

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23701

研究課題名（和文）抗うつ薬によるアストロサイトのプリン放出・代謝機能変化の解析

研究課題名（英文）The changes of astrocytic purine release and metabolisms by antidepressants

研究代表者

江口 遼太 (Eguchi, Ryota)

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：10846067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗うつ薬はうつ病の治療に用いられるが、詳細な作用メカニズムは明らかではない。本研究では、抗うつ薬がアストロサイトの機能に与える影響を検討した。マウスへの抗うつ薬投与により、脳のプリン放出チャンネルや代謝酵素の遺伝子発現が変化した。一方、培養アストロサイトへの抗うつ薬処置は代謝酵素の発現や活性を変化させなかった。また、FGF2がMAPK経路の1つであるERKを介してアストロサイトのプリン代謝酵素発現を制御することを明らかにした。これらの結果から、抗うつ薬はアストロサイトの機能に直接影響を与えず、ニューロンやミクログリアなどの中枢神経系細胞を介してアストロサイト機能を制御する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになった、抗うつ薬によるプリン放出チャンネルや代謝酵素の遺伝子発現変化は、抗うつ薬がこれらの機能を変化させることで抗うつ作用を示す可能性を提示するものであり、新たな抗うつ薬の作用メカニズムの解明につながる可能性がある。また、抗うつ薬の作用メカニズムの解明が進むことにより、うつ病態の解明やうつ病の新たな治療法の確立につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：Antidepressants are used for treatment of depressive disorders, although little is known about the detail mechanisms of antidepressive effect. In this study, we investigated the effects of antidepressants on the functions of astrocytes. Administration of antidepressants on mice changed the gene expression of channels and enzymes which contribute to purine release and metabolisms in brain. On the other hands, antidepressants treatment for cultured astrocytes did not change the expression and activity of purine metabolic enzymes. In addition, it was shown that FGF2 regulates purine metabolic enzymes in astrocytes via ERK pathway. These results suggest that antidepressants may not directly affect astrocytic functions, but regulate it via cells in the central nervous system such as neurons and microglia.

研究分野：薬理学、獣医学

キーワード：アストロサイト ATP アデノシン 抗うつ薬 FGF2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病は現代社会の大きな問題となっており、獣医学領域でもペットの問題行動が疾患として認められている。これらの治療にはともに抗うつ薬が用いられるが、その作用メカニズムには不明な点が残っている。その一方で近年、抗うつ薬がグリア細胞のアストロサイトの機能を变化させることで、抗うつ作用を示すことが報告された。

(2) アストロサイトは自ら伝達物質を放出するが、その一つが ATP やアデノシンなどのプリンである。うつ病態にも ATP やアデノシンが関与することが示唆されており、アストロサイトのプリン放出・代謝機能が抗うつ薬の作用メカニズムに深く関与する可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、抗うつ薬がアストロサイトのプリン放出・代謝機能を变化させるかどうか明らかにすることを目的とした。これらの機能変化を解析することで、抗うつ薬の新たな作用メカニズムが明らかになることが期待された。

(2) 申請者らは以前、FGF2 がアストロサイトのプリン放出と代謝を促進することを解明した。抗うつ薬がアストロサイトから FGF2 を放出させることが報告されており、抗うつ薬によりアストロサイトから放出された FGF2 が、アストロサイト自身に作用し、プリン放出・代謝機能を变化させる可能性がある。そこで、抗うつ薬がアストロサイトの機能変化を引き起こす詳細なメカニズムを明らかにすることも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 生体脳組織のアストロサイトに対する抗うつ薬の効果を解析するため、三環系抗うつ薬のクロミプラミンおよび選択的セロトニン再取込阻害薬のフルオキセチンを 1~3 週間、1 日 1 回マウスに腹腔内投与した。1、2 または 3 週間後にマウスを安楽死処置し、大脳皮質および海馬を採材して組織から RNA を抽出した。プリン放出や代謝機能に關与するチャンネルや酵素の発現変化を調べるため、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現を解析した。

(2) 培養アストロサイトのプリン放出・代謝に対する抗うつ薬の効果を解析するため、新生ラットの海馬から分離培養したアストロサイトに、抗うつ薬を 24~48 時間処置した。抗うつ薬は、クロミプラミンとフルオキセチンに加え、三環系抗うつ薬のアミトリプチリンと四環系抗うつ薬のミルタザピンも用いた。プリン代謝酵素の発現はリアルタイム PCR 法で測定した。プリン放出チャンネルや代謝酵素の活性の解析は、細胞外の ATP やアデノシンなどのプリン量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定することで行った。

(3) FGF2 がアストロサイトのプリン代謝酵素の発現と活性を上昇させる、詳細な細胞内メカニズムを明らかにするため、培養アストロサイトに FGF2 とその下流経路の阻害薬を処置した。FGF2 によって活性化される MAPK 経路のうち、ERK、JNK および p38 経路の阻害薬を用いた。プリン代謝酵素の発現をウェスタンブロット法とリアルタイム PCR 法で、活性を HPLC で測定した。

### 4. 研究成果

(1) 抗うつ薬のクロミプラミンおよびフルオキセチン (10 mg/kg) を 1~3 週間、マウス (ICR、雄、9 週齢) に 1 日 1 回腹腔内投与し、プリン放出チャンネルや代謝酵素、受容体を含む 10 の遺伝子の発現量の変化を測定した。本報告では、主にプリン代謝酵素の発現変化について述べる。ATP 代謝酵素の ENTPD1 および ENTPD2、AMP 代謝酵素の CD73、アデノシン代謝酵素の ADA について発現変化を解析したところ、抗うつ薬の投与によって ENTPD1、2 および CD73 の遺伝子発現量に変化は見られなかったが、ADA の遺伝子発現に有意な変化が認められた (図 1)。フルオキセチンの 1 週間投与は、大脳皮質における ADA 遺伝子発現を有意に増加させたが、2・3 週間投与では変化が見られなかった。また、クロミプラミン投与でも同様の傾向が認められた。さらに、海馬における遺伝子発現変化も同様の傾向を示した。

プリン代謝酵素以外の発現については、ATP 放出チャンネルの Panx1 やアデノシン輸送体の ENT2 の発現に変化が認められた。以上の結果から、抗うつ薬により脳のプリン放出や代謝機能

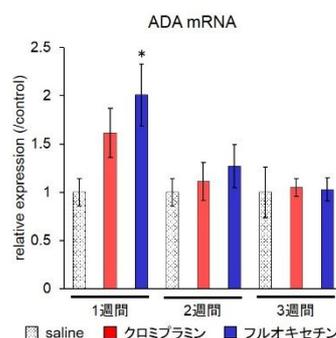


図1 大脳皮質のADA遺伝子発現に対する抗うつ薬の効果

が変化する可能性が示唆された。しかし、どの細胞種において発現が変化しているのか、機能的な変化が認められるのかは明らかではないため、今後検討する必要がある。

(2) 海馬培養アストロサイトのアミトリプチリン、クロミプラミン、フルオキセチン、ミルタザピン (15  $\mu$ M) を処置した。24 時間後にリアルタイム PCR 法で遺伝子発現の変化を調べたところ、いずれの抗うつ薬の処置もプリン代謝酵素の ENTPD1、ENTPD2、CD73 および ADA の遺伝子発現に影響を与えなかった (図 2)。さらに、48 時間後に細胞外に ATP もしくはアデノシンを加え、それらの代謝産物の量を HPLC で測定して酵素活性を調べたところ、酵素活性も変化が認められなかった (図 3)。

以上の結果から、抗うつ薬はアストロサイトのプリン代謝酵素の発現や活性を直接変化させないことが示された。抗うつ薬がニューロンやミクログリアなど中枢神経系の他の細胞に影響を与える可能性や、これらの細胞とアストロサイトの相互作用により変化が引き起こされる可能性が考えられる。そのため、ニューロンやミクログリアの培養やアストロサイトとの混合培養に抗うつ薬を処置してその効果を検討することが必要である。

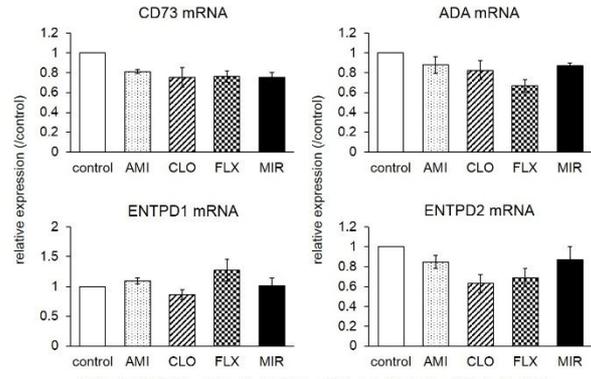


図2 海馬アストロサイトのプリン代謝酵素発現に対する抗うつ薬の効果

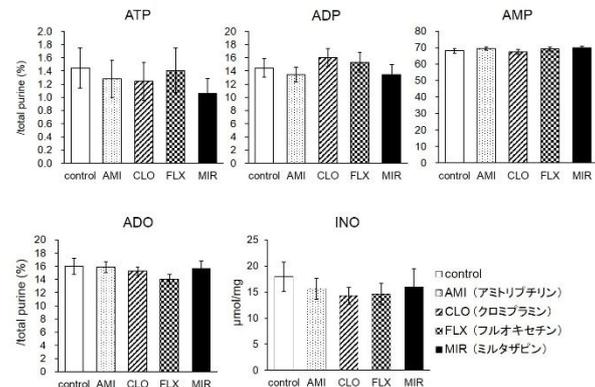


図3 海馬アストロサイトのプリン代謝酵素活性に対する抗うつ薬の効果

(3) アストロサイトにおけるプリン代謝酵素の発現および活性の制御機構の詳細を明らかにするため、FGF2 による変化の細胞内メカニズムを検討した。

FGF2 (1-20 ng/ml, 3-48 h) は濃度依存性・時間依存性にアストロサイトの CD73 および ADA の遺伝子発現、タンパク発現と活性を上昇させた。この上昇は、FGF 受容体の阻害薬である SU5402 により抑制された (図 4)。

FGF 受容体はチロシンキナーゼ型受容体であり、その下流では MAPK 経路を含めたいくつかの因子がリン酸化される。FGF2 (20 ng/ml, 30 min) は MAPK の ERK および JNK をリン酸化した。ERK 阻害薬の U0126 は、FGF2 による CD73 および ADA の発現と活性の上昇を有意に抑制した (図 5)。一方、JNK 阻害薬の SP600125 は抑制傾向を示したが、有意な抑制は認められなかった。

以上の結果から、FGF2 はアストロサイトの FGF 受容体を介して ERK をリン酸化し、CD73 および ADA の転写を促進することで酵素の発現と活性を上昇させることが明らかになった。このようなメカニズムが、体内のアストロサイトでもプリン代謝酵素の発現や活性を制御し、生理機能や病態に関与する可能性がある。この研究成果は、論文として発表済みである (Eguchi et al., Purinergic Signalling, 16, 519-527, 2020)。

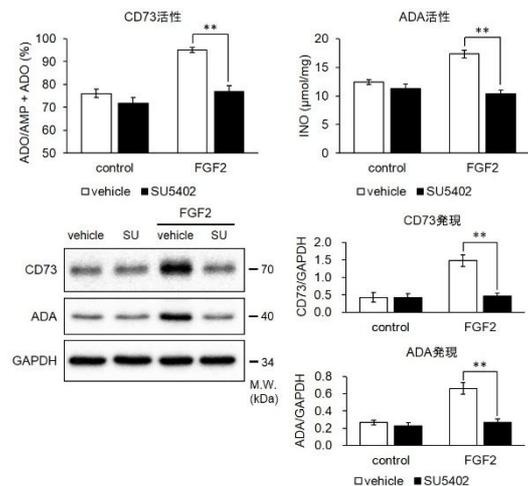


図4 FGF2によるプリン代謝酵素増強に対するFGF受容体阻害薬の効果

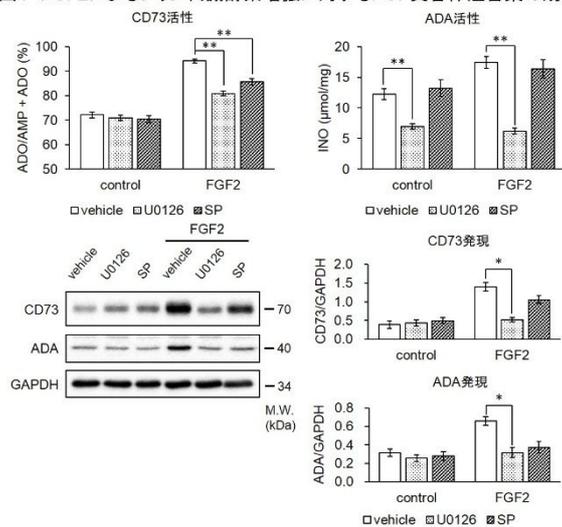


図5 FGF2によるプリン代謝酵素増強に対するMAPK阻害薬の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eguchi Ryota, Kitano Taisuke, Otsuguro Ken-ichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Fibroblast growth factor 2 upregulates ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase via MAPK pathways in cultured rat spinal cord astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Purinergic Signalling	6. 最初と最後の頁 519 ~ 527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11302-020-09731-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江口 遼太、乙黒 兼一
2. 発表標題 線維芽細胞成長因子2によるMAPK経路を介した脊髄アストロサイトのプリン代謝酵素発現調節
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江口 遼太、乙黒 兼一
2. 発表標題 MAPK経路を介したFGF2によるアストロサイトのプリン代謝酵素制御機構
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------