

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19334

研究課題名（和文）慢性炎症から認知症発症/増悪へのミッシングリンカー脳小血管変性の新機序と創薬標的

研究課題名（英文）Missing link from chronic inflammation to dementia onset/exacerbation: New mechanism and drug target in cerebral small vessel disease

研究代表者

白川 久志 (Shirakawa, Hisashi)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50402798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、認知症病態における血管病変・血管調節異常の重要性が明らかにされつつある。アストロサイトは、中枢神経系の様々な刺激にตอบสนองして病態の増悪/抑制に寄与することが明らかになりつつあることから、本研究では、血液脳関門構成細胞群のうちアストロサイトに主に着目して研究を進めた。その結果、アストロサイトを炎症促進性の表現型へと変化させるサイトカインであるTNF およびIL1 の同時刺激に対する応答において、ストア作動性Ca²⁺流入を担うチャネルであるOraiの一種であるOrai2が、炎症起因物質としても知られるPGE₂産生を抑制していることが明らかとなり、この経路が治療標的の1つとして提示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症の克服は、超高齢社会における最優先課題とも言える。近年、末梢の慢性炎症や免疫異常が何らかの形で中枢神経系(CNS)へ広がり、さらに過剰なCNS炎症を経て、難治性神経疾患である認知症の発症/増悪に至っていることが示唆されるようになってきたが、その詳細については不明な点が多い。最近、認知症における血管病変が注目されつつあることから、本研究では血液脳関門を構成する細胞群、特にアストロサイトに着目し研究を進めた。その結果、脳内で最も豊富に存在するグリア細胞であるアストロサイトにおける機能分子について、複数見出すことが出来たため、これらを将来的な創薬標的として期待したい。

研究成果の概要（英文）：Emerging evidence clearly suggests that vascular dysregulation is more important in the pathogenesis of dementia. Since astrocytes can respond to various stimuli in the central nervous system and contribute to the exacerbation/suppression of pathological conditions, we focused mainly on astrocytes among the cell groups that constitute the blood-brain barrier. In this study, we found that Orai2, a member of the store-operated calcium channel (SOCC) family, is involved in the production of PGE₂, a known inflammation-related substance, in the response of astrocytes to simultaneous stimulation with TNF and IL1, which are known to induce astrocytes to inflammatory phenotypes. In summary, Orai2 is upregulated in TNF/IL1 stimulated astrocytes and reduces PGE₂ production to some extent, thereby modulating CNS inflammation. Our findings may help to understand how astrocytes are associated with inflammatory responses and to identify new targets that modulate astrocytic reactivity.

研究分野：病態生理学

キーワード：CNS炎症 エーター アストロサイト ケモカイン 炎症性サイトカイン Oraiチャネル TRPチャネル 血管病変 脂質メディ

1. 研究開始当初の背景

認知症は、超高齢社会の日本はもちろん、世界中を見渡しても、その症例数が著しく増大しており、保健政策上も最優先課題とされている。近年、腸内細菌層の制御薬がヒトのアルツハイマー病治療薬として中国において認可され、また歯周病菌がアルツハイマー型認知症を惹起しうることが報告された。これらを勘案すると、末梢の慢性炎症や免疫異常が何らかの形で中枢神経系(CNS)へ広がり、さらに過剰な CNS 炎症を経て、難治性神経疾患である認知症の発症/増悪に至っていることが示されつつある。近年、このような過剰な CNS 炎症には、病態下における血管病変・血管調節異常の重要性が明らかにされつつあることから、本研究では血液脳関門を構成する細胞群のうちアストロサイトに主に着目して研究を進めた。

アストロサイトは、CNS における最も豊富なグリア細胞であり、神経細胞活動や血管機能の調節、グリオトランスミッターの放出など、多くの CNS 機能において多様な役割を担っている。これらの恒常性維持機能に加えて、アストロサイトは様々な CNS 疾患の発症/増悪にも関与していることが近年明らかにされつつある。炎症状態では、アストロサイトはプリン体、サイトカイン、脂質を含む様々な因子によって刺激されるが、そのような病態下では、アストロサイトは、いくつかの炎症性サイトカインで刺激されると有害になり、その一方で IFN γ や TGF β などの因子で刺激されると保護的になると報告されている。したがって、炎症状態に対するアストロサイト応答の根底にある分子メカニズムを明らかにし、それを制御することは、CNS 疾患を治療するための新たなアプローチとなりうる。

2. 研究の目的

アストロサイトは電氣的に興奮する細胞ではないことから、Ca²⁺は細胞内シグナル伝達にとって最も重要な分子の一つである。アストロサイトにおける Ca²⁺シグナル伝達は、増殖、形態学的変化、グリオトランスミッター放出と関連している。傷害、炎症、興奮性亢進などの脳機能障害は、急性および慢性的にアストロサイトの Ca²⁺シグナル伝達を変化させる。それゆえ、アストロサイトにおける Ca²⁺シグナリングの関連性を明らかにすることは、その機能と分子メカニズムに対する的確な洞察を提供することができると考えられている。

様々な細胞種において、ストア作動性 Ca²⁺ entry (SOCE) は、細胞内 Ca²⁺ストアを補充するための Ca²⁺取り込みに不可欠な経路であり、SOCE は、遺伝子転写、細胞周期の進行、免疫応答において非常に重要な役割を果たす。例えば、免疫細胞において、SOCE は Ca²⁺流入を引き起こす主要なメカニズムであり、様々なサイトカインの産生に関与している。ストア作動性 Ca²⁺チャネル(SOCC)は、小胞体 Ca²⁺ストアの枯渇によって活性化される主要な Ca²⁺透過性チャネルファミリーの一つであり、アストロサイトにおける SOCE を担っている。ほとんどの細胞種において、SOCE は小胞体カルシウムセンサー STIM1/2 と細胞膜タンパク Orai1/2/3 によって駆動される。Orai アイソフォームに加えて、TRPC チャネルのいくつかのアイソフォームも SOCC として機能するため、SOCE はアストロサイトにおけるグリオトランスミッター放出やサイトカイン産生を制御すると考えられている。

そこで本研究では、炎症性分子、特に TNF α /IL1 α の共処置によって刺激されたアストロサイトの反応と、Ca²⁺シグナル伝達との関連を調べることを目的として、研究を開始した。

3. 研究の方法

培養アストロサイトを用いた *in vitro* 実験等のすべての動物実験は、各大学の動物実験委員会の倫理指針に従って事前に承認を受けた後に実施された。Orai2-KO マウスは研究協力者(順天堂大学医学部 大洞将嗣先生)により CRISPR/Cas9 システムを用いて作製された。培養アストロサイトを得るために、はじめに生後 0-2 日齢の C57BL/6J マウスまたは Orai2-KO マウス的大脑皮質から細胞を摘出・単離し、10% ウシ胎仔血清 (FBS) を添加したイーグル最小必須培地 (EMEM) を用いて、5% CO₂、37 °C の環境下で 75 cm² のペントキャップフラスコに播種した。2-4 週間維持した後、フラスコをシェーカーで 250 rpm、37 °C で over night にて振とうしてミクログリア等を除去し、残ったアストロサイトは 0.25% トリプシンで剥離してから無血清 EMEM に再懸濁し、再播種後 4-5 日維持してからに実験に使用した。

形態学的変化は、GFAP 蛍光染色により評価した。培養アストロサイトは 10 mm のガラスカバースリップ上で 4-5 日間維持し、4% PFA で固定した後、3% ウシ血清アルブミンと 0.1% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間細胞を透過処理し、ウサギ抗 GFAP 抗体 (1:500; abcam) と 4 °C で一晩インキュベートし、その後 Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:300; Invitrogen) と室温で 90 分間インキュベートした。DAPI Fluoromount-G で核を染色した後、FluoView FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus) を用いて蛍光画像を取得し、形態学的変化を観察した。

RT-PCR、定量的 RT-PCR 実験には、35mm ディッシュ上で培養したアストロサイトを用いた。ISOGEN 試薬を用いて total RNA を回収し、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡) を用いて逆転写し、Blend Taq (東洋紡) を用いた PCR でマウス cDNA を増幅した。増幅 PCR 産物をアガロースゲル上で電気泳動し、0.1 μ g/mL 臭化エチジウムで染色し、紫外線下で可視化した。定量的 RT-PCR は、StepOne Real-Time PCR System と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて常法により行った。

ELISA 実験には、48 ウェルプレートで維持した培養アストロサイトを用いた。無血清培地で一晩維持した後、サイトカイン等の薬物処置を 24 時間行い、培養上清を分析した。

細胞内 Ca²⁺濃度測定は、蛍光 Ca²⁺指示薬 fura-2 AM を用いて評価した。アストロサイトを 10 mm の

ガラスカバースリップ上で培養し、無血清培地で一晚維持した後、24 時間の薬物処置を行い、Krebs-Riger 溶液中で、5 μ M fura-2 AM を 40 分間負荷した。測定時には、細胞を播種したガラスカバースリップを、AQUACOSMOS /ORCA-AG イメージングシステムを搭載したニコン蛍光顕微鏡にセットした。蛍光画像は、室温で 340 nm と 380 nm で交互に励起し、500 nm、2 秒間隔でスキャンした。個々の細胞の蛍光比を F340/380 とし、測定後に細胞の生存を確認するためにはイオノマイシンを用いた。

細胞増殖/生存率は、MTT アッセイで評価した。薬物処置後、細胞に MTT (0.025 mg/mL) を 2 時間負荷し、DMSO で溶解後、570 nm の吸光度を測定した。細胞毒性は、培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定して評価した。

統計解析は GraphPad Prism 9 を用いた。データは平均値 \pm SEM で示し、 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

4. 研究成果

近年、ミクログリアから分泌される IL1 α 、TNF α 、C1q が、静止型アストロサイトを A1 アストロサイトと呼ばれる neurotoxic な反応性アストロサイトに変化させることが報告された (Liddel et al., Nature, 2017) そこで、はじめに培養アストロサイトに TNF α 単独、IL1 α 単独、TNF α と IL1 α の併用 (TNF α /IL1 α) 処置を行って 24 時間後に、さまざまな因子の発現レベルを評価した。TNF α と IL1 α を併用すると、反応性アストロサイトと A1 アストロサイトのマーカーである Lcn2 と C3 の発現がそれぞれ増加したが、A2 アストロサイトのマーカーである Cd109 の発現は変化しなかった。

次に、アストロサイト反応性マーカーとしてよく用いられる GFAP を免疫染色したところ、TNF α や IL1 α 刺激後、多少の形態学的変化は観察されたものの、GFAP 発現量に大きな変化は見られなかった。さらに、IL6、Cxcl1、Cxcl2、および Ccl2 の発現は、TNF α /IL1 α で共処置したアストロサイトにおいて相乗的に上昇した。次に、ELISA によってアストロサイト培養液中の IL6、CXCL1、CXCL2、CCL2 レベルを測定したところ、TNF α /IL1 α は相乗的にこれらの放出を促進することがわかった。相乗作用がアストロサイト増殖の亢進によって引き起こされたかどうかを評価するために、MTT アッセイを用いた。TNF α 単独、IL1 α 単独、および TNF α /IL1 α 共刺激を受けたアストロサイトでは細胞生存率が低下したが、TNF α /IL1 α 共刺激による相乗効果は観察されなかった。対照的に、TNF α /IL1 α 共刺激は LDH 放出に影響を与えなかった。したがって、IL6、CXCL1、CXCL2 産生に対する相乗効果は、アストロサイトの増殖亢進による効果ではなかった。これらのデータは、アストロサイトが TNF α /IL1 α 共刺激に反応して炎症性表現型に変化し、炎症に強く寄与することを示唆している。

次に、アストロサイトにおける SOCE の関与を調べた。まず、Ca²⁺ イメージングを用いて、アストロサイトにおける SOCE の機能を調べた。SOCE を定量化するために、細胞外 Ca²⁺ を除去し、小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害薬であるタプシガルギン (1 μ M) を加えて小胞体 Ca²⁺ 貯蔵量を枯渇させた。SOCE は、タプシガルギン存在下での細胞外 Ca²⁺ 添加後の細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加から明らかになった。最初の Ca²⁺ 上昇を「release」、2 回目の Ca²⁺ 上昇を「Entry」と定義した。Ca²⁺ Entry は IL1 α 単独刺激で有意に増加したが、これは相乗効果ではなく、TNF α /IL1 α 共刺激は相乗的に Ca²⁺ release を増加させた。これらのデータは、TNF α /IL1 α で共刺激されたアストロサイトでは、ER 関連の Ca²⁺ シグナル伝達が促進されることを示唆している。次に、Trpc と Orai の発現の変化を RT-PCR で調べたところ、Orai1/2/3 と Trpc1/3 に特異的な高強度のバンドが見られ、Orai1/2/3 と Trpc1 の発現は TNF α /IL1 α の共刺激によってわずかに増加した。定量的 RT-PCR により、TNF α /IL1 α で共刺激したアストロサイトでは Orai2 の発現が相乗的に上昇することがわかった。Orai1 と Orai3 の発現は TNF α /IL1 α の共刺激によりわずかに上昇したが、有意ではなかった。Trpc1 の発現は TNF α /IL1 α 共刺激によって変化しなかった。これらの結果は、TNF α /IL1 α で共刺激されたアストロサイトでは、ER の Ca²⁺ シグナルと Orai2 の発現が増加していることを示している。

次に、アストロサイトにおける Orai2 を介した SOCE の分子メカニズムを調べるため、Orai2 に対する 3 種類の shRNA を開発した。それぞれの shRNA 候補を AAV 内でマウス大脳皮質アストロサイトにトランスフェクトし、定量的 RT-PCR でノックダウン効率を測定した。その結果、shRNA 候補 #1 はコントロールおよび TNF α /IL1 α 処置細胞で Orai2 mRNA レベルを約 50% 減少させたが、#2 と #3 は Orai2 発現に影響を与えなかった。したがって、Orai2 に対する shRNA 候補 #1 (sh-Orai2) を最も効果的な候補として選び、以降の実験に用いた。Orai2 ノックダウン (Orai2-KD) 後のアストロサイトの SOCE を Ca²⁺ イメージングを用いて測定したところ、予想通り、sh-Orai2 で処理したアストロサイトでは Ca²⁺ 放出が減少した。次に、TNF α /IL1 α の共刺激による IL6、Cxcl1 および Cxcl2 の相乗的なアップレギュレーションが、Orai2-KD によって影響を受けるかどうかを調べた。sh-Orai2 を投与したアストロサイトと AAV 陰性対照の間に違いはなかった。したがって、Orai2 は IL6、Cxcl1、Cxcl2 の相乗的な発現増大機序を制御していないと考えられる。

他の Orai2 関連炎症因子を同定するために、網羅的にマイクロアレイ解析を行った。その結果、興味深いことに、TNF α /IL1 α で共刺激したアストロサイトでは、いくつかのプロスタグランジン合成および調節関連遺伝子の発現が上昇した。特に、Pla2g4a、Ptgs2、Ptges などの PGE₂ 合成関連遺伝子の発現が強く上昇していた。Pla2g4a は細胞質ホスホリパーゼ A2 (cPLA2) であり、膜リン脂質からアラキドン酸を放出する。Ptgs2 はシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2) であり、AA をプロスタグランジン H₂ (PGH₂) に変換する。Ptges はミクロソームプロスタグランジン E 合成酵素 1 (mPGES-1) であり、PGH₂ を PGE₂ に異性化する。マイクロアレイ解析により、Orai2-KD アストロサイトでは Pla2g4a、Ptgs2、Ptges の発現が増加していることが明らかになった。次に qPCR と ELISA を用いて、この経路が TNF α /IL1 α 共刺激後に相乗的に上昇するかどうかを調べた。IL6、CXCL1、CXCL2 と同様に、PGE₂ 合成関連遺伝子の発現と

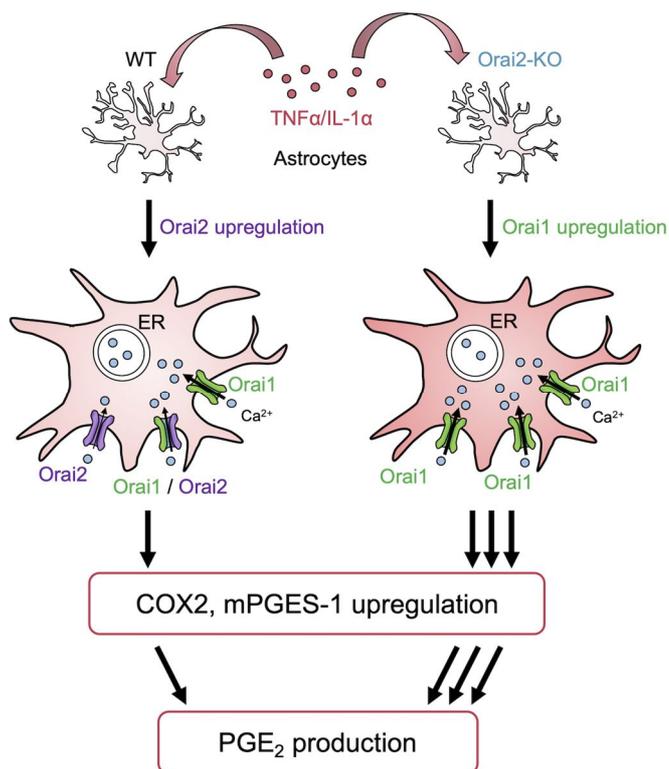
PGE₂ 産生は、TNF α /IL1 α で共刺激したアストロサイトで相乗的に増加した。次にマイクロアレイ解析の再現性を確認するため、qPCR と ELISA を用いて Orai2-KD の影響を調べた。マイクロアレイ解析とは対照的に、Pla2g4a および Ptgs2 の発現は Orai2-KD によって有意に変化しなかった。しかしながら、Ptgs2 の発現と PGE₂ の産生は、Orai2-KD によって有意に増加した。これらの結果は、TNF α /IL1 α 刺激アストロサイトにおいて、Orai2 が mPGES-1 の発現と PGE₂ 産生を負に制御していることを示している。

最後に、Orai2-KO アストロサイトにおける PGE₂ 合成経路の役割を調べるため、Pla2g4a、Ptgs2、Ptgs2 の mRNA レベルを調べた。Orai2-KD アストロサイトで得られた知見と同様に、Orai2-KO アストロサイトでは、TNF α /IL1 α で共刺激すると、Ptgs2 の発現が WT アストロサイトに比べて有意に増加した。さらに、Ptgs2 mRNA も Orai2-KO アストロサイトで増加したが、Pla2g4a mRNA レベルは変化しなかった。PGE₂ 産生は Orai2-KO アストロサイトで増加し、Orai2-KD アストロサイトでの産生と一致した。また、脳卒中やアルツハイマー病などの脳疾患に関連する可能性のある PGD2 および PGF2 の産生についても調べたが、WT と Orai2-KO アストロサイトの間に差は見られなかった。これらのデータは、Orai2 が TNF α /IL1 α 刺激アストロサイトにおける COX2 および mPGES-1 の発現を抑制することにより、PGE₂ 産生を負に制御していることを示している。

本研究では、TNF α /IL1 α で共刺激した場合、Orai2-KO アストロサイトの SOCE は野生型アストロサイトよりも大きく増加した。これは、Orai2 の欠損によって誘導される SOCE の増加を示すいくつかの報告と一致している。Orai2 は Orai1 とヘテロメリックチャンネルを形成し、これらのチャンネルは Orai1 ホモメリックチャンネルよりも少ない Ca²⁺ entry を示す。これらを総合すると、Orai1 ホモメリックチャンネルは Orai2-KO アストロサイトで主に機能し、Ca²⁺ entry の増加を引き起こしている可能性がある。さらに、研究代表者の知る限りでは、Orai2 が脳損傷後や何らかの疾患においてアストロサイトで発現上昇するという報告はない。従って、本研究で見出された Orai2 のアップレギュレーションは、中枢神経系疾患におけるアストロサイトの役割を調べるための新たな知見を提供するかもしれない。

PGE₂ は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの様々な神経変性疾患と関連している。PGE₂ は、EP1-EP4 という 4 つの G タンパク質共役型受容体を活性化し、異なるシグナル伝達カスケードを形成する。EP1 および EP3 受容体は PGE₂ が介在する神経毒性に必須であるのに対し、EP2 および EP4 受容体は神経保護的である。PGE₂ 受容体はアストロサイトの機能にも寄与し、アストロサイトの増殖や炎症性サイトカインの産生を通じて、神経炎症において重要な役割を果たしている。本研究では、Orai2 は Ptgs2 (COX2) と Ptgs2 (mPGES-1) を制御したが、Pla2g4a (cPLA2) は制御しなかった。COX には COX1-3 の 3 つのアイソフォームがあり、COX2 は様々な脳疾患に関連する誘導性アイソフォームである。COX2 はグリアではほとんど発現しないが、反応性アストロサイトでは増加する。今回の知見は、COX2 が炎症時のアストロサイトにおいて重要な役割を果たしている可能性を示していると考えられる。

結論として、本研究において研究代表者らは、アストロサイトが TNF α /IL1 α との共刺激によって炎症性表現型に変化し、様々な炎症性分子を産生することを見出した。特に、相乗的に上昇した Orai2 は、PGE₂ の産生を負に制御する。このことは、神経炎症におけるアストロサイトの新たな役割やメカニズムを示唆しており、神経変性疾患の病態制御に役立つ可能性がある。



研究成果全体の模式図: 参照 Nakajima et al., *Glia* 70, 1666–1680 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Hiroki, Fujita Sayaka, Kakaie Masashi, Nagayasu Kazuki, Oh hora Masatsugu, Shirakawa Hisashi, Kaneko Shuji	4. 巻 70
2. 論文標題 Orai2 channel regulates prostaglandin E2 production in TNF /IL1 stimulated astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1666 ~ 1680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.24188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中島弘貴、藤田沙也香、抱将史、永安一樹、大洞将嗣、白川久志、金子周司
2. 発表標題 Orai2チャンネルは炎症性刺激を受けたアストロサイトにおけるプロスタグランジンE2産生を制御する
3. 学会等名 TRP研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島弘貴、藤田沙也香、抱将史、永安一樹、大洞将嗣、白川久志、金子周司
2. 発表標題 炎症性刺激を受けたアストロサイトにおけるOrai2チャンネルの機能解明
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Nakajima, Sayaka Fujita, Masashi Kakaie, Kazuki Nagayasu, Masatsugu Oh-hora, Hisashi Shirakawa, and Shuji Kaneko
2. 発表標題 The role of Orai2 channel in pro-inflammatory astrocytes
3. 学会等名 THE 50TH NAITO CONFERENCE Glia World, Glial Cells Governing Brain Functions (国際学会)
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
研究協力者	金子 周司 (Kaneko Shuji) (60177516)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	
研究協力者	永安 一樹 (Nagayasu Kazuki) (00717902)	京都大学・薬学研究科・助教 (14301)	
研究協力者	大洞 将嗣 (Ohora Masatsugu) (40351506)		

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
---------	---------