

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14915

研究課題名（和文）脳梗塞後の組織炎症におけるアストロサイトの神経保護作用の可視化解析

研究課題名（英文）Analysis of neuroprotective actions of astrocytes in the inflammatory tissues during cerebral infarction

研究代表者

関谷 敬（Sekiya, Hiroshi）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任助教

研究者番号：40511374

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、血流量の低下したペナンブラと呼ばれる梗塞巣周辺領域において、神経細胞死が進行することが大きな問題であるが、詳細な病態生理には不明な点が多い。本研究では、脳梗塞後の病態生理のより詳細な理解を通して、新しい治療法の開発につなげることを目的とし、病態をより忠実に反映する血栓塞栓モデルを作製し、神経細胞とグリア細胞の活動を蛍光イメージングにより可視化解析を行った。さらに、グリオトランスミッターである細胞外ATPの蛍光イメージングを実現することで、グリア細胞が神経活動の抑制を通して、神経細胞を保護する働きを持つ可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は、死亡原因の上位に位置し、死に至らなくても重篤な後遺症が残り得る疾患で、社会に対する負荷も重大である。しかし、脳梗塞は、ヒトを対象とした研究には困難があるなどの理由から、病態の理解は十分ではない。本研究で得られた神経細胞およびグリア細胞の活動動態や、シグナル分子であるグリオトランスミッターの細胞外動態などは、脳梗塞後の病態生理のより詳細な理解に重要であり、病態を踏まえた積極的な治療法の実現に有用であることが十分に期待される。

研究成果の概要（英文）：In cerebral infarction, one of major problems is the progression of neuronal cell death in the region surrounding the infarction site, known as the penumbra, where blood flow is reduced, but the details of the pathophysiology remain unclear. In this study, a thromboembolic model that more faithfully reflects the pathophysiology was performed, and the activities of neurons and glial cells were visualized and analyzed by fluorescence imaging. Furthermore, fluorescence imaging of extracellular ATP, a gliotransmitter, was achieved, suggesting that glial cells may function to protect neurons through suppression of neuronal activity.

研究分野：神経科学

キーワード：イメージング 脳梗塞 グリア細胞 神経細胞 ATP

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、死亡原因の上位に位置し、死に至らなくても麻痺や言語障害をはじめとする重篤な後遺症が残る疾患で、社会に対する負荷も重大である。しかし、脳梗塞は急速に進行する病態であることや、梗塞の状態や合併症が症例ごとに著しく異なることなどから、臨床におけるヒトを対象とした研究は非常に困難で、病態の理解は十分ではない。そのため、脳梗塞における神経細胞死に対し、病態を踏まえた積極的な治療法は十分には開発されておらず、脳梗塞発症から数時間以内の急性期に血栓溶解薬を投与するという再灌流療法が、主な治療法である。

脳血管に血栓が起きた脳において、血流が途絶えた領域では、直ちに神経細胞死が引き起こされ、梗塞巣となる。一方、梗塞巣の周辺領域は、直には神経細胞死に至らないが、血流低下により一時的に正常な神経活動が停止した、ペナンプラと呼ばれる領域となる。この血流の低下したペナンプラでは、神経細胞は細胞死までには至らないが、非常に脆弱な状態である。このペナンプラは、梗塞巣外縁から伝播する異常神経活動により、大きなエネルギー消費を強いられ、神経細胞死を起こして梗塞巣へ移行する。このペナンプラへ拡大する梗塞巣が、初期の梗塞巣より大きく、脳損傷の大きな割合を占めることが示唆されている。そのため、この梗塞巣拡大を止めることが、脳梗塞の非常に有効な治療になると考えられた。この梗塞巣拡大の抑制には、神経活動の阻害が有効と考えられるが、神経伝達の阻害薬などは、動物実験ではわずかな有効性を示したのみで、ヒトでの臨床成績に至ってはむしろ悪化した。これらの結果は、動物モデルの梗塞はペナンプラの割合が小さく、ヒトでの梗塞と異なる可能性や、阻害薬投与により脳の興奮抑制のバランスが変化することで、むしろ梗塞後の異常神経活動に対して負の影響を与えるなどの可能性があげられるが、脳梗塞発生直後の詳細な病態生理には不明な点が多く、より優れた治療法の開発には至っていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、脳梗塞病態をより忠実に再現した動物モデルを用い、梗塞後の炎症過程における病態生理をより詳細に理解し、新しい治療法の開発につなげることを目的とした。

病態再現においては、これまで問題となることの多かったペナンプラにおける梗塞巣拡大を忠実に再現することや、炎症過程に重要である虚血後再灌流における血流量を十分に維持することが重要だと考えた。これまでの脳梗塞モデルには、内頸動脈を遮断する一過性脳虚血モデルが多く用いられてきた。この病態モデルは、安定した梗塞巣を作製できるなどの点において非常に優れており、多くの貴重な知見をもたらした。しかし、広範囲における血流の完全遮断により、大きな梗塞巣ができ、ペナンプラ領域が現れにくくなる問題や、血流遮断操作時に、総頸および内頸動脈の血管内皮が傷つき、再灌流後の脳血流が低下する問題などにより、虚血時の血流分布や再灌流過程が実際の病態と異なってしまう恐れがある。このため、脳梗塞後の炎症過程を忠実に反映しきれない可能性が指摘されていた。そこで、マウス血液から作製した血栓を、外頸動脈を経由して注入することで、梗塞巣を作製するモデルを用いることを考えた。この病態モデルでは、微小血管を梗塞させることで、小さな梗塞巣とその周囲のペナンプラを作製でき、また頸部の主要な動脈を損傷しないため、二次的な血流低下が起きにくいと考えられる。この病態モデルを用いて、脳梗塞後の炎症過程の細胞動態についての蛍光イメージングを行う。蛍光イメージングでは、主に神経細胞とアストロサイトのカルシウムイメージングにより細胞の活動動態を捉えることに加え、アストロサイトが放出する細胞外シグナル分子である ATP のイメージングにより、アストロサイトの周囲の細胞への作用も可視化する。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデル

脳梗塞病態のより忠実な再現のため、血液から作製した血栓を用い、梗塞を作製する。この際、血栓注入のためのライン留置操作などにより、血流途絶や血管内皮損傷が内頸動脈に起こると、脳血流が低下し、実際の脳梗塞病態とは異なってしまう。このため、外頸動脈から逆行性に血栓を導入する手法を用いた(図1)。

(2) 脳梗塞後の神経細胞およびグリア細胞の活動可視化

細胞の活動動態可視化には、高感度蛍光カルシウムインジケータ YCnano50 を用いた。カルシウムインジケータの遺伝子配列を、マウ

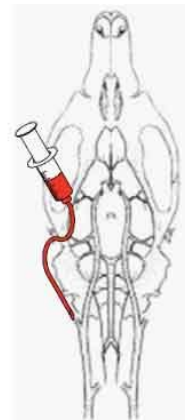


図1: 逆行性血栓注入

スの β -actin 遺伝子座にノックインし、インジケータの大量発現を実現した。目的とする細胞種にカルシウムインジケータを発現したマウスに対し、蛍光実体顕微鏡および二光子励起顕微鏡を用いて、細胞レベルでの活動動態イメージングを行った。蛍光イメージング中に血栓塞栓を行うことで、梗塞直後の細胞の活動動態を可視化した。

(3) 脳梗塞後のグリア細胞と神経細胞の相互作用の解明

アストロサイトから放出されるグリオトランスミッターである ATP に注目し、脳梗塞後の細胞外 ATP 動態を可視化することで、グリア細胞と神経細胞の相互作用を捉える。ATP イメージングには、ATP 結合タンパクと赤色蛍光色素を融合させた、ハイブリッド型の蛍光インジケータを使用した(図2)。大脳皮質に ATP インジケータを導入し、梗塞直後の梗塞巣拡大時に、アストロサイトから放出される ATP が神経保護作用を示すことを可視化解析する。前段で捉えた神経細胞やアストロサイトの動態と比較し、アストロサイトの神経保護作用を捉える。

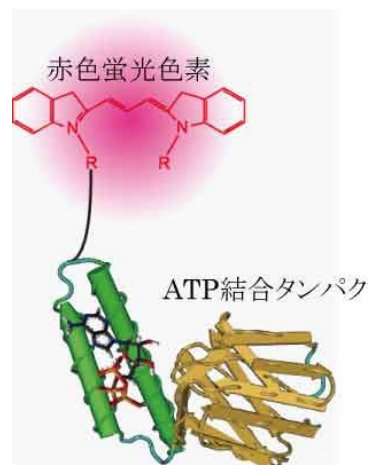


図2: ATPインジケータ

4. 研究成果

(1) 脳梗塞モデル

作製した血栓を、外頸動脈を逆行させて内頸動脈から脳内に導入することで、梗塞巣を作製することに成功した。この脳梗塞モデルにより作製される梗塞巣は、脳全体に梗塞巣のみが広がるものではなく、局所的な梗塞巣から血流の途絶えていない領域までを含むものであった。これらの梗塞巣およびその周辺領域の詳細は脳透明化や MRI を用いて確認することができた(図3)。

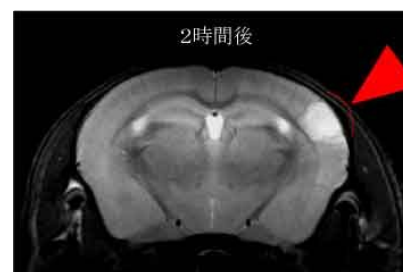


図3: 梗塞巣

(2) 脳梗塞後の神経細胞およびグリア細胞の活動可視化

蛍光カルシウムイメージングを行うことで、脳梗塞前後における神経細胞とアストロサイトの活動を可視化に成功した(図4, 図5)。脳は、特定の情報を処理する領域がそれぞれ決まっているため、処理する情報の種類によって、特定の神経活動パターンが見られる(図6)。しかし、脳梗塞後の脳は、高度な活動パターンを示さず、かつ見られたカルシウムシグナルは遷延することが分かった。

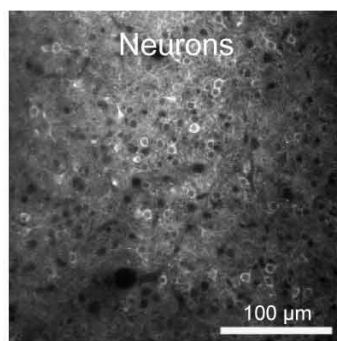


図4: カルシウムインジケータ(神経細胞)

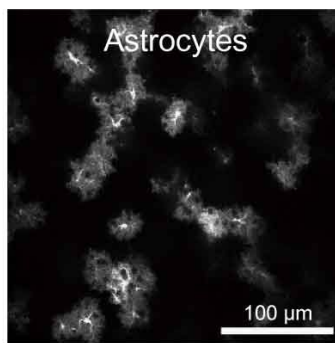


図5: カルシウムインジケータ(グリア細胞)

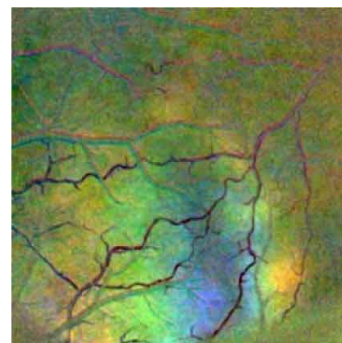


図6: 神経活動パターン

(3) 脳梗塞後のグリア細胞と神経細胞の相互作用の解明

蛍光イメージングを用いて、神経活動によりグリア細胞の活動と、グリオトランスミッターである細胞外 ATP 濃度の上昇が引き起こされることを可視化した。細胞外 ATP 濃度の上昇は、神経活動を強く抑制するため、グリア細胞は、神経活動の抑制を通して、神経細胞保護の働きを持つ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nami Kitajima, Kenji Takikawa, Hiroshi Sekiya, Daisuke Asanuma, Hirokazu Sakamoto, Shigeyuki Namiki, Masamitsu Iino, Kenzo Hirose	4. 巻 11(11)
2. 論文標題 In vivo Fluorescence Imaging of Extracellular ATP in the Mouse Cerebral Cortex with a Hybrid-type Optical Sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Protoc.	6. 最初と最後の頁 e4046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4046	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 Kitajima N, Takikawa K, Sekiya H, Satoh K, Asanuma D, Sakamoto H, Takahashi S, Hanaoka K, Urano Y, Namiki S, Iino M, Hirose K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Real-time in vivo imaging of extracellular ATP in the brain with a hybrid-type fluorescent sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 e-Life	6. 最初と最後の頁 e57544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.57544.	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 Tatsuya C. Murakami, Tomoyuki Mano, Shu Saikawa, Shuhei A. Horiguchi, Daichi Shigeta, Kousuke Baba, Hiroshi Sekiya, Yoshihiro Shimizu, Kenji F. Tanaka, Hiroshi Kiyonari, Masamitsu Iino, Hideki Mochizuki, Kazuki Tainaka & Hiroki R. Ueda	4. 巻 21(4)
2. 論文標題 A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 625-637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-018-0109-1.	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 -

1. 著者名 Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A & Ueda HR.	4. 巻 24(8)
2. 論文標題 Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2196-2210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.07.056.	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北島 奈美, 瀧川 健司, 関谷 敬, 浅沼 大祐, 坂本 寛和, 並木 繁行, 飯野 正光, 廣瀬 謙造
2. 発表標題 脳虚血における細胞外ATP動態の生体内蛍光イメージング
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北島 奈美, 瀧川 健司, 関谷 敬, 浅沼 大祐, 坂本 寛和, 並木 繁行, 飯野 正光, 廣瀬 謙造
2. 発表標題 大脳皮質における細胞外ATP動態のin vivo蛍光イメージング
3. 学会等名 生理学研究所研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北島 奈美, 瀧川 健司, 関谷 敬, 並木 繁行, 飯野 正光, 廣瀬 謙造
2. 発表標題 大脳皮質における細胞外ATP動態のin vivo蛍光イメージング
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 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
---------	---------