

2021年5月20日

お茶の水女子大学

自治医科大学

名古屋市立大学

脳障害からの回復を促進するメカニズムを解明

—脳組織液中のカリウムイオン濃度の正常化が鍵—

要旨

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系の毛内 祐 助教（理化学研究所（理研）脳神経科学研究センター客員研究員）、神経グリア回路研究チームの平瀬 肇 チームリーダー（研究当時、現コペンハーゲン大学教授）、自治医科大学の篠原良章 教授らの国際研究グループ^{*}は、マウスを用いた研究により、高カリウムが誘発する急性脳機能不全（**皮質拡張性抑制**）からの回復が、アドレナリン受容体遮断薬^[1]によって促進することを発見しました。皮質拡張性抑制は、脳卒中や片頭痛に代表されるさまざまな脳障害に伴う現象であり、本研究成果は、脳機能回復を支援する治療法の開発に貢献すると期待されます。

正常な脳活動には、脳組織液中のカリウムイオン（細胞外 K^+ ）濃度が、細胞内よりも数十倍低く保たれている必要があります。ところが、脳卒中などの脳障害によって急激な細胞外 K^+ 濃度の上昇が引き起こされると、障害部位からは次々と細胞外 K^+ 濃度上昇を誘発する異常興奮の波が発生し、やがて大脳皮質全体に伝播します。この波が去った後の脳組織では、長期にわたる脳機能不全が引き起こされます。脳には、このような機能不全から自力で回復する仕組みが備わっており、脳組織液中の K^+ 濃度の正常化がその鍵を握っていると考えられます。しかしながら、薬剤投与などによって脳組織液中の K^+ 濃度を正常化するという観点から、急性脳機能不全からの回復法を検討した研究はされていませんでした。

理研の神経グリア回路研究チームはこれまで、光血栓法^[2]と呼ばれる方法で作製した脳卒中モデルマウスにおいて、アドレナリン受容体遮断薬が、脳損傷を軽減する現象を報告してきました^{注1)}。また、そのメカニズムの一端として、細胞外 K^+ の排出（クリアランス）機構の促進を指摘してきました。今回、国際共同研究グループは、アドレナリン受容体遮断薬が一般的な脳障害からの回復にも有効かどうかを検討するために、さまざまな脳障害に共通して生じる皮質拡張性抑制からの神経活動の回復を評価しました。神経活動の指標である脳の電気的な活動と同時に脳組織中の細胞外 K^+ 濃度を直接測定した結果、急上昇した細胞外 K^+ 濃度が徐々に正常化するにつれて、神経活動も回復していきました。一方、遮断薬の投与によって、細胞外 K^+ 濃度の正常化が促進し、それに伴い神経活動の回復も有意に早まることを見いだしました。さらに、神経活動の回復には、脳細胞の一種であるアストロサイト^[3]の細胞内 Ca^{2+} 上昇が、重要な働きを担うことを見いだしました。これらの結果から、アドレナリン受容体遮断薬による脳機能回復の促進が、アストロサイトの Ca^{2+} 上昇とは独立している機序に基づくことが示唆されます。

研究成果は、英国の総合科学雑誌『Scientific Reports』のオンライン版（4月14日付）に掲載されました。

注1) 2019年5月20日プレスリリース「[クリアランスによる脳卒中後の損傷拡大の抑制－脳内の水の動きが鍵－](#)」

※国際共同研究グループ

お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系

助教 毛内 拓（もうない ひろむ）

（理化学研究所 脳神経科学研究センター 客員研究員）

University of Copenhagen Center for Translational Neuromedicine

教授 平瀬 肇（ひらせ はじめ）

（理化学研究所 脳神経科学研究センター 神経グリア回路研究チーム チームリーダー）

自治医科大学 医学部

教授 篠原 良章（しのはら よしあき）

名古屋市立大学大学院医学研究科

大学院生 額額 真之介（こうけつ しんのすけ）

教授 植木 孝俊（うえき たかとし）

コペンハーゲン大学

大学院生 ペーター・クスク（Peter Kusk）

大学院生 ナタリー・ハウグルン（Natalie L Hauglund）

研究員 アンドリュー・サムソン（Andrew J Samson）

ロチェスター大学メディカルセンター

教授 マイケン・ネーダーガード（Maiken Nedergaard）

※研究支援

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科学研究費補助金若手研究「脳梗塞によって脳の水チャネル分子アクアポリン4の局在が変化する機序の解明（研究代表者：毛内拓）」、若手研究「脳のクリアランス促進による恒常性維持機構の解明（研究代表者：毛内拓）」、基盤研究B「超高速イメージング技術で海馬から皮質への記憶転送を観察する（研究代表者：篠原良章）」、基盤研究A「グリア細胞により支援される皮質神経回路の可塑性（研究代表者：平瀬肇）」、新学術領域「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態（領域代表者：池中一裕）」の「生体内で起こる皮質回路シナプス可塑性におけるアストロサイトの役割（研究代表者：平瀬肇）」、新学術領域「脳情報動態を規定する多領域連関と並列処理（領域代表者：尾藤晴彦）」の「神経修飾物質による皮質アストロサイトの中長期的な活動観測と機能的意義の解明（研究代表者：平瀬肇）」、ヒューマン・フロンティア・サイエンス（研究代表者：平瀬肇）、平成30年度研究拠点形成事業（A 先端拠点形成型）「階層横断的グリア脳科学研究のための国際コンソーシアム拠点形成（拠

点代表者：和氣弘明)」、日本医療研究開発機構 (AMED) 戦略推進部 (脳と心の研究課) 革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト (Brain/minds 革新脳) の「アデノ随伴ウイルスベクターを用いた生体マウス中脳神経系の細胞種特異的遺伝子ノックダウン/ノックアウト法の開発 (研究代表者：平井宏和)」、Adelson 医学研究財団 (研究代表者：マイケン・ネーダーガード)、Lundbeck foundation (研究代表者マイケン：ネーダーガード、平瀬肇)、Novo Nordisk Foundation (研究代表者マイケン：ネーダーガード、平瀬肇)、米国国防総省 (研究代表者マイケン：ネーダーガード) による支援を受けて行われました。

背景

正常な脳活動には、脳細胞の隙間を満たす組織液中のカリウムイオン (細胞外 K^+) 濃度が、細胞内よりも数十倍低く保たれている必要があります。一方、脳卒中や片頭痛に代表される脳障害に伴って、細胞外 K^+ 濃度が急上昇すると、障害部位からは次々と細胞外 K^+ 濃度上昇を誘発する異常興奮の波が発生し、やがて大脳皮質全体に伝播します。この波が去った後の脳組織では、長期にわたる脳機能不全が引き起こされます。このような急性の脳機能不全は、皮質拡張性抑制と呼ばれています。この状態では、ニューロンは電気的な活動を継続できなくなり、神経活動が長期にわたって抑制され、ひいては脳組織の壊死につながります。この異常興奮の波は、障害部位だけでなく健康な脳部位まで影響が及ぶことが知られており、これが脳損傷拡大の一因となると考えられています。この現象は、外傷性脳損傷や、てんかんとも関係することが示唆されており、皮質拡張性抑制からの回復が病気の予後と関連すると考えられます。

一方、脳には一般的に、脳内環境を一定に保とうとする恒常性維持の仕組みがあり、このような抑制状態から自力で回復する仕組みが備わっています。脳障害からの回復の場合は、脳組織中の細胞外 K^+ 濃度の正常化が重要な役割を担っていると考えられます。しかしながら、脳組織液中の細胞外 K^+ 濃度を正常化するという観点から、皮質拡張性抑制からの回復を検討した薬剤投与などの方法は、研究されていませんでした。

平瀬チームリーダーらはこれまで、光血栓法によって作製した脳卒中モデルマウスにおいて、アドレナリン受容体遮断薬が、脳卒中後の脳損傷を軽減する現象を報告してきました。また、そのメカニズムの一端として、細胞外 K^+ の排出 (クリアランス) 機構の促進を指摘してきました。今回、国際共同研究グループは、アドレナリン受容体遮断薬が一般的な脳障害からの回復にも有効かどうかを検討するために、さまざまな脳障害に共通して生じる皮質拡張性抑制からの神経活動の回復を評価しました。

研究手法と成果

国際共同研究グループは、さまざまな脳障害の共通の原因の一つと考えられる高濃度の K^+ を含む溶液を直接脳表面に滴下し、10 分間作用させたのちに生理食塩水で洗浄し、その後の脳活動の回復を評価しました。脳細胞は、活動に伴って細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) が顕著に増加する性質を持つため、 Ca^{2+} を指標として細胞の活動を評価することができます。細胞内で Ca^{2+} 上昇を検知すると、光の強度が変化する Ca^{2+} センサータンパク質 (G-CaMP7) を脳細胞に組み込んだ遺伝子改変マウス (G7NG817 系統) を利用して、広域な脳活動を頭蓋骨越しに可視化し、高速カメラで撮影しました (経頭蓋マクロイメージング)。

麻酔下マウスの頭蓋骨の一部に小さな穴を開け、高濃度のカリウム溶液を滴下するとその直後から脳活動の異常興奮が拡大し、波のように伝播していく様子が観測されました (図 1)。この波は、穴を開けた側の脳半球全体にわたって広がりましたが、反対側の脳半球には広がらなかった。広がる速度は、一

分間あたり 4 mm 程度でした。マウス的大脑皮質の前後の長さが約 10 mm であることを考えると、この波の伝わる速度は、脳信号伝達に比べて非常にゆっくりとしたものであることがわかります。また、10 分間にこの波が複数回現れた例もありました。

この異常興奮の波が去ってから、抑制されていた神経活動が正常に戻るまでの時間を測定したところ、およそ 60 分を要することがわかりました。アドレナリン受容体遮断薬を投与した場合も、カリウム溶液の滴下によって同様の異常興奮の波が観測されました。一方、カリウム溶液を作用させている 10 分間の間に波が出現する頻度は、有意に減少しました。複数の波が生じる場合でも、一回目の波と二回目の波の発生の間隔が広まっていました。さらに、アドレナリン受容体遮断薬を投与した場合、皮質拡張性抑制からの回復に要する時間は、通常 60 分程度のところ 30 分程度へと短縮され、回復が促進することがわかりました (図 2)。

次に、アドレナリン受容体遮断薬が皮質拡張性抑制からの回復を促進する仕組みを解明するために、脳細胞中でも、脳内環境を維持する役割を持つアストロサイトの活動に注目しました。高濃度のカリウム溶液の滴下後、異常興奮の波が去った直後から複数のアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} が異常に高い頻度で上昇しました (図 3)。一方、アドレナリン受容体遮断薬を作用させた結果、このような異常な Ca^{2+} 上昇は、ほとんど見られなくなりました。これらの結果は、異常なアストロサイトの Ca^{2+} 上昇が、神経活動回復の妨げとなっている可能性を示唆しています。では、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇そのものを抑制すると回復が早まるのでしょうか。

アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇と皮質拡張性抑制からの回復との関係を調べるために、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇に関与するタンパク質 (2 型イノシトール三リン酸受容体) を生まれつき欠損した遺伝子組換えマウス (2 型 IP_3 受容体を欠損したマウス) を利用しました。このマウスでは、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇が抑制されています。2 型 IP_3 受容体を欠損したマウスと G7NG817 系統マウスを掛け合わせたマウスにおいても、カリウム溶液滴下によって、同様の Ca^{2+} 波が観測されました。アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇が抑制された状態においても、波の伝播の速さなどの性質には目立った変化は見られませんでした。一方、2 型 IP_3 受容体を欠損したマウスでは、皮質拡張性抑制からの回復が大幅に遅くなることがわかりました (図 4)。

神経活動の回復を評価するために、マウスのヒゲに空気を当てた際に生じる大腦皮質バレル野の神経活動を測定しました。遺伝子に変異のない野生型マウスでは、脳障害後のヒゲ刺激に対する応答性の回復に 1 時間程度要するのに対して、2 型 IP_3 受容体を欠損したマウスでは、3 時間以上経っても完全に回復することがありませんでした。この結果は、皮質拡張性抑制からの回復には、アストロサイトの Ca^{2+} 上昇が重要な働きをしていることを示唆しています。また、驚いたことに、この 2 型 IP_3 受容体を欠損したマウスにアドレナリン受容体遮断薬を投与した場合にも、野生型マウスと同程度の回復促進効果が得られました (図 5)。

最後に、研究グループは、皮質拡張性抑制からの回復のメカニズムについて、脳組織液中の細胞外 K^+ 濃度に着目した解析を行いました (図 6)。神経活動と同時に脳組織液中の細胞外 K^+ 濃度を直接測定した結果、カリウム溶液の滴下後、組織液中の K^+ 濃度が急上昇していました。細胞外 K^+ 濃度が正常化するにつれて、徐々に神経活動も回復していきました。アドレナリン受容体遮断薬を投与した場合は、細胞外 K^+ 濃度の正常化が促進されており、神経活動の回復も加速しました。一方、2 型 IP_3 受容体を欠損したマウスでは、細胞外 K^+ 濃度の正常化が顕著にゆっくりになっていたことから、アドレナリン受容体遮断薬による脳機能回復の促進は、アストロサイトの Ca^{2+} 上昇とは独立している機序に基づくことが示唆されます。以上の結果から、皮質拡張性抑制からの回復には、組織液中の細胞外 K^+ 濃度の正常化が重要であり、アドレナリン受容体遮断薬による神経機能の回復の効果は、細胞外 K^+ 濃度の正常化を促進した結果

であることが示唆されます。

今後の期待

本研究成果は、脳卒中や外傷性脳損傷、てんかんや片頭痛などのさまざまな脳障害の後に、脳が自力で機能回復するメカニズムを支援することによる新たな治療法の開発に貢献すると期待されます。

原著論文情報

Hiromu Monai, Shinnosuke Koketsu, Yoshiaki Shinohara, Takatoshi Ueki, Peter Kusk, Natalie L. Hauglund, Andrew J. Samson, Maiken Nedergaard & Hajime Hirase, Adrenergic inhibition facilitates normalization of extracellular potassium after cortical spreading depolarization. *Sci Rep* 11, 8150 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87609-w>

発表者

お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系 助教

毛内 拓 (もうない ひろむ)

Tel: 03-5978-5303 / Fax: 03-5978-5303

E-mail : monai.hiromu@ocha.ac.jp

University of Copenhagen Center for Translational Neuromedicine

教授 平瀬 肇 (ひらせ はじめ)

自治医科大学 医学部

教授 篠原 良章 (しのはら よしあき)



毛内拓 助教

補足説明

1. アドレナリン受容体遮断薬

神経伝達物質の一種であるノルアドレナリンを受け取る受容体の働きを阻害する。ブロッカーとも。脳のアドレナリン受容体は、ノルアドレナリンにより活性化され、注意や覚醒などに影響する。

2. 光血栓法

ローズベンガル色素を血中に導入した状態で、緑色光を照射することにより血栓を生じさせ、局所的な脳梗塞を誘導する方法。

3. アストロサイト

脳を構成するグリア細胞の一種。血管と直接の相互作用を持ち、ニューロンへのエネルギー供給や組織液中の K^+ 濃度を一定に保つなど、脳内環境の恒常性維持を担うことが知られている。

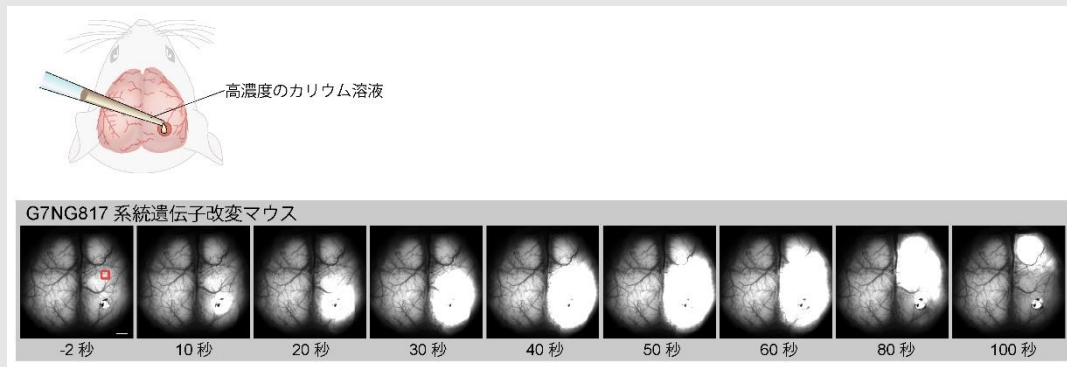


図 1 高カリウムが誘導する異常興奮の波の経頭蓋マクロイメージングによる可視化

(上) 麻酔下 G7NG817 系統遺伝子改変マウスの右側の頭蓋骨に小さな穴を開け、高濃度のカリウム溶液を滴下した。

(下) その後、異常興奮に伴う Ca^{2+} 波が大腦皮質の上を伝播する様子を、蛍光実体顕微鏡で観察し、高速カメラで記録した。滴下した瞬間を 0 秒とした。画像の白い部分が、異常興奮を起こしている部位を表している。画像は、マウスの脳を頭蓋骨越しに上から見た様子で、黒い線は脳表に走っている血管を表している。右脳と左脳が両方見えている。画面の大きさは 10 mm。

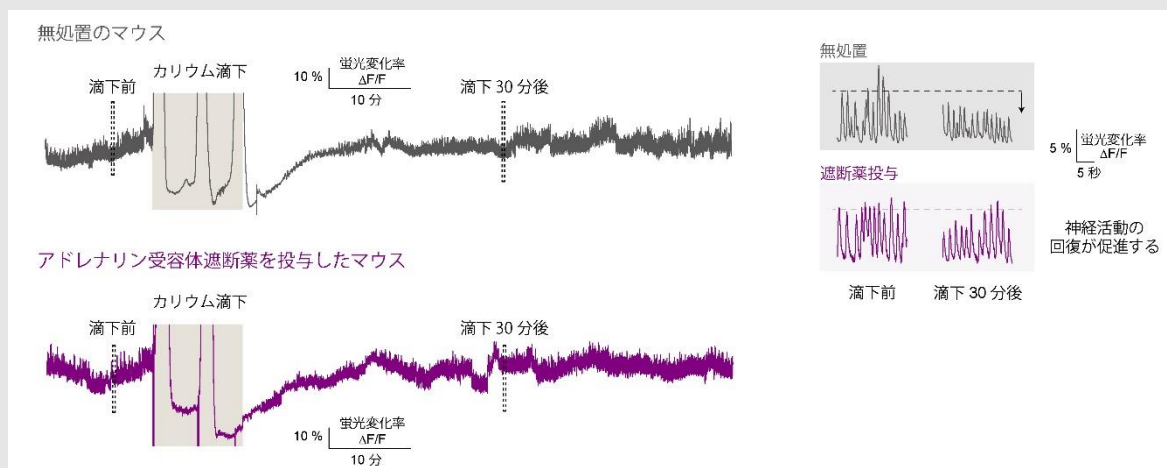


図 2 アドレナリン受容体遮断薬による皮質拡張性抑制からの回復促進効果

(左) 図 1 の -2 秒の時点において赤で示した部分の平均輝度変化率の時間変化を示している。麻酔下 G7NG817 系統遺伝子改変マウスの大腦皮質は、自発的に 0.5-2 Hz 程度の周期的な神経活動を示す。カリウム滴下中は、異常興奮の波が 1 から複数回出現する。10 分後カリウムを除去した後の自発的な神経活動は、抑制されており振幅が小さくなるが、時間と共に徐々に回復する。一方、アドレナリン受容体遮断薬をあらかじめ作用させておいた場合は、回復が促進する効果が得られた。

(右) 無処置と遮断薬を投与した場合の、カリウム滴下後 30 分後の自発的活動の振幅を拡大して表示した。遮断薬を投与した場合は、神経活動の回復が有意に促進した。

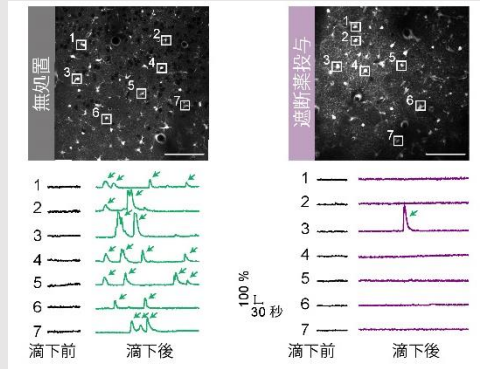


図3 異常興奮の波が去った後に出現する異常なアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇

(左) 麻酔下 G7NG817 マウス的大脑皮質の脳表から約 200 μm の深さでアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇を測定した。アストロサイトを7つランダムに選択し、アストロサイトの細胞体における Ca^{2+} 上昇の蛍光変化率の時間変化をそれぞれの細胞についてプロットした。カリウム滴下後、異常興奮の波が去った後に観測された異常な Ca^{2+} 上昇を矢印で示した。

(右) 遮断薬をあらかじめ投与した場合は、異常な Ca^{2+} 上昇が発生する頻度は有意に減少した。

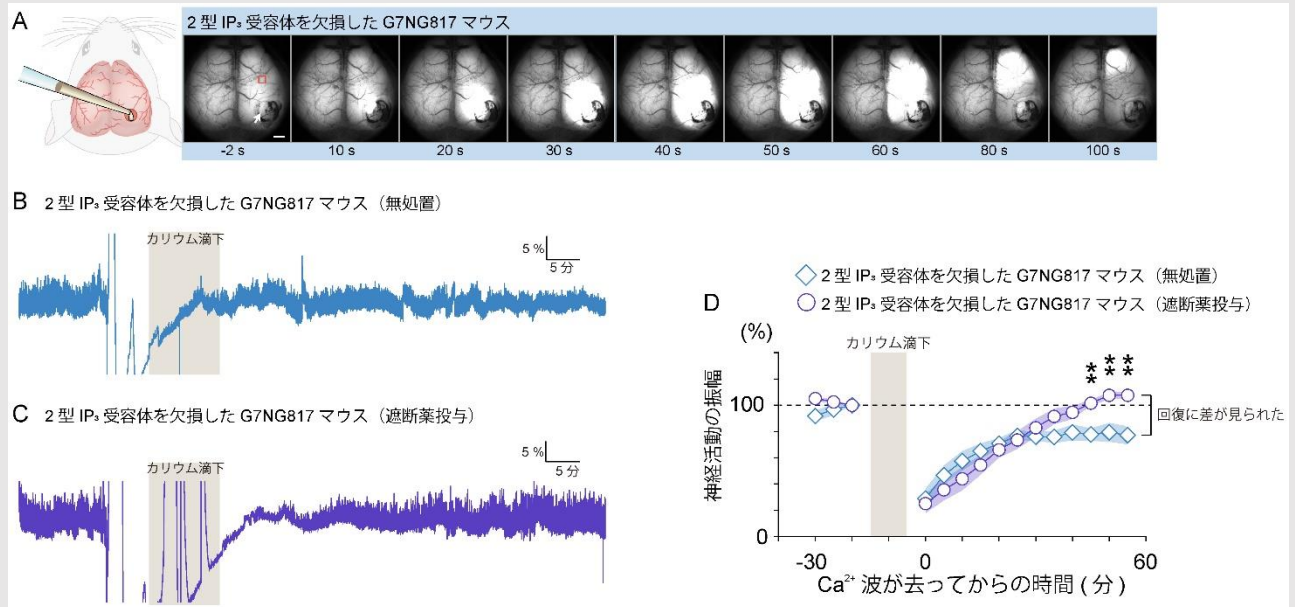


図4 2型 IP_3 受容体を欠損した G7NG817 マウスにおける経頭蓋マクロイメージング

(A) 2型 IP_3 受容体を欠損した G7NG817 マウスにおいて、図1と同様に頭蓋骨に穴を開け、高濃度のカリウム溶液を滴下したところ、野生型とほぼ同様の性質の Ca^{2+} 波が観測された。

(B) 2型 IP_3 受容体を欠損した G7NG817 マウス（無処置）における、蛍光変化率の時間変化。

(C) 2型 IP_3 受容体を欠損した G7NG817 マウスにあらかじめアドレナリン受容体遮断薬を投与した場合における、蛍光変化率の時間変化。

(D) 10分おきに神経活動の振幅の平均を計算し、その時間変化をプロットした。野生型の場合と同様、アドレナリン受容体遮断薬を投与した場合では、回復促進効果がみられた。**は統計的に有意な差が見られるポイントを示している。

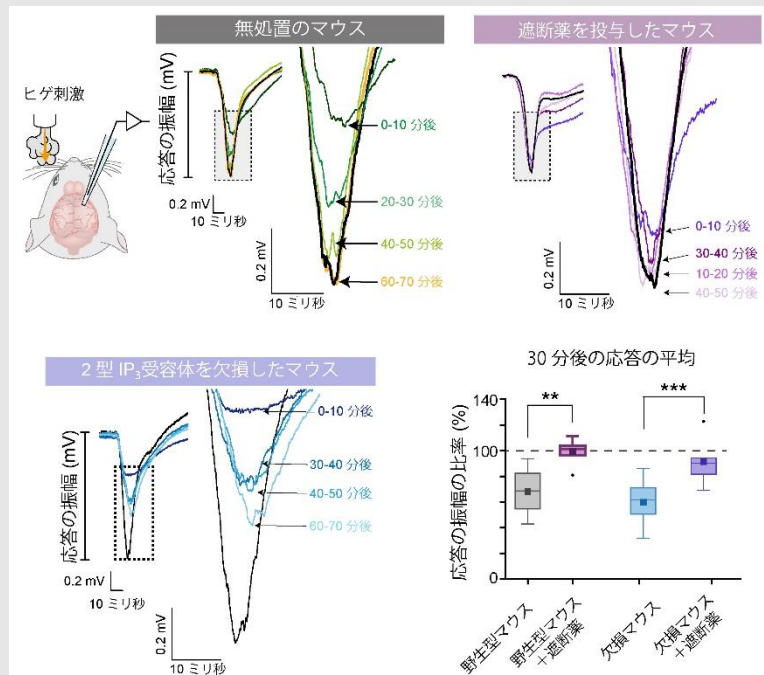


図5 アドレナリン受容体遮断薬による、ヒゲ刺激に対する応答の回復促進効果

麻酔下のマウスのヒゲを空気で刺激した際に見られる大脳皮質の神経細胞の電氣的応答の変化を記録した。カリウム溶液を滴下する前の応答の平均値を黒線で示し、10分間作用させた後にカリウム溶液を取り除いた後の応答の平均値を色別に示した。カリウム除去後、30分後における応答の振幅の平均値を比較した。**や***は統計的に有意な差があることを示している。

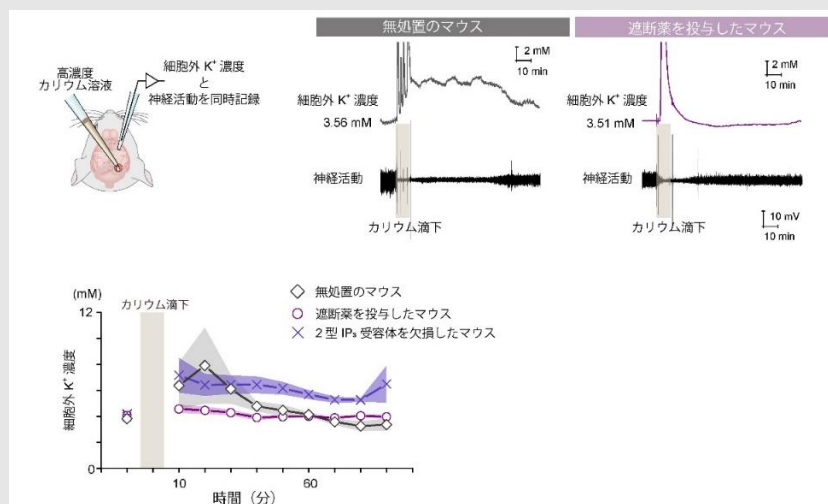


図6 アドレナリン受容体遮断薬による、細胞外 K⁺濃度正常化の促進効果

麻酔下のマウスより、イオン選択的微小電極法を用いて細胞外 K⁺濃度と神経活動を同時記録した。カリウム溶液を滴下するための穴と、記録のための穴は2 mm 程度離して作製した。通常、細胞外 K⁺濃度は3.5 mM (モーラー) 程度に保たれているが、カリウム溶液を滴下すると異常興奮の波によって細胞外 K⁺濃度が急上昇する。カリウム溶液除去後も細胞外 K⁺が高い状態が持続するため、神経活動は長時間抑制される。細胞外 K⁺が正常に戻るにつれて徐々に神経活動が回復する。一方、アドレナリン受容体遮断薬を投与した場合は、細胞外 K⁺濃度の正常化が促進し、神経活動の回復も加速した。2型 IP₃ 受容体を欠損したマウスでは、細胞外 K⁺の正常化が遅延していた。