

称号及び氏名 博士（理学） 井田 智章

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 31 日

論文名 「Regulatory mechanism of calcium-dependent glutamate release from astrocytes by cytokines via the nitric oxide signal pathway (サイトカインによる一酸化窒素シグナル経路を介したアストロサイトからのCa<sup>2+</sup>依存的グルタミン酸放出の調節機構)」

論文審査委員 主査 居原 秀  
副査 原 正之  
副査 児玉 靖司  
副査 八木 孝司

## 論文要旨

### <背景と目的>

サイトカインは免疫系で細胞間コミュニケーションを仲介する因子としてよく知られている。また、中枢神経系では、サイトカインは特にグリア細胞に作用し、様々な神経系疾患を引き起こすことが知られている一方で、様々な生理機能を示すことが明らかになりつつある。グリア細胞、なかでもアストロサイトはこれまで神経細胞の物理的支持、栄養因子の放出など、神経細胞の恒常性維持や神経活動を支える裏方としてのみ働いていると考えられてきた。しかし、近年、神経細胞と同様にアストロサイトにも数多くの神経伝達物質やサイトカインのレセプター、各種イオンチャンネルが発現しているとともに、成長因子、サイトカインなどの生理活性物質、さらにはグルタミン酸 (Glu)、ATP、*D*-セリンなどの神経伝達物質 (グリオトランスミッター) を放出し、神経回路そのものの機能にも重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。これらの発見により、前シナプス神経、後シナプス神経、アストロサイトからなる“三者間シナプス”といわれる概念が生まれた。現在ではアストロサイトから放出されるグリオトランスミッターはシナプスに作用し、神経可塑性に関与していることが示され、神経伝達の理解には三者間シナプスにおける総合的な研究が重要であることが示されている (Fig. 1)。

サイトカインはアストロサイトを活性化し、アラキドン酸代謝物、一酸化窒素 (NO)、活性酸素種 (ROS) などを産生することが知られている。これらの過剰産生はアルツハイマー病などの神経変性疾患の一因であると考えられている。しかし、近年、サイトカインにより活性化されたアストロサイトはシナプス再形成や、抗酸化機能促進など、損傷した中枢神経系細胞の修復促進、損傷抑制作用を示すことが報告された。しかし、現在のところ、アストロサイトからのグリオトランスミッター放出に及ぼすサイトカインの影響は不明である。

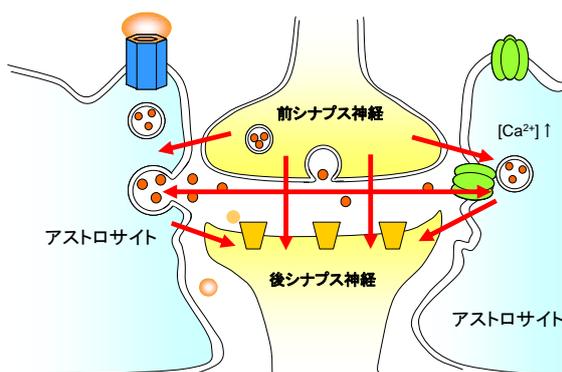


Fig. 1. 三者間シナプス

サイトカインにより活性化されたアストロサイトは誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を誘導することが知られている。中枢神経系において、NO は記憶や学習などの神経可塑性や神経細胞死、神経発生に関与していることが示されているが、未だ不明な点が多い。NO の主要なシグナル伝達経路は NO による可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) の活性化を介したサイクリック GMP (cGMP) の産生、cGMP 依存的プロテインキナーゼ (PKG) によるタンパク質のリン酸化を介して成立する (NO-cGMP シグナル経路)。また近年、ニトロ化、S-ニトロシル化などの化学修飾が注目されている。さらに近年、新規のニトロ化核酸として 8-nitro-cGMP が生体内で合成され多様な機能を発揮していることが報告された。

8-nitro-cGMP は cGMP 様の活性をもつほか、8-nitro-cGMP 特有の機能として活性酸素産生、膜透過性などをもつ。さらに 8-nitro-cGMP はタンパク質のスルフィドリル基と反応する新規のタンパク質翻訳後修飾 (S-guanylation) が知られている。現在のところ、アストロサイトでの 8-nitro-cGMP の産生や機能についての知見はほとんどない (Fig. 2)。

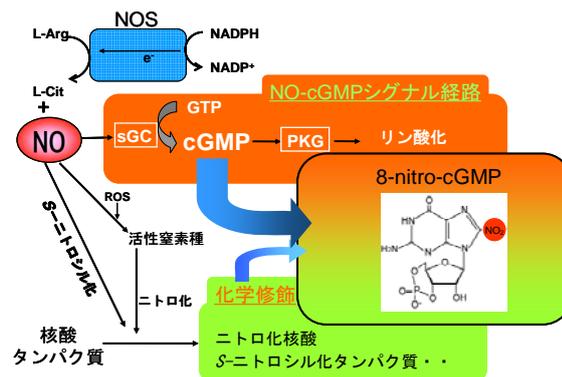


Fig. 2. NOシグナル経路

本研究では次の2つのテーマで研究に取り組んだ。第一章ではサイトカインによるアストロサイトからのCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出に及ぼす影響について調べた。第二章ではアストロサイトにおける新規細胞情報伝達物質 8-nitro-cGMPの産生とCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出に及ぼす影響を解析することを目的とした。

## 第一章

### <実験方法>

ラット大脳皮質より調製したアストロサイトとアストロサイトのモデル細胞として広く用いられるラットグリオーマ細胞株C6細胞を用いた。アストロサイトの純度はアストロサイトのマーカータンパク質であるglial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する特異的抗体、神経細胞のマーカータンパク質であるmicrotubule associated protein 2 (MAP2) に対する特異的抗体を用いた細胞蛍光免疫染色、ウェスタンブロットにより評価した。Glu放出は各種試薬で前処理したアストロサイトにCa<sup>2+</sup>イオノフォアA23187を加え、細胞内に強制的にCa<sup>2+</sup>を流入させた。培養上清中に放出されたGluは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。さらに、アストロサイトからのCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出に及ぼすNO、NO-cGMPシグナル経路の関与を検討するために、細胞をinterferon-γ (IFN-γ)、tumor necrosis factor-α (TNF-α)、interleukin-1β (IL-1β) からなるサイトカイン、NOS阻害剤、NO発生剤、sGC阻害剤、PKG阻害剤、cGMPアナログで前処理した。iNOSの発現は、抗iNOS特異的抗体を用いて、細胞蛍光免疫染色とウェスタンブロットにより解析した。NOの代謝産物である亜硝酸濃度をGriess assayにより測定することで、NO産生量を解析した。

### <結果>

細胞蛍光免疫染色の結果より96%以上の細胞がGFAP陽性細胞であり、神経細胞の混入は確認されなかった。A23187を用いてアストロサイトにCa<sup>2+</sup>を流入させることによりCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出が確認され、サイトカイン処理によりCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出量は増加された。また、サイトカイン処理によりアストロサイトにおいてiNOSの発現、NO産生が確認され、iNOS

阻害剤によりNO産生が阻害された。iNOS阻害剤はCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出に及ぼすサイトカインの効果を打ち消し、NO発生剤はサイトカイン非存在下でもCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出を増加させた。また、C6細胞においても、アストロサイトと同様の結果を得た。NOによるCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出の増強効果にNO-cGMPシグナル経路が関与しているかを検討した結果、NOによるGlu放出の増強効果はsGC阻害剤で打ち消されたが、PKG阻害剤では抑制されなかった。また、cGMPアナログはGlu放出に影響を及ぼさなかった。

<小括>

本研究において、サイトカインはアストロサイトにおけるiNOSの発現誘導を介したNO産生を促進することを示し、さらに産生されたNOがアストロサイトからのCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出を増加させることを示した。NOによるGlu放出の増強効果にはsGCが関与するが、cGMP単独では増強効果が認められなかった。これらの結果より、NO-cGMPシグナル経路とは異なるシグナル伝達機構の存在が示唆された。

## 第二章

<実験方法>

ラット大脳皮質アストロサイトとC6細胞を用いた。細胞内8-nitro-cGMPの産生は、グルタミン合成阻害剤L-buthionine sulfoximine (BSO)の存在、非存在下で、細胞にNO発生剤、lipopolysaccharide (LPS) + サイトカイン、NOS阻害剤またはsGC阻害剤で処理した後、抗8-nitro-cGMP特異的抗体を用いた細胞蛍光免疫染色とLC-MS/MSにより同定、定量化した。8-nitro-cGMPによるCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出に及ぼす影響は、C6細胞を8-nitro-cGMPで処理し、第一章と同様の方法で解析した。

<結果>

NO発生剤による外因性NO、サイトカイン誘導性iNOSの発現誘導による内因性NOによって、C6細胞、アストロサイト内で8-nitro-cGMPの産生が確認された。内因性NOによる8-nitro-cGMPの産生はNOS阻害剤、sGC阻害剤によって抑制された。また、外因性NOによる8-nitro-cGMPの産生はsGC阻害剤によって抑制された。さらにLC-MS/MSを用いた定量的解析により、cGMPの産生はNO発生剤処理後30分でピークになった。一方、8-nitro-cGMPはNO発生剤、LPS+サイトカイン処理後12時間以降において顕著に産生された。8-nitro-cGMPを処理したC6細胞において、Ca<sup>2+</sup>依存的Glu放出が増加された。

<小括>

8-nitro-cGMPがNO発生剤、またはLPS+サイトカイン処理後12時間以降にNO依存的にsGCの活性化を介し、アストロサイト内に顕著に産生されていることが明らかとなった。また、産生された8-nitro-cGMPはアストロサイトからのCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出を増加させた。

<総括>

アストロサイトからのCa<sup>2+</sup>依存的グルタミン酸放出に及ぼすサイトカインの影響は不明であった。また、アストロサイトにおける8-nitro-cGMPの産生や機能についてはほとんど不明であった。本研究では、サイトカインはアストロサイトにiNOSの発現を誘導させ、産生されたNOはアストロサイトからのCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出を増加させることを明らかにした。このNOによるGlu放出の増強効果にはsGCが関与するが、cGMP単独では増強効果が認められず、NO-cGMP経路とは異なるシグナル伝達機構の存在が示唆された。8-nitro-cGMPは外因性、内因性NOによりアストロサイト内にsGCを介して産生されることを示した。さらに、8-nitro-cGMPはアストロサイトからCa<sup>2+</sup>依存的Glu放出を増加させた。これらの結果より、Glu放出調節機構はNOによるsGCの活性化によって産生され、NO-cGMP経路とは異なるシグ

ナル伝達機構をもつ 8-nitro-cGMPによって調節されていることが示された。本研究はアストロサイトにおける 8-nitro-cGMPの産生とグルタミン酸放出調節機構に及ぼす影響を述べた最初の研究である。本研究より、サイトカインはアストロサイトに作用し、8-nitro-cGMP産生を介したグリオトランスミッター放出を調節し、三者間シナプスに関与していることを示唆した (Fig. 3)。

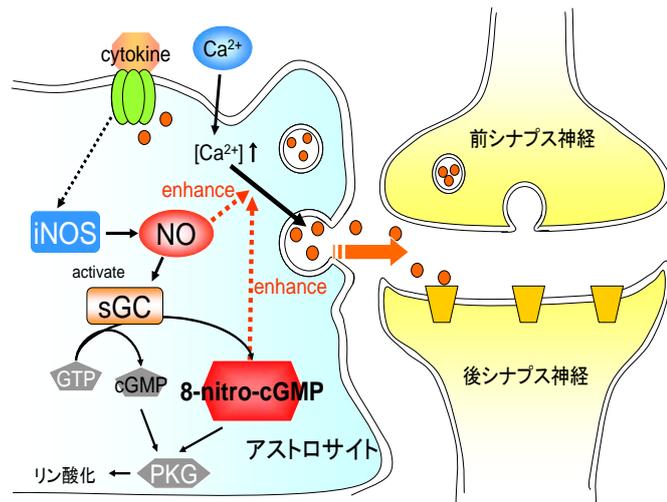


Fig. 3. サイトカインによる三者間シナプスに及ぼす影響

## 審査結果の要旨

本学位論文は、サイトカインによる一酸化窒素シグナル経路を介したアストロサイトから神経伝達物質であるグルタミン酸 (Glu) のカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 依存的放出の調節機構について述べており、二つの章から構成されている。第一章では初代培養ラット大脳皮質由来アストロサイト、グリオーマ細胞からのカルシウム依存的Gluの放出に及ぼすサイトカインの影響を調べ、一酸化窒素 (NO) 産生を介した放出調節の分子メカニズムについて検討している。第二章では、アストロサイト、グリオーマ細胞を用い、新規情報伝達物質 8-nitro-cGMPの産生を調べ、カルシウム依存的Glu放出に及ぼす 8-nitro-cGMPの影響を調べている。

近年、神経機能におけるアストロサイトからの $\text{Ca}^{2+}$ 依存的Glu放出の重要性が注目されている。本研究により、サイトカインがNO産生を介してアストロサイトからのカルシウム依存的Glu放出を促進すること、また、アストロサイトにおいて新規情報伝達物質 8-nitro-cGMPがNO産生に依存して合成され、Glu放出を促進することが明らかとなった。

神経系におけるサイトカインの生理的作用が明らかにされつつあるが、サイトカインによる $\text{Ca}^{2+}$ 依存的Glu放出の調節機構に関する報告はなかった。また、アストロサイトにおける新規情報伝達物質 8-nitro-cGMPの産生メカニズム、生理作用は不明であった。これまでにNOがcGMPを介して作用するという報告が数多くあるが、今回の結果よりアストロサイトからの $\text{Ca}^{2+}$ 依存的Glu放出においてNOはcGMPを介さず、8-nitro-cGMPを介して作用することを明らかにした。今後 8-nitro-cGMP を含めたNOシグナル伝達系によるさらに複雑な調節機構の関与が明らかになると予想される。

上記の研究成果は、神経系におけるサイトカイン、NO、8-nitro-cGMPの役割、とりわけアストロサイトにおけるGluの $\text{Ca}^{2+}$ 依存的放出の制御について、新しい知見を加えるものであり、詳細な実験に基づいて論理的に結論が導かれているものと認められた。

本委員会は、本論文の審査、最終試験の結果に基づき、博士 (理学) の学位を授与することを適当と認める。