

令和元年9月6日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15532

研究課題名(和文)活性化アストロサイトの意義を探る - ナノサージェリー法を用いて -

研究課題名(英文) Analysis for activated astrocytes -with nano surgery method-

研究代表者

池島 宏子 (IKESHIMA, Hiroko)

早稲田大学・理工学術院・その他(招聘研究員)

研究者番号：60265783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは血管からニューロンに栄養や神経伝達物質を供給し、血液脳関門(BBB)の機能を持つことが知られている。その足突起は血管内皮細胞間のタイトジャンクションに機能すると考えられているが、技術的な制約によりその真相は未知のままである。本研究者は、レーザーアブレーションを利用して、マウスのアストロサイト足突起の機能解析を行った。その結果、血管からアストロサイト足突起が剥がれている状態でも、血管を染色した色素の漏出は認められなかった。一方、脳血管を損傷した際には色素の漏出が認められた。このことから、脳血管を巻くアストロサイトの足突起はBBBの機能維持に直接関与していないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、レーザーアブレーションを初めてアストロサイトに適用した。これまでの遺伝子改変マウスを用いた解析とは異なり、生きたマウス脳内のたった一つのアストロサイト足突起の挙動を追跡することが可能である。今後さらに、アストロサイトの機能を明らかにする上で有用な手法であると考えられる。BBBの存在により、脳神経疾患に対する薬の投与に対してはバリアーとなることが治療を困難にしている。本研究では脳血管へのアブレーションによって、BBBを一時的に破綻させることを可能にした。将来的には本法をヒト用に改良して、BBBが破綻しているうちに脳内へ薬を投与して脳神経疾患の治療に応用することを目指している。

研究成果の概要(英文)：Astrocyte plays functional roles such as provision of nutrients from blood vessels to neurons, supplying neurotransmitters and supporting blood brain barrier (BBB) integrity. Astrocytic endfeet are known to support the integrity of BBB through maintenance of the tight junction between endothelial cells of blood vessels but evidence of its direct contribution is still unclear owing to technical limitations. In this study, astrocytic endfoot covering blood vessels were removed by the laser ablation (nano surgery method) with two photon laser microscopy in in vivo mouse brain, and re-covering of blood vessels with astrocytic endfeet was observed. BBB kept their integrity without astrocytic endfoot covers: leakage of blood vessel marker dyes from blood vessels was not observed during blood vessels were stripped, while dyes leaked when the vascular walls were ablated. These results suggest that astrocytic endfoot covering blood vessels do not contribute to the immediate BBB barrier.

研究分野：神経免疫学

キーワード：アストロサイト 二光子レーザー顕微鏡 レーザーアブレーション(ナノサージェリー法) 足突起
脳血管 血液脳関門

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アストロサイトはグリア細胞の一つで、神経細胞への栄養供給や神経活動・学習・記憶にも重要な役割を果たしている。これまでに本研究者は、脳損傷モデルの一つとしてマウス大脳皮質への穿刺脳損傷モデルを作成してアストロサイトの機能解析を行ってきた。脳が損傷を受けるとアストロサイトが活性化し、炎症性サイトカインを産生し、増殖・移動を示した。また活性化アストロサイトは、脳損傷によって破綻した血液脳関門 (BBB) の修復にも機能する可能性を示した。

アストロサイト足突起はほぼ全ての脳血管周囲を巻いており、BBB の役割を担っていると考えられてきた。しかしながら、アストロサイトの足突起のみを除去する手法がこれまでに無かったことから、その生理学的な意義は明らかにされてこなかった。そこで本研究者は、二光子レーザー顕微鏡 (2PLSM) を用いたレーザーアブレーション法 (ナノサージェリー法) により、アストロサイト足突起のみを損傷してその機能解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究では 2PLSM を用いて、麻酔下で生きたマウス脳内におけるアストロサイトの *in vivo* imaging を試みた。2PLSM は、長波長のレーザーを用いるために生体に対して非侵襲・非破壊の手法である。これまで本研究者は、固定後のマウス脳切片を用いた断片的なアストロサイトの解析を行ってきたが、本研究では生きたマウス脳内におけるアストロサイトの動態の経時的な変化に着目した。また、脳内の微小な領域を損傷することが可能な 2PLSM によるレーザーアブレーション法を用いて、アストロサイトの足突起のみを除去する手法を確立し、血管を巻く足突起の生理学的な意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

アストロサイト特異的に eGFP を発現する GFAP-eGFP マウス (8 週齢, 雌雄) を麻酔下で頭骨に歯科用ドリルで穴を開けて、カバーガラスで置換した (ウインドウ作成)。2PLSM を用いて eGFP を発現するアストロサイトの *in vivo* imaging を行った。その際、血管を Evans Blue (EB) で染めて、脳内のアストロサイトと血管をそれぞれ蛍光標識により区別して観察した。さらに、脳内の微小な領域に 2PLSM のレーザーを短時間照射して、アストロサイトの足突起を損傷した (レーザーアブレーション法)。その後のアストロサイトの足突起や周囲のアストロサイトの動態を経時的に観察を行った。この間、マウスは麻酔しておき、長時間の観察の際は追加麻酔をするか、一度ケージに戻して覚醒させてから再度麻酔して観察を継続した。

4. 研究成果

- (1) 二光子顕微鏡を用いた *in vivo* imaging 法によって、麻酔下のマウス大脳皮質におけるアストロサイト足突起にレーザー照射してアブレーションを行い、脳血管からアストロサイト足突起を除去した。その後、この領域の経時変化の観察を行った。その結果、おおよそ一日以内に除去されたアストロサイト足突起の血管への再接触が認められ、脳血管をアストロサイトの足突起が覆っている状態が生理的に重要であることが示唆された。
- (2) アブレーション部位を足突起のみならず、アストロサイトの血管から少し離れた首の領域に行った場合でも血管からアストロサイト足突起の除去が可能であり、この場合でもほぼ同時期に同様に血管への再接触が認められた。
- (3) 乖離したアストロサイト足突起の血管への再接触の過程を経時的に観察した結果、アブレーション後に損傷されずに残った部位から血管に沿って伸展する形で血管への再接触が誘導されていた。このことは、アストロサイトの足突起が再接触する際には何らの誘引因子が血管から分泌されているのではないかと考えられた。
- (4) アストロサイトの足突起にアブレーションして脳血管が露出した状態でも、血管内の染色液 EB は漏出しなかった。また、より分子量が小さい FITC-デキストランを用いて血管を染色した場合も結果は同様で、血管からの漏出は認められなかった。一方、脳血管をアブレーションした際には、一分以内に染色液 EB が漏れ出した。このことから、アストロサイト足突起の除去は BBB の破綻を起こすことなく、BBB に直接的に機能していないことが明らかとなった。
- (5) アブレーションしたアストロサイトが死んだ場合でも、他の生きているアストロサイトの足突起が血管への再接触を行っていた。つまりアストロサイトの生死に関係なく再接触は起きることが明らかとなった。
- (6) マウス脳の window 作成の手術を行うと、その数日後にアストロサイトが活性化することが知られている。そこで、アストロサイトが活性化する前の手術直後に足突起へのアブレーションと観察を行ったが、同様に血管へのアストロサイト足突起の再接触が確認できた。このことは、アストロサイトの活性化の有無に関係なく、乖離したアストロサイト足突起の血管への再接触が誘導されることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

<研究論文> 計 7 件

1. Hideaki Kubotera[#], Hiroko Ikeshima-Kataoka^{#*}, Yoshiki Hatashita, Anna Letizia Allegra Mascaro, Francesco Saverio Pavone, Takafumi Inoue^{*}:
Astrocytic endfeet re-cover blood vessels after removal by laser ablation. (査読あり)
Scientific Reports, 9:1263, 2019. doi: 10.1038/s41598-018-37419-4.
([#]These authors are equally contributed, ^{*}Corresponding author)
2. Hiroko Ikeshima-Kataoka^{*}, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede:
Osteopontin is indispensable for activation of astrocytes in injured mouse brain and primary culture.
(査読あり)
Neurological Research, 40(12):1071-1079, 2018. (^{*}Corresponding author)
doi: 10.1080/01616412.2018.1517995.
3. Kei Hashimoto, Mari Nakashima, Ayana Hamano, Mari Gotoh, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Kimiko Murakami-Murofushi, Yasunori Miyamoto: 2-carba cyclic phosphatidic acid suppresses inflammation via regulation of microglial polarisation in the stab-wounded mouse cerebral cortex. (査読あり)
Scientific Reports, 8(1):9715, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-27990-1.
4. Yoichiro Abe, Wakami Goda, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Masato Yasui:
The Dual Effects of the Astrocyte-Specific Enhancer of the AQP4 M1 Promoter. (査読あり)
FEBS Letters, 591(23):3906-3915, 2017. doi: 10.1002/1873-3468.12910.
5. Kei Hashimoto, Natsumi Ikeda, Mari Nakashima, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Yasunori Miyamoto:
Vitronectin Regulates the Fibrinolytic System during the Repair of Cerebral Cortex in Stab-Wounded Mice. (査読あり)
J. Neurotrauma, 34(22):3183-3191, 2017. doi: 10.1089/neu.2017.5008.
6. Hiroko Ikeshima-Kataoka^{*} and Masato Yasui:
Correlation between astrocyte activity and recovery from blood-brain barrier breakdown caused by brain injury. (査読あり)
Neuroreport, 27(12): 894-900, 2016. (^{*}Corresponding author)
doi: 10.1097/WNR.0000000000000619.
7. Hiroko Ikeshima-Kataoka^{*}, Yoichiro Abe, Masato Yasui:
Aquaporin 4 dependent expression of GFAP and TN-C in activated astrocytes in stab wound mouse brain and in primary culture. (査読あり)
J. Neurosci. Res., 93:121-129, 2015. (^{*}Corresponding author) doi: 10.1002/jnr.23467.

<総説論文>計 2 件

1. Mitsuhiro Morita, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Marko Kreft, Nina Vardjan, Robert Zorec, Mami Noda:
Metabolic Plasticity of Astrocytes and Aging of the Brain. (査読あり)
Int. J. Mol. Sci. 20(4):E941, 2019. Review doi: 10.3390/ijms20040941.
2. Hiroko Ikeshima-Kataoka^{*}:
Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes. (査読あり)
Int. J. Mol. Sci. 17(8): E1306, 2016. Review (^{*}Corresponding author) doi: 10.3390/ijms17081306.

[学会発表] (計 28 件)

<招待講演 (国際学会) > 計 5 件

1. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA (invited speaker at Plenary Lecture), Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Yoko HONJYO, Masato YASUI:
Reactive Astrocyte has a Neuroimmunological Function in injured Mouse Brain.
World Summit on Neurology & Neuroscience, Montreal, Canada, September 26-27, 2018
2. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA (invited symposiast, chairperson and received “BEST PRESENTATION AWARD”), Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Yoko HONJYO, Masato YASUI:
Activated Astrocytes has a Neuroimmunological Function in Stab Wounded Mouse Brain.
ICTBISN 2018: 20th International Conference on Traumatic Brain Injury and Sports Neurology, Prague, Czech, March 22-23, 2018
3. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA (invited symposiast and chairperson), Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Yoko HONJYO, Masato YASUI: Astrocyte Reactivation has a Neuroimmunological Role in Injured Mouse Brain.
BIT's 7th World Gene Convention 2016 Shanghai, China, November 3-5, 2016
4. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA (invited symposiast), Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Yoko HONJYO, Masato YASUI:
Functional Role of Reactive Astrocytes in Injured Mouse Brain.
9th Annual World Protein & Peptide Conference, Dalian, China, April 25-28, 2016
5. Hiroko Ikeshima-Kataoka (invited symposiast):
Functional analysis of activated astrocytes in injured mouse brain._
JSPS Core-to-Core Program "3D Lab Exchange Symposium 日本学術振興会研究拠点形成事業「立体展開研究交流シンポジウム」 A-STAR, Singapore, September 7-9, 2015

<学会発表（国際学会）>計 11 件

1. Hiroko Ikeshima-Kataoka, Motoko Furukawa, Sayaka Inui, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede, Masato Yasui:
Neuroimmunological function of osteopontin in activation of astrocytes in stab wound mouse brain and LPS stimulated primary culture. (査読あり)
13th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, March, 2019
2. Hiroko Ikeshima-Kataoka, Motoko Furukawa, Sayaka Inui, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede, Masato Yasui:
Neuroimmunological function of osteopontin in activation of astrocytes in stab wound mouse brain and LPS stimulated primary culture. (査読あり)
Cold Spring Harbor-Asia Conference, Novel Insights into Glia Function & Dysfunction
Suzhou, China, December, 2018
3. Mari Nakashima, Kei Hashimoto, Ayana Hamano, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Mari Gotoh, Kimiko Murakami-Murofushi, Yasunori Miyamoto:
2-carba cyclic phosphatidic acid contributes to the repair of stab-wounded cerebral cortex via regulation of microglial and astrocyte cells. (査読あり)
The American Society for Cell Biology, San Diego, CA, USA, December, 2018
4. Hideaki KUBOTERA, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Yoshiki HATASHITA, Anna Letizia ALLEGRA MASCARO, Francesco PAVONE, Takafumi INOUE:

- Characteristics of astrocytic endfeet in mouse brain revealed by laser ablation. (査読あり)
Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, November, 2018
5. Hideaki KUBOTERA, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Anna Letizia ALLEGRA MASCARO, Francesco PAVONE, Takafumi INOUE:
Re-covering blood vessels by astrocytic endfeet after laser ablation. (査読あり)
18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, Japan, July, 2018
6. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA (received “Best Poster Presentation Award”), Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Yoko HONJYO, Manae IMAMURA and Masato YASUI :
Astrocyte Reactivation is Concerned in BBB Recovery from Breakdown. (査読あり)
2nd International Conference on Neurology and Brain Disorders, Rome, Italy, June, 2018
7. Kei HASHIMOTO, Masako TANABE, Natsumi IKEDA, Mari NAKASHIMA, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Yasunori MIYAMOTO:
Vitronectin regulates the fibrinolytic system and inflammation during the repair of cerebral cortex in stab-wounded mice. (査読あり)
American Society for Cell Biology, Philadelphia, USA, December, 2017
8. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Yoko HONJYO, Manae IMAMURA and Masato YASUI :
Reactivation of Astrocytes correlated to Recovery from Blood-Brain Barrier Breakdown in the Mouse Brain Injury. (査読あり)
International Society for Neurochemistry-European Society for Neurochemistry
Paris, France, August, 2017
9. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA and Masato YASUI:
Role of Astrocyte Activation for Blood-Brain Barrier Breakdown after the Brain Injury. (査読あり)
13th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Edinburgh, UK, July, 2017
10. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Motoko FURUKAWA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA and Masato YASUI:
Analysis of regulatory mechanism for upregulation of TN-C and GFAP expression in activated astrocytes in injured mouse brain and in primary culture. (査読あり)
10th FENS Forum of Neuroscience, Copenhagen, Denmark, July, 2-6, 2016
11. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Masato YASUI:
Functional analysis of TN-C and GFAP induced upregulation in the reactive astrocytes in the injured brain and in primary culture. (査読あり)
12th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Bilbao, Spain, July, 2015

<学会発表(国内)>計 12 件

1. Mari Nakashima, Kei Hashimoto, Ayana Hamano, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Mari Gotoh, Kimiko Murakami-Murofushi, Yasunori Miyamoto:
The effect of carba-derivative of cyclic phosphatidic acid on microglial and astrocyte cells during the repair of a stab-wounded mouse cerebral cortex. (査読あり)
第 61 回日本神経化学会大会, 神戸, 2018 年 9 月
2. Hideaki KUBOTERA, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Anna Letizia ALLEGRA MASCARO,

Francesco PAVONE, Takafumi INOUE:

Analysis of the relationship between astrocytic endfoot and blood vessel. (査読あり)

第 41 回日本神経科学大会, 神戸, 2018 年 7 月

3. Kei Hashimoto, Natsumi Ikeda, Mari Nakashima, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Yasunori Miyamoto:
Vitronectin regulates the fibrinolytic system in the stab-wounded mouse cerebral cortex (査読あり)
第 50 回日本結合組織学会学術大会, 福岡, 2018 年 6 月
4. Mari Nakashima, Ayana Hamano, Kei Hashimoto, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Mari Gotoh, Kimiko Murofushi, Yasunori Miyamoto:
The effect of carba-derivative of cyclic phosphatidic acid on the repair of a stab-wounded cerebral cortex. (査読あり)
第 60 回日本神経化学学会大会, 仙台, 2017 年 9 月
5. Hideaki KUBOTERA, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Anna Letizia ALLEGRA MASCARO, Francesco PAVONE, Takafumi INOUE: Functional analysis of astrocyte endfoot for the blood-brain barrier integrity in mouse brain. (査読あり)
第 40 回日本神経科学大会, 幕張, 2017 年 7 月
6. Hiroko Ikeshima-Kataoka, Motoko Furukawa, Sayaka Inui, Manae Imamura, Masato Yasui:
Activated astrocytes concern in recovery from BBB breakdown in mouse brain injury. (査読あり)
第 90 回日本薬理学会大会, 長崎, 2017 年 3 月
7. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Motoko Furukawa, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Masato YASUI:
Functional role of activated astrocytes for blood-brain barrier breakdown after the brain injury. (査読あり)
第 38 回日本生物学的精神医学会 ・ 第 59 回日本神経化学学会合同大会, 福岡, 2016 年 9 月
8. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Motoko Furukawa, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Masato YASUI: Functional analysis of activated astrocytes induced by brain injury for blood-brain barrier. (査読あり)
第 39 回日本神経科学大会, 横浜, 2016 年 7 月
9. 池島 (片岡) 宏子, 古川元子, 乾さやか, 今村愛枝, 安井正人: 損傷脳組織における活性化アストロサイトの機能解析—アクアポリン4に着目して— (査読あり)
第 129 回日本薬理学会近畿部会, 広島, 2016 年 6 月
10. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Motoko Furukawa, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Masato YASUI: Functional role of activated astrocytes in blood-brain barrier breakdown caused by brain injury. (査読あり)
第 89 回日本薬理学会年, 横浜, 2016 年 3 月
11. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Motoko Furukawa, Sayaka INUI, Manae IMAMURA, Masato YASUI:
Upregulation of TN-C and GFAP in reactive astrocytes in injured brain and in primary culture is dependent on aquaporin-4 expression. (査読あり)
第 58 回日本神経化学学会大会, 埼玉, 2015 年 9 月
12. Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Sayaka INUI, Manae IMAMURA Masato YASUI:
Functional analysis of molecules around injury site in the CNS (査読あり)
第 38 回日本神経科学大会, 神戸, 2015 年 7 月