

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08117

研究課題名（和文）アセチルコリン関連酵素がグリア細胞機能を制御調節する可能性

研究課題名（英文）Possibility of regulation for functions of glial cells through acetylcholine-related enzymes

研究代表者

坂上 元栄（Sakaue, Motoharu）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：60348589

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経伝達物質アセチルコリン（ACh）とACh関連酵素、特にAChエステラーゼ（AChE）のグリア細胞活性化制御の可能性を検討した。マウス脳障害モデルでは、脳障害部位で活性化したグリア細胞にAChE及びコリンアセチルトランスフェラーゼChATの陽性反応及びAChの増加が見られた。一方で、初代培養アストロサイトの活性化状態は、AChE阻害剤処理によって変化が見られなかった。脳障害モデルの脳障害部位の大きさが減少すると想定しAChE阻害剤を投与したが、予想外にも増大し、マイクログリア活性化マーカーの増加が見られたことから、AChEがマイクログリア活性化に影響を及ぼす可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系には、神経機能の主体である神経細胞とそれをサポートするグリア細胞が存在する。脳が傷害されると修復のためにグリア細胞が活性化されるが、過剰な活性化は神経細胞死を引き起こし予後を悪くする。神経膠細胞の活性化制御により、この増悪を抑制する可能性がある。本研究ではAChとACh関連酵素とグリア細胞の中でもアストロサイトとマイクログリアの関連を検討し検討を行った。マイクログリア活性化にAChEが関与する可能性が示されたことは、今後は詳細な検討が必要ではあるが、脳障害時の予後改善に関わる一要因としての情報となるであろう。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the expression and regulation function of acetylcholine (ACh) -related enzymes, especially ACh esterase (AChE), in activation of glial cells. In the injury area in cerebral cortex of a mouse TBI model, increase of AChE- and choline acetyltransferase (ChAT)-immunopositive signals was immunohistochemically detected in reactive glial cells, and ACh amount was also increased. Reactive state of primary cultured astrocytes wasn't affected by treatment with AChE inhibitor. Contrary to our expectation that AChE inhibitor administration decreases the size of the injured area in the cerebral cortex of the model, the inhibitor increased the size and the immunopositive signals of reactive-microglial marker in the injured area, and didn't that of astrocytes. Therefore, AChE increased by TBI seems to have regulatory function on reaction state of microglia.

研究分野：組織細胞学

キーワード：AChE ChAT ACh グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経にある主なグリア細胞には、アストロサイト、マイクログリア、オリゴデンドロサイトがあり、いずれも神経細胞が神経機能を発揮するための環境を整える働きをしている。

一過性脳虚血や脳梗塞、脳損傷などの脳神経障害時において、アストロサイトとマイクログリアは形態変化を起こすとともに、神経栄養因子や炎症性サイトカインを分泌亢進するなどの、いわゆる「活性化」状態となり、障害神経細胞の除去や器質化などの修復が行われる（Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011）。しかし、これらグリア細胞の「過剰な活性化」は、「炎症性サイトカインやフリーラジカルの過剰な産生」を生じ、それにより、さらなる神経細胞死が誘導されて障害部位が拡大し、修復を遅延あるいは不能にして、予後を悪くする。アストロサイト活性化が引き起こす環境変化は、アルツハイマー病やハンチントン病等でも、さらなる神経細胞死を誘導すると報告されていること（Phatnani and Maniatis, 2015）から、脳障害時のグリア細胞の活性化の制御は、予後を改善し Quality of life を向上させるための臨床学的な治療ターゲットの可能性として注目されている。

神経伝達物質であるアセチルコリン（ACh）は、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）によって合成される。一般にはシナプスで分泌され、ACh エステラーゼ（AChE）により分解、不活化される。日本で使用される4つのアルツハイマー病治療薬のうちドネペジル（Donepezil）、リバスチグミン、ガランタミンはいずれも AChE 阻害剤であり、一般には ACh 分泌の減少を補うことで神経活動を促進することを目的として使用される。しかし、近年その ACh が非神経細胞であるグリア細胞にも作用し、その活性化を制御することが明らかにされつつあり、AChE 阻害がグリア細胞の機能を制御しうる可能性がでてきた。研究代表者は、*in vitro* のアストロサイト活性化モデルで、その活性化を ACh アゴニストが抑制すること（Ozawa *et al.*, 2013）、さらにはアストロサイト活性化にともない AChE の発現と活性が増加し、その AChE 活性阻害および siRNA による AChE 発現抑制が、アストロサイトの活性化を抑制することを明らかにした（Ozawa *et al.*, 2013; 門脇ら, 2012）。一方、脳障害モデルマウスで、マイクログリアの活性化が、ACh アゴニストの1つであるニコチンによって抑制され、神経細胞死の促進が抑制された（Guan *et al.*, 2015）との報告もある。

2種類の ACh 受容体、ムスカリン作動性受容体およびニコチン作動性受容体は、いずれもアストロサイトおよびマイクログリアに発現する。これらのことから、「AChE の ACh 分解作用」および「ChAT の ACh 合成作用」が、ACh 量を調節することでグリア細胞の中でも特にアストロサイトの活性化を制御する可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は「ACh 関連酵素（AChE 及び ChAT）のグリア細胞活性化への制御可能性とその機序について明らかにすること」である。ACh が、グリア細胞の活性化を制御することが明らかになりつつある。ACh 量を調節する ACh 関連酵素である「ACh 合成酵素 ChAT」と「ACh 分解酵素 AChE」は、グリア細胞活性化を制御しうるのか、またこれら酵素がグリア細胞の活性化にともない変化するかについては不明である。

本研究では、AChE と ChAT の発現と局在が、グリア細胞の活性化に伴いどのように変化するか、また、これら2つの酵素が、グリア細胞活性化を含むグリア細胞の機能の制御にどのように関わるかを明らかにすることを目的とする。まず、主にアストロサイトに注目し、これらの可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### （1）マウス脳損傷モデルの作成と蛍光免疫組織化学及び ACh の検出

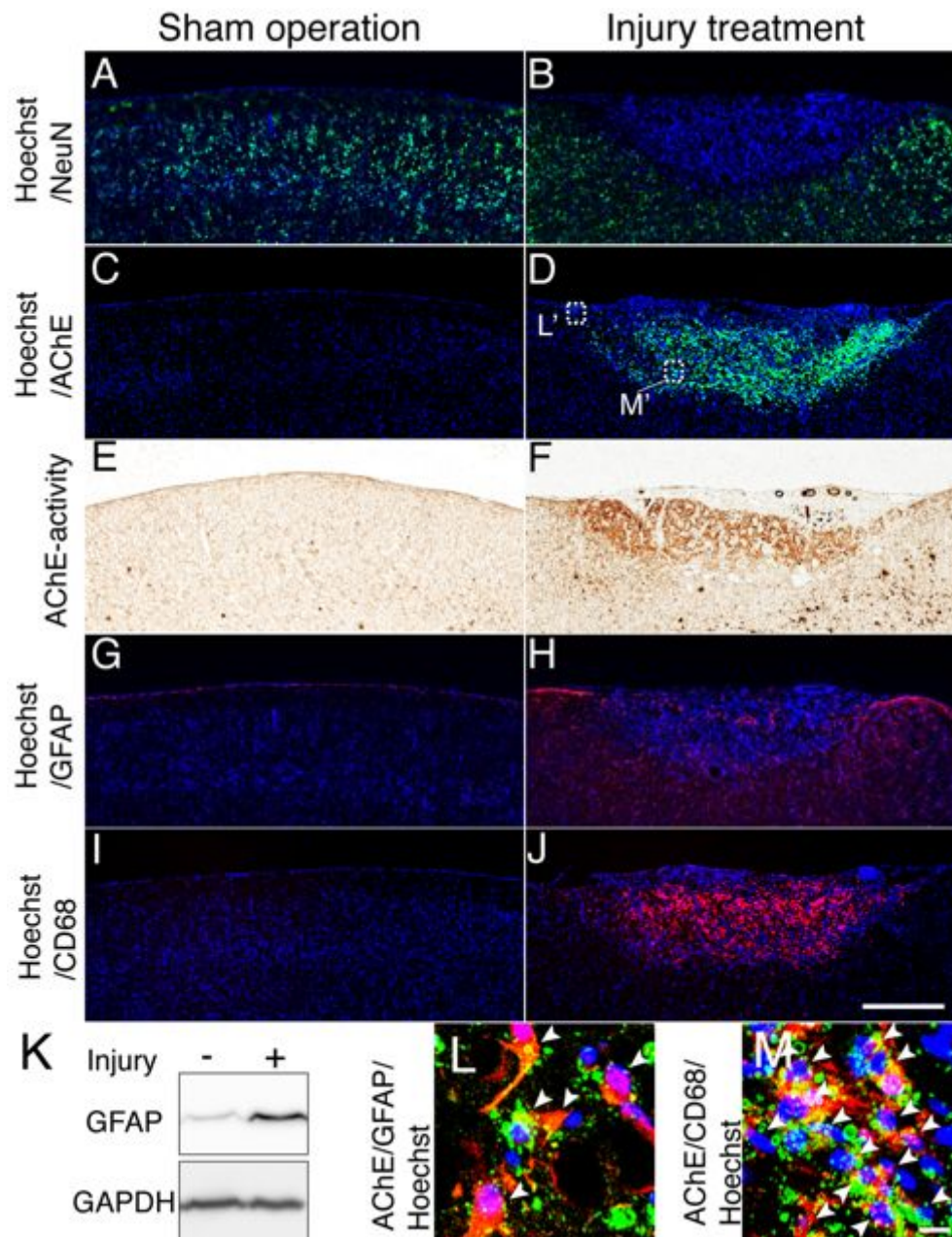
グリア細胞活性化時の AChE と ChAT の発現変化を検討するため、マウス脳損傷モデルを使用した。C57BL/6NJcl マウス（8週齢、オス）を使用し、脳損傷処置として液体窒素で過冷却した直径5mmステンレス棒を側頭骨に密着させ大脳皮質の一部を損傷する方法（Tatsumi ら, 2005）で行った。脳損傷処置3日及び7日後に脳を採材・固定し、凍結切片を作成、免疫組織化学的染色により AChE と ChAT の局在と酵素組織化学的手法により AChE の酵素活性局在を検討した。ACh 及び Choline 量の局在変化については、イメージング質量分析により行った。

### （2）初代培養アストロサイトの調整と処理

新生仔マウスの大脳よりアストロサイトを調整・培養した。この細胞の培地にアストロサイト活性化誘導因子（IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、LPS）及び ACh を加え24時間処置をし、アストロサイトの活性化状態を、活性化マーカーである IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の mRNA 発現レベルを Real-time RT-PCR 法で解析することで検討した。また、ACh 酵素活性のアストロサイト活性化への影響を検討するため、AChE 選択的阻害剤 Huperzine A（HupA）を培地に添加した。また初代培養アストロサイトの AChE 酵素活性を Ellman ら（1961）の方法を改変して使用し測定した。

### （3）マウス脳損傷モデルへの AChE 阻害剤投与

脳損傷処置の7日前から脳損傷処置の7日後までの14日間、AChE 阻害剤である Donepezil



**Fig. 1.** Immunofluorescent staining for acetylcholinesterase (AChE), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and CD68 in the injured areas of the murine traumatic brain injury (TBI) (cryo-injury) model. Fluorescence immunohistochemistry with anti-NeuN antibody (green; A and B), anti-AChE antibody (green; C and D), anti-GFAP antibody (red; G and H), and anti-CD68 antibody (red; I and J) in sham operation areas and cryo-injured areas of the brain. E and F: Enzyme activity of AChE (brown) in the brain areas of the cerebral cortex shown by enzyme histochemistry. K: Western blot analysis for protein expression levels of GFAP and GAPDH. Protein samples from sham operation area (–) and cryo-injured area (+) were electrophoresed. Photomicrographs (L) and (M) show the magnified areas of dotted-line squares (L') and (M') in panel D, revealing the intracellular double expression of GFAP/AChE (L) and CD68/AChE (M). Arrowheads: Double-positive cells. All sections used in the fluorescent immunohistochemistry were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Scale bars: 500  $\mu$ m (A–J) or 10  $\mu$ m (L and M). Reproduced with permission of the Japanese Society of Veterinary Science from Horio, et al. Immunohistochemical analysis for acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in mouse cerebral cortex after traumatic brain injury. J Vet Med Sci, 2020. DOI: 10.1292/jvms.19-0551. In press.

を飲用水に一日摂取量が約 5 mg/kg/day または 15 mg/kg/day となるように混合し摂取させた。脳損傷処置 7 日後に脳を採材し、損傷部位の大きさの測定及び、免疫組織化学的検索を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス脳損傷モデルでの AChE と ChAT 発現及び ACh の変化の検討

グリア細胞活性化の ACh 関連酵素の発現局在を検討するためマウス脳損傷モデルを用いた。脳損傷部位では抗 AChE 抗体陽性反応がみられ、抗 GFAP 抗体陽性もしくは抗 CD68 陽性を示す細胞に観察された。また、抗 ChAT 抗体陽性反応も同じように、抗 GFAP 抗体陽性細胞もしくは抗 CD68 陽性細胞に観察された。また、AChE の酵素組織化学染色法では、脳損傷部位に AChE の酵素活性陽性反応が顕著に見られた (Fig. 1)。イメージング質量分析により、脳損傷部位で ACh 及び Choline 量が増加が検出された (Fig. 2)。アストロサイトとマイクログリアの活性化に伴っ



て AChE 及び ChAT の発現が増加し、ACh 量が増加したと考えられた。

#### ( 2 ) 初代培養アストロサイトの活性化状態への AChE の影響の検討

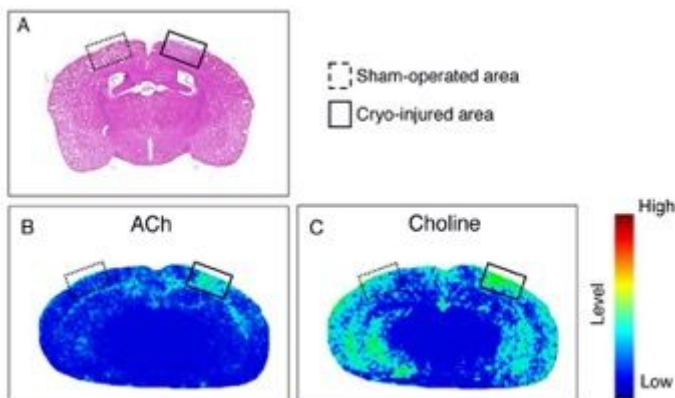
グリア細胞への直接的な AChE の影響を検討するため、初代培養アストロサイトで検討を行った。活性化誘導因子処理により IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の mRNA 発現レベルが増加したことから、初代培養細胞が活性化することを確認した。この活性化状態のアストロサイトに HupA を処置した。AChE 活性は初代培養細胞の活性化に伴い増加し、HupA 処理により減少したが、増加した IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の mRNA 発現が HupA により変化することにはなかったことから、アストロサイトに AChE による影響、すなわち ACh によるアストロサイト活性化には影響がないと思われた。

#### ( 3 ) マウス脳損傷モデルでの AChE 阻害剤の影響の検討

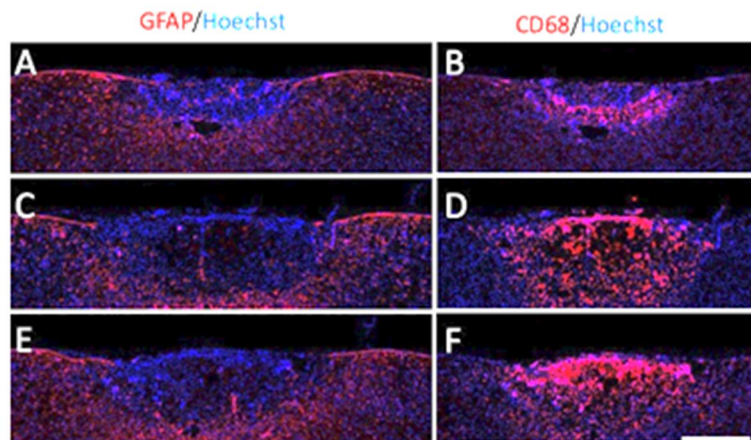
マウス脳損傷モデルにおける AChE の影響を検討するため、Donepezil を投与した。Donepezil 投与により、脳損傷部位の大きさが減少すると予想していたが、それに反して増大した。免疫組織化学的検索では、脳損傷部位のアストロサイトマーカー GFAP 陽性細胞には顕著な変化は見られなかったが、マイクログリアマーカー CD68 陽性細胞が明らかに増加していた (Fig.3)。このことから、AChE はマイクログリアの増殖や活性化に影響する可能性が考えられた。

#### ( 4 ) まとめ

ACh 関連酵素のグリア細胞機能への役割を明らかにするため、アストロサイトを中心に検討を行った。脳損傷部位の活性化したアストロサイト及びマイクログリアに ACh 関連酵素の局在が増大した。初代培養アストロサイト及びマウス脳損傷モデルのいずれでも AChE 阻害によるアストロサイトへの顕著な影響が見られなかったことから、AChE はアストロサイト活性化状態には影響しないと考えられた。一方で、マウス脳損傷モデルでの AChE 阻害処理では、マイクログリアへの影響が見られた。マイクログリアはニコチン作動性 ACh 受容体を発現し、この受容体がマイクログリアの活性化を抑制する (Moriok et al., 2018) という報告がある。AChE 阻害剤が脳損傷部位の大きさを増大させた本研究の結果はこの報告とは逆の結果であることから、他のメカニズムを介する可能性が考えられた。マイクログリア活性化に AChE が関与する可能性が示されたことは、今後は詳細な検討が必要ではあるが、脳障害時の予後改善に関わる一要因としての情報となるであろう。



**Fig. 2.** Imaging mass spectrometry results for acetylcholine (ACh) and choline in cryo-injured areas. *Dotted-line squares*: Sham-operated areas. *Solid-line squares*: Cryo-injured areas. A: Image of a brain section stained with hematoxylin and eosin. Imaging results of derived ions from ACh (B) and choline (C) show the relative intensity. Reproduced with permission of the Japanese Society of Veterinary Science from Horio, et al. Immunohistochemical analysis for acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in mouse cerebral cortex after traumatic brain injury. J Vet Med Sci, 2020. DOI: 10.1292/jvms.19-0551. In press.



**Fig. 3.** Histological effect of Donepezil on the traumatic injured area of the cerebral cortex. Fluoroimmunohistochemistry for GFAP (A, C and E) and CD68 (B, D and F) shows red color as the positive signals. Blue indicates nucleus stained with Hoechst 33258. Samples were from control (A and B), Donepezil low-dose (C and D) and high-dose groups (E and F), 7 days after brain injury. Bar = 500  $\mu$ m

# 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 HORIO Tomoyo, OZAWA Aisa, KAMIIE Junichi, SAKAUE Motoharu	4. 巻 ---
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis for acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in mouse cerebral cortex after traumatic brain injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0551	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 Ozawa Aisa, Kadowaki Erina, Horio Tomoyo, Sakaue Motoharu	4. 巻 698
2. 論文標題 Acetylcholine suppresses the increase of glia fibrillary acidic protein expression via acetylcholine receptors in cAMP-induced astrocytic differentiation of rat C6 glioma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 146～153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.01.020	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 堀尾 朋世, 小澤 秋沙, 池本 美貴, 中内 維彌, 佐藤 幸妃, 豊田 紗千乃, 坂上 元栄
2. 発表標題 脳損傷モデルマウスにおけるastrocyte・microglia でのacetylcholinesterase およびcholine acetyltransferase 局在
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会, 東京
4. 発表年 2018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
研究協力者	堀尾 朋世  (Horio Tomoyo)	麻布大学大学院・獣医学研究科動物応用科学専攻・博士前期課程大学院生  (32701)	