

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19016

研究課題名(和文) アストロサイト性虚血耐性の分子メカニズム解析

研究課題名(英文) Mechanism of astrocyte-mediated ischemic tolerance

研究代表者

平山 友里 (HIRAYAMA, Yuri)

山梨大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：30732804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：虚血耐性とは、あらかじめ短時間虚血(Preconditioning; PC)を経験しておくことで、その後の長時間虚血に対する抵抗性が獲得される現象である。我々はこれまでに、PC後に活性化されるアストロサイトで発現亢進するHIF-1が虚血耐性獲得に重要であることを報告した。PC後のHIF-1発現亢進は神経細胞とアストロサイトで認められるが、なぜ神経細胞ではなくアストロサイトのHIF-1が重要であるかは不明であった。本研究により、神経細胞とアストロサイトでHIF-1の発現メカニズムに違いがあることを見出し、この違いがアストロサイトHIF-1の重要性を説明する上で鍵となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Brain ischemic tolerance is an endogenous neuroprotective mechanism, whereby an experience of mild ischemic episode (preconditioning; PC) produces resilience to subsequent much severe ischemic injury. We previously showed that PC-induced activation of astrocytes, and their subsequent expression of HIF-1 is responsible for ischemic tolerance. Although PC also increased HIF-1 in neurons, this was not involved in ischemic tolerance. Here, we show the difference in mechanism of HIF-1 increase between neurons and astrocytes, and answer why astrocytic HIF-1 is more important.

研究分野：神経薬理学

キーワード：グリア細胞 アストロサイト 脳梗塞 虚血耐性 ATP受容体

## 1. 研究開始当初の背景

「虚血耐性」とは、先行して非侵襲的虚血 (PC; Preconditioning) を経験することにより、その後の侵襲的虚血に対する抵抗性を獲得する現象である。これは臨床的にも、実験的にも観察される現象であり、またその強力な脳保護作用により、これまでに多くの精力的な研究がなされ、様々な分子メカニズムが報告されてきた。しかし、それらの研究の多くは神経細胞のみに注目したものである。脳には神経細胞以外に、その10倍も多い数のグリア細胞が存在している。特に、グリア細胞の中で最大数を占めるアストロサイトは、多数の神経細胞伝達物質の受容体や輸送体を発現し、またグリア伝達物質と呼ばれる化学伝達物質により、神経細胞と積極的にコミュニケーションを取っている。従って、脳の生理機能及び病態生理機能の解明にはグリア細胞の視点は不可欠であり、これが欠けていると、脳虚血耐性メカニズムの解明、そして有効な脳保護薬の開発へと繋げることはできない。

我々はこれまでに、グリア細胞に注目した脳虚血耐性メカニズムの解析を行い、既に以下の3点を明らかにしている。

- (1) *In vivo* マウス脳虚血耐性モデルを独自の方法で作製し、PCによる虚血耐性獲得にはアストロサイトの活性化が必須であること (アストロサイト性虚血耐性)。
- (2) 活性化アストロサイトで発現誘導される P2X7 受容体が、アストロサイト性虚血耐性の責任分子であること。
- (3) 虚血耐性効果をもたらすアストロサイト P2X7 受容体の下流シグナルとして、さまざまな神経保護分子の産生を誘導する転写因子 hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  が中心的な役割を果たしていること。

このように、アストロサイトが虚血耐性獲

得に必須であること、またその分子メカニズムとして HIF-1 $\alpha$  カスケードが中核を担うことが明らかとなった。HIF-1 $\alpha$  は虚血後に神経細胞で発現亢進することがよく知られている分子であるが、この神経性 HIF-1 $\alpha$  はなぜか虚血耐性の獲得には関与していない。これらが「アストロサイト性虚血耐性」の特性及び生理的意義を説く鍵と考えられるが、何故アストロサイトの HIF-1 $\alpha$  でないと機能しないのかについては、全く不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに見出したアストロサイト依存的な虚血耐性の中心カスケード「P2X7 受容体/HIF-1 $\alpha$  経路」に注目し、虚血耐性獲得に至るメカニズムの詳細を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) *In vivo* マウス脳虚血モデル実験：中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) モデルを採用し、15分間虚血を PC として用いた。各種タンパク発現変化は免疫組織学的解析にて評価した。アストロサイトのマーカーは GFAP あるいは GS を、神経細胞のマーカーは NeuN を用いた。
- (2) *In vitro* 初代培養細胞実験：神経細胞とアストロサイトの初代培養細胞を用い、分子生物学的及び生化学的解析を中心に検討した。

## 4. 研究成果

- (1) アストロサイトと神経細胞の HIF-1 $\alpha$  発現パターンは異なる

PC 後の HIF-1 $\alpha$  発現の経時的変化をアストロサイトと神経細胞に分けて調べるために、MCAO モデルを用いて PC (15分間虚血) を負荷し、免疫組織化学染色法にて HIF-1 $\alpha$  の発現変化を調べた。神経細胞 HIF-1 $\alpha$  は PC1 日後から発現亢進していたが、その発現

は一過的であった (図 1)。一方、アストロサイト HIF-1 $\alpha$  は PC3 日後、活性化したアストロサイトで発現亢進しており、少なくとも 2 週間までその発現は持続していた。これはアストロサイトの P2X7 受容体発現タイムコースとよく一致していた。これらの結果から、神経細胞とアストロサイトで HIF-1 $\alpha$  発現メカニズムが異なることが示唆された。

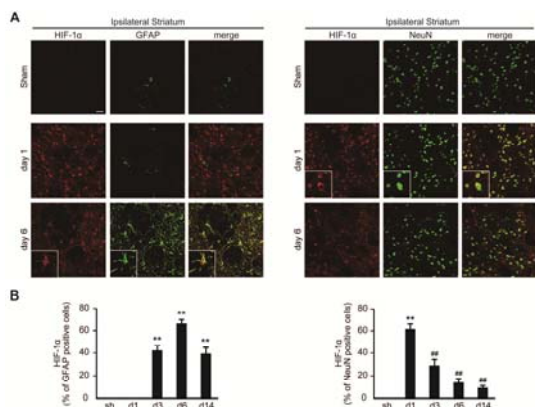


図1. アストロサイトと神経細胞におけるPC後のHIF-1 $\alpha$ 発現パターンの違い

(2) アストロサイト HIF-1 $\alpha$  は P2X7 受容体依存的なメカニズムを介して発現制御されている

HIF-1 $\alpha$  発現は通常、酸素依存的に働く PHD2 によって分解されるが、PC のような低酸素負荷によって PHD2 の機能が阻害される結果、HIF-1 $\alpha$  が細胞質内に蓄積、核内に移行し、神経保護作用をもつ複数のターゲット分子が産生されることが知られている。本研究の *in vitro* 実験においても、初代培養神経細胞への低酸素負荷により、有意な HIF-1 $\alpha$  発現亢進が認められた (図 2A)。一方、初代培養アストロサイトでは、低酸素負荷によって HIF-1 $\alpha$  の発現は変化しなかった。また、*in vivo*、*in vitro* 実験において、PHD2 は神経細胞にて高発現しているのに対し、アストロサイトでの発現は殆ど認められなかった (図 2B、C)。したがって、神経細胞とは異なり、アストロサイトの HIF-1 $\alpha$  発現は低酸素非依存的なメカニズムによって制御されていることが考えられた。

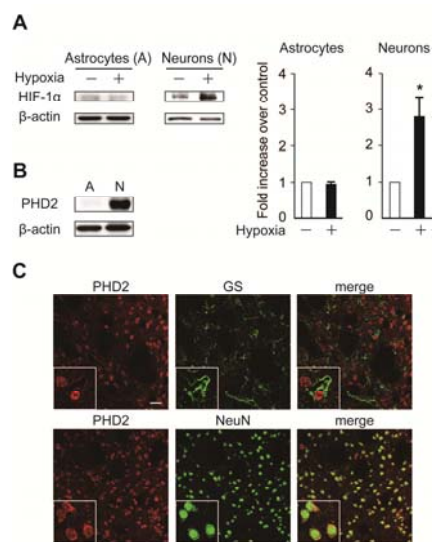


図2. 低酸素負荷によるHIF-1 $\alpha$ 発現とPHD2の局在

我々は以前に、PC 後のアストロサイト HIF-1 $\alpha$  発現は P2X7 受容体依存的であることを報告している。そこで初代培養細胞における P2X7 受容体アゴニスト BzATP の影響を検討したところ、アストロサイト HIF-1 $\alpha$  は顕著に発現亢進したのに対し、神経細胞 HIF-1 $\alpha$  の発現変化は認められなかった (図 3A)。また、P2X7 受容体の内因性リガンド ATP によるアストロサイト HIF-1 $\alpha$  の発現亢進は、P2X7 受容体欠損アストロサイトでは認められなかった (図 3B)。以上のことから、低酸素依存的なメカニズムによって制御されている神経細胞 HIF-1 $\alpha$  とは異なり、アストロサイト HIF-1 $\alpha$  は低酸素非依存的であるが、代わりに P2X7 受容体依存的なメカニズムを介して発現制御されていることが明らかとなった。

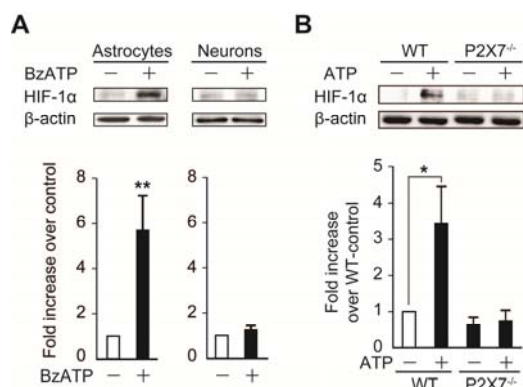


図3. アストロサイトP2X7受容体の活性化によるHIF-1 $\alpha$ 発現

## <結論>

神経細胞とアストロサイトでは PC 後の HIF-1 $\alpha$  発現メカニズムが全く異なること、アストロサイト HIF-1 $\alpha$  は PHD2 による分解を受けないため、発現が持続することが明らかとなった。以上のことから、アストロサイト性虚血耐性は、P2X7 受容体を介する持続的な HIF-1 $\alpha$  発現亢進により、神経保護効果を誘導することが示唆された (図 4)。

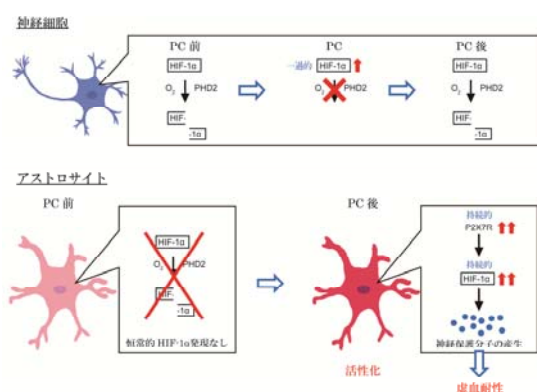


図4. アストロサイトに特有なP2X7/HIF-1 $\alpha$ 経路と虚血耐性

## 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 4 件)

- ① Koizumi S, Hirayama Y, Morizawa YM, New roles of reactive astrocytes in the brain; an organizer of cerebral ischemia, *Neurochemistry International*, in press, 査読有、DOI: 10.1016/j.neuint.2018.01.007
- ② Hirayama Y, Koizumi S, Astrocytes and ischemic tolerance, *Neuroscience Research*, 126, 53-59, 2018 年、査読有、DOI: 10.1016/j.neures.2017.11.013
- ③ Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H, Koizumi S,

Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway, *Nature Communications*, 8(1):28, 2017 年、査読有、

DOI: 10.1038/s41467-017-00037-1

- ④ Hirayama Y, Koizumi S, Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 $\alpha$  expression in astrocytes after ischemic preconditioning, *Glia*, 65(3), 523-530, 2017 年、査読有、DOI: 10.1002/glia.23109

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hirayama Y, Le Pham Ngoc Ha, Koizumi S, Mechanism underlying hypoxia-independent upregulation of astrocytic HIF-1 $\alpha$  after ischemic preconditioning, *Neuroscience 2017*, 2017 年 11 月 12 日、Walter E. Washington Convention Center (Washington, DC)
- ② 平山友里、小泉修一、Glia-mediated ischemic tolerance, 第 60 回日本神経化学学会大会、2017 年 9 月 7 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ③ 平山友里、Le Pham Ngoc Ha、小泉修一、Mechanisms underlying hypoxia-independent upregulation of HIF-1 $\alpha$  in astrocytes, 第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール アストピア (長崎県長崎市)
- ④ 平山友里、小泉修一、アストロサイト P2X7 受容体を介する持続的な脳虚血耐性、第 20 回 Japan Purine Club Meeting、2016 年 10 月 26 日、東京慈恵会医科大学 (東京都港区)
- ⑤ 平山友里、小泉修一、持続的なアストロサイト性脳虚血耐性の分子メカニズム解析、第 135 回日本薬理学会関東部会、2016 年 10 月 8 日、アクトシティ浜松 研修交流センタ

一（静岡県浜松市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 友里 (HIRAYAMA, Yuri)

山梨大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：30732804