

総 説

アストロサイト依存的虚血耐性の分子メカニズム解析

平 山 友 里

山梨大学大学院総合研究部医学域基礎医学系リエゾンアカデミー（薬理学講座）

要 旨：虚血耐性とは、先行して非侵襲的な虚血を経験すると、その後の侵襲的な虚血に対する抵抗性が増す現象であり、最も脆弱な臓器である脳でも認められる。近年、神経細胞の機能維持及び保護には、神経細胞以上に周辺のグリア細胞の役割が重要であることが分かってきたが、虚血耐性におけるグリア細胞の役割は殆ど分かっていない。筆者らは、*in vivo* マウス脳虚血耐性モデルを作成し、虚血耐性現象の分子メカニズムをグリア細胞の視点から明らかにした。本稿では、虚血耐性現象におけるグリア細胞の役割とその分子メカニズムについて概説する。

キーワード 脳虚血耐性, Preconditioning, アストロサイト, P2X7 受容体, HIF-1 α

I. はじめに

虚血耐性とは、先行して傷害を与えない程度の短時間虚血（preconditioning：PC）を経験しておく、その後の致命的傷害を与える長時間虚血に対する抵抗性を獲得する現象である。この保護効果は、実験的にも臨床的にも認められる現象であり、虚血に最も脆弱な臓器である脳でも起きることが確認されている^{1,2)}。脳梗塞治療薬の開発が苦戦している中で、強力な脳保護効果を示す虚血耐性現象の分子メカニズムの解明は、新規治療薬の開発及びその治療戦略において重要視されている。これまでに多くの精力的な研究により、分子メカニズムが複数報告されているが、そのほとんどが神経細胞の機能変化に注目したものであった。しかし、神経細胞の機能維持及び保護にはグリア細胞の役割が重要であることも示唆されているが、虚血耐性におけるグリア細胞の関与はほとんど知られていない。本稿では、脳内で最大数を占めるグ

リア細胞、アストロサイトに依存した虚血耐性の分子メカニズムについて概説する。

II. マウス脳虚血耐性モデルの作製

虚血耐性は非常に強力な脳保護作用を呈することから、すでに多くの精力的な研究がなされている³⁾。しかしそれらの研究の多くは培養細胞等を用いた *in vitro* 実験が中心であり、実際の脳卒中で認められるような脳虚血耐性現象を再現した病態モデル動物を用いた *in vivo* 実験はほとんど行われていなかった。そこで著者らは、実際の脳梗塞の臨床病態に近い状態を作り出せる中大脳動脈閉塞（middle cerebral artery occlusion：MCAO）⁴⁾ の手技を応用して、再現性の高い *in vivo* 脳虚血耐性モデルを独自に作製した。本モデルにおいて、短時間虚血（PC）である 15 分間 MCAO は傷害を引き起こさないが、長時間虚血である 60 分間 MCAO を負荷すると脳梗塞傷害が起こる（図 1）。この侵襲的 60 分間 MCAO による梗塞傷害は、PC を 3 日前に先行負荷することにより顕著に抑制された。従って、本プロトコルで虚血耐性が誘

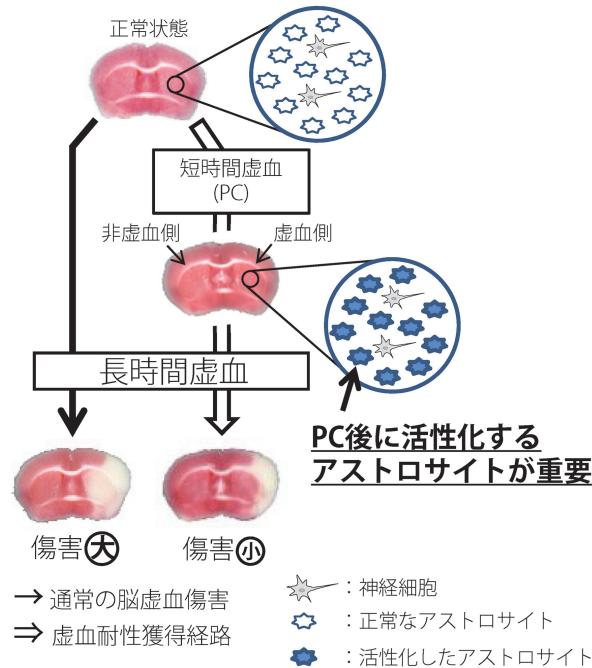


図1. アストロサイト依存的虚血耐性の模式図
 マウス脳切片の TTC 染色により虚血後の傷害部位（白色部分）を染め分けた。Preconditioning (PC) の負荷は傷害を与えずにアストロサイトを活性化させ、この活性化アストロサイトの働きによって後に起こる長時間虚血に対して抵抗性を示す（虚血耐性）。これまで考慮されていなかったグリア細胞、特にアストロサイトの存在が虚血耐性獲得において重要であることを明らかにした。

導されること、また本モデルが虚血耐性研究に有用なモデルであることが示唆された。しかし PC を 1 日前に負荷した場合には、虚血耐性が誘導されなかったことから、PC 後 3 日が経過する間に、虚血耐性獲得のための分子が誘導される可能性が強く示唆された。

Ⅲ. 活性化アストロサイトが誘導する虚血耐性

脳には神経細胞のみならず、神経細胞の数倍もの数のグリア細胞が存在している。特に、グリア細胞の中でそのサイズおよびポピュレーションが最大であるアストロサイトは、神経伝達物質の受容体や輸送体を多数発現しており、

脳梗塞の分子病態と強く関連していることが報告されている⁵⁾。虚血耐性獲得にも、グリア細胞が関連している可能性があるが、これまでのほとんどの虚血耐性研究は、神経細胞を標的としたものであった。グリア細胞は、脳内環境の変化に対して非常に感受性が高く、またその性質を大きく変化させることが知られていることから、重要な役割を担っていることが推測できる。そこで著者らは、PC によりグリア細胞の表現型が変化することで虚血耐性が誘導される、との作業仮説を立て、その検証を行った。

まず、免疫組織化学染色法を用いて PC 後のアストロサイトの形態変化を観察した結果、PC 1 日後では何も変化がみられなかったが、

PC 3日後以降に活性化が認められ、このアストロサイト活性化と虚血耐性獲得の時空間パターンとの間に相関関係が認められた。さらに、フルオロクエン酸を投与してPCにより惹起されるアストロサイトの活性化を抑制すると、PCによる虚血耐性効果が消失した。これらの結果から、アストロサイトの活性化は虚血耐性の獲得に必須であることが明らかとなった。また、PCによるアストロサイトの活性化は8週間後まで持続することから、本モデルにおける虚血耐性は長時間有効である可能性が示唆された。

一方、脳内の免疫担当細胞として知られているグリア細胞、ミクログリアも脳虚血病態への関与が数多く報告されており⁶⁾、本実験でもPCによって活性化することが示されている。しかし、ミクログリア活性化抑制薬であるミノサイクリンを投与してPC後のミクログリアの活性化を抑えても虚血耐性獲得への影響はなく、またミクログリア活性化の時空間パターンと虚血耐性獲得のそれとは一致していなかった。以上のことから、PCによる虚血耐性獲得には、ミクログリアではなくアストロサイトの活性化が必要であることが明らかとなった（アストロサイト依存的虚血耐性）。

Ⅳ. アストロサイト依存的虚血耐性の分子メカニズム

虚血耐性獲得にアストロサイトの活性化が重要であることが明らかとなったが、その分子メカニズムについては不明であった。そこで、神経細胞-アストロサイト間の相互作用において中心的な役割を果たすATPおよびその受容体に注目した。すでに、脳梗塞の分子病態とATP受容体、特にイオンチャネル型P2X受容体に関しては多くの報告がなされている^{7,8)}。我々はPCにより変化するP2X受容体のスクリーニングから、P2X7受容体の発現亢進を見だし、その発現亢進はアストロサイトにおいて顕著であった。脳虚血耐性におけるP2X7受

容体の役割を明らかにするため、P2X7受容体欠損(P2X7-KO)マウス⁹⁾を用いて解析を行ったところ、PCによるアストロサイト活性化程度は野生型と比べて違いはなかったが、虚血耐性の獲得はP2X7-KOマウスでは消失した。したがって、アストロサイト依存的虚血耐性獲得の分子メカニズムとして、P2X7受容体の発現亢進が必要条件であることが示唆された¹⁰⁾。

次に、アストロサイト依存的虚血耐性誘導におけるP2X7受容体下流シグナルの解析を行った。ここでは、酸素の恒常性維持におけるマスター分子であり、多くの神経保護分子を制御する転写因子hypoxia inducible factor (HIF)-1 α ¹¹⁾に注目した。HIF-1 α 発現は通常、酸素依存的に働くPHD2によって制御されているが、PCのような低酸素負荷によってPHD2の機能が阻害される結果、HIF-1 α が細胞質内に蓄積、核内に移行し、ターゲット分子が産生される。神経細胞のHIF-1 α はこのメカニズムにより発現制御されていることが知られており、PCによって亢進する神経細胞HIF-1 α が虚血耐性獲得に関与する可能性が示唆されていた。しかし、神経細胞特異的HIF-1 α 欠損マウスを用いた研究により、神経細胞由来のHIF-1 α と虚血耐性獲得の因果関係はすでに否定されており¹²⁾、本モデルでもPCによる神経細胞HIF-1 α の発現亢進は一過的であった(図2A)。一方で、PCによるHIF-1 α 発現亢進は、神経細胞だけでなくアストロサイトでも認められる。そこで、PCによるアストロサイトのHIF-1 α 発現と虚血耐性獲得の関連性を解析した結果、アストロサイトHIF-1 α の発現亢進は遅発性(PC3日後以降)で持続的であった(図2B)。さらに、アストロサイトのHIF-1 α 発現は酸素非依存的であり、その代りに完全にP2X7受容体に依存しており、その発現亢進の時空間パターンは、虚血耐性獲得のパターンとよく一致していた。以上のことから、アストロサイト依存的虚血耐性の分子メカニズムとして、P2X7/HIF-1 α 経路を介する持続的な神経保護分子の産生が関与している可能性が示唆

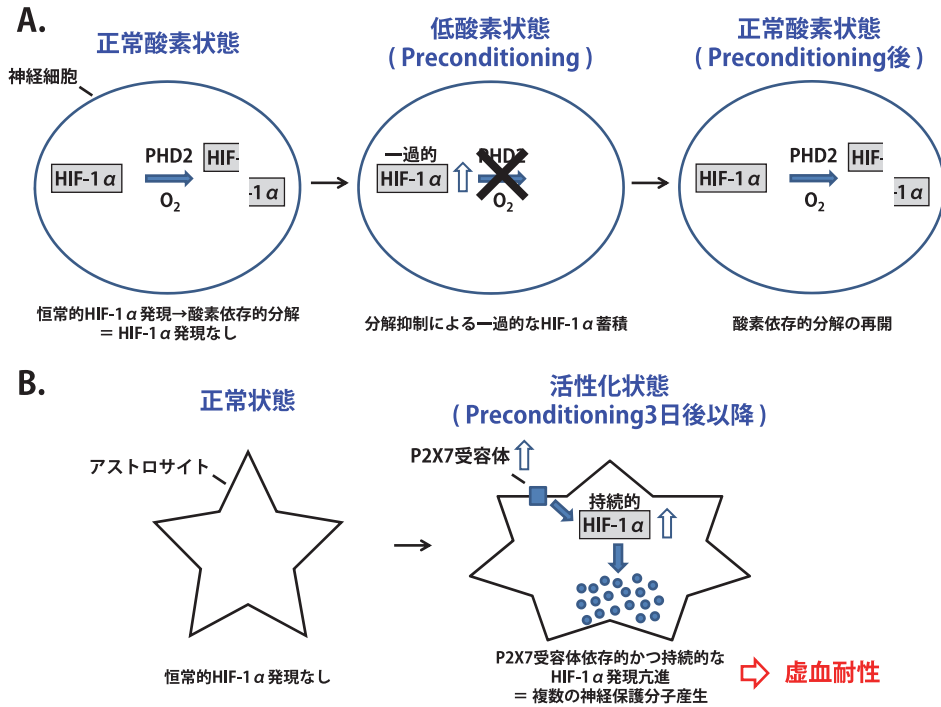


図2. アストロサイト依存的虚血耐性の分子メカニズム

(A) 恒常的に発現している神経細胞の HIF-1 α は通常、酸素依存的に働く PHD2 によって発現制御されている。Preconditioning (PC) のような低酸素状態になると、PHD2 の機能が阻害され、HIF-1 α の蓄積が一過的に起こるが、PC 後は再び分解される。(B) アストロサイトは通常 HIF-1 α は発現しておらず、PC3 日後以降に活性化状態になると、P2X7 受容体発現亢進→HIF-1 α 発現を介して複数の神経保護分子を持続的に産生し、虚血耐性を誘導する。これらアストロサイト依存的虚血耐性の分子メカニズムは、これまで神経細胞で見いだされていたものとは異なり、虚血耐性の有効期間はより長期である。

された。

V. おわりに

本研究により、虚血耐性獲得がグリア細胞 (アストロサイト) 依存的であること、またその分子メカニズムの一端が明らかとなった。つまり、このアストロサイト依存的虚血耐性の獲得は、P2X7/HIF-1 α 依存的であり、その脳保護作用は非常に強力であった¹⁰⁾。本研究で用いたような PC は、非侵襲的ではあるものの直接ヒトに応用することはできない。したがって、今後臨床への応用を目指すためには、アストロサイトあるいは本研究により見いだした虚血

耐性関連分子を、PC 以外の方法で制御するストラテジーを検討しなければならない (図3)。そのために、アストロサイト依存的虚血耐性分子メカニズムの全容解明に向けたさらなる研究が必要である。しかし、本研究成果は、アストロサイトが虚血耐性誘導および脳梗塞治療戦略において、非常にポテンシャルの高い標的細胞であることを強く示唆するものであると考えている。

参考文献

- 1) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, *et al.*: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res*, 528: 21–24, 1990.

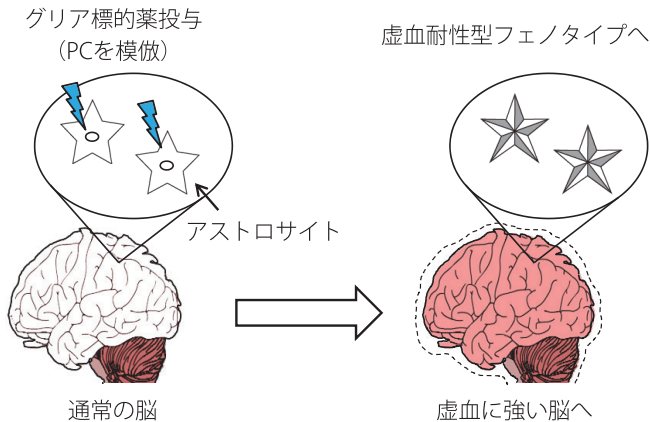


図3. アストロサイト依存的虚血耐性を薬物で模倣する
アストロサイトを虚血耐性型フェノタイプへと変えるグリア標的薬ができれば、Preconditioning (PC) 後と同様に虚血に強い脳をつくりだすことが可能となり、グリア創薬による新規脳梗塞治療法の開発につながる。

- 2) Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, *et al.*: Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*, 30: 1851–1854, 1999.
- 3) Dirnagl U, Becker K, Meisel A: Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol*, 8: 398–412, 2009.
- 4) Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, *et al.*: Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl AcadSci USA*, 103: 11790–11795, 2006.
- 5) Rossi DJ, Brady JD, Mohr C: Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*, 10: 1377–1386, 2007.
- 6) Wang Q, Tang XN, Yenari MA: The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*, 184: 53–68, 2007.
- 7) Franke H, Illes P: Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther*, 109: 297–324, 2006.
- 8) Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P: P2X7 receptors in the nervous system. *ProgNeurobiol*, 78: 327–346, 2006.
- 9) Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, *et al.*: Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J BiolChem*, 276: 125–132, 2001.
- 10) Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y, Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, *et al.*: Astrocyte-mediated ischemic tolerance. *J Neurosci*, 35: 3794–3805, 2015.
- 11) Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12: 5447–5454, 1992.
- 12) Baranova O, Miranda LF, Pichiule P, Dragatsis I, Johnson RS, *et al.*: Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 27: 6320–6332, 2007.