

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10121

研究課題名(和文) アストロサイトを標的とした急性脳症新規治療法の探索

研究課題名(英文) A New therapeutic strategies for acute encephalitis by targeting astrocytes

研究代表者

浅井 清文 (Asai, Kiyofumi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：70212462

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)：Aquaporin-4 (AQP4) の細胞内局在をリアルタイムで観察するために、蛍光タンパクとの融合タンパクを遺伝子導入により発現させた。pHluorinとmKateの両者を含む発現ベクターをC6細胞及びACT57細胞に遺伝子導入し、両者の蛍光が観察された。pHluorinのpH感受性と原形質膜上の発現を確認するため、培養液のpHを7.4からpH6.0に変化させたとこ、pHluorinの蛍光が消滅し、これにより原形質膜上に遺伝子導入したAQP4が発現している可能性が示唆され、構築したベクターが機能し、今後の研究に活用できるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築できたAQP4と蛍光タンパクの融合タンパクを発現するベクターを用いることにより、アストロサイトの細胞極性の有無をリアルタイムに観察することが可能となると思われる。この方法を用いることにより、アストロサイトの活性化状態を観察することが可能となり、急性脳症の病態の解析やその治療法の開発に応用できるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：To detect the cellular polarity of astrocyte, we employed aquaporin-4 (AQP4) expression as a marker of polarity. To detect the intracellular distribution of AQP4, pHluorin and mKate double-labeled AQP4 expression vector was constructed. pHluorin was introduced to the extracellular loop of AQP4 and mKate was fused to C-terminal. This vector was transfected to C6 astrocytoma and ACT57 immortalized rat astrocyte. Both green signal (pHluorin) and red signal (mKate) were detected 48 to 96 hrs after transfection. When the extracellular pH was changed from pH7.4 to pH6.0, the green signal was disappeared. This result might suggest AQP4 fusion protein was expressed on the plasma membrane. Next, the co-culture system of bovine brain endothelial cell line tBEC-117 and ACT57 was tested. Clear cellular polarity was not detected at present.

研究分野：神経化学

キーワード：アクアポリン 血液脳関門 アストロサイト 蛍光タンパク 急性脳症

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザや突発性発疹などをはじめとする感染症の重篤な合併症である急性脳症は、代謝異常を主な病態とする症候群 (Reye 症候群など)、興奮毒性を主な病態とする症候群 (痙攣重積型急性脳症など)、サイトカインストームを主な病態とする症候群 (急性壊死性脳症など) の3つに分類されている。それぞれの症候群には、相違点もあるが、共通した病態が存在することが想定されている。その共通な病態として、1) 粘膜炎など中枢神経以外の臓器の炎症に始まり、2) 自然免疫系の賦活化 (マクロファージなど)、3) 血液脳関門の傷害 (脳血管内皮細胞)、4) 脳実質への炎症の波及 (アストロサイト、ミクログリア)、5) 神経の興奮性の異常 (神経細胞) と進展することが考えられている。

申請者は、これら病態のうち、「脳実質への炎症の波及」に注目し、アストロサイト、ミクログリアの活性化機構に関して詳細に検討してきた。その結果、複数のサイトカインがグリア細胞に同時に作用することにより、急激に活性化を生じ、一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が誘導され、産生された一酸化窒素 (NO) が細胞傷害を引き起こすこと、消炎鎮痛薬であるジプロフェナクなど一部のシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤が、サイトカイン存在下では、むしろグリア細胞の活性化を促進することなどを見いだしてきた。このように、グリア細胞における炎症の進展機構の理解は進みつつあったので、これらの知見をもとに、早期に予防的な治療ができれば、急性脳症の発症を防ぐことが可能になると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

発症した急性脳症の治療を考えた場合、原因となる病態を取り除くだけでなく、アストロサイトやミクログリアの活性化状態を終息させ、早期に定常状態に戻す方法が見つかれば、有効な治療手段になるものと考えられる。そこで、本研究においては、アストロサイトの活性化状態に作用し、早期に定常状態に回復させる分子 (薬剤、タンパク性因子など) を見つけ、急性脳症の新たな治療法を見いだすことを目的とした。

アストロサイトは、定常時には細胞極性が存在し、血管内皮細胞側の突起と神経細胞側の突起で分布するトランスポーターなどが異なることが知られている。虚血などにより、活性化し、この細胞極性が失われると、血液脳関門機能も破綻してしまう。一方で、回復期においては、アストロサイトの細胞極性が戻ることにより、血液脳関門機能も回復することが知られている。そこで、本研究では、申請者が考案した新たな培養系を利用し、アストロサイトの細胞極性を指標とした活性化状態のリアルタイム評価系を用いることとした。

3. 研究の方法

1) アストロサイトの活性化状態を検出する指標として、アクアポリン 4 (以下 AQP4) を利用することとした。AQP4 の細胞内局在をリアルタイムで観察するために、蛍光タンパクとの融合タンパクを遺伝子導入により発現させ観察することとした。ヒト AQP4cDNA の細胞外ループに相当する部分に、pH 感受性で緑色を呈する pHluorin の遺伝子を挿入し、さらに、AQP4cDNA の C 末端側に赤色を呈する mKate を挿入した発現ベクターを構築した。また、比較対象として、AQP4cDNA の C 末端側に mKate のみを挿入した発現ベクターも準備した。さらに AQP4 のアイソフォームによる局在の変化の可能性も考慮し、AQP4-M1 (1 番目のメチオニンからのアイソフォーム) と AQP4-M23 (23 番目のメチオニンからのアイソフォーム) の合計 4 種類のベクターを準備した。これら発現ベクターを、ラットアストロサイトマ細胞 C6 に遺伝子導入し、導入後から 24 時間ごとに 96 時間後まで、蛍光タンパクの発現と局在を観察した。

2) 次に、pHluorin の pH 感受性と原形質膜上の発現を確認するため、培養液の pH を 7.4 から pH6.0 に変化させ、蛍光の変化を観察した。

3) 本研究室で樹立したラットアストロサイト不死化細胞 ACT57 にも遺伝子導入し、同様の観察を行った。

4) 上記ベクターを導入した ACT57 細胞と本研究室で樹立したウシ脳血管内皮細胞 tBBEC-117 と共培養を試みた。

4. 研究成果

1) pHluorin と mKate の両者を含む発現ベクターを遺伝子導入した場合、両者の蛍光が観察され、mKate のみの場合は、赤色のみ検出された。

2) pHluorin の pH 感受性と原形質膜上の発現を確認するため、培養液の pH を 7.4 から pH6.0 に変化させたところ、pHluorin の蛍光が消退した。これにより pHluorin の pH 感受性と、原形質膜上にあるタンパクが緑色蛍光を発している可能性が示唆された。今回準備した発現ベクター

の構築で、今後の研究が遂行できる可能性が高いと思われたが、遺伝子導入効率が悪く、改善の余地があるため、ACT57 で試みることにした。

3) ACT57 においても C6 において得られた結果と同様の結果が得られ、今回準備したベクターが機能するものと考えられた。

4) 発現ベクターを導入した ACT57 細胞と tBEC-117 細胞の共培養を試みたが、本研究期間中では、ACT57 細胞が細胞極性を示したという結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Suzuki Takahisa, Yasumoto Miki, Suzuki Yoshiaki, Asai Kiyofumi, Imaizumi Yuji, Yamamura Hisao | 4. 巻 98 |
| 2. 論文標題 TMEM16A Ca ²⁺ -Activated Cl ⁻ Channel Regulates the Proliferation and Migration of Brain Capillary Endothelial Cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Pharmacology | 6. 最初と最後の頁 61 ~ 71 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/mol.119.118844 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamamura Hideto, Suzuki Yoshiaki, Yamamura Hisao, Asai Kiyofumi, Giles Wayne, Imaizumi Yuji | 4. 巻 315 |
| 2. 論文標題 Hypoxic stress upregulates Kir2.1 expression by a pathway including hypoxic-inducible factor-1 and dynamin2 in brain capillary endothelial cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 C202 ~ C213 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00154.2017 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamamura Hideto, Suzuki Yoshiaki, Asai Kiyofumi, Imaizumi Yuji, Yamamura Hisao | 4. 巻 523 |
| 2. 論文標題 Oxidative stress facilitates cell death by inhibiting Orai1-mediated Ca ²⁺ entry in brain capillary endothelial cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 153 ~ 158 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.12.035 | 査読の有無 無 |
| 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 | 藤田 政隆 (Fujita Masataka) (10360637) | 名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 加藤 晋 (Kato Shin) (90551250) | 名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903) | |

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 |
|---------|---------|
| | |