

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08862

研究課題名(和文) グリア細胞におけるSmadシグナリングは脳虚血後の脳内炎症反応を制御するか？

研究課題名(英文) The relationship between Smad signaling and ischemia-induced brain inflammation

研究代表者

中島 崇行 (Nakajima, Takayuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30333644

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)：虚血後の海馬グリア細胞でのSmad活性動態とSmadシグナリングの炎症反応への影響を調べることでグリア細胞でのSmadシグナリングの虚血誘導性脳内炎症反応制御の可能性について検討した。本研究で、虚血後海馬では神経細胞死に伴って、グリア細胞でTGF- β 1/Smadシグナルが活性化することを見出した。虚血後海馬で発現レベルが上昇する代表的な炎症反応関連分子IL-1 β 、TNF- α 、CX3CR1のmRNAに対するTGF- β 1/Smadシグナル阻害剤の脳室内投与の影響を調べたが、本研究ではTGF- β 1/Smadシグナル阻害によるこれらの分子のmRNA発現レベルの変化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去、全脳虚血モデルを用いた研究により虚血後の海馬でのTGF- β 1 mRNA発現レベルの上昇が報告されてる。しかしながら、虚血後海馬においてTGF- β 1が作用する細胞については明らかにされていなかった。今回の研究によって、虚血後の海馬ではミクログリアとアストロサイトがTGF- β 1シグナルの標的細胞となっていることを明らかにすることができた。虚血後脳のグリア細胞は虚血後の病態悪化に関連することが示唆されている。今後、グリア細胞でのTGF- β 1/Smadシグナリングの機能的意義を詳細に検証することで虚血後脳症の病態軽減につながる有効な知見が得られると考える。

研究成果の概要(英文)：Ischemia-induced changes in Smad phosphorylation and the effect of Smad signaling on ischemia-induced brain inflammation in the hippocampus was examined using global cerebral ischemia model rat. Five minutes of ischemia induced neuronal cell death and increased the number of phosphorylated Smad-immunopositive astrocytes and microglia. The ischemia also increased in the expression TGF- β 1 mRNA in the hippocampus. The intracerebroventricular injection of SB525334, an inhibitor of TGF- β 1 signaling, canceled the ischemia-induced increase in the number of phosphorylated Smad-immunopositive glial cells. These results suggest that the ischemia induces the TGF- β 1/Smad signaling in the glial cells of the hippocampus. The expression levels of mRNAs for brain inflammation molecules including IL-1 β , TNF- α and CX3CR1 increased in the hippocampus after ischemia. However, the treatment of SB525334 did not changed the ischemia-induced increase in the expression level of mRNAs of these molecules.

研究分野：神経解剖学

キーワード：全脳虚血 Smad TGF- β 1 ミクログリア アストロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトが呼吸や心拍の一時停止に陥ると、一命は取り留めたとしても脳機能障害が残ることがある(虚血後脳症)。脳に血液を供給する総頸動脈と椎骨動脈を一時的に閉じる全脳虚血は、虚血後脳症の病態に類似する。ところで、虚血に陥った脳では神経細胞が死滅すると、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞が急速に活性化して種々のサイトカインを分泌し、炎症反応を引き起こす。脳梗塞患者では、脳の炎症反応が病態の悪化を招き、その予後に大きな影響を与えられている。ミクログリアやアストロサイトは脳虚血後の炎症反応の中心的な役割を果たすため、虚血後脳におけるこれらの細胞の変化を調べることは、脳虚血患者の予後改善に向けた新たな治療薬の開発につながると思われる。

Smadタンパク質はTGF- β スーパーファミリーの刺激を伝達する細胞内シグナル分子である。TGF- β 、activin、bone morphogenetic protein (BMP)からなるTGF- β スーパーファミリーは、発生期の組織形成に重要な役割を果たす分泌性のタンパク質としてよく知られている。近年、Smadシグナリングがグリア細胞の活性を抑制することを示唆する結果が培養細胞を用いたいくつかの*in vitro*の研究によって報告されるようになってきた。しかしながら、脳虚血モデル動物を用いた*in vivo*実験系にて、「グリア細胞におけるSmadシグナリングが脳虚血後の炎症反応にどのように影響するのか？」についての評価はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全脳虚血モデル動物を用いて 虚血後海馬におけるSmad活性(リン酸化)レベルの経時的変化、Smadリン酸化を誘導する因子、Smadシグナリングの炎症反応への影響、Smadシグナリングの虚血後の脳機能への影響の検索を行うことで、「グリア細胞におけるSmadシグナリングは虚血後の脳内炎症反応を制御するか？」について調べることである。

3. 研究の方法

(1) ラット全脳虚血

イソフルランの吸入麻酔下で左右椎骨動脈と左右総頸動脈の閉塞による5分間の全脳虚血処置を行った。

(2) Smadリン酸化阻害剤SB-525334の脳室内投与

マイクロインジェクターを用いて(プレグマから尾側に0.5 mm、正中線から外側に2 mm、頭蓋骨表面から下方に5 mm)、25% DMSO - 75% polyethylene glycol で溶解したSB 525334 (Chem LLC, NJ)を1 μ l/minの割合で左右両側の脳室内に投与した(40 mM of SB 525334を一側の脳室内に5 μ l)。SB 525334の投与は虚血/再灌流の4、5、6日後に一日1回行った。同量の溶媒の投与をコントロール実験として行った。

(3) 組織固定と凍結切片作製

ラットを4% paraformaldehyde -0.1M phosphate buffer (PB)で固定した後、7 μ m厚の脳の凍結切片を作製した。

(4) 虚血後海馬における組織変化

左右両側の海馬CA1領域において虚血後に生存していると判断した神経細胞の数を計測した。生き残っていると判断した神経細胞の数は左右両側のCA1領域の2つの区域(1区域の長さ400 μ m)でカウントし、合計800 μ mの領域中の生存神経細胞数を算出した。円形あるいは卵円形の核を持った神経細胞を生き残っている細胞と判断した。

(5) 免疫染色

Smad1/5/9、Smad3、リン酸化Smad1/5/9、リン酸化Smad3に対する各抗体を用いて avidin-biotin peroxidase complex (ABC) による免疫染色を行った。

(6) Real-time PCR

海馬組織からトータルRNAを抽出し、逆転写反応によってcDNAを作製した。Smadのリン酸化を誘導するTGF- β 1、- β 2、- β 3、inhibin β A、BMP2、BMP6、and BMP7の各遺伝子を増幅するためのプライマーを用いて、これらの遺伝子の虚血後の発現レベル変化を調べた。

(7) 蛍光免疫二重染色

Smad1/5/9、Smad3、あるいはリン酸化Smad1/5/9、リン酸化Smad3、GFAP(アストロサイトマーカー)、Iba-1(ミクログリアマーカー)、CNPase(オリゴデンドロサイトマーカー)の各抗体を用いて、Smad1/5/9、Smad3、あるいはリン酸化Smad1/5/9、リン酸化Smad3が局在する細胞の種類を評価した。

4. 研究成果

(1) 虚血後の海馬組織変化

5分間の虚血によってCA1領域の神経細胞が死滅した。虚血/再灌流1日後ではほとんど神経細胞は形態変化を示さなかった。虚血/再灌流の3日後になると、神経細胞死が誘導されはじめ、たいていの神経細胞は虚血/再灌流の7日後以内に死滅した。一方で、CA3領域や歯状回領域の組織構造にはほとんど変化は認められなかった。

(2) 虚血後海馬CA1領域におけるSmad1/5/9およびリン酸化Smad1/5/9免疫染色性の変化

未処置および偽手術ラットでは円形あるいは卵円形の細胞体を持った細胞と細い突起を持った小型の細胞で Smad1/5/9 免疫陽性反応が認められた。形態的特徴から判断すると、円形あるいは卵円形の細胞体を持った細胞と細い突起を持った小型の細胞はそれぞれ、海馬 CA1 領域の神経細胞である錐体細胞と静止型アストロサイトであると思われた。蛍光二重染色を行うと、ほとんどの GFAP 陽性アストロサイトは Smad1/5/9 陽性反応を示した。虚血/再灌流後、錐体細胞の死滅に伴って錐体細胞の Smad1/5/9 陽性反応が消失したのに対して、アストロサイトでの染色性は強くなった。歯状回や CA3 領域でも Smad1/5/9 免疫陽性アストロサイトは認められたが、これらの領域における虚血後のアストロサイトの Smad1/5/9 免疫反応性にほとんど変化は認められなかった。

Smad1/5/9 の活性化型であるリン酸化 Smad1/5/9 陽性反応は虚血後にアストロサイトで認められるようになり、リン酸化 Smad1/5/9 陽性アストロサイト数は、ほとんどの錐体細胞が死滅した虚血/再灌流 7 日後にピークに達した。具体的には未処置ラット、偽手術ラット、虚血再灌流 1 日後、3 日後、10 日後および 15 日後のラットでは、1 mm² 領域のリン酸化 Smad1/5/9 陽性アストロサイト数がそれぞれ、 $0.41 \pm 0.82/\text{mm}^2$ 、 $1.03 \pm 0.93/\text{mm}^2$ 、 $1.85 \pm 2.43/\text{mm}^2$ 、 $5.28 \pm 5.53/\text{mm}^2$ 、 $6.44 \pm 9.46/\text{mm}^2$ 、 $8.63 \pm 13.25/\text{mm}^2$ であり、これらのグループ間で有意差は認められなかった。虚血再灌流 7 日後のラットでは 1 mm² 領域のリン酸化 Smad1/5/9 陽性アストロサイトの数が $34.97 \pm 13.56/\text{mm}^2$ で他のいずれのグループよりも有意に増加した。虚血/再灌流 7 日後に CA1 領域で認められた GFAP 陽性のアストロサイトのうち $17.72 \pm 9.01\%$ の細胞でリン酸化 Smad1/5/9 陽性反応が検出された。また、虚血/再灌流 7 日後の CA1 領域ではリン酸化 Smad1/5/9 陽性細胞の $85.83 \pm 13.44\%$ が GFAP 陽性反応を示した。Iba-1 と CNPase はそれぞれミクログリアとオリゴデンドロサイトのマーカータンパク質として広く利用されているが、今回の研究では Smad1/5/9 に対する免疫陽性反応は Iba-1 および CNPase 陽性細胞には認められなかった。一方で、リン酸化 Smad1/5/9 免疫陽性反応は歯状回や CA3 領域ではほとんど認められなかった。

(3) 虚血後海馬における Smad3 およびリン酸化 Smad3 免疫染色性の変化

未処置ラットと偽手術ラットでは錐体細胞と錐体細胞よりも小型の細胞において Smad3 の陽性反応が検出された。虚血/再灌流後、錐体細胞の死滅に伴って錐体細胞の Smad3 陽性反応が消失するとともに Smad3 陽性の小型の細胞が増加した。Smad3 陽性の小型の細胞数は虚血/再灌流 7-10 日後にかけてピークとなった。蛍光二重染色を行うと Smad3 陽性の小型の細胞は Iba-1 陽性ミクログリアあるいは GFAP 陽性アストロサイトであることが分かった。虚血/再灌流後の CA1 領域における小型の Smad3 陽性細胞をカウントすると未処置ラット、偽手術ラット、虚血再灌流 3 日後および 15 日後のラットでは、1 mm² 領域の Smad3 陽性細胞の数がそれぞれ、 $1.6 \pm 1.5/\text{mm}^2$ 、 $2.5 \pm 2.1/\text{mm}^2$ 、 $39.4 \pm 36.2/\text{mm}^2$ 、および $33.3 \pm 52.6/\text{mm}^2$ であり、これらのグループ間で有意差は認められなかった。虚血/再灌流 7 日後および 10 日後のラットでは 1 mm² 領域の Smad3 陽性細胞の数がそれぞれ $155.1 \pm 55.3/\text{mm}^2$ および $129.1 \pm 50.9/\text{mm}^2$ であり、他のいずれのグループよりも有意に増加した。歯状回や CA3 領域でも Smad3 免疫陽性ミクログリアおよびアストロサイトはわずかに認められたが、これらの領域では虚血後の Smad3 陽性細胞数にほとんど変化は認められなかった。

Smad3 の活性化型であるリン酸化 Smad3 陽性反応は未処置ラットと偽手術ラットでは錐体細胞では検出されず、錐体細胞よりも小型の細胞においてまれに検出された。リン酸化 Smad3 陽性の小型の細胞は虚血/再灌流後にその数を増し、虚血/再灌流 7-10 日後にピークに達した。具体的には未処置ラット、偽手術ラット、虚血/再灌流 3 日後および 15 日後のラットでは、1 mm² 領域のリン酸化 Smad3 陽性細胞の数がそれぞれ、 $1.9 \pm 0.8/\text{mm}^2$ 、 $3.1 \pm 1.9/\text{mm}^2$ 、 $34.2 \pm 38.6/\text{mm}^2$ 、および $48.8 \pm 33.5/\text{mm}^2$ であり、これらのグループ間で有意差は認められなかった。一方で、虚血/再灌流 7 日後および 10 日後のラットでは 1 mm² 領域のリン酸化 Smad3 陽性細胞の数がそれぞれ $166.2 \pm 28.8/\text{mm}^2$ および $112.5 \pm 33.8/\text{mm}^2$ であり、他のいずれのグループよりも有意に増加した。蛍光二重染色によってリン酸化 Smad3 陽性反応も Smad3 陽性反応と同様、もっぱら虚血を受けた海馬 CA1 領域に分布する Iba-1 陽性ミクログリアで検出された。虚血/再灌流 7 日後の海馬 CA1 領域においてはリン酸化 Smad3 陽性細胞のうち、その $81.2 \pm 9.3\%$ が Iba-1 陽性ミクログリアであった。また、Iba-1 陽性ミクログリアのうち、その $75.2 \pm 9.7\%$ の細胞がリン酸化 Smad3 陽性反応を示した。また、リン酸化 Smad3 陽性反応は少数の GFAP 陽性アストロサイトでも認められた。虚血/再灌流 7 日後の海馬 CA1 領域においてはリン酸化 Smad3 陽性細胞のうち、その $3.3 \pm 3.0\%$ が GFAP 陽性アストロサイトであった。また、GFAP 陽性アストロサイトのうち、その $15.7 \pm 12.6\%$ がリン酸化 Smad3 陽性であった。Smad3 陽性反応およびリン酸化 Smad3 陽性反応は CNPase 陽性細胞では検出されなかった。歯状回や CA3 領域でもリン酸化 Smad3 免疫陽性ミクログリアおよびアストロサイトはわずかに認められたが、これらの領域では虚血後のリン酸化 Smad3 陽性細胞数にほとんど変化は認められなかった。

(4) 虚血後海馬における TGF- β s、inhibins、BMPs mRNA 発現レベルの real time PCR 解析

虚血後海馬での Smad のリン酸化を誘導する候補因子を探るため、虚血/再灌流 5、7、10 日後の海馬における TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、inhibin β A、inhibin β B、BMP2、BMP6、BMP7 の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR により定量的に解析した。その結果、虚血/再灌流 5、7、10 日後の海馬において TGF- β 1 mRNA の発現レベルが偽手術処置ラット海馬と比べて、有意に高くなっていた。虚血/再灌流 10 日後の海馬においては TGF- β 2 mRNA の発現レベルも上

昇していた。

(5) 虚血後海馬における Smad リン酸化への TGF- β シグナル阻害剤 SB525334 投与の影響

PCR 解析の結果から、我々は虚血後の Smad のリン酸化に TGF- β が関与しているのではないかと推測した。SB525334 は TGF- β シグナルの阻害剤として広く用いられているので、SB525334 の脳室内投与の虚血後に増加する Smad リン酸化レベルへの影響について調べた。免疫染色の結果、Smad リン酸化レベルは虚血/再灌流の3日後から増加し、虚血/再灌流の7日後にはピークとなるので、SB525334 を虚血4、5、6日後に脳室内に投与し、虚血/再灌流の7日後に Smad リン酸化レベルを免疫染色によって調べた。リン酸化 Smad1/5/9 に対する染色性は溶媒投与ラットと比べると、SB525334 を投与したラットで減少していた。SB525334 の虚血後のリン酸化 Smad1/5/9 免疫反応性への影響を定量的に評価すると、溶媒投与ラットおよび SB525334 を投与したラットの CA1 領域 1 mm² 当たりのリン酸化 Smad1/5/9 陽性細胞数はそれぞれ、 31.03 ± 10.76 と 8.07 ± 4.68 であり、阻害剤によって有意にリン酸化 Smad1/5/9 陽性細胞数が減少していた ($P < 0.05$ versus vehicle-treated rats)。SB525334 の虚血/再灌流後のリン酸化 Smad3 免疫反応性への影響についても同様に定量的に評価すると、溶媒投与ラットおよび SB525334 を投与したラットの CA1 領域 1 mm² 当たりのリン酸化 Smad3 陽性細胞数はそれぞれ、 256.64 ± 12.33 と 107.38 ± 52.01 であり、阻害剤によって有意にリン酸化 Smad3 陽性細胞数が減少していた ($P < 0.05$ versus vehicle-treated rats)。

以上の結果から、虚血後海馬グリア細胞では TGF- β /Smad シグナルが強くなっていることが示唆された。

(6) 虚血後海馬における炎症関連分子発現への TGF- β シグナル阻害剤 SB525334 投与の影響

グリア細胞での TGF- β /Smad シグナルが虚血後海馬での炎症関連分子の発現に影響するかどうかについて検討した。ラットを虚血処置+ TGF- β シグナル阻害剤 SB525334 投与群、虚血処置+溶媒投与群、偽手術+SB525334 投与群、偽手術+溶媒投与群の4グループに分けた。PCR 用のサンプルとして虚血/再灌流7日後の海馬を用いた。予備実験で虚血/再灌流7日後の海馬で炎症関連分子である interleukin-1 β (IL-1 β)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、arginase-1、CX3CR のうち、IL-1 β 、TNF- α 、CX3CR1 の mRNA 発現レベルが虚血後に上昇することを確認した。そこで、これらの分子に着目して実験を進めた。その結果、偽手術+SB525334 投与ラットおよび偽手術+溶媒投与ラットと比べると、虚血処置+SB525334 投与ラットおよび虚血処置+溶媒投与ラットでは IL-1 β 、TNF- α 、CX3CR1 の mRNA 発現レベルは上昇していたが、虚血処置+ SB525334 投与ラットと虚血処置+溶媒投与ラット間でこれらの分子の mRNA 発現レベルに変化は認められなかった。今回の結果は TGF- β /Smad シグナルが虚血/再灌流7日後に誘導される IL-1 β 、TNF- α 、CX3CR1 の発現調節に影響を及ぼさない可能性を示唆している。しかしながら、SB525334 投与は虚血7日後での Smad リン酸化を効果的に阻害することが分かっている。TGF- β /Smad シグナルの炎症関連分子発現調節への影響は例えば虚血/再灌流から10日後のように、虚血/再灌流7日以降のタイミングで評価をする必要があるかもしれない。

(7) Smad シグナリングの虚血後脳機能への影響

Smad シグナリングの虚血後脳機能への影響については、新型コロナウイルス感染拡大防止に伴う大学での研究活動制限の影響もあり、検討するには至らなかった。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima T., Kunieda Y., Takahashi Y., Tanaka Y., Kondo T., Takenaka S.	4. 巻 113
2. 論文標題 Changes in Smad1/5/9 expression and phosphorylation in astrocytes of the rat hippocampus after transient global cerebral ischemia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Chem. Neuroanat.	6. 最初と最後の頁 101941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jchemneu.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yusuke Takahashi, Shigeo Takenaka and Takayuki Nakajima
2. 発表標題 The Expression and Activation of Smad proteins in Glial Cells of the Rat Hippocampus After Transient Global Cerebral Ischemia
3. 学会等名 7th Congress for Asian Association of Veterinary Anatomists (AAVA)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 崇行、高橋 勇祐、竹中 重雄
2. 発表標題 全脳虚血後の海馬グリア細胞におけるSmadの発現とその活性について
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島崇行 近藤友宏
2. 発表標題 ラットの脳におけるSmadの分布と活性について
3. 学会等名 日本病態生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 崇行
2. 発表標題 ラットの脳におけるSmadの分布と活性について
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Takahashi and Takayuki Nakajima
2. 発表標題 The expression and activation of Smad in the rat hippocampus following global cerebral ischemia
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Nakajima
2. 発表標題 Distribution of Smad mRNA and proteins in the rat brain
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	竹中 重雄 (Takenaka Shigeo) (10280067)	大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究所・教授 (24403)	

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	近藤 友宏 (Kondo Tomohiro) (40585238)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師 (24403)	

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