

京都大学	博士（薬学）	氏名	畝村 和宏
論文題目	アストロサイトのグルコルチコイド受容体によるニューロン死の制御に関する研究		
（論文内容の要旨） グルコルチコイドは副腎皮質から分泌され、その分泌量はhypothalamic-pituitary-adrenal系により制御されている。過度のストレス下においてはこの制御機構が破綻し血中のグルコルチコイド濃度が上昇することが示唆されている。最近、若年性うつ病患者の前脳においてアストロサイトが減少することやストレスが脳梗塞の危険因子の一つであることが報告されている。しかし、アストロサイト細胞数の変化や虚血障害時の中枢神経系細胞に対するグルコルチコイドの作用には不明な点が多い。そこで本研究において著者は、グルコルチコイドの中枢神経系細胞に対する作用におけるグルコルチコイド受容体（GR）の役割について検討を進めた結果、以下の新知見を得た。 第一章 アストロサイト細胞数に対するグルコルチコイドの作用 グルコルチコイドがアストロサイト細胞数に与える影響を検討するため、ラット胎仔由来初代培養アストロサイトを用いて検討を行った。コルチコステロンを処置したところ濃度依存的にアストロサイト細胞数は減少し、その作用はGR拮抗薬であるRU486によって阻害された。GRの発現量変化について検討したところ、コルチコステロン処置によって一過性に上昇した後発現量が減少した。RU486はコルチコステロンによるGR発現上昇作用は阻害せずに、発現低下作用は阻害した。さらに、siRNAを用いてGRをノックダウンすることによりアストロサイトの増殖は抑制された。次に、in vivoにおけるグルコルチコイドのアストロサイトに対する作用を明らかにする目的で、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）投与がアストロサイト数に与える影響について検討した。ACTHを14日間連続でラットに皮下投与したところ、前脳部分においてglial fibrillary acidic protein（GFAP）およびGRの発現量低下さらにGFAP陽性細胞数の減少が観察された。以上の結果から、グルコルチコイドによるGRの発現量低下がアストロサイトの増殖抑制に重要な役割を果たすことが示唆された。 第二章 グルタミン酸神経毒性に対するグルコルチコイドの作用におけるアストロサイトの関与 グルタミン酸は興奮性の神経伝達物質であるが、脳梗塞などの病態形成時には過度の濃度上昇により神経細胞死を惹起することが知られている。一方、			

グルココルチコイドはその処置時間によりニューロン死に対して相反する作用を示すことが報告されている。そこで、グルココルチコイドのグルタミン酸神経毒性に対する作用および処置時間が与える影響について検討した。ニューロンとアストロサイトの共培養においてコルチコステロンの短期処置はグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示したが、長期処置は保護作用を示さなかった。一方、ニューロン単独培養においてコルチコステロンは処置時間依存的な保護作用を示した。さらに、ニューロンとアストロサイトの共培養においてはニューロン単独培養に比べてより低濃度のグルココルチコイドから保護作用が観察された。以上の結果より、グルタミン酸神経毒性に対するグルココルチコイドの保護作用にはアストロサイトへのグルココルチコイド刺激が重要であること、アストロサイトを介した保護作用は長期処置によって消失することが示唆された。

第三章 虚血再灌流障害に対するACTHの作用および虚血再灌流後のGR発現変化

これまでに脳虚血モデルにおいてストレスが梗塞巣体積の増大を引き起こすこと、および虚血再灌流後に血中のグルココルチコイドが上昇することが報告されている。そこで、グルココルチコイドの虚血障害に対する作用および虚血再灌流後における各脳部位におけるGRの発現変化について、ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて検討を行った。虚血開始1時間前にACTHを投与したところ、saline投与群に比べ梗塞巣体積の減少が見られた。一方、虚血開始前に24時間おきに3回ACTHを投与したところ梗塞巣体積の増大がみられた。次に、虚血再灌流後のGRの発現変化に関して検討を行ったところ、虚血再灌流1日後に視床下部においてGRの発現量低下およびGFAPの発現量の上昇が観察された。一方、梗塞周辺部の前頭皮質および海馬ではこれらの変化は観察されなかった。以上の結果より、グルココルチコイドの暴露時間により虚血障害への作用が異なること、虚血再灌流後の早期に視床下部においてGRの一過性の発現量低下およびグリオシスが起ることが示唆された。

以上、著者は、グルココルチコイドがGRの発現低下を介してアストロサイトの増殖を抑制すること、暴露時間によってグルココルチコイドのニューロン死に対する作用が異なり、その変化にはアストロサイトに対するグルココルチコイド刺激が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、虚血再灌流後に視床下部において早期にGRの発現低下が起きることを明らかにした。本研究の成果は、脳虚血時におけるグルココルチコイド上昇がアストロサイトを介してニューロン死を制御することを示すものであり、脳内グルココルチコイド受容体の役割に関する重要な知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

グルココルチコイドは副腎皮質から分泌され、その分泌量はhypothalamic-pituitary-adrenal系により制御されている。過度のストレス下においてはこの制御機構が破綻し血中のグルココルチコイド濃度が上昇することが示唆されている。最近、若年性うつ病患者の前脳においてアストロサイトが減少することやストレスが脳梗塞の危険因子の一つであることが報告されている。しかし、アストロサイト細胞数の変化や虚血障害時の中枢神経系細胞に対するグルココルチコイドの作用には不明な点が多い。本研究において、グルココルチコイドの中枢神経系細胞に対する作用におけるグルココルチコイド受容体 (GR) の役割を検討した。

グルココルチコイドがアストロサイト細胞数に与える影響を検討するため、ラット胎仔由来初代培養アストロサイトを用いて検討を行った。コルチコステロンを処置したところ濃度依存的にアストロサイト細胞数は減少し、その作用はGR拮抗薬であるRU486によって阻害された。GRの発現量変化について検討したところ、コルチコステロン処置によって一過性に上昇した後発現量が減少した。RU486はコルチコステロンによるGR発現上昇作用は阻害せずに、発現低下作用は阻害した。さらに、siRNAを用いてGRをノックダウンすることによりアストロサイトの増殖は抑制された。次に、in vivoにおけるグルココルチコイドのアストロサイトに対する作用を明らかにする目的で、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 投与がアストロサイト数に与える影響について検討した。ACTHを14日間連続でラットに皮下投与したところ、前脳部分においてglial fibrillary acidic protein (GFAP) およびGRの発現量低下さらにGFAP陽性細胞数の減少が観察された。以上の結果から、グルココルチコイドによるGRの発現量低下がアストロサイトの増殖抑制に重要な役割を果たすことが示唆された。

グルタミン酸は興奮性の神経伝達物質であるが、脳梗塞などの病態形成時には過度の濃度上昇により神経細胞死を惹起することが知られている。一方、グルココルチコイドはその処置時間によりニューロン死に対して相反する作用を示すことが報告されている。そこで、グルココルチコイドのグルタミン酸神経毒性に対する作用および処置時間が与える影響について検討した。ニューロンとアストロサイトの共培養においてコルチコステロンの短期処置はグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示したが、長期処置は保護作用を示さなかった。一方、ニューロン単独培養においてコルチコステロンは処置時間依存的な保護作用を示した。さらに、ニューロンとアストロサイトの共培養においてはニューロン単独培養に比べてより低濃度のグルココルチコイドから保護作用が観察された。以上の結果より、グルタミン酸神経毒性に対するグルココルチコイドの保護作用にはアストロサイトへのグルココルチコイド刺激が重要であること、アストロサイト

を介した保護作用は長期処置によって消失することが示唆された。

これまでに脳虚血モデルにおいてストレスが梗塞巣体積の増大を引き起こすこと、および虚血再灌流後に血中のグルココルチコイドが上昇することが報告されている。そこで、グルココルチコイドの虚血障害に対する作用および虚血再灌流後における各脳部位におけるGRの発現変化について、ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて検討を行った。虚血開始1時間前にACTHを投与したところ、saline投与群に比べ梗塞巣体積の減少が見られた。一方、虚血開始前に24時間おきに3回ACTHを投与したところ梗塞巣体積の増大がみられた。次に、虚血再灌流後のGRの発現変化に関して検討を行ったところ、虚血再灌流1日後に視床下部においてGRの発現量低下およびGFAPの発現量の上昇が観察された。一方、梗塞周辺部の前頭皮質および海馬ではこれらの変化は観察されなかった。以上の結果より、グルココルチコイドの暴露時間により虚血障害への作用が異なること、虚血再灌流後の早期に視床下部においてGRの一過性の発現量低下およびグリオシスが起ることが示唆された。

以上、グルココルチコイドがGRの発現低下を介してアストロサイトの増殖を抑制すること、暴露時間によってグルココルチコイドのニューロン死に対する作用が異なり、その変化にはアストロサイトに対するグルココルチコイド刺激が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、虚血再灌流後に視床下部において早期にGRの発現低下が起きることを明らかにした。本研究の成果は、脳虚血時におけるグルココルチコイド上昇がアストロサイトを介してニューロン死を制御することを示すものであり、脳内グルココルチコイド受容体の役割に関する重要な知見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24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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降