

143. 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 基礎医学系 リエゾンアカデミー (薬理学講座)

Key words : アストロサイト, 脳虚血耐性, Preconditioning, P2X7 受容体, HIF-1 α

緒言

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) を経験しておくこと、その後の致死伤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。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明らかとなった分子メカニズムが複数報告されているが¹⁾、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。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ほとんど分かっていなかった。我々はこれまでに、PC 後に活性化するアストロサイトが虚血耐性獲得に重要であること、その分子メカニズムとして、多くの神経保護分子を制御する転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) -1 α が必須であることを明らかにしてきた²⁾。しかし、PC 後の HIF-1 α 発現亢進は神経細胞とアストロサイトの両者で認められるが、なぜ神経細胞ではなく、アストロサイトの HIF-1 α が虚血耐性獲得に重要であるかは不明のままであった。今回、初代培養細胞を用いた *in vitro* 実験と中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO) モデルを用いた *in vivo* 実験の検討により、神経細胞とアストロサイトでは PC 後の HIF-1 α 発現メカニズムが全く異なること、持続的に発現亢進するアストロサイト HIF-1 α のみが虚血耐性獲得に関与することが明らかとなった。

方法および結果

1. アストロサイトと神経細胞の HIF-1 α 発現パターンの違い

PC 後の HIF-1 α 発現の経時的変化をアストロサイトと神経細胞に分けて調べるために、MCAO モデルを用いて PC (15 分間虚血) を負荷し、免疫組織化学染色法にて HIF-1 α の発現変化を調べた。神経細胞 HIF-1 α は PC1 日後から発現亢進していたが、その発現は一過的であった (図 1)。一方、アストロサイト HIF-1 α は PC3 日後、活性化したアストロサイトで発現亢進しており、少なくとも 2 週間までその発現は持続していた。これはアストロサイトの P2X7 受容体発現タイムコースとよく一致していた。これらの結果から、神経細胞とアストロサイトで HIF-1 α 発現メカニズムが異なることが示唆された。

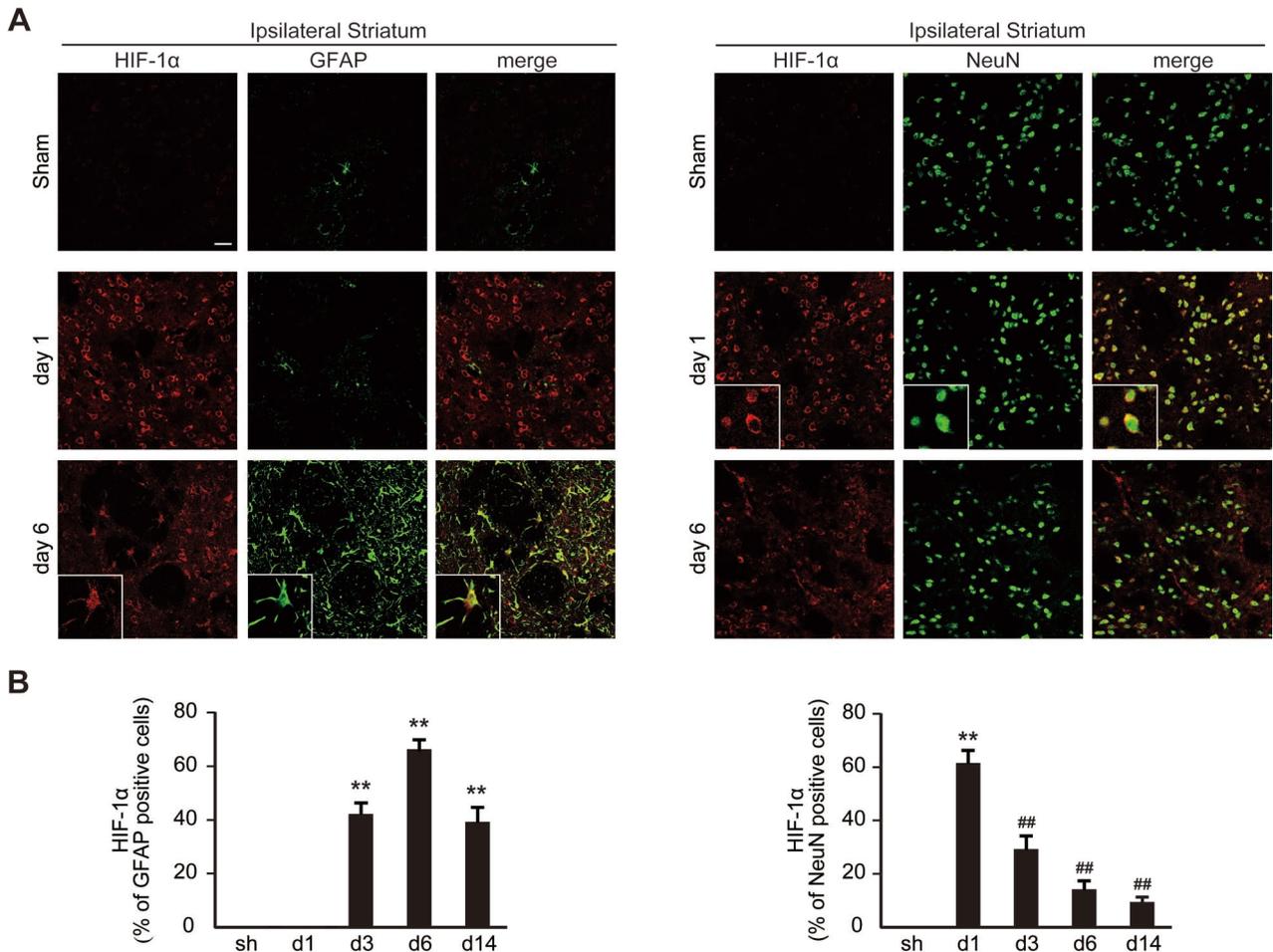


図1. アストロサイトと神経細胞におけるPC後のHIF-1 α 発現変化の違い

(A) 15分間MCAO(PC)から1、3、6、14日後の虚血側線条体におけるHIF-1 α 発現変化を、免疫組織化学染色法にてアストロサイトと神経細胞に分けて解析した。Shamマウスにおいて、HIF-1 α 発現は認められなかった。PC3日後から、活性化したアストロサイトでHIF-1 α (赤)発現が亢進し、少なくとも2週間まで発現が持続していた。一方、神経細胞でもPCによるHIF-1 α 発現亢進は起きるが、一過的であった。GFAP(緑)：アストロサイトのマーカー、NeuN(緑)：神経細胞のマーカー。Scale bars: main images, 30 μ m; insets, 12 μ m。(B) GFAPあるいはNeuN陽性細胞におけるHIF-1 α の陽性率。** $P < 0.01$ vs. sham (sh); ## $P < 0.01$ vs. d1; $n = 3 - 6$ (Tukey's test)。

2. アストロサイトにおける低酸素非依存的なHIF-1 α 発現

HIF-1 α 発現は通常、酸素依存的に働くPHD2によって分解されるが、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、神経保護作用をもつ複数のターゲット分子が産生されることが知られている。本研究の*in vitro*実験においても、初代培養神経細胞への低酸素負荷により、有意なHIF-1 α 発現亢進が認められた(図2A)。一方、初代培養アストロサイトでは、低酸素負荷によってHIF-1 α の発現は変化しなかった。また、*in vivo*、*in vitro*実験において、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2B、C)。したがって、神経細胞とは異なり、アストロサイトのHIF-1 α 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。

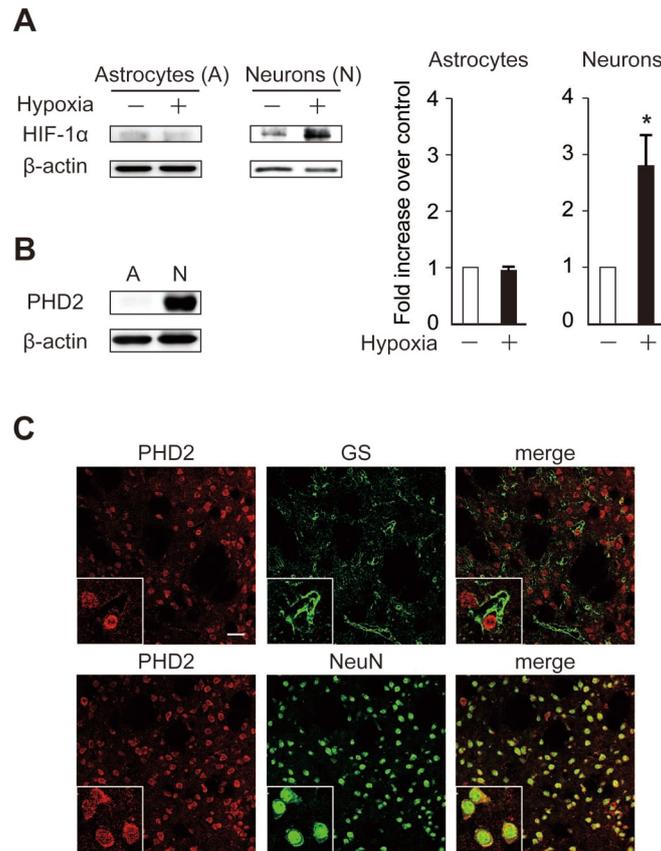


図2. 低酸素負荷による HIF-1 α 発現と PHD2 の局在

(A) 初代培養アストロサイトあるいは神経細胞に4時間低酸素(5%)を負荷し、ウエスタンブロット法にて HIF-1 α 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-1 α 発現レベルは control と比べて変化がなかったが、神経細胞 HIF-1 α は顕著な発現亢進が認められた。 $*P < 0.05$ vs. control; $n = 4 - 5$ (t-test)。(B) 初代培養アストロサイトと神経細胞の 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) 無処置のマウスを用いて、脳内の PHD2 の局在を免疫組織化学染色法にて解析した。線条体において、PHD2 (赤) は主に神経細胞で発現しており、アストロサイトでの発現はほとんど認められなかった。Glutamine synthetase (GS; 緑): アストロサイトのマーカー、NeuN (緑): 神経細胞のマーカー。Scale bars: main images, 30 μ m; insets, 12 μ m.

我々は以前に、PC 後のアストロサイト HIF-1 α 発現は P2X7 受容体依存的であることを報告している²⁾。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 α は顕著に発現亢進したのに対し、神経細胞 HIF-1 α の発現変化は認められなかった(図 3A)。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 α の発現亢進は、P2X7 受容体欠損アストロサイトでは認められなかった(図 3B)。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 α とは異なり、アストロサイト HIF-1 α 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。

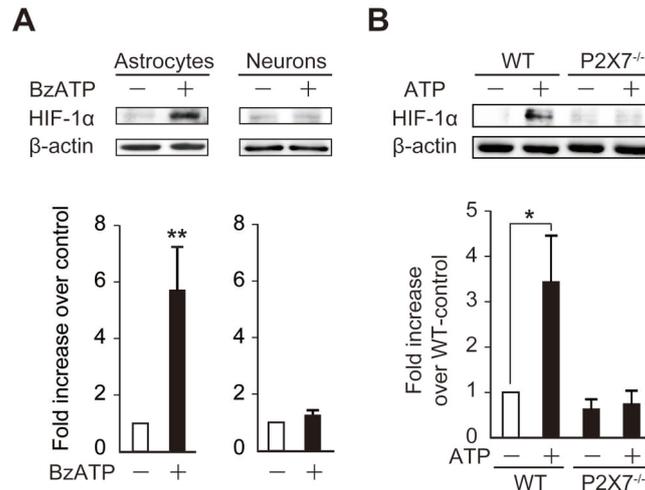


図3. アストロサイト P2X7 受容体の活性化による HIF-1 α 発現

(A) 初代培養アストロサイトあるいは神経細胞に P2X7 受容体アゴニスト BzATP (50 μ M) を処置し、24 時間後にウエスタンブロット法にて HIF-1 α 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-1 α 発現は control と比べて顕著に亢進したが、神経細胞 HIF-1 α 発現レベルは変化しなかった。** $P < 0.01$ vs. control; $n = 6 - 8$ (t-test) . (B) 野生型 (WT) と P2X7 受容体欠損 (P2X7^{-/-}) 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 (1mM) を処置し、24 時間後にウエスタンブロット法にて HIF-1 α 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-1 α 発現は control と比べて有意に亢進したが、P2X7^{-/-}アストロサイトの HIF-1 α 発現レベルは変化しなかった。* $P < 0.05$ vs. WT-control; $n = 5 - 6$ (Tukey's test) .

考 察

これまで、PC によって発現亢進する神経細胞 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が、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いる³⁾。しかし本研究により、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起こっていること、さらに両者の HIF-1 α 発現メカニズムは全く異なることが明らかとなった⁴⁾。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 α 分解機構が存在しないため、PC 後の HIF-1 α 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、これが虚血耐性獲得につながることを示唆された。

文 献

- 1) Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: From experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol.* 2009;8(4):398-412. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70054-7. PubMed PMID: 19296922.
- 2) Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y, Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, Koizumi S. Astrocyte-Mediated Ischemic Tolerance. *J Neurosci.* 2015;35(9):3794-805. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4218-14.2015. PubMed PMID: 25740510.
- 3) 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.* 2007;27(23):6320-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0449-07.2007. PubMed PMID: 17554006.
- 4) Hirayama Y, Koizumi S. Hypoxia-independent Mechanisms of HIF-1 α Expression in Astrocytes after Ischemic Preconditioning. *Glia.* 2017;65(3):523-530. doi: 10.1002/glia.23109. PubMed PMID: 28063215.