

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14815

研究課題名（和文）脳虚血障害に対するミクログリアVNUTによる保護作用とその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Neuroprotection against cerebral ischemic injury via microglial VNUT-mediated pathway

研究代表者

平山 友里（HIRAYAMA, Yuri）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30732804

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体のエネルギー通貨ATPは、細胞外へ放出されて細胞間情報伝達物質として機能する。脳虚血により細胞外ATP濃度が上昇することは知られているが、これが脳虚血障害に対して保護的に働くのか、有害作用をもたらすかは不明であり、また細胞外ATP濃度上昇のメカニズムも分かっていなかった。ATPの貯蔵や放出を担う小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）は、さまざまな生理機能や病態でのプリン作動性シグナル伝達において重要な役割を果たしている。我々は本研究により、グリア細胞の一種であるミクログリアのVNUT依存的ATP開口放出が脳虚血障害に対して保護効果をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの脳虚血障害治療薬の標的は神経細胞であった。本研究により、グリア細胞（ミクログリア）はプリン作動性シグナルを介して、脳虚血障害に対して保護作用をもたらすことが明らかとなった。これにより、全く新しい脳卒中治療戦略に繋がる基礎データを蓄積することができた。

研究成果の概要（英文）：ATP, which is the universal energy currency of life, is released into the extracellular space and acts as a neurotransmitter. ATP is known to be increased in response to transient brain ischemia, but whether this ATP increase is beneficial or harmful to cerebral ischemic injury is controversial, and a mechanism underlying the ATP increase is unknown. Vesicular nucleotide transporter (VNUT), a transporter responsible for vesicular storage of ATP, plays an important role in purinergic signaling in various physiological and pathological phenomena. Here, we show that the ATP exocytosis via VNUT in microglia, a type of glial cell, contributes to neuroprotection against cerebral ischemic injury.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ミクログリア 脳梗塞 VNUT ATP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに、脳卒中及びその予後改善に向けて多くの医薬品開発が行われてきたが、十分な脳保護作用を呈する医薬品の開発には至っていない。この原因の一つは、脳卒中治療薬の開発が神経細胞のみを標的にした戦略で行われてきたためと考えられる。最近の脳科学の進歩により、脳機能は神経細胞と「グリア細胞」との相互作用により担われていること、またグリア細胞の機能変調が神経細胞、ひいては脳機能の変調を引き起こすことが明らかにされつつある。従って、脳卒中及び脳虚血（以下脳虚血）に対する治療薬を開発するための戦略として、グリア細胞を視野に入れることが、もはや必須であると考えられる。また、脳虚血後エネルギー供給が再開されてからの神経障害あるいは神経保護のメカニズムに、グリア細胞が大きな役割を果たすと考えられているが、実際の役割については殆ど分かっていない。

これまでに申請者は、グリア細胞が脳虚血障害に対して脳保護作用を呈する非常に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた(Hirayama et al., *J Neurosci.*, 2015, Hirayama and Koizumi, *Glia*, 2017)。このとき、鍵となる分子はATPであった。細胞外ATPは、脳卒中を含む多くの疾患・傷害の初期に上昇し、脳の初期異常を伝える重要な化学シグナルと考えられている。またATPはグリア伝達物質として中心的な役割を果たし、神経細胞の興奮性亢進、興奮性シナプス伝達抑制及び抑制性シナプス伝達増強と多様な性質を呈する。しかし、脳虚血時の細胞外ATP上昇のメカニズムや脳虚血障害への影響等々、多くは不明のままである。

申請者はすでに予備実験により以下の2点を明らかにしている。

- ・脳虚血後に「vesicular nucleotide transporter (VNUT)」がミクログリア特異的に発現亢進すること
- ・VNUT欠損マウスは脳虚血に対して脆弱であること

VNUTはATP開口放出に必須の分子である。従って、上記の結果は、脳虚血後にミクログリアからのATP開口放出が亢進して細胞外ATPが上昇すること、このミクログリア依存的ATP放出が脳保護効果を誘導する可能性を強く示唆する。しかし、脳虚血後にミクログリアVNUT依存的にATPが放出されているのか、放出されたATPは脳保護作用を示すのか、またその分子メカニズムについては全く解っていない。

2. 研究の目的

ミクログリアVNUT及び細胞外ATPに焦点を当て、脳虚血障害に対するミクログリアの役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳虚血後の細胞外ATP濃度の定量

In vivo マイクロダイアリシス法とルシフェリン - ルシフェラーゼ法を用いて中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) により惹起される細胞外ATP濃度を定量した。実験には、野生型マウスに加え、VNUT欠損マウスを用いた。

(2) 遺伝子改変マウスを用いたミクログリアVNUTの役割解明

慶應義塾大学医学部精神神経科学教室田中謙二先生のご指導の下、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システム (tet システム) を用いて、ミクログリア特異的 VNUT 過剰発現及び発現抑制マウスの作製を行った。これらのマウスに MCAO を負荷し、再灌流から 72 時間後に TTC 染色により脳虚血障害を評価した。

(3) 細胞外ATPとVNUTを介する脳保護作用の関連性解明

ATP受容体 (P2受容体) 及びアデノシン受容体の各種阻害薬を用いて、MCAOによる脳虚血障害への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 虚血再灌流後の細胞外ATPはVNUT依存的に放出される

脳虚血による細胞外ATP濃度の経時的変化を調べるために、15分間MCAOによって一過性脳虚血モデルを作製し、虚血後の細胞外ATP濃度を測定した。脳虚血後、野生

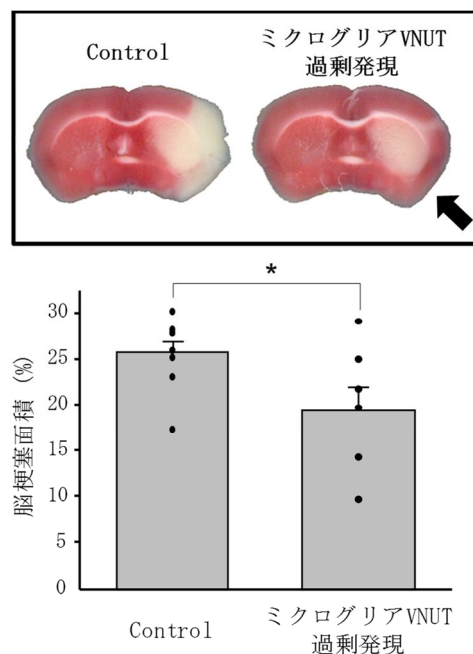


図1. 脳虚血障害におけるミクログリアVNUT過剰発現の影響
TTC染色により虚血後の傷害部位（白色部分）を染め分けた。1時間MCAOにて虚血を負荷した場合、Controlと比較し、ミクログリア特異的VNUT過剰発現マウスでは脳虚血障害が抑制された。

型マウスは少なくとも 72 時間後まで持続的な細胞外 ATP 濃度上昇が認められたが、VNUT 欠損マウスでは虚血後の細胞外 ATP 濃度上昇は起こらなかった。これらの結果から、虚血後の細胞外 ATP 濃度上昇は VNUT 依存的に惹起されることが示唆された。

(2) ミクログリア VNUT は虚血障害に対して脳保護効果を誘導する

ミクログリア VNUT の脳虚血障害時の役割を明確にするために、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システム (tet システム) を用いて、ミクログリア特異的 VNUT 過剰発現及び発現抑制マウスの作製し、これらのマウスを用いて脳梗塞障害程度の比較を行った。ミクログリア特異的 VNUT 過剰発現マウスに 1 時間 MCAO を負荷し、TTC 染色にて脳梗塞面積を Control 群と比較したところ、有意に梗塞面積が減少していた (図 1)。一方、ミクログリア特異的 VNUT 発現抑制マウスに 45 分間 MCAO を負荷したところ、Control 群と比較して有意に梗塞面積が増大していた。以上の結果から、ミクログリア VNUT は脳虚血障害に対して保護作用を誘導することが示唆された。

(3) 細胞外 ATP は P2 受容体とアデノシン A_{2A} 受容体を介して脳保護作用をもたらす

ミクログリア VNUT による脳保護作用の分子メカニズムを調べるために、ATP 受容体 (P2 受容体) 及びアデノシン受容体の各種阻害薬を用いて脳虚血障害における影響を解析した。アデノシン A_{2A} 受容体アンタゴニストである SCH58261 を 15 分間 MCAO 直前、再灌流から 2 時間後、24 時間後の計 3 回腹腔内投与し、脳虚血障害程度を TTC 染色により評価したところ、SCH58261 投与によって濃度依存的に脳梗塞面積が増大することが明らかとなった (図 2)。アデノシン A₁ 受容体アンタゴニストである DPCPX (1mg/kg を 15 分間 MCAO 直前、再灌流から 2 時間後、24 時間後の計 3 回腹腔内投与) は、脳虚血障害に影響を与えなかった。一方、非選択的 P2 受容体アンタゴニストである Suramin (100mg/kg を 15 分間 MCAO 直前尾静脈内投与) は脳梗塞面積を有意に増大させることが分かった。これらの結果から、脳虚血後に放出される ATP は P2 受容体とアデノシン A_{2A} 受容体を介して脳保護作用を誘導することが示唆された。

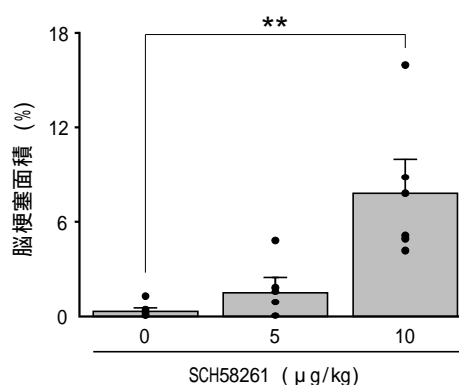


図2. 脳虚血障害におけるアデノシンA_{2A}受容体アンタゴニストの影響

15分間MCAOにて虚血を負荷した場合、アデノシンA_{2A}受容体アンタゴニストSCH58261投与群では濃度依存的に脳虚血障害が悪化した。

< 結論 >

脳虚血後、ミクログリアは VNUT 依存的に細胞外へ ATP を放出し、神経細胞の P2 受容体とアデノシン A_{2A} 受容体を介して神経保護作用を誘導することが示唆された (図 3)。今後は、「ミクログリア VNUT 依存的 ATP 開口放出による神経保護作用」の全容解明に向けて、脳虚血後のミクログリア VNUT 発現メカニズムの解析を行う予定である。

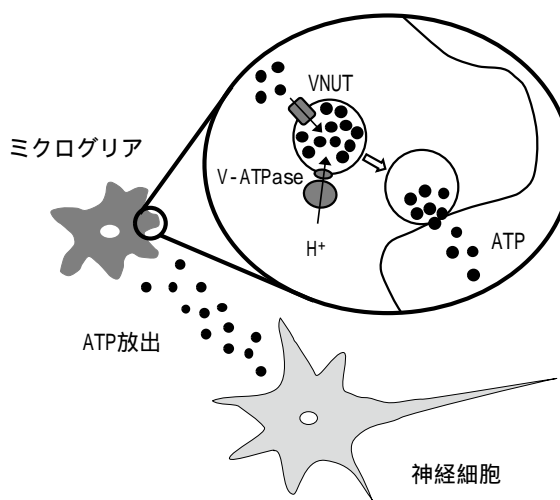


図3. ミクログリアVNUT依存的ATP開口放出による神経保護作用

脳虚血が起こるとミクログリアのVNUTが発現亢進する()。VNUTはV-ATPaseが形成したH⁺の電気化学的勾配を駆動力としてATPを分泌小胞内に輸送し、エキソサイトーシスによってATPを放出する()。放出されたATPは、神経細胞に作用し、P2受容体とアデノシンA_{2A}受容体を介して脳保護効果を示す()。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hirayama, Y., Ngoc, Le HP., Ishii, I., Anzai, N., Koizumi, S.
2. 発表標題 Role of microglial VNUT in cerebral ischemic injury
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirayama, Y., Ngoc, Le HP., Koizumi, S., Anzai, N.
2. 発表標題 Neuroprotection against cerebral ischemic injury via VNUT-mediated pathway
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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