

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07373

研究課題名(和文) 生体内カルシウムイメージングによる片頭痛発症機序の解明

研究課題名(英文) Astrocytes in Atp1a2-deficient heterozygous mice exhibit hyperactivity after induction of cortical spreading depression

研究代表者

杉本 大樹 (SUGIMOTO, Hiroki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70515866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Naポンプ 2サブユニット欠損マウス(Atp1a2+/-)は、大脳皮質拡張性抑制(CSD)の異常を示す。成体マウスでは、同サブユニットはアストロサイトに局在しており、Atp1a2+/-のCSDの異常は、アストロサイトの活動異常によって生じる可能性が考えられる。そこで、本研究では、Ca²⁺イメージングによって細胞内Ca²⁺濃度変化を観察し、Atp1a2+/-と野生型マウスの大脳皮質アストロサイトの活動を比較した。CSD誘起後、Atp1a2+/-はCa²⁺波の伝播速度の上昇とCa²⁺濃度上昇を示すアストロサイト数が増加を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Naポンプ 2サブユニットの変異は、家族性片麻痺性片頭痛 2型(FHM2)の原因であり、同遺伝子欠損マウスで明らかにした大脳皮質アストロサイトの活動異常は、FHM2の病態解明に大いに役立つと考えられる。さらにアストロサイトの活動異常は、2型以外のFHMでも見られており、FHMの共通基盤としてアストロサイトの活動異常が存在することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The ATP1A2 coding $\alpha 2$ subunit of Na,K-ATPase, which is predominantly located in astrocytes, is a causative gene of familial hemiplegic migraine type 2 (FHM2). FHM2 model mice (Atp1a2tmCKwk/+) are susceptible to cortical spreading depression (CSD), which is profoundly related to migraine aura and headache. However, astrocytic properties during CSD have not been examined in FHM2 model mice. Using Atp1a2tmCKwk/+ crossed with transgenic mice expressing G-CaMP7 in cortical neurons and astrocytes (Atp1a2+/-), we analyzed the changes in Ca²⁺ concentrations during CSD. The propagation speed of Ca²⁺ waves and the percentages of astrocytes with elevated Ca²⁺ concentrations in Atp1a2+/- were higher than those in wild-type mice. Increased percentages of astrocytes with elevated Ca²⁺ concentrations in Atp1a2+/- may contribute to FHM2 pathophysiology.

研究分野：遺伝学

キーワード：片頭痛 マウス カルシウムイメージング G-CaMP7 家族性片麻痺性片頭痛 2型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

片頭痛は、日本で人口の約8.4%が罹患する慢性疾患(Sakai et al 1997)である。本疾患により、患者自身の生活の質(QOL)が低下するのみならず、仕事の効率や生産性への影響が生じる。その経済的損失は、年間3000億円にも及ぶと試算される。しかしながら、片頭痛の発生メカニズムは未解明な点が多く、根本的な治療法も存在しない。片頭痛の前兆(閃輝暗点、言語障害など)は、大脳皮質拡延性抑制(Cortical spreading depression, CSD)と呼ばれる、一過性の興奮とそれに続く抑制が大脳皮質を伝播していく現象によって生じる。CSDを実験的に誘起すると、痛みの原因と考えられる三叉神経系の活性化を生じるので、CSDは前兆と痛みの原因であると言える。従って、CSDの発生を抑制できれば、前兆と痛みを抑えることができ、片頭痛の有力な根本治療法となる。

家族性片麻痺性片頭痛(Familial Hemiplegic Migraine)には、3つの型(FHM1、FHM2、FHM3)が知られ、各々Caチャンネル 1サブユニット(*CACNA1*)、Naポンプ 2サブユニット(*ATP1A2*)、Naチャンネル サブユニット遺伝子(*SCN1A*)の変異が原因である。これらの変異により引き起こされる神経細胞の興奮性亢進が、家族性片麻痺性片頭痛の共通の発症基盤であると考えられている。申請者の所属研究室では、FHM2の原因遺伝子であるNaポンプ 2サブユニット遺伝子に注目し、研究を進めてきた。*Atp1a2*欠損マウスでは、グルタミン酸の神経終末への再吸収の低下、 K^+ - Cl^- 共輸送体の機能低下による細胞内 Cl^- 濃度の上昇、脳幹呼吸中枢での抑制性神経活動から興奮性神経活動への変換が観察された(Ikeda et al 2003、Ikeda et al 2004)。加えて、*Atp1a2*欠損マウスは、野生型マウスと比べ、CSDの誘起閾値低下やCSDの伝播速度上昇、CSDによる神経活動抑制からの回復遅延を生じた(Unekawa et al 2017)。FHM2の原因遺伝子がコードするNaポンプ 2サブユニットは、マウス脳内ではアストロサイトに局在する。Naポンプ 2サブユニットの機能欠損や機能低下は、シナプス間隙の K^+ とグルタミン酸濃度の上昇(Ikeda et al 2003)に加えて、アストロサイトの Ca^{2+} 濃度を上昇させる(Golovina et al 2003)。これらの事実から、*Atp1a2*変異マウスでは、アストロサイトの Ca^{2+} 動態の異常が起き、CSDが発生する可能性が高いと考えられる。しかし、FHM2病態モデルマウスにおいて、アストロサイトの Ca^{2+} 動態の異常や、そのCSDの発生への関与は、全く調べられていなかった。

2. 研究の目的

そこで、CSDが観察される大脳皮質に注目し、生体内 Ca^{2+} イメージングによって、*Atp1a2*欠損マウスの示す定常時及びCSD誘起時の、アストロサイトと神経細胞の Ca^{2+} 動態を、野生型マウスと比較し、その異常を明らかにすることを目的とする。

さらに、FHM2患者では多くの原因突然変異が報告されており、変異ごとに患者の病態が異なる(R202Q 運動失調、E700K頭痛のみ、M731T 構音障害など)。これらは、遺伝子変異によりポンプ機能が低下するだけでなく、各変異特異的なドミナントネガティブな効果が、症状の違いを生み出した結果と考えられる。そこで、FHM2の原因点突然変異を導入した遺伝子改変マウスを使用することで、ヒトの様々な片頭痛病態を反映した異常を見出す。

3. 研究の方法

ナトリウムポンプ 2サブユニット欠損マウス(片頭痛モデルマウス、*Atp1a2*^{tmCKvkl/+})とG-CaMP7マウス(G7NG817)を掛け合わせ、ニューロンとアストロサイトでG-CaMP7を発現するナトリウムポンプ 2サブユニット欠損マウス(*Atp1a2*^{tmCKvkl/+}; G7NG817^{+/+}、*Atp1a2*^{+/-})を作成した。そのマウスを用い2光子顕微鏡下で大脳皮質の生体内カルシウムイメージングを行い、細胞活動を調

べた。定常時のCa²⁺動態のイメージング。定常時のニューロンの自発的活動(一定以上の蛍光強度を示した細胞数、頻度、時間など)を野生型マウス (*Atp1a2*^{+/+}; G7NG817^{+/+}) と比較観察した。CSD誘起時のCa²⁺動態のイメージング。CSD誘起時(麻醉下、KCl滴下)のニューロンとアストロサイトの活動を比較観察した。アストロサイトは標識色素 (Sulphorodamine 101)を用いて特定し、ニューロンとアストロサイトを別々に評価した。各観察視野内に任意の注目画像領域 (ROI) を設定し蛍光強度のデータを取得した。取得したデータに対して、任意の閾値(活動、非活動を定める)を検討・設定し、大脳活動を定量的に解析した。FHM2患者がもつ変異 (R202Q、E700K、M731T) を導入したトランスジェニックマウスを作成し、片頭痛と併発することが多い痙攣の発生閾値(熱性痙攣)や明暗箱テストで光過敏の傾向を調べ片頭痛病態モデルとして評価をした。

4. 研究成果

定常時の大脳皮質のCa²⁺動態の変化は、両遺伝子型マウスで、有意な差は無かった。次にCSD中のアストロサイトプロパティの変化が、神経活動に影響するのかを調査するためにCa²⁺動態を調べた(図1)。CSD誘導後、Ca²⁺波の生じる回数は両遺伝子型間で、有意な差は無かった。しかし、伝播速度は、*Atp1a2*欠損マウスで有意に速かった。さらにCa²⁺濃度の上昇(蛍光強度が一定の閾値以上を示す割合)を示したアストロサイト数は、*Atp1a2*欠損マウスで有意に多かった。ニューロンでは、有意な差は観察されなかった(図2)。これらの結果は、*Atp1a2*欠損マウスのアストロサイトの活動亢進を示す。さらにアストロサイト-ニューロンの相互作用を見るためにROI間の相関・相互相関を調べた。細胞間Ca²⁺濃度変化パターンは全ての細胞間(ニューロン・ニューロン間、ニューロン・アストロサイト間、アストロサイト・アストロサイト間)で、有意な差は観察されなかった。アストロサイト細胞内Ca²⁺濃度変化パターンは、*Atp1a2*欠損マウスにおいて、細胞内領域間で有意に同調性が低かった。これらの結果は、アストロサイトの活動増加が、ニューロンではなく

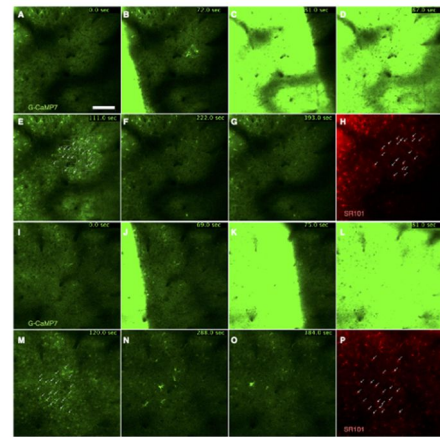


図1 代表的なCSD誘導後のイメージ。CSD誘導後の野生型マウス (A-G) と*Atp1a2*^{-/-}マウス (I-O) のG-CaMP7の蛍光強度。秒はイメージングのスタート時間。Bar=100μm。矢印は、ROIとして設定した神経細胞。H, Pはsulforhodamine 101で標識されたアストロサイト。矢印は、ROIとして設定したアストロサイト。(Sugimoto et al 2020より)

血管系調節作用による可能性を示唆する。一般にアストロサイトのCa²⁺濃度の上昇は、グリオトランスミッターの放出を介し、血管拡張を導くとされている。FHM2患者でしばしば見られる血管拡張を長時間の前兆との関連が報告されており、今回発見したアストロサイトのCa²⁺濃度の上昇は、血管拡張を介し、前兆に影響するかもしれない。またアストロサイトのCa²⁺濃度の上昇は、FHM1モデルマウスでも観察されている。FHM3モデルマウスもグルタミン酸の放出が増加を介してアストロサイトのCa²⁺濃度が上昇すると考えられている。したがって家族性片麻痺性片頭痛の共通基盤としてアストロサイトのCa²⁺濃度上昇が存在することを示唆する。家族性片麻痺性片頭痛の病態解明に大いに役立つと考えられる。

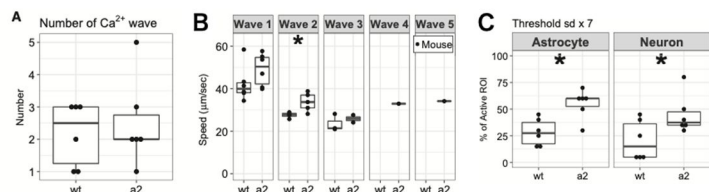


図2 CSD波の回数 (A)。CSD波の伝播速度 (B)。活動した神経細胞とアストロサイトの割合 (C-E)。野生型マウス (wt)、*Atp1a2*^{-/-}マウス (a2)。(Sugimoto et al 2020を改変)

また、E700K変異マウスは、けいれん(片頭痛と併発することが多い症状)誘起閾値低下、R202Q変異マウスは光過敏(ヒトの片頭痛時に見られる症状)を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hiroki Sugimoto, Masaaki Sato, Junichi Nakai and Kiyoshi Kawakami	4. 巻 10
2. 論文標題 Astrocytes in Atp1a2-deficient heterozygous mice exhibit hyperactivity after induction of cortical spreading depression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1031-1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Sugimoto & Kiyoshi Kawakami	4. 巻 143
2. 論文標題 Low-cost Protocol of Footprint Analysis and Hanging Box Test for Mice Applied the Chronic Restraint Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59027	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本大樹、佐藤正晃、中井淳一、川上潔
2. 発表標題 Naポンプ 2サブユニット欠損マウスにおけるアストロサイトの活動変化
3. 学会等名 日本生理学会・生理学東京談話会
4. 発表年 2018年～2019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
---------	---------