

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06859

研究課題名(和文) 脳虚血後神経新生における酸感受体ASIC1aの役割

研究課題名(英文) Role of ASIC1a in postischemic neurogenesis

研究代表者

熊本 奈都子 (Kumamoto, Natsuko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：30467584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：酸感受性イオンチャンネル1a(acid-sensing ion channel 1a: ASIC1a)は、水素イオンによって活性化されるカルシウム透過性の陽イオンチャンネルである。我々は、本研究において、虚血時に活性化されたASIC1aが、成体脳海馬神経新生の各ステージにどのように影響するかを、新生ニューロン特異的ASIC1a欠損マウスの中大脳動脈永久梗塞モデルマウスを用いて形態学的解析により調べた。その結果、虚血によるASIC1aの活性化は海馬神経幹/前駆細胞の増殖を阻害する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血によるASIC1aの活性化は海馬神経幹/前駆細胞の増殖を阻害する可能性が示唆された。このことは、ASIC1aの過度な活性化は細胞内カルシウム流入による細胞死を惹起するというこれまでの報告に矛盾しない。ASIC1aの活性抑制を虚血性脳血管障害に対する創薬ターゲットとみなすためには、今後さらに、梗塞巣の大きさを揃えた脳虚血モデルマウスのデータを収集し、慎重に評価する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) is a calcium-permeable cation channel activated by hydrogen ions. In this study, we investigated how ASIC1a activated during ischemic acidosis affects each stage of adult hippocampal neurogenesis by morphological analysis using ASIC1a conditional knockout MCAO (middle cerebral artery occlusion) mice. The results suggest that ischemic acidosis-induced activation of ASIC1a may inhibit proliferation of hippocampal neural stem/progenitor cells.

研究分野：成体脳神経新生

キーワード：成体脳神経新生 脳虚血 酸感受性イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

近年、脳梗塞などの虚血性脳血管障害に対する新しい治療戦略として、内在性の神経幹細胞を賦活化することで機能回復を目指す「神経再生医療」が注目を集めている。脳虚血が神経幹細胞の増殖を促進することは、齧歯類・霊長類などのモデル動物やヒトの死後脳研究から明らかにされている。しかし、増殖が促進されても、障害を受けた神経回路に正しく組み込まれる細胞の割合は小さく、神経機能の回復には不十分である。従って、神経再生医療の実現のためには、虚血脳において、新生ニューロンが生存を維持し、神経回路の再構築へ寄与するために必要な、あるいは、それらを阻害している因子の同定・解析が不可欠である。

酸感受性イオンチャンネル 1a (acid-sensing ion channel 1a: ASIC1a) は、水素イオン (酸) によって活性化されるカルシウム透過性の陽イオンチャンネルである。脳では、ほぼ全ての神経細胞に発現し、シナプス小胞から神経伝達物質とともに開口放出された水素イオンをシナプス後膜にて受容することで、神経情報伝達に参与している。一方、虚血時には、嫌気性解糖の亢進により病変局所に水素イオンが蓄積するが、これにตอบสนองして開いた ASIC1a は、細胞内へ陽イオンを流入させ、細胞の興奮に働く。極端な場合は、細胞内カルシウム流入により、毒性を発揮する。このように、ASIC1a は、虚血時の病態生理と深い関係があるにも拘わらず、同病態下での神経新生への影響に関しては、全く報告がない。

既に我々は、ASIC1a が海馬新生ニューロンに、その初期段階から発現していること、正常脳で ASIC1a の発現を抑制すると、海馬神経幹/前駆細胞の増殖と生存、新生ニューロンの樹状突起とスパインの発達、機能的神経回路の形成が抑制されることを見出している。これらの知見は、非虚血下で、ASIC1a からの入力信号が新生神経の増殖から既存の神経回路とのシナプス形成までの各ステージで必要であることを示唆している。そして、虚血脳で活性化した ASIC1a が神経新生に影響することは容易に想像できる。

2. 研究の目的

虚血時に活性化された ASIC1a は、神経新生の各ステージにどのように影響するか調べ、ASIC1a の虚血性脳血管障害に対する新規創薬ターゲットとしての可能性 (どの時期に、ASIC1a の活性を上昇させるべきなのか、あるいは抑制すべきなのか) を検証する。

3. 研究の方法

ASIC1a は脳内に広く分布するが、本研究では、新生ニューロンに発現する ASIC1a のみを欠損させた新生ニューロン特異的 ASIC1a ノックアウトマウスを使用する。そして、このマウスを用いて脳虚血モデルを作製し、ASIC1a が成体脳海馬神経新生にどのような影響を与えるか、形態学的解析を行う。

(1) 新生ニューロン特異的 ASIC1a 欠損マウスの準備

他の領域にある ASIC1a の影響を回避するため、新生ニューロン特異的 ASIC1a 欠損マウスを作成する。ASIC1a flox マウスと Nestin プロモーターの下流に CreER^{T2} を発現する Nestin-CreER^{T2} トランスジェニックマウスとを交配させる (Nestin は、神経幹/前駆細胞特異的に発現する細胞骨格蛋白質)。得られる Nestin-CreER^{T2}/lox-ASIC1a-lox マウスは、タモキシフェン (TMX) 投与により CreER^{T2} が核内へ移行し、loxP 配列で挟まれた ASIC1a が切除されるため、新生ニューロン特異的 ASIC1a 欠損マウスになる。

(2) 局所脳虚血モデルマウスの作製

本研究では、ヒトの脳梗塞の病態に近い、左側中大脳動脈永久閉塞 (MCAO) モデルを用いる (J Exp Stroke Transl Med. 3:28-33 (2010))。中大脳動脈支配領域である線条体と大脳皮質に梗塞巣が形成されるが、C57BL6 系マウスは梗塞巣の大きさにばらつきがあり海馬に及ぶこともあるので、形態学的解析では、海馬の組織構造が保たれたマウスのデータを採用する。

(3) 虚血脳における ASIC1a KO 神経幹/前駆細胞の増殖の評価

チミジンアナログである BrdU は DNA 複製時に核内に取り込まれるため、増殖細胞の標識に用いられる。TMX (タモキシフェン) 50mg/kg を Nestin-CreER^{T2}/lox-ASIC1a-lox マウスに 5 日間連続腹腔内投与し、神経幹/前駆細胞の ASIC1a を欠損させる。最後の TMX 投与の 3 日後に MCAO を行い梗塞巣を作製する。その 3 日後に BrdU 150mg/kg を単回、腹腔内投与し、2 時間後に脳を摘出、BrdU の蛍光免疫染色を行い、BrdU 陽性 (増殖) 細胞の数を評価する。

(4) 虚血脳における ASIC1a KO 神経幹/前駆細胞の生存の評価

神経前駆細胞は増殖後、選択的細胞死が 2 つのピーク (1~4 日後と 1~3 週間後) で起こる。

特に1~3週間後はシナプス形成が進まず、既存のニューロンからの入力が無かった細胞は死滅する。上記と同様にTMX 5日間投与から3日目にMCAOを行い、この時点から3~5日後にかけて12時間ごとにBrdU 100mg/kgを計6回腹腔内投与する。BrdU最終投与から28日後に脳を摘出、BrdUの蛍光免疫染色を行い、BrdU陽性細胞(生存細胞)の数をカウントする。また、TMX 5日間投与から3日後にMCAOを行い、そこから28日後に脳を摘出、cleaved caspase-3(細胞死マーカー)の蛍光免疫染色を行う。

(5) 虚血脳におけるASIC1aKO新生ニューロンの発達の形態学的解析

レトロウイルスは分裂中の細胞にのみ感染するため、EGFP発現レトロウイルスを使って、海馬歯状回の神経幹/前駆細胞特異的にEGFP遺伝子を導入することができる。TMX 5日間投与から3日目にMCAOを行い、さらに3日後にEGFP発現レトロウイルスを注入する。レトロウイルス注入28日後(=新生ニューロンが誕生してから28日経過したと考えられる)の脳を摘出し、薄切の上、共焦点レーザー顕微鏡を用いてEGFP陽性新生ニューロンの樹状突起とスパイン形態(mushroom, stubby, thin, filopodia)をZスタック撮影する。Imarisにて3次元画像を再構築し、樹状突起長の測定、sholl analysisによる樹状突起の複雑性の解析、成熟スパイン(mushroom spine)の大きさと密度の計測を行う。

4. 研究成果

実験計画ごとに結果の概要を記し、最後に総括した。

(1) 新生ニューロン特異的ASIC1a欠損マウスの準備

当研究室で所有するASIC1a flox マウスと、Nestin-CreER^{T2}マウスを交配させ、タモキシフェン投与により新生ニューロン特異的にASIC1aが欠損するマウス(ASIC1a cKO)を作出した。

(2) 局所脳虚血モデルマウスの作製

(3)から(5)の解析のため、野生型マウスとASIC1a cKOマウスでMCAOを作製した。梗塞巣の大きさにばらつきがあり、海馬にまで梗塞が及んだマウスを除外して解析したため、解析に使用するマウスのN数を確保するのに時間を要した。

(3) 虚血脳におけるASIC1a KO神経幹/前駆細胞の増殖の評価

野生型マウスではBrdU投与2時間後の脳虚血モデルマウスの梗塞巣同側の海馬歯状回BrdU陽性細胞数は対側(非梗塞側)と比較して有意な差はみられなかった。一方、ASIC1a cKOマウスでは、BrdU陽性細胞数が対側と比較して梗塞巣側で増加傾向がみられた。このことよりASIC1a cKOマウスでは脳虚血で神経幹/前駆細胞の増殖が亢進することが明らかになった。

(4) 虚血脳におけるASIC1a KO神経幹/前駆細胞の生存の評価

BrdU投与28日後の海馬歯状回BrdU陽性細胞数は野生型マウスもASIC1a cKOマウスも梗塞巣側と対側で有意な差は認めなかった。

MCAO作製28日後の脳を用いてcleaved caspase-3(CC3)の免疫染色を行い、細胞死の亢進が梗塞巣側で起こっているか否かを検討した。その結果、梗塞巣側では対側に比べ、Tbr2(-)/DCX(+)/cc3(+)細胞(後期選択的細胞死)の数が増加傾向であったが、データのばらつきが大きく有意差は認められなかった。データのばらつきは、梗塞巣の大きさのばらつきに起因していると考えられるため、梗塞巣の大きさを揃えた脳虚血モデルマウスのデータが収集できれば有意差がつく可能性がある。

(5) 虚血脳におけるASIC1aKO新生ニューロンの発達の形態学的解析

レトロウイルスを用いた海馬新生ニューロン特異的EGFP遺伝子導入による樹状突起やスパインの形態学的解析を行い、脳虚血モデルマウスにおけるASIC1a KO海馬新生ニューロンの発達を評価した。正常脳における新生ニューロンのASIC1a発現抑制により、樹状突起やスパインの発達が抑制されることは既に確認しているが、脳虚血モデルマウスでは個体によるデータのばらつきが大きく、梗塞巣側と対側の新生ニューロンの樹状突起やスパインの形態に有意差は認められなかった。

(総括)

ASIC1a欠損により、虚血脳における海馬神経幹/前駆細胞の増加が認められたことより、虚血によるASIC1aの活性化は海馬神経幹/前駆細胞の増殖を阻害する可能性が示唆された。このことは、ASIC1aの過度な活性化は細胞内カルシウム流入による細胞死を惹起するというこれまでの報告に矛盾しない。しかし、CC3陽性細胞数は梗塞巣側と対側で有意差が認められなかったため、ASIC1aの活性抑制を虚血性脳血管障害に対する創薬ターゲットとみなすためには、今後さらに、梗塞巣の大きさを揃えた脳虚血モデルマウスのデータを収集し、慎重に評価する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1の役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 Roles of acid-sensing ion channel-1a in hippocampal adult neurogenesis
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会・第66回日本神経化学学会大会 合同大会
4. 発表年 2023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	鶴川 眞也 (Ugawa Shinya) (20326135)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (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	澤本 和延 (Sawamoto Kazunobu) (90282350)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (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