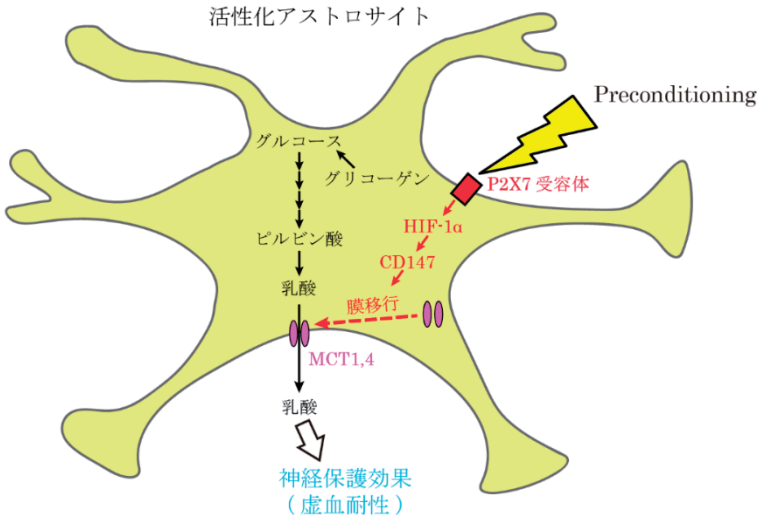
140　脳虚血耐性における乳酸の役割の解明	平山　友里

【目的】虚血耐性とは、先行して非侵襲的な短時間虚血（preconditioning : PC）を経験することにより、その後の侵襲的な長時間虚血に対する抵抗性を獲得する現象である。我々はこれまでに、グリア細胞の一種であるアストロサイトが PC によって活性化し、ATP 受容体である P2X7 受容体を発現亢進することで脳虚血耐性を誘導することを明らかにしてきた（アストロサイト依存的脳虚血耐性）。しかし、P2X7 受容体の下流のメカニズムについては不明であった。そこで我々は、このメカニズムの解明のために予備実験を行ったところ、アストロサイトから P2X7 受容体依存的に放出される「乳酸」が虚血耐性に関与することを示唆する結果が得られた。本研究は、「脳虚血耐性による保護作用はアストロサイト P2X7 受容体依存的な乳酸放出により誘導される」との仮説を提唱し、マウス一過性脳虚血モデルを用いてその仮説の検証及び乳酸放出制御機構を明らかにすることで、新しい脳卒中治療戦略の開発につなげることを目的とした。

【方法】*In vivo* 実験では、既に作製済みである全身性 P2X7 受容体欠損（P2X7-KO）マウスと野生型（WT）マウスを用いた。一過性脳虚血モデルは中大脳動脈閉塞（MCAO）の手技にて作製し、短時間虚血（PC）は 15 分間 MCAO、長時間虚血は 1 時間 MCAO を使用して脳虚血耐性モデルを作製した。脳虚血時の細胞外乳酸濃度は *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて測定した。乳酸輸送担体等の局在は免疫組織化学による二重染色にて確認した。*In vitro* 実験では、アストロサイト初代培養系を用い、P2X7 受容体依存的な乳酸放出のメカニズムを解析した。

【結果】MCAO の手技にて一過性脳虚血モデルを作製し、1 時間 MCAO 中の細胞外乳酸濃度を測定したところ、PC を予め負荷したマウスは PC なしのマウスと比較して有意に細胞外乳酸濃度が上昇していたが、その現象は P2X7-KO マウスでは見られなかった。また、乳酸の脳室内投与は 1 時間 MCAO により惹起される脳梗塞体積を顕著に縮小させることもわかった。PC 後の活性化アストロサイトでは、乳酸放出に関与する輸送体 MCT1、MCT4、それら輸送体のシャペロンである CD147 の発現が増加していた。アストロサイト初代培養系を用いた *in vitro* 実験により、P2X7 受容体活性化は CD147 発現を亢進し、MCT1 と MCT4 の膜発現を CD147 依存的に促進することが明らかとなった。さらに、PC による 1 時間 MCAO 中の細胞外乳酸濃度上昇は CD147 中和抗体の投与により抑制され、虚血耐性効果も見られなかった。従って本研究により、アストロサイトは P2X7 受容体依存的な乳酸放出により虚血耐性を誘導することが示唆された。

アストロサイト依存的脳虚血耐性の作用機序



140. 脳虚血耐性における乳酸の役割の解明

平山　友里

千葉大学 大学院医学研究院 薬理学

Key words：虚血耐性，アストロサイト，P2X7 受容体，乳酸，CD147

緒　言

これまでに、脳卒中及びその予後改善に向けて多くの医薬品開発が行われてきたが、十分な脳保護作用を呈する医薬品の開発には至っていない。この原因の一つは、脳卒中治療薬の開発が神経細胞のみを標的にした戦略で行われてきたためと考えられる。最近の脳科学の進歩により、脳機能は神経細胞と「グリア細胞」との相互作用により担われていることが明らかにされつつある。したがって、脳虚血に対する治療薬を開発するための戦略として、グリア細胞を視野に入れることが、もはや必須であると考えられる。これまでに我々は、グリア細胞の一種であるアストロサイトが「虚血耐性」による脳保護作用において重要な役割を果たしていること、さらにその分子メカニズムの一端も明らかにしてきた［1〜3］。虚血耐性とは、先行して非侵襲的な短時間虚血（PC：preconditioning）を経験することにより、その後の侵襲的な長時間虚血に対する抵抗性を獲得する現象である。この強力な脳保護効果の誘導には、PC によって活性化したアストロサイトで発現亢進する「P2X7 受容体」が必須であることが分かっているが、その下流のメカニズムについては不明であった。

P2X7 受容体は ATP 受容体の 1 つであり、特異的な長い C 末構造があるため、イオンチャネル型受容体でありながら、様々なシグナル伝達も担っている。このアストロサイト P2X7 受容体依存的に誘導される虚血耐性のメカニズムを解明するために、虚血中に大きく変化する脳のエネルギー代謝に注目したところ、虚血耐性モデルにおける長時間虚血中の細胞外乳酸濃度が P2X7 受容体依存的に顕著に上昇することを予備実験にて明らかにした。乳酸は、嫌気性代謝によって産生される老廃物であり、細胞内に蓄積するとアシドーシスにより神経障害因子の放出や細胞死等の有害作用を誘導することが知られている。一方で、細胞外に放出された乳酸は脳虚血障害に対して保護作用を誘導することも分かっている。アストロサイトは乳酸の供給源であるグリコーゲンを大量に貯蔵していることを考慮すると、虚血耐性による脳保護効果は、活性化アストロサイトの P2X7 受容体が誘導する「乳酸放出の亢進」が関与していることが考えられる。しかし、P2X7 受容体がどのように乳酸放出を制御しているか、放出された乳酸は脳虚血耐性獲得に関与するか、またその分子メカニズムについては全く分かっていなかった。

本研究により、脳虚血耐性による保護作用はアストロサイト P2X7 受容体依存的な乳酸放出の促進により誘導されること、またその分子メカニズムの一端が明らかとなった。

方法および結果

1. 脳虚血耐性モデルにおける P2X7 受容体による乳酸放出の制御

一過性脳虚血モデルであるマウス中大脳動脈閉塞（MCAO）と *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、長時間虚血中の細胞外乳酸濃度を測定した。本研究では、短時間虚血（PC）として 15 分間 MCAO、長時間虚血として 1 時間 MCAO を用い、虚血耐性モデルを作製した。長時間虚血中の細胞外乳酸濃度は Control と比べて上昇しており、予め 3 日前に PC を負荷しておいた虚血耐性モデルでは、それよりもさらに上昇していた（図 1）。しかし、P2X7 受容体欠損（P2X7-KO）マウスでは、PC による細胞外乳酸濃度上昇は見られなかった。これら

の結果から、虚血耐性モデルにおける長時間虚血中の細胞外乳酸濃度は P2X7 受容体依存的に上昇することが明らかとなった。

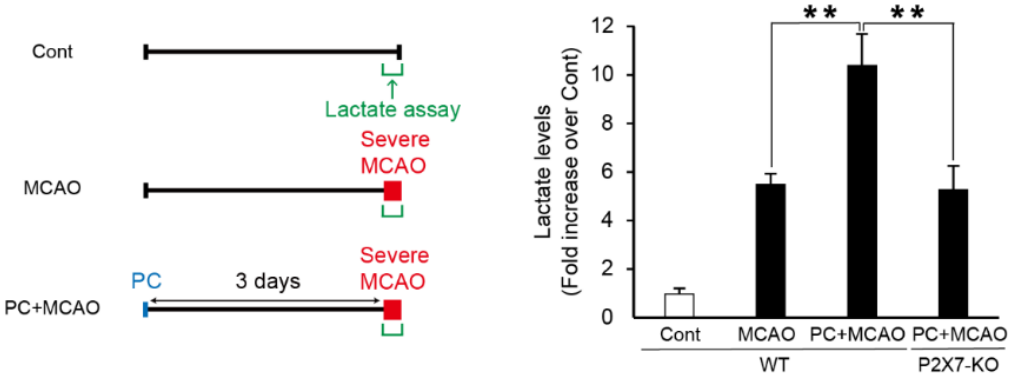


図 1. P2X7 受容体依存的な細胞外乳酸濃度の上昇

短時間虚血（PC）は 15 分間 MCAO、長時間虚血（severe MCAO）は 1 時間 MCAO を用いた。1 時間 MCAO 中の細胞外乳酸濃度については、*in vivo* マイクロダイアリシス法にて乳酸を潅流液に回収し、Lactate Assay Kit にて測定した（n＝2～4）。

***P*＜0.01（Tukey's test）。

2. 脳虚血障害に対する乳酸の保護効果

脳虚血障害に対する乳酸の影響を調べるために、100 mM 乳酸を 1 μL 脳室内に投与して外因的に細胞外乳酸濃度を上げ、1 時間 MCAO 処置後の脳梗塞体積を Control と比較した。虚血後の傷害部位は TTC 染色により染め分けた。Control と比較して乳酸投与マウスでは虚血による傷害が抑制された（図 2）。

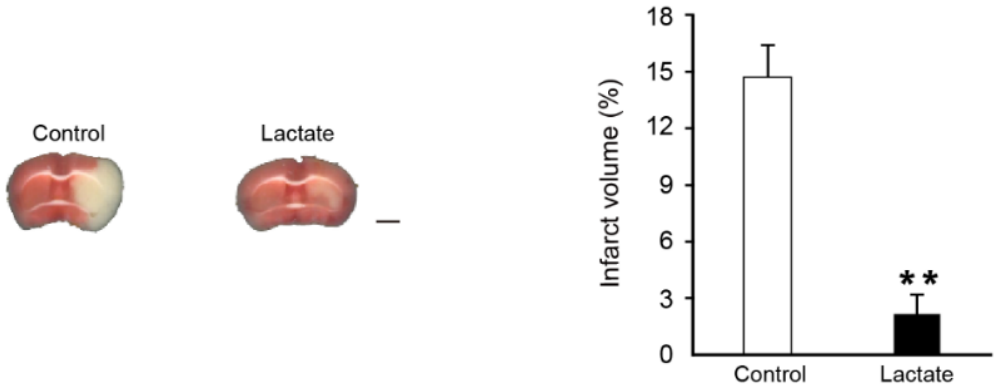


図 2. 脳虚血障害における乳酸の保護作用

100 mM 乳酸 1 μL を脳室内に投与し、1 日後に 1 時間 MCAO を処置し、さらに 3 日後に TTC 染色により脳梗塞体積を評価した（n＝6～9）。

***P*＜0.01（t-test）。Scale bar：2 mm。

3. PC による乳酸輸送関連分子の発現変化

PC による長時間虚血中の細胞外乳酸濃度上昇のメカニズムを解明するために、まず乳酸輸送関連分子の発現パターンを免疫組織化学による二重染色にて調べた。その結果、アストロサイトにおける乳酸放出を担う輸送担体 monocarboxylate transporter 1（MCT1）と MCT4［4］、それら輸送体の細胞膜上での発現を促進する膜糖タンパク質 CD147 が PC により活性化したアストロサイトで発現増加していることがわかった（図 3）。

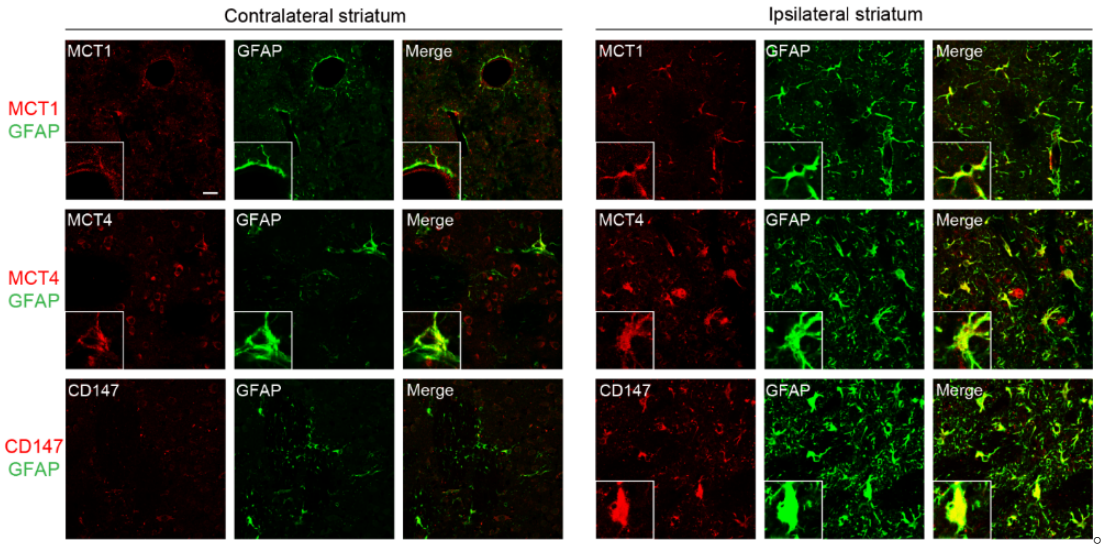


図 3. PC 後の活性化アストロサイトにおける乳酸輸送関連分子の発現

PC から 3 日後の乳酸輸送関連分子 MCT1、MCT4、CD147 の発現パターンについて、免疫組織化学による二重染色にて解析した。GFAP はアストロサイトのマーカーとして用い、虚血側と非虚血側とで発現パターンを比較した。Scale bars：main images 20 μm、insets 8 μm。

4. 初代培養アストロサイトにおける P2X7 受容体依存的な CD147 発現増加

次に、アストロサイトにおける MCT1、MCT4、CD147 の発現増加は P2X7 受容体依存的か否かを明らかにするために、初代培養アストロサイトを用いて P2X7 受容体アゴニストである BzATP の効果を検討した。タンパク質の発現量はウエスタンブロッティングにて確認した。BzATP 刺激により濃度依存的に CD147 のタンパク量が発現増加したが、MCT1 と MCT4 の発現量は変化しなかった（図 4）。

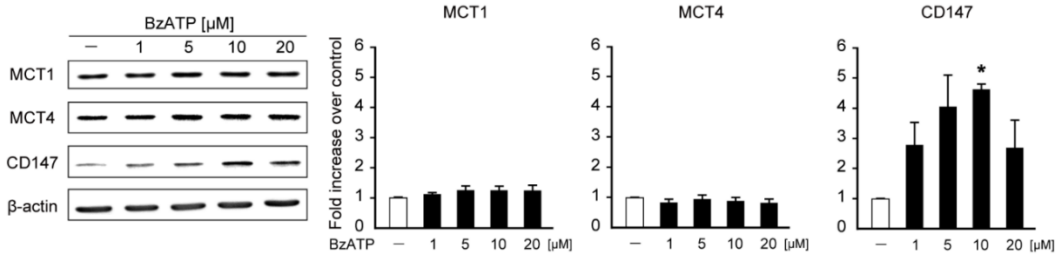


図 4. P2X7 受容体活性化による CD147 発現亢進

初代培養アストロサイトを用いて、P2X7 受容体アゴニスト BzATP 刺激から 24 時間後の MCT1、MCT4、CD147 のタンパク発現量をウエスタンブロッティングにて解析した（n＝4）。*P＜0.05 versus control（Tukey's test）。

5. CD147 を介する MCT1 と MCT4 の細胞膜移行

CD147 は MCT1 と MCT4 のシャペロンとして働き、MCT1 と MCT4 の細胞膜上での発現を促進することが知られている［5］。そこで、初代培養アストロサイトにおける P2X7 受容体アゴニスト BzATP 刺激によるそれら輸送体の局在の変化を免疫細胞染色にて解析した。その結果、BzATP 刺激により MCT1 と MCT4 の局在が核周囲から細胞表面上に移行することがわかった（図 5a）。また、膜タンパク質抽出キットを用いて膜タンパク質を分離し、ウエスタンブロッティングにて発現量を確認したところ、BzATP 刺激により MCT1 と MCT4 の細胞

膜上での発現量は増加しており、その増加は CD147 中和抗体によって抑制される傾向があった（図 5b）。以上のことから、アストロサイト P2X7 受容体の活性化は MCT1 と MCT4 の発現量には影響しないが、CD147 を介してそれら輸送体を細胞膜上へ移行させることが示唆された。

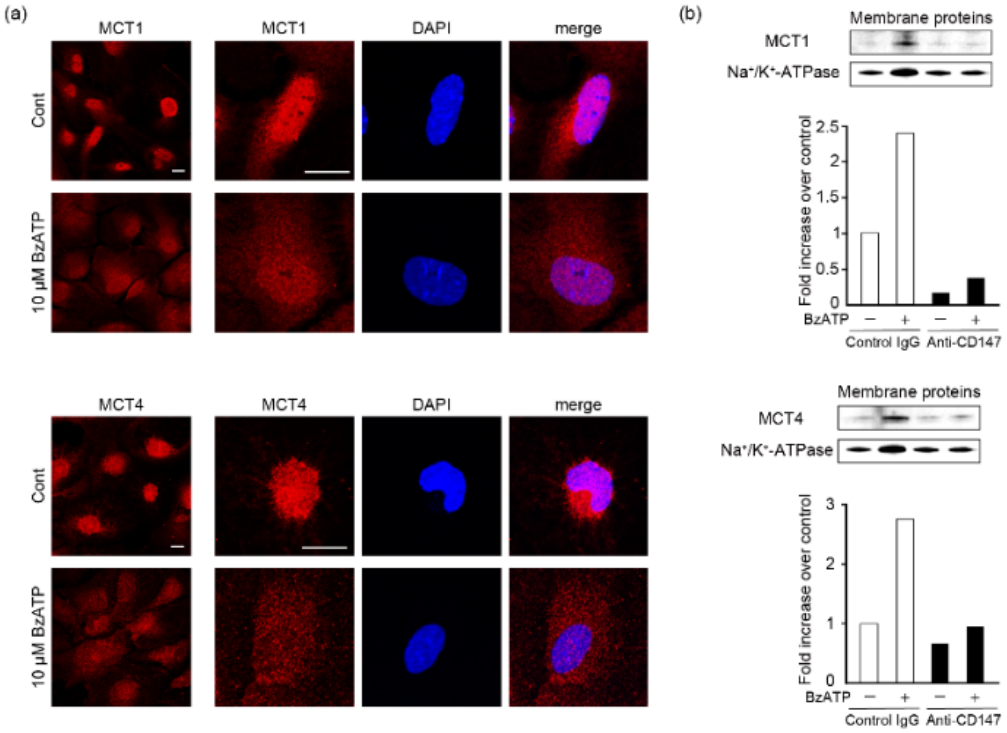


図 5. P2X7 受容体活性化による CD147 を介した MCT1・MCT4 の膜移行

a）初代培養アストロサイトを用いて、P2X7受容体アゴニストBzATP刺激から24時間後のMCT1、MCT4の局在を免疫細胞染色にて解析した。Scale bar：20 μ m。

b）初代培養アストロサイトを用いて、BzATP刺激から24時間後の細胞膜上のMCT1、MCT4のタンパク発現量をウエスタンブロッティングにて解析した（n＝1）。

6. 脳虚血耐性モデルにおける CD147 による乳酸放出の制御

上記 *in vitro* 実験で得られた結果から、虚血耐性モデルにおける長時間虚血中の細胞外乳酸濃度が P2X7 受容体依存的に上昇するのは、CD147 を介する MCT1、MCT4 の膜移行促進によるものと考えられた。そこで、*in vivo* 実験にて CD147 中和抗体の細胞外乳酸濃度への影響を検討した。その結果、虚血耐性モデルにおける長時間虚血中の細胞外乳酸濃度上昇は、CD147 中和抗体（1 mg/mL）1 μ L を脳室内に投与することにより抑制されることがわかった（図 6）。

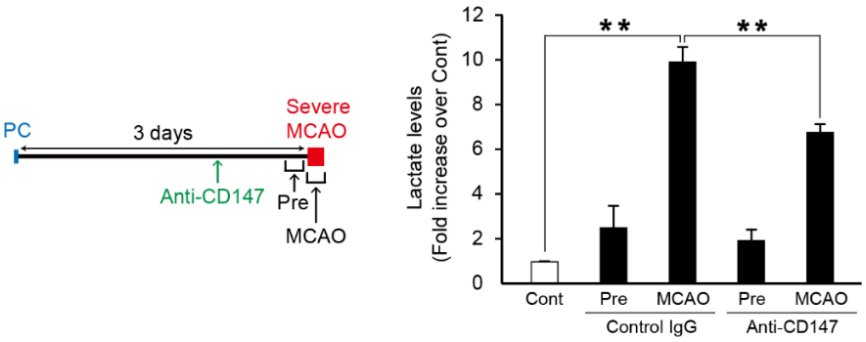


図 6. CD147 依存的な細胞外乳酸濃度の上昇

短時間虚血（PC）は15分間MCAO、長時間虚血（severe MCAO）は1時間MCAOを用い、CD147中和抗体（1 mg/mL）はPCから2日後に脳室内に1μL投与した。1時間MCAOの前と虚血中の細胞外乳酸濃度については、*in vivo*マイクロダイアリシス法にて乳酸を潅流液に回収し、Lactate Assay Kitにて測定した（n＝3～5）。
**P＜0.01（Tukey's test）。

7. CD147 依存的な虚血耐性の獲得

最後に CD147 中和抗体の虚血耐性効果への影響を検討した。CD147 中和抗体（1 mg/mL）1μL を脳室内に投与すると、脳虚血耐性による保護効果が消失することがわかった（図 7）。

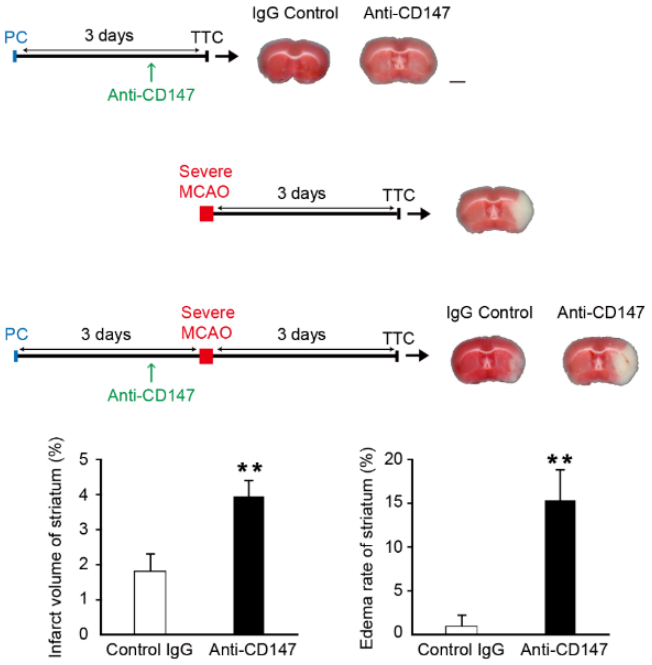


図 7. CD147 中和抗体による虚血耐性の消失

短時間虚血（PC）は 15 分間 MCAO、長時間虚血（severe MCAO）は 1 時間 MCAO を用い、CD147 中和抗体（1 mg/mL）は PC から 2 日後に脳室内に 1μL 投与した。1 時間 MCAO の処置から 3 日後に TTC 染色により脳梗塞体積と脳浮腫を評価した（n＝4～6）。**P＜0.01（t-test）。Scale bar：2 mm。

考　察

我々はこれまでに、アストロサイト依存的脳虚血耐性には PC によって活性化したアストロサイトで発現亢進する「P2X7 受容体」が必須であることを明らかにしてきたが、その下流のメカニズムについては不明であった。本研究により、PC により活性化したアストロサイトは P2X7 受容体を介して CD147 を発現誘導し、MCT1、MCT4 の細胞膜上での発現を促進することで長時間虚血中に細胞外へ放出する乳酸を増やすことができ、その結果脳保護作用が得られる（虚血耐性を獲得する）ことが示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究は千葉大学大学院医学研究院薬理学教室（安西尚彦教授）で行われたものであり、研究をサポートしていただいた教室員の方々に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y, Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, Koizumi S. Astrocyte-mediated ischemic tolerance. J Neurosci. 2015 Mar 4;35(9):3794-805. PMID: 25740510 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4218-14.2015

2） Hirayama Y, Koizumi S. Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1α expression in astrocytes after ischemic preconditioning. Glia. 2017 Mar;65(3):523-530. Epub 2017 Jan 7. PMID: 28063215 DOI: 10.1002/glia.23109

3） Hirayama Y, Anzai N, Koizumi S. Mechanisms underlying sensitization of P2X7 receptors in astrocytes for induction of ischemic tolerance. Glia. 2021 Sep;69(9):2100-2110. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34076906 DOI: 10.1002/glia.23998

4） Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. J Neurochem. 2005 Jul;94(1):1-14. PMID: 15953344 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x

5） Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. EMBO J. 2000 Aug 1;19(15):3896-904. PMID: 10921872 DOI: 10.1093/emboj/19.15.3896.