

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15524

研究課題名(和文)脳虚血耐性をグリア細胞で理解・制御する

研究課題名(英文)Mechanisms underlying glia-mediated ischemic tolerance

研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI, Schuichi)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10280752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲的な軽い脳卒中(PC)を経験すると、その後の侵襲的な脳卒中に対する強い抵抗性が獲得され、これは虚血耐性と呼ばれる。虚血耐性の獲得にアストロサイトが必須であること及びその分子メカニズムを解明した。アストロサイトのP2X7が発現が必要条件であったが、今回、P2X7下流シグナルとしてHIF1aを見出した。通常、HIF1aは、低酸素/PHD2依存的に、神経細胞等で増加する。しかし、アストロサイトには、PHD2発現、低酸素によるHIF1a増加、がともに認められなかった。アストロサイトはPC後に、低酸素非依存的、P2X7依存的にHIF1aを増加させ、虚血耐性を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：A mild ischemic episode (preconditioning; PC) induces resistance to a subsequent severe ischemic injury in the brain. This phenomenon, known as ischemic tolerance, is an endogenous process that provides robust neuroprotection. So far there have already been a lot of research on ischemic tolerance, but almost all studies were performed from the point of view of neurons. We found that astrocytes are essential for the induction of ischemic tolerance, for which upregulation of P2X7 receptors is required. Here, as a downstream signal, we found that induction of HIF1a is essential. HIF1a is a well-known molecule that controls oxygen homeostasis, and increases in response to hypoxia/PHD2 in neurons. Here, we found that unlike neurons, astrocytes increased HIF1a in a hypoxia-independent manner but upregulated it in a P2X7 receptor-dependent fashion. Such astrocytic HIF1a is long-lasting, and allows astrocytes to produce ischemic tolerance.

研究分野：神経化学、神経薬理学

キーワード：アストロサイト 脳卒中 虚血耐性 P2X7受容体 HIF1a

### 1. 研究開始当初の背景

非侵襲的な軽い脳卒中 (プレコンディショニング、PC) を経験すると、その後の侵襲的な脳卒中に対する強い抵抗性が獲得される。この現象は、虚血耐性と呼ばれ、その非常に強い脳保護作用から、これまでも多くの研究が成されてきた。しかし、ほとんどの研究は、神経細胞に注目した研究であった。しかし、脳には、神経細胞の数倍も数の多いグリア細胞が存在し、脳内環境の変化をいち早く感知していることが知られている。最近、このグリア細胞が脳保護作用を示すこと、過剰な活性化により逆に神経細胞の障害を引き起こすこと、さらに神経細胞の活動を積極的に制御していること等、脳機能における神経-グリア細胞連関の重要性が強く指摘されるようになってきている。しかし、虚血耐性獲得におけるグリア細胞の役割に関しては殆ど解っていない。

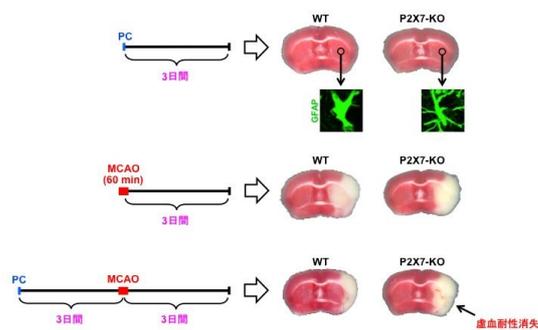


図1 虚血耐性とアストロサイト P2X7 受容体

PC 後に虚血耐性が獲得されるが(下段 WT)、P2X7 受容体欠損マウス(P2X7-KO)では、アストロサイトの活性化は起こるが(上段)、虚血耐性は消失する(下段、P2X7-KO)。MCAO に対する傷害の程度は変化しない(中段)。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、この虚血耐性の獲得にグリア細胞の一種である、アストロサイトが非常に重要な役割を果たしていることを見出し、これを「アストロサイト性虚血耐性」と命名した。さらにその分子メカニズムの解明を行い、P2X7 受容体が中心的な役割を果たしていることを見出した(図1)。本研究は、

P2X7 受容体刺激から、アストロサイト性虚血耐性発現に至る分子メカニズムを明らかにすることを目的とするものである。これらの解析を通じ、アストロサイト性虚血耐性の特徴、意義等を併せて議論したい。

### 3. 研究の方法

虚血耐性モデル: In vivo 虚血耐性は、マウスの中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを用いた。PC は 15 分、その後の侵襲的虚血には 60 分の MCAO を採用した。傷害の程度は、TTC 染色により評価し、各種抗体を用いた免疫組織学的検討により補完した。

P2X7 受容体の関与: P2X7 受容体の役割を明らかとするため、P2X7 受容体欠損マウス、さらに各種薬理的な拮抗薬を用いた。

HIF1 $\alpha$  発現メカニズムの解析: In vivo 実験系では免疫組織学的解析により、また in vitro 実験系では免疫細胞学的及び western blotting 法による解析により、評価を行った。

### 4. 研究成果

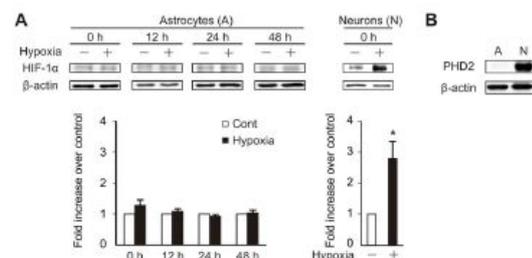


図2 アストロサイトは低酸素で HIF1 を上昇しない

A. 神経細胞は低酸素で HIF1 を上昇させるがアストロサイトは応答しない。B. 培養アストロサイト(A)には PHD2 酵素が確認出来ない。

Hypoxia inducible factor1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )は、酸素恒常性を制御するマスター分子であり、低酸素時に神経細胞で増加する。神経細胞での HIF1 $\alpha$  増加は、酸素依存的な HIF1 $\alpha$  分解酵素である、PHD2 が低酸素時に機能しなくなるために、HIF1 $\alpha$  が蓄積し、これが核内に移行して種々の脳保護分子の転写を亢進する。実際、培養神経細胞に低酸素を負荷すると、

HIF1 $\alpha$  は増加した (図 2 A 右)。しかし、培養アストロサイトに低酸素負荷を行っても、HIF1 $\alpha$  の上昇は全く認められなかった (図 2 A 左)。そこで、アストロサイトに PHD2 があるかどうかを確認したところ、培養アストロサイトには PHD2 の発現は殆ど認められなかった (図 2 B)。

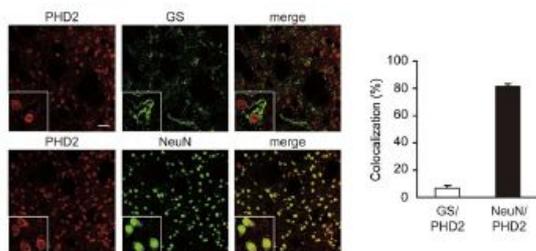


図 3 PHD2 発現の細胞種による差異

線条体 PHD2 はアストロサイトには殆ど認められず (GS 陽性、上段)、神経細胞 (NeuN 陽性、下段) に存在していた。

さらに、免疫組織学的手法により、マウス線条体アストロサイトの PHD2 の発現を調べたところ、やはり PHD2 は in situ アストロサイトでも発現は殆ど認められなかった (図 3)。つまり、アストロサイトには (1) PHD2 が発現しておらず、(2) 低酸素による PHD2 増加も認められなかったのである。しかし、脳卒中後には、アストロサイトでも HIF1 $\alpha$  は増加する。つまりアストロサイトは、神経細胞とは全く異なるメカニズムで HIF1 $\alpha$  を増加させ、虚血耐性を誘導していることが明らかとなった。

そこで、次にこのアストロサイトに特徴的な HIF1 $\alpha$  増加の分子メカニズムの解析を行った。PC 後に、P2X7 受容体がアストロサイトで発現亢進することを既に見出している。そこで P2X7 受容体とアストロサイトの HIF1 $\alpha$  発現について解析を行った (図 4)。

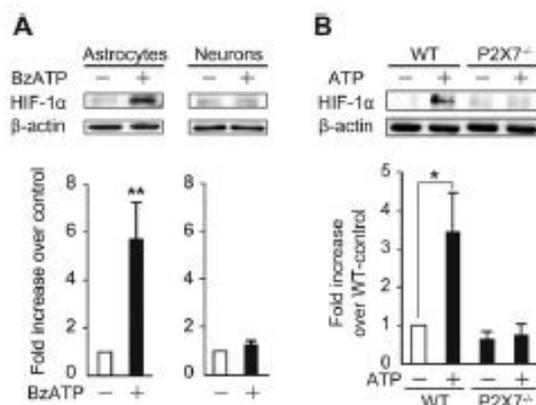


図 4 P2X7 受容体依存的 HIF1 発現

A. P2X7 受容体アゴニスト BzATP はアストロサイトで HIF1 を発現させるが神経細胞ではない。B. 高濃度 ATP (P2X7 受容体刺激) によるアストロサイトの HIF1 亢進は、P2X7 受容体欠損マウスのアストロサイトでは認められない。

アストロサイトの HIF1 $\alpha$  発現は、P2X7 受容体アゴニストの BzATP で亢進すること (図 4A) また高濃度 ATP でもアストロサイトの HIF1 $\alpha$  発現は亢進し、これは P2X7 受容体欠損マウスのアストロサイトでは消失することを見出した (図 4B)。これらの応答は神経細胞では起きなかった。従って、アストロサイトは神経細胞とは異なり、独自のシグナル、つまり P2X7 受容体発現を亢進させ、本受容体依存的メカニズムで HIF1 $\alpha$  を誘導し、虚血耐性を引き起こす事が明らかとなった。

神経細胞等の HIF1 $\alpha$  増加は、低酸素により一過性に PHD2 の活動が抑制された結果による。従って、PC 後に酸素を再度供給 PHD2 の活動が回復すると、直ぐに HIF1 $\alpha$  も低下する、一過性の応答である。しかし、アストロサイトの HIF1 $\alpha$  増大は P2X7 受容体の発現亢進に完全に依存するので、アストロサイトでは、P2X7 受容体発現 (図 5) と HIF1 $\alpha$  (図 6) は非常に良く一致する。PC 後の P2X7 受容体及び HIF1 $\alpha$  発現は、slow-onset であるが、非常に持続的である (図 5 及び 6)。PC によるアストロサイトの HIF1 $\alpha$  の発現のタイムコースも、slow-onset かつ持続的であ

った。同じ HIF1 $\alpha$  でも、神経細胞とアストロサイトでは、虚血耐性獲得に対する役割が全く異なっていた、つまり神経細胞の HIF1 $\alpha$  は虚血耐性獲得と殆ど関係していないのに対しアストロサイトのそれは虚血耐性に必須の分子であった。このような違いは、神経細胞と異なり、アストロサイトは HIF1 $\alpha$  を持続的に亢進させ、HIF1 $\alpha$  依存的な神経保護分子の産生を継続させることに起因しているものと考えられた。

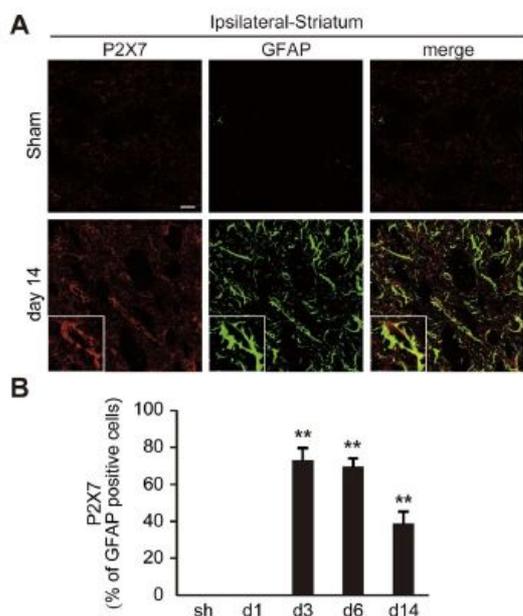


図5 PC後のP2X7受容体発現タイムコース  
アストロサイトのP2X7受容体発現はPC後3日目から認められ少なくとも2週間持続する。

以上、アストロサイトが虚血耐性獲得に必須であること、またその分子メカニズムを明らかとした。しかし本研究で用いたようなPCは、非侵襲的ではあるものの直接ヒトに応用することはできない。したがって、今後臨床への応用を目指すためには、本研究により見いだした虚血耐性誘導に関連する複数の標的分子を、PC以外の方法で制御する戦略をとる必要がある。そのために、アストロサイト依存性虚血耐性分子メカニズムの全容解明に向けたさらなる研究が必要である。しかし、本研究成果は、アストロサイトが虚血耐性誘導および脳卒中治療戦

略において、非常にポテンシャルの高い標的細胞であることを強く示唆するものであり、虚血耐性研究のマイルストーンの一つに位置づけることができると考えている。

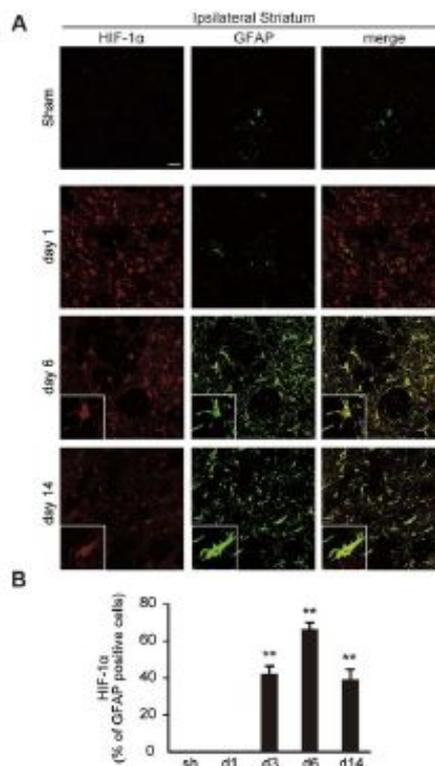


図6 PC後のHIF1受容体発現タイムコース  
アストロサイトのHIF1受容体発現はPC後3日目から認められ少なくとも2週間持続する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

① Ihara, T., Mitsui, T., Nakamura, Y., Kira, S., Nakagomi, H., Sawada, N., Hirayama, Y., Shibata, K., Shigetomi, E., Shinozaki, Y., Yoshiyama, M., Andersson, KE., Nakao, A., Takeda, M. Koizumi, S. Clock Genes Regulate the Circadian Expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26, and VNUT in an Ex Vivo Mouse Bladder Mucosa. PLoS One. 査読有, 12(1), 2017, e0168234, DOI: 10.1371/journal.pone.0168234

② Hirayama, Y., Koizumi, S. Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 $\alpha$  expression in astrocytes after ischemic preconditioning. Glia. 査読有, 65(3), 2017, 523-530, DOI: 10.1002/glia.23109

③ Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A.W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, Koizumi, S.

Moorhouse, A., Yoshimura, Y. and \*Nabekura, J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. Nat Commun. 査読有、7、2016、12540、DOI: 10.1038/ncomms12540

④ Kim, S.K., Hayashi, H., Ishikawa, T., Shibata, K., Shigetomi, E., Shinozaki, Y., Shinozaki, Y., Inada, H., Roh, S.E., Kim, S.J., Lee, G., Bae, H., Moorhouse, A.J., Mikoshiba, K., \*Koizumi, S. and \*Nabekura, J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. J Clin Invest. 査読有、126(5)、2016、1983-1997、DOI: 10.1172/JCI82859

⑤ Hirayama, Y., Ikeda-Matsuo, Y., Notomi, S., Enaida, H., Kinouchi, H., Koizumi, S. Astrocyte-Mediated Ischemic Tolerance. Journal of Neuroscience. 35(9)、2015、3794-3805 DOI:10.1523/JNEUROSCI.4218-14.2015

〔学会発表〕(計 13 件)

① 平山友里、Le Pham Ngoc Ha、小泉修一、低酸素に依存しないアストロサイト HIF-1 $\alpha$  発現上昇メカニズムと虚血耐性、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

② 平山友里、脳虚血耐性現象におけるグリア細胞の役割、北陸大学グリアセミナー、2017 年 2 月 15 日、北陸大学(石川県・金沢市)

③ 平山友里、小泉修一、アストロサイト P2X7 受容体を介する持続的な脳虚血耐性、第 20 回 Japan Purine Club Meeting、2016 年 10 月 26 日、東京慈恵会医科大学(東京都)

④ 平山友里、小泉修一、持続的なアストロサイト性脳虚血耐性の分子メカニズム解析、第 135 回日本薬理学会関東部会、2016 年 10 月 8 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

⑤ Koizumi, S. Ischemic tolerance mediated by microglia-astrocytes communications. 14th meeting of Asian-Pacific Society for Neurochemistry. 14th meeting of Asian-Pacific Society for Neurochemistry. 2016 年 8 月 30 日、クアラルンプール(マレーシア)

⑥ 平山友里、松尾由理、小泉修一、持続的なアストロサイト性虚血耐性のメカニズム解析、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 11 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

⑦ Hirayama, Y.、Koizumi, S. Mechanisms underlying astrocyte-mediated ischemic tolerance. 第 20 回グリア研究会、2015 年 12 月 5 日、名古屋市立大学(愛知県・名古屋市)

⑧ Hirayama, Y.、Ikeda-Matsuo, Y.、Koizumi, S. Role of P2X7 receptor/HIF-1 $\alpha$  signal pathway in astrocyte-mediated ischemic tolerance. Society for Neuroscience Annual Meeting 2015. 2015 年 10 月 20 日、シカゴ(アメリカ)

⑨ 平山友里、松尾由理、小泉修一、Activation of P2X7 receptor/HIF-1 $\alpha$  signal pathway in astrocytes induces ischemic tolerances. 第 58 回日本神経化学会大会、2015 年 9 月 11 日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

⑩ Hirayama, Y.、Ikeda-Matsuo, Y.、Koizumi, S. New insights into glia-mediated ischemic tolerance. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 29 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

⑪ Morizawa, Y.、Hirayama, Y.、Shibata, S.、Koizumi, S. Phagocytes astrocytes after brain ischemia. □ European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. 2015 年 7 月 15 日~18 日、ビルバオ(スペイン)

⑫ Koizumi, S.、Hirayama, Y. Glial cells-triggered ischemic tolerance. The 2015 Cold Spring Harbor Conferences Asia. 2015 年 6 月 25 日、蘇州(中国)

⑬ 小泉修一、Glial-mediated ischemic tolerance. 第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 22 日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical\\_basic/pharmaco/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI, Schuichi)  
山梨大学・総合研究部・教授  
研究者番号：10280752

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

平山 友里 (HIRAYAMA, Yuri)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号：30732804

木内 博之 (KINOUCHI, Hiroyuki)  
山梨大学・総合研究部・教授  
研究者番号：30241623

(4) 研究協力者

篠崎 陽一 (SHINOZAKI, Youichi)  
繁富 英治 (SHIGETOMI, Eiji)