

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700442

研究課題名(和文) グリア細胞情報発信の空間制御メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Analysis of astrocyte response mechanism after brain injury

研究代表者

篠崎 陽一 (SHINOZAKI, Youichi)

山梨大学・医学工学総合研究部・講師

研究者番号：10443772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞など脳障害時におけるアストロサイト活性化メカニズムを解析した。In vitro 傷害モデルから、P2Y1受容体がアストロサイトの活性を調節する事が明らかとなった。続いて、In vivoで脳傷害モデルから、P2Y1受容体ノックアウトマウスではアストロサイト活性化の促進及びグリア瘢痕形成促進が見られ、ニューロンの傷害も軽減していた。また、アストロサイト選択的にP2Y1受容体をノックアウトしてもグリア瘢痕形成の促進並びに神経保護作用が観察された。以上から、アストロサイトに発現するP2Y1受容体がダイナミックにグリア瘢痕形成を調節することで脳障害後の神経保護作用に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Brain injury is known to activate astrocytes, however, it is unclear how they are regulated to show an oriented response to the focal brain injury. Here we demonstrate that down-regulation in astrocytic P2Y1 receptor accelerates astrocyte responses and neuroprotection after brain injury. Inhibition or knockout of P2Y1 receptor accelerated astrocyte reaction in vitro. P2Y1 receptor knockout (P2Y1KO) mouse showed accelerated astrocyte activation at early phase after brain injury and reduced a number of dead neurons which were reproduced by selective knockout of P2Y1 receptor in astrocytes. Our data highlight P2Y1 receptor-mediated-astrocyte reaction after brain injury that is essential for neuroprotective action.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：アストロサイト P2Y1受容体 ATP グリア瘢痕 神経保護 物理的脳損傷

様式 C-19、F-19、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アストロサイトはシナプスや血管など、方向性を持った突起伸展を行うことで脳内の生理機能調節を担っている。脳障害時にはアストロサイトが活性化、特に脳梗塞など局所傷害を伴う場合にはその部位に向かった突起伸展や周囲を取り囲むグリア瘢痕を形成することが知られている。しかしながら、そのメカニズムは不明である。

我々は一貫してグリア伝達物質であるアデノシン三リン酸(ATP)及びその受容体である P2 受容体のグリア細胞における機能の解析を行ってきた。脳傷害時には傷害された細胞から ATP を含むヌクレオチドが放出・漏出する。ミクログリアはこれらに应答して遊走・貪食など種々の機能を果たすが、アストロサイトについてはどのような機能を誘導するか不明であった。*In vitro*の報告からアストロサイトは ATP および P2 受容体により情報伝達を行うことから、脳傷害時において傷害部位から放出される ATP が方向性をもったアストロサイトの反応を制御すると考えられた。

2. 研究の目的

局所脳傷害におけるアストロサイトの反応メカニズムを解析する。特に P2 受容体に着目し、その発現制御メカニズムを明らかにする。さらに、P2 受容体によるアストロサイトの機能変化が神経細胞にどのように作用するかを調べる。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 脳傷害モデル

培養ディッシュに培養したアストロサイトをピペットで傷害する。傷害部に面したアストロサイトは傷害部位に向かって突起を伸展する。*In vivo*においても傷害部に隣接した領域では傷害の中心部に向かって突起を伸展する事から、この突起伸展スピードをアストロサイト活性化の指標として用いる事ができる。

(2) *In vivo* 局所脳傷害モデル

局所脳傷害モデルとしてマウスに対する物理的脳損傷(Traumatic Brain Injury, 以下 TBI)モデルを用いた。傷害は体性感覚皮質(AP: - 1.75 mm, ML: - 1.75 mm, DV: - 1.0 mm)に加えた。

(3) *In vivo* マイクロダイアリシス

半透膜を付加したプローブ(A-I 型、エイコム)を傷害部位に配置し、人口脳脊髄液を還流することで細胞外に放出される ATP を回収した。ATP 濃度はルシフェリン-ルシフェラーゼ法を用い、フォトンカウンティングにより計測した。

(4) コンベンショナル及び細胞特異的 P2Y₁ 受容体ノックアウトマウス

コンベンショナル P2Y₁ 受容体ノックアウトマウスは過去に作出したものを用いた(Leon et al. JCI 1999)。アストロサイト特異的 P2Y₁ 受容体ノックアウトマウスはテトラサイクリン制御性トランス抑制因子(tTS)の遺伝子を組み込んだマウス及び tTS で制御されるプロモーター(tetO プロモーター)下で P2Y₁ 受容体発現が抑制されるマウスを掛けあわせることによって作出した(図 3a)。

4. 研究成果

(1) *In vitro* 傷害モデルを用いたアストロサイト反応メカニズムの解析

傷害時に放出・漏出される ATP のアストロサイトの反応性に対する影響を *in vitro* 脳傷害モデル(図 1a)を用いて薬理的に検討した。傷害部に隣接したアストロサイトの突起を伸展する(図 1b)事からこの突起伸展スピードを Image J 及び Manual Tracking プログラムを用いて解析した。アストロサイトの突起伸展スピードに対して広範なアデノシン受容体アンタゴニスト xanthine amine congener (XAC, 10 μ M)や代謝型グルタミン酸受容体アンタゴニスト MCPG (1 mM)は抑制しなかった(図 1c)。一方、P2 受容体アンタゴニスト RB2 及び PPADS (10 及び 100 μ M)

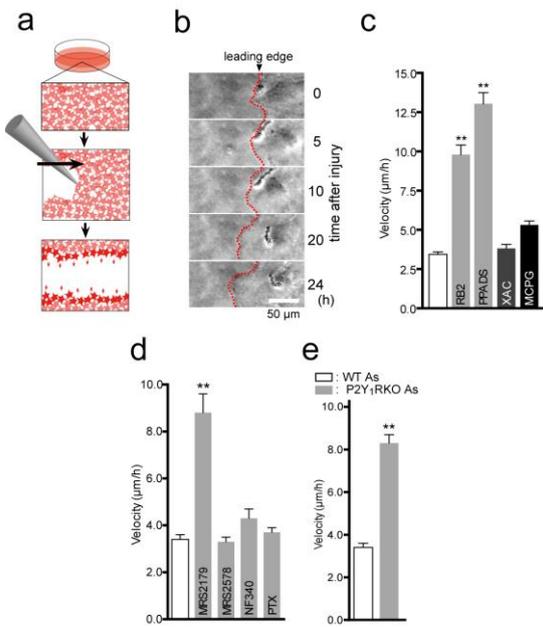


図 1. *in vitro* 傷害モデルとアストロサイト活性化

は突起伸展スピードを著しく増加した。この結果より P2 受容体の阻害がアストロサイト突起伸展に促進的に機能する事が明らかとなった。続いてどの受容体サブタイプがこの反応に重要であるかを選択的アンタゴニスト及び百日咳毒素 (PTX) を用いて検討した。P2Y₆ 受容体アンタゴニスト MRS2578 (3 µM), P2Y₁₁ 受容体アンタゴニスト NF340 (10 µM) 及び百日咳毒素 (100 ng/ml, 24 時間前処置, Gi 共役型 P2Y 受容体 P2Y_{12, 13} 及び ₁₄ を阻害) はアストロサイト突起伸展に顕著な影響を及ぼさなかった (図 1d)。一方、P2Y₁ 受容体アンタゴニスト MRS2179 (1 µM) は著しくアストロサイトの突起伸展速度を増強した。薬理的解析に加え、P2Y₁ 受容体ノックアウトマウス (以下 P2Y₁KO マウス) より調製したアストロサイトの反応を調べたところ、WT アストロサイトより顕著に突起伸展速度が速かった (図 1e)。以上の結果より、アストロサイトの P2Y₁ 受容体の発現及び機能抑制により傷害後の反応増強が生じる事が明らかとなった。

(2) *In vivo* 脳傷害モデルを用いたアストロサイト反応メカニズムの解析

In vivo でも同様の反応メカニズムが見られ

るかマウスを用いて検討した。局所脳傷害モデルとして物理的脳損傷 (Traumatic Brain Injury, 以下 TBI) モデルを用いた。アストロサイトの活性化を活性化マーカーである GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) の発現を指標に、ウェスタンブロットによって検討したところ、野生型マウスでは傷害後 3~7 日をピークに、その後緩やかに発現低下していた (図 2a, WT)。一方、P2Y₁KO マウスでは傷害後 1 日 (1 dpi) ですでに GFAP の発現増強が見られた。実際、免疫染色で細胞形状を確認すると野生型マウスでは 1 dpi の大脳皮質ではドット状の GFAP シグナルしか見られないものの、P2Y₁KO マウスでは既に繊維状の構造物が観察された (図 2b)。これらに加えて、反応性アストロサイトの調節因子として重要な STAT3 の発現も P2Y₁KO マウスで増強していた。3 dpi ではグリア瘢痕構造が形成されるが、その形成領域が P2Y₁KO マウスでは有意に縮小しており (図 2c)、神経細胞死も減弱していた (図 2d)。さらに、アストロサイトに発現する P2Y₁ 受容体機能を更に明確にするため、アストロサイト選択的に P2Y₁ 受容体をノックアウトしたマウスを作成した (図 3a)。コンベンショナルノックアウトと同様、グリア瘢痕形成は促進され (図 3b)、神経細胞

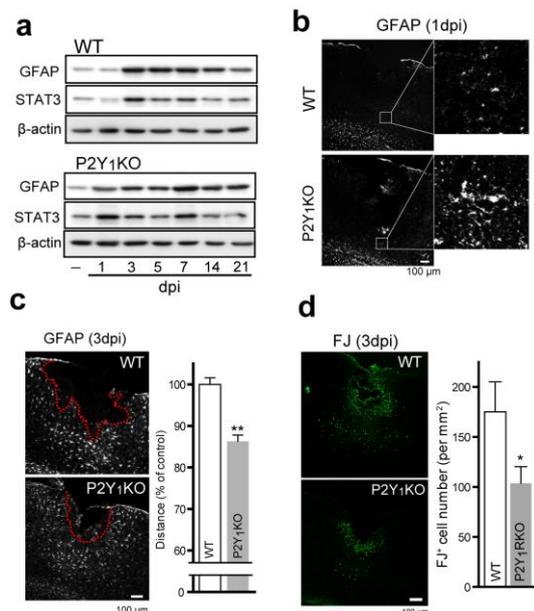


図 2. *in vivo* 脳傷害モデルとアストロサイト活性化

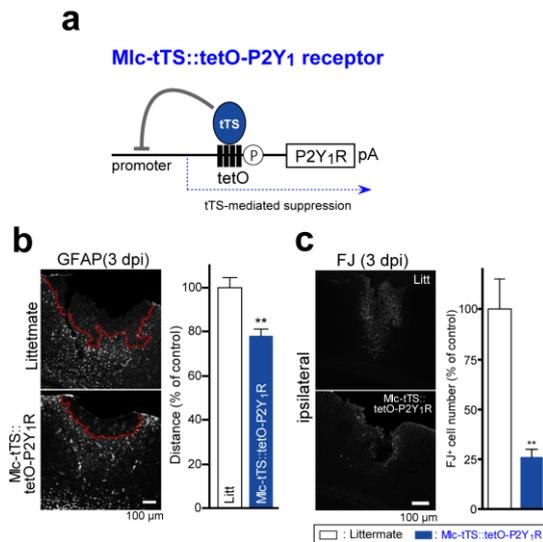


図3. 選択的 P2Y₁ 受容体ノックアウトとアストロサイト活性化は抑制された(図 3c)。以上の結果より、アストロサイトに発現する P2Y₁ 受容体は活性化調節に重要な分子であるほか、脳傷害後の神経保護機能に大きく影響することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

1) Youichi Shinozaki, Schuichi Koizumi
 Purinergic signaling-regulated glial scar formation (Poster presentation)

XI European meeting on glial cells in health and diseases (GLIA2013)

July 2-6, 2013, Berlin, Germany

2) Youichi Shinozaki, Schuichi Koizumi
 Astrocytic P2Y₁ receptor regulates glial scar formation (Oral presentation)

Neuro2013, 京都, 2013 年 6 月 20-23 日

3) 篠崎陽一、小泉修一

P2Y₁ 受容体を介したグリア瘢痕形成の調節 (口頭発表)

第 86 回日本薬理学会年会、福岡、2013 年 3 月 21-23 日

4) 篠崎陽一、小泉修一

P2Y₁ 受容体抑制によるグリア瘢痕形成の促進 (口頭発表)

第 127 回日本薬理学会関東部会、東京、2012 年 10 月 20 日

5) Youichi Shinozaki, Yoshio Imura, Yosuke Morizawa, Yuri Hirayama, Ryohei Komatsu, Keisuke Shibata, Kayoko Fujishita, Schuichi Koizumi

P2Y₁ receptor negatively regulates astrocytic migration and scar-like structure formation (Oral presentation)
 55th Annual meeting on Japanese Society for Neurochemistry/11th Biennial meeting of Asian pacific society for neurochemistry
 September 29-October 2, 2012, Hyogo, Japan

6) 篠崎陽一、井村誉史雄、森澤陽介、平山有里、小松龍平、柴田圭輔、藤下加代子、繁富英治、小泉修一

P2Y₁ 受容体はアストロサイト細胞移動及び瘢痕構造の形成を負に調節する

第 14 回応用薬理シンポジウム、山梨、2012 年 9 月 3-4 日 (ポスター)

7) Youichi Shinozaki, Yoshio Imura, Yosuke Morizawa, Yuri Hirayama, Ryohei Komatsu, Keisuke Shibata, Kayoko Fujishita, Schuichi Koizumi

P2Y₁ receptor blockade enhances astrocytic motility and glial scar formation (Oral presentation)

Purine 2012, May 31- July 2, 2012, Fukuoka, Japan

[その他]

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~yshinozaki/Home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠崎 陽一 (SHINOZAKI, Youichi)

山梨大学・医学工学総合研究部・講師

研究者番号：10443772