

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

所属機関名	大分大学医学部附属病院薬剤部
職名・氏名	田中 雅彬 (印)

1 研究テーマ

Adenosine A_{2B} 受容体 (*Adora2b*) を介したアストロサイトのミトコンドリア機能制御機構の解明

2 研究の目的

アストロサイトは脳内のエネルギー代謝および神経保護機構において重要な役割を担っている。近年、アデノシン受容体シグナルがアストロサイト機能を制御する可能性が示唆されているが、ミトコンドリア機能との関連については十分に解明されていない。本研究では、Adenosine A_{2B} 受容体 (*Adora2b*) に着目し、アストロサイトにおけるミトコンドリア機能および関連遺伝子発現への影響を明らかにすることを目的とした。特に、グルタミン酸シグナル (mGluR5) および神経栄養因子 (BDNF) との関連を含めた統合的理解を目指した。

3 研究の方法

初代培養アストロサイトを用い、*Adora2b* siRNA または Negative control siRNA (Control 群) を導入し、導入3日目に解析を実施した。遺伝子発現解析は RT-qPCR により実施し、*Adora2b*、*Grm5*、*Ppargc1a*、*Tfam*、*Nrf1*、*Nfe2l2*、*Bdnf* の発現を評価した。発現量は内因性コントロール (*Hprt*) で正規化し、相対発現量として算出した。統計解析には Welch's t-test を用いた。ミトコンドリアの細胞内分布の評価には MitoTracker Deep Red FM を用い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM900) により撮像した。さらに、ミトコンドリア関連遺伝子間の関連性を評価するため、スピアマンの順位相関係数を用いた相関解析を実施した。

4 研究の成果

(1) アストロサイト培養系の純度評価
免疫蛍光染色により細胞種構成を評価した結果、GFAP 陽性細胞は全 DAPI 陽性細胞の 100% を占めており、Iba1、MAP2、NG2 陽性細胞はいずれも検出されなかった (Fig.1)。以上より、本培養系はアストロサイトのみから構成される

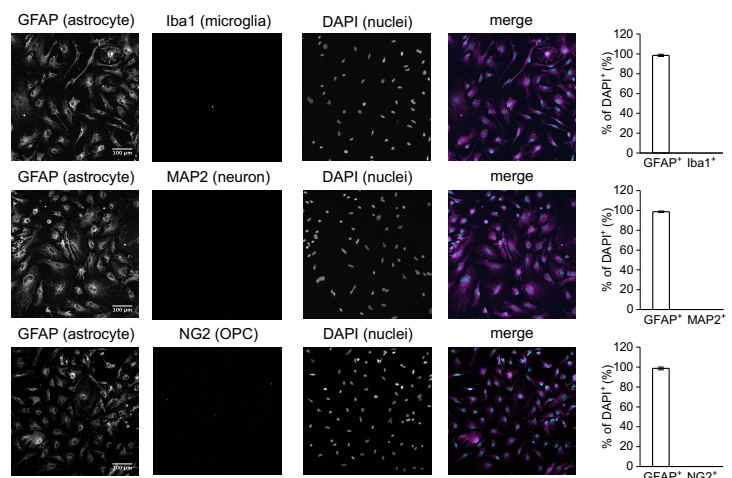


Fig.1: GFAP、Iba1、MAP2、NG2 免疫染色により細胞種構成を評価し、DAPI 陽性細胞に対する割合を算出した。

高純度な培養系であることが確認された。

(2) *Adora2b* ノックダウンの確認

Adora2b 発現は Control 群と比較して *Adora2b* siRNA 群で有意に低下した (0.59 ± 0.14 倍, $p = 0.0388$) (Fig.2)。本結果は独立した 2 回の実験で再現された。

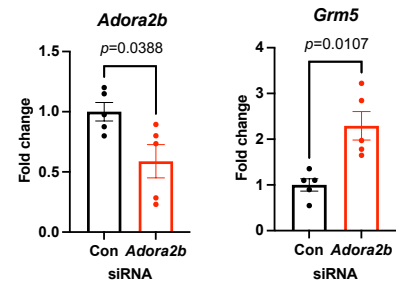


Fig.2: RT-qPCR により

Adora2b 発現を評価し

た (*Hprt* で正規化)。

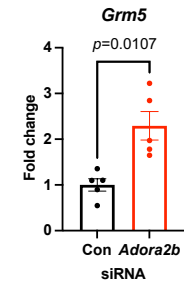


Fig.3: RT-qPCR により

Grm5 発現を評価した

た (*Hprt* で正規化)。

(3) *Grm5* の変化

Grm5 発現は 2.29 ± 0.31 倍に有意に増加した ($p = 0.0107$) (Fig.3)。本結果は独立した 2 回の実験で再現された。

(4) ミトコンドリア関連遺伝子の変化

Ppargc1a および *Tfam* の発現は *Adora2b* siRNA 群で有意に増加した。一方、*Nrf1* および *Nfe2l2* では有意な変化は認められなかった (Fig.4)。本結果は独立した 2 回の実験で再現された。これらの結果より、*Adora2b* はミトコンドリア生合成関連遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆された。

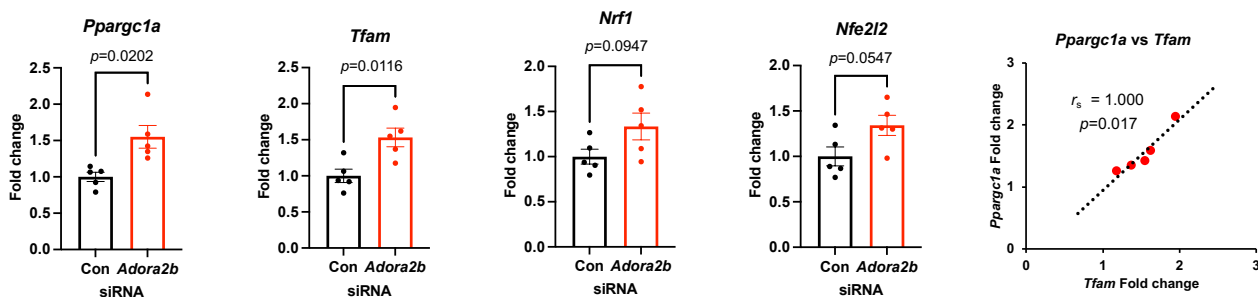


Fig.4: RT-qPCR によりミトコンドリア関連遺伝子を解析した (*Hprt* で正規化)。

Fig.5: *Adora2b* siRNA 群におけるミトコンドリア関連遺伝子間の相関。

(5) 遺伝子間相関解析

Adora2b siRNA 処置群において、*Ppargc1a* と *Tfam* の発現の間に強い正の相関が認められた ($r_s = 1.000$, $p = 0.017$, $n = 5$) (Fig.5)。本結果は独立した 2 回の実験で再現された。本結果は、ミトコンドリア生合成関連遺伝子が協調的に制御されている可能性を示唆するが、例数が限られているため、今後さらなる検証が必要である。

(6) ミトコンドリアの局在変化

MitoTracker 染色によりミトコンドリアを可視化した結果、*Adora2b* siRNA 群においてミトコンドリアシグナルの細胞内分布に明瞭な変化が認められ、対照群と比較して分布様式の差異が観察された。この結果から、*Adora2b* の抑制がミトコンドリアの細胞内動態および配置制御に関

与する可能性が示唆された。現在、これらの変化について定量解析を進めている (Fig.6)。

(7) *Bdnf* の変化

Bdnf 発現は *Adora2b* siRNA 群で有意に増加した (1.39 ± 0.08 倍, $p = 0.0226$)

(Fig.7)。本結果は独立した 2 回の実験で再現された。

【研究の総括】

本研究により、*Adora2b* がアストロサイトにおいてミトコンドリア関連遺伝子の発現および神経関連遺伝子の制御に関与することが明らかとなった。

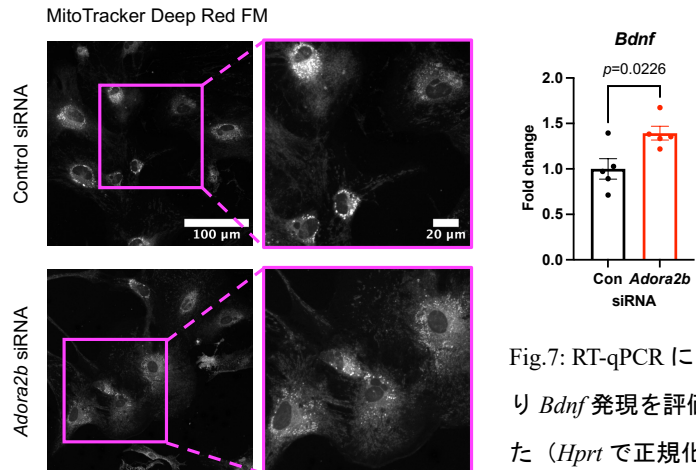


Fig.7: RT-qPCR により *Bdnf* 発現を評価した (*Hprt* で正規化)。

Fig.6: MitoTracker によりミトコンドリアを可視化。代表画像を示す。

Adora2b の抑制は、

- ・グルタミン酸受容体関連遺伝子 (*Grm5*) の発現増加
- ・ミトコンドリア生合成関連遺伝子 (*Ppargc1a*, *Tfam*) の協調的な発現上昇
- ・ミトコンドリア局在の変化

を誘導し、最終的に神経栄養因子 (*Bdnf*) の発現増加につながる可能性が示された (Fig.8)。

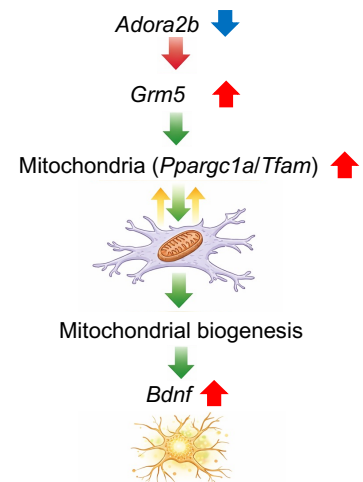


Fig.8: *Adora2b* ノックダウンによるアストロサイト機能変化の模式図。*Adora2b* 抑制はグルタミン酸シグナル、ミトコンドリア生合成および神経栄養因子発現を連動して変化させる可能性を示す。

これらの結果は、アストロサイトにおける代謝制御と神経機能を結びつける新たな分子基盤を示すものである。

5 今後の展望

今後は、MitoTracker シグナルの定量解析を実施し、ミトコンドリア機能変化を定量的に評価する。さらに、ATP 産生能や代謝機能の解析を通じて、ミトコンドリア機能変化の生理的意義を明らかにする予定である。

また、*Grm5* および *Bdnf* との関連を詳細に検討し、アストロサイトを介した神経保護機構の解明を進める。将来的には、小児神経疾患や神経変性疾患に対する新規治療標的としての応用を目指す。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

本研究成果は、国内外の学会 (日本薬理学会、日本神経化学会等) で発表するとともに、国際学術誌への投稿を予定している。さらに、関連研究と統合し、より発展的な研究として科研費等の外部資金への申請を行う。

7 謝辞

本研究を遂行するにあたり、大分大学医学部附属病院薬剤部の伊東弘樹教授、田中遼大准教授、吉川直樹准教授、龍田涼佑副薬剤部長、審査に携わってくださった先生方、県民生活部私学・科学振興課のご担当者様を含めた関係者の皆様に深く御礼申し上げます。