

# 脳虚血神経障害発生メカニズムの解明と光制御の可能性

東北大学大学院 医学系研究科 脳神経科学コアセンター

新医学領域創生分野

松井 広

## 1. はじめに

脳細胞の半数を占めるグリア細胞も神経細胞と同様に、様々な信号を担っており、近年、神経細胞とグリア細胞の間に双方向性の信号伝達が存在することが明らかになってきた<sup>1)</sup>。グリア細胞の信号は、神経活動の状態を左右し、最終的には意識といった脳の高次機能にも影響を与えている可能性がある。しかし、神経とグリアの織り成すネットワーク間の相互作用は、通常の状態では他の作用に埋もれて見出すのは容易ではない。そこで、私たちは、グリアの働きを最大限に引き出すために、虚血といった極端な環境におかれた脳を研究対象とした。脳虚血時には、細胞内アンダーシスやグルタミン酸過剰放出による興奮性神経毒性が生じる。これまで、細胞死へと至る発端となるグルタミン酸の放出を止める手立は考えられておらず、そもそもどの細胞が主要な放出源であるのかすら特定されていなかった。本研究では、脳虚血時にグリア細胞からグルタミン酸が過剰に放出されるメカニズムを明らかにし、グリア細胞内イオン濃度を光操作することで放出そのものを止め、虚血性脳障害を回避させる方法を編み出すことに成功した<sup>2)</sup>。

## 2. 方法

本研究では、脳細胞活動を光を使って自在に操作する手段(光遺伝学;オプトジェネティクス)を通して、脳機能におけるグリア細胞の役割を解明することや、病態時におけるグリア活動の暴走制御を行うことを目指したが、これには、脳細胞に光感受性タンパク質channelrhodopsin-2 (ChR2)を発現する遺伝子配列を組み込んだ遺伝子改変マウスを作製する必要があった。問題は、ひとつのChR2が開いた時のコンダクタンスは、およそ50-250 fSと考えられており、これは、これまで知られている多くのイオンチャンネルのコンダクタンスより2桁以上小さいことである。したがって、ChR2は、細胞に大量に発現させてやらなければ、細胞の活動を思うがままにコントロールすることはできない。そこでKENGE-tetシステムという二種構成のシステムを開発した<sup>3)</sup>。第一種のマウスには、特定の細胞に発現を誘導する遺伝子プロモーターの下流にテトラサイクリントランスアクチベーター(tTA)というタンパク質を発現する遺伝子を組み込んだ。第二種のマウスには、tTAが存在すると初めて発現が強力に誘導されるtetO遺伝子プロモーターを組み込んだ。tetOプロモーターの下流には、ChR2の発現を誘導する遺伝子が続いている。しかし、普通のマウスにはtTAは存在しないので、このマウスではChR2の発現には至らず、野生型と変わらない。第一種と第二種のマウスを掛け合わせると、その子供に両方の外来性遺伝子を併せ持つマウスがある確率で生まれてくる。このマウスで初めて、tTAとtetOが揃うことで、ChR2の発現が誘導されるようになるわけである。

## 3. 結果

上記マウスのうち、グリア細胞の中でもアストロサイト選択的に発現が誘導されるMlc1-tTA::tetO-ChR2マウスを用いて、まず、小脳から急性スライス標本作製し、小脳からの唯一の出力神経細胞であるプルキニエ細胞の電気活動をホールセルパッチクランプ法によって調べた。まず、グリアを光刺激すると、プルキニエ細胞から

はゆっくりとした興奮性の電流が記録されることが分かった。この電流は、グルタミン酸受容体の阻害剤で完全に抑制された。グルタミン酸は神経細胞間のシナプス伝達でも使われる興奮性の伝達物質である。光刺激によって活動したグリアは、グルタミン酸を放出することによって神経細胞の活動を高めていることが分かった。また、神経細胞での小胞の開口放出によるグルタミン酸放出とは異なり、光刺激されたグリアでは陰イオンチャンネルが開き、陰イオンであるグルタミン酸が、細胞質から細胞外へと放出されていることも明らかになった。

なぜグリアのChR2を光刺激すると、陰イオンチャンネルが開いて、グルタミン酸が放出されるのか？神経細胞からのグルタミン酸放出の場合は、細胞内のCa<sup>2+</sup>上昇が引き金となって、シナプス小胞に含まれたグルタミン酸が開口放出されることが知られている。ところが、細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇を強力に緩衝した条件下であっても、グリアのChR2光刺激によってグルタミン酸放出が起きた。ここで、そもそもChR2とは何か、もう一度、振り返ってみた。ChR2とは光に応じて開く、陽イオンチャンネルである。しかし、ChR2を最初に発見した文献を良く読んでみると、ChR2は、陽イオンの中でもH<sup>+</sup>イオンを特に良く通すことが分かった。細胞内と外のpHには大差ないが、細胞内は負の電位に過分極しているため、陽イオンチャンネルが開けば、H<sup>+</sup>イオンは細胞内に流入して、細胞内は酸性化することが予想される。実際に、私たちの実験系でも細胞内pHイメージングを行ったところ、ChR2光刺激に伴い、細胞内が酸性化することが明らかになった。この細胞内酸性化こそが引き金となって、陰イオンチャンネルが開いて、グルタミン酸が細胞外へと放出されるのではないかと考えた。この仮説を検証する手段として、細胞内のpH緩衝能力を操作するという手段をとった。細胞内外のpH緩衝剤として働く炭酸水素ナトリウムを細胞外溶液から抜いて、細胞膜を通過しないHEPESというpH緩衝剤を代わりに用いると、細胞内の炭酸イオンが抜けて、細胞内pH緩衝能力が低くなることが知られている。このようにして、細胞内pH緩衝能力を下げると、ChR2光刺激に伴う細胞内酸性化がより亢進することが確認された。この状況で、グリアから放出されるグルタミン酸をプルキニエ細胞で検出したところ、グルタミン酸応答が大きくなることが明らかになった。神経細胞からのCa<sup>2+</sup>依存性のグルタミン酸放出機構が発見されてから50年以上経つが、ここに新たに、細胞内酸性化が引き金となって、グルタミン酸が放出されるという機構が発見されたのである。

全てのタンパク質は多かれ少なかれpHに影響される。細胞機能はCa<sup>2+</sup>イオン濃度だけでなく、H<sup>+</sup>イオン濃度(=pH)に大きく影響されていても何ら不思議ではなく、細胞内外のpHは刻々と変化していることも知られており、細胞内シグナルとしてpHが重要な役割を果たしていることは想像に難くない。脳においてグリアのpH変化のもたらす作用を明らかにするため、この作用が最も極端に発現する状況へと研究を進めることにした。脳が極端に酸性化する状況としては、脳虚血時が挙げられる。脳への血流が途絶え、酸素と栄養素が不足する脳虚血時には、脳ではグリア細胞の中でもアストロサイトのみに蓄積されているグリコーゲンが、グルコースの代替のエネルギー源となる。しかし、グリコーゲンは乳酸にまで分解されたところで止まり、酸素がないことから代謝回路が働かず、細胞にとって最大のエネルギー源であるATPは合成されない。乳酸が最終産物として大量に蓄積され、乳酸は酸性の物質であることから、アストロサイトの細胞内は酸性化する。乳酸はトランスポーターを介して神経細胞へと運ばれるため、引き続き、神経細胞の酸性化も生じる。このようにして、虚血時に脳内はアシドーシスという極端な酸性化状態へと陥る。一方で、虚血の初期段階では、脳内は過剰なグルタミン酸に晒され、神経細胞は興奮毒性を引き起こすことが知られている。このように虚血時における脳細胞死の発端は、過剰なグルタミン酸であることが明らかであるにも関わらず、どの細胞がどのようにしてグルタミン酸を放出しているのかは突き止められていない。私たちは、アストロサイトが極端に酸性化するために、上記に示したような過程を経て、過剰なグルタミン酸を放出し、神経細胞の興奮毒性を引き起こしている、という仮説を立てた。

もしアストロサイト(グリア細胞)の極端な酸性化と、グルタミン酸の過剰な放出との間に因果関係があるなら、アストロサイトの酸性化を抑えることによって、神経細胞のグルタミン酸毒性を抑えることができるはずである。ここで、もうひとつの光遺伝学ツールを利用することにした。本来、古細菌に発現するアーキオロドプシン(ArchT)

は、黄色い光が照射されると、細胞内から細胞外へとH<sup>+</sup>イオンをくみ出す作用がある。KENGE-tetシステムを使って、ArchTをアストロサイトに発現させたマウスを作製し、細胞内pHイメージングを行ったところ、確かに、光照射に伴い、アストロサイトはアルカリ化した。小脳スライス標本を用いて、灌流液から酸素とグルコースを抜いて虚血状態を模擬すると、アストロサイトは酸性化し、プルキニエ細胞からは大きなグルタミン酸作動性の興奮性電流が流れる。この時、アストロサイトのArchTを光刺激して酸性化を抑えたところ、神経細胞でのグルタミン酸電流が顕著に抑制されることが分かった。続いて、生きたままのマウスにおいて、小脳に人工的に梗塞を作り出すという虚血モデルを作製した。この時、アストロサイトのArchT光刺激を行ったところ、虚血による脳組織の損傷が顕著に抑制されることが分かった。以上の結果から、虚血による神経細胞死の発端は、アストロサイトの酸性化による過剰なグルタミン酸放出であることが明らかになった<sup>2)</sup>。

#### 4. 考察

アストロサイトの酸性化を抑えるだけで、虚血による脳傷害の進行を遅らせることが可能であることが、今回のマウスを用いた実験で分かった。これらの知見を臨床応用するには、例えば、細胞内のpH緩衝能力を強くするような薬物や、細胞内のH<sup>+</sup>イオンを汲み出すトランスポーターを刺激する薬物などを開発して、脳梗塞時に素早く投与するなどの可能性が考えられる。しかし、虚血部位は血流が滞っていることから、肝心の虚血中心部位に上記薬物を到達させることは困難であると予想される。このように、基礎研究から臨床応用へつなげるにはまだまだハードルが高いが、少なくとも、アストロサイトの異常な活動が虚血性脳障害の鍵となっており、その活動さえどうにか制御できれば、脳傷害を抑制することができるということが分かっただけでも大きな前進である。

また、これまで、グリア細胞の一種であるアストロサイトは、活動電位を生じないことから、不活性な細胞であると思われてきた。しかし、私たちの一連の研究を通して、グリアの活動が神経細胞に伝わるということが証明され、グリアの活動は脳の諸機能を理解する上で、無視できない存在であることが明らかになってきた。病態時だけではなく、正常な状態でもグリアは神経細胞の活動に応じて、酸性化やアルカリ化することが知られている。pHに依存したグリアの活動は、脳の恒常性維持機構や、虚血以外の病態時にも、脳内環境を左右する因子となっている可能性が考えられる。今後も光遺伝学によるグリア等の活動操作によって、様々な脳の状態におけるグリア細胞の機能を明らかにしていきたい。本研究を通して得られた知見は、今後、病態時における脳のダメージコントロールや治療だけでなく、学習等における脳機能の充進などにもつながるものと期待される。

#### 5. 参考文献

- 1) Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, **Matsui K**\* (2012) Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 20720-20725. (\* corresponding author)
- 2) Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, **Matsui K**\* (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*, **81**: 314-320. (\* corresponding author)
- 3) Tanaka KF\*, **Matsui K**\*, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A (2012) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Reports*, **2**: 397-406. (\* equal contribution)