

氏 名	なか お けん じ 中 尾 賢 治
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 644 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	アストロサイトにおけるトロンビン誘発Ca ²⁺ ダイナミクスに関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 金 子 周 司 教 授 赤 池 昭 紀 教 授 竹 島 浩

論 文 内 容 の 要 旨

Ca²⁺は普遍的に存在する無機イオンで、細胞内セカンドメッセンジャーとして細胞の活動状態を制御している。中枢神経系で最も豊富に存在するアストロサイトは、様々な疾患時に活性化し、細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を変動させることが知られている。しかし、病的刺激後のCa²⁺ダイナミクスがアストロサイトで果たす生理的な役割については未だ不明である。一方、脳損傷や中枢神経変性疾患に起因する脳内出血時において、脳実質に浸潤した血中由来因子はアストロサイトの病的変化を引き起こすことが知られており、その中でも重要な血中由来因子の一つであるトロンビンはアストロサイトに対して、細胞形態変化や異常増殖を伴ったグリオシス（神経膠症）を引き起こすことが報告されている。そこで私は、脳内出血後のアストロサイト活性化にCa²⁺ダイナミクスが関与している可能性を解明するべく、トロンビン誘発アストロサイト細胞応答に対して電位非依存性非選択的カチオンチャネルであるTRPC（transient receptor potential canonical）に着目して解析し、以下の新知見を得た。

第一章 アストロサイトにおけるトロンビン誘発細胞形態変化に対するTRPC3を含めたCa²⁺ダイナミクスの関与

病態モデルとして細胞形態の変化を鋭敏に検出することができる株化アストロサイトを用いて、形態や[Ca²⁺]_iの変化について解析を行った結果、トロンビンによる細胞突起の退縮運動が、トロンビン受容体の一つproteinase-activated receptor 1（PAR-1）を選択的に介して素早くかつ可逆的に制御されていることが明らかとなった。その一方でトロンビンはPAR-1を介して[Ca²⁺]_iのオシレーション反応を惹起した。そこで、Ca²⁺ダイナミクスが細胞運動に与える影響を薬理的に検討したところ、細胞内ストアからのCa²⁺放出および細胞外からストアへのCa²⁺補充がアストロサイトの運動に関与していることが示された。

TRPCチャネルは生体内の幅広い組織に発現しており、受容体刺激に伴った細胞内Ca²⁺ストア枯渇後のCa²⁺流入を担っているチャネルであり、最近の研究により細胞応答への関与は未だ不明であるもののTRPCがアストロサイトに発現していることが示されている。そこで、このチャネル分子がトロンビン誘発細胞応答に関与している可能性について評価した。TRPCサブタイプのうち、受容体刺激後のCa²⁺流入を担う有力な候補分子として特に知られるTRPC3やTRPC1のmRNA及びタンパク質発現が株化アストロサイトにおいて確認されたことから、siRNAを用いてTRPC3の発現を抑制した結果、トロンビンによるCa²⁺オシレーションの頻度と細胞形態変化がいずれも抑制された。さらに、TRPC3阻害作用を示す新規薬物を用いて検証したところ同様の結果が得られた。また、TRPC3とヘテロ多量体化することが報告されているTRPC1チャネルをノックダウンした細胞においても同様にトロンビン応答の減弱が確認された。次いで、形態変化メカニズムにおけるTRPC3の位置づけを行ったところ、TRPC3はRhoAの活性化やミオシン軽鎖のリン酸化を調整することで、細胞骨格制御経路に関与していることが判明した。最後に、培養ラット大脳皮質アストロサイトにおいてもTRPC3を含むCa²⁺ダイナミクスが細胞骨格の制御に関係していることが薬理的に示された。以上の結果から、アストロサイトに存在するTRPCチャネルが細胞応答に関与していることが初めて同定され、アストロサイトが病的刺激により活性化する際のCa²⁺ダイ

ナミクスが担う生理的役割として初めて細胞骨格の制御が提示された。

第二章 トロンビンによるアストロサイト活性化時の TRPC3 タンパク質発現量変化

TRPCチャネルは末梢組織における各種病態時において、その発現量を動的に変化させることで病態に関与していることが示唆されている。しかし、中枢神経系での病態時における TRPC 発現量変化については未だ不明である。そこで、アストロサイトがトロンビン刺激により活性化する際の TRPC3 タンパク質発現量変化を経時的に評価した。その結果、培養ラット大脳皮質アストロサイトにおいてトロンビンによる PAR-1 受容体を介した TRPC3 タンパク質の一過性の発現上昇が確認された。タンパク質発現上昇の機序について薬理的に検討したところ、細胞の増殖や分化に関係の深い mitogen-activated protein kinase 経路のうち extracellular signal-regulated kinase 経路と c-Jun N-terminal kinase 経路を介した新規タンパク質合成によって TRPC3 発現上昇が起こることが判明した。さらに、TRPC3 阻害薬を含む Ca^{2+} 動態に関する各種薬物を用いて検討した結果から、この発現上昇が Ca^{2+} ダイナミクスそのものに依存している、すなわち TRPC3 自己活性に依存した feed-forward な発現増幅機構の存在が示唆された。この TRPC3 発現増加と平行して、トロンビン刺激によるアストロサイトの増殖が観察された。トロンビン誘発アストロサイト増殖は、TRPC3 タンパク質発現上昇と同様、 Ca^{2+} ダイナミクスの影響を受けていた。以上の結果から、アストロサイトにおいて TRPC3 活性が自己の発現量を調整しながら細胞増殖に関与していることが示唆された。

以上、著者はトロンビン刺激後のアストロサイトの細胞応答に、 Ca^{2+} ダイナミクスが関与していることを発見した。特に、TRPCチャネル分子がアストロサイトにおいて機能的なチャネルを形成し、病理的活性化のスイッチ・増幅器として機能していることが示された。本研究は、脳内出血後のグリオシス形成・進行メカニズムにおける Ca^{2+} ダイナミクスの関与とその分子的背景を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、普遍的に存在する無機イオンであり、細胞内セカンドメッセンジャーとして細胞の活動状態を制御している Ca^{2+} が、中枢神経系で最も豊富に存在するアストロサイトで果たす機能に着目した研究である。

まず、脳内出血後のアストロサイト活性化に Ca^{2+} ダイナミクスが関与している可能性を解明するべく、トロンビン誘発アストロサイト細胞応答に対して電位非依存性非選択的カチオンチャネルである TRPC (transient receptor potential canonical) に着目した。アストロサイトにおけるトロンビン誘発細胞形態変化に対する TRPC3 を含めた Ca^{2+} ダイナミクスの関与を解明するために細胞形態の変化を鋭敏に検出することができる株化アストロサイトを用いた解析から、トロンビンによる細胞突起の退縮運動が、トロンビン受容体の一つ proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) を選択的に介して素早くかつ可逆的に制御されていることを明らかにした。ついで、 Ca^{2+} ダイナミクスが細胞運動に与える影響を薬理的に検討したところ、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出および細胞外からストアへの Ca^{2+} 補充がアストロサイトの運動に関与していることが示された。受容体刺激に伴った細胞内 Ca^{2+} ストア枯渇後の Ca^{2+} 流入を担っているチャネルである TRPCチャネルがトロンビン誘発細胞応答に関与している可能性について評価したところ、TRPC サブタイプのうち、受容体刺激後の Ca^{2+} 流入を担う有力な候補分子として特に知られる TRPC3 や TRPC1 の mRNA 及びタンパク質発現が株化アストロサイトにおいて確認された。そこで、siRNA を用いて TRPC3 の発現を抑制した結果、トロンビンによる Ca^{2+} オシレーションの頻度と細胞形態変化がいずれも抑制された。さらに、TRPC3 阻害作用を示す新規薬物を用いて検証したところ同様の結果が得られた。また、TRPC3 とヘテロ多量体化することが報告されている TRPC1 チャネルをノックダウンした細胞においても同様にトロンビン応答の減弱が確認された。形態変化メカニズムにおける TRPC3 の位置づけを行ったところ、TRPC3 は RhoA の活性化やミオシン軽鎖のリン酸化を調整することで、細胞骨格制御経路に関与していることが判明した。最後に、培養ラット大脳皮質アストロサイトにおいても TRPC3 を含む Ca^{2+} ダイナミクスが細胞骨格の制御に関係していることが薬理的に示された。以上の結果から、アストロサイトに存在する TRPCチャネルが細胞応答に関与していることが初めて同定され、アストロサイトが病理的刺激により活性化する際の Ca^{2+} ダイナミクスが担う生理的役割として初めて細胞骨格の制御が提示された。

続いて本論文は、トロンビンによるアストロサイト活性化時の TRPC3 タンパク質発現量変化に言及した。アストロサイ

トロンビン刺激により活性化する際の TRPC3 タンパク質発現量変化を経時的に評価したところ、培養ラット大脳皮質アストロサイトにおいてトロンビンによる PAR-1 受容体を介した TRPC3 タンパク質の一過性の発現上昇が確認された。タンパク質発現上昇の機序について薬理的に検討したところ、細胞の増殖や分化に関係の深い mitogen-activated protein kinase 経路のうち extracellular signal-regulated kinase 経路と c-Jun N-terminal kinase 経路を介した新規タンパク質合成によって TRPC3 発現上昇が起こることが判明した。さらに、TRPC3 阻害薬を含む Ca^{2+} 動態に関する各種薬物を用いて検討した結果から、この発現上昇が Ca^{2+} ダイナミクスそのものに依存している、すなわち TRPC3 自己活性に依存した feed-forward な発現増幅機構の存在が示唆された。この TRPC3 発現増加と平行して、トロンビン刺激によるアストロサイトの増殖が観察された。トロンビン誘発アストロサイト増殖は、TRPC3 タンパク質発現上昇と同様、 Ca^{2+} ダイナミクスの影響を受けていた。以上の結果から、アストロサイトにおいて TRPC3 活性が自己の発現量を調整しながら細胞増殖に関与していることが示唆された。

以上、本論文はトロンビン刺激後のアストロサイトの細胞応答に、 Ca^{2+} ダイナミクスが関与していることを発見した。特に、TRPC チャンネル分子がアストロサイトにおいて機能的なチャンネルを形成し、病理的活性化のスイッチ・増幅器として機能していることが示された。本研究は、脳内出血後のグリオシス形成・進行メカニズムにおける Ca^{2+} ダイナミクスの関与とその分子的背景を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。