

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670622

研究課題名(和文) グリア性脳虚血耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying glia-mediated ischemic tolerance

研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI, Schuichi)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10280752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：「虚血耐性」とは、非侵襲虚血(PC)負荷を経験するとその後の侵襲虚血に対する抵抗性が獲得できる現象である。マウス中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを用いたin vivo虚血耐性モデルを作成し、グリア細胞の役割を解明した。PCによりアストロサイトの活性化が認められること、活性化アストロサイトはP2X7受容体発現を亢進させることにより、虚血耐性を誘導することが明らかとなった。これらグリア性虚血耐性は、非常に強力かつ持続的であり、脳を守るために非常に重要な内在性メカニズムであることが示唆された。本仕組みの制御により、脳卒中に強い脳、脳卒中の予防、さらに治療に役立つ戦略が開発される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using a preceding sub-lethal ischemic insult, preconditioning (PC), is an attractive strategy for protecting neurons by inducing ischemic tolerance in the brain. Although the underlying molecular mechanisms have been studied extensively, almost all experiments have been performed on neurons. Here, using a middle cerebral artery occlusion model in mice, we show that astrocytes have an essential role in the induction of ischemic tolerance. PC caused activation of astrocytes, which was essential for the induction of ischemic tolerance. As for the mechanisms, we found that P2X7 receptors were dramatically upregulated in activated astrocytes, which was essential for the ischemic tolerance. Unlike previous reports focusing on neuron-based mechanisms, our results show that astrocytes play indispensable roles in inducing ischemic tolerance.

研究分野：Neuropharmacology

キーワード：グリア細胞 アストロサイト 脳卒中 虚血耐性 グリア伝達

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は死亡原因の 3 又は 4 位と常に上位を占める。「虚血耐性現象」とは、侵襲的な虚血に先行して非侵襲的な虚血 (PC; Preconditioning) を経験すると、その後の侵襲的な虚血に対する抵抗性を獲得する現象でその強力な脳保護作用から、新しい治療戦略として注目されている。これまで、多くの虚血耐性研究が行われ、さまざまなメカニズムや責任分子が報告されている。例えば erythropoietin (EPO)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、adrenomedullin、hypoxia inducible factor (HIF)-1 α 、heat shock protein (HSP) 及び brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 等である。しかし、これらは全て神経細胞に注目した研究であった。

脳は神経細胞のみにより構成されているのではなく、その大半はグリア細胞が占めている。特に、グリア細胞の中で最も占める割合が多いアストロサイトは、多数の神経伝達物質の受容体や輸送体を発現しており、さまざまな刺激に反応して ATP などのグリア伝達物質を放出する。アストロサイトによる神経保護効果はよく知られており、実際にアストロサイトの活性化の抑制は、虚血傷害を悪化させることが *in vivo* 脳虚血モデルにおいても報告されている。さらに興味深いことに、HIF-1 α のターゲット分子 EPO の放出は、神経細胞ではなくアストロサイトで起こり、神経保護効果を示すことが *in vitro* 虚血耐性モデルで報告されている。これらの報告は、虚血耐性の誘導におけるアストロサイトの重要性を示唆している。しかし、脳虚血耐性におけるグリア細胞の関与に関するは不明のままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vivo* マウス中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて、脳虚血耐性にお

けるグリア細胞の役割およびその分子メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

動物は 8-10 週齢の雄性 C57BL/6j マウス (CLEA JAPAN, Shizuoka, Japan) を用いた。P2X7 受容体欠損 (P2X7^{-/-}) マウス (C57BL/6j) は九州大学医学部眼科学教室 江内田寛 講師より供与いただいた。

P2X7-EGFP ノックインマウスは、凍結胚を MMRRC 社から購入し、理化学研究所にてマウス個体化を行った。

(2) MCAO による虚血耐性モデル

非侵襲虚血 (PC) として 15 分間の MCAO を先行負荷し、一定期間 (1~6 日間) 後に再度同じフィラメントを用いて侵襲虚血 Severe MCAO を 1 時間負荷した。脳を Brain matrix で 2mm 厚の切片都市、TTC 染色することより梗塞巣体積を算出した (図 1)。

(3) 統計解析方法

解析結果はすべて mean \pm s.e.m. で表し、データの統計学的有意差検定は 2 群間の比較には Student's t-test を、多重比較検定には Tukey 法による検定を用いた。

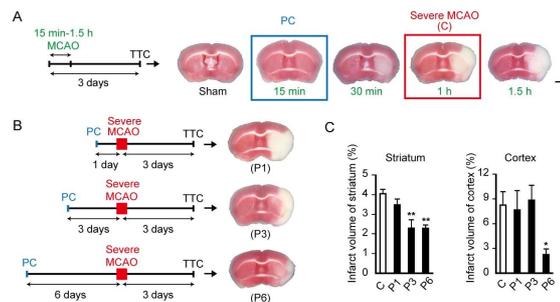


図 1 MCAO による虚血耐性モデルマウス

4. 研究成果及び考察

(1) アストロサイト活性化と虚血耐性効果は相関する

脳虚血耐性におけるグリア細胞の役割を明らかにするために、免疫組織化学染色法を用いて PC 後のグリア細胞の形態変化を調べた。ここで、アストロサイトは抗 GFAP 抗体で標識し、細胞体の肥大化、GFAP シグナルの

増強をアストロサイトの活性化として判断した。同様に、ミクログリアは抗 Iba1 抗体で標識し、アメボイド型への形態変化、Iba1 シグナルの増強をミクログリアの活性化として判断した。GFAP 陽性アストロサイトは、PC から 3 日後と 6 日後の虚血側線条体、6 日後の虚血側大脳皮質で活性化していた(図 2)。この活性化は PC から 8 週間後まで持続した。一方、Iba1 陽性ミクログリアは、PC から 1 日後で既に線条体で活性化しており、8 週間後まで持続した。しかし、大脳皮質では何れの時点でも活性化は認められなかった。非虚血側の線条体と大脳皮質では、アストロサイト及びミクログリアの活性化は認められなかった(結果は示さず)。これらの結果から、虚血耐性獲得部位がアストロサイトの活性化部位と、時・空間的に相関することが示された。従って、PC と Severe MCAO の間に必要なインターバルは、アストロサイトが活性化するまでに要する時間であることが示唆された。

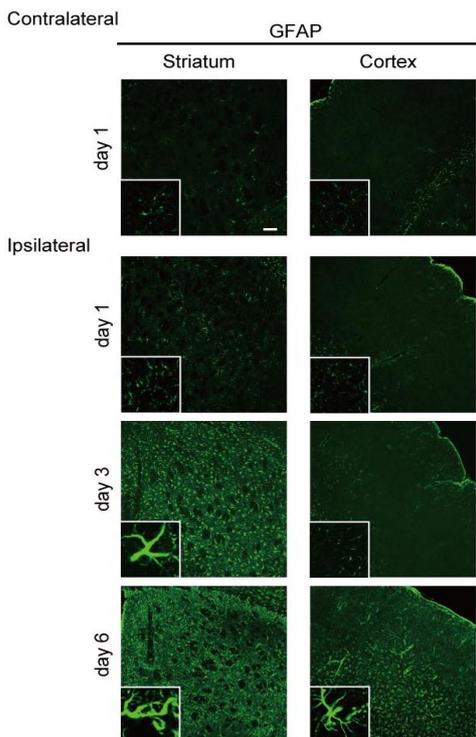


図 2 PC 後のアストロサイト活性化

(2) アストロサイトの活性化は虚血耐性を誘導する

アストロサイトの活性化が虚血耐性獲得に必須かどうか検討するために、アストロサイトの活性化阻害薬である fluorocitrate (FC) の効果を調べた。PC2 日後の FC (1 pmol/site) 投与は、ミクログリアの活性化には影響を与えず、アストロサイトの活性化を抑制した(図 3 E)。PC 後の FC 投与は傷害を惹起せず(図 3 A)、Severe MCAO による梗塞巣形成にも影響を与えなかった(図 3 B 右)。その一方で、FC は PC による虚血耐性効果を消失させた(図 3 C, D)。これらの結果より、アストロサイトの活性化が虚血耐性獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された。

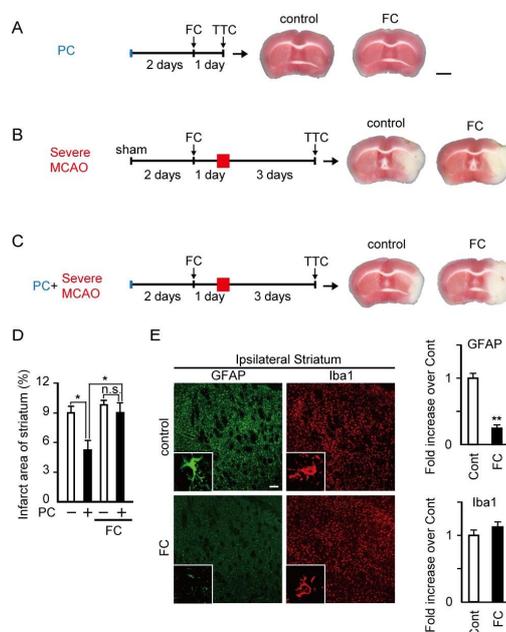


図 3 アストロサイトの活性化抑制による虚血耐性の消失

(3) PC によって活性化したアストロサイトは P2X7 受容体を発現する

ATP は神経細胞 - アストロサイト間の相互作用において重要な役割を果たしている。特に、イオンチャネル型の ATP 受容体である P2X7 受容体は、病態時におけるグリア - 神経細胞間の情報伝達を担っている。そこで、虚血耐性獲得における P2X7 受容体の役割を調べるために、まず PC 後の P2X7 受容体 mRNA 発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。

虚血側線条体において、P2X7 受容体 mRNA 発現 4 加は PC から 1 日後に起こり、その発現増加は 6 日後まで続いた (図 4C)。次に、PC により発現増加する P2X7 受容体はどの細胞に由来するのか調べるために、P2X7-EGFP マウスの EGFP シグナルを利用してモニターした。Sham マウスの線条体において、EGFP シグナルは静止型ミクログリアにて観察された (図 4A)。PC1 日後の虚血側線条体では、活性化したミクログリアで強い EGFP シグナルが観察された。PC3 日後には活性化ミクログリアだけでなく、活性化アストロサイトでも EGFP シグナルの増加が観察された (図 4A)。さらに FC 投与によってアストロサイトの活性化を抑えることで、PC による P2X7 受容体の mRNA 発現増加は抑制された (図 4D)。これらの結果から、アストロサイト由来の P2X7 受容体発現が、虚血耐性獲得と時・空間的に相関することが示唆された。

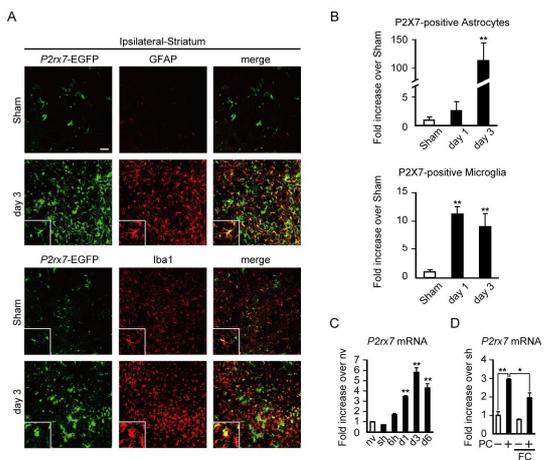


図 4 アストロサイトの活性化抑制による虚血耐性の消失

(4) P2X7 受容体は脳虚血耐性獲得に必須である

脳虚血耐性における P2X7 受容体の役割を調べるために、WT と $P2X7^{-/-}$ マウスを用いて虚血耐性モデルを作成し、梗塞巣の大きさを比較した。Severe MCAO によって形成される梗塞巣の大きさにおいて、WT と $P2X7^{-/-}$ マウスの間で違いは認められなかった (図 5a)。しかし、脳虚血耐性モデルにおいて、WT マウ

スで見られる虚血側線条体の傷害抑制効果は $P2X7^{-/-}$ マウスでは消失した (図 5A, B)。これらの結果から、P2X7 受容体は Severe MCAO による脳梗塞形成に関与しないが、PC 後の虚血耐性獲得に重要であることが示唆された。

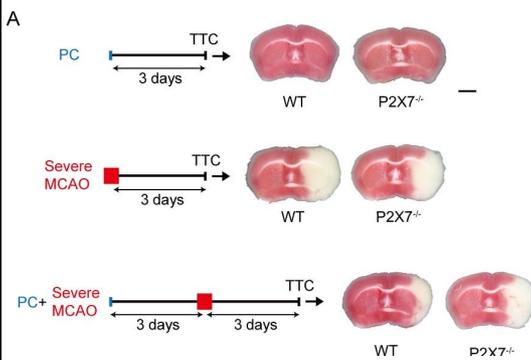
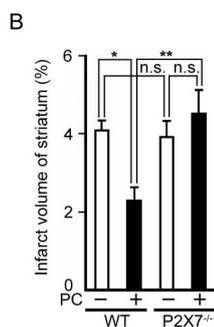


図 5 $P2X7^{-/-}$ マウスにおける虚血耐性現象の消失



【結論】

本研究の主な新規性は以下の 3 点である。
 (1) PC によって活性化するアストロサイトは、脳虚血耐性獲得過程で不可欠な役割を果たしている。つまり「グリア性虚血耐性」の重要性を見出した。

(2) PC 後、活性化アストロサイトにて発現増加する P2X7 受容体は、グリア性虚血耐性獲得の責任分子である。

(3) アストロサイトは P2X7 受容体依存的に HIF-1a を発現亢進させ、これにより EPO 等の神経保護分子の発現を誘導し、虚血耐性を呈する可能性が示唆された。

以上本研究成果は、「グリア性虚血耐性」現象を見出し、その重要性及び分子メカニズムの一端を明らかとしたものである。本実験結果で得られた知見を、イラストを用いてまとめた (図 6 参照)。

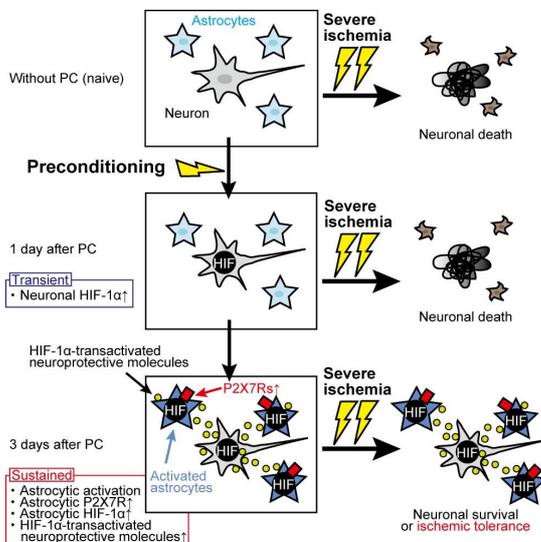


図6 アストロサイト性虚血耐性の模式図

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Yuri Hirayama, Yuri Ikeda-Matsuo, Shoji Notomi, Hiroshi Enaida, Hiroyuki Kinouchi, Schuichi Koizumi, Astrocyte-Mediated Ischemic Tolerance, *Journal of Neuroscience*, 35(9) 3794-3805, 2015年、査読有、doi: 10.1523/JNEUROSCI.

Nghia NA, Hirasawa T, Kasai H, Obata C, Moriishi K, Mochizuki K, Koizumi S, Kubota T, Long-term imipramine treatment increases N-methyl-D-aspartate receptor activity and expression via epigenetic mechanisms, *Eur J Pharmacol*, 752C, 69-77, 2015年、査読有、doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.010

Narita K, Sasamoto S, Koizumi S, Okazaki S, Nakamura H, Inoue T, Takeda S, TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport, *FASEB J*, 2015年、査読有、in press、<http://www.fasebj.org/content/early/2015/02/13/fj.14-261396.short>

Sayuri Sukigara, Hongmei Dai, Shin Nabatame, Taisuke Otsuki, Sae Hanai, Ryoko Honda, Takashi Saito, Eiji Nakagawa, Takanobu Kaido, Noriko Sato, Yuu Kaneko, Akiko Takahashi, Kenji Sugai, Yuko Saito, Masayuki Sasaki, Yu-ichi Goto, Schuichi Koizumi, Masayuki Itoh, Expression of Astrocyte-Related Receptors in Cortical

Dysplasia With Intractable Epilepsy, *J Neuropathol Exp Neurol*, 73(8), 798-806, 2014年、査読有、doi: 10.1097/NEN.0000000000000099

Y Shinozaki, M Nomura, K Iwatsuki, Y Moriyama, C Gachet, S Koizumi, Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission, *Scientific Reports* 4, Article number:4329, 2014年、査読有、Doi10.1038/srep04329

Inoue K, Komatsu R, Imura Y, Fujishita K, Shibata K, Moriyama Y, Koizumi S, Mechanisms underlying ATP release in human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol*, 134(5):1465-1468, 2013年、査読有、doi: 10.1038/jid

Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, Shibata K, Shinozaki Y, Kasai H, Moriishi K, Moriyama Y, Koizumi S, Microglia release ATP by exocytosis, *Glia*, 61(8), 1320-1330, 2013年、査読有、doi: 10.1002/glia.22517

[学会発表](計10件)

平山友里、松尾由理、小泉修一、P2X7 受容体/HIF-1 経路はアストロサイト依存的虚血耐性に特有なメカニズムである、第88回日本薬理学会年会、2015年3月18日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

Schuichi Koizumi, Astrocytic phagocytosis after brain ischemia, KIST 国際シンポジウム、2014年10月27日、Seoul (Korea)

Schuichi Koizumi, Astrocytes and Ischemic tolerance, Conference on Glial Biology in Medicine, 2014年10月13日、Birmingham (U.S.A)

小泉修一, Astrocytic ATP and ischemic tolerance, The 12th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, 2014年8月24日、Taiwan (China)

Schuichi Koizumi, Ischemic tolerance mediated by the glia purinergic system, Purine2014, 2014年7月24日、Bonr(Germany)

Y Hirayama, Y Ikeda-Matsuo, S Koizumi, Astrocyte-Mediated ischemic tolerance in the brain, 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014年7月8日、Milan (Italy)

小泉修一、グリア細胞と脳虚血耐性、第2回パーキンソン病と神経科学研究会、2014年6月20日、ANAクラウンプラザホテル(京都府、京都市)

小泉修一、平山友里、脳虚血障害のグリア性制御、第87回日本薬理学会年会、2014年3月19日、東北大学(宮城県、仙台市)

Koizumi S、Glia-mediated ischemic tolerance、The 17th International Conference on Korean Medicine、2013年11月23日、Seoul(Korea)

平山友里、松尾由理、小泉修一、Mechanisms underlying astrocyte-dependent ischemic、Neuroscience2013、2013年11月11日、SanDiego(U.S.A)

〔図書〕(計1件)

小泉修一、日本臨床社、最新臨床脳卒中学(上)、2014年、91-94

6. 研究組織

(1)研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI, Schuichi)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：10280752

(3)連携研究者

木内 博之 (KINOUCHI, Hiroyuki)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：30241623

篠崎 陽一 (SHINOZAKI, Youichi)
山梨大学・総合研究部・講師
研究者番号：10443772

繁富 英治 (SHIGETOMI, Eiji)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：00631061

柴田 圭輔 (SHIBATA, Keisuke)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：50580411