

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15895

研究課題名(和文)脳梗塞によって脳の水チャネル分子アキアポリン4の局在が変化する機序の解明

研究課題名(英文)The mechanisms of the dysregulation of brain water channel aquaporin 4 (AQP4) after acute ischemic stroke in mice brain

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いた研究から、脳梗塞3時間後、脳の水チャネル分子であるアキアポリン4が血管内皮から細胞体へ移行する様子(非局在化)を観察した。一方、アドレナリン受容体を阻害した場合は、非局在化はみられなかった。さらに、脳表に直接、アドレナリン受容体を作動する薬を添加することによって、3時間後に有意なアキアポリン4の非局在化を引き起こした。この際、脳の炎症性マーカーであるグリア線維性酸性タンパク質には顕著な変化は生じなかったが、ミクログリアのマーカーであるIba-1の発現が亢進し、ミクログリアの形態も顕著に変化した。この結果は、脳梗塞後のAQP4の非局在化にミクログリアが関与する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳脊髄液と間質液の交換は、正常な脳内環境を維持するのに重要な役割を果たしており、脳梗塞をはじめとする脳血管障害やアルツハイマー病に代表される神経変性疾患との関わりが示唆されています。また、アキアポリン4は、脳脊髄液と間質液の交換の駆動力として働く分子として注目されています。私達の研究成果が今後、脳梗塞やアルツハイマー病のメカニズムの更なる理解や、ひいては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)：In this research, we induced AQP4 dysregulation by the topical application of AdR agonist to the anesthetized living mouse cortex. We proposed the analysis method to evaluate the AQP4polarization using double immunohistochemistry staining with AQP4/Lectin and AQP4/glutamate synthetase. As a result, we found that AQP4polarization was significantly decreased by applying beta AdR agonist, isoproterenol, for 3 hours. Furthermore, the application of isoproterenol also induced a significant increase of microglia immunofluorescence, Iba-1, whereas no apparent change in astrocytes reactivity, GFAP.

研究分野：神経科学

キーワード：アストロサイト 大脳皮質 光血栓法 マウス アドレナリン受容体 ミクログリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳は頭蓋骨の中で脳脊髄液と呼ばれる無色透明な液体に浸っており、脳細胞を取り巻く間質液と交換することで、脳内環境の維持に重要な役割を果たしている。脳卒中や外傷性脳損傷などの脳血管障害では、脳血流の低下だけでなく、脳脊髄液と間質液の交換が低下する。これまで研究代表者は、アドレナリン受容体の拮抗阻害薬の投与によって脳梗塞後の脳脊髄液の流れを改善することで、細胞外カリウムイオン濃度の正常化が促進し、脳組織損傷が最小限に抑えられることを報告してきた(毛内ら, 2019, PNAS)。

さらに研究代表者らは、髄液の流れに、脳の水チャネル分子であるアクアポリン4が関与することを明らかにしてきた(Mestre, 毛内ら, 2018, eLife)。一方、脳梗塞発生3時間後には、このアクアポリン4の標識が50%程度まで減少することを、マウスで免疫組織化学染色法を用いた研究から報告してきた(毛内ら, 2019, PNAS)。

脳細胞の一種であるアストロサイトは、足突起と呼ばれる構造により血管を取り巻いており、血液脳関門を形成している。アクアポリン4は、アストロサイトの足突起に偏って存在しており、その局在性によって水の駆動力を生み出していることが示唆されている。一方、脳血管障害時、アストロサイトの足突起が、血管から解離することや、アクアポリン4の局在変化が生じることが断片的に報告されてきた。他方、研究代表者らは、アドレナリン受容体の拮抗阻害薬の投与によってアクアポリン4の標識が維持されることを報告してきた(毛内ら, 2019, PNAS)。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは未解明であった。

## 2. 研究の目的

脳梗塞によって生じるアクアポリン4の標識の変化が、アクアポリン4分子がアストロサイトの足突起から細胞体部へと移行する「非局在化」のプロセスによって生じ、その機序にアドレナリン受容体が関与すると予想し、これを検証する。

## 3. 研究の方法

レーザーを用いた光血栓法によって、大脳皮質に局所的に脳梗塞を引き起こしたマウス脳のアクアポリン4と血管内皮細胞(レクチン)およびアクアポリン4とアストロサイトの細胞体(グルタミン合成酵素)を免疫組織化学染色の手法を用いてそれぞれ共染色することにより、アクアポリン4の非局在化を評価した。

## 4. 研究成果

脳梗塞3時間後で、アクアポリン4が血管内皮から細胞体へ移行する様子が観察された。一方、アドレナリン受容体を阻害した場合は、非局在化はみられなかった。さらに、頭蓋骨を切除し、脳表に直接、アドレナリン受容体の作動薬を添加した場合、3時間後には有意なアクアポリン4の非局在化が引き起こされることを明らかにした(図1)。この際、脳の炎症性マーカーであるグリア線維性酸性タンパク質(GFAP)には顕著な発現変化は生じなかったが、ミクログリアのマーカーであるIba-1の発現が亢進し、ミクログリアの形態が顕著に変化することを見出した。以上の知見は、脳梗塞後のAQP4の非局在化にミクログリアが関与する可能性を示唆している。

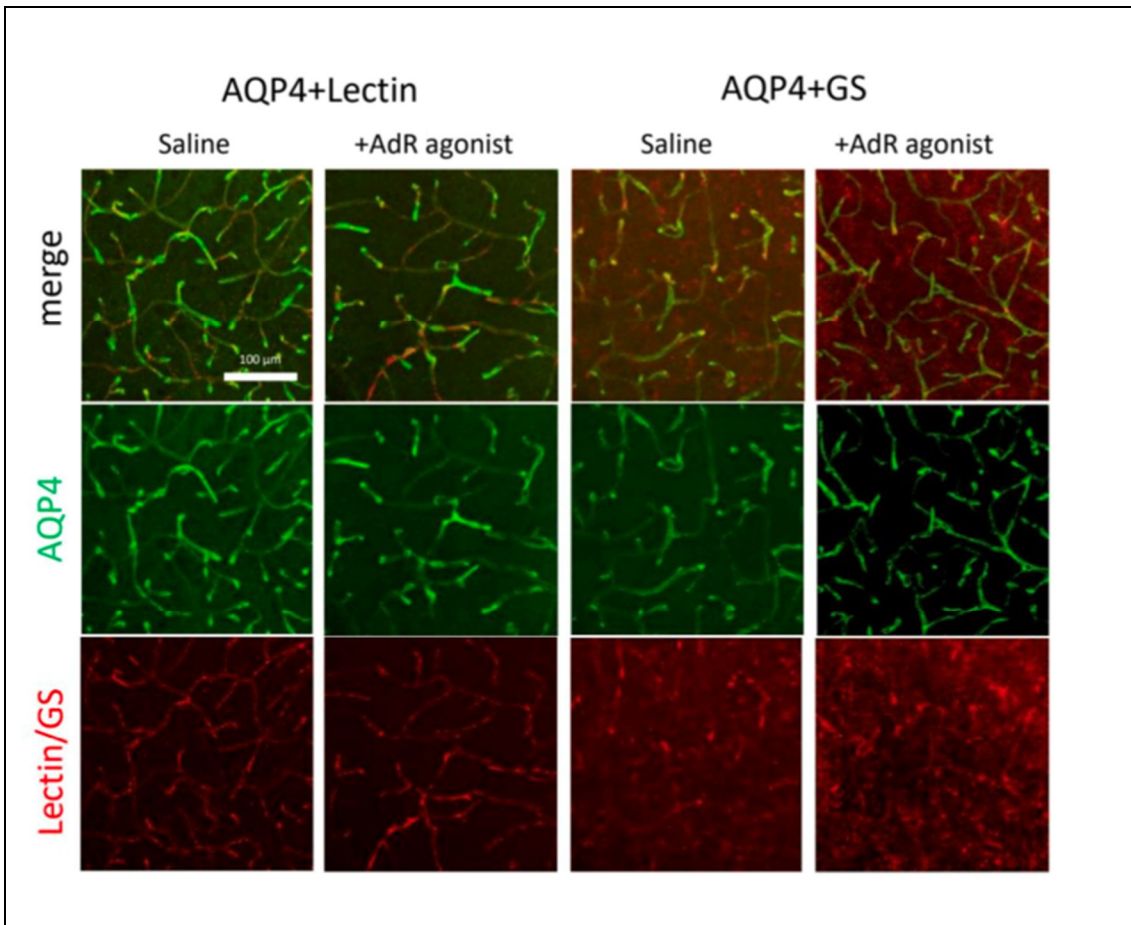


図 1. アドレナリン受容体作動時のアクアポリン 4 の局在変化  
 生理食塩水 (Saline) とアドレナリン受容体作動薬 (Saline + AdR agonist) を投与した場合の、アクアポリン 4 (緑) と血管内皮細胞 (Lectin, 赤) および、アストロサイト細胞体 (GS, 赤) とを免疫組織化学染色法によって共染色した (スケールバー:100  $\mu\text{m}$ )

## 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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Monai Hiromu	4. 巻 71
2. 論文標題 Transcranial cortex-wide fluorescence imaging through a fully intact skull, as a powerful tool for functional mapping: less invasive macroscopic imaging of cortical Ca <sup>2+</sup> dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Natural Science Report, Ochanomizu University	6. 最初と最後の頁 39-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Monai Hiromu, Koketsu Shinnosuke, Shinohara Yoshiaki, Ueki Takatoshi, Kusk Peter, Hauglund Natalie L., Samson Andrew J., Nedergaard Maiken, Hirase Hajime	4. 巻 11
2. 論文標題 Adrenergic inhibition facilitates normalization of extracellular potassium after cortical spreading depolarization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87609-w	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 森田笑子, 毛内拓
2. 発表標題 Microglial involvement in the dysregulation of aquaporin-4 after acute adrenergic receptor agonism.
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aoi Gohma
2. 発表標題 Refractive indexes estimation of living tissues using spherical aberration correction
3. 学会等名 11th Ewha-JWU-Ochanomizu Joint Symposium 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛内拓, 平瀬肇
2. 発表標題 脳損傷に伴う異常なCa <sup>2+</sup> 波の伝播と回復の可視化
3. 学会等名 第29回日本バイオイメーシング学会 学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛内拓
2. 発表標題 健康な脳機能を支える脳内ロジスティクス
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 毛内 拓	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 272
3. 書名 脳を司る「脳」 最新研究で見えてきた、驚くべき脳のはたらき	

〔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