

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591276

研究課題名(和文)代謝ストレス応答を介したアストロサイトの糖尿病性脳症に対する保護機構の解明

研究課題名(英文) Astrocytic neuroprotective mechanism against diabetic encephalopathy through metabolic stress response

研究代表者

高橋 慎一 (Takahashi, Shinichi)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20236285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高グルコース環境は培養アストログリアにおいてminor pathwayの1つHBP亢進に伴ってERストレスを惹起し、Keap1/Nrf2システムを介して別のminor pathwayであるPPPの律速酵素glucose 6-phosphate dehydrogenaseを誘導する。糖尿病における炎症の関与が知られているが、LSP刺激がMAPKを介してPPPを活性化することは、アストログリアのTLR4刺激を介した細胞障害に対する保護機構と考えられた。ケトン体産生はアストログリアにおいて高率で、神経細胞のTCAサイクルのエネルギー代謝を維持する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Astroglia play a pivotal role in the brain glucose metabolism. In particular, the astroglial metabolic compartment exerts supportive roles in making neurons dedicated to generating action potentials and protects them against oxidative stress associated with high energy consumption. Thus, the metabolic responses of the astroglia in patients with diabetes mellitus (DM) would be neuro-protective. DM induces numerous metabolic derangements, resulting in irreversible neuronal damage. Therefore, the metabolic responses of the astroglia in the early stage of DM could be either protective or deleterious. In this project, we focused on three major metabolic responses: 1) glucose, 2) inflammatory 3) fatty acid. A better understanding of the astroglial metabolic response in normal physiological state may be expected to lead to the development of a novel strategy in DM-associated encephalopathy.

研究分野：脳卒中

キーワード：糖尿病 認知症 アストロサイト アストログリア

1. 研究開始当初の背景

脳機能を支えるのは高率なエネルギー産生能であり、D-グルコースのみをエネルギー基質とした酸化的糖代謝による ATP 産生が不可欠である。脳は成人体重の約 2% を占める臓器であるが、酸素消費は全身の 20%、グルコース消費は 25% を占め、代謝ストレスの結果発生する活性酸素 (ROS) が組織障害をもたらす。正常酸素分圧下で問題になる代謝ストレスとして高血糖に伴うグルコース・ストレスも重要である。本邦の糖尿病 (疑いを含め) 患者数は約 2210 万人と推定され、脳卒中に代表される糖尿病性大血管症は大きな社会問題である。同時に、糖尿病は認知症のリスクであることが疫学的に明らかにされており、大血管症としての脳卒中が引き起こす脳血管性認知症の他、細小血管症とも連動した代謝障害をもたらす神経障害が想定される。糖尿病患者では、MRI による計測により側頭葉の萎縮が示されており、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病モデル動物では、海馬顆粒細胞を中心に酸素ストレスを反映する lipofuscin の蓄積が観察されている。これらは、高血糖が、1) 脳細小血管症を介した微小循環障害、2) 脳実質細胞への高グルコース・ストレス、を惹起する可能性を示唆する。脳の微小血管とニューロン、これを解剖学的に架橋するアストロサイトは、脳循環代謝 (酸素/グルコース代謝) の機能的単位 (NVU) を構成することから、脳内において 1) 2) は分かちがたく、特にアストロサイトの機能変化の検討が重要である。我々は、これまで脳の主要な構成細胞であるニューロンとアストロサイトにおけるグルコース代謝のコンパートメント機能 (astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis)、ニューロンの活動を反映したアストロサイトを介した脳微小循環の制御機能等について検討し、アストロサイトの機能障害が primary に脳機能障害を引き起こす“アストログリオパシー”と呼ぶべき疾患の存在を提唱するに至った。糖尿病性脳症は、元来アストロサイトが有する高グルコース、酸化ストレスに対する防御機能が破綻した結果生じる NVU 障害であると推測している。本研究は、糖尿病の代謝ストレスに対する脳保護機構としてのアストロサイトの応答メカニズムを明らかにし、その破綻により生じる脳症 (認知症) に対する治療戦略を確立することを目的に立案された。

2. 研究の目的

アストロサイトとニューロンの機能分担を細胞レベルで明らかにすることは in vivo では困難であるため、まず本研究は in vitro の培養細胞系から実施する。これまでにニューロンとアストロサイトにおける急性/慢性高血糖モデルとして、細胞外液中のグルコース濃度を正常濃度である 2 から 10、20 mM に増加 (生物学的不活性型 L-グルコースの混

合により浸透圧は一定に保持した高グルコース・ストレス) させた際に、ニューロンの酸化的グルコース代謝は直線的に増加し、これに伴う ROS 産生率 (DCF による蛍光シグナルとして定量) も増加するが (酸化ストレス)、アストロサイトにおいては減少することを報告した。ニューロンとアストロサイトの共培養系においては、高血糖時 ROS の増加全体が抑制されていることより、この現象は脳内におけるアストロサイトがもたらす代謝ストレスへの防御反応の反映であると考えられた。そのメカニズムとして 1) グルタチオン (GSH/GSSG) の合成系がアストロサイトにおいてニューロンの数倍 active であること、2) 還元型グルタチオン (GSH) を維持するためのペントースリン酸経路 (PPP) 活性が高グルコースにより誘導されることを示した。急性高グルコースのみならず亜急性~慢性高グルコース条件は、ニューロンではグルコースの酸化的代謝率を変化させないが、アストロサイトにおいて減少し、TCA サイクルへの flux が減少すると同時に解糖系活性が亢進し、乳酸の放出を増加させる。さらにそのシャント経路である PPP 活性を亢進させることが判明した。以上の基礎研究を踏まえ、本研究期間には、1) PPP の律速酵素である G6PDH の高血糖条件における活性化メカニズムを明らかにし、さらに in vivo 系への応用として 2) STZ 誘発糖尿病モデル動物を用いた検討を行う。現時点では、高血糖に伴うグルコース代謝変化に伴う代謝産物が引き起こす小胞体 (ER) ストレスと Keap1/Nrf2 system のクロストークを介した生体防御機構がアストロサイトに特異的に作動するとする作業仮説を立てている。全身臓器における phase detoxifying enzyme の多くが、その転写領域に antioxidant responsive element (ARE) を有しており、細胞質内で複合体を形成する Keap1/Nrf2 がストレス応答の結果解離し、転写因子である Nrf2 の核移行が迅速な酵素産生を惹起する。既に、G6PDH の転写制御に Nrf2 が関与し、Nrf2 stimulator である天然 isothiocyanate の sulforaphane が G6PDH の mRNA、酵素活性を亢進させることが報告されているが、アストロサイトでの検討はほとんど行われていない。高血糖による Keap1/Nrf2 の解離を惹起する生体内分子シグナルとして、ROS の産生亢進に伴う Keap1 のシステイン thiol 残基への修飾、あるいは未同定の上流 kinase による Nrf2 の serine 残基リン酸化の可能性等が報告されているが同定はされていない。本研究では高血糖に伴って活性化するグルコース代謝の minor pathway と Keap1/Nrf2 system を結ぶシグナルとしてアストロサイトの ER ストレス応答を想定し、神経保護機構としての ER ストレス応答を証明する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞の調整と維持:

SD ラット・C57 マウスの初代もしくは2代目の培養細胞を用いて行う。RI アッセイの主体となる培養アストログリアは、2代培養法にて調整する。RI アッセイ系ではトレーサーの取り込みを24穴プレートレベルの細胞集団の総体として測定するため、アッセイに供する細胞集団の均一性が要求されるが、アストロサイトでは1回の継代によってこれが達成される。これまでの方法に従い妊娠確定動物を購入後、実験動物センター(慶應義塾大学医学部内)にて数日の短期間飼育の上、自然出産を待って得られた生後24時間以内の新生仔の脳皮質より培養アストログリアを調整する。アッセイにおいて比較対照細胞群となる初代培養ニューロンについては、妊娠確定動物を購入後、実験動物センターでの飼育を行うことなく直接実験に供する。すなわち開腹にて胎児を取り出し実体顕微鏡下でその皮質線条体を摘出し、初代ニューロンを調整する。

(2) In vitro RI アッセイ :

培養アストログリアもしくはニューロンを、培養メディウム内のグルコース濃度を正常値下限である2 mMを基準とし、5、10、20 mMとした上で2-4週間の培養後にアッセイを行う。総グルコース利用の指標である $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucose リン酸化率を基準とする。培養メディウムを、トレーサー量の $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseを含む2 mM glucose アッセイ溶液(その他のイオン組成は培養メディウムと同等)に置換し、37、5%CO₂に設定したインキュベータ(慶應義塾大学医学部内RI共同利用実験施設に現有)内でリン酸化反応を測定する細胞内の未反応 $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseを細胞外に排出後、細胞を融解し、 ^{14}C 量を測定し $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucose リン酸化率が定量できる。グルコースの酸化代謝活性の測定には $[^{14}\text{C}]$ lactateもしくは $[^{14}\text{C}]$ glucoseをトレーサーとして使用する。産生物質は完全酸化の結果産生される気体 $^{14}\text{CO}_2$ をトラップするために細胞は予めキャップ付の密閉型フラスコ内で培養する。産生される $^{14}\text{CO}_2$ をフラスコ内に吊り下げたウェル内の綿球にしみ込ませた hyamine hydroxide 10-X 溶液に吸着後、 ^{14}C をLSCでカウントする。PPP活性の測定はHothersallらの原法(Arch Biochem Biophys 198:478-92,1979)に従って、定量的評価を行う。すなわち $[1-^{14}\text{C}]$ glucose由来の $^{14}\text{CO}_2$ がPPPを経由した場合(G6PDH作用によるシャント経路分岐)としない場合の総和であるが、 $[6-^{14}\text{C}]$ glucose由来の $^{14}\text{CO}_2$ はPPPでは脱炭酸を受けないことから、その差分をPPP活性とする。培養液におけるグルコース濃度条件負荷、Nrf2活性化薬として sulforaphane (0-10 μM)、tBHQ (0-100 μM)、ERストレス誘発薬である thapsigargin(1 μM)、tunicamycin(3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)等の薬剤負荷後のPPP活性変化を定量する。これらの実験は全てRI

共同利用実験施設内で実施し、 ^{14}C 量カウントは施設内に現有する液体シンチレーションカウンター(LSC)で行う。

(3) In vitro 蛍光イメージングによる ROS 測定 :

ROSとして細胞内の H_2O_2 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 測定を行う。前者に対する蛍光色素として CM- H_2DCFDA (chloromethyl derivative of dichlorodihydrofluorescein diacetate)を、後者に対して hydroethidine (HETH)を選択する。また、NOの産生は4,5-diaminofluorescein diacetate(DAF-2 DA)で測定する。培養アストログリアもしくはニューロンを35 mmディッシュ、もしくは24穴プレート上で培養するが、メディウム内のグルコース濃度を正常値下限である2 mMを基準とし、5 mM、20 mMとした上で2週間の培養後にアッセイを行う。蛍光強度の測定にはバルク解析として蛍光マルチプレートリーダー(Tecan, Infinite F200Pro、慶應義塾大学医学部神経内科内に現有)、個々の細胞解析には蛍光顕微鏡(NIKON エクリプス TE2000)と CCD カメラ、解析ソフト(AQUACOSMOS)(慶應義塾大学医学部神経内科内に現有)を用いて行う。

(4) 免疫組織染色および WB 解析 :

培養細胞を35 mm ガラスボトムディッシュに培養し、グルコース条件変化(慢性、急性高グルコース培養)、薬剤負荷等によるERストレスマーカー(Bip)の発現、およびNrf2の免疫染色を行う。観察は共焦点レーザー顕微鏡(Leica, TCS-SP5、慶應義塾大学医学部共同利用研究施設にて共同使用)にて行い、これによりNrf2については細胞質内からの核移行が観察される可能性があるが、さらに6穴プレートに細胞培養後、回収した細胞からWBによる核分画のNrf2変化を、細胞内全Nrf2に対する比率として評価する。さらに現在入手可能なリン酸化Nrf2特異抗体(p-ser40: OriGene Technologies, MD, USA)による免疫組織学的、WBによる検討を行う。

4. 研究成果

(1) PPP 活性制御には phase 2 detoxifying/antioxidant enzymes のマスターレギュレーターである Keap1/Nrf2 システムが関与し、通常は細胞質内で速やかに分解される転写因子 Nrf2 と Keap1 複合体が解離し Nrf2 が核移行することで酵素合成が誘導される。核移行促進因子の1つに Nrf2 リン酸化が想定され、Nrf2 は ER ストレス下の PERK のリン酸化基質であることが報告されている。高グルコース環境は培養アストログリアにおいて minor pathway の1つ HBP 亢進に伴って ER ストレスを惹起し、Keap1/Nrf2 システムを介して別の minor pathway である PPP の律速酵素 glucose 6-phosphate dehydrogenase を誘導する可能性、総じてア

ストログリアのグルコース代謝応答による神経保護作用が示された。これは当該領域では初めての報告である。一方、慢性高グルコース環境は、アストログリアの PPP 活性を亢進させ神経保護作用を示す反面、この状態からグルコース濃度を急性に低下させた際には PPP 活性は低下し、酸化ストレスを増大させる可能性が示唆された。このことは、長期にわたる高血糖が、内因性の神経保護作用を超えて障害を惹起する可能性を初めて示した。

(2) 脳梗塞における炎症の関与が注目されている。虚血性細胞障害において、内因性 LPS リガンドが神経系細胞に発現する TLRs に作動し、種々の pro-inflammatory response を惹起することが知られており、TLR 4 のノックアウトマウスでは梗塞巣が縮小することが報告されている。TLR 4 はニューロンのみならず、グリア系細胞にも発現が確認されており、特に microglia においては、TLR4 刺激がニューロンに傷害作用をもたらすことが知られている。しかし、同じグリア系細胞である astroglia における TLR 4 の作用は十分に検討されていない。今回、培養 astroglia に LPS を添加したところ、PPP 活性化が生じることが明らかとなった。PPP 活性制御には phase 2 detoxifying/antioxidant enzymes のマスターレギュレーターである Keap1/Nrf2 システムが関与し、Nrf2 が核移行することで酵素合成が誘導される。核移行促進因子の 1 つに Nrf2 リン酸化が想定され、Nrf2 は MAPK のリン酸化基質であることが知られている。LSP 刺激が MAPK を介して PPP を活性化することは、astroglia の TLR 4 刺激を介した神経細胞障害に対する保護機構と考えられた。これまで TLR 4 を介した経路はミクログリアを中心に、炎症増悪因子ととらえられることが多かったが、今回の結果は同じグリア系細胞である astroglia の有する内因性神経保護機能の 1 つを示した重要な知見であると考えられる。

(3) 脳はグルコースを唯一のエネルギー基質としてその酸化的代謝によって ATP を産生し機能を維持する。骨格筋や心筋は脂肪酸が主なエネルギー基質であることと対照的である。しかし、脳にも脂肪酸の取り込みのためのトランスポーターが存在し、脳の脂肪酸代謝の役割が注目されている。今回、培養アストログリアとニューロンにおける脂肪酸の酸化的代謝を [1-¹⁴C]palmitic acid から産生される ¹⁴CO₂ を用いて、また ¹⁴C でラベルされた acid-soluble fraction 産生をケトン体として測定し、その代謝調節を検討した。また非アイソトープ法によりケトン体として acetoacetate、-hydroxybutyrate を個々に測定し、低酸素下におけるアストログリアにおけるケトン体産生の調節機序およびその利用の可能性を検討した。アストログリア、

ニューロンともに脂肪酸の TCA サイクルにおける酸化的代謝はグルコース利用の 1 % 程度であり、大部分はケトン体に変換された。ケトン体産生はアストログリアにおいて高率であり、これは低酸素下における AMPK 活性化に依存した。低酸素後のニューロンは乳酸よりケトン体を高率に利用することで、再酸化後の TCA サイクルのエネルギー代謝を維持する可能性が示唆された。糖尿病におけるケトーシス発生は、合併症として避けるべきものと理解されている。しかし、本研究では脳において内因性のケトン体産生が astroglia を中心に行われ、これが神経保護作用を発揮する可能性を示した。さらにケトン体産生が AMPK 活性化に依存しており、薬物による介入の可能性を開いたことも重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Takahashi S, Iizumi T, Mashima K, Abe T, Suzuki, N. Roles and regulation of ketogenesis in cultured astroglia and neurons under hypoxia and hypoglycemia. ASN Neuro. 2014;6(5) 1759091414550997 査読あり
DOI: 10.1177/1759091414550997.

Abe T, Suzuki M, Sasabe J, Takahashi S, Uekawa M, Mashima K, Iizumi T, Hamase K, Konno R, Aiso S, Suzuki N. Cellular origin and regulation of D- and L-serine in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2014;34(12):1928-35. 査読あり
DOI: 10.1038/jcbfm.2014.164.

Takahashi S, Seki M, Suzuki N. Roles of metabolic compartmentalization by astrocytes and neurons in the pathophysiology and treatment of Parkinson's disease. Brain Nerve. 2013;65:1497-508. Review. 査読あり
<http://medicalfinder.jp/doi/abs/10.1147/7/mf.1416101669>

高橋慎一、安部貴人、伊澤良兼、飯泉琢矢、鈴木則宏：シンポジウム 血液脳関門：2 . NVU における BBB の役割と cellular metabolic compartment. 脳循環代謝 24: 75-82, 2013 査読無し
http://www.cbfm.jp/journal2/contents/24/2/75_82/

高橋慎一：脳血管とアストロサイト - neurovascular unit の概念について - . 神経内科 (特集 / アストロサイトをめぐる最近の話題) 79(2): 247-56, 2013 査読無し

高橋慎一：血液脳関門および脳循環・代謝

調節とアストロサイト. 実験医学 (特集 / Neurovascular Unit: 神経血管グリアのユニットが脳と体を支配する) 31(14):2195-2203, 2013 査読無し

Takahashi S, Izawa Y, Suzuki N. Astroglial pentose phosphate pathway rates in response to high-glucose environments. ASN Neuro. 2012;4(2). pii: e00078. 査読あり
DOI: 10.1042/AN20120002.

Takahashi S, Izawa Y, Suzuki N. Astroglial pathology as a loss of astroglial protective function against glycoxidative stress under hyperglycemia. Rinsho Shinkeigaku. 2012;52(1):41-51. Review. 査読あり
http://www.neurology-jp.org/Journal/public_pdf/052010041.pdf

Takahashi S, Abe T, Izawa Y, Suzuki N. Effects of fluctuating glucose concentrations on oxidative metabolism of glucose in cultured neurons and astroglia. Journal of Diabetes Mellitus 2012, 2:19-26. 査読あり
<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=17298>

Takahashi S. Treatment of acute ischemic stroke: tissue clock and reperfusion. Masui. 2012;61 Suppl:S11-22. 査読なし

高橋慎一, 伊澤良兼, 飯泉琢矢, 安部貴人, 鈴木則宏: シンポジウム 2 治療ターゲットとしての脳虚血後の炎症: 「アストロサイトからみた脳虚血後の炎症」. 脳循環代謝 23(2): 66-74, 2012 査読無し

〔学会発表〕(計 9 件)

高橋慎一: アルツハイマー型認知症の病態とアストログリアからみた治療戦略. 横浜神経内科セミナー (平成 26 年 1 月 16 日, ホテルプラム, 横浜市, 神奈川県) 招待講演

高橋慎一: アストログリアをターゲットとした脳梗塞治療戦略の構築. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会シンポジウム 3: 脳梗塞病態と新治療開発 (平成 26 年 11 月 21-22 日, 岡山コンベンションセンター, 岡山市, 岡山県) 招待講演

高橋慎一: 基礎研究のすすめ (Stroke practice and basic research). 第 38 回日本脳卒中学会総会 教育講演 (平成 25 年 3 月 21-23 日, 東京ドームホテル, 東京) 招待講演

高橋慎一: 神経疾患とアストログリア -

Neurovascular unit と metabolic compartment. 第 56 回神経内科懇話会 (平成 25 年 8 月 3 日, 東京ステーションコンファレンス, 東京) 招待講演

高橋慎一: アストロサイト研究の現状と展望. 第 25 回日本脳循環代謝学会総会 イブニングセミナー (平成 25 年 11 月 1 日, 京王プラザホテル札幌, 札幌) 招待講演

Takahashi S: Astroglial response to ischemic stroke: protectants of the neurovascular unit? BRI International Symposium 2012, The blood-brain barrier: structure, regulation, and clinical implications. (March 3-4, 2012, Niigata University, Niigata, Japan) 招待講演

高橋慎一: 脳梗塞急性期治療: Tissue clock と Reperfusion. 日本麻酔科学会 第 59 回学術集会 招待講演 (平成 24 年 6 月 8 日, 神戸ポートピアホテル, 神戸市, 兵庫県) 招待講演

高橋慎一: アストロサイトとニューロンの代謝からみたパーキンソン病の病態. 第 6 回パーキンソン病・運動障害コンgres オープニングセミナー: アストロサイトとパーキンソン病 (平成 24 年 10 月 11 日, 京都ホテルオークラ, 京都市, 京都府) 招待講演

高橋慎一, 安部貴人, 伊澤良兼, 飯泉琢矢, 鈴木則宏: シンポジウム 血液脳関門: 2. NVU における BBB の役割と cellular metabolic compartment. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会 (平成 24 年 11 月 8-9 日, リーガロイヤルホテル広島, 広島市, 広島県) 招待講演

〔図書〕(計 1 件)

高橋慎一: 神経細胞およびグリア細胞におけるケトン体代謝の重要性. Annual Review 神経 2015 (6. 中毒・代謝疾患), 中外医学社 (東京), 2015 年, Pp196-203

〔産業財産権〕
出願状況 (なし)

取得状況 (なし)

〔その他〕
ホームページ等 (なし)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
高橋 慎一 (TAKAHASHI Shinichi)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 20236285

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

安部 貴人 (ABE Takato)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：3 0 3 6 5 2 3 3

伊澤 良兼 (IZAWA Yoshi Kane)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：9 0 4 6 8 4 7 1