

学位論文題名

Neuron-glia interactions during ischemia and reperfusion in neuron/astrocyte co-cultures.

(虚血性病態時におけるニューロン・グリア機能連関と再灌流脳障害に関する研究)

学位論文内容の要旨

興奮性アミノ酸であるグルタミン酸(Glu)は主要な興奮性神経伝達物質の一つであり、神経細胞により放出されたグルタミン酸は、通常神経細胞やアストロサイトに存在するGluトランスポータにより速やかに回収されている。しかし近年、脳虚血のような病態においてはこのGluトランスポータが逆転現象を起こし、細胞外Glu濃度を非生理的な濃度まで上昇させることが虚血性神経細胞死を誘発する主因であると考えられるようになった。本研究室で確立されたニューロンとグリアの2種類の細胞が同時に存在する共培養系を実験対象とし、本研究では、とくに *in vivo* の研究でも神経細胞死の原因であると考えられている、アストロサイトに存在するGluトランスポータのサブタイプであるGLT-1に着目し、虚血時及び再灌流時におけるニューロン・グリア間の機能連関の重要性およびその動作機序を明らかにすることを目的とした。

まず本研究では、脳虚血に関連した現象の一つである脳虚血耐性という現象に着目した。この現象はこれまでに脳や心臓でその存在が報告されており、事前に非致死的な虚血(Preconditioning, PC)を加えられることにより、後の致死的な虚血(Lethal ischemia, LI)に一時的に耐性を持つという現象である。この現象の発現機序の詳細については未だ明らかではないため、本研究ではこれをニューロンとグリアの係わり合いの観点から説明することを目的とした。脳虚血は培養系から酸素とグルコースを除去する oxygen/glucose deprivation (OGD) によって模擬し、まず本共培養系においてPC処置終了24時間後に虚血耐性が発現することを確認した。そこで次に、PC中にGLT-1の阻害薬であるDHKを付加したところ、PC中に見られたGlu濃度上昇は抑制され、虚血耐性は消失した。またPC中にニューロンのNMDA型Glu受容体の阻害薬であるAP5を付加することでも虚血耐性は消失したことから、通常は神経細胞死の原因であると考えられているGLT-1の逆転によるGlu濃度上昇が、死なない程度の短時間であればニューロンのNMDA型受容体の活性化を通して神経細胞の防御機構である虚血耐性の原因にもなっていることが示唆された。そこで次に、PC後には細胞にどのような変化が起きているのかについて解析した。PC処置24時間後の共培養系では、ニューロン自体がGlu毒性に対して強くなっているのではなく、虚血中に放出されてくるGluの量が減少している事を確認した。またGLT-1

のタンパク量を解析したところ、その発現量は PC24 時間後に有意に減少していた。近年の研究により、アストロサイト GLT-1 の発現には PACAP 等のニューロンから放出される物質が必要であることが明らかとなっている。そこで Sham 処置及び PC 処置 24 時間後の 2 種類の培養液上清をアストロサイト培養系に 24 時間負荷し、GLT-1 の発現量を解析したところ、PC 処置後の上清を負荷したものは通常の上清を負荷したものに比べ、60%程度の発現を呈するに止まった。本結果から、PC 処置後にはニューロンから放出される、アストロサイト GLT-1 の発現を促す物質が減少していることが示唆された。PC 処理によりニューロンがアストロサイトの GLT-1 の発現を一時的に減少させ、GLT-1 からの Glu 放出が抑えられることが虚血耐性現象における神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、こうしてニューロンによって GLT-1 が減少させられた状態というのはグリアにとってはどういった意味を持つのかについて解析した。通常 GLT-1 の発現にはニューロンから放出された物質が必要のため、アストロサイトのみでの培養系では殆ど発現が見られないことが知られている。そこで本研究では、アストロサイト培養系に PACAP を付加することで強制的に発現させ、虚血に対する応答について調べた。細胞内  $\text{Na}^+$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の同時蛍光観察により、アストロサイトは虚血中、GLT-1 が存在する場合にはその逆転によって Glu と共に細胞内の  $\text{Na}^+$  を放出することで、過剰な  $\text{Na}^+$  の蓄積により引き起こされるアストロサイト死の原因である細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇を抑えている事を明らかにした。またこの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の抑制は、GLT-1 の阻害薬である DHK の付加により消失した。本結果より、ニューロンにより GLT-1 を減少させられる事はアストロサイトの虚血時の生存に対しては不利になっているということが示唆された。

最後に本研究では、再灌流時には GLT-1 がどのように機能しているのかを検証した。脳梗塞のような虚血性の病態では、虚血後血液の供給が再開することにより、かえって組織の損傷の度合いが増す場合がある。これを再灌流障害という。この障害をモデル化する手段として、*in vitro* において細胞を低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液に短時間曝露後、 $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液でインキュベートするという方法で虚血—再灌流を模擬する  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスという方法が知られている。これまでこの手法による細胞障害はニューロンよりもグリアへ強く作用することが知られており、短時間の低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液によるインキュベーションがアストロサイト細胞内  $\text{Na}^+$  を上昇させ、その結果  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系(NCX)の逆転による  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入が引き細胞死を引き起こすと考えられてきたが、共培養系を用いた本研究により、低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液への曝露によるアストロサイト内  $\text{Na}^+$  上昇は、通常の溶液に戻した後に GLT-1 の逆転による Glu 放出を引き起こし、アストロサイト死よりも先に Glu 毒性によるニューロン死に繋がる事が明らかになった。

以上、本研究によって脳虚血耐性の形成および脳虚血・再灌流障害におけるニューロン・グリア間での機能連関の重要性が明らかとなった。この研究成果は、脳梗塞など虚血・再灌流に起因する脳機能障害に関する新規な機序を明らかにしたものであり、虚血性脳疾患の予後改善など新たな治療法の開発に寄与する重要な知見を与えた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 原 剛 一

副 査 教 授 栗 城 眞 也

副 査 教 授 遠 藤 俊 徳

学 位 論 文 題 名

## Neuron-glia interactions during ischemia and reperfusion in neuron/astrocyte co-cultures.

(虚血性病態時におけるニューロン・グリア機能連関と  
再灌流脳障害に関する研究)

興奮性アミノ酸であるグルタミン酸 (Glu) は主要な興奮性神経伝達物質の一つであり、神経細胞により放出されたグルタミン酸は、通常神経細胞やアストロサイトに存在する Glu トランスポータにより速やかに回収されている。しかし近年、脳虚血のような病態においてはこの Glu トランスポータが逆転現象を起こし、細胞外 Glu 濃度を非生理的な濃度まで上昇させることが虚血性神経細胞死を誘発する主因であると考えられるようになった。本研究で確立されたニューロンとグリアの 2 種類の細胞が同時に存在する共培養系を実験対象とし、本研究では、とくに *in vivo* の研究でも神経細胞死の原因であると考えられている、アストロサイトに存在する Glu トランスポータのサブタイプである GLT-1 に着目し、虚血時及び再灌流時におけるニューロン・グリア間の機能連関の重要性およびその動作機序を明らかにすることを目的とした。

まず本研究では、脳虚血に関連した現象の一つである脳虚血耐性という現象に着目した。この現象はこれまでに脳や心臓でその存在が報告されており、事前に非致命的な虚血 (Preconditioning, PC) を加えられることにより、後の致命的な虚血 (Lethal ischemia, LI) に一時的に耐性を持つという現象である。この現象の発現機序の詳細については未だ明らかではないため、本研究ではこれをニューロンとグリアの係わり合いの観点から説明することを目的とした。脳虚血は培養系から酸素とグルコースを除去する oxygen/glucose deprivation (OGD) によって模擬し、まず本共培養系において PC 処置終了 24 時間後に虚血耐性が発現することを確認した。そこで次に、PC 中に GLT-1 の阻害薬である DHK を付加したところ、PC 中に見られた Glu 濃度上昇は抑制され、虚血耐性は消失した。また PC 中にニューロンの NMDA 型 Glu 受容体の阻害薬である AP5 を付加することでも虚血耐性は消失したことから、通常は神経細胞死の原因であると考えられている GLT-1 の逆転による Glu 濃度上昇が、死なない程度の短時間であればニューロンの NMDA 型受容体の活性化を通して神経細胞の防御機構である虚血耐性の原因にもなっていることが示唆された。そこで次に、PC 後には細胞にどのような変化が起きているのかについて解析した。PC 処置 24 時間後の共培養系では、ニューロン自体が Glu 毒性に対して強く

なっているのではなく、虚血中に放出されてくる Glu の量が減少している事を確認した。また GLT-1 のタンパク量を解析したところ、その発現量は PC24 時間後に有意に減少していた。近年の研究により、アストロサイト GLT-1 の発現には PACAP 等のニューロンから放出される物質が必要であることが明らかとなっている。そこで Sham 処置及び PC 処置 24 時間後の 2 種類の培養液上清をアストロサイト培養系に 24 時間負荷し、GLT-1 の発現量を解析したところ、PC 処置後の上清を負荷したものは通常の上清を負荷したものに比べ、60%程度の発現を呈するに止まった。本結果から、PC 処置後にはニューロンから放出される、アストロサイト GLT-1 の発現を促す物質が減少していることが示唆された。PC 処理によりニューロンがアストロサイトの GLT-1 の発現を一時的に減少させ、GLT-1 からの Glu 放出が抑えられることが虚血耐性現象における神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、こうしてニューロンによって GLT-1 が減少させられた状態というのはグリアにとってはどういった意味を持つのかについて解析した。通常 GLT-1 の発現にはニューロンから放出された物質が必要なため、アストロサイトのみの培養系では殆ど発現が見られないことが知られている。そこで本研究では、アストロサイト培養系に PACAP を付加することで強制的に発現させ、虚血に対する応答について調べた。細胞内  $\text{Na}^+$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の同時蛍光観察により、アストロサイトは虚血中、GLT-1 が存在する場合にはその逆転によって Glu と共に細胞内の  $\text{Na}^+$  を放出することで、過剰な  $\text{Na}^+$  の蓄積により引き起こされるアストロサイト死の原因である細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇を抑えている事を明らかにした。またこの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の抑制は、GLT-1 の阻害薬である DHK の付加により消失した。本結果より、ニューロンにより GLT-1 を減少させられる事はアストロサイトの虚血時の生存に対しては不利になっているということが示唆された。

最後に本研究では、再灌流時には GLT-1 がどのように機能しているのかを検証した。脳梗塞のような虚血性の病態では、虚血後血液の供給が再開することにより、かえって組織の損傷の度合いが増す場合がある。これを再灌流障害という。この障害をモデル化する手段として、*in vitro* において細胞を低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液に短時間曝露後、 $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液でインキュベートするという方法で虚血—再灌流を模擬する  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスという方法が知られている。これまでこの手法による細胞障害はニューロンよりもグリアへ強く作用することが知られており、短時間の低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液によるインキュベーションがアストロサイト細胞内  $\text{Na}^+$  を上昇させ、その結果  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系 (NCX) の逆転による  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入が起き細胞死を引き起こすと考えられてきたが、共培養系を用いた本研究により、低  $\text{Ca}^{2+}$  溶液への曝露によるアストロサイト内  $\text{Na}^+$  上昇は、通常の溶液に戻した後に GLT-1 の逆転による Glu 放出を引き起こし、アストロサイト死よりも先に Glu 毒性によるニューロン死に繋がる事が明らかになった。

これを要するに、著者は、脳虚血耐性の形成および脳虚血・再灌流障害におけるニューロン・グリア間での機能連関の重要性を明らかにしたものであり、脳神経科学および神経情報科学に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (情報科学) の学位を授与される資格あるものと認める。