

### グリア細胞主導型の虚血耐性獲得メカニズムの解明

平山 友里

(山梨大学大学院総合研究部医学域薬理学講座)

#### はじめに

「虚血耐性」とは、非侵襲的虚血 (preconditioning: PC) の経験により、その後の侵襲的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<sup>1)2)</sup>。脳卒中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、その殆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殆ど知られていない。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。

#### I. *In vivo* 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<sup>3)</sup>。しかし、それらの研究の多くは培養細胞や脳スライス標本等を用いた *in vitro* 実験が中心であり、実際の脳卒中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、実際の脳虚血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)<sup>4)</sup> 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、長時間虚血である 60 min MCAO を負荷すると広範囲に傷害が起こった (図 1A)。この侵襲的 60 min MCAO の 3 日前に、傷害を引き起こさない 15 min MCAO (PC) を先行負荷しておく、傷害が顕著に抑制された (図 1A)。従って、本プロトコールで虚血耐性が誘導されること、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。

#### II. 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<sup>5)</sup>。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

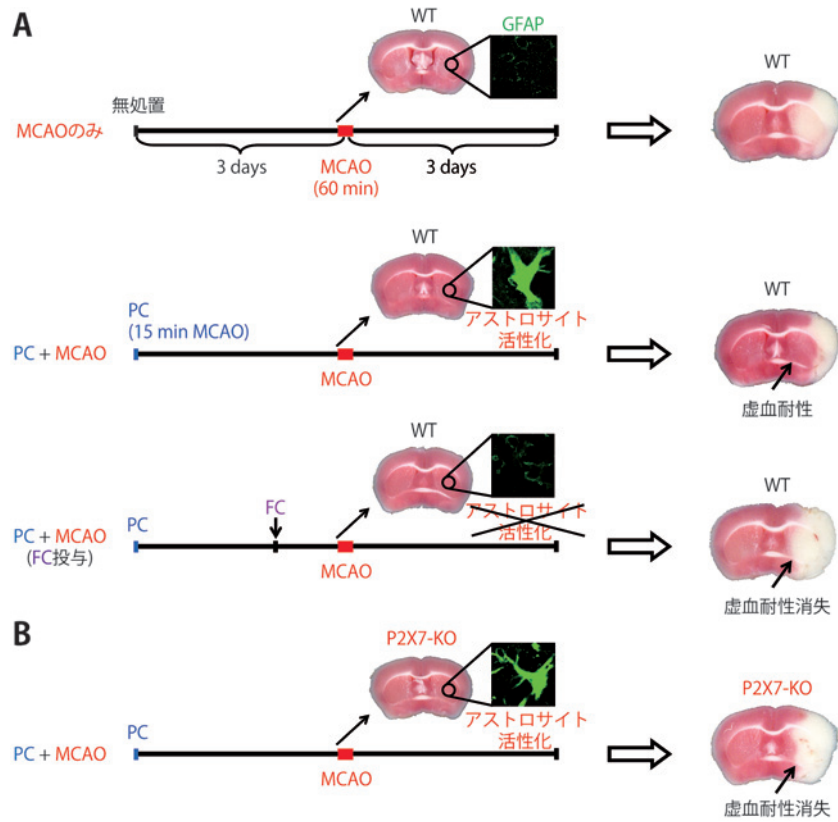


図1 アstrocyte性虚血耐性

中大脳動脈閉塞 (MCAO) の手技を応用して、*in vivo* マウス脳虚血耐性モデルを作製し、TTC 染色にて傷害程度を評価した。Astrocyteの活性化に関しては、免疫組織化学染色法にて解析した。(A) 野生型 (WT) マウスに侵襲的な 60 min MCAO を負荷すると広範囲に傷害が起こった (白色部分)。傷害を引き起こさない PC (15 min MCAO) を先行して負荷しておく、後の 60 min MCAO による傷害は顕著に抑制された。PC により、Astrocyteは活性化して GFAP (緑色; Astrocyteのマーカー) 発現を亢進するが、この Astrocyteの活性化が認められる部位と傷害が抑制される部位は一致していた。PC による Astrocyteの活性化を FC (Astrocyte活性化抑制薬) で抑制すると、虚血耐性は消失した。(B) 活性化 Astrocyteで顕著に発現亢進している P2X7 受容体の欠損 (P2X7-KO) マウスにおいて、PC による Astrocyteの活性化は見られるが、虚血耐性は消失した。(文献 10) より改変・転載

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 Astrocyte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 Astrocyte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 (図 1A)。さらに、フルオロクエン酸 (FC) を投与して PC により惹起される Astrocyte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 (図 1A)。これらの結果から、Astrocyte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 Astrocyte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

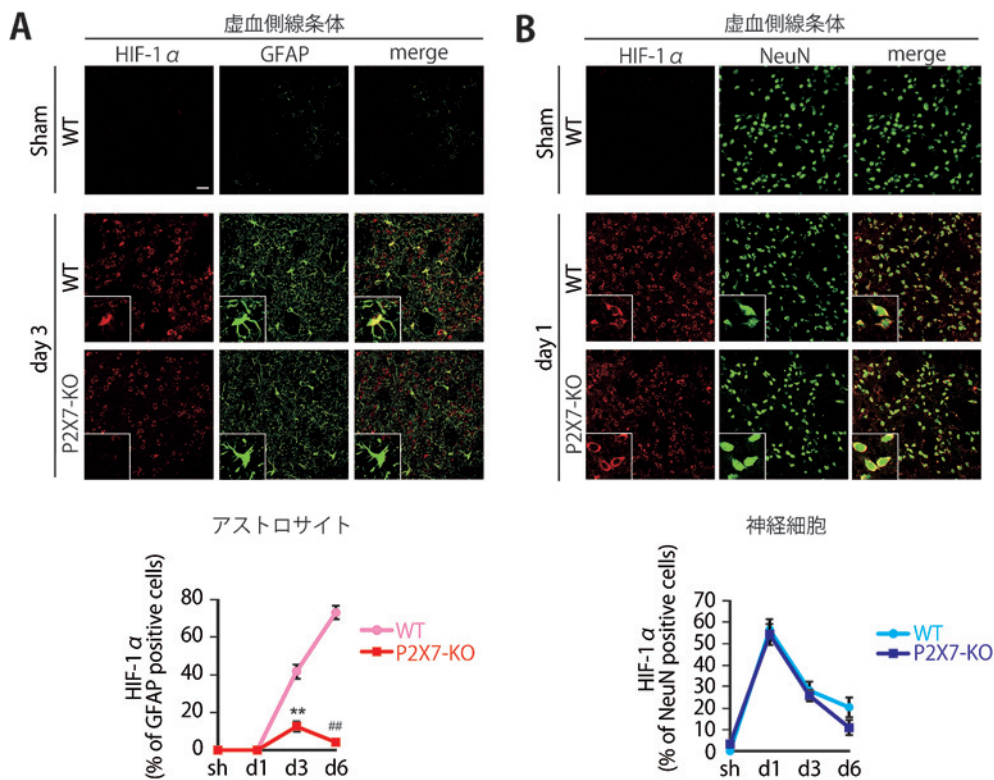


図2 アストロサイトと神経細胞におけるPC後のHIF-1 $\alpha$ 発現パターンの違い

PC後の虚血側線条体におけるアストロサイトと神経細胞のHIF-1 $\alpha$ 発現パターンを免疫組織化学染色法にて解析した。下段のグラフは、GFAPあるいはNeuN陽性細胞におけるHIF-1 $\alpha$ の陽性率を示す。(A) Shamマウスにおいて、HIF-1 $\alpha$ 発現は認められなかった。PCによるアストロサイトHIF-1 $\alpha$ (赤)発現亢進は遅発性であるが(PC3日後以降)、持続的であった(少なくとも2週間持続)。P2X7-KOではWTで見られるアストロサイトHIF-1 $\alpha$ の発現変化はなかった。GFAP(緑):アストロサイトのマーカー。Scale bars: main images, 30 $\mu$ m; insets, 12 $\mu$ m. \*\* $P < 0.01$  vs. WT-d3; ## $P < 0.01$  vs. WT-d6;  $n = 3-6$ 。(B) PCによる神経細胞HIF-1 $\alpha$ 発現亢進は早期に見られるが(PC1日後)、一過性であった。P2X7-KOとWTで、神経細胞HIF-1 $\alpha$ の発現変化に違いはなかった。NeuN(緑):神経細胞のマーカー。(文献10)より改変・転載

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<sup>6)</sup>、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(アストロサイト性虚血耐性)。

### III. アストロサイト性虚血耐性の分子メカニズム

#### 1) アストロサイトに特有なP2X7/HIF-1 $\alpha$ 経路

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。

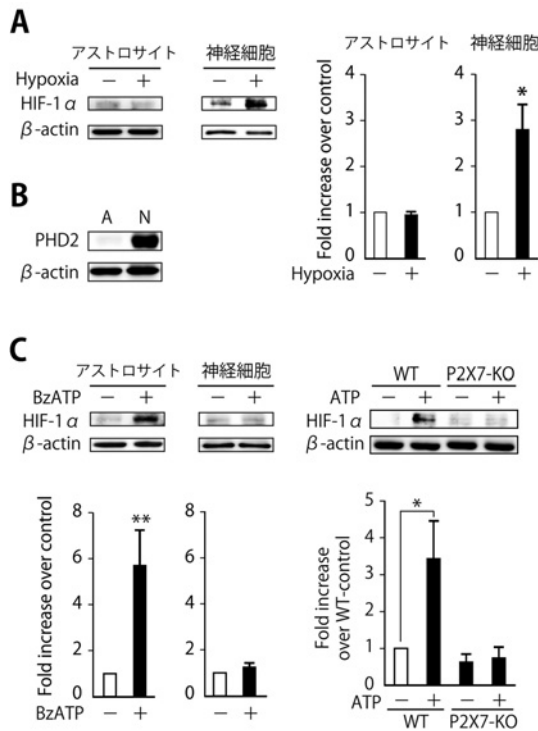


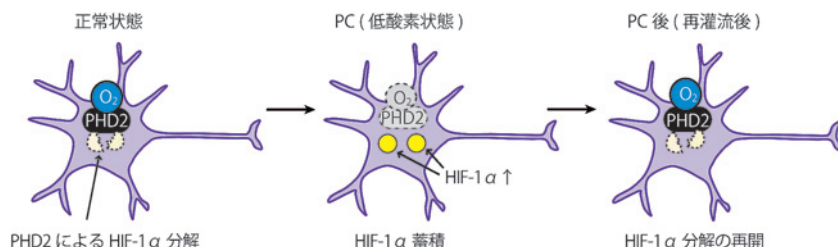
図3 アストロサイトと神経細胞の HIF-1α 発現メカニズムの違い

(A) 初代培養アストロサイト及び神経細胞に4時間低酸素(5%)を負荷し、ウエスタンブロット法にてHIF-1α発現レベルを比較した。低酸素負荷により、アストロサイトHIF-1α発現レベルはcontrolと比べて変化はなかったが、神経細胞HIF-1αは顕著な発現亢進が認められた。 $*P<0.05$  vs. control; n=4-5. (B) 初代培養アストロサイト(A)と神経細胞(N)のPHD2発現レベルをウエスタンブロット法にて比較した。神経細胞ではPHD2が高発現しているのに対し、アストロサイトでは殆ど発現が認められなかった。(C) 初代培養アストロサイト及び神経細胞にP2X7受容体アゴニストBzATP(50 μM)を処置し、24時間後にウエスタンブロット法にてHIF-1α発現レベルを比較した。P2X7受容体活性化により、アストロサイトHIF-1α発現はcontrolと比べて顕著に亢進したが、神経細胞HIF-1α発現レベルは変化しなかった。 $**P<0.01$  vs. control; n=6-8. 野生型(WT)とP2X7受容体欠損(P2X7-KO)マウスの初代培養アストロサイトにP2X7受容体の内因性リガンドATP(1 mM)を処置し、24時間後にウエスタンブロット法にてHIF-1α発現レベルを比較した。ATP処置によりWTアストロサイトのHIF-1α発現はcontrolと比べて有意に亢進したが、P2X7-KOアストロサイトのHIF-1α発現レベルは変化しなかった。 $*P<0.05$  vs. WT-control; n=5-6. (文献13)より改変・転載)

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<sup>7,8)</sup>。著者らは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<sup>9)</sup>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、虚血耐性効果はP2X7-KOマウスでは消失した(図1B)。したがって、アストロサイト性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<sup>10)</sup>。

次に、アストロサイト性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)-1α<sup>11)</sup>に注目した。HIF-1α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-1α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-1α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-1α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-1α欠損マウスを用いた研究により、神経細胞由来のHIF-1αと虚血耐性獲得の因果関係はすでに否定されており<sup>12)</sup>、本モデルでもPCによる神経細胞HIF-1αの発現亢進は一過的であった(図2B)。一方で、PCによるHIF-1α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-1α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-1αの発現亢進は遅発性(PC3日後以降)で持続的であった(図2A)。さらに、アストロサイトのHIF-1α発現は完全に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、

### 神経細胞：低酸素依存的な HIF-1 $\alpha$ 発現



### アストロサイト：P2X7 受容体依存的な HIF-1 $\alpha$ 発現

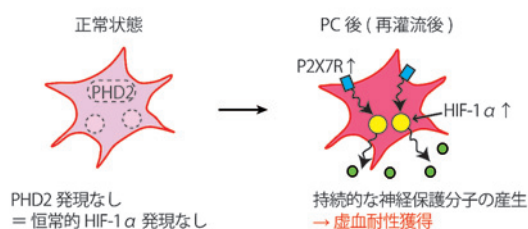


図4 アストロサイトに特有な P2X7/HIF-1 $\alpha$  経路と虚血耐性

正常時、神経細胞では恒常的に HIF-1 $\alpha$  を発現しているが、PHD2 により酸素依存的に分解される。PC により低酸素状態になると、HIF-1 $\alpha$  分解の阻害により HIF-1 $\alpha$  は蓄積するが、再灌流後は分解が再開するため、HIF-1 $\alpha$  上昇は一過性である。一方、アストロサイトは殆ど PHD2 を発現していないために、従来の経路は存在せず、その代わりに PC 後発現亢進する P2X7 受容体依存的に HIF-1 $\alpha$  発現、そしてさまざまな神経保護分子の産生を誘導することで虚血耐性を誘導することが示唆された。

アストロサイト性虚血耐性の分子メカニズムとして、P2X7/HIF-1 $\alpha$  経路が関与している可能性が示唆された。

### 2) アストロサイト HIF-1 $\alpha$ と神経細胞 HIF-1 $\alpha$ の発現メカニズムの違い

HIF-1 $\alpha$  発現は PC 後の神経細胞とアストロサイトで認められるが、なぜ両者の HIF-1 $\alpha$  発現亢進の時空間パターンは異なるのか、なぜ神経細胞の HIF-1 $\alpha$  ではなくアストロサイトの HIF-1 $\alpha$  が虚血耐性獲得に関与するのか不明であった。そこで、アストロサイトと神経細胞で HIF-1 $\alpha$  発現メカニズムの違いがあり、これが脳虚血耐性現象におけるアストロサイト HIF-1 $\alpha$  の重要性を説明する上で鍵となると考え、初代培養細胞を用いた *in vitro* 実験にて HIF-1 $\alpha$  発現メカニズムの解析を行った。初代培養神経細胞は低酸素負荷により有意に HIF-1 $\alpha$  発現を亢進したが、初代培養アスト

ロサイトでは低酸素負荷による HIF-1 $\alpha$  の発現変化は認められなかった (図 3A)。また、HIF-1 $\alpha$  分解酵素である PHD2 は神経細胞にて高発現しているのに対し、アストロサイトでの発現は殆ど認められなかった (図 3B)。したがって、神経細胞とは異なり、アストロサイトの HIF-1 $\alpha$  発現は低酸素非依存的なメカニズムによって制御されていることが考えられた。

図 2A より、PC 後のアストロサイト HIF-1 $\alpha$  発現は P2X7 受容体依存的であることが明らかになっている。そこで、初代培養細胞における P2X7 受容体アゴニスト BzATP の影響を検討したところ、アストロサイト HIF-1 $\alpha$  は顕著に発現亢進したのに対し、神経細胞 HIF-1 $\alpha$  の発現変化は認められなかった (図 3C)。また、P2X7 受容体の内因性リガンド ATP によるアストロサイト HIF-1 $\alpha$  の発現亢進は、P2X7-KO アストロサイトでは認められなかった (図 3C)。以上のことから、低酸素依

存的なメカニズムによって制御されている神経細胞 HIF-1 $\alpha$ とは異なり、アストロサイト HIF-1 $\alpha$ は低酸素非依存的であるが、代わりに P2X7 受容体依存的なメカニズムを介して発現制御されていることが明らかとなった<sup>13)</sup>。また、神経細胞とは異なり、アストロサイトには PHD2 による HIF-1 $\alpha$  分解機構が存在しないため、PC 後の HIF-1 $\alpha$  発現亢進は持続し、その結果として多くの神経保護分子が産生され、これが強力な虚血耐性につながることを示唆された (図 4)。

#### 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性虚血耐性の獲得は、P2X7/HIF-1 $\alpha$  依存的であり、その脳保護作用は非常に強力であった<sup>10)</sup>。さらに、P2X7 受容体と HIF-1 $\alpha$  共に少なくとも PC から 2 週間後まで発現が持続することから<sup>13)</sup>、この脳保護効果は長期間持続することが考えられる。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。そのために、アストロサイト性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卒中治療戦略において、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。

#### 謝 辞

本研究は山梨大学大学院総合研究部医学域薬理学講座 (小泉修一教授) で行われたもので、共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, Kamada T. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res*, 528, 21-24 (1990).
- 2) Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, Einhüpl KM. 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, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci 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. *Prog Neurobiol*, 78, 327-346 (2006).
- 9) Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. Altered cytokine production in mice lacking P2X (7) receptors. *J Biol Chem*, 276, 125-132 (2001).
- 10) Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y, Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, Koizumi S. 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, Chavez JC. 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).
- 13) Hirayama Y, Koizumi S. Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 $\alpha$  expression in astrocytes after ischemic preconditioning. *Glia*, 65, 523-530 (2017).