

論文内容要旨

アストロサイトにおける抗うつ薬による
塩基性線維芽細胞増殖因子産生機構に関する薬理学的研究

主指導教員：仲田義啓教授

(応用生命科学部門 薬効解析科学)

副指導教員：山脇成人教授

(応用生命科学部門 精神神経医科学)

副指導教員：森岡徳光准教授

(応用生命科学部門 薬効解析科学)

梶谷 直人

(医歯薬保健学研究科博士課程後期薬科学専攻)

アストロサイトにおける抗うつ薬による 塩基性線維芽細胞増殖因子産生機構に関する薬理学的研究

平成 24 年度入学 梶谷 直人
主指導教員 仲田 義啓

【序論】

近年の臨床および基礎研究の知見から、抗うつ薬の新たな作用機序として複数の神経栄養因子・成長因子の増加を介した脳神経系の可塑的な変化が注目されている。塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor 2: FGF2) は中枢神経系において神経の新生・維持に重要な役割を果たしている。近年、うつ病患者の死後脳において FGF2 の発現低下が報告され、一方で、ラットに抗うつ薬を慢性投与することで、脳内における FGF2 の発現増加が報告されている。さらに、FGF2 をラットの脳室内に投与することで抗うつ効果がみられるとの報告もある。これらの知見から、FGF2 は抗うつ薬の効果発現に関与する因子の一つと考えられている。しかしながら、抗うつ薬がどのようにして脳内で FGF2 の発現を増加させるのかはよく分かっていない。

脳内において FGF2 は、神経やアストロサイトで主に産生されている。これまでに初代培養アストロサイト並びに神経細胞を用いた検討より、三環系抗うつ薬 amitriptyline は、アストロサイトに直接作用して FGF2 の産生・遊離を増加させることを明らかにしている。アストロサイトにおいて amitriptyline による FGF2 産生は、従来抗うつ薬の薬理作用として知られているモノアミンの再取り込み阻害作用とは異なる作用を介することを示唆しているが、詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、アストロサイトにおける amitriptyline による FGF2 の発現誘導に関わるシグナルメカニズムの解明を行った。

【実験方法】

初代培養アストロサイトは、ラット大脳皮質を摘出し、酵素処理分散法により混合グリア細胞を調製したのち、約 3 週間培養する間に振とうすることによりアストロサイト以外の細胞を取り除き調製した。FGF2 等の各種 mRNA 発現量および、タンパク質発現量は real time PCR 法、western blotting 法により解析した。

【結果及び考察】

1. Amitriptyline 誘導性 FGF2 mRNA 発現にタンパク質合成阻害剤が及ぼす影響

ラット大脳皮質培養アストロサイトにおいて、amitriptyline による FGF2 mRNA の発現は薬物処置後 24 時間で有意に増加する。そこで、amitriptyline の作用に何らかのタンパク質合成が関与する可能性を考え、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide の影響について検討した。Amitriptyline 誘導性 FGF2 mRNA の発現は cycloheximide の併用により有意に抑制された。従って、amitriptyline は何らかのタンパク質合成を介して FGF2 mRNA の発現を増加させる可能性が示唆された。

2. Amitriptyline 誘導性 FGF2 mRNA 発現増加に関与する転写因子の検討

次に、amitriptyline による FGF2 mRNA の発現誘導に関わるタンパク質の候補として、FGF2 の発現を制御する転写因子 EGR1、hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α)、myeloid zinc finger 1 (MZF1) に着目した。まず始めに、amitriptyline 処置によるこれらの転写因子の発現変化を検討した。その結果、amitriptyline は EGR1 mRNA の発現のみ有意に増加させた。EGR1 タンパク質発現も、

amitriptyline 処置後 2 時間で有意に増加した。そこで、アストロサイトに EGR1 特異的な siRNA を導入し、EGR1 をノックダウンしたところ、amitriptyline による FGF2 mRNA の増加が抑制された。従って、amitriptyline は EGR1 の産生を介して FGF2 mRNA の発現を増加させる可能性が示唆された。

3. Amitriptyline 誘導性 FGF2 mRNA 発現増加における細胞内情報伝達系の関与

Amitriptyline 誘導性 FGF2 mRNA 発現増加に関して、MAP キナーゼの関与について選択的な阻害剤を用いて検討を行った。FGF2 mRNA の発現増加作用は、MEK/ERK 阻害剤である U0126 を併用することによって抑制された。一方で、p38 並びに JNK 阻害剤では抑制されなかった。同様に、amitriptyline 誘導性 EGR1 mRNA 発現増加に関しても U0126 の併用においてのみ抑制されることを確認した。

これまで amitriptyline はアストロサイトにおいて matrix metalloproteinase (MMP) 依存的な受容体型チロシンキナーゼの活性化を介して細胞内情報伝達系を駆動させる機構が報告されている⁵⁾。そこで、amitriptyline による FGF2 mRNA の発現増加にこれらのメカニズムが関与しているか薬理的検討を行った。MMP 阻害剤である GM6001 並びに prinomastat を併用した結果、amitriptyline 誘導性 FGF2 mRNA の発現増加が有意に抑制された。

さらに、受容体型チロシンキナーゼの関与を検討したところ、amitriptyline 誘導性 FGF2 mRNA 発現増加作用は FGFR 選択的阻害剤 SU5402 もしくは epidermal growth factor receptor (EGFR) 選択的阻害剤 AG1478 の併用で有意に抑制されたが、platelet derived growth factor receptor 選択的阻害剤 AG1296 の併用では抑制されなかった。

Amitriptyline による ERK リン酸化並びに EGR1 mRNA 発現増加作用も同様に MMP 阻害剤、FGFR 阻害剤、EGFR 阻害剤の併用で抑制された。

従って、amitriptyline は MMP, FGFR/EGFR, ERK を介して EGR1 産生につながるシグナルを駆動させ、FGF2 mRNA 発現を増加させる可能性が示唆された。

【結論】

アストロサイトにおける amitriptyline による FGF2 mRNA の発現増加作用には、EGR1 の産生が関与することが示唆された。さらに amitriptyline による FGF2 および EGR1 の産生に関与するシグナル経路として、MMP や FGFR/EGFR を介する ERK の活性化が重要な役割を果たす可能性が示唆された。これらの結果から、amitriptyline にはアストロサイトを標的とした従来の薬理作用とは異なる新たな作用機序を有する可能性が示唆された。