

氏名 (生年月日) ^{ふる}古 ^た田 ^{たか}能 ^{ひろ}裕 (1989年5月8日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博第172号

学位授与の日付 2018年3月17日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける亜鉛動態変動を介した細胞機能制御に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 長澤 一樹

(副査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 安井 裕之

論文内容の要旨

序論 (はじめに)

脳高次機能維持には神経及びグリア細胞間の伝達物質を介した機能連関が重要であり、この破綻は精神神経疾患などの発症に寄与すると考えられている。近年増加の一途にあるうつ病などの気分障害はセロトニン・ノルアドレナリンなどを介した神経伝達の異常に起因すると考えられており、このモノアミン仮説に基づいた薬物治療が行われている。しかしながら、その治療成績は十分なものではなく、より画期的な治療法の確立が望まれている。このような中、うつ病の発症において、酸化ストレスの負荷に起因したグリア細胞、特にアストロサイトの機能変化並びに亜鉛やATPなどの情報伝達物質の脳内動態変動が中心的役割を担うことが明らかとなってきた。

これまで著者の研究室では、アストロサイトへの一酸化窒素の産生を伴った低浸透圧ストレス負荷が細胞内外の亜鉛動態を変動させること、またアストロサイトの異物貪食機能がATP受容体の一つであるP2X7受容体(P2X7R)により制御されることを報告してきた。しかしながら、酸化ストレスが負荷されたアストロサイトにおいてその貪食能を含めた細胞機能が変化するか否か、またその制御機構に関する情報は未だ得られていない。そこで本研究では、酸化ストレスを負荷したアストロサイトにおける細胞内外の亜鉛動態変動がその細胞機能に与える影響について精査した。

第1章 亜鉛動態の変動

脳神経系細胞外において認められる亜鉛は、神経興奮に伴ってシナプス前小胞から分泌されるものと考えられてきた。しかしながら、酸化ストレスを生じる脳虚血などの病態時における細胞外亜鉛レベルの増大には少なくとも急性期及び慢性期の二相性プロファイルが認められることから、神経細胞以外の細胞からの亜鉛放出が推測される。そこで、酸化ストレスを負荷したアストロサイトの細胞内外における亜鉛動態について検討した。アストロサイトの細胞生存率に影響を及ぼさないことが確認された酸化ストレス負荷条件(400 μ M H₂O₂, 24時間作用)において、アストロサイトの活性化の指標である細胞形態の変化及びglial fibrillary acidic proteinの発現増大、並びに酸化ストレスの指標である4-hydroxy-2-nonenalの発現が認められた。このときの細胞外亜鉛レベルをICP-MSにより測定したところ、酸化ストレス負荷後2時間までは経時的に増大し、その後24時間まではほぼ変化しなかった。一方、酸化ストレス負荷されたアストロサイトの細胞内亜鉛レベルをその蛍光指示薬であるZnAF-2 DAを

用いて絶対定量したところ、酸化ストレス負荷2時間後において約2 μM の最大値となり、その後低下したものの、その濃度は control 群のそれよりも有意に高かった。これらのことから、酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおいて、細胞外及び細胞内のいずれにおいても亜鉛レベルが増大し、その変動プロファイルは両コンパートメントにおいて類似したものであることが明らかとなった。

第2章 細胞外亜鉛クリアランスの変動

脳神経系細胞外において亜鉛が過剰に存在する場合、神経細胞死が誘発されるとともに、ミクログリアの活性化を介したその増悪が引き起こされる。したがって、情報伝達物質としての亜鉛の細胞外レベルは厳密に制御される必要がある。これまでに細胞外亜鉛のクリアランスは主にアストロサイトに発現する亜鉛トランスポーターの一つである ZIP1 を介して行われることがわかっているものの、酸化ストレス負荷条件下におけるその機能的発現変動に関する情報は無い。そこで、酸化ストレスを負荷されたアストロサイトにおける亜鉛クリアランスについて検討した。アストロサイトによる放射性トレーサーである ^{65}Zn の取り込みは、酸化ストレス負荷により有意に増大し、速度論的解析からそれは ZIP1 の発現増大に起因する可能性が示唆された。そこで酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける ZIP1 の発現をウェスタンブロット法及び免疫細胞染色法により評価したところ、その総発現量のみならず、細胞膜における発現量も増加していた。これらのことから、アストロサイトによる ZIP1 を介した亜鉛クリアランスは酸化ストレス負荷により増大することが示され、このアストロサイトの機能変化は細胞外に過剰に存在する亜鉛を除去することにより脳神経系細胞傷害に対して保護的に機能するものであると考えられる。

第3章 細胞内亜鉛による食食活性制御

アストロサイトの持つ食食機能は P2X7R により制御されている。一方、これは酸化ストレス負荷によって増大または低下するとの相反する報告がなされており、明確な結論は得られていない。そこで、アストロサイトに対して酸化ストレスを負荷した際の P2X7R を介したその食食機能の変化について検討した。アストロサイトの食食活性を latex beads の細胞内取り込みにより評価したところ、酸化ストレス負荷群によるその亜鉛取り込みは、control 群の場合より少なく、これは P2X7R の活性の指標である YO-PRO-1 取り込みの低下と対応していた。次に、P2X7R の発現プロファイルを検討した結果、その細胞膜における発現は酸化ストレス負荷により減少した。この P2X7R の細胞膜における発現局在の変化は、細胞膜透過型亜鉛キレータである TPEN (2 μM) の前処理によって部分的に抑制され、またアストロサイトの P2X7R 活性及び食食活性も control レベルまで回復した。P2X7R の活性は細胞膜において full length によるホモ三量体 (約 240 kDa) 形成時に最も高く、その C 末端欠損体である splice variants とのヘテロ三量体の形成により低下することが報告されている。そこで、アストロサイトにおける P2X7R の三量体形成に対する酸化ストレス負荷の影響を blue native PAGE 法により評価した。まず、full length のみを検出する抗 P2X7R 抗体を用いたところ、control 群において約 240 kDa 付近に検出された P2X7R の免疫活性は酸化ストレス負荷群において減少していたのに対し、full length 及び splice variants と反応する抗体を用いた場合ではその免疫活性に変化はなかった。これらの結果から、酸化ストレス負荷されたアストロサイトの細胞内遊離型亜鉛レベルの増大は細胞膜における P2X7R の機能的発現を減少させ、それによりアストロサイトの食食機能を低下させることが明らかとなった。

総括 (結論)

本研究の遂行により酸化ストレスを負荷されたアストロサイトでは細胞内外の亜鉛シグナリングの変動を介して細胞の機能性が変化することが明らかとなった。このことと、アストロサイトから放出

された亜鉛が P2X7R の活性化を介してミクログリアを活性化し、その貪食活性を誘導することを考え併せると、亜鉛はアストロサイト及びミクログリアの機能変化を惹起する重要な分子であり、そのアストロサイトにおける動態制御はうつ病などに対する新規治療法の開発につながる可能性が考えられる。

審査の結果の要旨

うつ病などの精神神経疾患の発症において、酸化ストレス負荷によるアストロサイトの細胞機能変化が重要な役割を担うとされているが、その制御機構は明らかとなっていない。そこで申請者は、うつ病発症に関与する脳内情報伝達物質の一つである亜鉛に着目し、酸化ストレス負荷がアストロサイトにおける細胞内外の亜鉛動態に与える影響、並びにそれらの細胞機能変化との連関について精査した。

第1章では、アストロサイト対して細胞傷害を惹起しない程度の酸化ストレス負荷条件、並びにその酸化ストレスが負荷されたアストロサイトの細胞内外における亜鉛動態が検討された。アストロサイトに対する 400 μ M 過酸化水素の 24 時間処置は、細胞生存率に影響を及ぼすことなく酸化ストレスを負荷し、細胞を活性化状態にすることが明らかとなった。本条件でのアストロサイトへの酸化ストレス負荷は、細胞外に亜鉛をミクログリアを活性化するレベルまで放出させるとともに、細胞内における遊離型亜鉛レベルも増大させ、細胞内外における亜鉛動態を変化させることが示された。

脳神経系細胞外に亜鉛が過剰に存在する場合、脳傷害が増悪されるため、その細胞外レベルは厳密に制御される必要があるが、酸化ストレス負荷状態において亜鉛クリアランス機構の機能的発現が変化するか否かに関する情報はない。そこで第2章では、亜鉛クリアランスに寄与する主要分子の一つである亜鉛トランスポータ ZIP1 に着目し、酸化ストレスを負荷されたアストロサイトにおける亜鉛取り込み特性が精査された。アストロサイトによる亜鉛取り込みは、酸化ストレス負荷により有意に増大していた。このときの ZIP1 の発現を調べたところ、その細胞膜における発現は control 群のそれと比較して有意に増加していた。これらのことから、アストロサイトによる ZIP1 を介した亜鉛クリアランスは酸化ストレス負荷により増大し、これは細胞外に過剰に存在する亜鉛による脳神経系細胞傷害に対して保護的に機能するものであることが示唆された。

第3章では、アストロサイトの貪食機能に対する細胞内遊離型亜鉛レベル増大の影響が検証された。まず、酸化ストレスを負荷した際のアストロサイトの貪食活性を評価したところ、それは control 群の場合と比較して低下しており、これはその貪食活性を制御する P2X7 受容体の活性の低下と対応していた。そこで P2X7 受容体の発現を調べた結果、その細胞膜発現量は酸化ストレス負荷により減少しており、これは細胞膜透過型亜鉛キレータである TPEN の前処理で細胞内遊離型亜鉛レベルの増大を抑制することによって部分的に抑制され、また TPEN は貪食活性及び P2X7 受容体活性も control レベルまで回復させることが示された。さらに、この P2X7 受容体の発現局在の変化の詳細が検討され、これは P2X7 受容体とその splice variants の三量体形成における構成割合の変化に起因することが明らかになった。これらのことから、酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおいて、細胞内遊離型亜鉛レベルの増大を介して細胞膜における P2X7 受容体の機能的発現が減少し、それにより貪食活性が低下すること、すなわち細胞内遊離型亜鉛はアストロサイトの P2X7 受容体を介した貪食活性を制御する分子であることが示された。

以上の結果から、アストロサイトは、酸化ストレスを負荷されることにより細胞内外の亜鉛動態の変動を介して自身の機能性を変化させるとともに、ミクログリアの活性を制御することが明らかとな

った。これら成績は、亜鉛がグリア細胞の機能変化を惹起する重要な分子であり、アストロサイトにおけるその動態制御がうつ病などに対する新規治療法開発に繋がる可能性を示す有益な基礎的知見であると考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。