

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03769

研究課題名(和文) 脳虚血耐性獲得機序の新展開-ATP受容体を介する細胞内分子機構と細胞間相互作用-

研究課題名(英文) New developments in the mechanism of acquisition of cerebral ischemic tolerance: intracellular molecular mechanisms and interactions mediated by ATP receptors.

研究代表者

木内 博之 (Kinouchi, Hiroyuki)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：30241623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：虚血耐性現象においてミクログリアやアストロサイトなどがP2受容体などでクロストークを行いながら、各々の形質を変化させ、保護効果を発揮すると予測されるが明らかとなっていない。これをマウス一過性中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルにおいて、コロニー刺激因子1受容体(CSF1R)拮抗薬(PLX5622)によって誘導される薬理的ミクログリア枯渇が、preconditioning後の神経保護効果およびアストロサイトの活性化を惹起できるかどうかを検討した。その結果、アストロサイト誘導性虚血耐性現象において、ミクログリアは傷害性アストロサイトの増殖を抑制し、耐性獲得へ寄与するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では以下の重要な知見が明らかになった。

1) ミクログリアはpreconditioningによる虚血耐性現象誘導に必須である。2) ミクログリアはpreconditioningを感知し、アストロサイトを虚血抵抗性の表現型へ変化させる。3) ミクログリアは保護反応性アストロサイトを誘導するだけでなく、神経毒性表現型への変化も抑制する。これらを総合すると、虚血耐性の誘導には、preconditioning時点でのミクログリアの存在と、それに続くミクログリア-アストロサイト相互連関が不可欠であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Astrocyte-mediated ischemic tolerance has attracted much attention recently as a neuroprotective mechanism induced by ischemic preconditioning (IPC). The interaction between microglia and astrocytes is expected to play an important initiator; however, it has not been elucidated. We investigated whether pharmacological microglial depletion induced by a colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) antagonist (PLX5622) could induce neuroprotective effects and astrocyte activation after preconditioning in a transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) model mouse. We investigated whether pharmacological microglial depletion induced by antagonist (PLX5622) can induce neuroprotective effects and astrocyte activation after preconditioning. The results suggest that microglia inhibit proliferation of injurious astrocytes and contribute to the acquisition of tolerance in the astrocyte-induced ischemic tolerance phenomenon.

研究分野：脳虚血耐性

キーワード：脳梗塞 脳虚血耐性 グリア細胞 アストロサイト ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

虚血耐性は、軽微な虚血の前負荷 (**preconditioning**)により、引き続き致死的負荷に対して抵抗性を獲得する現象であり、その強力な神経細胞保護効果は、脳梗塞治療開発の観点から注目を集めており、その機序解明に向けて精力的に研究が進められている。これまで、熱ショック蛋白、神経系栄養因子、アポトーシス抑制因子などの関与が報告されているが、これらの因子だけで虚血耐性のすべてを説明できないことも明らかとなっており、神経系全体に視点を移した研究が必要と考えられるようになった。

ATP 受容体 (**P2** 受容体)には、チャネル型 **P2X** と代謝型 **P2Y** の 2 種類が存在し、前者は非選択性陽イオンチャネルを形成し、これまで 7 種類 (**P2X1** ~ **7**)が同定され、一方、後者は、**G** 蛋白共役型で 8 種 (**P2Y1, 2, 4, 6, 11** ~ **14**)が明らかになっている。中枢神経系のすべての細胞はこれら **P2** 受容体いずれかのサブタイプを発現しており、神経細胞のシナプス伝達に参与するだけでなく、神経-グリア間やグリア同士の主要な伝達物質 (グリア伝達物質)としても機能している。すなわち、生理的狀態では、アストロサイトから放出された **ATP** がアストロサイト-神経間の液性情報伝達物質として働き、シナプス伝達を極めてダイナミックに調節している。この **ATP** の生理的機能に加えて、虚血後に神経細胞やグリアから放出される細胞外 **ATP** の増加は、グルタミン酸の放出の促進や、**Ca²⁺**流入を促進しアポトーシス経路を活性化することが報告されている。このグルタミン酸の刺激は **NMDA** 受容体、**NR2A** を介して **cAMP** 配列結合性蛋白質 (**CREB**) を活性化し虚血耐性獲得の鍵を握るとされており、その上流に存在する **ATP** は、虚血耐性獲得の端緒となることが予想される。しかしながら、神経細胞における **ATP** のシグナル経路の役割については、虚血耐性はもちろんのこと虚血性障害においても未だ明らかにされていない。

また、近年の脳虚血研究においては、全神経系細胞を含む **neurovascular unit** をターゲットとした治療戦略の重要性が認識され、グリアの役割について注目を集めている。**ATP** はこの制御において重要な役割を担い、例えば、障害された神経細胞から漏出した **ATP** が、**P2Y1** 受容体を介してアストロサイトを活性化し、神経栄養因子が分泌され、神経保護作用が発揮されることが明らかにされた。我々は、非致死的虚血負荷により放出された **ATP** が **P2X7** 受容体を介してアストロサイトを活性化し、これにより、アストロサイトが **hypoxia inducible factor (HIF)-1** を分泌し、神経細胞を保護することを初めて明らかにし、グリア誘導性虚血耐性として報告した。一方、ミクログリアは、脳内微小環境を絶えずモニタリングし、様々な変化に対して初期応答する。脳虚血で、**ATP** が細胞外に放出され **P2Y12** 受容体に結合すると、ミクログリアは傷害部位へと遊走し、活性化される。この活性化には、**tumor necrosis factor** などを分泌する傷害型と、神経栄養因子を分泌する保護型の 2 つがあり、最近の我々の研究で保護型への転換には **P2Y1** 受容体が重要であることが解明された。このように、ミクログリアは **P2** 受容体を介して活性化型に分化して神経細胞機能を修飾している可能性が示されており、グリア誘導性虚血耐性の開始に参与することが予想されている。

上述の通り、虚血耐性現象において **neurovascular unit** ではミクログリアやアストロサイトなどがクロストークを行いながら、各々の形質を変化させ、結果として保護効果を発揮すると予測される。しかし、この相互連関は全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アストロサイトが介在する虚血耐性において、**preconditioning** を感知するミクログリアがアストロサイトの表現型変化の引き金になる、という仮説を検証することである。マウス一過性中大脳動脈閉塞 (**MCAO**)モデルにおいて、コロニー刺激因子 1 受容体 (**CSF1R**)拮抗薬 (**PLX5622**)によって誘導される薬理学的ミクログリア枯渇が、**preconditioning** 後の神経保護効果およびアストロサイトの活性化を惹起できるかどうかを検討した。さらに、**preconditioning** 後の反応性アストロサイトの表現型に対する **PLX** 投与の影響を検討した。

3. 研究の方法

動物

動物を用いたすべての実験手順は、米国国立衛生研究所 (NIH) のガイドラインに従い、山梨大学動物実験委員会の承認を得て実施した。体重 20-25g の雄性 C57Bl/6 マウス (日本 SLC) を標準的な光条件下で飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。

マウス一過性脳局所虚血モデル

マウスを用いた一側性脳局所虚血モデルは、右中大脳動脈フィラメント閉塞法により行った。マウスを 5% (v/v) セボフルランで麻酔し、フェイスマスクを用いて 2.5% (v/v) セボフルランで維持した。手術中は酸素濃度 30%に維持した。直腸温を記録し、36.0 ~ 36.5 に保った。頸部を切開し、総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を剥離した。その後、外頸動脈を結紮し、シリコン被覆モノフィラメント縫合糸を近位外頸動脈から内頸動脈に挿入し、さらに Willis 輪に挿入して中大脳動脈を閉塞した。中大脳動脈を **preconditioning** として 15 分間、致死的虚血として 50 分間閉塞した後、縫合糸を引き抜き、虚血部位の再灌流を可能にした。マウスは麻酔から自然に覚醒し、水と餌を自由に摂取できるようにした。Sham operation では、中大脳動脈を閉塞する

ことなく同様の外科的処置を実施した

PLX5622 による処理

選択的 CSF1R 拮抗薬 PLX 5622 (Plexxikon, Berkley, CA) は経口にてマウスへ投与した。ミクログリア欠失のため、preconditioning の 7 日前 (1~7 日目) から PLX を連日投与し、preconditioning の直後に PLX を飼料から除去した。対照マウスには、PLX 以外は同じ組成の AIN-93M を与えた。

脳梗塞体積

脳梗塞の大きさは、1) 通常食マウス、preconditioning(-)、2) 通常食マウス、preconditioning(+)、3) PLX 食マウス、preconditioning (+)、の 3 群へ致死虚血を与えて比較した (図 2A) ペントバルビタール (100 mg/kg, i.p.) で麻酔し、リン酸緩衝生理食塩水で経心的に灌流した。脳を摘出し、前脳を 2mm 厚の冠状切片にスライスしたのち、2% (w/v) 2, 3, 5-TTC (Sigma-Aldrich) 生理食塩水で 37 °C、10 分間染色 (TTC 染色) しデジタルスキャンした。脳スライスの梗塞体積は Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD) を用いて測定した。梗塞の大きさは、実験コホートを盲検化した観察者が解析した。

神経学的スコア

神経学的症状は、Longa の 5 段階評価スケールを用いて以下のように評価した。

0: 正常、**1**: 尾で動物を持ち上げた後の胴体と対側前肢の屈曲、**2**: 対側へ旋回するが安静時は正常姿勢、**3**: 安静時に対側ヘリクライニング、**4**: 自発運動がない。スコアは致死虚血後 **24** 時間後に測定した。

免疫染色

マウスは preconditioning 後 7 日目に深麻酔下で PBS 中 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を経心灌流した。脳を摘出し、4% PFA で 24 時間後固定したのち、ビブラトーム (VT1200; Leica, Solms, Germany) で冠状切片 (厚さ 40 μ m) に切り出した。切片は以下の一次抗体とともに 4 °C で一晩インキュベートした: GFAP (1:500; Invitrogen, #13-0300, Carlsbad, CA)、Iba1 (1: 250; Wako, #011-27991, Osaka, Japan)、P2X7 受容体 (1:500; Alomone, #APR-008, Jerusalem, Israel)、C3d (1:500; Dako, #A0063, Glostrup, Denmark)。切片洗浄後、適切な Alexa 488 または Alexa 546 (1:250, Invitrogen) と室温で 1 時間インキュベートした。蛍光画像は、共焦点レーザー顕微鏡システム (A1R HD25; ニコン、東京、日本) で撮影した。

Preconditioning 後のアストロサイト活性化および表現型の誘導における、ミクログリア欠失の影響を明らかにするために、GFAP を発現している活性化アストロサイトを 4 つの群で評価した: **1) sham operation** を受けた対照食投与マウス、**2) sham operation** を受けた PLX 投与マウス、**3) preconditioning** を受けた通常食マウス、**4) preconditioning** を受けた PLX 投与マウス (Fig. 3A)。PLX 投与群では preconditioning 直後に PLX を食事から除去し中止し、sham operation または preconditioning の 7 日後に脳サンプルを採取した。

免疫染色の定量分析

免疫染色の陽性細胞数は、実験コホートを盲検化した観察者により、同側大脳皮質野のプレグマのレベルで無作為に選択した 3 つの異なる領域 (3 \times 10-2 mm²) で計数し、平均した。

統計解析

Tukey の多重比較検定を用いた一元配置分散分析 (ANOVA) により、複数群を解析した。2 群間の平均値の比較は、対応のない Student の t 検定によって行った。p<0.05 の値を統計的に有意とみなした。

4. 研究成果

PLX5622 を用いたミクログリア欠失

PLX を用いたミクログリアの欠失と、投与中止に伴う再増殖が確認された (図 1)。マウスに PLX を 7 日間連続投与したところ、マウス脳全体のミクログリアが 93.4% 消失した。動物を通常の飼料に戻すとミクログリアは再増殖し、PLX 投与中止 7 日後にはミクログリアの数が投与前のレベル (126.5%) へと戻った (図 1.B,C,D)。

ミクログリア欠失は preconditioning の保護効果を消失させた

15 分間の preconditioning では TTC 染色で梗塞は起こらず (データは示さず) 50 分間の致死虚血に対して強い保護効果を誘導した。通常食マウスでは、致死虚血の 1 日後の梗塞体積は、preconditioning を行ったマウスにて有意に小さく (P<0.001, 図 2B および C) 神経学的スコアも有意に良好であった (P<0.05, 図 2D)。PLX 食マウスでは、致死虚血に対する preconditioning の耐性効果が低下し、TTC 染色で有意に梗塞体積は拡大し、通常食マウスと比較し神経学的スコアが悪化した (P<0.01, 図 2B-D)。

Preconditioning 後のアストロサイト活性化はミクログリア欠乏によって増強した

脳切片を GFAP で染色したところ、sham operation では通常投与群だけでなく PLX 投与群においてもアストロサイトの活性化は誘導されなかった (図 3B)。preconditioning 単独で梗塞は誘導されなかったが、preconditioning 後 7 日で同側の大脳皮質と基底核で GFAP が増大した。preconditioning を受けたマウスの反応性アストロサイト数は、通常食投与群 ($P < 0.01$) および PLX 投与群 ($P < 0.001$) とともに sham operation マウスよりも有意に多かった。さらに、PLX 投与は preconditioning 後のアストロサイト活性化を著しく増強した。 ($P < 0.001$ 、図 3B、C)。

ミクログリア欠乏は preconditioning 後のアストロサイト表現型を変化させた

反応性アストロサイトにおける C3d (神経毒性アストロサイトマーカー) の発現は、通常食マウスではかすかに観察されたが、PLX 投与マウスでは顕著であった。GFAP と C3d の共陽性細胞数は、PLX 投与マウスでは通常食投与マウスに比べて有意な増加を示した ($P < 0.001$ 、Fig. 4 A および B)。対照的に、反応性アストロサイトにおける P2X7 受容体 (保護アストロサイトマーカー) の発現は、PL 投与により減少した。二重免疫染色の定量的解析により、PLX 投与群における P2X7 受容体陽性の反応性アストロサイトの数は、対照食投与群よりも有意に少なかった (図 5A および B)。

Figure 1

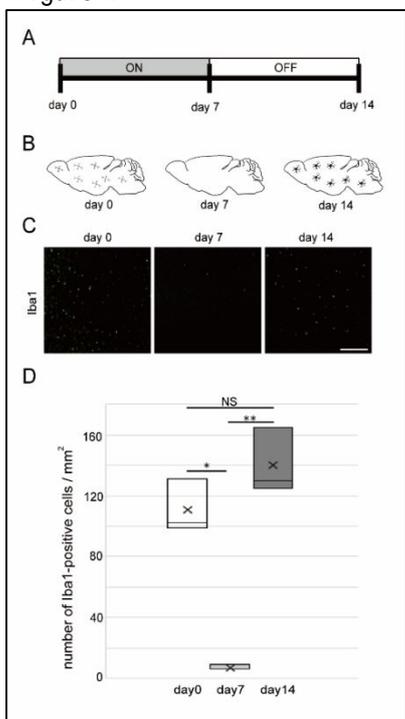


Figure 2

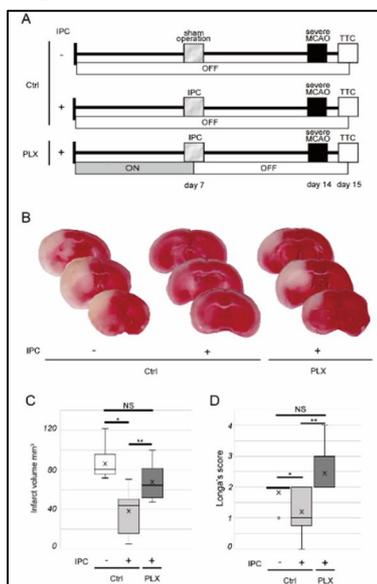


Figure 3

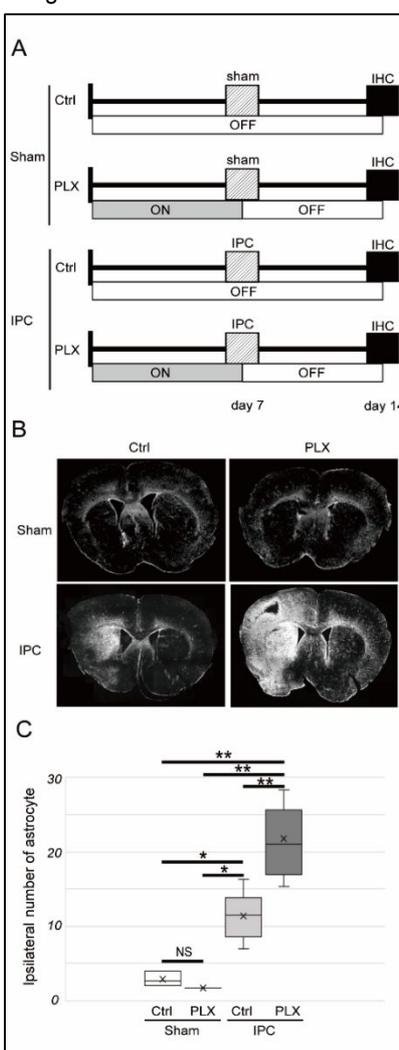


Figure 4

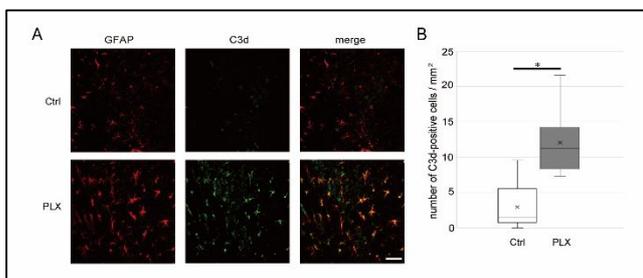
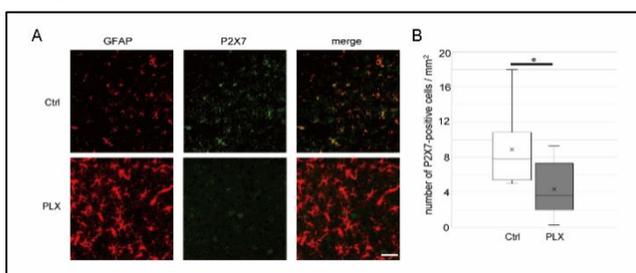


Figure 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舘岡達、吉岡秀幸、若井卓馬、橋本幸治、福田憲人、小泉修一、木内博之
2. 発表標題 アストロサイト誘導性虚血耐性現象におけるミクログリアの役割
3. 学会等名 Stroke 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舘岡達、吉岡秀幸、若井卓馬、橋本幸治、福田憲人、小泉修一、木内博之
2. 発表標題 アストロサイト誘導性虚血耐性現象におけるミクログリアの役割
3. 学会等名 第40回 山梨神経科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舘岡達、吉岡秀幸、若井卓馬、橋本幸治、福田憲人、小泉修一、木内博之
2. 発表標題 アストロサイト誘導性虚血耐性現象におけるミクログリアの役割
3. 学会等名 第22回 日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舘岡達、吉岡秀幸、若井卓馬、橋本幸治、福田憲人、小泉修一、木内博之
2. 発表標題 アストロサイト誘導性虚血耐性現象におけるミクログリアの役割
3. 学会等名 第81回 脳神経外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舘岡達、吉岡秀幸、若井卓馬、橋本幸治、福田憲人、小泉修一、木内博之
2. 発表標題 アストロサイト誘導性虚血耐性現象におけるミクログリアの役割
3. 学会等名 第22回 日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舘岡達、吉岡秀幸、若井卓馬、橋本幸治、福田憲人、小泉修一、木内博之
2. 発表標題 アストロサイト誘導性虚血耐性現象におけるミクログリアの役割
3. 学会等名 第65回 日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Tateoka, Hideyuki Yoshioka, Takuma Wakai, Koji Hashimoto, Norito Fukuda, Schuichi Koizumi, Hiroyuki Kinouchi
2. 発表標題 Microglia Initiated Astrocyte-Mediated Ischemic Tolerance
3. 学会等名 Brain and Brain PET 2023
4. 発表年 2023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 分担 者	小泉 修一 (Koizumi Schuichi) (10280752)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	吉岡 秀幸 (Yoshioka Hideyuki) (20402076)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	

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