

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16014

研究課題名（和文）脳梗塞時のペリサイト選択的K-ATPチャネルの役割の解明

研究課題名（英文）Investigation of the roles of pericyte K-ATP channel in ischemic stroke

研究代表者

安藤 康史（Ando, Koji）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：10736010

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）：中枢においてペリサイト選択的に発現するKCNJ8およびABCC9遺伝子から構成されるATP依存性カリウムチャネル(K-ATPチャネル)の脳梗塞時における役割を明らかにするため、ペリサイトK-ATPチャネル改変マウスやK-ATPチャネル標的薬を用いて、脳梗塞後の梗塞領域・神経傷害スコア・脳血流・血管透過性を解析した。その結果、K-ATPチャネル活性が脳虚血後の脳障害の進展に重要な役割を持つことが示唆されつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本法では脳梗塞は高い死亡率に加え、発症後の要介護リスクの第2位を占めており、その克服が強く望まれる。本研究を遂行することにより、ペリサイトK-ATPチャネルが脳梗塞に対する治療標的となる可能性が示唆されつつあり、今後のペリサイトを焦点とした脳梗塞治療戦略の発展が見込まれ、本研究はその嚆矢としても重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study we have tried to clarify the role of ATP-dependent potassium channels (K-ATP channels) composed of KCNJ8 and ABCC9, which are pericyte-selectively expressed in the brain, on ischemic stroke. To this end, utilizing genetically modified mice which can control pericyte K-ATP channel function and K-ATP channel-targeting drugs, we analyzed the infarct area, neurological functions, cerebral blood flow, and blood-brain barrier permeability. Through the analysis, we found that pericyte K-ATP channel activity may have an important role in the protecting neurons after transient cerebral ischemia.

研究分野：血管生物学

キーワード：ペリサイト K-ATPチャネル 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

毛細血管を被覆するペリサイトの消失は血管障害や認知症を始め様々な血管性疾患の発症・進展に寄与する。ペリサイトは虚血に対する感受性が高く、虚血によりペリサイトの消失が数時間以内に起こるとされる。ペリサイトの消失は血液脳関門の破綻を引き起こし、血管外へのトロンピンを始めとした神経毒性因子の流出等により神経障害を惹起する。さらに虚血によるペリサイトの消失は毛細血管の持続的狭窄を誘発し、長期的な脳梗塞の形成に寄与することが示唆されている。実際にペリサイトの被覆がない毛細血管では虚血再灌流後にも狭窄が持続し、血流が回復しないという予備データが得られたことから、脳梗塞治療に対してペリサイトの機能制御が新たな標的になると考えた。

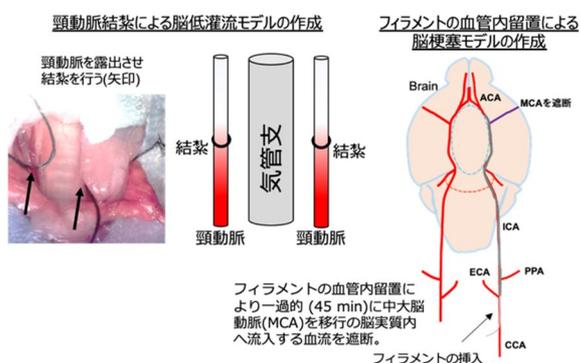
一方、申請者らが実施したマウス脳血管を用いた単一細胞 RNA シークエンスデータを基に、KCNJ8 および ABCC9 が脳組織ではペリサイト特異的に発現することを見出してきた。KCNJ8/ABCC9 から構成されるヘテロ複合体は、細胞内から細胞外へとカリウムイオンを排出する ATP 依存性カリウムチャンネル(K-ATP チャンネル)として機能し、KCNJ8 または ABCC9 のどちらか一方でも欠損するとチャンネルとしての機能が失われるとされる。これまでに野生型と比較して *Kcnj8* ヘテロ欠損マウスでは脳虚血後の損傷領域が拡大し、*Kcnj8* 欠損マウスは虚血処理中に死亡する一方、K-ATP チャンネルの活性化剤ジアゾキサイドは脳虚血後の損傷領域を優位に低下させることが報告され、KCNJ8/ABCC9 から構成される K-ATP チャンネルが脳梗塞時に保護的役割を担うことが示された。一方、これまでに申請者は *Kcnj8* 欠損マウスでは脳血管特異的に血管平滑筋細胞の分化が抑制され、神経活動依存的な脳血流上昇が阻害されることを明らかにしてきた。従って、これまでの先行研究では血管平滑筋異常が脳虚血を悪化させ、損傷領域の拡大に寄与した可能性があり、十分に明らかではなかった。また、ジアゾキサイドは神経細胞や膵臓 B 細胞などに発現する KCN11/ABCC8 などから構成されるその他の K-ATP チャンネルにも作用するため、ペリサイトが実際の作用点であるかは不明であった。このように、ペリサイト選択的 K-ATP チャンネルの活性化が脳梗塞による脳損傷を緩和する可能性が強く予想されるものの、現状ではペリサイトにおける K-ATP チャンネルが脳梗塞後に保護的作用を示すかは十分な証明がなされておらず、更なる検証とその分子機構の解明が必要であった。

2. 研究の目的

本研究期間では、毛細血管支持細胞であるペリサイト選択的に発現することを見出した、KCNJ8 および ABCC9 複合体から構成される ATP 依存性カリウムチャンネル(K-ATP チャンネル)の脳梗塞時における役割を明らかにし、本ペリサイト選択的 K-ATP チャンネルに対する選択的作動薬を用いた新規脳梗塞治療への発展を目指す。

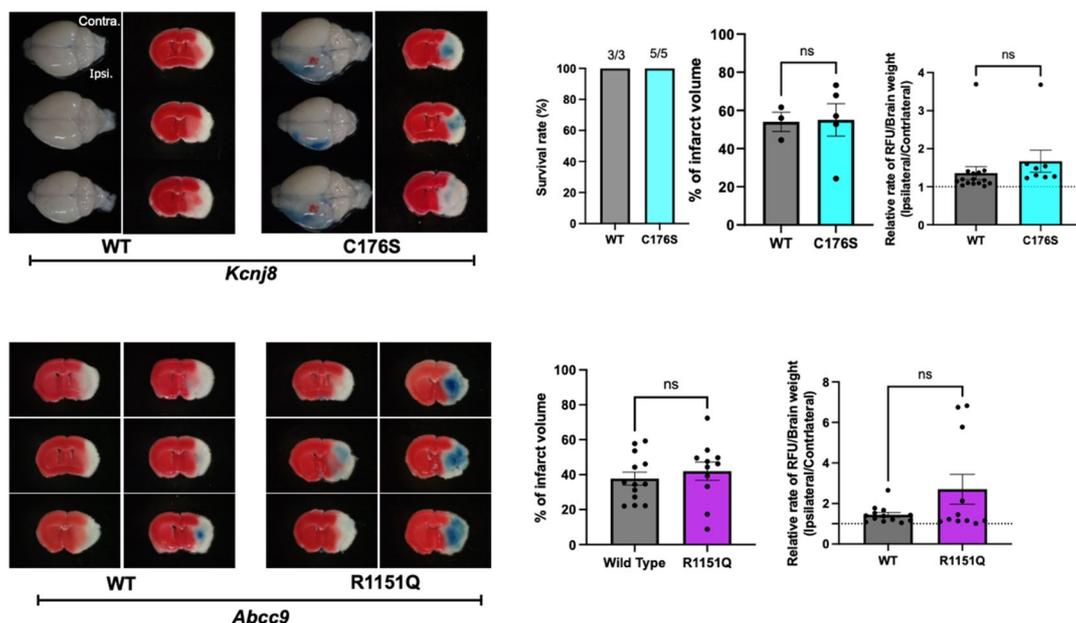
3. 研究の方法

脳低灌流モデルとして両側頸動脈結紮法を利用した。またヒト脳梗塞を模倣するモデルとして、フィラメントの血管内留置による一過性片側中大脳動脈閉塞術(tMCAO)を用いて解析を行った。脳梗塞における K-ATP チャンネルの役割を明らかにするため、野生型マウス、*Kcnj8* 欠損マウス、*Kcnj8* または *Abcc9* 活性化変異マウス(*Kcnj8*C141S, *Abcc9*G1151Q)に tMCAO 手術を行い、24 時間後における梗塞領域・脳血流変化・血管透過性(血液脳関門)・神経障害度を解析した。梗塞領域は TTC 染色により判定を行った。脳血流変化は接触型光ファイバー式レーザー血流計 (OMEGAFLO-C1)により、術前・術中・術直後・4・23 時間後に測定を行った。血流測定は血管閉塞の確認にも利用し、術中に血流量が 80%以上低下した個体のみを解析の対象とした。血管透過性は腹腔内投与したエバンスブルーの血管から脳組織内への透過量を指標に解析を実施した。血管透過性は、エバンスブルーの脳組織への漏出の画像解析または脳組織からホルムアミドによりエバンスブルーを抽出し、分光光度計により測定した。神経障害度は、神経障害スコア (0:症状なし~4:24 時間以内に死亡)を解析するとともに、オープンフィールドテストによる行動テスト解析により評価した。行動解析には EthoVision ビデオトラッキングシステムを用いた。K-ATP チャンネル作動薬は術前または梗塞後 6 時間後に腹腔内投与、静脈内投与または脳室内投与を行った。



4. 研究成果

野生型マウス、K-ATP チャンネル活性が消失するとされる *Kcnj8* 欠損マウス、Cantu 症候群で認められる点変異を模倣した *Kcnj8* または *Abcc9* 活性化変異マウス(*Kcnj8*C141S,*Abcc9*1151Q)を用いて、脳梗塞後の梗塞領域・神経傷害スコア・脳血流・血管透過性を解析した。まず、両側頸動脈結紮による低還流モデルを用いて解析を実施したが、術後 24 時間の時点では野生型マウスと比較して K-ATP チャンネル活性変異マウスにおいて顕著な表現型は認められなかった。次にフィラメントの血管内留置による一過性片側中大脳動脈閉塞術による脳梗塞モデルを用いた解析を実施した。その結果、45 分から 1 時間の片側中大脳動脈閉塞により、先行報告と部分的に一致するように野生型マウスと比較して *Kcnj8* ヘテロ欠損マウスでは違いは認められなかったが *Kcnj8* 欠損マウスでは梗塞巣および神経傷害の増大が認められた。更に、野生型では死亡個体は認められなかったものの、*Kcnj8* 欠損個体では術後数時間から 24 時間以内に 8 割以上の割合で死亡することが明らかとなり、ペリサイト K-ATP チャンネルが脳虚血に対する防御機構として必須の役割を担うことが示唆された。一方、解析を進めたところ活性化型変異マウスでは梗塞巣および神経傷害は野生型と比較して顕著な差は認められなかった。しかし、エバンスブルーの血中から脳組織への移行を調べることで脳梗塞後の血管透過性を調べた結果、*Kcnj8* 欠損マウスではエバンスブルーの脳組織への漏出は低く、活性化型変異マウスでは増加することが分かった。特に、欠損マウスでは梗塞巣中心部での漏出はほとんど認められないものの、活性化変異マウスでは梗塞巣の中心部でも漏出が顕著であった。この結果は、K-ATP チャンネルの開口は血管透過性の亢進に寄与する、もしくは梗塞解除後の血流回復領域の差に依存する可能性が予想された。



(TTC染色による生存神経標識: 赤, エバンスブルーの漏出: 青)

上記の *Kcnj8* 欠損マウスや *Kcnj8* または *Abcc9* 活性化変異マウスは脳血管発生に影響をあたえることから (Ando et al., Dev. Cell. 2022)、脳梗塞後の病態形成時に K-ATP チャンネル機能が重要であるかを明らかにするため、脳梗塞直前または術後に K-ATP 作動薬を投与し、解析を実施した。まず、腹腔もしくは静脈投与により作用を検討したが、脳梗塞後の神経障害および血管制御に対する影響はほとんど認められなかった。そこで中枢への移行が低く十分な有効濃度に達していない可能性と、中枢特異的な作用をより正確に検証するため、K-ATP チャンネル作動薬をマウス脳室内に投与し、解析を実施した。その結果、K-ATP チャンネル作動薬による神経障害抑制作用は、術前投与だけでなく術後 6 時間後の投与においても効果を発揮することが明らかになった。以上の結果から、ペリサイト K-ATP チャンネルが脳梗塞後の神経保護に寄与することが示唆された。現在、ペリサイトにおける K-ATP チャンネルの脳梗塞に対する保護作用を詳細に検討するため、タモキシフェン依存的に機能欠損を誘導可能な *Kcnj8* 条件付き欠損マウスを用いた解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nishimura Yusuke, Ishii Tomohiro, Ando Koji, Yuge Shinya, Nakajima Hiroyuki, Zhou Weibin, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 3
2. 論文標題 Blood Flow Regulates Glomerular Capillary Formation in Zebrafish Pronephros	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0005962021	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 Ando Koji, Shih Yu-Huan, Ebarasi Lwaki, Grosse Ann, Portman Daneal, Chiba Ayano, Mattonet Kenny, Gerri Claudia, Stainier Didier Y.R., Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo, Betsholtz Christer, Lawson Nathan D.	4. 巻 479
2. 論文標題 Conserved and context-dependent roles for pdgfrb signaling during zebrafish vascular mural cell development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 11 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2021.06.010	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 該当する
1. 著者名 Ando Koji, Ishii Tomohiro, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 11
2. 論文標題 Zebrafish Vascular Mural Cell Biology: Recent Advances, Development, and Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11101041	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 Rho Seung-Sik, Oguri-Nakamura Eri, Ando Koji, Yamamoto Kiyotake, Takagi Yuki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for analysis of integrin-mediated cell adhesion of lateral plate mesoderm cells isolated from zebrafish embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100428 ~ 100428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100428	査読の有無 無
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 Ando Koji, Shih Yu-Huan, Ebarasi Lwaki, Grosse Ann, Portman Daneal, Chiba Ayano, Mattonet Kenny, Gerri Claudia, Stainier Didier Y.R., Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo, Betsholtz Christer, Lawson Nathan D.	4. 巻 479
2. 論文標題 Conserved and context-dependent roles for pdgfrb signaling during zebrafish vascular mural cell development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 11 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2021.06.010	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 該当する

1. 著者名 Ando Koji, Tong Lei, Peng Di, V?zquez-Li?banas Elisa, Chiyoda Hirohisa, He Liqun, Liu Jianping, Kawakami Koichi, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo, Grutzendler Jaime, Betsholtz Christer	4. 巻 57
2. 論文標題 KCNJ8/ABCC9-containing K-ATP channel modulates brain vascular smooth muscle development and neurovascular coupling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1399.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2022.04.019	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

1. 著者名 Peng Di, Ando Koji, Hu?mann Melina, Gloger Marleen, Skoczylas Renae, Mochizuki Naoki, Betsholtz Christer, Fukuhara Shigetomo, Schulte-Merker Stefan, Lawson Nathan D, Koltowska Katarzyna	4. 巻 11
2. 論文標題 Proper migration of lymphatic endothelial cells requires survival and guidance cues from arterial mural cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.74094	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安藤 康史 Christer Betsholtz 福原 茂朋
2. 発表標題 ペリサイト選択的ATP感受性カリウムチャネルによる中枢特異的な血管平滑筋細胞分化制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第29回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤 康史、福原 茂朋
2. 発表標題 Investigation of the molecular mechanism underlying mural cell specification in zebrafish
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井智裕，弓削進弥，野一色千景，安藤康史，望月直樹，福原茂朋
2. 発表標題 Roles of pericytes in wound angiogenesis clarified by live imaging of adult zebrafish.
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井智裕，弓削進弥，安藤康史，福原茂朋
2. 発表標題 ペリサイトによる血管新生制御機構の解明
3. 学会等名 第6回 日本血管生物医学若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤 康史
2. 発表標題 Investigation of molecular mechanisms underlying pericyte development
3. 学会等名 第100回 日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------