

学 位 論 文 題 名

虚血・再灌流時におけるアストロサイトの
機能動態変化と細胞外 ATP-プリン受容体
シグナル伝達系に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】 脳を栄養する血管の閉塞や狭窄により血流が途絶すると、数分で細胞代謝活動は停止し、血流停止が持続するとエネルギー貯蔵能力に乏しい神経細胞は死滅して早期の脳機能障害に陥る。また、血流再開によりエネルギー代謝が回復しても、虚血時間や虚血状態（梗塞部位や梗塞範囲）などにより神経細胞の細胞代謝活動が回復せず、遅発性細胞死などが生じる。脳梗塞の治療法としては、早期に血栓部位を治療して血流回復する以外の有効な治療法はなく、血栓溶解剤（t-PA）の臨床使用が海外で行われているが、t-PA の投与により神経細胞が死滅するとの報告もある。したがって、脳虚血性疾患の複雑な発症/治癒メカニズムを解明し、画期的な治療法を探索することは極めて意義のある研究である。

これまでは、神経細胞と共に中枢神経系を構成しているグリア細胞（アストロサイト）は単なる神経細胞の支持体として考えられていた。しかし近年、アストロサイトは脳虚血などの障害時には積極的にその形態・機能を変化させて神経細胞保護作用を示すことが報告されている。具体的には、虚血・再灌流時において、グリア細胞は神経栄養因子を放出して、残存している神経細胞の軸索突起の再伸長などを促すなど、脳内ネットワークの再構築に寄与していることが示唆されているが、形態変化したアストロサイト自身が正常な血管を圧迫して障害をもたらす（再灌流障害）ことも報告されており、詳細は不明な点が多い。中程度の脳虚血後にはアストロサイトが主役となり脳内の環境が改善されるにも関わらず、これまでアストロサイト単層培養系を用いた虚血ストレスへの応答、すなわちアストロサイト自身の虚血・再灌流時の挙動に着目した研究は殆ど行われていない。

【目的】 本研究では、アストロサイトにおける虚血耐性メカニズムの解明を目的とし、特に ATP 感受性プリン受容体（P2Y receptors）を介したシグナル伝達機構の虚血耐性効果の関与について研究を行った。虚血後のアストロサイト間では活発な情報伝達のやり取りがなされているはずであり、それらが広範囲における虚血耐性効果獲得メカニズムに寄与するものと考えた。とりわけアストロサイト間の情報伝達機構である Ca^{2+} waves の dynamics が虚血処置前後で変化する可能性が考えられたので、caged calcium ionophore を用いて Ca^{2+} waves を虚血処置後のアストロサイト培養系において誘導し、その dynamics の変化と虚血耐性との機能連関を検証した。

【結果・考察】 まず、新生児ラット大脳皮質由来アストロサイト培養系に対して、虚血模擬処置である脱酸素・脱グルコース処置（oxygen-glucose deprivation; OGD）を施し、虚血耐性効果の存在を確認し

た。培養系に OGD 処置を行い、通常培養することで再灌流模擬とした。アストロサイトに対しては 4 時間未満の OGD 処置は非致死的な虚血模擬 (sublethal OGD; sOGD) 処置であり、8 時間以上は致死性的であった。また、sOGD 処置を行った 1 日後 (preconditioning; PC 処置) に再び致死的な OGD 処置を行うと、有意に致死性的 OGD による細胞死が抑制された。したがって、アストロサイト培養系において確かに PC 処置により虚血耐性効果が獲得されることがわかった。

アストロサイト培養系に caged calcium ionophore を導入し、紫外光 (350 nm) を局所的に照射することで、目的とする細胞群における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を上昇させることが可能であった。また、“ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇”という情報が、次々と周囲のアストロサイトに伝搬される “ Ca^{2+} waves” が caged calcium ionophore を用いることで非侵襲的に誘導可能であり、非 OGD 処置群では主に細胞内ギャップ結合を介した伝搬経路で伝達することがわかった。一方、sOGD 処置後の再灌流 1 時間 (初期)、再灌流 1 日後 (後期) では、 Ca^{2+} waves の伝搬速度、伝搬距離が非 OGD 処置群よりも有意に亢進していた。sOGD 処置により Ca^{2+} waves が亢進する現象のメカニズムを解明するため、sOGD 処置後に細胞内情報伝搬経路に関連するギャップ結合タンパク質 (connexin 43; Cx43) の発現量、活性化率などを調査したが、sOGD 処置有無群で明確な差は認められなかったことから、細胞内情報伝搬経路の活性化により Ca^{2+} waves が亢進した可能性は低いことが示唆された。そこで、非 OGD 処置群では Ca^{2+} waves の伝搬にあまり関与していない細胞外情報伝搬経路 (ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路) が、sOGD 処置後では活性化 (誘発) する可能性が考えられたので、細胞外 ATP 濃度 ($[\text{ATP}]_o$) ならびに P2Y receptors の発現量を調査した。sOGD 処置直後ならびに再灌流初期では明らかに $[\text{ATP}]_o$ 上昇が認められ、再灌流中に ATP 放出経路の一つである hemichannels を阻害すると、 $[\text{ATP}]_o$ 上昇が抑制された。また sOGD 処置再灌流初期では $\text{P2Y}_1/\text{P2Y}_2$ receptors の発現量ならびに各種拮抗剤に対する感受性は、非 OGD 処置群と比較して有意に増加していた。また P2Y receptors 阻害剤を負荷することで、sOGD 処置再灌流初期における Ca^{2+} waves の亢進は抑制された。以上の結果より、sOGD 処置再灌流初期では ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路が活性化した結果、 Ca^{2+} waves が亢進することがわかった。

最後に OGD 耐性効果獲得メカニズムに ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路の活性化が関与しているかを調査したところ、sOGD 処置再灌流初期においては、ATP-P2Y receptors 伝達経路の下流シグナルである Akt や ERK1/2 が活性化されており、再灌流後期では再灌流初期における ERK1/2 の活性化がもたらす、転写調節因子 c-Fos、c-Jun の発現量が亢進していた。また、P2Y receptors、ERK1/2 阻害剤を sOGD 処置再灌流期間中に負荷したところ、その後の致死的な OGD 処置に対する抵抗性が消失した。

【結語】 アストロサイト自身が OGD 耐性効果を獲得するためには ERK1/2 を介した ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路、すなわち Ca^{2+} waves における細胞外伝搬経路の活性化が必須であり、sOGD 処置後に早期に活性化された ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路により転写調節因子の発現が亢進し、様々な遺伝子発現が変化することが致死的な OGD stress に対する耐性効果に寄与していることを示した。OGD 中の ATP 放出メカニズムならびに OGD 耐性効果に寄与する転写調節因子活性化と新規タンパク質産生との機能連関の解明とが今後に残された重要な課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 原 剛 一
副 査 教 授 遠 藤 俊 徳
副 査 准教授 岡 嶋 孝 治

学 位 論 文 題 名

虚血・再灌流時におけるアストロサイトの 機能動態変化と細胞外 ATP-プリン受容体 シグナル伝達系に関する研究

脳を栄養する血管の閉塞や狭窄により血流が途絶すると、エネルギー貯蔵能力に乏しい神経細胞は死滅して早期の脳機能障害に陥る。血流再開後も虚血時間や虚血状態により神経細胞の細胞代謝活動が回復せず、遅発性細胞死などが生じるため、脳虚血性疾患の複雑な発症/治癒メカニズムを解明し、画期的な治療法を探索することは極めて意義のある研究である。これまでは神経細胞と共に中枢神経系を構成しているグリア細胞（アストロサイト）は単なる支持体として考えられていたが、障害時には積極的にその形態・機能を変化させて神経細胞保護作用を有することが報告されている。中程度の脳虚血後にはアストロサイトが主役となり脳内の環境が改善されるにも関わらず、アストロサイト単層培養系を用いた虚血ストレスへの応答、すなわち虚血・再灌流時の挙動に着目した研究は殆ど行われていない。虚血後は細胞間で活発な情報伝達のやり取りがなされているはずであり、それらが広範囲における虚血耐性効果獲得メカニズムに寄与するものと考え、特にアストロサイト間の情報伝達機構であるカルシウム波の虚血処置後の dynamics の変化と ATP 感受性プリン受容体 (P2Y receptors) を介したシグナル伝達機構の虚血耐性効果の関与について研究を行った。

新生児ラット大脳皮質由来アストロサイト培養系に対して、虚血模擬処置である脱酸素・脱グルコース処置 (oxygen-glucose deprivation; OGD) を施し、通常培養することで再灌流模擬とした。本手法による OGD 処置では、4 時間未満は非致死的な虚血模擬 (sublethal OGD; sOGD) 処置であり、8 時間以上はアストロサイトに対して致死であることがわかった。また、sOGD 処置を行って再灌流した 1 日後 (preconditioning; PC 処置) に、再び致死的な OGD 処置を行うと、PC 処置を施さないアストロサイトと比較して、有意に細胞死が抑制された結果より、PC 処置により虚血耐性効果が獲得されることがわかった。次に虚血処置後のアストロサイト間のカルシウム波の dynamics の変化を検証した。培養系に caged calcium ionophore (caged) を導入し、紫外光 (350 nm) を局所的に照射することで、目的とする細胞内のカルシウムイオン濃度を上

昇させることが可能であった。また、この“カルシウムイオン濃度の上昇”という情報が、周囲のアストロサイトに伝搬される“カルシウム波”が誘導され、非 OGD 処置群では主に細胞内ギャップ結合を介した細胞内伝搬経路で伝達することがわかった。一方、sOGD 処置後の再灌流 1 時間（初期）、再灌流 1 日後（後期）では、カルシウム波の伝搬速度、伝搬距離が非 OGD 処置群よりも有意に亢進していた。sOGD 処置後にギャップ結合タンパク質（connexin 43; Cx43）の発現量や活性化率などを解析したが、明確な差は認められなかった。そこで細胞外伝搬経路（ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路）が、sOGD 処置後では活性化する可能性が考えられたので、細胞外 ATP 濃度（ $[ATP]_o$ ）ならびに P2Y receptors の発現量を解析した。再灌流初期では hemichannels 由来で $[ATP]_o$ は上昇し、P2Y receptors の発現量も有意に増加しており、P2Y receptors 阻害剤を負荷することでカルシウム波の亢進は抑制された。以上の結果より、再灌流初期では細胞内伝搬経路の活性化ではなく、主に ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路が活性化した結果、カルシウム波が亢進することがわかった。加えて再灌流初期において、ATP-P2Y receptors 伝達経路の下流シグナルである Akt や ERK1/2 が活性化されており、再灌流後期では再灌流初期における ERK1/2 の活性化がもたらす、転写調節因子 c-Fos、c-Jun の発現量が亢進していた。また P2Y receptors、ERK1/2 阻害剤を PC 処置後の再灌流期間中に負荷したところ、その後の致死的な OGD 処置に対する抵抗性が消失した。

これを要するに、著者は、アストロサイトが虚血耐性効果を獲得するためには ERK1/2 を介した ATP-P2Y receptors シグナル伝達経路、すなわちカルシウム波における細胞外伝搬経路の活性化が必須であり、sOGD 処置後に早期に活性化された細胞外シグナル伝達経路により転写調節因子の発現が亢進し、様々な遺伝子発現が変化することが、致死的な OGD stress に対する耐性効果に寄与していることなど多くの新知見を得たものであり、生体情報科学とくに細胞情報科学に対して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。