



1. 研究テーマ

グリア細胞による脳梗塞後の神経機能回復機構の解明

2. 研究の背景および目的

脳梗塞とは、脳血流が滞り、脳が壊死する病態であり、成人の死因・後遺症獲得（片麻痺、運動・意識障害、失語など）の主因である。その一方で、治療法は乏しく、唯一神経機能を改善する方法は現状リハビリのみである。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である。

脳梗塞により死滅した細胞から生じる有害物質や不要神経回路は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、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ている。これまで脳内において死に至った細胞およびデブリなどは、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。近年、我々はアストロサイトというグリア細胞の一種もまた脳梗塞傷害後の組織修復期に、非常に高い貪食性を獲得していることを見出し、この分子機構の一端を明らかにした（図1）。しかしながら、当該分子の欠損マウスにおいてもアストロサイトの貪食能を完全に抑制することはできていない。さらに、従来、非貪食性と考えられてきたアストロサイトによる貪食の詳細な分子機構や制御様式については未だ不明な点が多い。

以上の背景から、本研究では、脳梗塞後の神経機能の改善に有効な新規治療戦略を見出すことを目指し、アストロサイトの貪食能を制御する分子およびその制御メカニズムについて解明することを目的とする。

Astrocyte / Debris

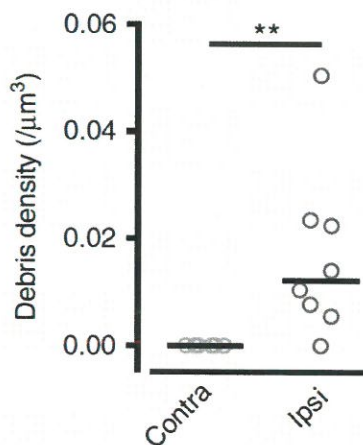
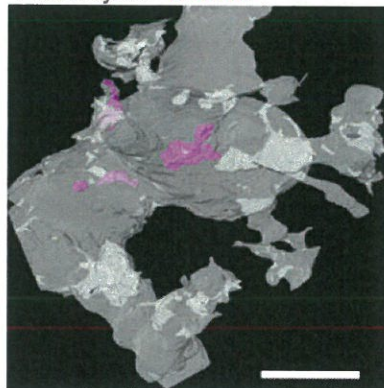


図1. 脳梗塞後のアストロサイトによる貪食

左: 3次元電子顕微鏡像再構成によるアストロサイト貪食像。脳梗塞傷害後、アストロサイト内（グレー）に複数のデブリ（ピンク）が取り込まれた様子。右: 貪食デブリ密度の定量結果。contra（非梗塞側）に対し、ipsi（梗塞側）においてのみ貪食性アストロサイトが多数観察された（Morizawa et al., Nat. Commun., 2017）。

3. 研究の方法

3-1. 貪食関連分子の同定

脳梗塞モデルにはマウス中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いた。イソフルラン麻酔下で、先端をシリコンコーティングしたナイロンフィラメントを中大脳動脈まで刺入した。一定時間、中大脳動脈を閉塞し、その後、再灌流をおこなった (図 2)。MCAO 傷害後、各タイムポイントで mRNA を回収し、定量 PCR 法を用いて、貪食関連分子の遺伝子発現解析を行った。

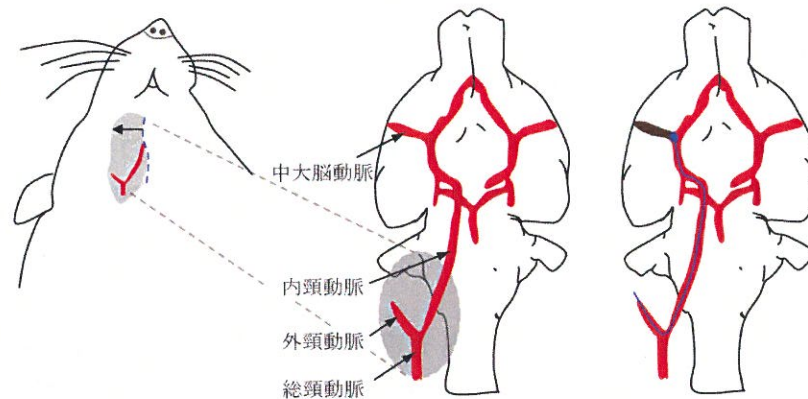


図 2. MCAO モデルマウス作製法

3-2. 貪食能評価

マウス初代培養アストロサイトを作成し、in vitro 貪食能試験をおこなった。培養アストロサイトに貪食基質である 4 μm carboxylate beads を一定時間処置し、細胞内へと取り込まれた蛍光ビーズをフローサイトメーターおよび、共焦点蛍光顕微鏡を用い評価した。薬剤処置はいずれも 15 分前から前処置をおこなった後に、ビーズを処置した。

4. 研究の成果

4-1. 脳梗塞傷害後、アストロサイトの P2X7 受容体は発現上昇する

これまでの研究で MCAO 傷害後、アストロサイトが様々なデブリに対し貪食性を獲得することを見出した (図 1, Morizawa et al., Nat. Commun. 2017)。MCAO 後の貪食関連分子発現の経時的变化を、定量 PCR 法を用いて解析したところ、P2X7 受容体発現がアストロサイトの貪食能獲得と相関して上昇していることを見出した (図 3)。P2X7 受容体は免疫細胞に多く発現するイオンチャンネル型 ATP 受容体である一方で、それ自体が貪食受容体として機能することが報告されている (Gu et al., J. Immunol. 2011)。免疫組織染色により活性化アストロサイトにおいて P2X7 受容体発現が亢進していることを確認したことから、アストロサイトの貪食性に P2X7 受容体が関与する可能性が示唆された (図 3)。

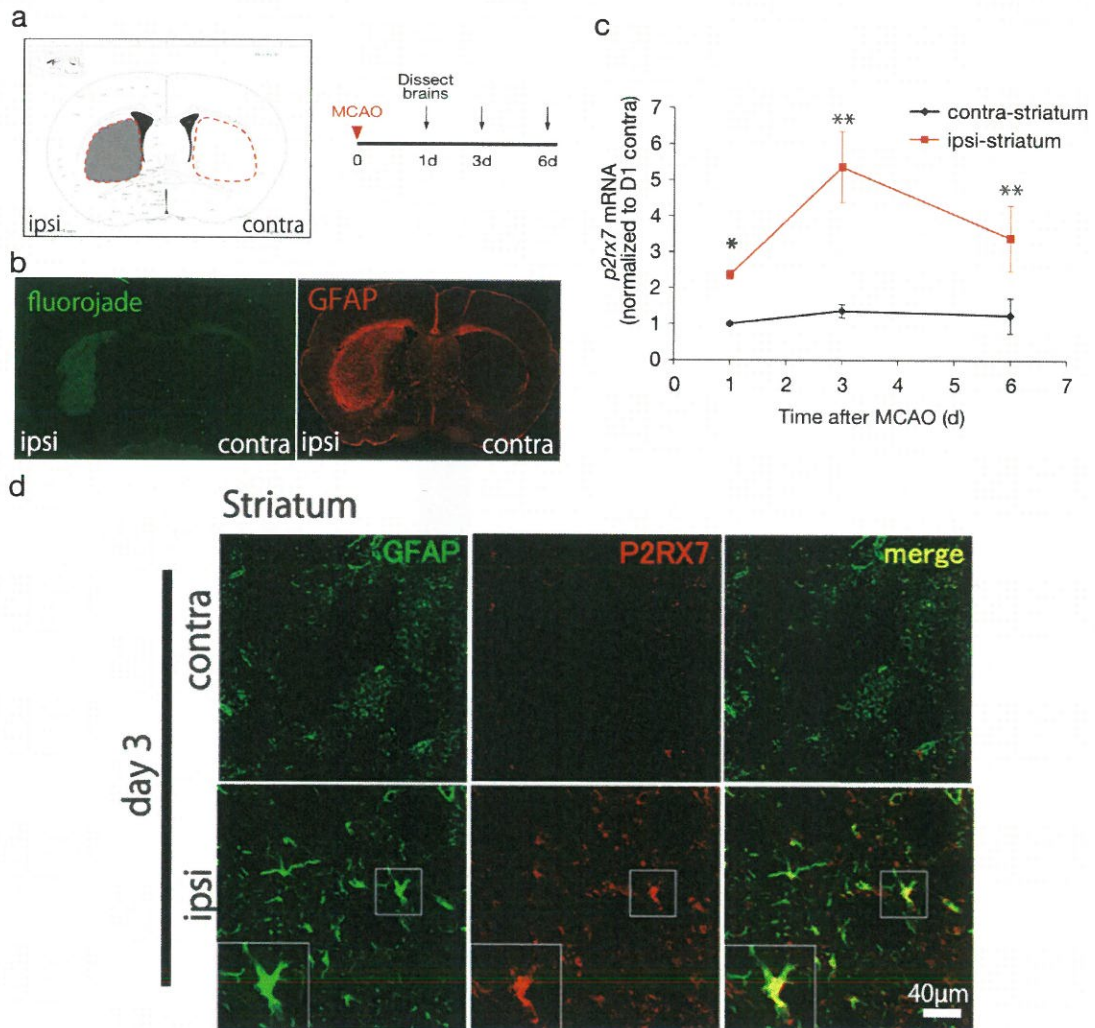


図 3. 脳梗塞傷害後、アストロサイトにおける P2X7 受容体の発現上昇

(a) mRNA 採取タイムコース。脳梗塞処置後、1, 3, 6 日後に、contra (非梗塞側)、ipsi (梗塞側) 線条体から mRNA を抽出した。(b) 脳梗塞処置 7 日後の変性神経細胞 (fluorojade) および活性化アストロサイト (GFAP) の様子。ipsi 線条体において神経変性が多数観察され、同時にアストロサイトの活性化が確認された。(c) p2rx7 mRNA 発現の時間的推移。傷害 1 日目以降、有意に p2rx7 mRNA 発現亢進を認めた ($n=3-4$, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs. respective contra, unpaired t-test)。(d) GFAP および P2X7 の 2 重免疫組織染色像。contra 領域では P2X7 受容体発現が低いのに対し、脳梗塞 3 日後に顕著な発現上昇を認め、それらの多くは GFAP 陽性アストロサイトに局在していた。

4-2. 貪食受容体としての P2X7 受容体

次に、アストロサイトの貪食能に P2X7 受容体が関与する可能性を検証した。in vitro 貪食能試験を用い、P2X7 欠損マウス由来培養アストロサイトの貪食能を野生型と比較したところ、有意に貪食能が低下していた (図 4)。さらに P2X7 の強制発現によりアストロサイトの貪食能は亢進し、P2X7 機能欠損体 (P2X7 Δ C, C 末端領域の欠損体) の強制発現はアストロサイトの貪食能を抑制した (図 4)。

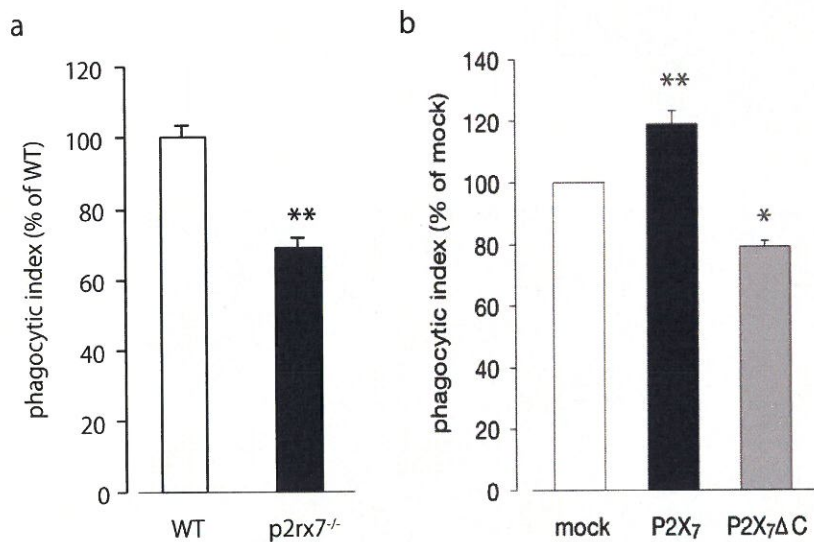


図 4. P2X7 受容体を介したアストロサイト貪食

(a) 野生型 (WT) および P2X7 遺伝子欠損マウス由来アストロサイトの貪食能の比較 (n=22, 21, **P<0.01 vs. WT, unpaired t-test)。
(b) mock (空ベクター)、P2X7 強制発現、P2X7 機能欠損体 (P2X7 Δ C) 強制発現におけるアストロサイトの貪食能の比較 (n=8-11, *P<0.05, **P<0.01 vs. mock, unpaired t-test)。

4-3. P2X7-GFP イメージング

貪食時の P2X7 受容体の局在をイメージングするため、P2X7-GFP ベクターをアストロサイトへと導入した。貪食基質である蛍光ビーズ投入後、アストロサイトと接触したビーズの周辺に P2X7-GFP が強くクラスタリングしてくることが明らかになった (図 5)。これらの結果からも P2X7 受容体がアストロサイトの貪食に強く関わる可能性が支持された。

4-4. ATP-P2X7 受容体シグナルによる貪食能制御

Gu らのマクロファージを用いた検討から、P2X7 受容体アゴニスト処置は、P2X7 受容体の貪食受容体としての機能を阻害することが明らかになっている (Gu et al., Blood 2010)。そこで、P2X7 受容体アゴニストである高濃度 ATP および BzATP のアストロサイト貪食へ与える影響を検討した。その結果、P2X7 受容体のアゴニスト処置により貪食能が著しく抑制されること、また、この効果は P2X7 受容体欠損マウス由来アストロサイトでは認めないことが明らかになった (図 6)。以上の結果から、アストロサイトの貪食に P2X7 受容体そのものが貪食受容体として機能すること、および ATP-P2X7 受容体シグナルによって貪食能が強く抑制されることが明らかになった。

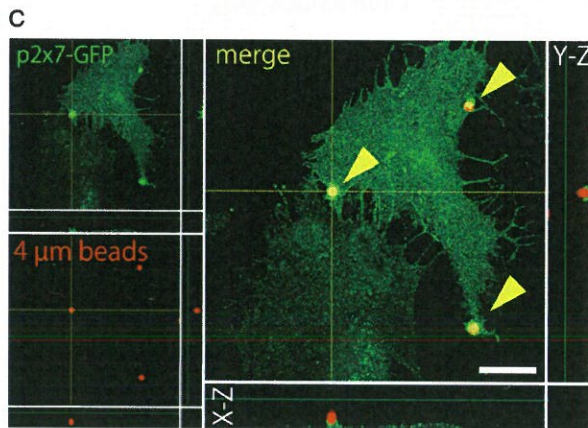
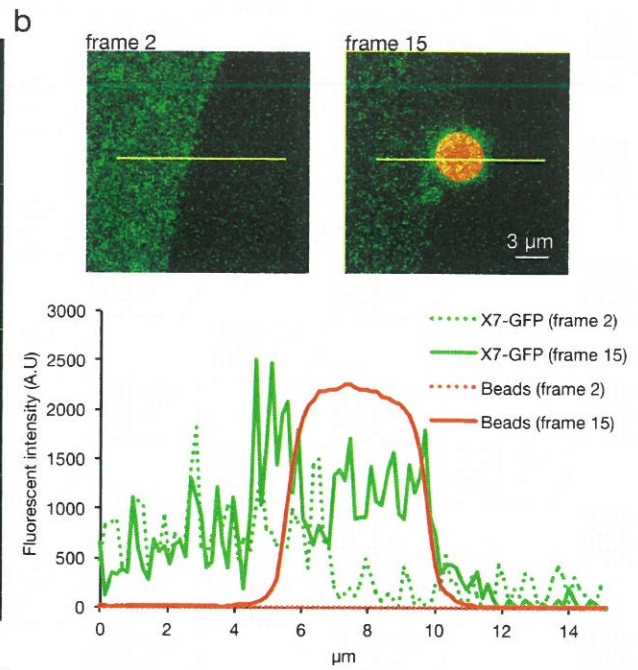
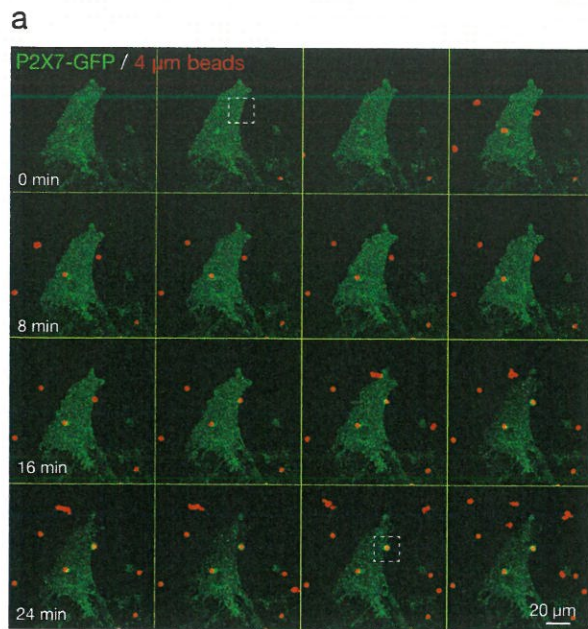


図 5. 貪食時の P2X7-GFP 局在解析

(a) P2X7-GFP のタイムラプスイメージングを行った。0 分時にビーズを投入し、frame 10 あたりからビーズとの接触部位において P2X7-GFP の集積が始まった。(b) frame 2 および 15 の ROI (白点線) の拡大図およびプロットプロファイル(黄線上)。ビーズの結合部位において phagocytic cup 様に P2X7-GFP シグナルの集積が観察された。(c) 別の標本の後固定像 (ビーズ投与 30 分後)。P2X7-GFP はビーズとの結合部位において強い集積を認めた。

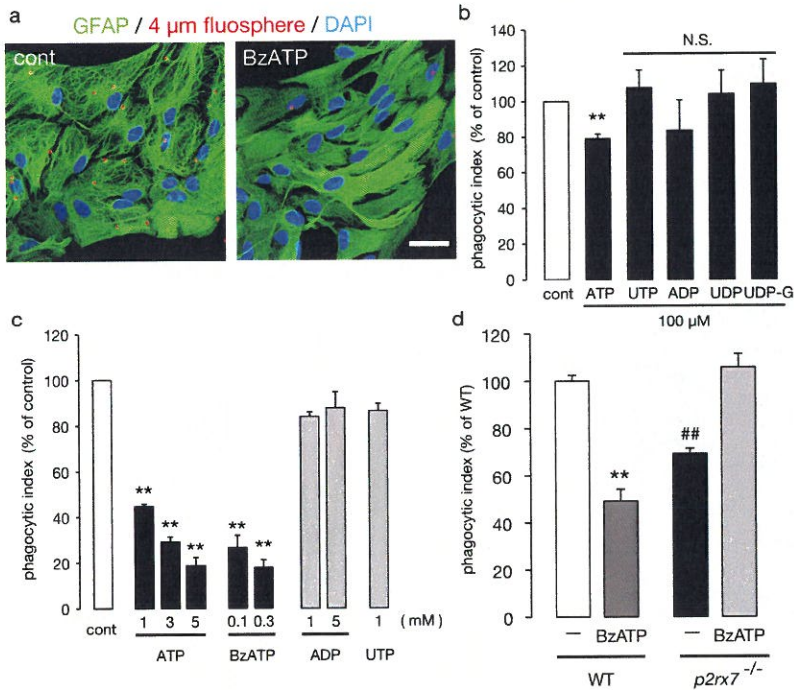


図 6. ATP-P2X7 受容体シグナルによる貪食能制御

(a) P2X7 受容体アゴニストである BzATP 300 μM 処置により、細胞内へのビーズの取り込みが顕著に低下する。(b, c) 各種プリン受容体アゴニスト処置によるアストロサイトの貪食能。P2X7 受容体アゴニストである高濃度 ATP および選択的アゴニスト BzATP 選択的にアストロサイトの貪食能は抑制された (**P<0.01 vs. cont. unpaired t-test. UDP-G: UDP-Glucose)。

(d) BzATP (300μM)による貪食能抑制効果は P2X7 欠損アストロサイトでは認めなかった (n=13-22, **P<0.01 vs. WT naive, **P<0.01 vs. p2rx7^{-/-} BzATP, one-way ANOVA with Tukey-Kramer. 図 4a データと一部重複)。

5. まとめ・考察

本研究では、1. 脳梗塞傷害後、P2X7 受容体がアストロサイトにおいて高発現すること、2. アストロサイトにおいて P2X7 受容体は貪食受容体として働くこと、3. ATP 存在下では ATP-P2X7 受容体シグナルは貪食性を著しく抑制すること、を明らかにした。

これまでの研究から、傷害初期には死細胞から大量に放出される ATP が find-me シグナルとして機能し、ミクログリアなどの免疫細胞を呼び寄せ、貪食を促すことが知られている。一方、本研究から ATP-P2X7 受容体シグナルはアストロサイトに対し、貪食能を著しく抑制する、という真逆の結果が得られた。これまでにミクログリアは傷害の初期から傷害中心領域で貪食能を亢進させ、アストロサイトの貪食能は傷害から 1 週間後をピークとし、傷害周辺領域で生じることを報告している。これらのことから、ATP というシンプルな情報伝達物質を介して、professional phagocytes であるミクログリアと non-professional phagocytes であるアストロサイトの貪食能の時空間分布が制御されている可能性が示唆された。さらに、培養アストロサイトを用いた検討から、P2X7 欠損由来アストロサイトでは貪食性が有意に低下していたこと、P2X7 の強制発現系の実験から P2X7 の機能的発現がアストロサイトの貪食に必要十分であること、貪食時、P2X7 受容体が貪食基部へと集積してくること、ATP-P2X7 受容体シグナルにより貪食性が顕著に抑制されることを明らかにした。以上の結果から、P2X7 受容体とそのシグナリングはアストロサイトの貪食を制御するキー分子として働く可能性が強く示唆された。

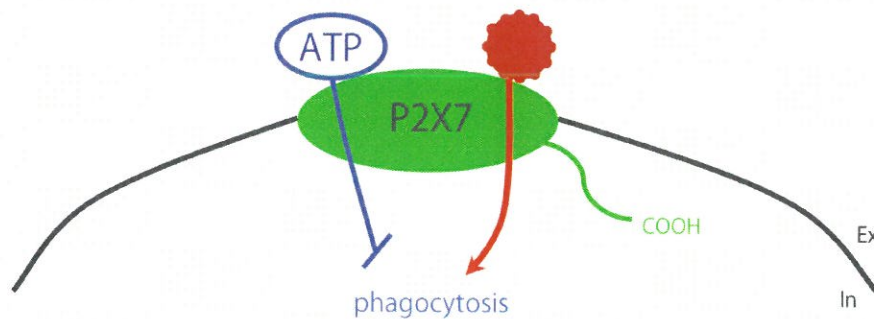


図 7. アストロサイト
 貪食における P2X7
 受容体機能

P2X7 受容体は貪食基
 質 (デブリ, 赤) に対
 し、貪食受容体として
 機能する一方、ATP 存
 在下では貪食能を抑制
 するシグナルを仲介す
 る。

6. 今後の展望

本研究では、アストロサイトの貪食能に P2X7 受容体および ATP-P2X7 受容体シグナルが強く関与することを明らかにした。しかしながら、*in vivo* において、脳梗塞傷害後のアストロサイト貪食への P2X7 受容体の関与および、ATP-P2X7 受容体シグナルの関与、脳梗塞予後への関与が明らかにできていない。P2X7 受容体欠損マウスを用いて、脳梗塞後のアストロサイトの貪食能評価および、運動機能を指標とした神経機能回復への影響を検討する必要がある。さらに、既に報告したアストロサイト貪食に重要な ABCA1 分子と本研究で見出した P2X7 分子のダブルノックアウトマウスを作成し、アストロサイトの貪食を完全に抑制することで、アストロサイト貪食が持つ病態生理的意義の解明に挑戦したい。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

本研究は、2018 年 7 月 1~6 日に開催の第 18 回 World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国立京都国際会館、京都)にて発表予定である。

タイトル「Remodeling the brain after stroke by astrocytic phagocytosis」

著者: 森澤 陽介¹, 小泉 修一²

所属: 東北大院・超回路脳機能、山梨大・薬理

発表形式: ポスター

