

氏名	丸山 惣一郎
(ふりがな)	(まるやま そういちろう)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙 第 1203 号
学位審査年月日	令和 2 年 7 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題名	ATP and repetitive electric stimulation increases leukemia inhibitory factor expression in astrocytes: A potential role for astrocytes in the action mechanism of electroconvulsive therapy (星状細胞に対する ATP および複数回の電気刺激は白血病抑制因子の発現を増加させる—電気けいれん療法の作用機序における星状細胞の潜在的な役割—)
論文審査委員	(主) 教授 鰐淵 昌彦 教授 小野 富三人 教授 近藤 洋一

学位論文内容の要旨

《目的》

精神疾患の主な治療法は薬物療法であるが、薬物治療の効果は未だ不十分であり、そのような場合には電気けいれん療法 (ECT) が施行される。ECT の有効性は高いが、作用機序は未だ不明である。我々は ECT が有効であった患者の末梢血を用いて包括的な遺伝子発現分析を行い、transcription factor 7 (TCF7) の mRNA 発現が増加したことを既に示した。TCF7 は、精神疾患への病態や治療薬の作用機序への関与が近年注目されている海馬神経発生を調節している Wnt pathway の重要な構成因子である。海馬神経新生を増加させる因子である leukemia inhibitory factor (LIF) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) は主にアストロサイトによって分泌される。我々は、ECT がアストロサイトを活性化して

LIF や FGF2 を増加させることがその作用機序の一部ではないかと考えた。本研究では、電気刺激 (ES) により興奮性ニューロンから放出される ATP と、アストロサイトにおける LIF と FGF の発現について検討を行った。

《方 法》

新生 C57BL/6J マウスの前脳組織から抽出し培養したアストロサイトを用いて実験を行った。ATP の投与濃度と ES の条件は、カルシウムイメージングを用いてアストロサイト活性化を指標として決定した。ATP は 1 mM で投与し、ES は 3 V の定電圧で 33 ms の刺激と 67 ms のインターバルのものを 60 サイクルで 1 回とし、1、3、10 回の刺激を行った。その後、アストロサイトから抽出した RNA を用いて定量 PCR を行ない、LIF mRNA と FGF2 mRNA の発現を測定した。培地中の LIF 蛋白質濃度は ELISA で測定した。また、ATP による LIF 発現増加のメカニズムとして、ATP 受容体の一つである P2X 受容体ファミリーの関与を考えた。P2X 受容体サブタイプ 1 から 7 の中で、P2X1、5、6 はアストロサイトでの発現がないか機能が乏しいため、P2X2、3、4、7 について siRNA を用いて発現抑制の有無を検討した。

《結 果》

ATP 投与により LIF mRNA は 2 時間で著しく増加したが、FGF2 mRNA の発現は変化しなかった。ATP による LIF mRNA 発現増加は ELISA により蛋白レベルでも確認された。また、単回の ES では LIF mRNA の発現に変化はなかったが、3 回ないし 10 回の反復刺激を加えることで増加した。

siRNA による検討の結果、P2X2 の発現抑制は ATP による LIF 遺伝子の発現増加を抑制し、一方、P2X3、4 の発現抑制はこれを増加させることが明らかとなった。

《考 察》

今回我々は、ニューロン・グリア相互作用の重要な媒介因子であり興奮したニューロンから放出されてアストロサイトを活性化させる ATP が、短時間で著しく LIF 発現を増加させ、そこに P2X2 受容体が関与していることを見出した。また、ES の反復施行は直接アストロサイトに作用して LIF 発現を増加させることを見出した。

siRNAによるP2X受容体の発現抑制実験の結果から、P2X2がATPによるLIF発現増加に関与し、P2X3、4はATPによるLIF発現増加を抑制すると考えられた。過去の研究ではATPの抗うつ効果はP2X2を介していることが示されており、本研究は過去の研究結果を強化するものと考えられる。また、ATPによるLIF発現増加は2時間でピークに達し、以後は減少していった。この減少効果にはP2X3、4が関与し、LIFの過剰発現を抑制している可能性が考えられた。P2X2受容体を介したATPによるLIFの増加作用について、ECTの臨床活用を模倣したin vivoモデルで検討し、更に詳細な分子メカニズムを解析することにより、作用発現の速い新規治療薬の開発につながることが期待される。

複数回のESによるLIF発現増加には、効果発現に時間を要することやESによるカルシウムイメージングの波形から、アストロサイトで主に発現している電位依存性遅延整流性カリウムチャネルの関与が推定された。ECTでは複数回施行により治療効果が発現するケースが多いため、ESの反復施行によりLIF発現が増加することは、ECTの臨床効果発現に即していると考えられた。従って、複数回のESによるLIF発現増加における電位依存性遅延整流性カリウムチャネルの役割を更に検討することで、ECTの作用機序への理解が深まることが期待される。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

精神疾患の治療法として薬物療法が進歩を遂げているが、薬物治療の効果は未だ不十分である。薬物療法で寛解に至らない難治症例に対して、精神科領域では電気けいれん療法が施行されており、その有効性は高い。しかし、電気けいれん療法の作用機序は不明であり、未だ解明には至っていない。本研究はマウスの脳細胞を用いて電気けいれん療法の作用機序解明を試みたものであり、方法として ATP の投与、カルシウムイメージング、定量 PCR を用いて検討している。特にアストロサイトに直接的電気刺激を行った研究は少なく、先進的である。加えて、ATP によるアストロサイトへの作用について、アストロサイトの受容体特性にも言及し、遺伝子的な knockdown を行うことで発現抑制実験を行っている。薬剤開発という観点で鑑みると、受容体特性は効果発現や有害な副作用防止に極めて重要である。上記の電気刺激に関する検証、ATP を投与した際のアストロサイトの受容体特性から、電気けいれん療法の有効性を模倣する、従来の治療薬よりも有効性の高い新規治療薬の開発につながると期待される。新規治療薬の開発は、長年消長を繰り返し社会生活を満足に送れなかった精神疾患に悩む患者さんに対する治療の一助となるであろう。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Psychiatry and Clinical Neurosciences 74(5): 311-317, 2020 May

doi: 10.1111/pcn.12986