

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19965

研究課題名(和文)脳虚血時のP2X4受容体を介した血管内皮による虚血耐性獲得メカニズムの解析

研究課題名(英文)The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning

研究代表者

尾崎 友彦(OZAKI, TOMOHIKO)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00723123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞治療に対し神経細胞の保護に限定せずグリア細胞や血管内皮細胞等の周囲の細胞にも着目すべきであるというNeurovascular Unitという概念が重要視されている。一過性の虚血(ischemic preconditioning <IPC>)は虚血耐性を獲得する刺激の一つと知られる。我々は、この際の血流の変化を血管内皮細胞が感知することに着目した。IPCにより血管内皮細胞に存在するP2X4受容体が血流のずり応力を感じ、神経保護分子であるオステオポンチンを介して脳梗塞に対する脳虚血耐性を獲得することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neurovascular Unit, the concept that not only neuron but also surrounding cells including glia and endothelial cells are needed to investigate ischemic stroke, has been regarded as an important concept. Ischemic preconditioning (IPC) is one of the stress to gain ischemic tolerance. We focused on vascular endothelial cells that detect vascular flow change during IPC. We revealed that P2X4 receptor on the vascular endothelial cells detect blood shear stress and induced ischemic tolerance via neuroprotective molecule osteopontin.

研究分野：脳卒中

キーワード：P2X4 receptor オステオポンチン 虚血耐性 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

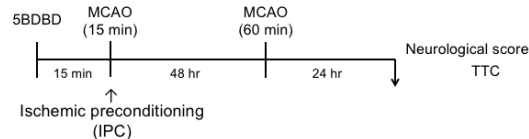
脳梗塞に対する治療は t-PA や血栓回収療法により進歩してきた。しかし時間的制約により適応患者は限られているのが現状であり脳保護薬の開発が望まれている。2000年代に入り脳梗塞治療に対し神経細胞の保護に限定せずグリア細胞や血管内皮細胞等の周囲の細胞にも着目するべきであるという Neurovascular Unit という概念が重要視されている。

2. 研究の目的

虚血耐性現象は、脳虚血実験系では確実な脳保護効果を示す実験系として知られている。様々な刺激により脳は虚血耐性を獲得するが、いかにして神経細胞の保護がもたらされるか、その分子メカニズムに不明な点が多い。一過性の虚血 (ischemic preconditioning <IPC>) は虚血耐性を獲得する刺激の一つと知られる。IPCにより血流が停止・再灌流し、その物理的刺激は流れ刺激に基づくずり応力の変化として血管内皮細胞に伝わると考えられる。そのため、IPCによる虚血耐性の獲得に血管内皮細胞が関与すると考えられる。本研究では、ずり応力のセンサーとして知られる血管内皮に存在する P2X4 受容体の虚血耐性獲得への関与を解明することを目的とした。

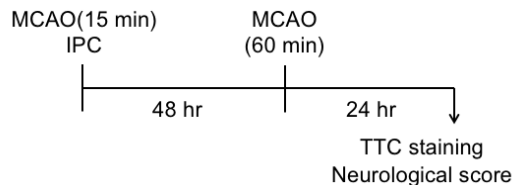
3. 研究の方法

**P2X4 受容体が虚血耐性獲得に関わっているか。** 8~10 週齢、雄の C57BL/6 マウスを用い、脳梗塞モデルとして、塞栓系を使用した中大脳動脈閉塞(MCAO)を行い、60 分の閉塞を施した。IPC には 60 分 MCAO の 48 時間前に 15 分間 MCAO の閉塞を施した。60 分 MCAO の 24 時間後の神経症状と梗塞体積を 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride(TTC)を用いて評価した。さらにこの実験モデルにおいて、IPC の 1 時間前に P2X4 受容体の拮抗薬である [5-(3-bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one](5BDBD) を脳室内に投与した。

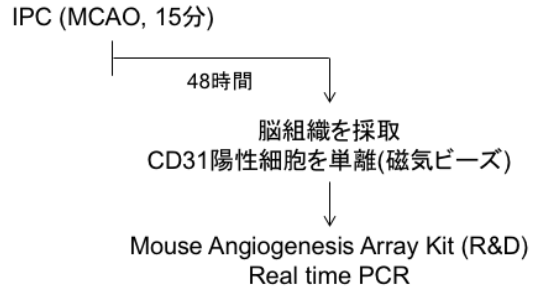


**P2X4 受容体がマウス脳内発現部位の同定。** P2X4 受容体と NeuN、GFAP、CD31、CD11b と共染色した。

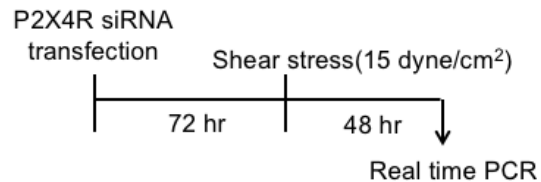
**血管内皮細胞の P2X4 受容体が虚血耐性獲得に関わっているか。** 血管内皮特異的に P2X4 受容体をノックアウトさせたマウスを作成した。同様に 60 分 MCAO の 48 時間前に 15 分 MCAO を行った。



**IPC 後の血管内皮細胞にはどのような分子が発現しているか。** Mouse Angiogenesis Array Kit (R&D)を用いて 15 分 MCAO を行った 48 時間後のマウスの脳を網羅的に解析した。さらに 15 分 MCAO を行った 48 時間後のマウスの血管内皮細胞を MACS (Miltenyi Biotec)を用いて採取し Real-time PCR を行ない mRNA の発現を調べた。

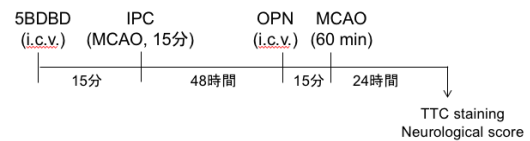


**ずり応力を感知した血管内皮細胞における P2X4 受容体を介したオステオポンチン発現の研究。** mouse brain vascular endothelial cell (b.End3 細胞)を用いて 48 時間のずり応力をかけ Real-time PCR を行ない mRNA の発現を調べた。さらに、ずり応力をかける前に P2X4 受容体 siRNA を 3 日間 b.End3 細胞と共培養させ P2X4 受容体の働きを阻害させる実験を行った。



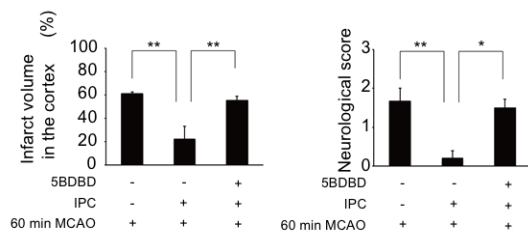
**オステオポンチンで虚血耐性は再獲得できるか。**

次に、P2X4 受容体拮抗剤 5BDBD 投与後に 15 分 MCAO を行い、その 48 時間後に 60 分 MCAO を行うコントロール群に対して 60 分 MCAO の 15 分前にオステオポンチンリコンビナントを脳室内投与した群を比較した。

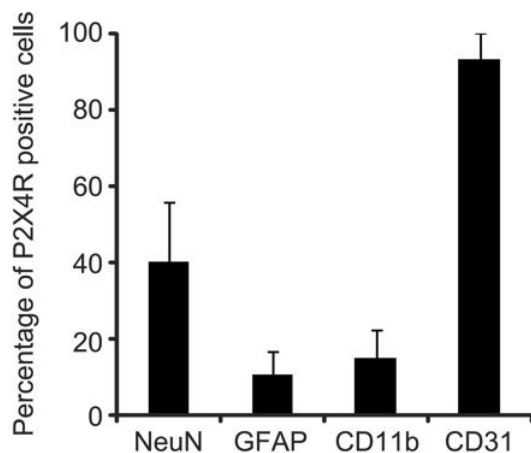


4. 研究成果

**P2X4 受容体が虚血耐性獲得に関わっているか。** IPC 群で梗塞体積の有意な縮小を認め、神経学的にも有意に良好であった。さらに、5BDBD を脳室内に投与すると IPC の効果が阻害され梗塞体積の有意な再増大を認めた。

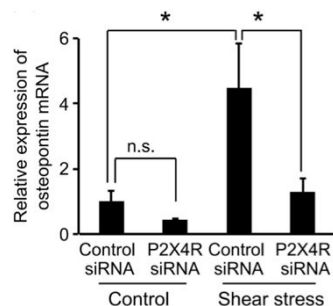


**P2X4 受容体がマウス脳内発現部位の同定。**  
P2X4 受容体は主に血管内皮に発現していることが分かった。



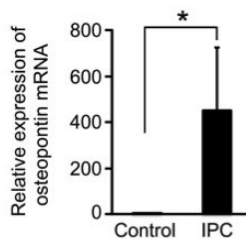
**血管内皮細胞の P2X4 受容体が虚血耐性獲得に関わっているか。** P2X4 受容体

+/:flox/flox マウスと比較し P2X4 受容体 cre+/:flox/flox マウスでは IPC 効果が認められず、有意に梗塞体積が大きく、神経症状も悪い結果であった。

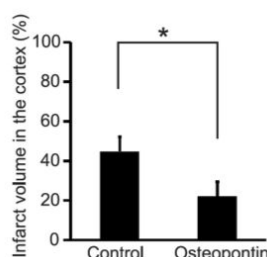


**IPC 後の血管内皮細胞にはどのような分子が発現しているか。** Mouse Angiogenesis Array で神経保護分子であるタンパク質のオステオポンチンの上昇を認めた。IPC 後 48 時間後のマウス脳血管内皮細胞でオステオポンチン mRNA の有意な上昇を認めた。

**ずり応力を感知した血管内皮細胞における P2X4 受容体を介したオステオポンチン発現の研究。** ずり応力をかけない群と比較し、オステオポンチンの有意な上昇を認めた。さらにあらかじめ P2X4 受容体 siRNA と共培養させるとずり応力をかけてもオステオポンチンの上昇は認めなかった。



**オステオポンチンで虚血耐性は再獲得できるか。** オステオポンチンのリコンビナント投与群で有意な梗塞体積の縮小と、神経症状の改善を認めた。



以上の実験よりずり応力を感知した血管内皮細胞に存在する P2X4 受容体がオステオポンチンを介して虚血耐性獲得に寄与していることが明らかとなった。

#### 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 1 件)

Ozaki T, Muramatsu R, Fujinaka T, Yoshimine T, Yamashita T. P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning: *Scientific Reports* 2016 May 13;6:25893

[学会発表](計 5 件)

Tomohiko Ozaki, Rieko Muramatsu, Toshiyuki Fujinaka, Toshiki Yoshimine, Toshihide Yamashita. 2017 February 24: 2017 International Stroke Conference (ISC). The P2x4 Receptor Is Required For Neuroprotection Via Ischemic Preconditioning. Oral. Houston, US

尾崎友彦、村松里衣子、木下学、中村元、吉峰俊樹、貴島晴彦、山下俊英。一過性脳虚血におけるオステオポンチン発現の検証～基礎的研究結果のヒトでの検証～、第 18 回日本分子脳神経外科学会、口演、2017 年 8 月 25 日甲府

尾崎友彦、村松里衣子、木下学、中村元、貴島晴彦、山下俊英。バルーン閉塞試験に対する生体反応の検討 プロテオミクス解析を用いた網羅的解析も含めたタンパク質発現変動、第 33 回日本脳神経血管内治療学会学術総会、口演、2017 年 11 月 25 日東京

尾崎友彦、村松里衣子、中村元、木下学、村上知義、吉峰俊樹、山下俊英。一過性脳虚血におけるオステオポンチン発現の検証～基礎的研究結果のヒトでの検証～。日本脳神経外科学会第 75 回学術総会。ポスター、2016 年 4 月 29 日福岡

尾崎友彦、村松里衣子、藤中俊之、吉峰俊樹、山下俊英。脳虚血に対する P2X4 受容体を介した虚血耐性獲得のメカニズム。第 27 回日本脳循環代謝学会総会。口演。2015 年 10 月 31 日富山

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

尾崎 友彦 (OZAKI TOMOHIKO)

大阪大学 医学系研究科 招聘教員

研究者番号：00723123

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )