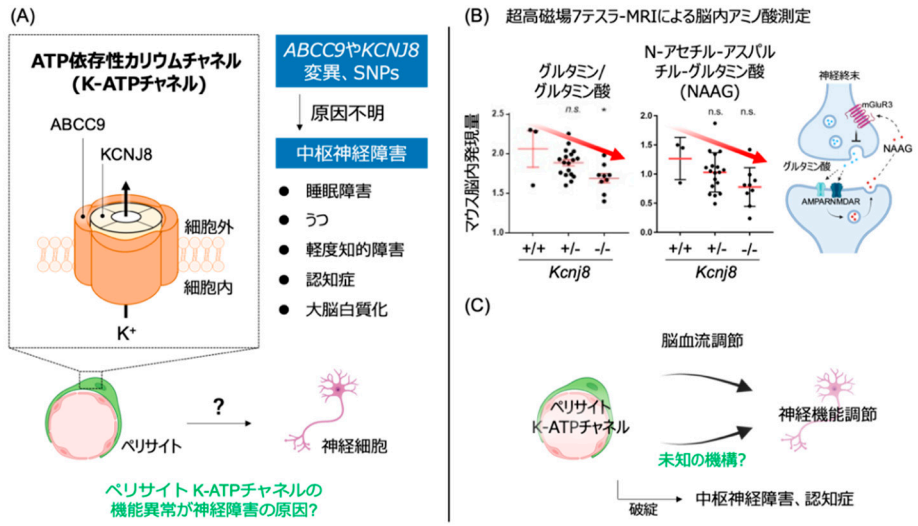
100　神経機能調節に対する脳血管ペリサイトの役割の解析	安藤　康史

【目的】脳内では神経・血管・グリア細胞などが、互いに密に連携する神経血管ユニットを形成することで、複雑かつ秩序だった中枢高次機能が発揮される。一方で、毛細血管を被覆するペリサイトの異常が認知症をはじめとした中枢神経疾患の発症・進展に寄与することが示唆されているが、その分子実態はほとんど分かっていない。そこで、私たちはペリサイトによる中枢恒常性維持機構の解明を目指し、マウスを用いた単一細胞 RNA シークエンス解析により、中枢におけるペリサイトの発現遺伝子群の同定を試みてきた（Vanlandewijck ら、Nature 2018）。明らかにしたペリサイト発現遺伝子の中から、ペリサイトへの特異性・発現量・疾患との関連・ペリサイトにおける機能が未知であったことから、KCNJ8 および ABCC9 ヘテロ複合体からなる ATP 依存性カリウムチャネル（K-ATP チャネル）に着目した。本研究ではペリサイト特異的 K-ATP チャネルの機能解析を通して、ペリサイト–神経細胞間の機能的連関の提唱と、中枢恒常性維持機構の理解を深めることを目的とした。
【方法】*KCNJ8*（KIR6.1）-*ABCC9*（Sur2B）からなる K-ATP チャネルの神経機能に対する影響を検討するために、まず *Kcnj8* 欠損マウスを作製し、生後 30 日齢以降の神経細胞の形態を免疫組織染色法により解析を実施した。次に、*Kcnj8* 欠損マウスの脳内環境の変化の有無を解析するために、血液脳関門・グルコース取り込み・代謝変動などについてそれぞれ解析を行った。さらに、神経細胞活性化に与える影響を検討するために、AAV ウイルスを用いてマウス脳神経細胞にカルシウムセンサーである GCaMP7 を発現させ、非麻酔下において神経細胞内カルシウム変化を観察した。
【結果】*Kcnj8* 欠損マウスでは神経細胞の形態学的な変化を認めなかった。また、血管機能として、脳恒常性維持に必須である血液脳関門の形成やグルコースの取り込みについても顕著な変化は認めなかった。一方で、神経細胞の活動に重要な役割を担うとされるグルタミン／グルタミン酸や NAAG は *Kcnj8* 欠損マウスでは減少傾向にある可能性が示唆された。さらに、今後の詳細な解析が必要であるものの細胞内カルシウム濃度上昇を指標とした個別の神経細胞の活性化を観察すると、細胞あたりのカルシウム上昇能には変化がないものの、近傍の神経細胞間でのカルシウムパターンではその同調性が損なわれている可能性が示唆された。

ペリサイト K-ATP チャネル異常による神経機能障害と、その調節機構の作業仮説



100. 神経機能調節に対する脳血管ペリサイトの役割の解析

安藤　康史

国立循環器病研究センター 研究所 心臓再生制御部

Key words：ペリサイト，ATP 依存性カリウムチャネル

緒　言

脳内では神経・血管・グリア細胞などが、互いに密に連携する神経血管ユニットを形成することで、複雑かつ秩序だった中枢高次機能が発揮される。一方で、毛細血管を被覆するペリサイトの異常が認知症をはじめとした中枢神経疾患の発症・進展に寄与することが示唆されているが、その分子実態はほとんど分かっていない。そこで、私たちはペリサイトによる中枢恒常性維持機構の解明を目指し、マウスを用いた単一細胞 RNA シークエンス解析により、中枢におけるペリサイトの発現遺伝子群の同定を試みてきた［1］。明らかにしたペリサイト発現遺伝子の中から、ペリサイトへの特異性・発現量・疾患との関連・ペリサイトにおける機能が未知であったことから、KCNJ8 および ABCC9 ヘテロ複合体からなる ATP 依存性カリウムチャネル（K-ATP チャネル）に着目した。これまでに KCNJ8 や ABCC9 の機能欠損や活性化変異、さらに一塩基多型などが、うつ・認知機能障害など様々な神経系障害に関わることが報告されている。すなわち、ペリサイト K-ATP チャネルによる神経活性制御機構を明らかにすることが出来れば、疾患とも関連する新たなペリサイト - 神経細胞間の機能的連関の提唱に繋がると考えた。本研究提案ではペリサイト特異的 ATP 依存性カリウムチャネルの機能解析を通して、ペリサイト-神経細胞間の機能的連関の提唱と、中枢恒常性維持機構の理解を深めることを目的とした。

方法および結果

1. *Kcnj8* 欠損マウスにおける神経細胞の組織形態学的解析

KCNJ8（KIR6.1）-*ABCC9*（Sur2B）からなる K-ATP チャネルの神経機能に対する影響を検討するために、まず *Kcnj8* 欠損マウスを作製し、生後 30 日齢以降の神経細胞の形態を免疫組織染色法により解析を実施した。NF-H および MBP 抗体により、*Kcnj8* 変異体におけるニューロフィラメントネットワーク（NF-H＋領域）および、その髄鞘化（MBP＋領域）の状態を可視化した。取得した画像は、Imaris の Surfaces ツールで解析した。このツールで神経フィラメントネットワーク（NF-H＋領域）とミエリン（MBP＋領域）の 3D 投影を行い、両者の 3D 表面の面積を計算した。さらに、Imaris を用いて NF-H＋染色の上に MBP＋染色をマスクすることにより、両染色の重なり面積を計算した。最後に、Surface ツールでこの重なりの 3D 投影を求め、重なりの面積を計算した。その後、各画像の実際の厚さを再計算し、各画像スタックの先に計算した面積の結果を各スタックの総体積で正規化することで、神経ネットワーク密度と、髄鞘化の程度を野生型マウスと *Kcnj8* 変異マウス間で比較を行った（図 1）。その結果、少なくとも成熟マウスでは神経細胞の形態的異常は認められなかった。

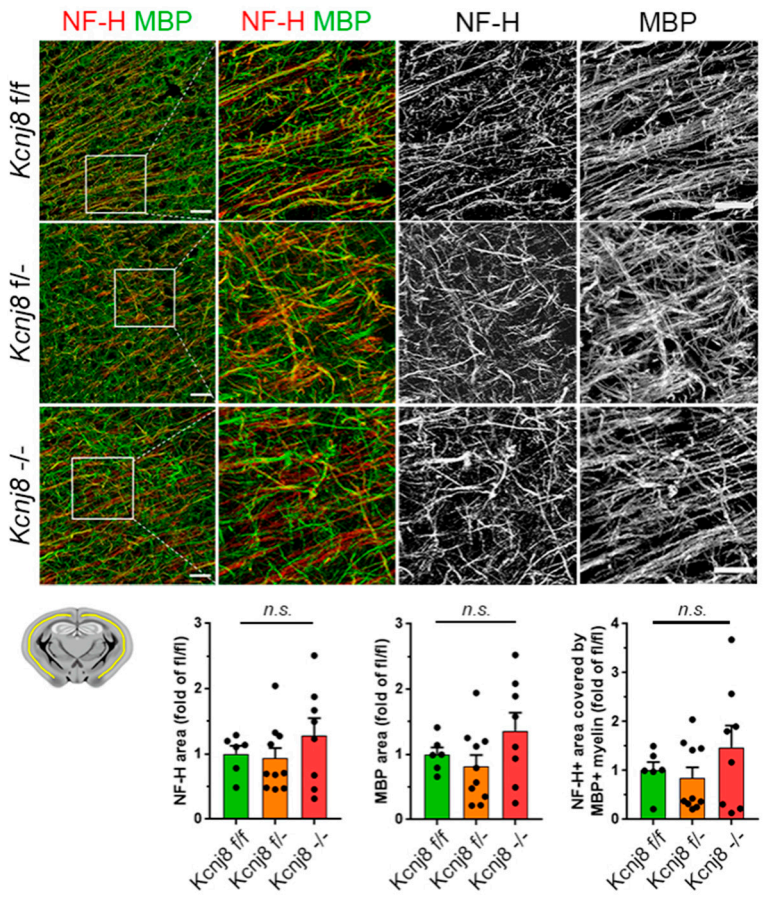


図 1. *Kcnj8* 欠損マウスにおける神経細胞の組織形態学的解析
Kcnj8 コントロールマウス（Kcnj8$^{f/f}$）、Kcnj8 ヘテロ欠損マウス（Kcnj8$^{f/-}$）、
Kcnj8 欠損マウス（Kcnj8$^{-/-}$）の大脳皮質における NF-H、MBP の組織染色像と、
その領域の定量結果（下図）。スケールバー：35 μ m または 20 μ m（拡大像）。

2. *Kcnj8* 欠損マウスにおける神経細胞の機能的解析

次に、*Kcnj8* 欠損マウスの脳内環境の変化の有無を解析するために、血液脳関門・グルコース取り込み・代謝変動などについてそれぞれ解析を行った。まず血管内に注入した蛍光トレーサーの脳実質内への透過性などを指標に血液脳関門の破綻の有無を検証した結果、*Kcnj8* 欠損マウスでは血液脳関門は正常に保たれていた。また、[^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose（FDG）を用いた脳内グルコース取り込み能を検討した結果、こちらも *Kcnj8* 欠損マウスにおいて有意な変動を認めなかった。次に、これまでに *Kcnj8* 欠損マウスでは脳血管平滑筋細胞の分化異常により神経活性依存的な血流上昇が損なわれることを報告してきたことから［2］、より詳細に脳内の代謝環境変化を捉えるために 7T-MRI を用いた MR スペクトロスコピーにより脳内代謝物を測定した。その結果、当初の予想とは異なり、脳全体としては嫌気的代謝の亢進は認められなかった。一方で、神経伝達物質であるグルタミン／グルタミン酸（Glx）や N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（NAAG）が、*Kcnj8* 欠損マウスで減少傾向にあることが分かった（図 2）。次に、神経細胞活性化に与える影響を検討するために、AAV ウイルスを用いてマウス脳神経細胞にカルシウムセンサーである GCaMP7 を発現させ、非麻酔下において神経細胞内カルシウム変化を観察した（図 3）。その結果、1 細胞あたりのカルシウム濃度上昇に有意な差異を認めないものの、*Kcnj8* 欠損マウスでは近接する神経細胞間における同調的なカルシウムの上昇が損なわれる可能性が見出された（図 3）。

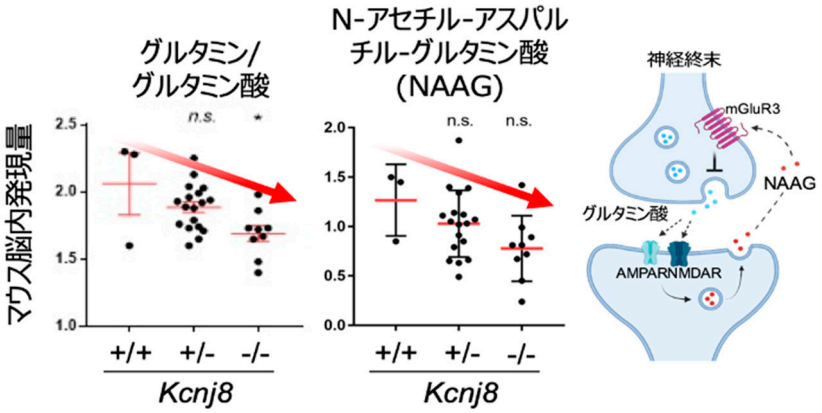


図 2. *Kcnj8* 欠損マウスにおける脳内代謝物変動

7T-MRI を用いた MRS 解析結果。Kcnj8 野生型（$^{+/+}$）、Kcnj8 ヘテロ欠損（$^{-/+}$）、*Kcnj8* 欠損マウス（$^{-/-}$）におけるグルタミン／グルタミン酸（左）、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸（NAAG）（右）の脳内発現量の比較解析。

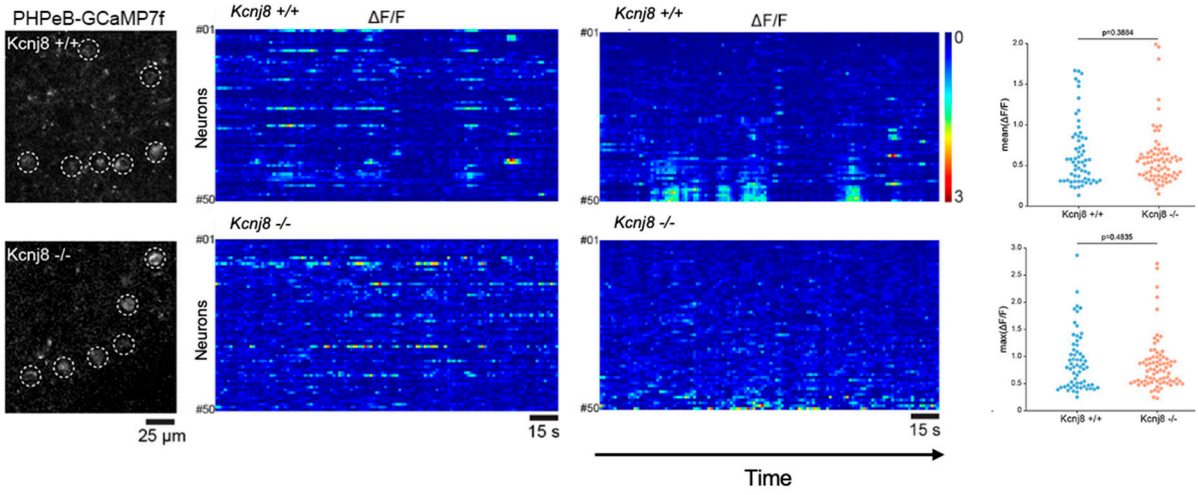


図 3. *Kcnj8* 欠損マウスにおける神経細胞のカルシウム濃度変動

PHPeB GCaMP7f ウイルスによる神経細胞内カルシウムイオン濃度変化のモニタリング。個々のニューロン（各遺伝子型につき 50 細胞）のカルシウム応答（ΔF／F）を、細胞体をカバーする ROI（一番左の画像の丸で囲った領域）の平均強度に基づいて抽出した（左上画像の円）。有意差検定は Student t-test により実施した。

考　察

以上の結果から、*Kcnj8* の欠損マウスでは神経細胞における形態学的な変化を認めなかった。また、血管機能として、脳恒常性維持に必須である血液脳関門の形成やグルコースの取り込みについても顕著な変化は認めなかった。一方で、神経細胞の活動に重要な役割を担うとされるグルタミン／グルタミン酸や NAAG は *Kcnj8* 欠損マウスでは減少傾向にある可能性が示唆された。さらに、今後の詳細な解析が必要であるものの細胞内カルシウム濃度上昇を指標とした個別の神経細胞の活性化を観察すると、細胞あたりのカルシウム上昇能には変化がないものの、近傍の神経細胞間でのカルシウムパターンではその同調性が損なわれている可能性が示唆された。この結果は *Kcnj8* 欠損マウスにおいて認められた神経伝達ペプチドの減少と矛盾しない結果に思われる。これまでに *KCNJ8* や *ABCC9* 遺伝子の機能欠損や活性化型変異、さらに一塩基多型などが、睡眠障害・うつ・認知機能障

害など様々な神経系障害に関わることが報告されている。さらに、最近報告されたアルツハイマー型認知症患者の単一細胞 RNA シークエンス解析から、患者由来のペリサイトでは対照群に比べて *KCNJ8* および *ABCC9* の発現が半減していることが報告された［3］。これらの先行報告を踏まえると、加齢に伴うペリサイト K-ATP チャネルの機能低下が認知症の進行をもたらす可能性があると思われる。特に、認知症ではタウなどの異常タンパク質の蓄積が認められる前に微小血管障害が生じることから、ペリサイト機能異常が最も早期の認知症発症に寄与する可能性が考えられる。従って、ペリサイト K-ATP チャネルによる新規神経活性調節機構を証明し、さらにペリサイト K-ATP チャネルの発現制御機構を明らかにすることが出来れば、認知症発症のイニシエーションに関わる分子基盤の解明や、*KCNJ8* や *ABCC9* 発現の減少などを指標とした認知症の超早期診断による予防法開発などへの貢献が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部の望月直樹部長、日本医科大学先端医学研究所の高野晴子教授、大阪大学大学院医学系研究科生体物理工学講座の齋藤茂芳准教授、エール大学 Jaime Grutzendler 教授、Lei Tong 博士である。

文　献

1） Vanlandewijck M, He L, Mäe MA, Andrae J, Ando K, Del Gaudio F, Nahar K, Lebouvier T, Laviña B, Gouveia L, Sun Y, Raschperger E, Räsänen M, Zarb Y, Mochizuki N, Keller A, Lendahl U, Betsholtz C. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. Nature. 2018 Feb 22;554(7693):475-480. PMID: 29443965. doi: 10.1038/s41586-018-0232-x.

2） Ando K, Tong L, Peng D, Vázquez-Liébanas E, Chiyoda H, He L, Liu J, Kawakami K, Mochizuki N, Fukuhara S, Grutzendler J, Betsholtz C. KCNJ8/ABCC9-containing K-ATP channel modulates brain vascular smooth muscle development and neurovascular coupling. Dev Cell. 2022 Jun 6;57(11):1383-1399.e7. PMID: 35588738. doi: 10.1016/j.devcel.2022.04.019.

3） Yang AC, Vest RT, Kern F, Lee DP, Agam M, Maat CA, Losada PM, Chen MB, Schaum N, Khoury N, Toland A, Calcuttawala K, Shin H, Pálovics R, Shin A, Wang EY, Luo J, Gate D, Schulz-Schaeffer WJ, Chu P, Siegenthaler JA, McNerney MW, Keller A, Wyss-Coray T. A human brain vascular atlas reveals diverse mediators of Alzheimer's risk. Nature. 2022 Mar;603(7903):885-892. PMID: 35165441. doi: 10.1038/s41586-021-04369-3.