

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14859

研究課題名（和文）脳のクリアランス促進による恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）The mechanisms of extracellular ion homeostasis by brain fluid dynamics

研究代表者

毛内 拓 (Monai, Hiromu)

お茶の水女子大学・基幹研究院・助教

研究者番号：90708413

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞では、脳血流だけでなく髄液の流れも滞ってしまいます。私達は、ノルアドレナリンという脳内物質を受け取れなくなる薬（阻害薬）を与えたマウスでは、脳梗塞後のダメージが軽減することを発見しました。詳細に調べた結果、阻害薬によって、アクアポリン4と呼ばれる、髄液の流れに関与している脳の水チャンネル分子が、減らずに維持されていることが分かりました。アクアポリン4が正常に機能した結果、髄液の流れが改善し、カリウムイオンの正常化が促進し、脳のダメージが軽減されたと解釈することができます。髄液の流れは、健康な脳を守り、正常な脳環境を維持するのに重要な役割を果たしていると考えられます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

髄液の流れは、健康な脳を守り、正常な脳環境を維持するのに重要な役割を果たしていると考えられます。私達の研究成果が今後、脳梗塞の治療法の開発に貢献していくことが期待されます。

研究成果の概要（英文）：The cerebral spinal fluid (CSF) flow is as well disrupted by stroke. In this study, we found that the adrenergic receptor (AdR) blockade significantly reduced the infarct area. We also found that the AdR blockade maintains the expression of the brain water channel, aquaporin 4 (AQP4), which is involved in the CSF flow. The mechanisms of the AdR blockade may be the improvement of CSF flow and facilitation of normalization of extracellular potassium ion, due to the preservation of AQP4. We believe that CSF will play an essential role in protecting a healthy brain and maintaining a normal brain environment.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳梗塞 脳脊髄液（髄液） カリウムイオン ノルアドレナリン 阻害薬 アストロサイト アクアポリン4

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞などの脳障害の超急性期において、細胞外カリウムイオン ( $K^+$ ) 濃度が局所的に急上昇することによって長期的な神経機能不全、ひいては細胞死を引き起こす。したがって、可及的速やかな細胞外  $K^+$  濃度の正常化が必要である。しかしながら現状、超急性期の治療法は、血栓溶解や神経保護に焦点を当てた対症療法に留まっており、細胞外  $K^+$  濃度の正常化をターゲットとした具体的な治療法は確立されていなかった。

## 2. 研究の目的

脳組織の細胞外イオン環境は、脳脊髄液と細胞間質液の交換によって一定に保たれている可能性がある。脳脊髄液の動態は、脳のノルアドレナリン濃度に依存していることが報告されており、ノルアドレナリン受容体(AdR)の阻害薬を投与することによって、脳脊髄液の流れを促進することが報告されている。一方、脳梗塞時には脳内でノルアドレナリンが急上昇することが知られている。したがって、脳梗塞時には、脳脊髄液と細胞間質液の交換が滞ることによって、高濃度の  $K^+$  が細胞外スペースに滞留している可能性がある。

本研究では、脳梗塞の超急性期において脳のノルアドレナリン受容体を阻害することによって、脳脊髄液の動きを促進し、余剰の  $K^+$  を排出できると仮説を立て、その詳細なメカニズムを検証する。

## 3. 研究の方法

- 成体マウスにローズベンガル色素を腹腔内投与し、大脳皮質領域に直径 2mm 程度の緑色のレーザーを頭蓋骨越しに 15 分照射することで局所的な血栓を作成した (光血栓法)。
- 24 時間後に、脳を摘出し TTC 染色をおこなうことによって損傷領域を評価した。
- 血栓作成後、1-3 時間後に脳を摘出し、免疫組織化学染色法によって様々なタンパク質を標識した。切り出した脳切片からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法によってタンパク質量を定量化した。
- ガラス電極を用いて、大槽 (Cisterna magna) に直接、10  $\mu$ l のビオチン化デキストラミン (70kDa) を毎分 1  $\mu$ l の割合で注入し、注入後 30 分後の大脳皮質実質における色素の拡がりや蛍光標識ストレプトアビジンによる標識によって評価した。
- イオン選択的微小電極により細胞外の  $K^+$  濃度を直接測定し、 $K^+$  の正常化を評価した。
- 用いたアドレナリン受容体阻害薬は、プラゾシン (10 mg/kg)、アチパメゾール (1 mg/kg)、プロプラノロール (10 mg/kg) であり、それぞれを光血栓作成の 20 分前、あるいは脳梗塞後に腹腔内投与した。

#### 4. 研究成果

マウスにあらかじめ**アドレナリン受容体 (AdR) 阻害薬**を投与した結果、脳梗塞を起こしたとしても梗塞部位が有意に縮小することを見出した (図 1)。さらに脳梗塞後の運動機能の回復が有意に促進することを明らかにしてきた。またこの薬の神経保護作用は梗塞が生じた後でも有効であった。

脳梗塞後の脳の水チャネルであるアキュアポリン 4 (AQP4) を免疫組織化学染色法により標識した結果、1 時間後より徐々に減少し始め、3 時間後には 24 時間後と同程度まで減少することがわかった。一方、AdR 阻害薬をあらかじめ投与することによって AQP4 の標識の減少を食い止められることを免疫組織化学染色法により明らかにした。また、ウエスタンブロット法によっても同様の傾向を認めている。このことは、AdR 受容体阻害薬の作用機序として、**脳内の水の動きが重要な役割を果たしている可能性を示唆している。**

次に、脳脊髄液中にトレーサーを直接注入した結果、脳梗塞を起こした部位では、トレーサーが拡がらなかったのに対して、あらかじめ AdR 受容体阻害薬を投与した場合は、脳実質にトレーサーが浸潤することが分かった。

最後に、イオン選択的微小電極により細胞外の  $K^+$  濃度を測定した結果、脳梗塞後 3 時間に渡って  $K^+$  濃度が高い状態が維持されたのに対して、AdR 受容体を阻害した場合は、 $K^+$  濃度の正常化が促進していることが明らかとなった。上記のような傾向は、AQP4 欠損マウスでは見られなかった。

以上の結果から、脳梗塞によって、ノルアドレナリン受容体の働きにより、AQP4 の発現が減少し、脳脊髄液の流れが滞り、細胞外に高濃度の  $K^+$  濃度が滞留することによって、損傷が拡大する。一方、AdR 阻害によって、AQP4 の発現が維持され、脳脊髄液の流れが改善し、細胞外の  $K^+$  濃度の正常化が促進することによって、損傷拡大が抑制されることが明らかとなった (図 2)。

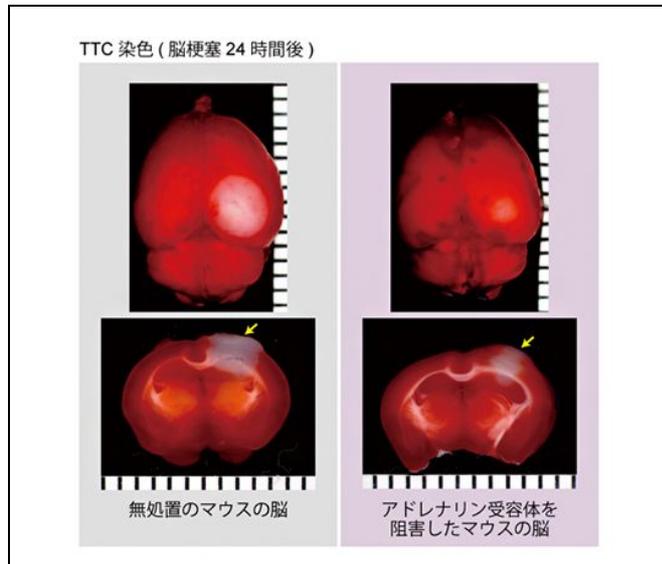


図 1 脳梗塞 24 時間後の脳損傷部位の大きさの評価

右側大脳皮質の感覚野に脳梗塞を起こしてから 24 時間後に脳を摘出し、TTC 染色を行った。この染色法では、脳細胞が生きていれば赤く染まり、壊死した部位では白いままとなる。

(左) 無処置のマウスの脳。上下の図はそれぞれ、大脳皮質表面と上の脳を 1mm 間隔で冠状断 (脳を前後に分ける面) で輪切りにしたうちの 1 枚。いずれも右脳に壊死した白い部位 (矢印) が見られる。  
(右) アドレナリン受容体の阻害薬を事前に投与したマウスの脳。左の図に比べて、壊死した白い部位 (矢印) が少ないことが分かる。

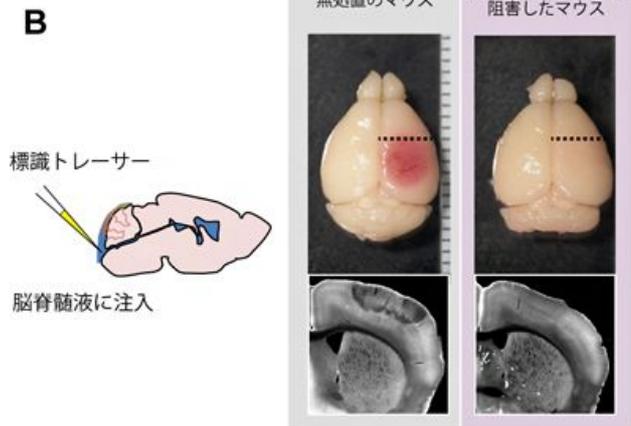
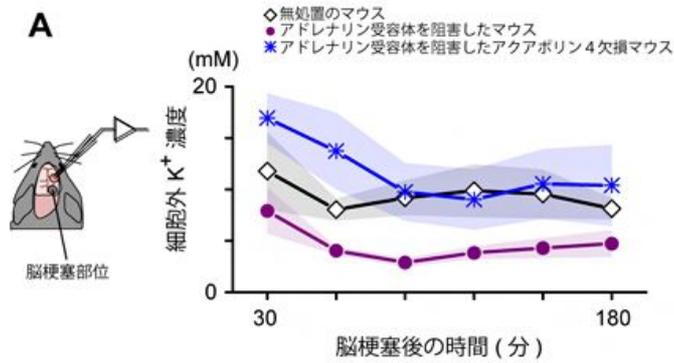


図2 脳梗塞後のカリウムイオン濃度の定量と脳脊髄液浸潤の可視化

(A) イオン選択性微小電極を用いて、脳組織液  $K^+$  濃度を測定した。脳梗塞直後から3時間後まで30分ごとの平均値を図に示した。縦軸はイオンの濃度を表す mM [ミリモラー] (ミリは1000分の1)。白抜きひし形は、無処置のマウス群(5匹)、紫の丸は、アドレナリン受容体の阻害薬を事前に投与した群(5匹)、青い米印はアクアポリン4欠損マウスにアドレナリン受容体の阻害薬を事前に投与した群(5匹)の結果である。アドレナリン受容体を阻害したマウスでは、約60分後に  $K^+$  濃度は正常な水準に戻った。実線は平均値、影は標準誤差を示す。

(B) 脳脊髄液中にトレーサーを注入し脳組織内に浸潤した脳脊髄液を標識した。注入30分後、図の点線の位置で冠状断(脳を前後に分ける面)で輪切りにした脳スライスを用いて、トレーサーに蛍光標識して空間分布を可視化した。無処理のマウスでは脳脊髄液の浸潤が少なくなったのに対し、アドレナリン受容体を阻害したマウスでは正常に浸潤したことが分かった。

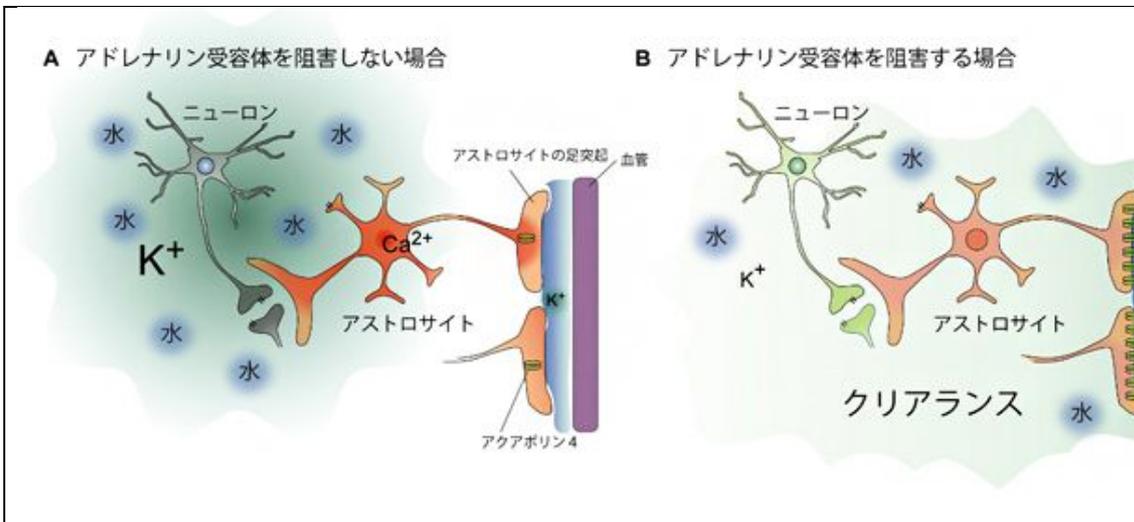


図 3 アドレナリン受容体の阻害によってカリウムイオンを正常化するクリアランスのモデル

A) ノルアドレナリンの作用により、グリア細胞のアストロサイトが活性化し、アストロサイトの足突起に局在する水の通り道であるアクアポリン 4 が減少する。その結果、高濃度の  $K^+$  を含む水が脳組織に滞留し、長期間にわたり神経細胞（ニューロン）の活動を抑制する。

B) アドレナリン受容体を阻害することにより、アクアポリン 4 の局在が確保される。水の動きによって  $K^+$  が排出（クリアランス）され、神経保護や脳機能回復が促進される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ue Yoshihiro, Monai Hiromu, Higuchi Kaori, Nishiwaki Daisuke, Tajima Tetsuya, Okazaki Kenya, Hama Hiroshi, Hirase Hajime, Miyawaki Atsushi	4. 巻 500
2. 論文標題 A spherical aberration-free microscopy system for live brain imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 236 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.049	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 H. Mestre*, LM. Hablitz*, ALB. Xavier*, W. Feng*, W. Zou*, T. Pu*, H. Monai*, G. Murlidharan*, RM. Castellanos Rivera*, MJ. Simon*, MM. Pike*, V. Pla*, T. Du*, BT. Kress*, X. Wang, BA. Plog, AS. Thrane, I. Lundgaard, Y. Abe, M. Yasui, JH. Thomas, M. Xiao, H. Hirase, A. Asokan, JJ. Iliff, M. Nedergaard	4. 巻 7
2. 論文標題 Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e40070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.40070	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 該当する
1. 著者名 Mishima Tsuneko, Nagai Terumi, Yahagi Kazuko, Akther Sonam, Oe Yuki, Monai Hiromu, Kohsaka Shinichi, Hirase Hajime	4. 巻 6
2. 論文標題 Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Adrenergic Receptor-Dependent Microglial Morphological Changes in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0204 ~ 19.2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1523/ENEURO.0204-19.2019">https://doi.org/10.1523/ENEURO.0204-19.2019</a>	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 該当する
1. 著者名 Monai Hiromu, Wang Xiaowen, Yahagi Kazuko, Lou Nanhong, Mestre Humberto, Xu Qiwu, Abe Yoichiro, Yasui Masato, Iwai Youichi, Nedergaard Maiken, Hirase Hajime	4. 巻 116
2. 論文標題 Adrenergic receptor antagonism induces neuroprotection and facilitates recovery from acute ischemic stroke	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11010 ~ 11019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1817347116	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 該当する

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 H. Monai, X. Wang, K. Yahagi, N. Lou, H. Mestre, Q. Xu, Y. Abe, M. Yasui, Y. Iwai, M. Nedergaard, H. Hirase
2. 発表標題 Adrenergic receptor antagonism induces neuroprotection and facilitates recovery from acute ischemic stroke
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 FAOPS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内 拓
2. 発表標題 健康な脳の鍵を握る脳の中のメタコミュニケーション
3. 学会等名 国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 脳機能イメージング研究部セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内 拓
2. 発表標題 健康な脳を支え、守る、グリア細胞の働き
3. 学会等名 第3回 お茶の水女子大学ヒューマンライフイノベーション研究所 公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Monai, X. Wang, K. Yahagi, N. Lou, H. Mestre, Q. Xu, Y. Abe, M. Yasui, Y. Iwai, M. Nedergaard, H. Hirase
2. 発表標題 Adrenergic receptor antagonism induces neuroprotection and facilitates recovery from acute ischemic stroke
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Monai and H. Hirase
2. 発表標題 Macroscopic neuroglial imaging of pathological states using a G-CaMP Tg mouse
3. 学会等名 研究拠点形成事業 Young Glia/ SPP1757 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 脳の中のメタコミュニケーション～ニューロン以外の要素が知性をつくる！？～
3. 学会等名 東京薬科大学 生命科学部 創立25周年記念シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Monai, X. Wang, K. Yahagi <sup>1</sup> , N. Lou, H. Mestre, Q. Xu, Y. Abe, M. Yasui, Y. Iwai, M. Nedergaard, H. Hirase
2. 発表標題 脳虚血超急性期の細胞外カリウムイオン濃度正常化における水チャネル AQP4 の関与
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会・第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上 喜裕, 毛内 拓, 樋口 香織, 西脇 大介, 田島 鉄也, 岡咲 賢哉, 濱 裕, 平瀬 肇, 宮脇 敦史
2. 発表標題 深部微細構造を鮮明かつ定量的にイメージングする自動球面収差補正システム
3. 学会等名 第27会 日本バイオイメージング学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Monai, X. Wang, K. Yahagi, N. Lou, H. Mestre, Q. Xu, Y. Abe, M. Yasui, Y. Iwai, M. Nedergaard, H. Hirase
2. 発表標題 Adrenergic receptor antagonism induces neuroprotection and facilitates recovery from acute ischemic stroke
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saya Katagiri, Hiromu Monai
2. 発表標題 Brain water channel aquaporin-4 involvement in tissue injury after photothrombotic stroke in mice
3. 学会等名 10th Ewha-JWU-Ochanomizu Joint Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rino Takei, Ayaka Kurihara, Hitomi Achiwa, Nanami Tsuji, Saya Katagiri, Hiromu Monai
2. 発表標題 Visualization of cortex-wide brain activity in living mouse
3. 学会等名 10th Ewha-JWU-Ochanomizu Joint Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aoi Gohma, Risa Tsurukame, Ayumi Takamizawa, Shoko Nakasono, Saya Katagiri, Hiromu Monai
2. 発表標題 Astrocytes, keeping the brain healthy, not just supporting cells for neurons
3. 学会等名 10th Ewha-JWU-Ochanomizu Joint Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Monai, X. Wang, K. Yahagi, N. Lou, H. Mestre, Q. Xu, Y. Abe, M. Yasui, Y. Iwai, M. Nedergaard, H. Hirase
2. 発表標題 AQP4 involvement in normalization of extracellular potassium after acute ischemic stroke
3. 学会等名 Young Glia/ SPP1757 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武井理乃, 毛内拓
2. 発表標題 覚醒マウスにおける経頭蓋マクロイメージング法の確立
3. 学会等名 第9回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郷間葵, 足立尚哉, 上喜裕, 樋口香織, 宮脇敦史, 毛内拓
2. 発表標題 球面収差自動補正システムによる脳組織の in vivo 水組成推定
3. 学会等名 第9回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 Brain water channel AQP4 involvement in normalization of extracellular potassium after acute ischemic stroke
3. 学会等名 ドイツ・ボン大学 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 健康な脳のはたらきを守り、支えるアストロサイト
3. 学会等名 JSTグローバルサイエンスキャンパス事業「医学・医療の学際的修学、半学半教」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 生体深部の球面収差を補正し、鮮明に観察するための顕微鏡システム
3. 学会等名 第7回 生物計測応用研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 健康な脳のはたらきを守り、支えるアストロサイト
3. 学会等名 寧夏回族自治区青年科学技術者交流団との学術交流会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 Glial involvement in transcranial direct current stimulation (tDCS)-induced plasticity
3. 学会等名 第2回「エクスペラシオン・フランス」プログラム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 健康な脳のカギを握る脳の中のメタコミュニケーション
3. 学会等名 第二回 形態解析ワークショップ 多様な顕微鏡を用いて (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 健康な脳のカギを握る脳の中のメタコミュニケーション
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回神経化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 健康な脳のカギを握る脳の中のメタコミュニケーション
3. 学会等名 第6回サイコグリア研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 健康な脳のカギを握る脳の中のメタコミュニケーション
3. 学会等名 北海道大学 電子科学研究所 ニコンイメージングセンター (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平瀬肇, 王筱文, 毛内弘, 安井正人	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 230
3. 書名 脳の半分を占める グリア細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

毛内研究室 (生体組織学) <a href="http://www-p.sci.ocha.ac.jp/bio-monai-lab/achievement.html">http://www-p.sci.ocha.ac.jp/bio-monai-lab/achievement.html</a> hi-rom.brain <a href="https://sites.google.com/site/hirombrain/achievement?authuser=0">https://sites.google.com/site/hirombrain/achievement?authuser=0</a>
---

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
---------------------------	-----------------------	----