

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11583

研究課題名（和文）アストロサイトのカリウム制御メカニズムに注目した新規脳浮腫治療法の探索

研究課題名（英文）Preventing brain edema involved with astrocyte expansion due to its potassium intake

研究代表者

加古 英介（Eisuke, Kako）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：70464576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：生後1-2日齢のマウスの脳からアストロサイトを分離し、正常時の脳内のアストロサイトの環境に近い培養系を確立し、周囲の細胞外のカリウム濃度を変化させることでカリウムがアストロサイト内へ取り込まれることを確認した。またこの細胞内カリウム濃度変化がアストロサイトの細胞容積の変化に関与していることを示唆した。またアストロサイトによる細胞外カリウムの取り込みがアデノシン三リン酸による細胞膜表面のNA-K-pump活性化によって促進されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳出血や脳梗塞といった脳卒中では脳が腫脹することによって症状が悪化し、生涯にわたって麻痺など重篤な障害を来す。しかしこの脳の腫脹のメカニズムはほとんどわかっていない。本研究でアストロサイト（脳の中で最も多くの容積をしめる細胞）による周囲のカリウム吸収機構がアストロサイト自身の細胞膨化に寄与していることが示唆され、カリウム吸収を促進するメカニズムの一端も明らかとなった。これらの成果は脳浮腫に対する新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have investigated potassium ion inflow to astrocytes from extracellular fluid that enhanced by higher level of extracellular potassium ion concentration. The change in intracellular potassium ion level was associated with increasing volume of astrocyte size that enhanced by Na-K pump stimulation with adenosine triphosphate. These finding is considered to develop a new treatment for brain edema.

研究分野：救急

キーワード：アストロサイト 脳浮腫 カリウム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳は虚血に対して脆弱な臓器であるため、脳の血流は様々な制御システムにより厳密にコントロールされており、生理的な条件では脳血流は常に一定に保たれるようになっている。しかし一旦、閾値を超えて血流が低下すると急速に神経細胞などの細胞死を来してしまう。血流低下を来す原因は様々であるが、急激で重篤な症状の悪化を来す病態の原因の一つに脳圧の上昇がある。血流の灌流圧は血圧と脳圧に規定される。脳の血流を維持するためには頭蓋内の圧(脳圧)が低いことが重要であるが脳は周囲を頭蓋骨、硬膜という硬い壁に囲まれているために圧上昇が起こると悪化しやすい。脳卒中や外傷などの急性期では細胞へのダメージから細胞の容積の増加、細胞外の水分容量の増加を来し脳浮腫となり脳圧の上昇が起こる。そして傷害範囲の拡大や脳ヘルニアといった不可逆的な脳へのダメージを来し、やがては脳死や死といった転帰をとることもある。しかし現在の治療法だけでは対応できない場面も多いため新しい治療が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

アストロサイトが制御を行っている因子の一つにカリウムがある。カリウムは通常細胞外濃度が低く、多くが細胞内にとどまっていることで細胞生理の主たる役目を果たしているが神経活動時や傷害などによる細胞が破壊される過程で大量に細胞外へ放出されることが知られている。アストロサイトはこれらのカリウムを吸収し、他の部位へ排出することで緩衝系としての役目を果たしている。また興味深いことにカリウムの吸収と細胞内外の水分の移動には関連性が示唆されている。

我々は以前より水チャネル(アクアポーリン:AQP)を介したアストロサイトによる細胞内外の水分量を調節と、脳圧に関する研究を行い、結果の報告をしてきた。今回の研究では以前の研究から得られたデータと新しい視点からの検討を組み合わせることで脳圧コントロールの新戦略の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

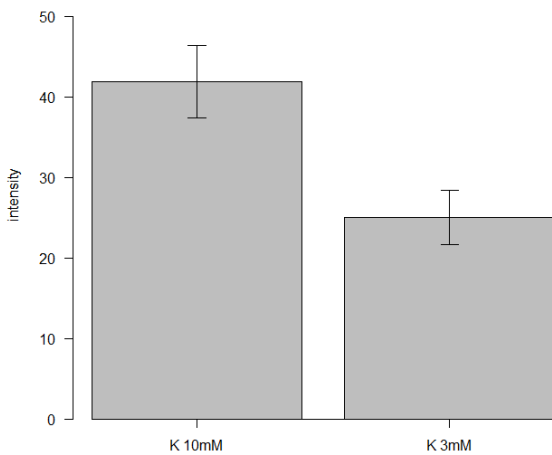
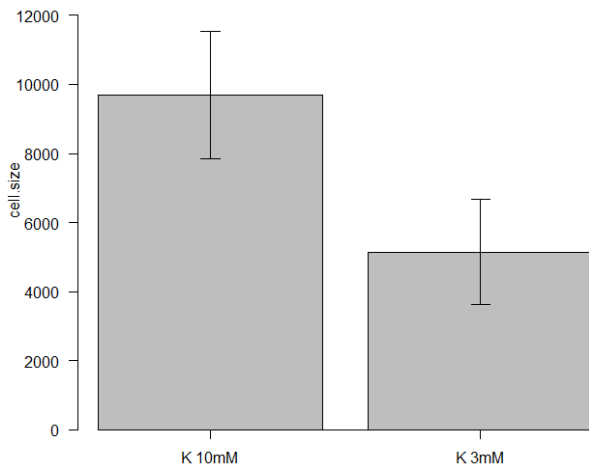
1) 生後マウスの脳を摘出し、アストロサイトのみを選択的に培養、脳内環境に近い条件で実験にて適した細胞密度になるまで培養を継続。培養液のカリウム濃度を生理的な条件のコントロール群と周囲の細胞が壊れた環境に近い高カリウム濃度群に分け、細胞内のカリウム濃度のインディケータである Assante Potassium green と細胞カルシウム濃度のインディケータである Rhod2 を用いて細胞を標識し、コンフォーカル顕微鏡を用いて細胞の容積を比較した。

2) 細胞内に取り込まれたカリウム量を測定できる Rb86 を用いて細胞外のカリウムがアストロサイト内へ取り込まれていることを確認する。また細胞外アストロサイトの情報伝達物質であると考えられる ATP を細胞外環境へ添加することにより細胞内へのカリウム取り込み量に変化するかを解析した。

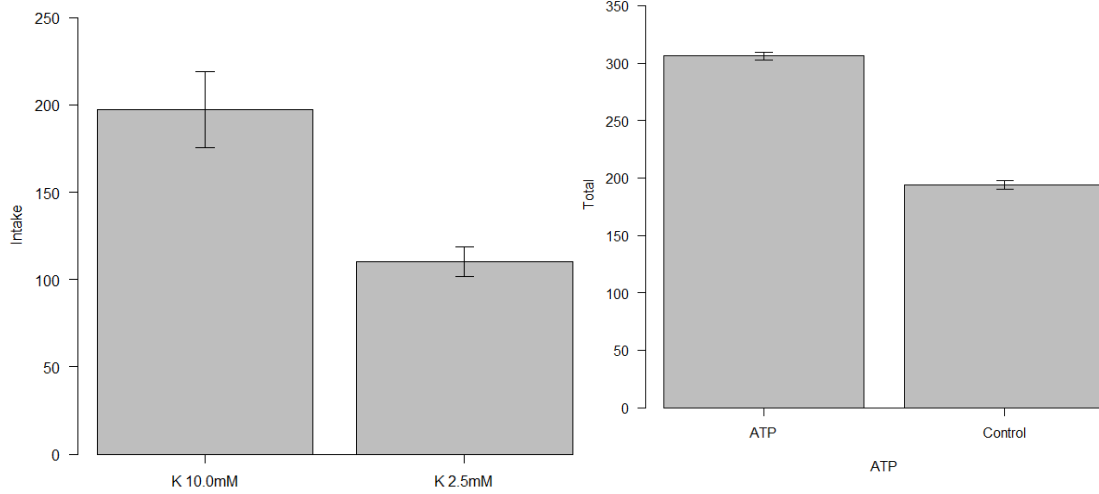
#### 4. 研究成果

1) 生後1日のマウス脳からアストロサイトを分離培養し14日程度培養し、細胞を安定化した後に、培養液を脳脊髄液組成の溶液に変更し Assante Potassium green 1microM を添加し、60分後に共焦点顕微鏡を用いて、細胞を撮像しカリウム濃度の変化が観察できることを確認した。脳脊髄液組成の溶液のカリウム濃度を変更させて3mM 群と10mM 群で細胞の大きさを確認したところ、カリウム10mM 群で細胞の大きさが増加していることが証明された。

また細胞外カリウム濃度の変化させた後の細胞内カリウム濃度を比較した。下図のように細胞外のカリウム濃度が10mM と脳の外傷時やけいれん発作時のように著しく高くなった状況では細胞内へのカリウムの取り込みが増加し、それに伴って細胞の大きさも大きくなることが示唆された。



2) マウス由来のアストロサイトを用いて細胞内へのカリウム取り込みを確認する実験を行った。細胞外カリウム環境を変化させ、カリウムの同位元素である Rb86 を用いて、アストロサイト内へ取り込まれた Rb86 の量を測定した。検体の細胞数や大きさを標準化するためにタンパク質総量をプロテインアッセイで測定した。下の図に示すようにカリウム取り込み量は細胞外のカリウム濃度に依存して変化すること。また ATP が細胞外へ添加されることによってアストロサイトによるカリウムの取り込み量が増加することが明らかとなった。



今回の結果より脳の恒常性を保つため、脳の細胞外カリウム濃度の上昇に対してアストロサイトがカリウムを取り込むバッファーとして働いていることが示唆された。また細胞外カリウムの細胞内への取り込みには ATP が関与していることが明らかとなり、新たな治療法の発見につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	祖父江 和哉  (Sobue Kazuya)  (90264738)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	
研究 協 力 者	澤本 和延  (Sawamoto Kazunobu)		
研究 協 力 者	金子 奈穂子  (Kaneko Naoko)		