

日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

脳梗塞後の貪食性アストロサイトによる脳内再編と
その分子基盤の解明

森澤 陽介

(東北大学大学院生命科学研究所超回路脳機能分野)

はじめに

脳梗塞とは、脳血管が詰まるなどして、血流が滞り、酸素・栄養が行き届かないために脳が壊死する病態である。成人の死因の主因の一つである一方、死を免れたとしても重い後遺症が残ることが少なくない。その一方で、唯一神経機能を改善する方法は現状リハビリのみといえる。これらのことより、詳細な病態解明、及び治療戦略の開発は急務といえる。脳梗塞により死滅した細胞や不要な神経回路は周囲に存在するグリア細胞によって貪食・除去される。この働きは有害物質の拡散を抑制し、二次的な炎症を防ぎ梗塞による傷害を抑制すると共に、神経回路網の修復、ひいては運動機能等の神経機能の回復に重要な役割を果たすと考えられる。近年、筆者らはこれまで非貪食性と考えられてきたアストロサイトというグリア細胞が、脳梗塞傷害後の組織修復期に非常に高い貪食性を有していることを見出した。本稿では、脳梗塞後に観察された貪食性アストロサイトとその分子機構について、筆者らの研究成果を紹介する¹⁾。

1. 脳梗塞後の活性化アストロサイトによる貪食

脳梗塞傷害により死滅した神経細胞は再生しないが、リハビリなどを通じ、梗塞巣周辺領域（ペナンプラ）の生き残った神経細胞が代償的に新たな回路を築くことで、失った機能がある程度取り戻すことができると考えられている（図1）²⁾。

傷害組織の中から再び機能的な回路を作り出すためには、膨大な量の有害かつ不要な傷害組織を除去し、脳内の環境を整えることが必要不可欠といえる。これまで脳内の死細胞やデブリ、外部から侵入した異物などは、専ら免疫担当細胞であるミクログリアによって貪食、除去されると考えられてきた³⁾。既報の通り、一過性の中大脳動脈閉塞(MCAO)を施した脳梗塞モデルマウスにおいて、死細胞片を多数取り込んだミクログリアが梗塞中心領域（コア）で多数観察された。一方、ペナンプラでは、ミクログリアの活性化にやや遅れて、アストロサイトがコアを取り囲むように活性化していた。病変組織を詳細に観察したところ、機能再建に重要とされるこの領域において、活性化したアストロサイトが変性した神経細胞やデブリをその突起で覆っている様子が多数観察された。さらに、アストロサイト内の貪食小胞内には神経細胞、シナプス、免疫細胞のシグナルなどが観察された。これらの結果からペナンプラで活性化したアストロサイトが貪食性を呈している可能性が示唆された。アストロサイトによる貪食の有無を詳細に解析するため免疫電子顕微鏡観察、及び3次元電子顕微鏡観察(SBF-SEM)を行った。その結果、光学顕微鏡観察で得られた結果と同様に、ペナンプラ領域の活性化アストロサイト内には多数のデブリが貪食されていることが確認された（図2）。中には、シナプスやミエリン様構造が貪食小胞内に観察される例もあった。アストロサイトの単位体積当たりの貪食デブリ量はミクログリアと比較しても、同程度であった。以上のことより、

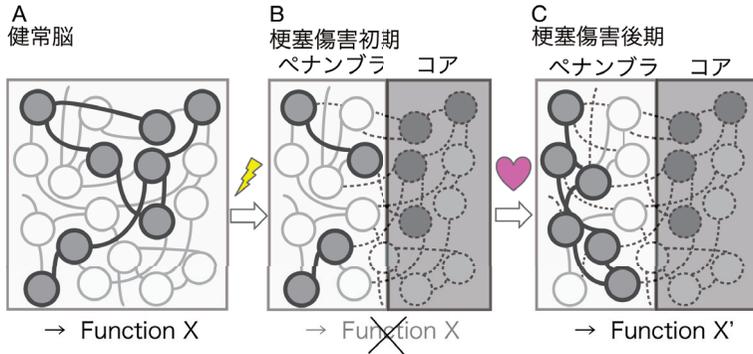


図1 脳梗塞傷害後の脳内再編と機能回復

A) 健常脳。機能 X (随意運動など) を発現するための神経回路 (太線)。B) 傷害初期。コアの神経細胞死により破綻した神経回路 (太線・破線)。機能 X が消失。C) 傷害後期。ペナンプラにおける神経回路網の再編により、機能 X' を発現する新たな神経回路が形成 (太線)。

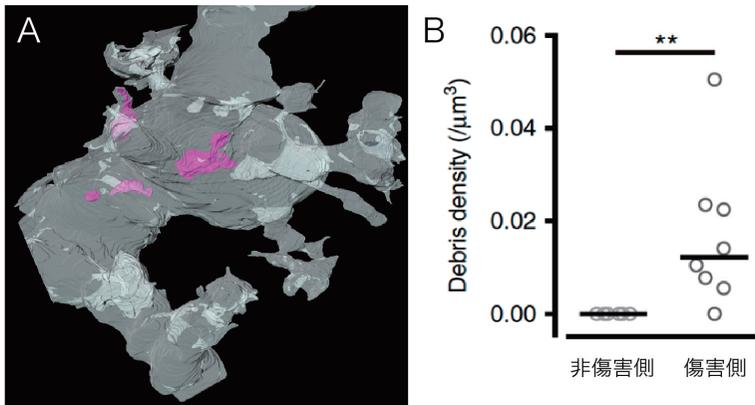


図2 脳梗塞後の貪食性アストロサイト

A) 3次元電子顕微鏡像から立体再構築したアストロサイト (グレー) と貪食されたデブリ (ピンク)。B) アストロサイト内に貪食されたデブリの密度。

一部の活性化アストロサイトは脳梗塞後、変性神経細胞やそのデブリをはじめ様々な基質を取り込む高い貪食性を有することが示された。

貪食性アストロサイトの時空間分布

アストロサイトが高い貪食性を有し、脳内再編に寄与する可能性が明らかになった。しかしながら、アストロサイトとミクログリア、異なるグリア細胞による貪食は何が違うのであろうか。1つには、2種のグリア細胞が貪食性を発揮している

時間と場所が違っていった。ライソソームタンパクの発現を指標に、貪食活性を解析した結果、ミクログリアは傷害後の早い段階で、死細胞が多く生じるコアに集積し、貪食性を亢進させていた。一方、アストロサイトは、傷害後より後期のフェーズで、ペナンプラにおいて、貪食性を亢進させていた。また、3次元電子顕微鏡観察から、ミクログリア内には比較的大きなデブリを取り込んだものが観察されたが、アストロサイト内においては、そのような大きなデブリは観察されなかった。以上の結果から、プロフェッショナルな貪食細胞で

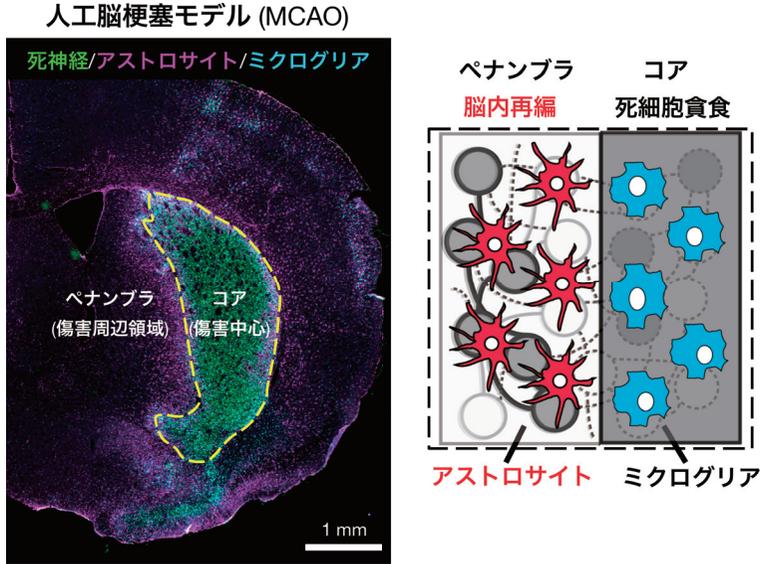


図3 貪食性グリア細胞の時空間分布
 脳梗塞後の貪食性アストロサイトとミクログリアの時空間分布。ミクログリアは傷害後、速やかにコア領域へ集積し、貪食性を示したのに対し、アストロサイトはより後期にペナンブラ領域で貪食性を示した。

あるミクログリアによる貪食は、コアにおいて死細胞やその断片などの大きなデブリを貪食し、有害物質の漏出を防ぎ、より後期に観察されたアストロサイトによる貪食は、この時期、ペナンブラで活発に生じる神経回路や組織再編などの脳内リモデリングに寄与するのではないかと類推された(図3)。

アストロサイト貪食を担う分子群の同定

貪食は様々な機能分子の統制された働きによって遂行される。遺伝子発現解析を用いて、脳梗塞後の活性化アストロサイトの貪食に関わる責任分子の同定を試みた。脳梗塞傷害に伴う貪食関連分子の遺伝子発現変化を解析したところ、Abca1分子の発現亢進が顕著かつアストロサイトの貪食性によく相関した経時変化を示すことが明らかになった。ABCA1はリン脂質やコレステロールなどを輸送する脂質トランスポーターである。一方で、線虫において同定された貪食必須遺伝子の一つced-7のは乳類相同遺伝子としても知られる。

ABCA1は、1. マクロファージに高発現し、貪食に必要なこと、2. 貪食能を持たない細胞へのABCA1強制発現は貪食能を与えること、3. ABCA1欠損動物は発達期の末梢組織における死細胞貪食に不全が生じること、などが示されており、ほ乳類においても貪食時に重要な役割を担う^{4)~6)}。貪食における機能的側面については不明な点も多いが、1. 貪食基部においてリン脂質輸送を介し、細胞膜の流動性を調節する役割、2. 貪食受容体の膜トラフィッキングを誘導する役割、3. 貪食基質由来の不要コレステロールを細胞外へと排出し、貪食能を維持する役割、などが提案されている^{7)~9)}。

in situ hybridization および免疫組織染色の結果、貪食能の亢進を認めたペナンブラ領域の活性化アストロサイトにおいて顕著にABCA1の発現が亢進していることが明らかになった。さらに、ABCA1と共役して貪食に関わる貪食受容体MEGF10⁶⁾、細胞内アダプタータンパク質GULP1¹⁰⁾もまた、ペナンブラの活性化アストロサイトにおいて発現亢進していたことから、脳梗

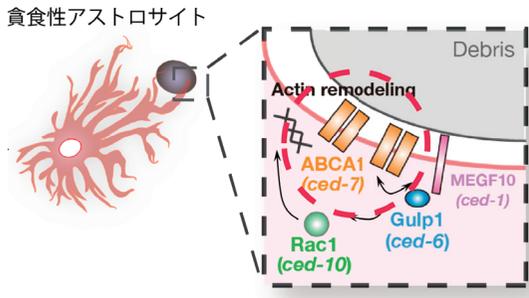


図4 脳梗塞後の貪食性アストロサイトの分子基盤 ABCA1 貪食経路分子を介し、細胞外のデブリを貪食する。

塞傷後の活性化アストロサイトの貪食には ABCA1-MEGF10-GULP1 分子経路が働いている可能性が示唆された。

ABCA1 貪食経路依存的なアストロサイト貪食

ABCA1-MEGF10-GULP1 貪食経路の重要性を検討するため単離培養アストロサイトを用い、詳細な検討を行った。培養アストロサイトは死細胞やデブリ、シナプトソーム、ビーズなどの貪食基質を細胞内へと取り込むことができるが、ABCA1 機能阻害薬、及び遺伝学的な ABCA1 発現低下、欠損によってこれらの貪食能が著しく抑制されることが明らかになった。さらに ABCA1 分子は貪食時に、貪食基質との接触部へと集積することも明らかになった。MEGF10、GULP1 の発現抑制もアストロサイトの貪食能を低下させることから、ABCA1-MEGF10-GULP1 貪食経路がアストロサイトの貪食に必要な役割を担うことが示唆された。一方、薬理的に ABCA1 発現を亢進させると、貪食能も顕著に亢進した。ABCA1 欠損アストロサイトを用いた場合には、この貪食能の亢進は認めなかった。以上のことから、ABCA1 の発現および機能はアストロサイトの貪食に必要かつ十分な役割を担っており、貪食能を強く制御するキー分子であることが明らかになった。

次に、*in vivo* におけるアストロサイト貪食の ABCA1 依存性を評価した。Cre-loxP システムを用い、アストロサイト特異的に ABCA1 を欠損さ

せた動物を用いて、貪食能を検討した。3次元電子顕微鏡解析により、欠損マウスにおいては、アストロサイト選択的に貪食能が顕著に低下していることが明らかになった。さらに、欠損動物では細胞外に蓄積されたデブリの密度が高い傾向にあった。以上の結果から、脳梗塞後、アストロサイトは ABCA1 の発現を亢進させ、ABCA1 貪食経路依存的に細胞外の不要物質を積極的に貪食、除去し、ペナンプラの脳内再編に参画・寄与する可能性が示唆された (図4)。

おわりに

本研究により、脳梗塞後の脳内再編に貪食性アストロサイトが関与すること、またその分子機構の一端が明らかになった。しかしながら、アストロサイトによる貪食がもつ病態生理学的意義や予後に果たす役割については明らかにできておらず、今後の課題である。引き続き、アストロサイトによる貪食が果たす生理、病態生理的意義の解明を試みるとともに、これまで蓄積されてきたミクログリアによる貪食の知見との相違点を明らかにすることで、脳内再編現象に果たす貪食性グリア細胞の役割を明らかにしたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、山梨大学の小泉修一教授、平山友里助教および研究室の皆様、共同研究者の先生方に多大なるご指導とご協力を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。最後に、本稿執筆の機会を与えてくださいました日本神経化学会奨励賞選考委員の先生方、関係者の先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Morizawa YM, et al. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nature communications*, 8, 28 (2017).

- 2) Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nature reviews Neuroscience*, 10, 861-872 (2009).
- 3) Koizumi S, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, 446, 1091-1095 (2007).
- 4) Hamon Y, Chambenoit O, Chimini G. ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1585, 64-71 (2002).
- 5) Hamon Y, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol*, 2, 399-406 (2000).
- 6) Hamon Y, et al. Cooperation between engulfment receptors: the case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS One*, 1, e120 (2006).
- 7) Marguet D, Luciani MF, Moynault A, Williamson P, Chimini G. Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nat Cell Biol*, 1, 454-456 (1999).
- 8) Jehle AW, et al. ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *J Cell Biol*, 174, 547-556 (2006).
- 9) Kiss RS, Elliott MR, Ma Z, Marcel YL, Ravichandran KS. Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes. *Curr Biol*, 16, 2252-2258 (2006).
- 10) Su HP, et al. Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem*, 277, 11772-11779 (2002).