

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24621008

研究課題名(和文) 中枢グリア細胞の睡眠機構への関与

研究課題名(英文) Involvement of Central Glial Cells in Sleep

研究代表者

中村 洋一 (NAKAMURA, Yoichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：90180413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の周囲を取り囲んで、脳全体のエネルギー代謝の要となっているアストロサイトの細胞機能が、種々の薬剤により変化することが明確になった。特にGlu取込活性がギャップ結合(GJ)阻害剤で増強されることは興味深い。Gluは最も広汎に存在する興奮性伝達物質であり、その取込活性が増強されることは、脳全体の覚醒レベルの低下に繋がる。GJが阻害され細胞間相互作用が抑制されることが、脳全体の覚醒レベルを下げ、グリコーゲンの消費モードから蓄積モードにスイッチされる可能性がある。動物の睡眠/覚醒とアストロサイト細胞機能との直接の繋がりについては今後の課題となるが、本研究はそれらの基礎となる仮説を提唱している。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes, surrounding neurons in CNS, play pivotal roles in brain energy metabolism. We found several drugs affects cellular functions of astrocytes. It is, especially, very interesting that inhibitors of gap junction (GJ) augment glutamate (Glu) uptake. Glu is the most abundant excitatory transmitter in our brain, and the augmentation of Glu uptake causes the decrease in the awakening level of total brain. Inhibition of GJ is possible to cause the reduction of inter-astrocytes communication, the decline of awakening level, and switching mode into the accumulation of glycogen from the consumption. The direct evidence would be necessary in future between actual animal sleep and the changes in cellular functions of astrocytes; however, we believe that this is a plausible hypothesis of an involvement of astrocytes in animal sleep.

研究分野：獣医生理学

キーワード：アストロサイト 睡眠覚醒 細胞機能調節 ギャップ結合 グルタミン酸輸送

1. 研究開始当初の背景

種によりその様式に様々な違いが見られるものの、全ての動物にとって必須の時間として確保されている「睡眠」のメカニズムについて多くの研究が積み重ねられてきた。視床下部の睡眠/覚醒中枢とよばれる領域に存在する、生体時計とカップルしたニューロン等が中心的に働いて睡眠の「周期」を制御していることが明らかにされてきたが、大脳皮質全体が入眠する「ドライビングフォース」が何によってもたらされるどのようなものであるのかは未解決である。

グリア細胞におけるある種の機能変化が、睡眠/覚醒の原因となっているのか、その結果であるのかの判断は容易ではない。しかしながら、睡眠という脳の複雑な現象を説明する場合、原因が結果を引き起こすと同時にその結果が原因を増幅する等という複雑な統合機構である可能性が高い。すなわちグリア細胞が入眠のドライビングフォースを担っている可能性がある。

脳の毛細血管はそのほぼ全てがアストロサイトの終足に覆われているとされており、ニューロンは直接には血中のグルコースを利用できず、アストロサイトに一旦取り込まれたグルコースが、グルコースそのままかあるいは乳酸に変わり、ニューロンにエネルギー源として供給されていると考えるのが妥当である。近年は乳酸が主として使われているとする報告がほとんどである。最近 *in vivo* 酵素電極を用いた研究により、脳間質のグルコース細胞外濃度は睡眠時に高く (Netchiporouk, et al, *Eur. J. Neurosci.*, 2001)、乳酸は逆に覚醒時に高い (Shram, et al, 2002, *Eur. J. Neurosci.*) という興味深い報告がある。ニューロンにとってのエネルギー源がグルコースでなく乳酸であるという前提に立つ場合、覚醒時にニューロンのエネルギー要求が高いと乳酸は睡眠時に比して低くなっても良さそうなものであるが、結果は反対に高くなっていた。

2. 研究の目的

睡眠機構における中枢グリア細胞の役割について注目した研究は多くない。本研究では、これまでニューロンの脇役として位置づけられていたものの、最近になりその多彩な機能が注目されているグリア細胞 (アストロサイトおよびミクログリア) が「睡眠機構」において、どのような役割を果たしているのかについて、「アストロサイトのエネルギー供給モードは睡眠/覚醒でドラスティックに切り替わる」および「グ

リア細胞が産生するサイトカインが睡眠/覚醒に関わっている」の2つの作業仮説に検討を加える目的で、様々な因子についてアストロサイトの種々の細胞機能への影響を調べた。

3. 研究の方法

- (1)アストロサイトの初代培養細胞は胎齢20日齢の Wistar ラット胎仔大脳皮質から調製した。CO₂ インキュベーター内で3週間培養後、実験に用いた。
- (2)EC-SOD 活性は生細胞培養液に WST-1 色素と O₂ 産生系を直接添加し、O₂ の発色反応と SOD による除去が競合的に奪い合うことを利用し、WST-1 発色阻害率から SOD 活性を算出した。
- (3)アストロサイトが産生する神経栄養因子類は ELISA によりタンパク質を、RT-PCR により mRNA 量を評価した。
- (4)グルタミン酸 (Glu) 取込み活性は、20 μM [³H]Glu を含む HKR を 500 μl 加えて反応を開始し、一定時間後に反応液を取り除き、1 mM の非放射性 Glu を含む HKR で 3 回洗浄した後細胞内に残る放射活性を蛋白量当たりの細胞内 Glu 量を取込み活性として評価した。
- (5)細胞膜に発現する Glu 輸送体量については、細胞表面を化学的にビオチン化した後、アビジン沈降して得られる画分をゲル泳動して免疫検出することにより評価した。

4. 研究成果

- (1)アストロサイトの細胞機能を変化させる薬剤をいくつか見出すことができた。神経細胞の生存維持に重要な働きを演ずる神経栄養因子類の産生が抗真菌薬アムホテリシン B により調節されること (NT-3 は減少、GDNF と BDNF は増加) がわかった (論文)。またラット脳内に投与することによっても GDNF が増加していることを確認した (論文)。また、アストロサイトの BDNF 発現レベルが三環系抗うつ薬のイミプラミンで上昇することも見出した (論文)。
- (2)LPS により活性化したアストロサイトの NO 産生能がテオフィリンにより増強されることも見出した (論文)。
- (3)LPS の活性化刺激によりアストロサイトの EC-SOD 活性が上昇することや、ドーパミン添加により EC-SOD が誘導されることを見出した (論文)。
- (4)アストロサイトの重要な機能である Glu 取込み活性については、ギャップジャンクション (GJ) 阻害剤である carbenoxolone や octanol により、有意に増強されることを見出した。またその増強機構としては、細胞表面膜に発現する輸送体 GLAST と GLT-1 のうち、前者の量が増加する可能性を示唆するデータ

が得られた。(論文投稿準備中)

以上のような研究成果から、神経細胞の周囲を取り囲んで、脳全体のエネルギー代謝の要となっているアストロサイトの細胞機能が種々の薬剤により変化することが明確になった。神経栄養因子類が長期的なニューロンの活動性を左右することに加え、NOの産生により局所の脳血流を調節することが考えられる。またEC-SODの活性調節がニューロンの酸化ストレスを左右している可能性も高い。これらの研究成果の中でもGlu取込み活性がGJ阻害剤で増強されることは非常に興味深い。

Gluは最も広汎に存在する興奮性伝達物質であるが故にその取込みを担うアストロサイトの細胞機能調節は重要である。Glu取込み活性が増強されることは、脳全体の興奮性神経活動が抑制され、覚醒レベルの低下の原因となりうる。アストロサイトは周囲の細胞とGJにより結合しており、細胞相互の代謝物の交換や情報伝達の手段となっていると考えられている。GJ阻害剤によりアストロサイト間の相互作用の程度が抑制されることにより、脳全体の覚醒レベルが低下するとともに、それぞれの細胞がグリコーゲン(エネルギー)の消費モードから蓄積モードにスイッチされる可能性がある。実際の動物の睡眠/覚醒とアストロサイトの細胞機能との繋がりについてはこれからの課題となるが、本研究はそれらの基礎となり得る仮説を提唱するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)
〔雑誌論文〕(計8件)

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2015) Lipopolysaccharide-stimulated transglutaminase 2 expression enhances endocytosis activity in mouse microglial cell line BV-2.

Neuroimmunomodulation, 査読有 22 (4) (DOI:10.1159/000365484).

Akiko Motoyoshi-Yamashiro, Katsura Takano, Kenji Kawabe, Takeshi Izawa, Hidemitsu Nakajima, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2014) Amphotericin B induces glial cell line-derived neurotrophic factor in rat brain. The Journal of Veterinary Medical Science, 査読有 76 (10), pp. 1353-1358.

(DOI:10.1292/jvms.14-0160)

Mizue Ogawa, Katsura Takano, Kenji

Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Hideshi Ihara, Yoichi Nakamura (2014)

Theophylline potentiates lipopolysaccharide-induced NO production in cultured astrocytes. Neurochemical Research, 査読有 39 (1), pp. 107-116. (DOI: 10.1007/s11064-013-1195-9

Akiko Motoyoshi-Yamashiro, Mizuho Tamura, Mitsuaki Moriyama, Katsura Takano, Kenji Kawabe, Hidemitsu Nakajima, Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi, Yoichi Nakamura (2013) Activation of cultured astrocytes by amphotericin B: Stimulation of NO and cytokines production and changes in neurotrophic factors production. Neurochemistry International, 査読有 63, pp. 93-100 (DOI: 10.1016/j.neuint.2013.05.007)

Katsura Takano, Nobuyuki Tanaka, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura. (2013) Extracellular superoxide dismutase induced by dopamine in cultured astrocytes. Neurochemical Research, 査読有 38(1), pp. 32-41. (DOI:10.1007/s11064-012-0882-2).

Katsura Takano, Hiroshi Yamasaki, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2012) Imipramine induces brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in cultured astrocytes. Journal of Pharmacological Sciences, 査読有 120(3), pp. 176-186. (DOI: 10.1254/jphs.12039FP)

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2012) Nicotine augments the expression of transglutaminase 2 in activated microglia. Journal of Neurochemistry, 査読有 123 (Suppl.1), pp. 80.

Ichiro Iitsuka, Akiko Motoyoshi-Yamashiro, Mitsuaki Moriyama, Yukiko Kannan-Hayashi, Yuka Fujimoto, Katsura Takano, Koji Murakami, Yukio Yoneda, Yoichi Nakamura. (2012) Superoxide dismutase activity in cultured astrocytes: Decrease in cell-surface and increase in medium by lipopolysaccharide stimulation. Neurochemical Research, 査読有 37(10), pp. 2108-2116. (DOI:

[学会発表](計15件)

Katsura Takano, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2015) Increase of transglutaminase 2 expression and endocytosis activity by amphotericin B in mouse microglial cell line BV-2. 第88回日本薬理学会年会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 3月18-20日

Katsura Takano, Akiko

Motoyoshi-Yamashiro, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2014) Induction of proinflammatory cytokines and change in neurotrophic factors expression by amphotericin B in cultured microglia. 第87回日本薬理学会年会, 東北大学百周年記念会館川内萩ホール(宮城県仙台市), 3月19-21日

河辺憲司, 金本永芝, 高野桂, 森山光章, 中村洋一 (2014) ミクログリアの組織型トランスグルタミナーゼとエンドサイトーシスに対するアンホテリシンBの効果. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道大学(北海道札幌市), 9月9-12日

金本永芝, 河辺憲司, 高野桂, 森山光章, 中村洋一 (2014) 酸化ストレスによる培養アストロサイトの組織型トランスグルタミナーゼの発現・活性上昇. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道大学(北海道札幌市), 9月9-12日

呉林亮佑, 高野桂, 森山光章, 中村洋一 (2014) アストロサイトにおけるLPS誘導性NO産生に対する酢酸の抑制効果. 第157回日本獣医学会学術集会, 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道大学(北海道札幌市), 9月9-12日

高野桂, 山城(本吉)晃子, 河辺憲司, 森山光章, 中村洋一 (2014) アムホテリシンBによるラット脳でのグリア細胞由来神経栄養因子の発現上昇. 第36回日本生物学的精神医学会/第57回日本神経化学会大会合同年会, 奈良県新公会堂(奈良県奈良市), 9月29~10月1日

高野桂, 河辺憲司, 森山光章, 中村洋一 (2014) LPSによるBV-2細胞のエンドサイトーシス上昇とトランスグルタミナーゼの関与. 第126回日本薬理学会近畿部会, 和歌山県JAビル(和歌山県和歌山市), 10月24日

高野桂, 山城(本吉)晃子, 河辺憲司, 森

山光章, 中村洋一 (2014) イミプラミンによる培養アストロサイトの脳由来神経栄養因子 mRNA 発現増加. 第24回日本臨床精神神経薬理学会/第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 11月20-22日
Katsura Takano, Nobuyuki Tanaka, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2013) Effects of dopamine on superoxide dismutase in cultured astrocytes. 第86回日本薬理学会年会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 3月21-23日

高野桂, 河辺憲司 (2013) タンパク質架橋形成酵素トランスグルタミナーゼのグリア細胞機能調節因子としての可能性(若手企画シンポジウム演題) 第155回日本獣医学会学術集会, 東京大学駒場キャンパス(東京都目黒区), 3月28-30日

Katsura Takano, Nobuyuki Tanaka, Kenji Kawabe, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2013) Dopamine increased the expression of extracellular superoxide dismutase in cultured astrocytes. Neuro2013, 京都国際会議場(京都府京都市), 6月20-23日

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2013) Blockade of transglutaminase activity by cystamine suppressed lipopolysaccharide-induced endocytosis in microglia. Neuro2013, 京都国際会議場(京都府京都市), 6月20-23日

高野桂, 小川瑞恵, 河辺憲司, 森山光章, 中村洋一 (2013) テオフィリンによる培養アストロサイトのNO産生増強効果. 第124回日本薬理学会近畿部会, 京都ガーデンパレス(京都府京都市), 11月1日

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2012) Expression of transglutaminase 2 and factor XIII-A in microglial activation. 第85回日本薬理学会年会, 京都国際会館(京都府京都市), 3月14-16日

Kenji Kawabe, Katsura Takano, Mitsuaki Moriyama, Yoichi Nakamura (2012) Nicotine augments the expression of transglutaminase 2 in activated microglia. The 11th Biennial

Meeting of the Asian Pacific Society
for Neurochemistry/The 55th Annual
Meeting of the Japanese Society for
Neurochemistry , Kobe Convention
Center(兵庫県神戸市) , 9月30-10月2
日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 洋一 (NAKAMURA Yoichi)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：90180413

(2)研究分担者

森山 光章 (MORIYAMA Mitsuaki)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：20275283

高野 桂 (TAKANO Katsura)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：50453139