8) で溶解し、95°C で 5 分間処理してタンパク質を変性させた。サンプルをポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動により分離後、PVDF メンブレンに転写した。抗原抗体反応では Tris buffered saline (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6) に Tween-20 を 0.1% 溶解したもの (TBST) を緩衝液として用いた。メンブレンを 5% スキムミルク含有 TBST 中で室温、30–60 分間緩やかに振盪し、さらに 1% スキムミルクと一次抗体を含む TBST 中で 4°C、一晩緩やかに振盪した。メンブレンを TBST で 5 分間以上 $\times 3$ 回洗浄後、1% スキムミルクと horseradish peroxidase 標識二次抗体 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA または Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を含む TBST 中で室温、1 時間緩やかに振盪した。メンブレンを TBST で洗浄後 (5 分間以上 $\times 3$ 回)、抗体は ECL Prime (GE Healthcare) を用いて発光させ、デジタルカメラ (Liponics, 日本、東京) を用いて発光画像を取得した。使用した一次抗体を表 2 に示した。発光画像は、Digital Photo Professional 3.8 (Canon, 東京、日本) および ImageJ software で解析した。

I. 試薬

使用した試薬は以下の通りである。

Dexmedetomidine hydrochloride、atipamezole hydrochloride、isoproterenol hydrochloride および adenosine は Sigma-Aldrich から、phenylephrine hydrochloride、propranolol hydrochloride および forskolin は富士フイルム和光純薬から、L-noradrenaline bitartrate monohydrate および prazosin hydrochloride は東京化成工業 (東京、日本) から、N6,2'-O-dibutyryladenosine-3',5'-cyclic monophosphate (dibutyryl cAMP) sodium salt および Y27632 はナカライテスク (京都、日本) から購入した。

表 2. ウェスタンブロット法で使用した一次抗体

標的蛋白質	(由来)	抗体希釈倍率		製品番号	製造元
		一次	二次		
GFAP	mouse	10,000	10,000	11051	Immuno-Biological Laboratories
adrenoceptor alpha 1A	mouse	1,000	5,000	sc- 100291	Santa Cruz Biotechnology
adrenoceptor alpha 1D	mouse	250	4,000	sc- 390884	Santa Cruz Biotechnology
adrenoceptor alpha 2A	goat	2,000	10,000	sc-1478	Santa Cruz Biotechnology
adrenoceptor alpha 2B	mouse	150	2,000	sc- 390430	Santa Cruz Biotechnology
adrenoceptor beta 3	mouse	500	5,000	sc- 515763	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	mouse	50,000	—	G9295	Sigma-Aldrich

抗 GAPDH 抗体は horseradish peroxidase 結合型の一次抗体を用いた。

J. 統計処理

それぞれの実験は最低異なる 3 個体から得られた培養細胞を用いて行った。データは平均値±標準誤差、n = 例数で示した。二群間の有意差検定は **unpaired Student's t-test** を用いて行い、多重比較では一元配置分散分析後に **Dunnett's test** を用いて行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意差水準とした。全ての統計解析にはエクセル統計 2008 (v.1.18; Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いた。

III. 結果

A. 脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの性状比較

アストロサイトの形態や機能は、CNS の部位によって異なることが知られている(Chai *et al.*, 2017; Batiuk *et al.*, 2020)。そこで、本研究で用いた脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの GFAP (アストロサイトマーカー) 発現、形態および増殖能を比較した。まず、GFAP 発現を抗 GFAP 抗体による免疫染色およびウェスタンブロット解析で比較した。GFAP 免疫染色では、陰性コントロールである髄膜細胞と比較して、脊髄および大脳皮質アストロサイトの培養系いずれにおいてもほぼすべての細胞が染まるのを確認できた (図 2A)。しかしながら、大脳皮質アストロサイトではすべての細胞がほぼ均一かつ明瞭に染まるのに対して、脊髄アストロサイトでは染まりにばらつきがあり、染色が不明瞭な細胞もみられた。脊髄アストロサイトでは、播種後培養日数に比例して、GFAP 免疫染色で明瞭に染まる細胞の割合が増加した (データは示さない)。ウェスタンブロット解析では、播種前および播種 3 日後において、いずれも大脳皮質アストロサイトの方が、脊髄アストロサイトに比べて、GFAP 発現が高い傾向がみられた (図 2B)。続いて、アクチン細胞骨格染色により形態を比較した。脊髄と大脳皮質のいずれのアストロサイトも共通して、ほとんどの細胞が突起を持たない多角形の形態をしていた (図 2C)。一方で、脊髄アストロサイトでは、大脳皮質アストロサイトと比べて、明瞭なストレスファイバーを有する細胞が多くみられた。血球計算盤を用いた細胞計測により増殖能を比較したところ、脊髄と大脳皮質アストロサイトではほとんど差はみられなかった (図 2D)。

以上の結果から、脊髄および大脳皮質培養アストロサイトでは、GFAP 発現や形態に違いが認められた。以降の実験では、この性状の異なる 2 種類の培養アストロサイトを用いて、ノルアドレナリンや α 作動薬および拮抗薬が形態や細胞内シグナルに与える影響を検討した。

B. 脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの形態と細胞内 cAMP に対するノルアドレナリンおよび β 作動薬の効果

ノルアドレナリンや β 作動薬は、培養アストロサイトの細胞内 cAMP を増加させ、突起形成を誘導することが報告されている。そこで、脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの形態と細胞内 cAMP に対する、ノルアドレナリンおよび β 作動薬の効果を検討した。

1. 形態に対するノルアドレナリンおよび β 作動薬の効果

脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン ($1 \mu\text{M}$) および β 作動

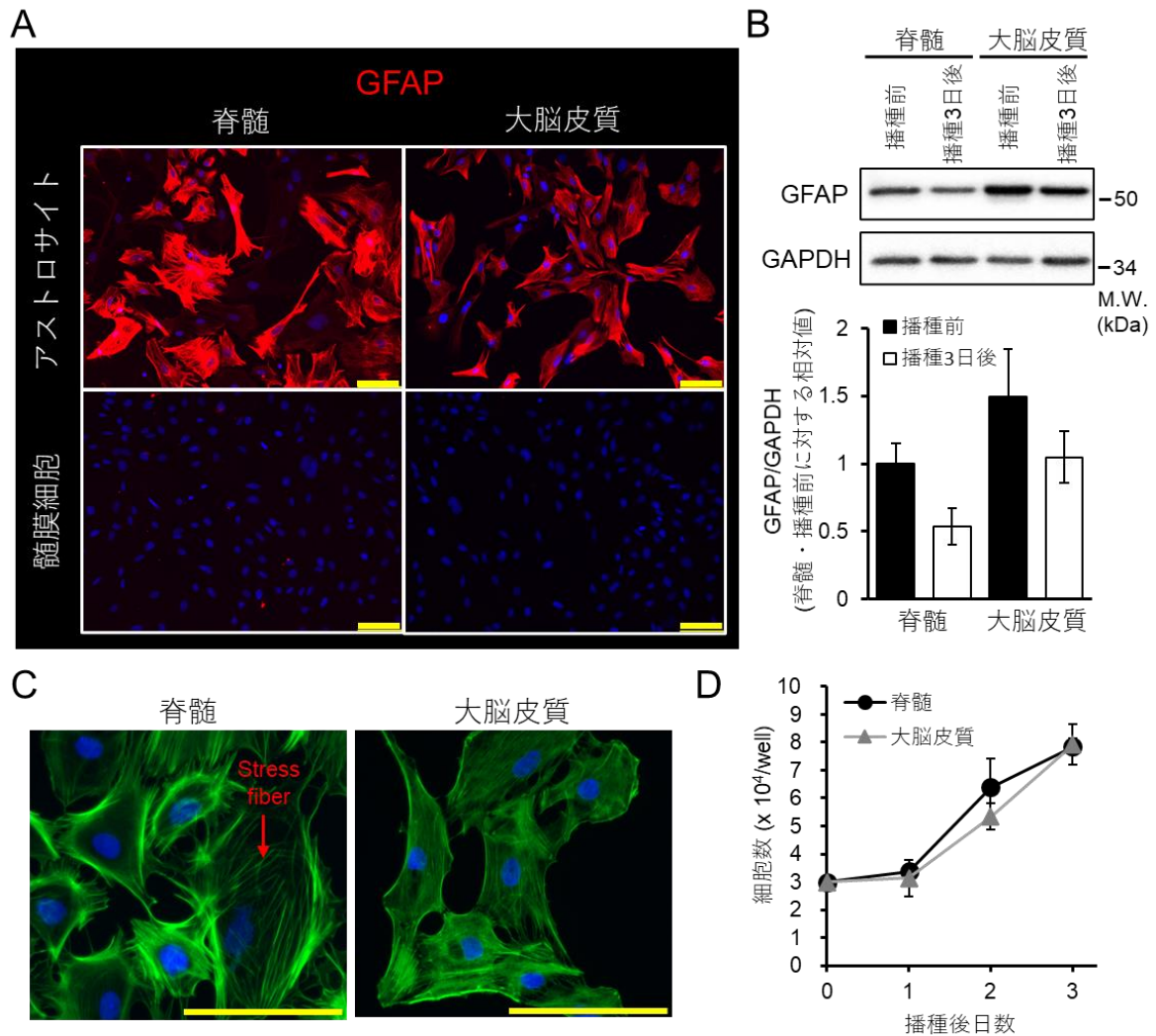


図 2. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの GFAP 発現、アクチン細胞骨格および増殖

(A) 播種 3 日後の脊髄および大脳皮質アストロサイトの典型的な GFAP 染色画像 (赤: GFAP、青: DAPI、Scale bar = 100 μm)。陰性コントロールとして髄膜細胞を用いた。

(B) 播種前または播種 3 日後の脊髄および大脳皮質アストロサイトの GFAP (50 kDa) および GAPDH (37 kDa) のウェスタンブロット解析。GFAP のバンド濃度を GAPDH のバンド濃度で標準化し、播種前の脊髄アストロサイトの値を 1 として示した。n = 4。

(C) 脊髄および大脳皮質アストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μm)。

(D) 脊髄および大脳皮質アストロサイトを 12 穴プレートに 3×10^4 個/well で播種し、1、2 および 3 日後の細胞数を血球計算盤を用いて計測した。n = 4。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

薬イソプロテレノール (1 μM) の 3 時間の処置は、細胞体の縮小と突起形成を誘導した (図 3)。この誘導された突起は、GFAP 染色陽性の主突起と GFAP 難染色性かつ F-アクチン陽性の微細突起から成り、生体内のアストロサイトに類似した形態を持っていた。微細突起の形成は、大脳皮質アストロサイトに比べて、脊髄アストロサイトでより顕著であった。以降の実験では、このような突起形成に対する薬物の効果を定量するために、アクチン染色により突起形成細胞を同定し、その割合を算出した。

まず、脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (1 μM) およびイソプロテレノール (1 μM) の突起形成に対する効果の時間依存性を検討した。これらの薬物による突起形成は、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状態に戻った (図 4A, B)。この結果から、以降の実験では薬物処置 3 時間後に形態評価を行った。次に、ノルアドレナリンおよびイソプロテレノールの突起形成に対する効果の濃度依存性を検討したところ、いずれも 1 μM で最大効果が得られた (図 4C)。これらの薬物の突起形成に対する効果は、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 (表 3, 4)。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大きかった。特に、脊髄アストロサイトではこれらの薬物の効果の差が大きく、イソプロテレノールの最大効果に対するノルアドレナリンの最大効果の割合 [ノルアドレナリン (1 μM) による突起形成 (%) $\div$ イソプロテレノール (1 μM) による突起形成 (%) $\times$ 100] は、大脳皮質アストロサイトで $83.4 \pm 3.6\%$ ($n=4$) に対して、脊髄アストロサイトで $63.5 \pm 3.0\%$ ($n=4$) であり、有意に小さかった ($p < 0.01$, unpaired Student's t-test)。

2. 細胞内 cAMP に対するノルアドレナリンおよび β 作動薬の効果

脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (1 μM) およびイソプロテレノール (1 μM) は、細胞内 cAMP レベルを増加させた (図 5)。この増加反応は、薬物処置 30 分後までにピークとなり、その後急激に減少し、12 時間後までは処置前よりもやや高い値で維持された。これらの薬物の細胞内 cAMP 増加に対する効果は、突起形成に対する効果と同様に、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かった (表 5)。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大きかった。

3. 形態に対するアデニル酸シクラーゼ活性化薬および細胞膜透過性 cAMP 類似体の効果

脊髄および大脳皮質アストロサイトの細胞内 cAMP と突起形成の関係を明らかにするために、アデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin と細胞膜透過性 cAMP 類似体 dibutyryl cAMP の突起形成に対する効果を検討した。Forskolin (10 μM) および dibutyryl cAMP (0.3 または 1 mM) の 3 時間の処置は、ノルアドレナリンやイソプロテレノールと同様に、GFAP 染色陽性の主突起と GFAP 難染色性かつ F-アクチン陽性の微細突起の形成を誘導した (図

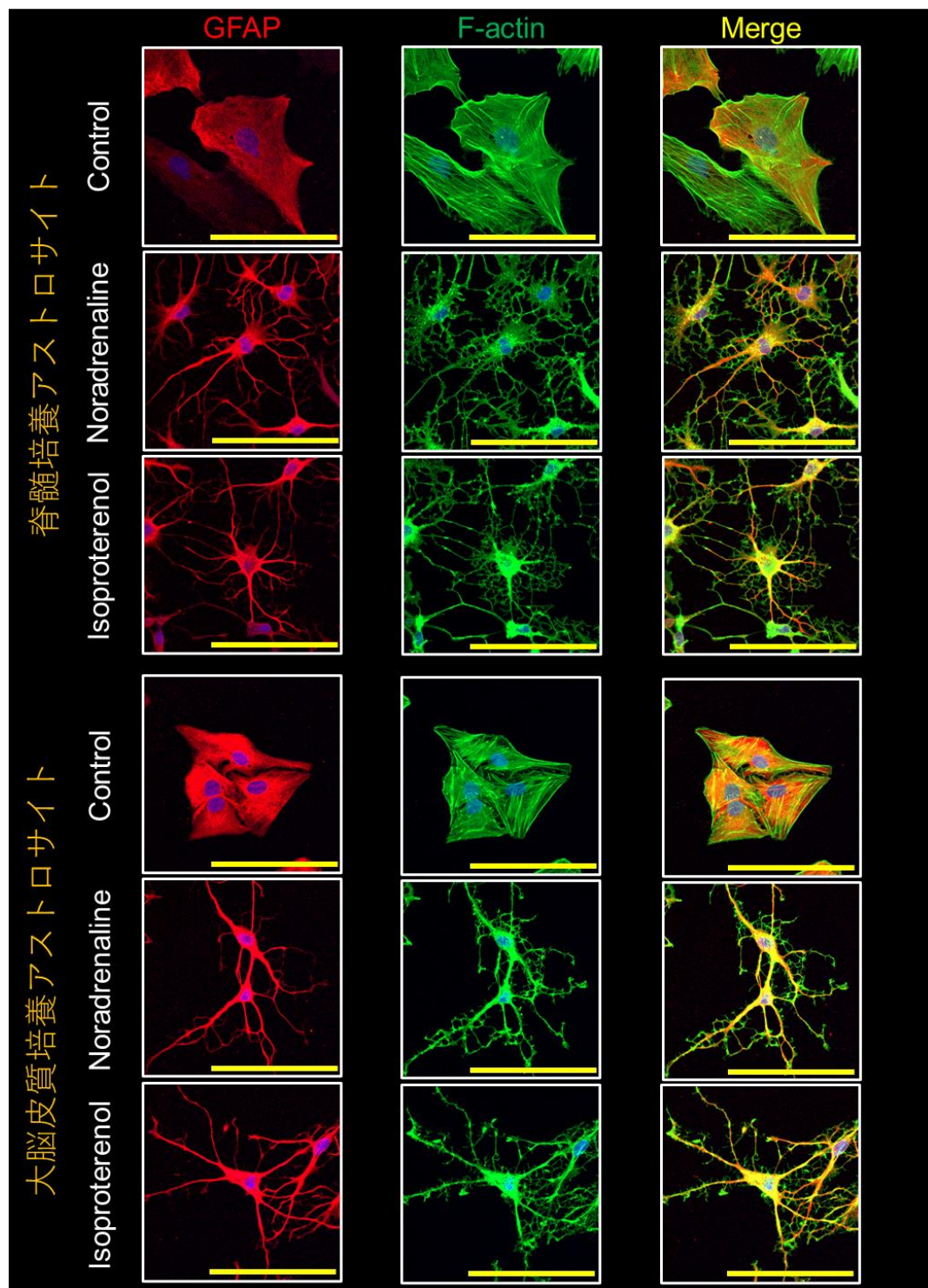


図 3. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの形態に対するノルアドレナリンおよび B 作動薬の効果

ノルアドレナリン (1 μ M) またはイソプロテレノール (1 μ M) を 3 時間処置したアストロサイトの典型的な GFAP/アクチン共染色画像 (赤: GFAP、緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m)。

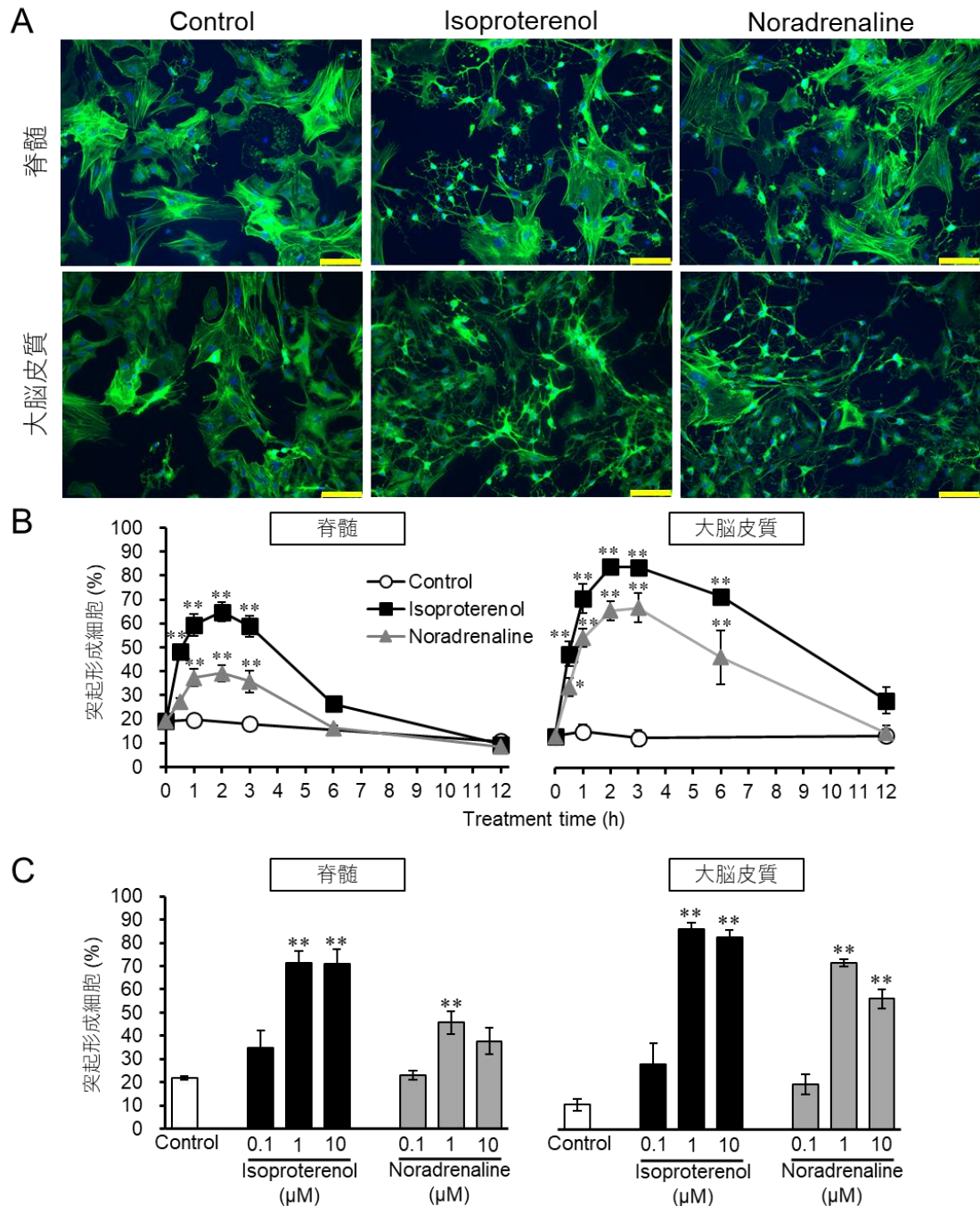


図 4. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの形態に対するノルアドレナリンと β 作動薬の効果の時間・濃度依存性

(A) ノルアドレナリン ($1 \mu\text{M}$) あるいはイソプロテレノール ($1 \mu\text{M}$) を 3 時間処置したアストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑 : F-actin、青 : DAPI、Scale bar = $100 \mu\text{m}$)。 (B) ノルアドレナリン ($1 \mu\text{M}$) あるいはイソプロテレノール ($1 \mu\text{M}$) を 0.5、1、2、3、6 または 12 時間処置した際の突起形成細胞割合 (%)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 処置前 (0 h) (Dunnett's test)、 $n = 4-5$ 。 (C) ノルアドレナリンあるいはイソプロテレノール 0.1、1 または $10 \mu\text{M}$ を 3 時間処置した際の突起形成細胞割合 (%)。** $p < 0.01$ vs. control (Dunnett's test)、 $n = 4$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

表 3. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの形態に対するノルアドレナリンと β 作動薬の効果の時間依存性

		処置時間 (h)			
		0	0.5	1	2
コントロール	脊髄	19.3 $\pm$ 1.9	-	19.8 $\pm$ 2.2	-
	大脳皮質	13.5 $\pm$ 3.0	-	15.4 $\pm$ 2.8	-
イソプロテレノール (1 μ M)	脊髄	-	48.3 $\pm$ 2.8	59.5 $\pm$ 4.6	64.8 $\pm$ 4.0
	大脳皮質	-	47.9 $\pm$ 5.2	71.0 $\pm$ 6.0	84.3 $\pm$ 2.2**
ノルアドレナリン (1 μ M)	脊髄	-	27.5 $\pm$ 1.3	37.4 $\pm$ 3.7	39.1 $\pm$ 3.5
	大脳皮質	-	33.9 $\pm$ 3.9	54.5 $\pm$ 3.9*	65.9 $\pm$ 3.9**
		処置時間 (h)			
			3	6	12
コントロール	脊髄		18.0 $\pm$ 2.2	-	10.9 $\pm$ 2.3
	大脳皮質		12.7 $\pm$ 3.5	-	13.7 $\pm$ 1.3
イソプロテレノール (1 μ M)	脊髄		58.8 $\pm$ 4.5	26.5 $\pm$ 2.1	9.4 $\pm$ 1.5
	大脳皮質		84.0 $\pm$ 2.5**	71.8 $\pm$ 2.9**	28.4 $\pm$ 5.6*
ノルアドレナリン (1 μ M)	脊髄		35.7 $\pm$ 4.6	16.3 $\pm$ 1.0	8.5 $\pm$ 0.8
	大脳皮質		67.1 $\pm$ 6.1**	46.4 $\pm$ 11.4	14.8 $\pm$ 3.0

ノルアドレナリン (1 μ M) あるいはイソプロテレノール (1 μ M) を 0.5、1、2、3、6 または 12 時間処置した際の突起形成細胞割合 (%)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 脊髄アストロサイト (unpaired Student's t-test)、 $n = 4-5$ 。データは図 4B に対応し、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

表 4. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの形態に対するノルアドレナリンと β 作動薬の効果の濃度依存性

	コントロール	イソプロテレノール (μM)		
		0.1	1	10
脊髄	21.9 ± 0.9	34.9 ± 7.2	71.4 ± 5.1	71.1 ± 6.1
大脳皮質	$10.7 \pm 2.6^{**}$	28.3 ± 9.1	$86.8 \pm 2.9^*$	83.4 ± 3.0
		ノルアドレナリン (μM)		
		0.1	1	10
脊髄		23.1 ± 2.1	45.7 ± 4.9	37.7 ± 5.7
大脳皮質		19.5 ± 4.5	$72.1 \pm 1.6^{**}$	$56.6 \pm 4.1^*$

ノルアドレナリンあるいはイソプロテレノール 0.1、1 または 10 μM を 3 時間処置した際の突起形成細胞割合 (%)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 脊髄アストロサイト (unpaired Student's t-test)、 $n = 4$ 。データは図 4C に対応し、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

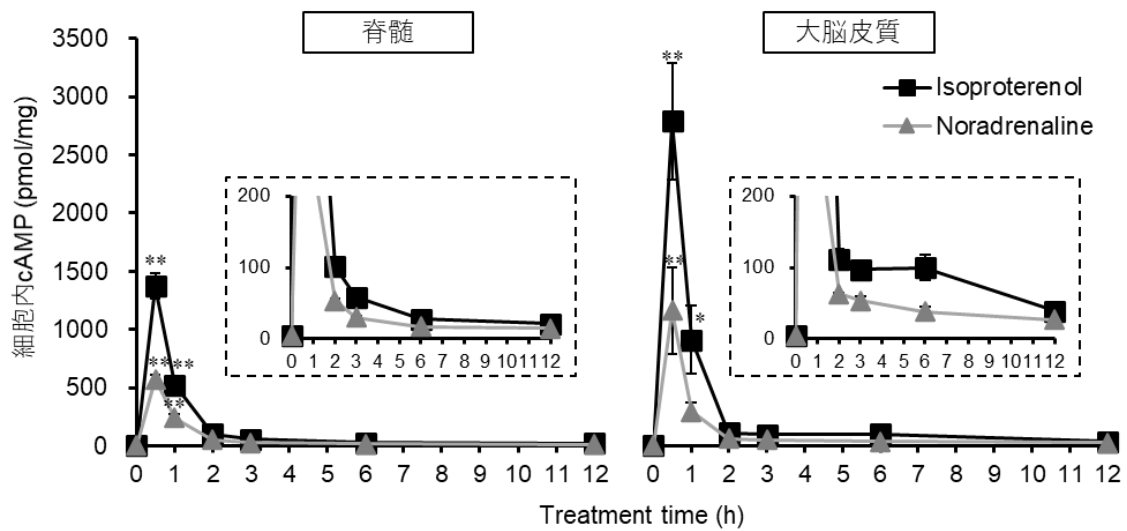


図 5. 脊髓および大脳皮質アストロサイトの細胞内 cAMP に対するノルアドレナリンと β 作動薬の効果の時間依存性

ノルアドレナリン ($1 \mu\text{M}$) あるいはイソプロテレノール ($1 \mu\text{M}$) を 0.5、1、2、3、6 または 12 時間処置した際の細胞内 cAMP レベル (pmol/mg)。挿入図は低濃度 cAMP レベル部分の拡大図。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 処置前 (0 h) (Dunnett's test)、 $n = 3$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

表 5. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの細胞内 cAMP に対するノルアドレナリンと β 作動薬の効果の時間依存性

		処置時間 (h)			
		0	0.5	1	2
コントロール	脊髄	4.5 ± 0.4	-	-	-
	大脳皮質	4.9 ± 1.2	-	-	-
イソプロテレノール (1 μ M)	脊髄	-	1373.0 ± 107.9	525.8 ± 53.2	101.1 ± 10.3
	大脳皮質	-	2791.0 ± 500.1	912.1 ± 289.7	111.5 ± 13.9
ノルアドレナリン (1 μ M)	脊髄	-	572.2 ± 40.2	243.0 ± 25.5	53.9 ± 1.9
	大脳皮質	-	1163.8 ± 370.6	297.6 ± 76.0	63.2 ± 1.2*

		処置時間 (h)		
		3	6	12
コントロール	脊髄	-	-	-
	大脳皮質	-	-	-
イソプロテレノール (1 μ M)	脊髄	58.5 ± 7.1	27.8 ± 5.8	21.1 ± 2.1
	大脳皮質	97.6 ± 7.6*	99.9 ± 18.0*	39.4 ± 6.4
ノルアドレナリン (1 μ M)	脊髄	29.9 ± 2.1	17.0 ± 2.3	14.7 ± 0.7
	大脳皮質	53.7 ± 6.5*	37.9 ± 6.9*	26.8 ± 2.3**

ノルアドレナリン (1 μ M) あるいはイソプロテレノール (1 μ M) を 0.5、1、2、3、6 または 12 時間処置した際の細胞内 cAMP レベル (pmol/mg)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 脊髄アストロサイト (unpaired Student's t -test)、 $n = 3$ 。データは図 5 に対応し、平均値 ± 標準誤差で示した。

6A、B)。また、forskolin (0.1–10 μ M) および dibutyryl cAMP (0.01–1 mM) は濃度依存的に突起形成を誘導した (図 6C)。これらの薬物の効果は、ノルアドレナリンやイソプロテレノールの効果とは異なり、脊髄アストロサイトと大脳皮質アストロサイトで dibutyryl cAMP では大きな差はなく、forskolin (1 μ M) による突起形成誘導は大脳皮質アストロサイトで有意に弱かった (表 6)。

これらの結果から、アデニル酸シクラーゼの活性化および細胞内 cAMP の増加が突起形成を誘導することが示され、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。

C. 脊髄および大脳皮質培養アストロサイトにおけるアドレナリン受容体サブタイプの発現比較

これまでの結果において、ノルアドレナリンおよびイソプロテレノールによる細胞内 cAMP 増加と突起形成誘導は、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強くみられた。また、脊髄アストロサイトでは、 β -AR のみに作用するイソプロテレノールの突起形成誘導効果に対して、 α_1 -、 α_2 -および β -AR のすべてに作用するノルアドレナリンの効果が顕著に小さかった。これらの結果から、脊髄および大脳皮質アストロサイトでは、AR サブタイプの発現に違いがある可能性が考えられた。そこで、リアルタイム PCR 法、免疫細胞染色法およびウェスタンブロット法を用いて、脊髄および大脳皮質アストロサイトにおける各 AR サブタイプの mRNA およびタンパク質発現を調べた。

大脳皮質アストロサイトと比較して、脊髄アストロサイトでは、 α_{1A} -、 α_{1D} -、 α_{2B} - および β_3 -AR の mRNA 発現が有意に高く、 α_{2C} -および β_1 -AR の mRNA 発現は低かった (図 7A)。免疫細胞染色で β_1 -AR、ウェスタンブロット解析で α_{1A} -、 α_{1D} -、 α_{2A} -、 α_{2B} -および β_3 -AR のタンパク質発現を確認した (図 7B、C)。mRNA 発現とは異なり、 α_{2A} -および α_{2B} -AR 発現は、大脳皮質アストロサイトに比べて、脊髄アストロサイトで有意に低かった。また、 α_{1D} -AR 発現も大脳皮質アストロサイトに比べ脊髄アストロサイトで低い傾向を示した。

以上の結果から、脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、 α_1 -、 α_2 -および β -AR がタンパク質レベルで発現していることを確認できた。また、脊髄アストロサイトでは、大脳皮質アストロサイトに比べて、 α_2 -AR タンパク発現が低いことが示された。

D. 培養アストロサイトの突起形成と細胞内 cAMP レベルの制御におけるアドレナリン受容体サブタイプの役割

一般的に、神経細胞や平滑筋に対して α_1 -、 α_2 -および β -AR はそれぞれ異なる作用を示し、特に α_2 -AR は抑制性の作用を示すことが知られている。本研究においても、海馬ニューロンのノルアドレナリン放出が α_2 -AR 活性化により抑制されることを確認した (データは示

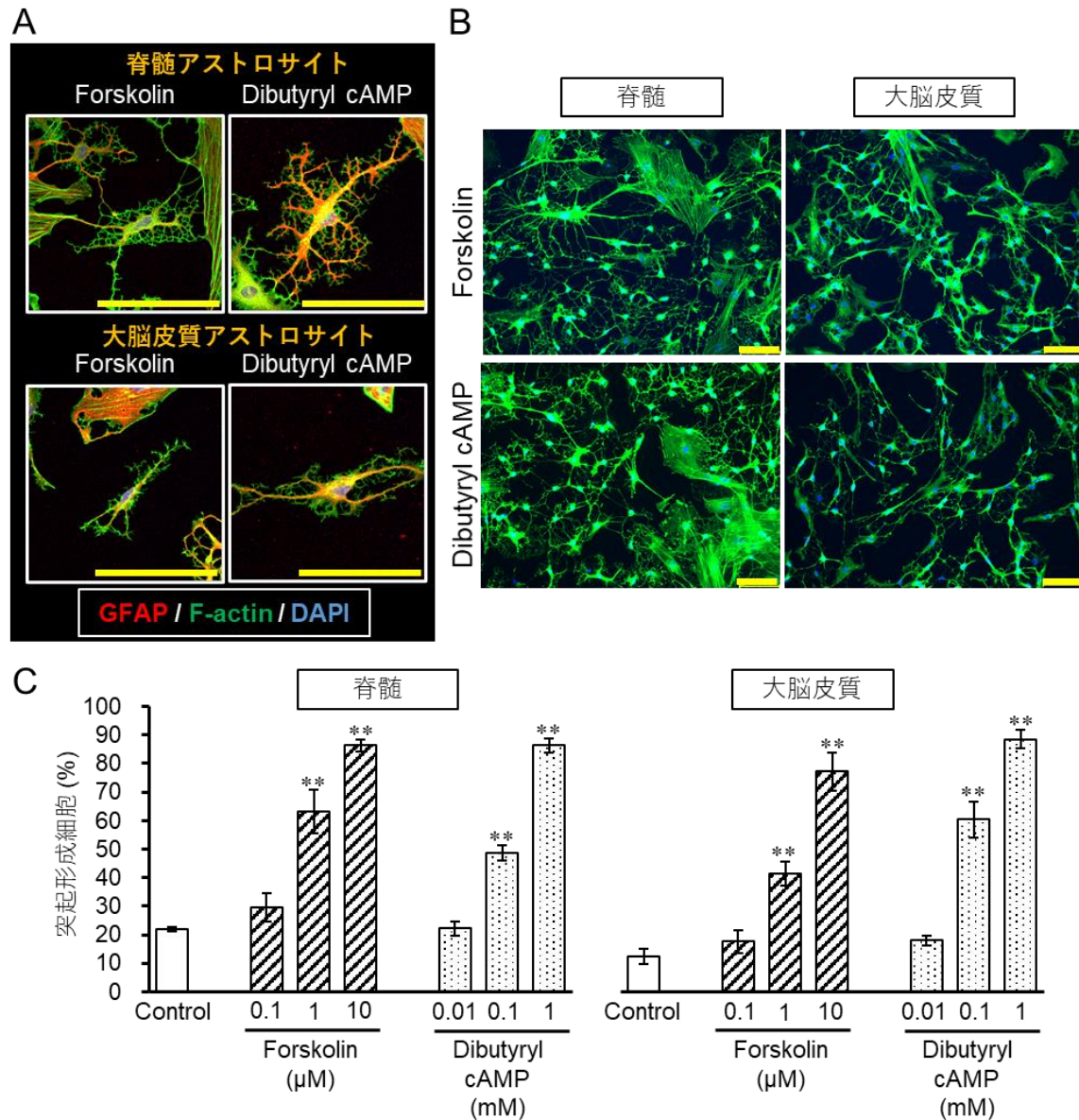


図 6. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの形態に対するアデニル酸シクラーゼ活性化薬と細胞膜透過性 cAMP 類似体の効果

(A、B) Forskolin (10 μM) あるいは dibutyryl cAMP (A; 0.3 mM または B; 1 mM) を 3 時間処置したアストロサイトの典型的な GFAP/アクチン共染色画像 (A) およびアクチン染色画像 (B) (赤: GFAP、緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μm)。 (C) Forskolin 0.1、1 または 10 μM あるいは dibutyryl cAMP 0.01、0.1 または 1 mM を 3 時間処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 **p < 0.01 vs. control (Dunnett's test)、n = 4–5。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

表 6. 脊髄および大脳皮質アストロサイトの形態に対するアデニル酸シクラーゼ活性化薬と細胞膜透過性 cAMP 類似体の効果の濃度依存性

	コントロール	Forskolin (μM)		
		0.1	1	10
脊髄	21.9 ± 0.9	29.6 ± 5.0	63.2 ± 7.5	86.3 ± 2.1
大脳皮質	$12.4 \pm 2.7^*$	17.6 ± 4.0	$41.5 \pm 4.2^*$	76.9 ± 6.7
		Dibutyryl cAMP (mM)		
		0.01	0.1	1
脊髄		22.2 ± 2.6	48.6 ± 2.7	86.3 ± 2.5
大脳皮質		18.1 ± 1.8	60.2 ± 6.4	88.2 ± 3.2

Forskolin 0.1、1 または 10 μM あるいは dibutyryl cAMP 0.01、0.1 または 1 mM を 3 時間処置した際の突起形成細胞割合 (%)。* $p < 0.05$ vs. 脊髄アストロサイト (unpaired Student's t-test)、 $n = 4-5$ 。データは図 6B に対応し、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

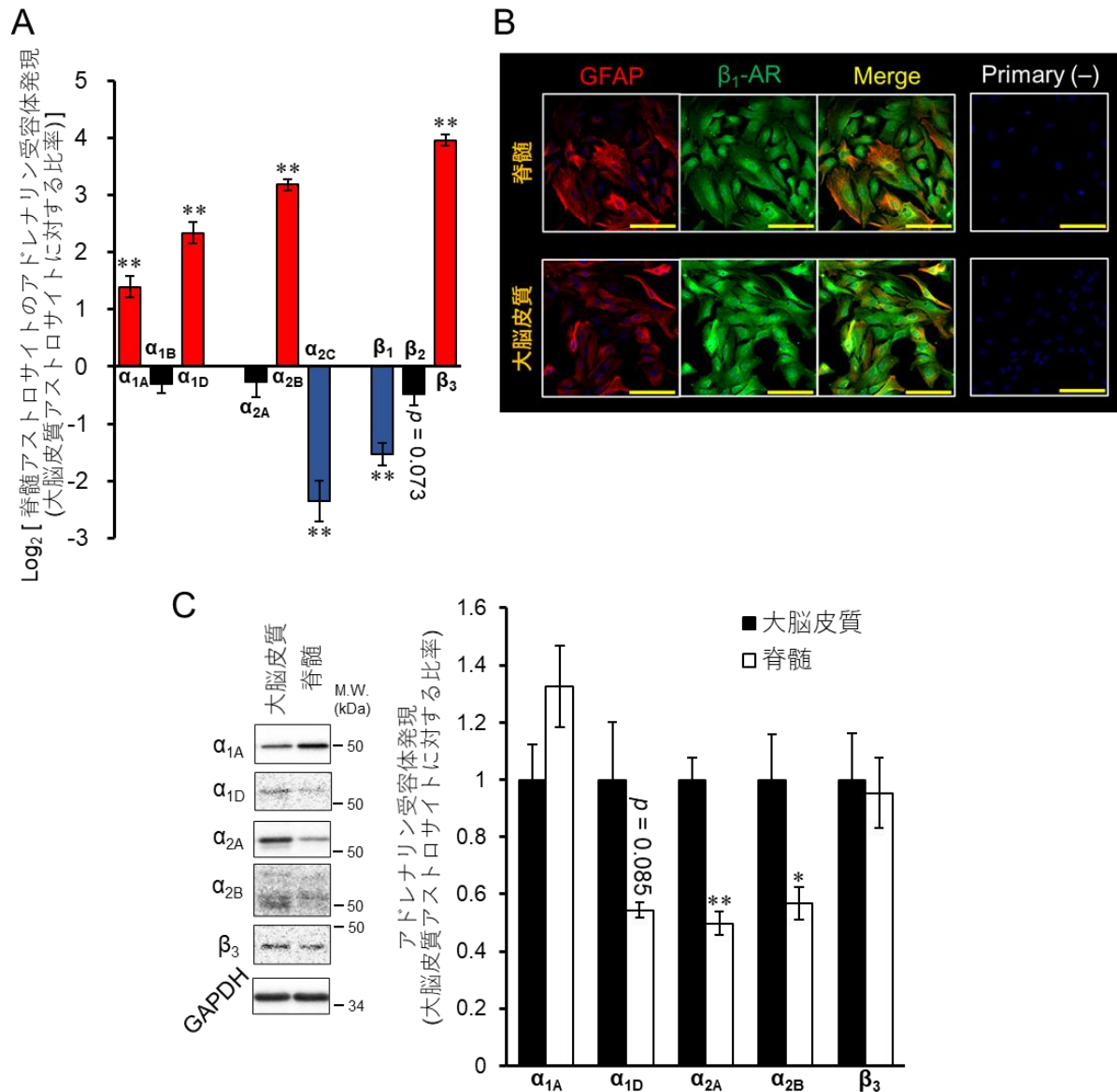


図 7. 脊髄および大脳皮質アストロサイトにおけるアドレナリン受容体サブタイプの mRNA およびタンパク質の発現

(A) 各 AR サブタイプ mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析。脊髄アストロサイトにおける各 AR サブタイプの mRNA 発現を大脳皮質アストロサイトでの発現に対する相対値で示した。縦軸は対数表記。脊髄アストロサイトでの発現が有意に高かったものを赤色、低かったものを青色で示している。* $p < 0.01$ vs. 大脳皮質アストロサイト (unpaired Student's t-test)、 $n = 6$ 。(B) 脊髄および大脳皮質アストロサイトの典型的な GFAP/ β_1 -AR 共染色画像 (赤: GFAP、緑: β_1 -AR、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m)。(C) 脊髄および大脳皮質アストロサイトの α_{1A} -AR (52 kDa)、 α_{1D} -AR (59 kDa)、 α_{2A} -AR (51 kDa)、 α_{2B} -AR (50 kDa)、 β_3 -AR (43 kDa) および GAPDH (37 kDa) のウェスタンブロット解析。各 AR のバンド濃度を GAPDH のバンド濃度で標準化し、大脳皮質アストロサイトを 1 として示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. 大脳皮質アストロサイト (unpaired Student's t-test)、 $n = 4-5$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

さず)。

そこで次に、アストロサイトの突起形成と細胞内 cAMP レベルの制御における、 α_1 -、 α_2 - および β -AR の役割を AR 拮抗薬と作動薬を用いて検討した。本検討は主に、 β 作動薬イソプロテレノールとノルアドレナリンの突起形成誘導効果に顕著な差がみられた脊髄アストロサイトを用いて行った。

1. ノルアドレナリンによる突起形成誘導と細胞内 cAMP 増加に対する AR 拮抗薬の効果

まず、脊髄アストロサイトにおいて、ノルアドレナリンによる突起形成に対する β 拮抗薬プロプラノロールの効果を検討した。プロプラノロール (10 μ M) の存在下では、ノルアドレナリン (1 μ M) は突起形成を誘導せず、むしろ抑制する傾向を示した (図 8A、B)。この結果から、ノルアドレナリンは β -AR を介して突起形成を誘導することが示された。続いて、 α_1 拮抗薬プラゾシンと α_2 拮抗薬アチパメゾールの効果を検討した。プラゾシンおよびアチパメゾールは、ノルアドレナリン (1 μ M) による突起形成を濃度依存的に増強し、プラゾシン (1 および 10 μ M) およびアチパメゾール (10 μ M) は有意な増強効果を示した (図 8A、C)。プラゾシン (1 μ M) およびアチパメゾール (10 μ M) はコントロールの突起形成には影響しなかった (図 8D)。また、プラゾシン (1 μ M) とアチパメゾール (10 μ M) の共処置は、ノルアドレナリン (1 μ M) による突起形成をさらに増強した。これらの結果から、 α_1 -および α_2 -AR は、 β -AR とは反対に、突起形成を抑制的に制御していることが示された。

続いて、ノルアドレナリンによる細胞内 cAMP 増加に対する AR 拮抗薬の効果を検討した。ノルアドレナリン (1 μ M) の 30 分間および 3 時間処置による細胞内 cAMP 増加は、プロプラノロールによって消失した (図 8E)。プラゾシンはノルアドレナリンによる細胞内 cAMP 増加に対して有意な効果を示さなかったが、アチパメゾールはノルアドレナリン 3 時間処置による cAMP 増加を有意に増強した。以上の結果から、ノルアドレナリンはアストロサイトの β -AR を介して細胞内 cAMP を増加させることで突起形成を誘導し、この突起形成は α_1 -および α_2 -AR の活性化により抑制されることが示唆された。また、 α_2 -AR を介した突起形成の抑制には、細胞内 cAMP 増加の抑制が関与している可能性が考えられた。

大脳皮質アストロサイトにおいても、プロプラノロール (10 μ M) はノルアドレナリン (1 μ M) による突起形成を消失させた (図 9A、B)。一方、脊髄アストロサイトとは異なり、プラゾシン (1 μ M) およびアチパメゾール (10 μ M) はノルアドレナリン (1 μ M) による突起形成を増強しなかった (図 9A、C)。

2. β 作動薬による突起形成誘導と細胞内 cAMP 増加に対する α 作動薬の効果

β -AR 活性化による突起形成と細胞内 cAMP 増加に対する α_1 -および α_2 -AR の機能をさらに検討するために、 β 作動薬イソプロテレノールの効果に対する α_1 作動薬フェニレフリン

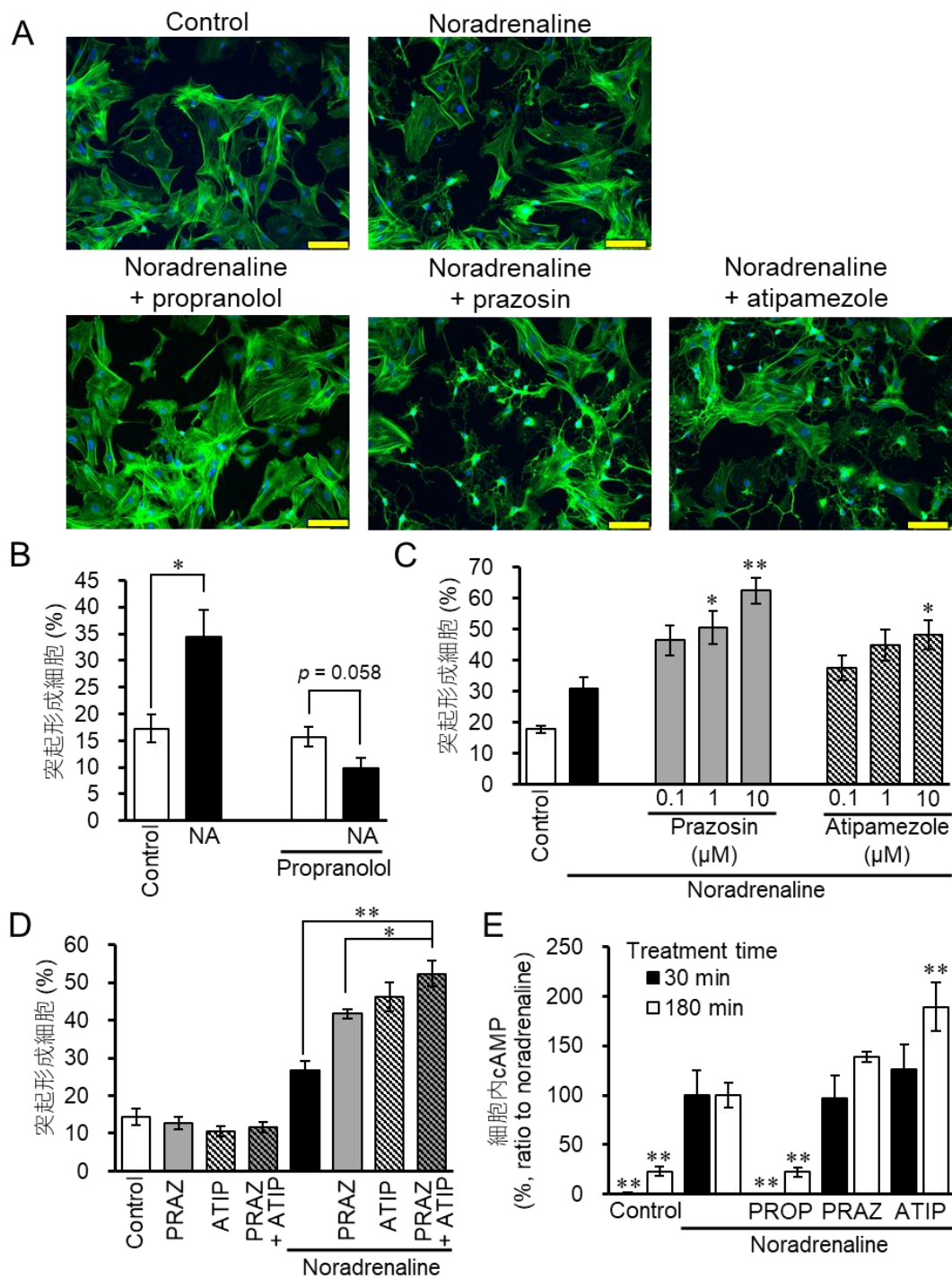


図 8. 脊髄アストロサイトにおけるノルアドレナリン誘導突起形成と細胞内 cAMP 増加に対する AR 拮抗薬の効果

(A) プロプラノロール (10 μ M)、プラゾシン (1 μ M) またはアチパメゾール (10 μ M) の存在下あるいは非存在下で、ノルアドレナリン (1 μ M) を 3 時間処置したアストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m)。 (B) プロプラノロール (10 μ M) 存在下あるいは非存在下で、ノルアドレナリン (NA; 1 μ M) を処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 * $p < 0.05$ (unpaired Student's t-test)、 $n = 6$ 。 (C) プラゾシン (0.1–10 μ M) またはアチパメゾール (0.1–10 μ M) 存在下あるいは非存在下で、ノルアドレナリン (1 μ M) を処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. noradrenaline (Dunnett's test)、 $n = 9$ 。 (D) プラゾシン (PRAZ; 1 μ M) とアチパメゾール (ATIP; 10 μ M) を単独またはノルアドレナリン (1 μ M) と共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. noradrenaline + PRAZ + ATIP (Dunnett's test)、 $n = 5-7$ 。 (E) プロプラノロール (PROP; 10 μ M)、プラゾシン (PRAZ; 1 μ M) またはアチパメゾール (ATIP; 10 μ M) 存在下あるいは非存在下で、ノルアドレナリン (1 μ M) を 30 分間または 3 時間処置した際の細胞内 cAMP レベル。縦軸は各処置時間におけるノルアドレナリン単独処置での細胞内 cAMP レベルに対する相対値 (%) で示している。 ** $p < 0.01$ vs. noradrenaline (Dunnett's test)、 $n = 4$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

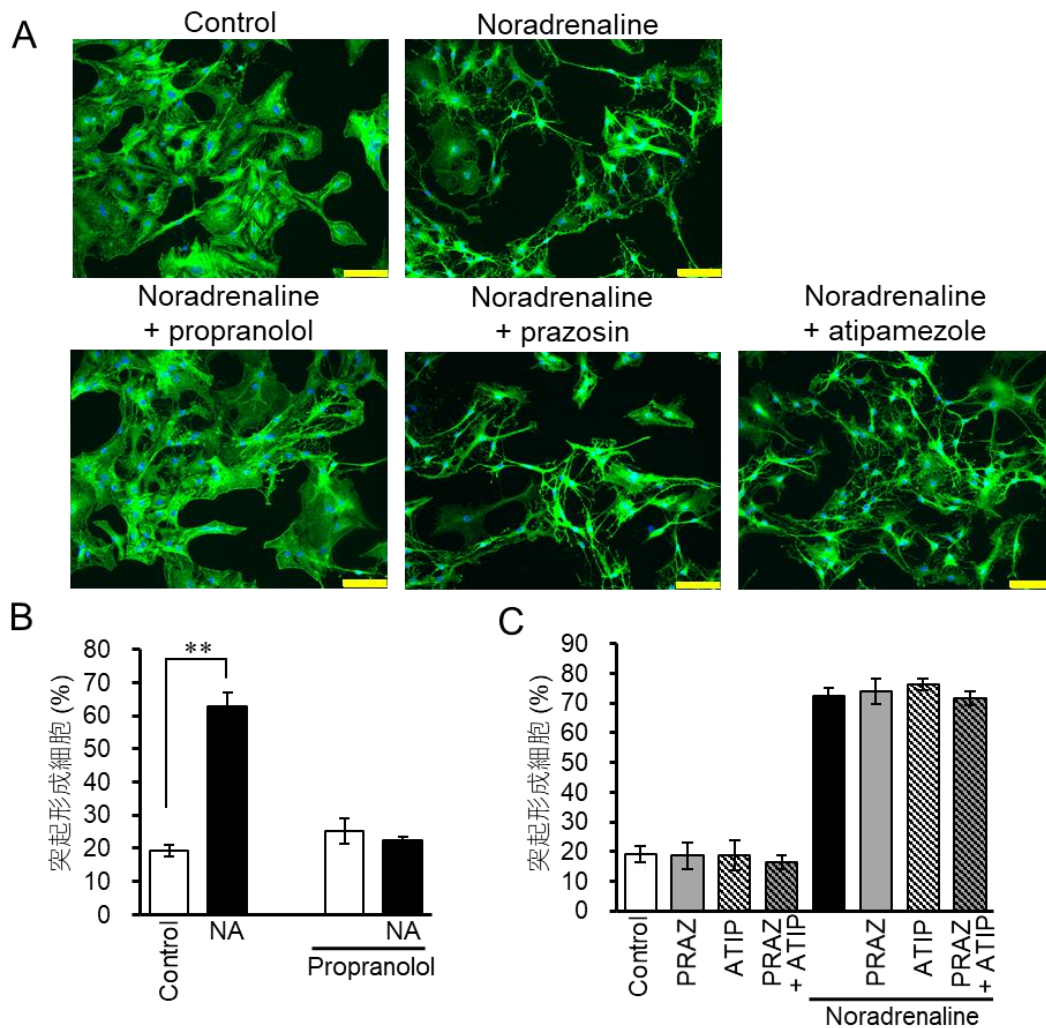


図 9. 大脳皮質アストロサイトにおけるノルアドレナリン誘導突起形成に対する AR 拮抗薬の効果

(A) プロプラノロール (10 μ M)、プラゾシン (1 μ M) またはアチパメゾール (10 μ M) の存在下あるいは非存在下で、ノルアドレナリン (1 μ M) を 3 時間処置したアストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m)。 (B) プロプラノロール (10 μ M) 存在下あるいは非存在下で、ノルアドレナリン (NA; 1 μ M) を処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 ** $p < 0.01$ (unpaired Student's t -test)、 $n = 5$ 。 (C) プラゾシン (PRAZ; 1 μ M) とアチパメゾール (ATIP; 10 μ M) を単独またはノルアドレナリン (1 μ M) と共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 $n = 4$ 。 データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

および α_2 作動薬デクスメデトミジンの効果を検討した。まず、脊髄アストロサイトにおいて、フェニレフリン (1 μM) およびデクスメデトミジン (1 μM) はコントロールの突起形成に対しては効果を示さなかったが、デクスメデトミジン (1 μM) はイソプロテレノール (1 μM) による突起形成を有意に抑制した (図 10A、B)。一方、フェニレフリン (1 μM) はイソプロテレノール (1 μM) による突起形成を抑制せず、デクスメデトミジン (1 μM) の突起形成抑制効果に対しても効果を示さなかった。続いて、イソプロテレノール (1 μM) による突起形成に対して、より高濃度のフェニレフリンおよび低濃度のデクスメデトミジンの効果を検討した。フェニレフリン (10 および 100 μM) はイソプロテレノール誘導突起形成を有意に抑制した (図 10C)。しかし、フェニレフリン (100 μM) による突起形成抑制効果は、 α_1 拮抗薬プラゾシンだけではなく α_2 拮抗薬アチパメゾール存在下でもみられなかったため (図 10D)、この反応は α_2 -AR を介している可能性が考えられた。低濃度のデクスメデトミジン (0.01 および 0.1 μM) はイソプロテレノール誘導突起形成を抑制しなかった (図 10C)。しかし、フェニレフリンとは異なり、デクスメデトミジン (1 μM) による突起形成抑制効果は、プラゾシンでは抑制されず、アチパメゾールによってのみ消失した (図 10D)。これらの結果から、デクスメデトミジンは α_2 -AR を活性化することで、イソプロテレノールによる突起形成を抑制することが示された。

続いて、細胞内 cAMP に対するフェニレフリンおよびデクスメデトミジンの効果を検討した。デクスメデトミジン (1 μM) はコントロールの細胞内 cAMP を減少させ、イソプロテレノール (1 μM) の 30 分間および 3 時間処置による細胞内 cAMP 増加を約 40%抑制する傾向を示した (図 10E)。一方、フェニレフリン (1 μM) はコントロールの細胞内 cAMP には影響せず、イソプロテレノール (1 μM) の 3 時間処置による細胞内 cAMP 増加に対しては増強する傾向を示した。また、デクスメデトミジン (1 μM) はアデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin (0.5 μM) による突起形成も顕著に抑制した (図 10F)。以上の結果から、 α_2 -AR の活性化は β -AR 活性化による突起形成を抑制し、この抑制メカニズムにはアデニル酸シクラーゼ活性の抑制による細胞内 cAMP 増加の抑制が関与する可能性が裏付けられた。

大脳皮質アストロサイトにおいても、デクスメデトミジン (1 μM) はイソプロテレノール (1 μM) による突起形成を有意に抑制したが、フェニレフリン (1 μM) は効果を示さなかった (図 11A、B)。この結果から、 α_2 -AR 活性化による突起形成の抑制機構は、脊髄アストロサイトだけではなく、大脳皮質アストロサイトでも機能していることが示された。

E. α_2 -AR を介した細胞内 cAMP 非依存的な突起形成抑制

これまでの結果から、 α_2 -AR を介したアデニル酸シクラーゼ活性の抑制による細胞内 cAMP 増加の抑制が、培養アストロサイトの突起形成抑制に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 非依存的な機構が関与するのかを検討した。

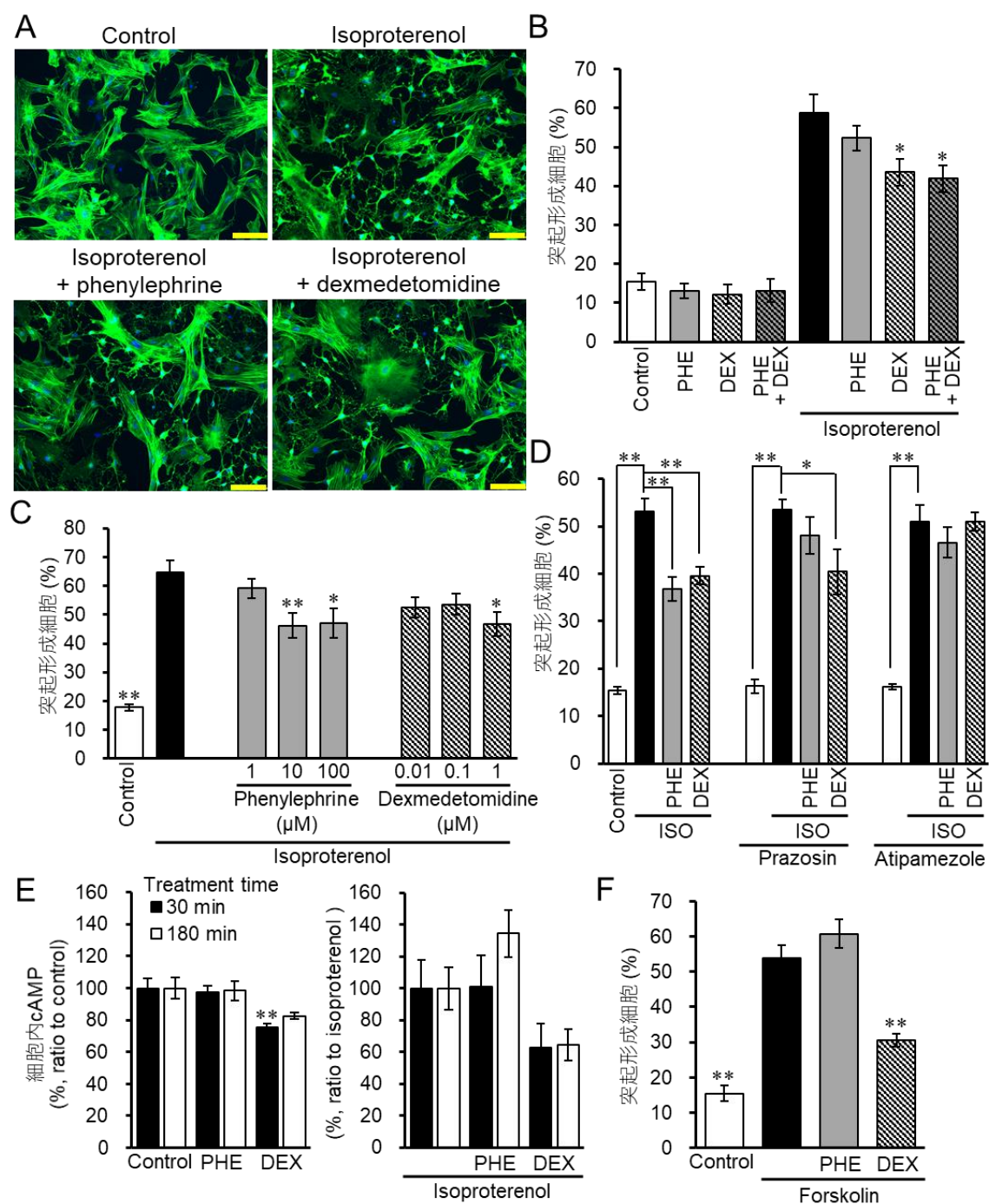


図 10. 脊髄アストロサイトにおける β 作動薬誘導突起形成と細胞内 cAMP 増加に対する α 作動薬の効果

(A) イソプロテレノール ($1\ \mu\text{M}$) を 3 時間、単独処置あるいはフェニレフリン ($1\ \mu\text{M}$) またはデクスメデトミジン ($1\ \mu\text{M}$) と共処置したアストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = $100\ \mu\text{m}$)。 (B) フェニレフリン (PHE; $1\ \mu\text{M}$) とデクスメデトミジン (DEX; $1\ \mu\text{M}$) を単独またはイソプロテレノール ($1\ \mu\text{M}$) と共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 * $p < 0.05$ vs. isoproterenol (Dunnett's test)、 $n = 6$ 。 (C) フェニレフリン (1 – $100\ \mu\text{M}$) またはデクスメデトミジン (0.01 – $1\ \mu\text{M}$) と、イソプロテレノール ($1\ \mu\text{M}$) を共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. isoproterenol (Dunnett's test)、 $n = 7$ 。 (D) プラゾシン ($1\ \mu\text{M}$) またはアチパメゾール ($10\ \mu\text{M}$) 存在下あるいは非存在下で、フェニレフリン (PHE; $100\ \mu\text{M}$) またはデクスメデトミジン (DEX; $1\ \mu\text{M}$) と、イソプロテレノール (ISO; $1\ \mu\text{M}$) を共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. isoproterenol (+ prazosin または atipamezole) (Dunnett's test)、 $n = 6$ 。 (E) フェニレフリン (PHE; $1\ \mu\text{M}$) とデクスメデトミジン (DEX; $1\ \mu\text{M}$) を単独またはイソプロテレノール ($1\ \mu\text{M}$) と 30 分間または 3 時間共処置した際の細胞内 cAMP レベル。縦軸は各処置時間におけるコントロールまたはイソプロテレノール単独処置での細胞内 cAMP レベルに対する相対値 (%) で示している。 ** $p < 0.01$ vs. control (Dunnett's test)、 $n = 3$ – 4 。 (F) フェニレフリン (PHE; $100\ \mu\text{M}$) またはデクスメデトミジン (DEX; $1\ \mu\text{M}$) と、forskolin ($0.5\ \mu\text{M}$) を共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 ** $p < 0.01$ vs. forskolin (Dunnett's test)、 $n = 5$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

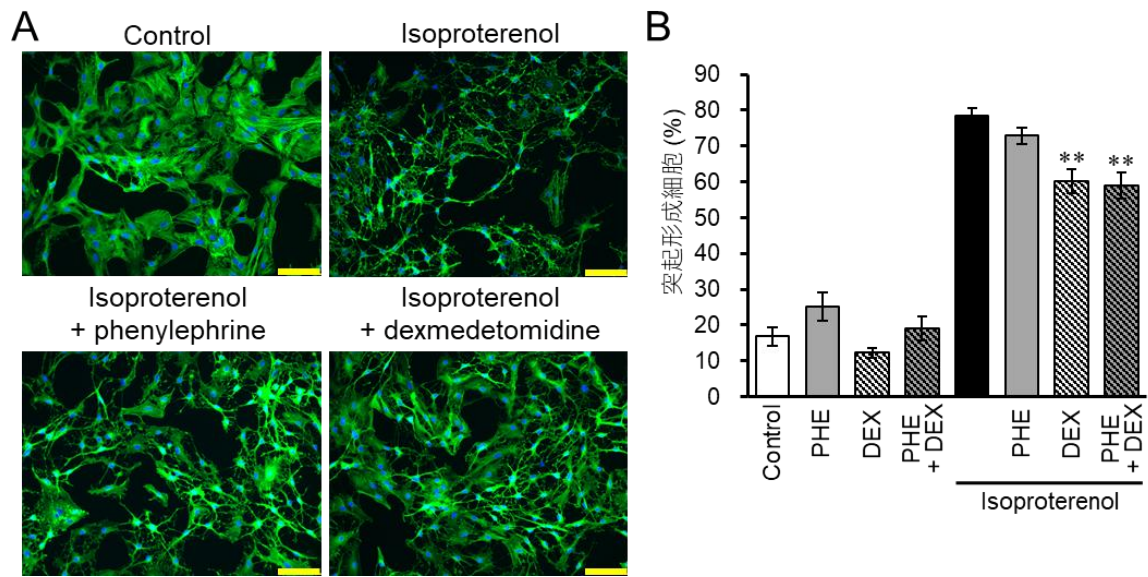


図 11. 大脳皮質アストロサイトにおける β 作動薬誘導突起形成に対する α 作動薬の効果
 (A) イソプロテレノール ($1 \mu\text{M}$) を 3 時間、単独処置あるいはフェニレフリン ($1 \mu\text{M}$) またはデクスメデトミジン ($1 \mu\text{M}$) と共処置したアストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = $100 \mu\text{m}$)。 (B) フェニレフリン (PHE; $1 \mu\text{M}$) とデクスメデトミジン (DEX; $1 \mu\text{M}$) を単独またはイソプロテレノール ($1 \mu\text{M}$) と共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 ** $p < 0.01$ vs. isoproterenol (Dunnett's test)、 $n = 5$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

1. 細胞膜透過性 cAMP 類似体による突起形成に対する α_2 作動薬の効果

細胞膜透過性 cAMP 類似体 dibutyryl cAMP はアデニル酸シクラーゼの活性化を介さずに、直接細胞内 cAMP を増加させる。そのため、 α_2 -AR 活性化によってアデニル酸シクラーゼ活性が抑制されても、dibutyryl cAMP による細胞内 cAMP 増加は抑制されない。そこで、dibutyryl cAMP による突起形成に対するデクスメデトミジンの効果を検討した。脊髄アストロサイトにおいて、dibutyryl cAMP (0.3 mM) による突起形成は、デクスメデトミジン (1 μ M) によって有意に抑制された (図 12A、B)。このデクスメデトミジンによる突起形成抑制は、 α_2 拮抗薬アチパメゾール (10 μ M) の存在下ではみられなかった (図 12B)。大脳皮質アストロサイトにおいても同様に、dibutyryl cAMP (0.1 mM) による突起形成は、デクスメデトミジン (1 μ M) によって有意に抑制され、この抑制はアチパメゾール (10 μ M) の存在下ではみられなかった (図 12C、D)。これらの結果から、 α_2 -AR 活性化は細胞内 cAMP 増加の抑制以外のメカニズムによっても突起形成を抑制していることが示唆された。

2. cAMP 非依存的な突起形成に対する α_2 作動薬の効果

α_2 -AR を介した細胞内 cAMP 非依存的な突起形成抑制機構についてさらに検討するために、cAMP 非依存的突起形成に対する α_2 作動薬の効果を検討した。cAMP 非依存的突起形成の誘導因子として、ラット大脳皮質アストロサイトを用いた先行研究で報告されているプリン化合物のアデノシンおよび Rho キナーゼ (ROCK) 阻害薬 Y27632 を用いた (Abe and Saito, 1998; Abe and Misawa, 2003)。脊髄アストロサイトにおいて、アデノシン (30 μ M) および Y27632 (10 μ M) の 3 時間の処置は、ノルアドレナリンや β 作動薬イソプロテレノールと同様に、GFAP 陽性の主突起と GFAP 難染色性かつ F-アクチン陽性の微細突起の形成を誘導した (図 13A)。これら薬物の細胞内 cAMP に対する効果を検討したところ、アデノシン (30 μ M) は処置 30 分後に有意な増加効果を示したが、その効果はイソプロテレノール (1 μ M) およびノルアドレナリン (1 μ M) による増加効果に比べて極めて小さかった (図 13B)。Y27632 (10 μ M) は細胞内 cAMP に影響しなかった。これらの結果から、アデノシンおよび Y27632 は細胞内 cAMP にほとんど影響せずに突起形成を誘導することが示された。

続いて、これらの薬物による突起形成に対する α_2 作動薬デクスメデトミジンの効果を検討した。デクスメデトミジン (1 μ M) はアデノシン (30 μ M) による突起形成を有意に抑制し、この抑制は α_2 拮抗薬アチパメゾール (10 μ M) の存在下ではみられなかった (図 13C、D)。同様に、デクスメデトミジン (1 μ M) は Y27632 (10 μ M) による突起形成も有意に抑制し、この抑制はアチパメゾール (10 μ M) によって消失した (図 13E、F)。

大脳皮質アストロサイトにおいても、アデノシン (30 μ M) および Y27632 (10 μ M) の 3 時間の処置は、GFAP 陽性の主突起と GFAP 難染色性かつ F-アクチン陽性の微細突起の形

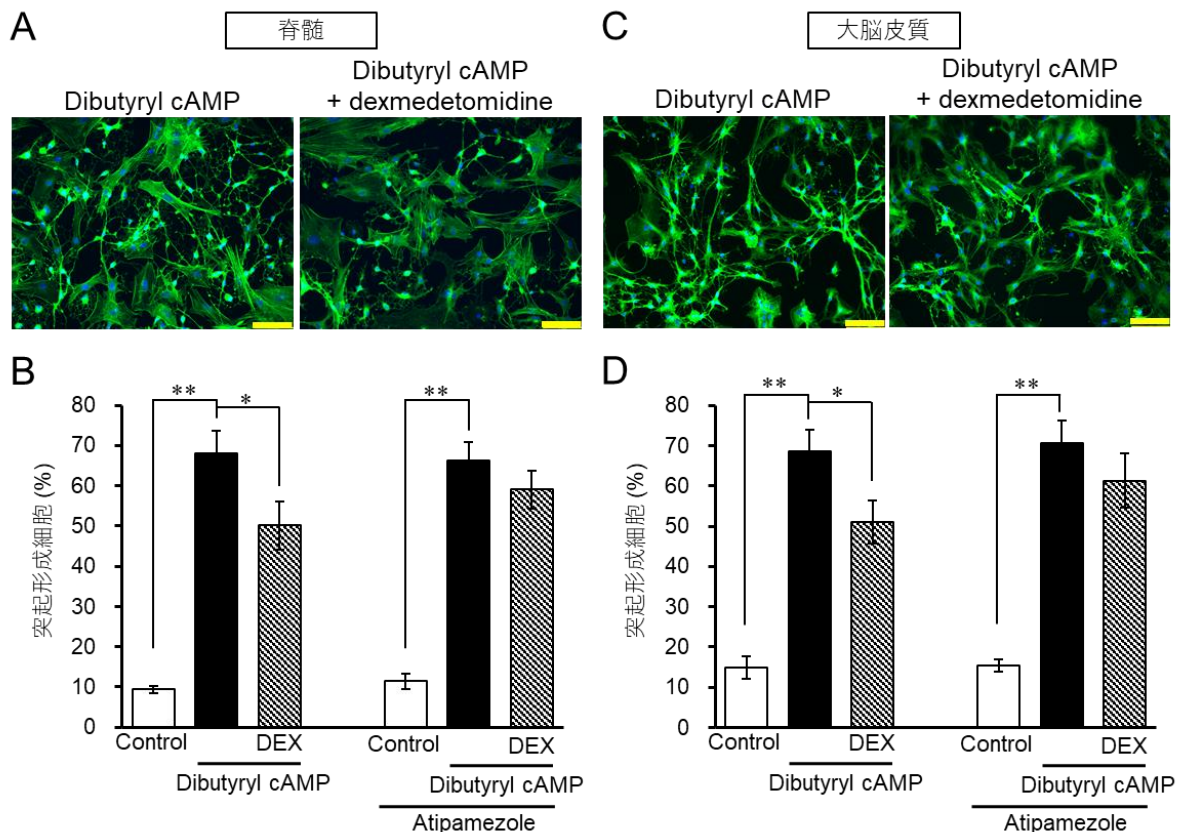


図 12. 脊髄および大脳皮質アストロサイトにおける細胞膜透過性 cAMP 誘導突起形成に対する α_2 作動薬の効果

(A、C) 脊髄および大脳皮質アストロサイトに dibutyryl cAMP をそれぞれ 0.3 (A) または 0.1 mM (C) で 3 時間、単独処置あるいはデクスメデトミジン ($1 \mu\text{M}$) と共処置した際の典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = $100 \mu\text{m}$)。 (B、D) アチパメゾール ($10 \mu\text{M}$) の存在下または非存在下で、脊髄および大脳皮質アストロサイトに dibutyryl cAMP をそれぞれ 0.3 (B) または 0.1 mM (D) で単独処置あるいはデクスメデトミジン (DEX; $1 \mu\text{M}$) と共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. dibutyryl cAMP (+ atipamezole) (Dunnett's test)、 $n = 5$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

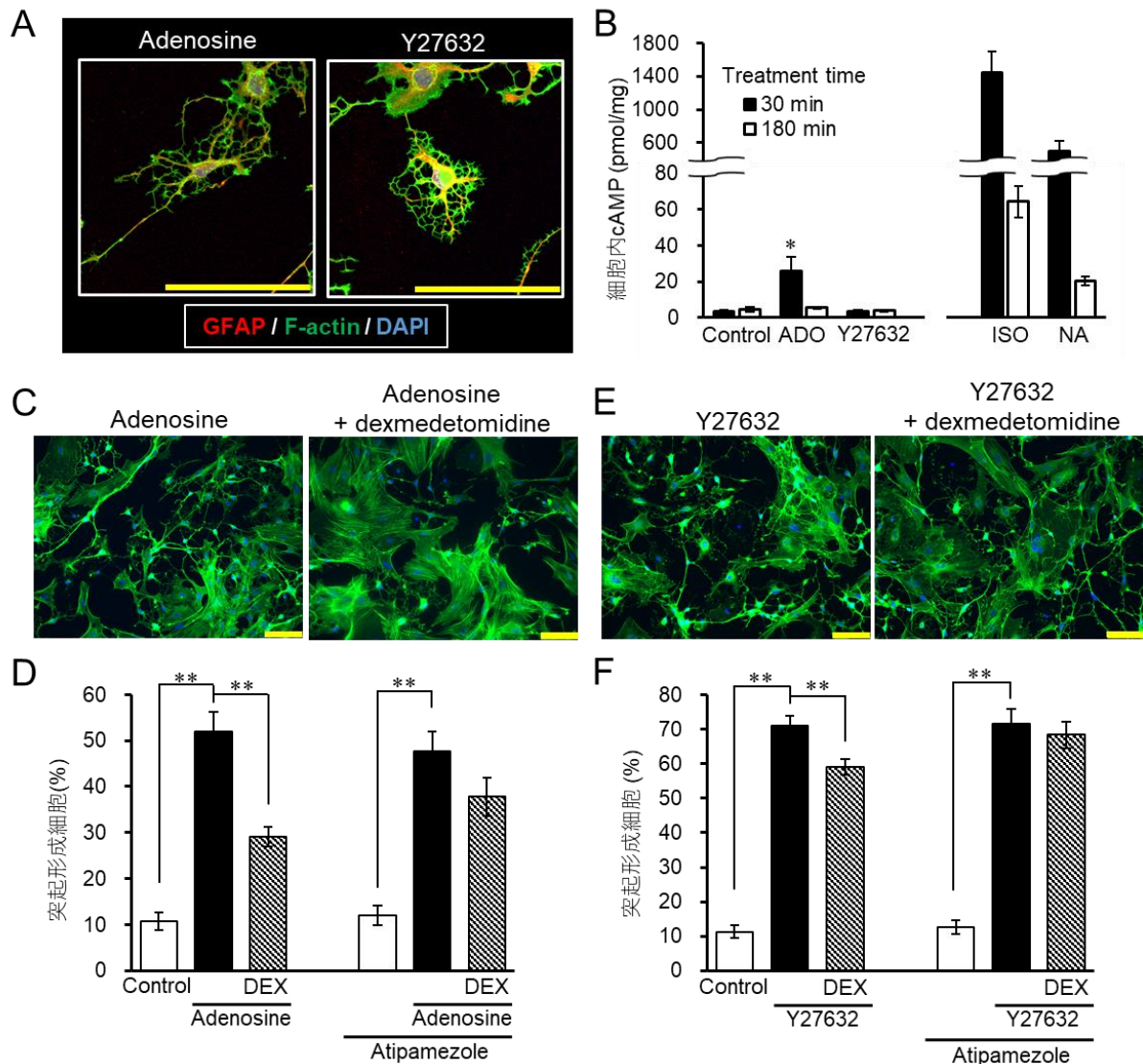


図 13. 脊髄アストロサイトにおけるアデノシンおよび ROCK 阻害薬誘導突起形成に対する α_2 作動薬の効果

(A) アデノシン (30 μ M) あるいは Y27632 (10 μ M) を 3 時間処置したアストロサイトの典型的な GFAP/アクチン共染色画像 (赤: GFAP、緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m)。 (B) アデノシン (ADO; 30 μ M)、Y27632 (10 μ M)、イソプロテレノール (ISO; 1 μ M) あるいはノルアドレナリン (NA; 1 μ M) を 30 分間または 3 時間処置した際の細胞内 cAMP レベル (pmol/mg)。 * $p < 0.05$ vs. control (Dunnett's test)、 $n = 3-4$ 。 (C、E) アデノシン (30 μ M) (C) あるいは Y27632 (10 μ M) (E) を 3 時間、単独処置あるいはデクスメデトミジン (1 μ M) と共処置したアストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m)。 (D、F) アチパメゾール (10 μ M) の存在下または非存在下で、アデノシン (30 μ M) (D) あるいは Y27632 (10 μ M) (F) を単独処置あるいはデクスメデトミジン (DEX; 1 μ M) と共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 ** $p < 0.01$ vs. adenosine (+ atipamezole) または Y27632 (+ atipamezole) (Dunnett's test)、 $n = 5$ 。 データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

成を誘導した (図 14A)。また、デクスメデトミジン ($1\ \mu\text{M}$) はアデノシン ($30\ \mu\text{M}$) および Y27632 ($10\ \mu\text{M}$) による突起形成に対して有意な抑制あるいは抑制傾向を示し、この抑制はアチパメゾールにより阻害された (図 14B–E)。

以上の結果から、 α_2 -AR は細胞内 cAMP 非依存的な機構によっても突起形成を抑制することが示唆された。

3. cAMP 非依存的な突起形成に対するノルアドレナリンの効果

脊髄アストロサイトにおいて、 α_2 作動薬だけではなく、内因性リガンドであるノルアドレナリンも cAMP 非依存的な突起形成を制御するのかを、ROCK 阻害薬 Y27632 を用いて検討した。Y27632 ($10\ \mu\text{M}$) による突起形成に対して、ノルアドレナリン ($1\ \mu\text{M}$) 単独では効果を示さなかった (図 15A、B)。一方、 β 拮抗薬プロプラノロール ($10\ \mu\text{M}$) 存在下では、ノルアドレナリン ($1\ \mu\text{M}$) は Y27632 ($10\ \mu\text{M}$) による突起形成を有意に抑制した。 β 拮抗薬プロプラノロール ($10\ \mu\text{M}$) は、単独では Y27632 による突起形成に影響しなかった ($72.1 \pm 1.3\%$ vs. Y27632 単独: $67.9 \pm 3.0\%$, $n = 3$)。プロプラノロール存在下でのノルアドレナリンによる Y27632 誘導突起形成の抑制は、 α_1 拮抗薬プラゾシン ($1\ \mu\text{M}$) または α_2 拮抗薬アチパメゾール ($10\ \mu\text{M}$) によって消失した。この結果から、ノルアドレナリンによる α_1 -および α_2 -AR の活性化は、cAMP 非依存的な突起形成も抑制することが示された。

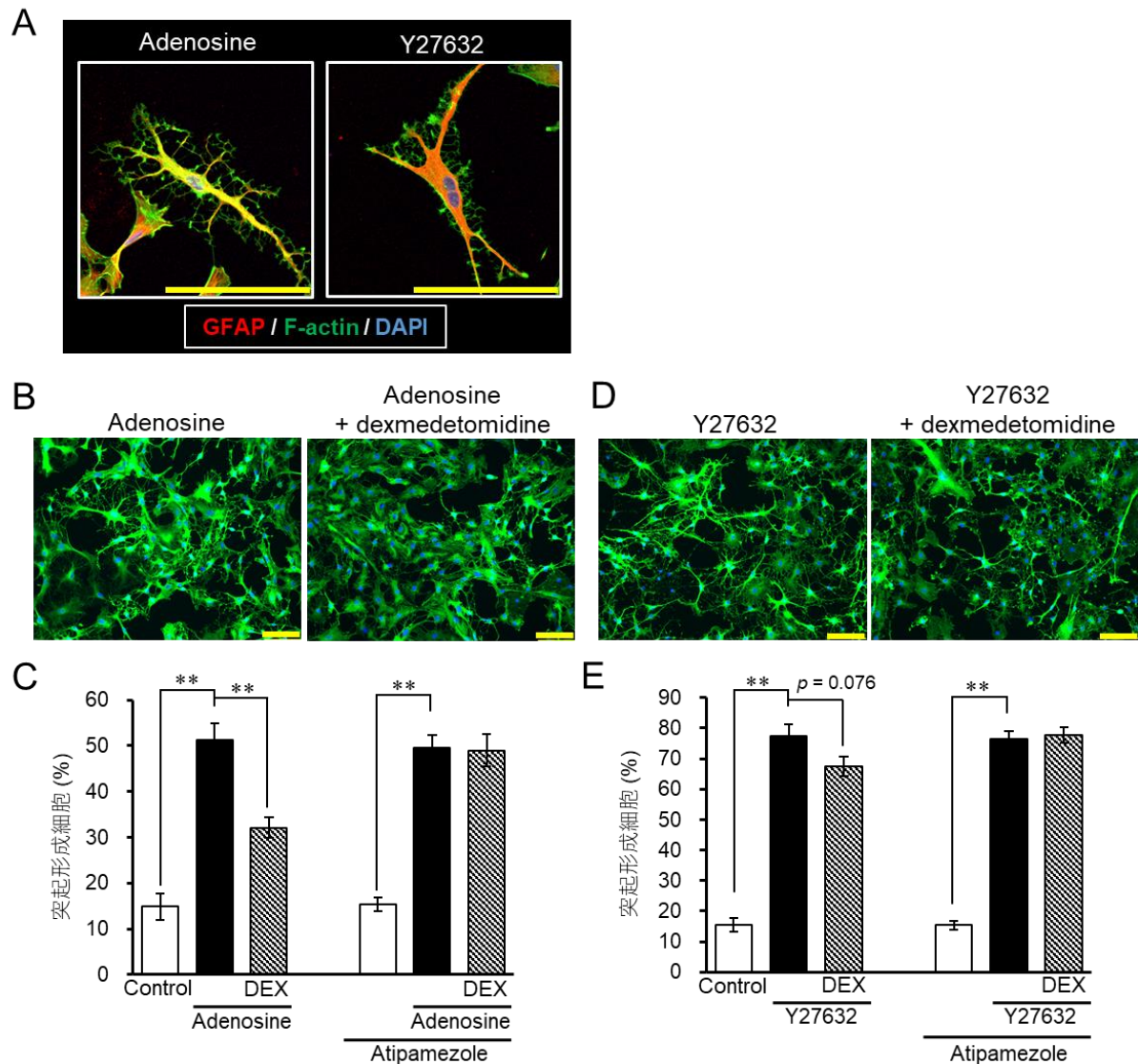


図 14. 大脳皮質アストロサイトにおけるアデノシンおよび ROCK 阻害薬誘導突起形成に対する α_2 作動薬の効果

(A) アデノシン (30 μM) あるいは Y27632 (10 μM) を 3 時間処置したアストロサイトの典型的な GFAP/アクチン共染色画像 (赤: GFAP、緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μm)。 (B、D) アデノシン (30 μM) (B) あるいは Y27632 (10 μM) (D) を 3 時間、単独処置あるいはデクスメドトミジン (1 μM) と共処置したアストロサイトの典型的なアクチン染色画像 (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μm)。 (C、E) アデノシン (30 μM) (C) あるいは Y27632 (10 μM) (E) を単独処置あるいはデクスメドトミジン (DEX; 1 μM) と共処置した際の突起形成細胞割合 (%)。 ** $p < 0.01$ vs. adenosine (+ atipamezole) または Y27632 (+ atipamezole) (Dunnett's test)、 $n = 5-6$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

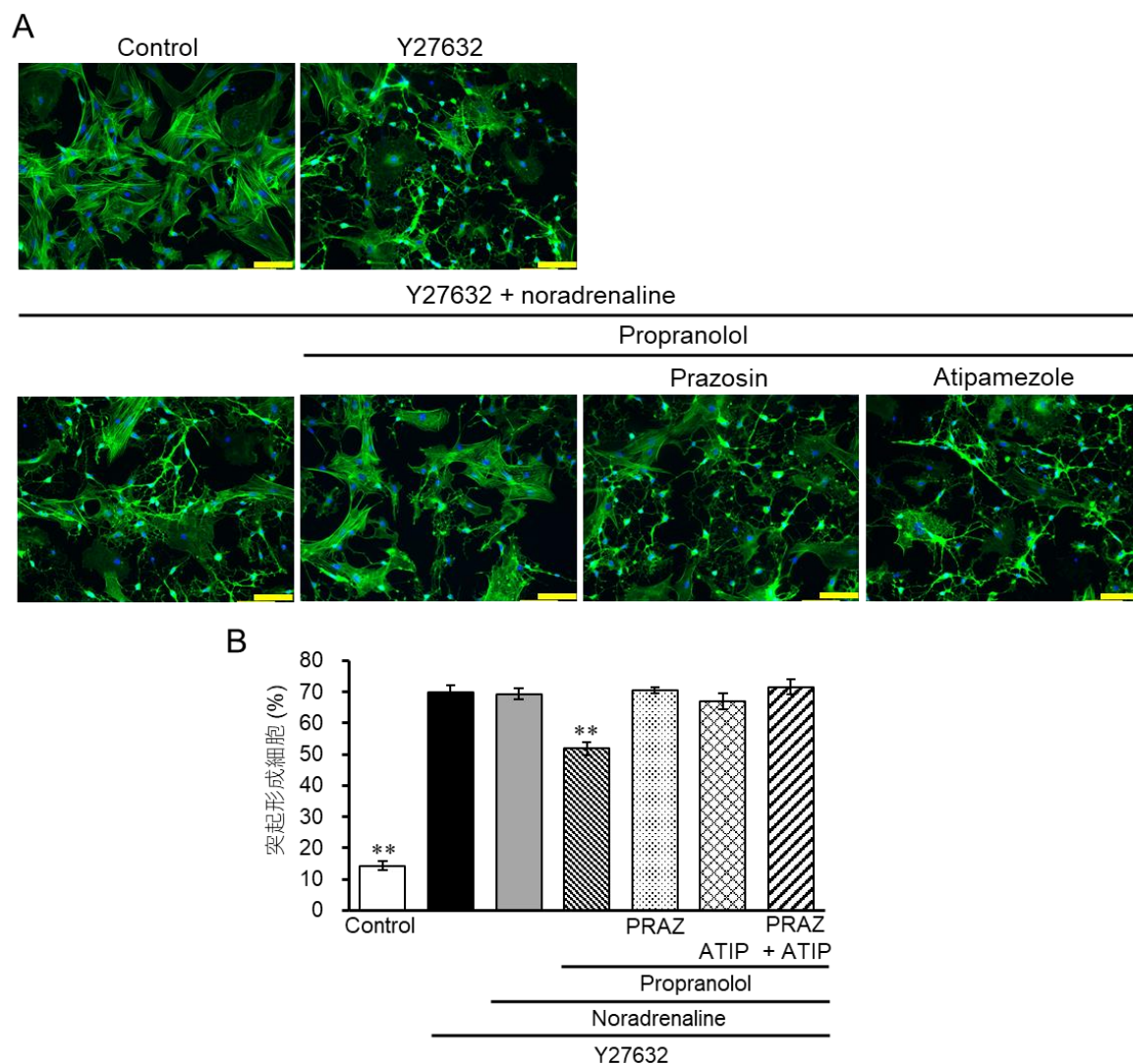


図 15. 脊髄アストロサイトにおける ROCK 阻害薬誘導突起形成に対するノルアドレナリンの効果

(A、B) アストロサイトにプロプラノロール (10 μ M)、プラゾシン (1 μ M) またはアチパメゾール (10 μ M) の存在下あるいは非存在下で、Y27632 (10 μ M) を 3 時間、単独処置あるいはノルアドレナリン (1 μ M) と共処置した際の典型的なアクチン染色画像 (A) (緑: F-actin、青: DAPI、Scale bar = 100 μ m) と突起形成細胞割合 (%) (B)。** $p < 0.01$ vs. Y27632 (Dunnett's test)、 $n = 5$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

IV. 考察

本研究では、培養アストロサイトにおいて、 β -AR の活性化が細胞内 cAMP の増加を介して突起形成を誘導する一方で、 α -AR の活性化は突起形成を抑制することが明らかとなった (図 16)。特に、 α_2 -AR は、細胞内 cAMP 増加の抑制および 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。また、このような β -および α -AR を介した突起形態制御は、脊髄と大脳皮質のアストロサイトで異なることも示された。これらの知見は、これまで β -AR の観点からのみ検討されてきたアストロサイトの突起形態に対するノルアドレナリンの効果に関して、新たな概念を提供する。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。

脊髄アストロサイトと大脳皮質アストロサイトの差

本研究で用いた脊髄および大脳皮質アストロサイトでは、以下のような違いがみられた；(1) GFAP 発現が大脳皮質アストロサイトの方が高い；(2) α_{2A} -および α_{2B} -AR のタンパク質発現が大脳皮質アストロサイトの方が高い；(3) 脊髄アストロサイトでは、明瞭なストレスファイバーを有するものが多く、薬物による微細突起の形成が顕著。生体内のアストロサイトの遺伝子・タンパク質発現、形態や機能は CNS 領域によって異なることが報告されている (Matyash and Kettenmann, 2010; Chai *et al.*, 2017; John Lin *et al.*, 2017; Batiuk *et al.*, 2020)。本研究でみられた違いも、このような部位差を反映しているかもしれない。一方で、マウスの脳および脊髄培養アストロサイトを比較した先行研究では、脊髄アストロサイトの方が GFAP を高発現していると報告されている (Yoon *et al.*, 2017)。アストロサイトにおける GFAP 発現は一定ではなく、成熟や病態刺激により変化することが知られている (Middeldorp and Hol, 2011)。また、*in vitro* では、培養液中の血清や初期培養密度などの培養条件も GFAP 発現に大きく影響を与える (Goldman and Chiu, 1984; Prah *et al.*, 2019)。本研究では脊髄および大脳皮質アストロサイトを同じ条件で培養したが、培養条件が GFAP 発現に与える影響に差がある可能性がある。また、このような培養条件による遺伝子・タンパク質発現への影響は GFAP だけに限らない。データでは示さなかったが、本研究の予備検討では、脊髄アストロサイトにおける α_{2A} -AR タンパク質発現は、初期培養密度の増加や培養液中の血清の除去により上昇し、fibroblast growth factor 2 等の成長因子の適用により低下した。本研究でみられた脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの差を、生体内のアストロサイトでも検証する必要がある。

さらに、アストロサイトの性状の差は、CNS の部位間だけではなく同じ部位内でも報告されている (Morel *et al.*, 2019)。*In vivo* 大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン作動性ニューロンを活性化した際の細胞内 cAMP や Ca^{2+} の上昇反応は、ごく近傍の細胞間でも異なることが報告されている (Oe *et al.*, 2020)。本研究でも、ノルアドレナリンや

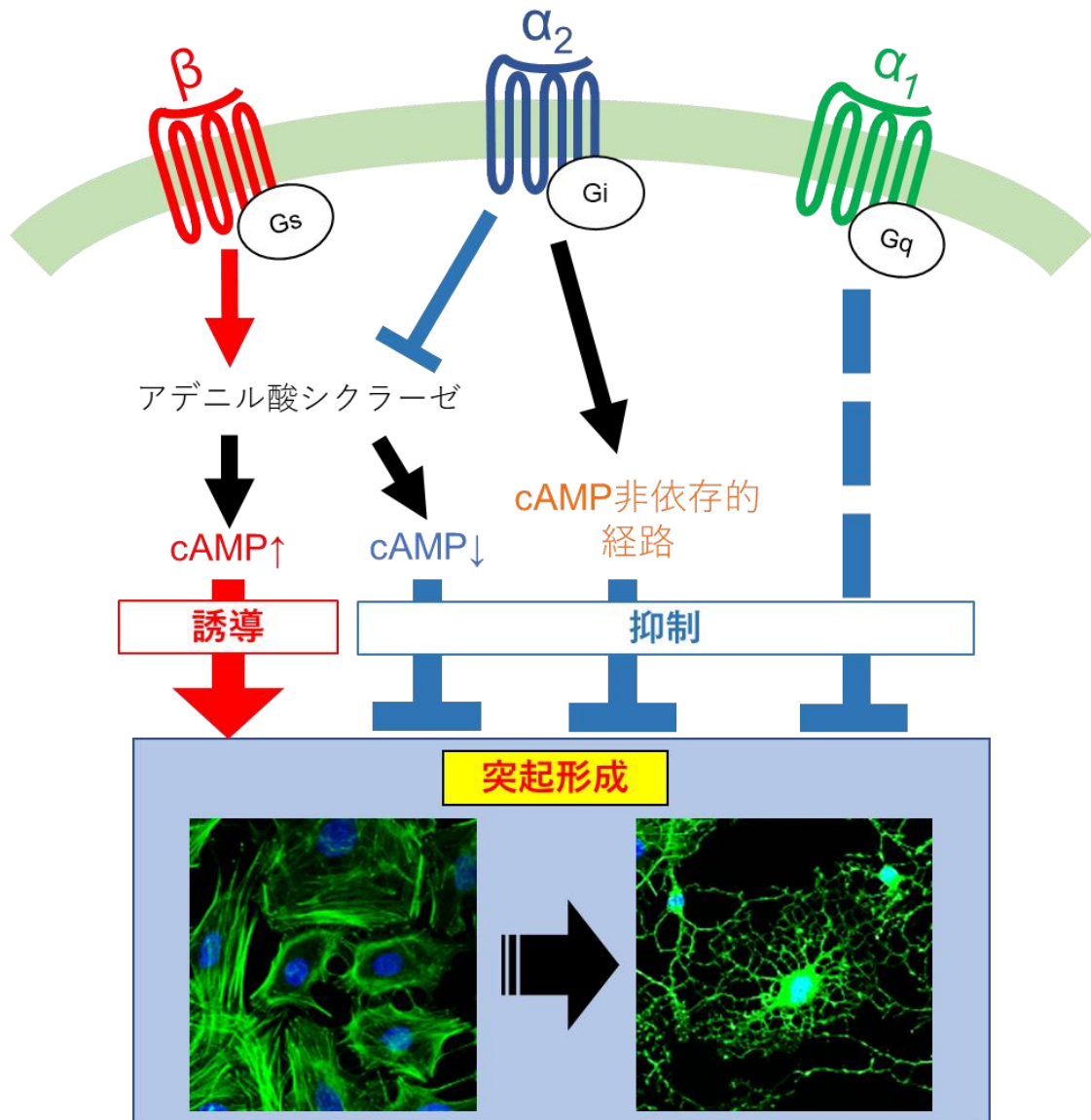


図 16. 培養アストロサイトにおけるアドレナリン受容体を介した突起形成制御

β -AR の活性化は、アデニル酸シクラーゼの活性化および細胞内 cAMP の増加を介して突起形成を誘導する。一方で、 α_2 -AR の活性化は、アデニル酸シクラーゼの抑制および細胞内 cAMP の減少、さらには cAMP 非依存的な経路を介して、突起形成を抑制する。 α_1 -AR も突起形成抑制に寄与する可能性がある。

β 作動薬等の薬物により突起形成が誘導される細胞とされない細胞が存在した。また、脊髄アストロサイトでは、細胞間で GFAP 発現にも差がみられた。薬物による突起形態の制御や、AR 等のタンパク質発現等について、単一細胞レベルでの解析により有用な知見が得られるかもしれない。

ノルアドレナリンおよび β 作動薬によるアストロサイトの突起形成

脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン ($1 \mu\text{M}$) による突起形成および細胞内 cAMP 増加は、 β 拮抗薬プロプラノロールにより完全に消失した。アデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin および細胞膜透過性 cAMP 類似体 dibutyryl cAMP が突起形成を誘導したこと、 β 作動薬イソプロテレノールも細胞内 cAMP を増加させ突起形成を誘導したことから、ノルアドレナリンは β -AR / cAMP シグナルを介して突起形成を誘導することが示唆され、これはこれまでの報告と一致する (Narumi *et al.*, 1978)。細胞内 cAMP による突起形成誘導機構は完全には明らかにされていないが、protein kinase A の活性化や Rho シグナルの抑制を介したミオシン軽鎖のリン酸化抑制によるアクチン脱重合の関与が報告されている (Rodnight and Gottfried, 2013)。また、ノルアドレナリン ($1 \mu\text{M}$) および β 作動薬イソプロテレノール ($1 \mu\text{M}$) による突起形成は、処置 3 時間後までにピークとなった。この経時変化は、ラット脳培養アストロサイトや *in situ* 成熟ラット大脳皮質アストロサイトを用いたこれまでの報告と一致する (Narumi *et al.*, 1978; Abe and Saito, 1998, 1999; Sherpa *et al.*, 2016)。このような β -AR 活性化によるアストロサイト突起形態の経時変化は、生体内で記憶の固定や形成時に起こるアストロサイトの形態変化と一致しており、その関与が示唆されている (Zorec *et al.*, 2015)。また、ノルアドレナリンおよびイソプロテレノールによる突起形成や細胞内 cAMP 増加はピーク後、薬物が存在し続けているのにもかかわらずコントロールのレベルにほぼ終息した。これには β -AR の脱感作が関与しているかもしれない (Frangakis and Kimelberg, 1985; Northam and Mobley, 1987)。

本研究で、ノルアドレナリンは $0.1 \mu\text{M}$ の濃度では、突起形成をほとんど誘導しなかった。麻酔下あるいは不動化した成熟ラットの大脳皮質や海馬において、微小透析法により測定された脳脊髄液中のノルアドレナリン濃度は、数 nM レベルであることが報告されている (Globus *et al.*, 1989; Engelhard *et al.*, 2002)。一方で、ウサギや齧歯類の末梢血管組織の神経筋接合部において放射性リガンド [^3H]ノルアドレナリンを用いた研究では、一定の刺激により放出されるノルアドレナリンの濃度は、シナプス空間の狭さに比例して 100 nM – $10 \mu\text{M}$ レベルで変動することが報告されている (Bevan and Su, 1974)。CNS におけるノルアドレナリンの濃度も、シナプスレベルの局所では、微小透析で測定される脳脊髄液中の濃度よりも高濃度であることが予想される。また、青斑核 (ノルアドレナリンニューロンの主要な神経核) の活動は、覚醒、注意、ストレス反応など種々の CNS 反応において増加し (Atzori *et al.*, 2016; Benarroch, 2018)、この時アストロサイト突起が形態変化しているこ

とも報告されている (Zhou *et al.*, 2019)。特定の CNS 反応において局所的に放出された高濃度のノルアドレナリンが、アストロサイトの β -AR を活性化し、その突起形態を制御しているかもしれない。

α_2 -AR を介したアストロサイトの突起形成抑制

脊髄アストロサイトにおいて、 α_2 拮抗薬アチパメゾールはノルアドレナリンによる突起形成および細胞内 cAMP 増加を増強した。また、 α_2 作動薬デクスメドミジンは β 作動薬イソプロテレノールによる細胞内 cAMP 増加を約 40%抑制する傾向を示し、イソプロテレノールや forskolin による突起形成を抑制した。これらの結果から、 α_2 -AR が β -AR 活性化によるアデニル酸シクラーゼ / cAMP シグナルを介した突起形成を抑制する役割を果たしていることが示された。さらに、 α_2 -AR の活性化は、dibutyryl cAMP 誘導突起形成や cAMP 非依存的な突起形成も抑制したことから、細胞内 cAMP 増加の抑制以外の機構も α_2 -AR による突起形成抑制に関与していると考えられる。これまで、当研究室を含め、培養アストロサイトにおける α_2 -AR の活性化が、ホスホリパーゼ C / イノシトール 3 リン酸 / 細胞内 Ca^{2+} 増加の経路を活性化すること (Enkvist *et al.*, 1996) や、Mitogen-activated Protein Kinase ファミリーの一種である Extracellular Signal-regulated Kinase および c-Jun N-terminal Kinase のリン酸化を促進すること (Peng *et al.*, 2003; Morimoto *et al.*, 2020) など cAMP 以外のシグナル経路に対する α_2 -AR の関与が報告されている。ラット培養下垂体後葉細胞 (アストロサイトの類似細胞) では、細胞内 Ca^{2+} 増加が細胞骨格制御に重要な働きをする Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の 1 種である Cdc42 を活性化し、突起形成を抑制することも報告されている (Rosso *et al.*, 2002a)。また、他の細胞種では、 α_2 -AR を含む G_i 共役型 GPCR の活性化が、別の Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の RhoA や Rac1 を活性化することも報告されている (Bétuing *et al.*, 1998; Vogt *et al.*, 2007)。今後、これらの cAMP 以外のシグナル経路を含め、 α_2 -AR による cAMP 非依存的な突起形成抑制を媒介する細胞内機構を検討する必要がある。

大脳皮質アストロサイトにおける α_2 作動薬と拮抗薬の効果の矛盾

大脳皮質アストロサイトでは、 α_2 作動薬デクスメドミジン (1 μM) は β 作動薬イソプロテレノール (1 μM) による突起形成を抑制した一方で、 α_2 拮抗薬アチパメゾール (10 μM) はノルアドレナリン (1 μM) による突起形成を増強しなかった。この矛盾は、ノルアドレナリンとデクスメドミジンによる α_2 -AR の活性化の違いによるかもしれない。ノルアドレナリンと比較して、デクスメドミジンはすべての α_2 -AR サブタイプに対して力価が高く、 α_{2B} -AR に対して高い固有活性を示す (Jasper *et al.*, 1998; Peltonen *et al.*, 1998)。1 μM という濃度は、デクスメドミジンが α_2 -AR を最大限に活性化するのに十分である一方で、

ノルアドレナリンでは不十分である。そのため、ノルアドレナリン (1 μM) は、デクスメデトミジン (1 μM) に比べて、 α_2 -AR を介した突起抑制効果が弱く、大脳皮質アストロサイトでは β -AR を介した突起形成を抑制できなかったのかもしれない。

アストロサイトの突起形成抑制における α_1 -AR の関与

脊髄アストロサイトにおいて、 α_1 拮抗薬プラゾシンはノルアドレナリンによる突起形成を増強した。一方で、 α_1 作動薬フェニレフリンは、 β 作動薬イソプロテレノールによる突起形成を抑制したが、この抑制は α_2 拮抗薬によっても阻害された。プラゾシンは、 α_1 -AR だけではなく、 α_{2B} -および α_{2C} -AR にも比較的高い親和性 (K_i 値で数百 nM レベル) を持つことが知られている (Devedjian *et al.*, 1994; Uhlen *et al.*, 1994)。そのため、プラゾシンはノルアドレナリン誘導突起形成に対する有意な増強効果を示した 1 μM 以上の濃度では、 α_{2B} -および α_{2C} -AR も阻害し、この阻害が増強効果を生み出した可能性も考えられる。しかし、プラゾシン (1 μM) は α_2 作動薬デクスメデトミジンによる突起形成抑制効果を阻害しなかった。また、プラゾシン (1 μM) 存在下で、 α_2 拮抗薬アチパメゾールはノルアドレナリン誘導突起形成をさらに増強した。これらの結果から、プラゾシンが α_2 -AR 阻害を介して、ノルアドレナリン誘導突起形成を増強した可能性は低いと考えられる。AR を含め GPCR では、作用する受容体が同じでも、リガンドによって活性化される細胞内シグナルが異なる biased agonism という現象がよく知られている。フェニレフリンは、ノルアドレナリンと比較して、 α_{1A} -AR を介した細胞内シグナルにバイアスがあることが報告されている (Evans *et al.*, 2011)。本研究でもフェニレフリンとノルアドレナリンが α_1 -AR を介して活性化する細胞内シグナルが異なり、フェニレフリンは突起形成抑制に必要な細胞内シグナルを十分に活性化しなかった可能性がある。今後、アストロサイトの突起形成抑制における α_1 -AR の関与およびそれを媒介する細胞内シグナルについて、さらに検討する必要がある。

ノルアドレナリンによるアストロサイトの突起形成制御における β -および α -AR 発現バランスの重要性

大脳皮質アストロサイトとは異なり、脊髄アストロサイトでは、 α_1 -、 α_2 -および β -AR のすべてに作用するノルアドレナリンの突起形成誘導効果が、 β 作動薬イソプロテレノールより顕著に小さかった。また、脊髄アストロサイトでのみ、 α_1 拮抗薬プラゾシンや α_2 拮抗薬アチパメゾールは、ノルアドレナリンによる突起形成を増強した。これらの結果は、大脳皮質アストロサイトに比べて、脊髄アストロサイトでは、ノルアドレナリンによる α -AR を介した突起形成抑制が強いことを示唆する。しかし、少なくとも α_{2A} -および α_{2B} -AR のタンパク質発現は、大脳皮質アストロサイトよりも脊髄アストロサイトで有意に低かった。イソプロテレノール (1 μM) による細胞内 cAMP の増加反応が、大脳皮質アストロサイトよりも

脊髄アストロサイトで有意に小さかったことから、 β -AR の機能的発現も脊髄アストロサイトで低いことが考えられる。脊髄アストロサイトでは、 α_2 -AR の発現は低いものの、ノルアドレナリンによる β -AR 活性化を介した突起形成誘導が弱いため、 α -AR を介した抑制が顕著にみられた可能性がある。逆に、大脳皮質アストロサイトでは、 β -AR 活性化を介した突起形成誘導が強く、 α -AR 活性化では抑制されなかったのかもしれない。これらの結果は、ノルアドレナリンによるアストロサイトの突起形成が、 β -および α -AR それぞれの機能的発現だけではなく、その発現バランスによって制御されることを示している。本研究と同様の方法でラットの大脳皮質、中脳蓋前丘、海馬、中脳腹側、尾状核、視床下部から培養されたアストロサイトでは、 β -および α_2 -AR の細胞膜上の発現に差があることが報告されている (Ernsberger *et al.*, 1990)。本研究結果と合わせて、アストロサイトにおける AR 発現およびノルアドレナリンによるアストロサイト突起形態制御は、CNS の部位により異なり、これが CNS におけるアストロサイト形態の多様性に寄与している可能性がある。また、CNS 病態下のアストロサイトでは、 β -AR の発現上昇や (Shao and Sutin, 1992; Mantyh *et al.*, 1995)、 α_2 -AR の発現低下が報告されており (Hamby *et al.*, 2012)、また、前述のように本研究でも脊髄アストロサイトにおける α_{2A} -AR 発現が成長因子で低下した。このような受容体発現の変化が病態下でのアストロサイトの突起形態変化やそれに伴う CNS 機能変化に関与しているかもしれない。

また、作用するノルアドレナリンの濃度もアストロサイトの突起形態制御には重要である。一般的に、 α -AR は β -AR よりもノルアドレナリンに対する親和性が高い。ノルアドレナリンの CNS 効果は濃度に依存し、 α_2 -、 α_1 -、 β -AR の順に発現する (Atzori *et al.*, 2016)。そのため、低濃度のノルアドレナリンでは α_2 -AR を介したアストロサイトの突起形態制御のみが働く可能性もある。

α_2 -AR が生体内のアストロサイトの突起形態を制御する可能性

生体内のアストロサイトは、本研究で用いた培養アストロサイトとは異なり、GFAP 陽性の主突起とそこから分岐する微細突起を有している。本研究において、ノルアドレナリンや β 作動薬イソプロテレノールは生体内のアストロサイトが持つ突起形態に類似した突起の形成を培養アストロサイトで誘導した。またこれまで、イソプロテレノールが大脳皮質スライス標本中のアストロサイトの微細突起を伸張させることが報告されており (Sherpa *et al.*, 2016)、 β -AR を介した突起形態制御は生体内のアストロサイトでも起こることが示されてきた。本研究の結果から、 α_2 -AR はこの β -AR の機能に拮抗することで、生体内のアストロサイトの突起形態を制御する可能性がある。これまで免疫電子顕微鏡法を用いた研究により、ネコ、ラット、サルの大脳皮質や海馬、青斑核に存在するアストロサイトの突起に β -および α_2 -AR (特に α_{2A} -AR) が発現することが報告されている (Aoki, 1992; Aoki *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Milner *et al.*, 1998)。また、HEK293 細胞に共発現させた β_1 -および

α_2 -AR は、ヘテロ 2 量体を形成するという報告もある (Xu *et al.*, 2003)。アストロサイトが持つ個々の突起の形態を、 β -および α_2 -AR が密接に関係しながら制御する可能性が示唆される。

また本研究において、 α_2 作動薬デクスメデトミジンおよびノルアドレナリンによる α -AR の活性化は、ROCK 阻害薬 Y27632 による突起形成も抑制した。RhoA/ROCK シグナル経路は、*in vitro* や *in vivo* のアストロサイトの突起形態制御に重要な役割を果たす (Zeug *et al.*, 2018)。本研究で用いたアデノシンも、ラット培養下垂体後葉細胞において、RhoA を抑制することで突起形成を誘導することが報告されている (Rosso *et al.*, 2002b)。そのため、 α -AR (特に α_2 -AR) は、 β -AR の機能に関係なく、生体内においてアストロサイトの突起形態制御に幅広く関与する可能性がある。

さらに、 α_2 -AR は病態下でのアストロサイトの突起形態制御にも関与するかもしれない。これまで、*in vivo* において病態下でのアストロサイト突起の肥大化に β -AR が密接に関与することが報告されている (Sutin and Griffith, 1993; Hodges-Savola *et al.*, 1996)。また、ヒト培養アストロサイトにおいて、炎症性サイトカイン interleukin-18 が、RhoA/ROCK シグナルの抑制によって活性化アストロサイト様の形態変化を誘導することも報告されている (John *et al.*, 2004)。アストロサイトに発現する α_2 -AR は、このような β -AR や RhoA/ROCK シグナル抑制を介した病態下でのアストロサイトの形態変化を制御する可能性がある。これまで、病態下でのラット脊髄アストロサイトの肥大化が、デクスメデトミジンにより抑制されること (Xu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012)、逆に、ノルアドレナリン作動性ニューロンの破壊や α_2 拮抗薬アチパメゾールにより誘導されること (Arora *et al.*, 2016) が報告されている。今後、生体内のアストロサイトを用いた研究により、 β -および α -AR を介したアストロサイトの突起形態制御およびその生理的・病態的な意義を検討する必要がある。

V. 結論

アストロサイトは複雑な突起を持つ細胞であり、その突起構造は CNS 機能と密接に関連している。本研究では、CNS の主要な神経伝達物質であるノルアドレナリンがアストロサイトの突起形態に与える影響を解明するために、ラット脊髄および大脳皮質培養アストロサイトの突起形成における α_1 -、 α_2 -および β -AR の役割を薬理学的手法により検討した。

1. 脊髄アストロサイトは大脳皮質アストロサイトに比べて、アストロサイトマーカー GFAP の発現量が低かった。また、いずれの培養アストロサイトもほとんどの細胞が突起を持たない多角形の形態をしていたが、脊髄アストロサイトでは大脳皮質アストロサイトに比べて、明瞭なストレスファイバーを有する細胞が多くみられた。脊髄および大脳皮質アストロサイト間で、増殖能には差がみられなかった。
2. 脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン ($1\ \mu\text{M}$) および β 作動薬イソプロテレノール ($1\ \mu\text{M}$) の 3 時間の処置は、細胞体の縮小と、GFAP 陽性の主突起および F-アクチンのみ陽性の微細突起の形成を誘導した。微細突起の形成は、脊髄アストロサイトで顕著にみられた。
3. 脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン ($1\ \mu\text{M}$) およびイソプロテレノール ($1\ \mu\text{M}$) 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の突起形成に対する効果は、いずれも $1\ \mu\text{M}$ で最大であった。これらの薬物の突起形成に対する効果は、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大きく、その差は脊髄アストロサイトで有意に大きかった。
4. 脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン ($1\ \mu\text{M}$) およびイソプロテレノール ($1\ \mu\text{M}$) は細胞内 cAMP を増加させた。この増加反応も、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かった。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大きかった。
5. 脊髄および大脳皮質アストロサイトにおいて、アデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin ($0.1\text{--}10\ \mu\text{M}$) と細胞膜透過性 cAMP 類似体 dibutyryl cAMP ($0.01\text{--}1\ \text{mM}$) 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。

6. 脊髄アストロサイトは脳皮質アストロサイトに比べて、 α_{1A} -、 α_{1D} -、 α_{2B} - および β_3 -AR の mRNA 発現が高く、 α_{2C} -および β_1 -AR の mRNA 発現は低かった。いずれのアストロサイトも α_1 -、 α_2 -および β -AR がタンパク質レベルでも発現していた。mRNA 発現とは異なり、脊髄アストロサイトは脳皮質アストロサイトに比べて、 α_{2A} -および α_{2B} -AR のタンパク質発現が低かった。
7. 脊髄アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (1 μ M) 誘導突起形成は、 β 拮抗薬プロプラノロール (10 μ M) により消失し、 α_1 拮抗薬プラゾシン ($\geq$ 1 μ M) および α_2 拮抗薬アチパメゾール (10 μ M) 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。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。
8. 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 μ M) および α_2 作動薬デクスメデトミジン (1 μ M) はコントロールの突起形成に影響しなかった。デクスメデトミジンはイソプロテレノール (1 μ M) または forskolin (0.5 μ M) による突起形成を抑制した。また、デクスメデトミジンは、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。脳皮質アストロサイトにおいても、デクスメデトミジンはイソプロテレノール誘導突起形成を抑制した。
9. 脊髄および脳皮質アストロサイトにおいて、デクスメデトミジン (1 μ M) 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 μ M) により阻害された。
10. 脊髄アストロサイトにおいて、アデノシン (30 μ M) および ROCK 阻害薬 Y27632 (10 μ M) 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。脊髄および脳皮質アストロサイトにおいて、デクスメデトミジン (1 μ M) 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 μ M) により阻害された。
11. 脊髄アストロサイトにおいて、ノルアドレナリン (1 μ M) は単独では Y27632 (10 μ M) 誘導突起形成に影響しなかったが、プロプラノロール (10 μ M) 存在下では、抑制した。この抑制は、プラゾシン (1 μ M) またはアチパメゾール (10 μ M) により阻害された。

以上の結果から、ラット脊髄および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。この AR を介したアストロサイトの突起形態制御が、CNS の生理機能や病態形成に深く関与する可能性がある。今後、本研究で得られた知見を *in vivo* あるいは *in situ* のアストロサイトを用いて検証するとともに、その生理的・病態的な意義を検討する必要がある。

謝辞

稿の終わりに臨み、本研究の推進にあたり始終御指導と御高配を賜り、本論文を御校閲頂きました北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学分野薬理学教室、乙黒兼一教授に心から厚く御礼申し上げます。

本論文を御校閲いただきました主査の北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学分野解剖学教室、昆泰寛教授、副査の同生化学教室、岡松優子准教授、北海道大学遺伝子病制御研究所、長谷部理絵助教に深く感謝申し上げます。

また、本研究の推進と論文の作成に当たり、始終御指導と御協力を頂きました同薬理学教室、江口遼太助教をはじめ薬理学教室の皆様に心から感謝致します。

最後に、本研究のために尊い命を提供してくれた数多の実験動物の御霊に心より感謝の念を捧げ、安らかな眠りにつくことを願って慰霊の言葉とさせていただきます。

引用文献

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**: 41–53.
- Abe K, Misawa M (2003). Astrocyte stellation induced by Rho kinase inhibitors in culture. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **143**: 99–104.
- Abe K, Saito H (1998). Adenosine stimulates stellation of cultured rat cortical astrocytes. *Brain Res.* **804**: 63–71.
- Abe K, Saito H (1999). Effect of ATP on astrocyte stellation is switched from suppressive to stimulatory during development. *Brain Res.* **850**: 150–157.
- Allen NJ, Eroglu C (2017). Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron* **96**: 697–708.
- Aoki C (1992). β -Adrenergic receptors: astrocytic localization in the adult visual cortex and their relation to catecholamine axon terminals as revealed by electron microscopic immunocytochemistry. *J. Neurosci.* **12**: 781–792.
- Aoki C, Venkatesan C, Go CG, Forman R, Kurose H (1998). Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cereb. Cortex* **8**: 269–277.
- Arora V, Morado-Urbina CE, Aschenbrenner CA, Hayashida K, Wang F, Martin TJ, Eisenach JC, Peters CM (2016). Disrupting spinal noradrenergic activation delays recovery of acute incision induced hypersensitivity and increases spinal glial activation in the rat. *J. Pain* **17**: 190–202.
- Atzori M, Cuevas-Olguin R, Esquivel-Rendon E, Garcia-Oscos F, Salgado-Delgado RC, Saderi N, Miranda-Morales M, Treviño M, Pineda JC, Salgado H (2016). Locus ceruleus norepinephrine release: a central regulator of CNS spatio-temporal activation? *Front. Synaptic Neurosci.* **8**: 1–26.

Bar El Y, Kanner S, Barzilai A, Hanein Y (2018). Activity changes in neuron-astrocyte networks in culture under the effect of norepinephrine. *PLOS ONE* **13**: e0203761.

Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, de Vin F, Marneffe C, Kusserow C, Koeppen J, Viana JF, Oliveira JF, Voet T, Ponting CP, Belgard TG, Holt MG (2020). Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat. Commun.* **11**: 1–15.

Benarroch EE (2018). Locus coeruleus. *Cell Tissue Res.* **373**: 221–232.

Bernardinelli Y, Muller D, Nikonenko I (2014a). Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural Plast.* **2014**: 1–13.

Bernardinelli Y, Randall J, Janett E, Nikonenko I, König S, Jones EV, Flores CE, Murai KK, Bochet CG, Holtmaat A, Muller D (2014b). Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Curr. Biol.* **24**: 1679–1688.

Bétuing S, Daviaud D, Pagès C, Bonnard E, Valet P, Lafontan M, Saulnier-Blache JS (1998). $G_{\beta\gamma}$ -independent coupling of α_2 -adrenergic receptor to $p21^{\text{rhoA}}$ in preadipocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 15804–15810.

Bevan J, Su C (1974). Variation of intra- and perisynaptic adrenergic transmitter concentrations with width of synaptic cleft in vascular tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **190**: 30–38.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* **22**: 183–192.

Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Octeau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP, Coppola G, Khakh BS (2017). Neural circuit-specialized astrocytes: transcriptomic, proteomic, morphological and functional evidence. *Neuron* **95**: 531–549.

Devedjian JC, Esclapez F, Denis-Pouxviel C, Paris H (1994). Further characterization of human α_2 -adrenoceptor subtypes: [^3H]RX821002 binding and definition of additional selective drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **252**: 43–49.

Engelhard K, Werner C, Kaspar S, Möllenberg O, Blobner M, Bachl M, Kochs E (2002). Effect of the α_2 -agonist dexmedetomidine on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology* **96**: 450–457.

Enkvist MO, Hämäläinen H, Jansson CC, Kukkonen JP, Hautala R, Courtney MJ, Akerman KE (1996). Coupling of astroglial α_2 -adrenoreceptors to second messenger pathways. *J. Neurochem.* **66**: 2394–2401.

Ernsberger P, Iacovitti L, Reis DJ (1990). Astrocytes cultured from specific brain regions differ in their expression of adrenergic binding sites. *Brain Res.* **517**: 202–208.

Evans BA, Broxton N, Merlin J, Sato M, Hutchinson DS, Christopoulos A, Summers RJ (2011). Quantification of functional selectivity at the human α_{1A} -adrenoceptor. *Mol. Pharmacol.* **79**: 298–307.

Frangakis MV, Kimelberg HK (1985). Desensitization of β -receptors on primary astrocyte cultures by norepinephrine but not by tricyclic antidepressants. *Brain Res.* **339**: 49–56.

Fuxe K, Agnati LF, Marcoli M, Borroto-Escuela DO (2015). Volume transmission in central dopamine and noradrenaline neurons and its astroglial targets. *Neurochem. Res.* **40**: 2600–2614.

Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD (1989). Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **9**: 892–896.

Goldman JE, Chiu FC (1984). Growth kinetics, cell shape, and the cytoskeleton of primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* **42**: 175–184.

Griffith R, Sutin J (1996). Reactive astrocyte formation *in vivo* is regulated by noradrenergic axons. *J. Comp. Neurol.* **371**: 362–375.

Hamby ME, Coppola G, Ao Y, Geschwind DH, Khakh BS, Sofroniew MV (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* **32**: 14489–14510.

Hertz L, Lovatt D, Goldman SA, Nedergaard M (2010). Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and $[Ca^{2+}]_i$. *Neurochem. Int.* **57**: 411–420.

Hodges-Savola C, Rogers SD, Ghilardi JR, Timm DR, Mantyh PW (1996). β -Adrenergic receptors regulate astrogliosis and cell proliferation in the central nervous system *in vivo*. *Glia* **17**: 52–62.

Horvat A, Zorec R, Vardjan N (2016). Adrenergic stimulation of single rat astrocytes results in distinct temporal changes in intracellular Ca^{2+} and cAMP-dependent PKA responses. *Cell Calcium* **59**: 156–163.

Jasper JR, Lesnick JD, Chang LK, Yamanishi SS, Chang TK, Hsu SA, Daunt DA, Bonhaus DW, Eglen RM (1998). Ligand efficacy and potency at recombinant α_2 adrenergic receptors agonist-mediated $[^{35}S]$ GTP γ S binding. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 1035–1043.

John GR, Chen L, Rivieccio MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF (2004). Interleukin-1 β induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase–ROCK axis. *J. Neurosci.* **24**: 2837–2845.

John Lin CC, Yu K, Hatcher A, Huang TW, Lee HK, Carlson J, Weston MC, Chen F, Zhang Y, Zhu W, Mohila CA, Ahmed N, Patel AJ, Arenkiel BR, Noebels JL, Creighton CJ, Deneen B (2017). Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat. Neurosci.* **20**: 396–405.

Koppel I, Jaanson K, Klasche A, Tuvikene J, Tiirik T, Pärn A, Timmusk T (2018). Dopamine cross-reacts with adrenoceptors in cortical astrocytes to induce BDNF expression, CREB signaling and morphological transformation. *Glia* **66**: 206–216.

Lee A, Rosin DL, Van Bockstaele EJ (1998). α_{2A} -Adrenergic receptors in the rat nucleus locus coeruleus: subcellular localization in catecholaminergic dendrites, astrocytes, and presynaptic axon terminals. *Brain Res.* **795**: 157–169.

- Liu L, Ji F, Liang J, He H, Fu Y, Cao M (2012). Inhibition by dexmedetomidine of the activation of spinal dorsal horn glia and the intracellular ERK signaling pathway induced by nerve injury. *Brain Res.* **1427**: 1–9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- Mantyh PW, Rogers SD, Allen CJ, Catton MD, Ghilardi JR, Levin LA, Maggio JE, Vigna SR (1995). β_2 -Adrenergic receptors are expressed by glia *in vivo* in the normal and injured central nervous system in the rat, rabbit, and human. *J. Neurosci.* **15**: 152–164.
- Matyash V, Kettenmann H (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* **63**: 2–10.
- Middeldorp J, Hol EM (2011). GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* **93**: 421–443.
- Milner TA, Lee A, Aicher SA, Rosin DL (1998). Hippocampal α_2A -adrenergic receptors are located predominantly presynaptically but are also found postsynaptically and in selective astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **395**: 310–327.
- Morel L, Men Y, Chiang MSR, Tian Y, Jin S, Yelick J, Higashimori H, Yang Y (2019). Intracortical astrocyte subpopulations defined by astrocyte reporter mice in the adult brain. *Glia* **67**: 171–181.
- Morimoto K, Kitano T, Eguchi R, Otsuguro K (2020). Bidirectional modulation of TNF- α transcription via α - and β -adrenoceptors in cultured astrocytes from rat spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **528**: 78–84.
- Narumi S, Kimelberg H, Bourke R (1978). Effects of norepinephrine on the morphology and some enzyme activities of primary monolayer cultures from rat brain. *J. Neurochem.* **31**: 1479–1490.

- Northam WJ, Mobley PL (1987). Clonidine inhibits the isoproterenol-induced desensitization of the beta noradrenergic activated adenylate cyclase system in astrocytes. *Psychopharmacology (Berl)*. **93**: 324–328.
- Oe Y, Wang X, Patriarchi T, Konno A, Ozawa K, Yahagi K, Hirai H, Tian L, McHugh TJ, Hirase H (2020). Distinct temporal integration of noradrenaline signaling by astrocytic second messengers during vigilance. *Nat. Commun.* **11**: 1–15.
- Pekny M, Pekna M (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.* **94**: 1077–1098.
- Peltonen JM, Pihlavisto M, Scheinin M (1998). Subtype-specific stimulation of [³⁵S]GTPγS binding by recombinant α₂-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **355**: 275–279.
- Peng L, Yu AC, Fung KY, Prévot V, Hertz L (2003). α-Adrenergic stimulation of ERK phosphorylation in astrocytes is α₂-specific and may be mediated by transactivation. *Brain Res.* **978**: 65–71.
- Peterson AC, Li CR (2018). Noradrenergic dysfunction in Alzheimer’s and Parkinson’s diseases—an overview of imaging studies. *Front. Aging Neurosci.* **10**: 1–16.
- Prah J, Winters A, Chaudhari K, Hersh J, Liu R, Yang SH (2019). A novel serum free primary astrocyte culture method that mimic quiescent astrocyte phenotype. *J. Neurosci. Methods* **320**: 50–63.
- Rodnight RB, Gottfried C (2013). Morphological plasticity of rodent astroglia. *J. Neurochem.* **124**: 263–275.
- Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer’s disease. *Neuroscience* **323**: 170–182.
- Rosso L, Peteri-Brunbäck B, Vouret-Craviari V, Deroanne C, Van Obberghen-Schilling E, Mienville JM (2002a). Vasopressin and oxytocin reverse adenosine-induced pituicyte stellation via calcium-dependent activation of Cdc42. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 2324–2332.

Rosso L, Peteri-Brunbäck B, Vouret-Craviari V, Deroanne C, Troadec J, Thirion S, Van Obberghen-Schilling E, Mienville J (2002b). RhoA inhibition is a key step in pituicyte stellation induced by A₁-type adenosine receptor activation. *Glia* **38**: 351–362.

Ruck A, Kendall DA, Hill SJ (1991). α - and β -Adrenoceptor regulation of cyclic AMP accumulation in cultured rat astrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 59–69.

Salm AK, McCarthy KD (1992). The evidence for astrocytes as a target for central noradrenergic activity: expression of adrenergic receptors. *Brain Res. Bull.* **29**: 265–275.

Shain W, Forman DS, Madelian V, Turner JN (1987). Morphology of astroglial cells is controlled by beta-adrenergic receptors. *J. Cell Biol.* **105**: 2307–2314.

Shao Y, Sutin J (1992). Expression of adrenergic receptors in individual astrocytes and motor neurons isolated from the adult rat brain. *Glia* **6**: 108–117.

Sherpa AD, Xiao F, Joseph N, Aoki C, Hrabetova S (2016). Activation of β -adrenergic receptors in rat visual cortex expands astrocytic processes and reduces extracellular space volume. *Synapse* **70**: 307–316.

Stogsdill JA, Ramirez J, Liu D, Kim YH, Baldwin KT, Enustun E, Ejikeme T, Ji RR, Eroglu C (2017). Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature* **551**: 192–197.

Sutin J, Griffith R (1993). β -Adrenergic receptor blockade suppresses glial scar formation. *Exp. Neurol.* **120**: 214–222.

Theodosius DT, Poulain DA, Olier SH (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* **88**: 983–1008.

Tynan RJ, Beynon SB, Hinwood M, Johnson SJ, Nilsson M, Woods JJ, Walker FR (2013). Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol.* **126**: 75–91.

Uhlen S, Porter AC, Neubig RR (1994). The novel *alpha*-2 adrenergic radioligand [³H]-MK912 is *alpha*-2C selective among human *alpha*-2A, *alpha*-2B and *alpha*-2C adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 1558–1565.

Vardjan N, Kreft M, Zorec R (2014). Dynamics of β -adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes. *Glia* **62**: 566–579.

Vogt A, Lutz S, Rümenapp U, Han L, Jakobs KH, Schmidt M, Wieland T (2007). Regulator of G-protein signalling 3 redirects prototypical G_i-coupled receptors from Rac1 to RhoA activation. *Cell. Signal.* **19**: 1229–1237.

Xu B, Zhang W, Yang JL, Lù N, Deng XM, Xu H, Zhang YQ (2010). Evidence for suppression of spinal glial activation by dexmedetomidine in a rat model of monoarthritis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **37**: e158–e166.

Xu J, He J, Castleberry AM, Balasubramanian S, Lau AG, Halls RA (2003). Heterodimerization of α_{2A} - and β_1 -Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* **278**: 10770–10777.

Yoon H, Walters G, Paulsen AR, Scarisbrick IA (2017). Astrocyte heterogeneity across the brain and spinal cord occurs developmentally, in adulthood and in response to demyelination. *PLOS ONE* **12**: e0180697.

Zeug A, Müller FE, Anders S, Herde MK, Minge D, Ponimaskin E, Henneberger C (2018). Control of astrocyte morphology by Rho GTPases. *Brain Res. Bull.* **136**: 44–53.

Zhang WP, Ouyang M, Thomas SA (2004). Potency of catecholamines and other L-tyrosine derivatives at the cloned mouse adrenergic receptors. *Neuropharmacology* **47**: 438–449.

Zhou B, Zuo YX, Jiang RT (2019). Astrocyte morphology: diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci. Ther.* **25**: 665–673.

Zorec R, Horvat A, Vardjan N, Verkhatsky A (2015). Memory formation shaped by astroglia. *Front. Integr. Neurosci.* **9**: 1–7.

Adrenergic regulation of the process formation by astrocytes

Taisuke Kitano

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Veterinary Sciences,
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

Astrocytes are the most abundant glial cells in the central nervous system (CNS). Astrocytes have numerous fine processes through which they contact blood vessels and neurons to regulate the functions of blood-brain barrier and synapse, respectively. These processes have plasticity depending on neural activity and change dynamically under physiological and pathological conditions, which is closely related to the CNS functions. The mechanisms regulating astrocyte morphology are of great interest because of the relationship between their morphological diversity and the CNS functions.

Noradrenaline is a major neurotransmitter in the CNS, and astrocytes express all type of adrenoceptors (ARs), i.e., α_1 -, α_2 - and β -ARs. Although all receptors are activated by noradrenaline, each receptor generally activates distinct intracellular signal. For example, β -ARs activate adenylate cyclase/cyclic AMP (cAMP) signal, while α_2 -ARs inhibit it. It has been reported that the activation of β -ARs induces the process formation of cultured astrocytes via cAMP signal and expansion of astrocyte processes *in situ*, and contributes to astrocyte hypertrophy under pathological conditions. On the other hand, the role of α -ARs in the morphology of astrocyte processes has not been elucidated.

Here, we employed pharmacological techniques to examine the role of α -ARs in the process formation by cultured astrocytes isolated from spinal cord and cerebral cortex of neonatal rats. Process formation of astrocytes was evaluated by phalloidin staining for actin-cytoskeleton with a fluorescence microscopy. Both cultured astrocytes were positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) (expression level: cortical astrocytes > spinal cord astrocytes) and exhibited polygonal shape without any processes.

In both cultured astrocytes, application of noradrenaline (NA; 1 μ M) and the β -agonist isoproterenol (ISO; 1 μ M) for 3 h transformed polygonal astrocytes into process-bearing ones with GFAP-positive major processes and actin-rich fine processes like astrocytes *in vivo*. The percentages of cells exhibiting process formation induced by NA (1 μ M) and ISO (1 μ M) peaked at 1–3 h after treatment. NA (1 μ M) and ISO (1 μ M) also increased the intracellular cAMP concentrations, which peaked within 30 min after treatment. In general, the effects of NA and ISO were more potent in cortical astrocytes than in spinal

cord astrocytes. In addition, the effect of ISO was more potent than that of NA, particularly in spinal cord astrocytes. Forskolin, an adenylate cyclase activator, and dibutyryl-cAMP, a cell-permeable cAMP analog, induced process formation in a concentration-dependent manner, which suggests that the increase in intracellular cAMP levels is related to the process formation induced by NA and ISO.

Next, the effects of AR-antagonists on NA (1 μ M)-induced process formation and cAMP elevation were examined in spinal cord astrocytes. The β -antagonist propranolol (PROP; 10 μ M) abolished NA-induced process formation and cAMP elevation. By contrast, the α_1 -antagonist prazosin (PRAZ; 1 or 10 μ M) or the α_2 -antagonist atipamezole (ATIP; 10 μ M) enhanced the NA-induced process formation, and ATIP enhanced NA-induced cAMP elevation. In cortical astrocytes, PROP (10 μ M) abolished NA-induced process formation, whereas PRAZ (1 μ M) and ATIP (10 μ M) had no effect on it.

The effects of α -agonists on ISO (1 μ M)-induced process formation and cAMP elevation were examined in spinal cord astrocytes. The α_2 -agonist dexmedetomidine (DEX; 1 μ M), but not α_1 -agonist phenylephrine (1 μ M), inhibited ISO-induced process formation and cAMP elevation. DEX (1 μ M) also inhibited ISO-induced process formation in cortical astrocytes. These results suggest that activation of β -ARs induces process formation via adenylate cyclase/cAMP signal, which is negatively regulated by α -ARs, especially α_2 -ARs. A reduction of intracellular cAMP levels contributes to the α_2 -AR-mediated inhibition of process formation.

To ascertain if a mechanism(s) other than intracellular cAMP reduction is involved in α_2 -AR-mediated inhibition of process formation, the effects of DEX on process formation induced by dibutyryl-cAMP, adenosine and a Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor, Y27632, were examined. In both cultured astrocytes, process formation induced by dibutyryl-cAMP (0.1 or 0.3 mM) was inhibited by DEX (1 μ M) but not in the presence of ATIP (10 μ M). Adenosine (30 μ M) and Y27632 (10 μ M) induced process formation almost without affecting the intracellular cAMP levels. DEX inhibited these cAMP-independent process formations but not in the presence of ATIP. Activation of α -ARs by NA also inhibited Y27632-induced process formation.

In conclusion, in contrast to β -ARs, α -ARs are responsible for inhibiting the formation of processes by cultured astrocytes. Especially, α_2 -ARs inhibited process formation via inhibition of adenylate cyclase/cAMP signal and cAMP-independent mechanism(s). NA bidirectionally affects astrocyte processes via α - and β -ARs. Noradrenergic regulation of astrocyte morphology likely depends on the balance of functional expression of ARs, which may be related to the CNS functions under physiological and pathological conditions.