

血管性認知障害における
グリア細胞の病態生理学的役割の解明

2022

抱 将史

目次

緒言	1
第1章 加齢に伴う認知機能低下における TRPM2 の役割	3
実験方法	4
実験結果	6
考察	9
第2章 血管性認知障害におけるミクログリアの役割	13
実験方法	13
実験結果	14
考察	16
第3章 血管性認知障害におけるアストロサイトの TRPA1 による保護機能	18
実験方法	18
実験結果	24
考察	38
総括および結論	45
謝辞	46
発表論文目録	47
参考文献	48

緒言

認知症や加齢に伴う認知機能低下は超高齢社会の現代において増加の一途を辿っており、精力的に取り組むべき喫緊の課題となっているものの、その創薬開発の多くは難航している。軽度認知障害からアルツハイマー病や血管性認知症を含む様々な認知症において、血管病変に起因する血管性認知障害が認められる。血管性認知障害は、加齢や生活習慣病などに伴い認められる慢性的な脳血流の低下 (慢性脳低灌流) がリスク因子として挙げられる。近年、アルツハイマー病患者において、認知機能障害、アミロイド β の蓄積、タウの異常リン酸化などのあらゆる症状に先行して、血管病変が認められることが報告されている。さらに、慢性脳低灌流状態や生活習慣病を改善することで認知機能が改善されることも示唆されている。これらの報告より、血管病変や加齢に起因する血管性認知障害は認知症の治療を目指す上で無視することのできない病態と考えられるようになってきたものの、その詳細な病態メカニズムは明らかにされておらず、認知症の根本的治療法開発が難航している一因となっている。

血管性認知障害の特徴的な所見として、神経細胞傷害に先行した白質傷害や中枢神経系 (CNS) 炎症が認められ、さらにミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞が活性化することが知られている。しかしこれらグリア細胞が白質傷害を伴う血管性認知障害にどのような病態生理学的役割を担っているかは十分に明らかにされておらず、またどのような刺激に対してどの制御分子が機能しているかについても不明な点が多い。

Transient receptor potential (TRP) チャネルは非選択的のカチオンチャネルの一群であり、その一部は脳内でグリア細胞に広く分布し、CNS 炎症や活性酸素種 (ROS) などを感知することが知られている。その中でも TRPM2 は脳内のミクログリアを含むさまざまな免疫担当細胞に発現し、CNS 炎症や ROS により活性化される。また、TRPA1 は TRP チャネルファミリーの中でも最も酸化ストレスに感受性があり、脳内ではアストロサイトなどに発現し微小な低酸素を検知し応答する。そこで本研究では、血管性認知障害の病態メカニズムを明らかにするため、第 1 章では加齢に伴う認知機能低下におけるミクログリアに発現する TRPM2 に着目し、第 2 章では慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害におけるミクログリアの寄与に着目し、第 3 章では慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害におけるアストロサイトの TRPA1 に着目し、グリア細胞の病態生理学的役割とその制御分子としての TRP チャネルの機能について検討を行い、以下の知見を得た。

第 1 章では、加齢に伴う認知機能低下に TRPM2 が関与することを明らかにした。第 2 章では、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害の病態増悪にミクログリアが寄与していることを明らかにした。第 3 章では、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害に対して、アストロサイトの TRPA1 を介した LIF の増加により、ミエリン化が促進されることで保護的に機能していることを明らかにした。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ADP	adenosinediphosphate	NeuN	neuronal nuclei
ACSA-2	astrocyte cell surface antigen-2	NLRT	Novel location recognition test
Aldh1l1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member 1	NORT	Novel object recognition test
ANOVA	analysis of variance	OL	oligodendrocyte
APC	adenomatous polyposis coli	OLIG2	oligodendrocyte transcription factor 2
BAPTA-AM	1,2-bis(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic tetrakis(acetoxymethyl) ester	OPC	oligodendrocyte precursor cell
BBB	blood-brain barrier	PBS	phosphate-buffered saline
BCAS	bilateral common carotid artery stenosis	PDGF-AA	platelet-derived growth factor-AA
CA	cinnamaldehyde	PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α
CCL	C-C motif chemokine ligand	PFA	paraformaldehyde
CNS	central nervous system	pFRG	parafacial respiratory group
CNTF	ciliary neurotrophic factor	PKA	protein kinase A
CSF1R	colony-stimulating factor 1 receptor	PKC	protein kinase C
DI	discrimination index	RNaseq	RNA sequencing
ERK	extracellular signal-regulated kinase	ROS	reactive oxygen species
FGF	fibroblast growth factor	RTN	retrotrapezoid nucleus
GFAP	glial fibrillary acidic protein	SOX10	SRY-box transcription factor 10
GO	Gene Ontology	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
GST-pi	glutathione S-transferase Pi	Tek	TEK receptor tyrosine kinase
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1	TNF α	tumor necrosis factor α
IL1 β	interleukin 1 β	TRP	Transient receptor potential
IL6	interleukin 6	TRPA1	Transient receptor potential ankyrin 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase	TRPA1-KO	Transient receptor potential ankyrin 1-knock out
LIF	leukemia inhibitory factor	TRPM2	Transient receptor potential melastatin 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase	TRPM2-KO	Transient receptor potential melastatin 2-knock out
MBP	myelin basic protein	WT	wild-type
mRNA	messenger ribonucleic acid		

第1章 加齢に伴う認知機能低下における TRPM2 の役割

加齢は、時間依存的な心機能、腎機能、認知機能、免疫機能の低下として広く定義されている^{1,2}。加齢に伴う認知機能低下は、高齢者本人だけでなく、家族や介護者にも社会的・経済的な影響を与えるという点で、最も重要な課題の1つに挙げられる³。さらに、加齢に伴う認知機能低下は、アルツハイマー病や血管性認知症など、より深刻な加齢性疾患を伴っていることが多い⁴。

加齢に伴う血管疾患は、炎症反応の変化、特に炎症性サイトカインの産生増加と関連することが示唆されている^{5,6}。マウス⁷およびヒト⁸において、持続的に脳血流が低下した慢性脳低灌流により誘発される認知機能障害が炎症と高度に関連することが過去の報告により示されている。さらに、抗炎症剤はラットの血管性認知障害モデルにおける認知機能障害を軽減し⁹、アルツハイマー病の発症率も低下させる¹⁰ことも報告されている。

最近の研究では、明らかな神経変性疾患のない正常な老化の過程でも、炎症反応が増加することが示唆されている¹¹。齧歯類^{12,13}およびヒト¹⁴の老化組織で炎症性因子の遺伝子発現の増加が観察されている。さらに、イブプロフェンの亜急性投与により、高齢マウスのシナプス障害および認知機能低下が抑制されることから¹⁵、炎症応答を調節することで加齢に伴う認知機能低下を阻止できる可能性が示されている。

ミクログリアは中枢神経系 (CNS) に存在する免疫細胞である¹⁶。高齢のヒトの脳では、ミクログリアの退行変性が認められることが報告されている¹⁷。コロニー刺激因子1受容体阻害薬である PLX5622 によるミクログリア除去後の再増殖によって、若齢マウスのミクログリアと類似した形態に回復させ、加齢に伴う認知機能低下を改善する¹⁸。これらの報告は、ミクログリアの機能変化が加齢に伴う病態に重要な役割を果たすことを示唆している。

TRPM2 は TRP スーパーファミリーに属し、C 末端に特徴的な ADP リボースピロホスファターゼドメインを持つ Ca²⁺透過性チャネルである¹⁹。TRPM2 は、CNS では神経細胞²⁰やミクログリア^{21,22}、末梢では免疫細胞である単球/マクロファージ²³や好中球²⁴などに機能的に発現している。また TRPM2 は、単球/マクロファージによる炎症性サイトカイン/ケモカインの産生を介して、潰瘍性大腸炎²³や神経障害性疼痛²⁵などの炎症関連疾患の増悪に関与することが知られている。さらに TRPM2 は、アルツハイマー病マウスモデルにおいて、アミロイドβによる神経細胞毒性や記憶障害に重要な役割を果たしている²⁶。著者らの過去の報告では、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおいて、TRPM2 を介したミクログリアの活性化が認知機能障害および白質傷害の惹起に重要な役割を果たすことを示した²⁷。これらの報告は、TRPM2 が加齢に伴う慢性炎症および認知機能低下にも関与することを示唆しているが、加齢における TRPM2 の生理的な役割は依然として不明である。

本章では、TRPM2 の加齢への関与を調べるために遺伝子改変マウスを用いて、TRPM2 欠損が加齢に伴う認知機能低下に及ぼす影響を評価した。

実験方法

動物実験

すべての動物実験は、京都大学動物実験委員会の倫理指針および日本薬理学会のガイドラインに準拠して行った。雄の C57BL/6J 野生型 (WT) マウス (RRID: IMSR_JAX: 000664) および TRPM2 遺伝子欠損 (TRPM2-KO) マウス (2-24 ヶ月齢) を実験に使用し、研究室内で飼育・維持した。TRPM2-KO マウスは、京都大学工学研究科 森泰生 教授より供与していただき、表現型に対するバックグラウンドの影響を排除するために、C57BL/6J マウス (日本 SLC) と 10 世代にわたって戻し交配を行った。すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクル下で $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の一定の周囲温度で飼育され、水と飼料を自由に摂取させた。

Y 迷路試験

2-3 ヶ月齢 (young) と 12-16 ヶ月齢 (middle-aged) のマウスを用いて Y 迷路試験を実施した。Y 迷路はそれぞれ等角の 3 本のアーム (長さ 40 cm、高さ 12 cm、幅 3 cm) で構成されている。まず、マウスを入れたアームを A とし、その他の 2 本のアームを B および C とした。実験は 8 分間行い、アームに入った回数と順序をビデオカメラで記録した。交替行動とは、マウスが 3 つのアーム全てに連続して入ること (ABC、CAB、BCA などが交替行動で、BAB は交替行動ではない) と定義し、その回数を計数した。交替行動回数をアームへの総進入回数から 2 を引いた数で割り、100 を乗じて交替行動率とした。アームへの合計進入回数を「自発的行動」として記録した。アーム進入回数が 15 回未満のマウスは除外した。

新奇物体認識試験 (NORT)

2-3 ヶ月齢 (young) および 12-16 ヶ月齢 (middle-aged) マウスを用いて、NORT による認知機能を評価した。実験は薄暗い照明下 (30 Lux) で行われた。まず、マウスを暗箱 (縦、横、長さ各 30 cm) に 3 日間 (1 日 10 分) 馴化させた後、トレーニング/テストを行った。トレーニング試行において、箱の中に 2 種類の物体 (黄色の三角柱と青色の四角錐) を入れ、その中でマウスを 10 分間自由に行動させた。トレーニング試行の 6 時間後にテスト試行を行い、青色の四角錐の代わりに木製の球を「新奇物体」として置いた。両物体の探索に費やした時間を総探索時間とし、運動量の指標とした。探索嗜好性は、両物体の総探索時間に対する、トレーニング試行時の青色の四角錐またはテスト試行時の木製球の探索時間の比率として定義され、この結果を認識記憶の指標とした。

新奇場所認識試験 (NLRT)

実験装置と馴化・トレーニング方法は NORT と同様に行った。テスト試行において、青い四角形の物体を別の場所に移動させた。前述したように、両物体の探索に費やした時間を総探索時間とし、運動量の指標とした。探索嗜好性は、両物体の総探索時間に対する青色の四角錐を探索した時間の比率と定義され、これを空間記憶の指標とした。

ミエリン染色

マウスにペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与で麻酔し、0.1 M K^+ 非含有 PBS で経心的に灌

流した後、K⁺非含有 0.1 M PBS 中の 4% PFA で灌流した。脳は 4% PFA 固定液中で 3 時間保存した後、0.1 M PBS 中の 15% スクロースに移し 4°C で一晩以上静置した。クライオスタットを用いて厚さ 20 μ m の冠状切片を作製した。ミエリンの染色には、脳切片を 0.1% Triton X-100 含有 PBS に 20 分浸し、Fluormyelin Green (1:300; Invitrogen) により室温で 20 分間インキュベートした。蛍光は、レーザー走査型共焦点イメージングシステムを備えた Olympus Fluoview 顕微鏡下で観察した。ミエリン染色の平均強度は、bregma + 0.7 mm に位置する脳梁部の 0.0400 mm² の視野で蛍光強度を定量した。

免疫蛍光染色法

冠状切片を前述のように作製し、一次抗体として rabbit anti-GSTpi antibody (1:200; MBL Life Science)、rabbit anti-Iba1 antibody (1:500; Wako Pure Chemical Industries)、または rat anti-CD3 antibody (1:100; BD Biosciences) を処置し 4°C で一晩インキュベートした。次に、切片に蛍光標識二次抗体として Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rabbit antibody または Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rat IgG antibody (1:300; Invitrogen) を処置し室温、暗所で 1.5 時間標識した。画像は共焦点蛍光顕微鏡で撮影した。GSTpi、Iba1、および CD3 陽性細胞数は bregma + 0.7 mm に位置する脳梁部および bregma - 2.8 mm に位置する海馬の 0.125 mm² の視野で細胞数を定量した。

NeuN 染色

冠状切片に一次抗体として mouse anti-NeuN antibody (1:500; Chemicon) を処置し、4°C で一晩インキュベートした後、biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (1:200, Vector Laboratories) で 1.5 時間標識した。次に、切片に ABC Elite reagent (1:200; Vector Laboratories) を処置し、1 時間インキュベートした。Diaminobenzidine (Dojindo) を発色剤とし、免疫反応性を可視化した。Bregma - 2.8 mm に位置する海馬の NeuN 陽性細胞数を定量した。

リアルタイム PCR

2 mm 厚の脳梁と 4 mm 厚の海馬の冠状切片を作製し、脳部位ごとに分離した。解剖した脳領域は液体窒素で瞬間凍結し、使用時まで -80°C で保存した。Total RNA は ISOGEN® (Nippon Gene) を用いて、メーカー指定のプロトコルにしたがって抽出し、ReverTra Ace® (Toyobo) を用いて 1 μ g の total RNA から cDNA を合成した。定量的リアルタイム PCR は、StepOne real-time PCR system (Life Technologies) を用いて行った。全量 20 μ l (25 ng の cDNA と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, Toyobo) で反応を行った。PCR は、95°C で 10 分、その後 95°C で 10 秒、60°C で 1 分を 40 サイクルの条件で行った。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである。

IL1 β (Fw: 5'-TGA GCA CCT TCT TTT CCT TCA-3', Rv: 5'-TTG TCT AAT GGG AAC GTC ACA C-3'), IL6 (Fw: 5'-GTG GCT AAG GAC CAA GAC CA-3', Rv: 5'-TAA CGC ACT AGG TTT GCC GA-3'), TNF α (Fw: 5'-TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC-3', Rv: 5'-GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT-3'), 18S (Fw: 5'-GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG-3', Rv: 5'-GGC CTC ACT AAA CCA TCC AA-3')

サンプル中の 18S rRNA 量を正規化に用いた (mRNA 量は対応する対照群との相対値で表した)。

統計解析

統計解析は、Prism 7 software (GraphPad Software Inc.) を使用して行った。複数の実験グループのデータを比較するために、one-way ANOVA および Tukey's post-hoc test を使用した。危険率 5%未満の場合には、統計的に有意な差であると判定した。データは平均値 ± 標準誤差で表した。各データポイントは、1 匹のマウスから得た 1 つのサンプル (脳梁や海馬などの特定の脳領域からの切片または抽出物) を表す。各実験で使用した *n* 数は、図の説明文に示されている。実験条件について盲検化された状態で評価を行った。

実験結果

加齢に伴う認知機能低下の評価

まず、2-3 ヶ月齢の young マウスと 12-16 ヶ月齢の middle-aged マウスを比較するための行動試験を実施した。最近の研究では、TRPM2-KO マウスは、オープンフィールド試験における行動指標において WT マウスと差がないことが示され、TRPM2-KO マウスの運動量は WT マウスと同程度であることが示された²⁸。次に、加齢に伴う認知機能低下における TRPM2 の役割を評価するために、Y 迷路試験を実施した (図 1-1A)。Middle-aged の WT マウスでは young マウスと比較し作業記憶の指標である交替行動率が減少したが、middle-aged の TRPM2-KO マウスではこの減少が抑制された (図 1-1A)。さらに認知機能の評価するために、新奇物体認識試験を行った (図 1-1B)。トレーニング試行の後、片方の物体を別の物体に置き換えたテスト試行において、middle-aged の WT マウスの新奇物体への探索嗜好性は、middle-aged の TRPM2-KO マウスの探索嗜好性より低かった (図 1-1B)。次に、middle-aged マウスの空間記憶機能の評価するために、新奇場所認識試験を行った (図 1-1C)。テスト試行において、移動させた物体に対する探索嗜好性は各群 50%以上であり、young 群と middle-

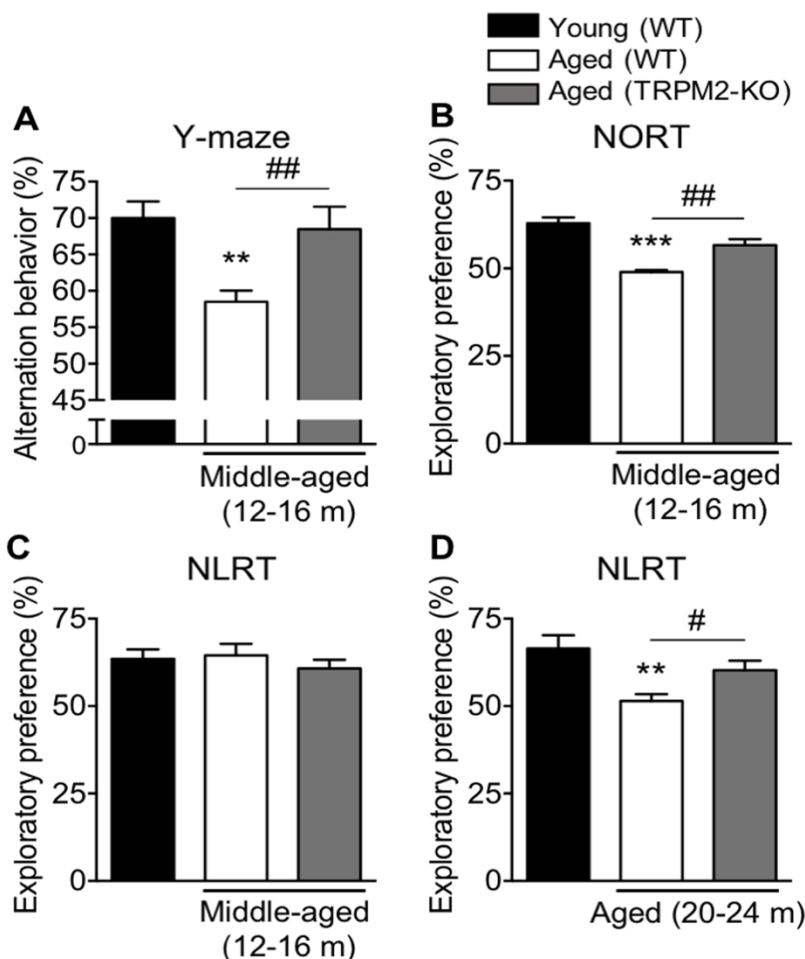


図 1-1. 加齢に伴い認知機能が低下し、TRPM2 遺伝子の欠損により抑制される (A) Y-maze テストにおける young (2-3 ヶ月齢) および middle-aged (12-16 ヶ月齢) マウスの交替行動率。 (B) NORT における young (2-3 ヶ月齢) および middle-aged (12-16 ヶ月齢) マウスの新奇物体に対する探索嗜好性。 (C, D) NLRT における young (2-3 ヶ月齢) および middle-aged (12-16 ヶ月齢) マウス (C) と young (2-3 ヶ月齢) および aged (20-24 ヶ月齢) マウス (D) の新奇場所への探索嗜好性。値は平均値 ± 標準誤差で表した。 (A) *n* = 15-19; (B) *n* = 7-10; (C) *n* = 4-6; (D) *n* = 9-16. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs young mice; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01.

aged 群および WT と TRPM2-KO の間で差は認められなかった (図 1-1C)。これらの結果から、middle-aged マウスでは作業記憶と認識記憶が損なわれるが、空間記憶は維持されており、さらに TRPM2 が加齢に伴う記憶機能低下に関与している可能性が示された。

次に、20–24 ヶ月齢の aged マウスの空間記憶機能を新奇場所認識試験により調べた (図 1-1D)。テスト試行において、aged の WT マウスは young の WT マウスに比べて、移動させた物体への探索嗜好性が低下した。また、この探索嗜好性の低下は aged の TRPM2-KO マウスでは抑制された (図 1-1D)。これらの結果より、加齢に伴い空間記憶機能の低下が見られ、そのメカニズムに TRPM2 が関与していることが示唆された。

加齢に伴う白質傷害と海馬傷害の評価

加齢における TRPM2 の関与をさらに調べるため、認知機能低下に関与する脳部位に着目して、young マウスと aged マウスの組織学的変化を評価した。白質は、作業記憶²⁹、非空間認識記憶³⁰、エピソード記憶³¹に関する、最も重要な脳部位の1つである。認知症³²や精神疾患³³においても、白質傷害は認知機能障害と深く関与している。そこで、加齢に伴う白質傷害への TRPM2 の関与を評価するために、脳梁においてミエリン染色を行った (図 1-2A)。著者らの過去の報告により young の WT マウスと TRPM2-KO マウスではミエリン密度に差は認められなかったが²⁷、aged の WT マウスのミエリン密度は young の WT マウスよりも低かった (図 1-2B)。一方で、aged の TRPM2-KO マウスでは、そのようなミエリン密度の低下は認められなかった (図 1-2B)。白質傷害をさらに評価するために、オリゴデンドロサイトのマーカーである GSTpi で脳梁の免疫染色を行った (図 1-2C)。WT マウスにおいて脳梁の GSTpi 陽性細胞数は、ミエリン密度と同様に加齢により減少したが、TRPM2-KO マウスでは GSTpi 陽性細胞数の減少は認められなかった (図 1-2D)。これらの結果は、加齢に伴う白質傷害の増悪に TRPM2 が重要な役割を担っていることを示唆している。

次に、加齢に伴う認知機能低下のメカニズムをさらに調べるために、空間記憶を含む認知機能に重要な役割を果たす海馬の組織学的評価を行った^{34,35}。海馬における神経細胞数を評価するために、神経細胞のマーカーである NeuN で免疫染色を行った (図 1-3A)。歯状回の NeuN 陽性細胞数に変化は認められなかった一方、aged の WT マウスの CA1 および CA3 における NeuN 陽性細胞数は、young の WT マウスよ

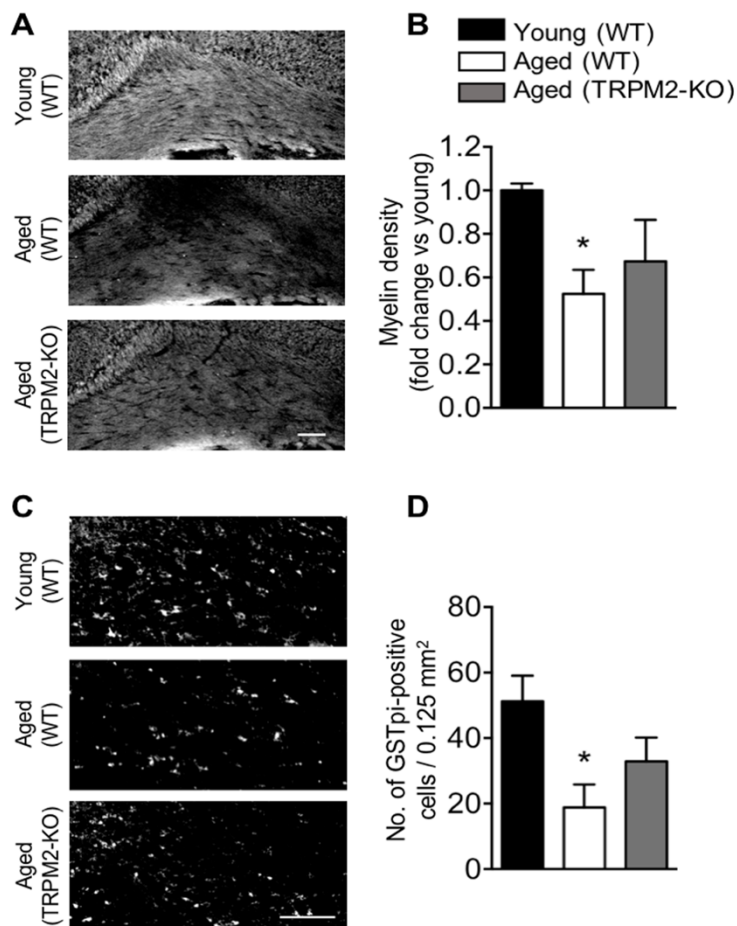


図 1-2. 加齢に伴い白質傷害が認められ、TRPM2 遺伝子の欠損により抑制される

Young (2–3 ヶ月齢) および aged (20–24 ヶ月齢) マウスの脳梁におけるミエリン密度を評価するためのミエリン染色の代表画像 (A) および定量データ (B)。Young (2–3 ヶ月齢) および aged (20–24 ヶ月齢) マウスの脳梁における抗 GSTpi 抗体による免疫染色の代表画像 (C) および陽性細胞数の定量データ (D)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μ m. (B) $n = 3–6$; (D) $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs young WT.

り少なかった (図 1-3B)。また aged の TRPM2-KO マウスと young の WT マウスの間には NeuN 陽性細胞数に差は認められなかった (図 1-3B)。これらの結果より、加齢に伴う海馬の神経細胞数の減少に TRPM2 が関与している可能性が示された。

白質および海馬における Iba1 および CD3 陽性細胞の役割

次に、白質と海馬の傷害を増悪させる原因細胞を特定するために、ミクログリア/マクロファージマーカーの Iba1 および T リンパ球マーカーの CD3 の免疫染色を脳梁および海馬で行った (図 1-4, 1-5)。Aged の WT マウスの脳梁における Iba1 陽性細胞数は、young の WT マウスと比べ増加したが、aged の TRPM2-KO マウスの Iba1 陽性細胞数は young の WT マウスと同程度であった (図 1-4A, B)。同様に、WT マウスの海馬における Iba1 陽性細胞数は aged マウスで増加し、さらに TRPM2-KO マウスの Iba1 陽性細胞数は aged の WT マウスよりも減少する傾向が見られた (図 1-4C, D)。

一方、脳梁 (図 1-5A, B) および海馬 (図 1-5C, D) の CD3 陽性細胞数は、aged マウスで増加したが、WT マウスと TRPM2-KO マウスの間に差は認められなかった。これらの結果より、加齢に伴う白質および海馬の傷害は、TRPM2 を介したミクログリアの活性化に起因する炎症反応によって引き起こされている可能性が示された。

脳梁および海馬における加齢に伴う炎症反応の変化

次に、白質と海馬の病理学的変化を検討するために、脳梁と海馬において、IL1 β 、IL6、TNF α などの炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR を用いて評価した。脳梁における aged の WT マウスの IL1 β (図 1-6A)、IL6 (図 1-6B)、TNF α (図 1-6C) の遺伝子発現は、young の WT マウスに比べ増加傾向があり、さらに TRPM2-KO マウスでは発現増加の抑制傾向があった。また、IL1 β (図 1-6D) および IL6 (図 6E) の遺伝子発現は、aged マウスで増加傾向であり、WT マウスと TRPM2-KO マウス間に差は認められなかった。一方、aged の WT マウスの海馬では、TNF α の遺伝子発現が有意に増加し、aged の TRPM2-KO マウスでは発現が低下する傾向が見られた (図 1-6F)。これらの結果は、白質および海馬が関与する認知機能低下に、TRPM2 の活性化を介した炎症反応が関与していることを示唆している。

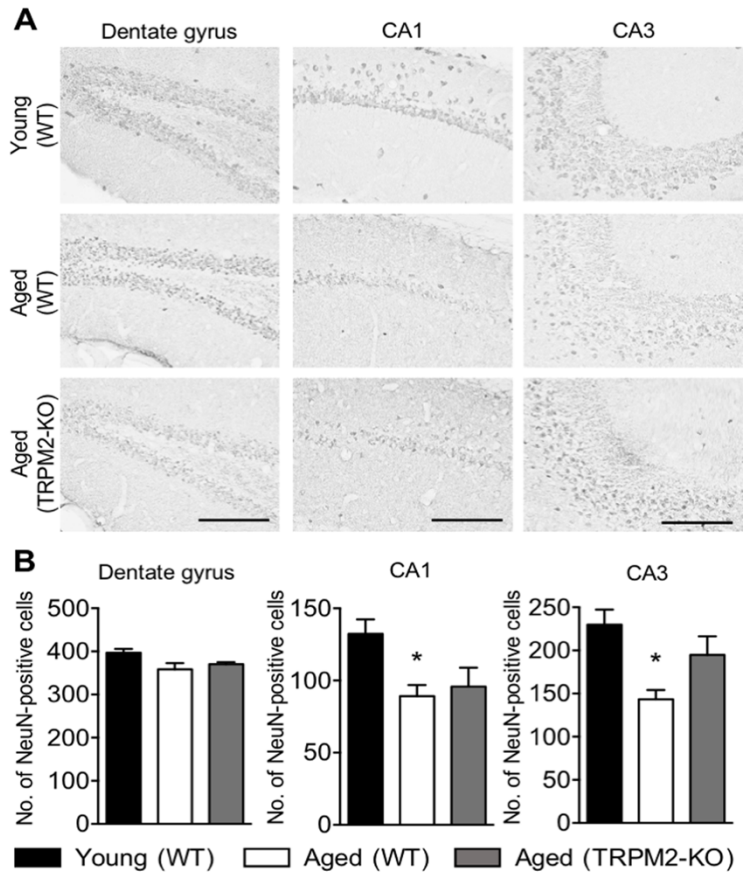


図 1-3. 加齢に伴い海馬の神経細胞死が認められ、TRPM2 遺伝子の欠損により抑制される
Young (2-3 ヶ月齢) および aged (20-24 ヶ月齢) マウスの海馬歯状回 (左)、CA1 (中央)、CA3 (右) 領域における海馬神経細胞数を調べるための NeuN 免疫染色の代表画像 (A) および陽性細胞数の定量データ (B)。値は平均値 \pm 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μ m. (A) $n = 6$; (B) $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs young WT.

考察

本研究では、加齢によりマウスが作業記憶、認識記憶、空間記憶に障害を示すことを実証した。さらに、TRPM2 遺伝子の欠損により、加齢に伴う認知機能低下が抑制され、白質および海馬の傷害が抑制されることを、著者の知る限り初めて明らかにした。また、加齢に伴う炎症反応が TRPM2-KO マウスで抑制される傾向があることも明らかにした。これらの結果は、TRPM2 の活性化が加齢に伴う脳機能低下に悪影響を及ぼすことを示唆している。

記憶機能は、加齢に伴い最も影響を受ける機能の1つとして知られている³⁶。これまでの報告では、加齢に伴い白質および海馬に傷害が生じることが示されている^{37,38,39}。しかし、白質と海馬のどちらがより大きく傷害を受けるかは明らかではない。他の研究チームは、18ヶ月齢のマウスでは、ミエリンの減少が神経突起の減少よりも大きいことを報告している⁴⁰。また、水迷路試験により、11ヶ月齢のマウスでは作業記憶の障害が見られるが、海馬が関わるとされる参照記憶は保たれていることが明らかになっており⁴¹、白質関連の記憶が特に加齢に伴い障害されやすいことが示唆されている。

Rogers らは、長期増強の低下と水迷路試験における空間記憶機能障害が24ヶ月齢以降で見られ、18ヶ月齢では見られないことを実証している¹⁵。これらの報告と同様に、著者は24ヶ月齢のマウスで空間記憶機能が低下することを見出した。さらに、慢性脳低灌流マウスモデルでは、白質が関与する作業記憶の障害が認められてからずっと遅れて海馬の萎縮とそれに伴う参照記憶機能障害が見られる²⁹。これらを総合すると、加齢に伴う認知機能障害には、白質と海馬の傷害が関与しており、また白質が海馬より先に傷害を受けている可能性が考えられる。

本章では、加齢に伴う Iba1 と CD3 陽性細胞数の増加、および炎症性サイトカインの発現量の増加を

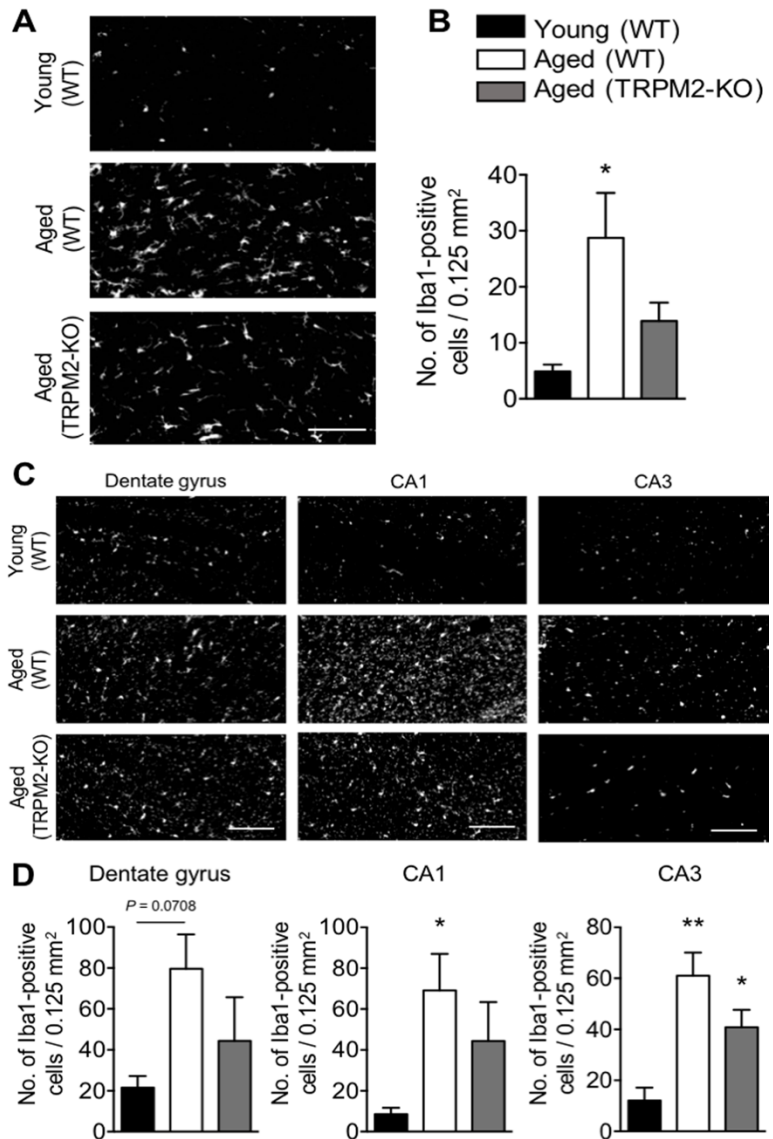


図 1-4. 加齢に伴い脳梁と海馬でミクログリア・マクロファージの増加が認められ、TRPM2 遺伝子の欠損により抑制される

Young (2-3ヶ月齢) および aged (20-24ヶ月齢) マウスの脳梁における抗 Iba1 抗体による免疫染色の代表画像 (A) と陽性細胞数の定量データ (B)。Young (2-3ヶ月齢) および aged (20-24ヶ月齢) マウスの海馬歯状回 (左)、CA1 (中央)、CA3 (右) 領域における抗 Iba1 抗体による免疫染色の代表画像 (C) および陽性細胞数の定量データ (D)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μm. n = 4. *P < 0.05, **P < 0.01 vs young WT.

見出した。脳の老化で見られる重要な特徴の1つに、炎症が挙げられる⁴²。炎症が進行すると、老化した脳のグリア細胞（特にミクログリア）は、若齢の脳では見られないような、細胞数の増加、異常な形態、食食能の低下、運動性の低下、および炎症性分子の発現などの顕著な表現型および機能的変化を示す^{43,44,45}。本章では、ミクログリアの機能を評価するために、Iba1の発現を免疫組織化学的手法のみで評価したが、今後の研究では、さまざまな手法を駆使しミクログリア機能の詳細な変化を検討する必要がある。

以前の報告では、CD11c 陽性の樹状細胞と CD3 陽性の T 細胞が高齢マウスの白質に浸潤することが示されており⁴⁶、加齢に伴う脳の炎症反応に白血球が関与している可能性が指摘されている。別の報告では、18ヶ月齢のラットの脳、および線条体に TNF α を注入した 2ヶ月齢のラットの脳で、CD68 陽性マクロファージ数が増加することが示された⁴⁷。さらに、12ヶ月齢のマウスの海馬における TNF α 量は2ヶ月齢のマウスよりも高いことも知られている⁴⁸。また、ヒトの血液脳関門の透過性は加齢とともに増加する⁴⁹。これらの報告を総合すると、加齢に伴う脳の炎症は、末梢性免疫細胞の脳への浸潤によって引き起こされる可能性がある。本章で示されたデータは、TRPM2 遺伝子の欠損は

CD3 陽性細胞の脳梁や海馬への浸潤に影響を与えないことを示しており、末梢免疫細胞に発現する TRPM2 は加齢に伴う CNS 炎症に重要な役割を担っていないことを示唆している。

これまでの研究で、マウスのサイトカイン量は加齢とともに増加することが明らかにされており⁵⁰、このことは健康な高齢者にも当てはまる⁵¹。さらに、Deczkowska らは、若齢マウスと比較して、高齢マウスのミクログリアにおいて、IL1 β および TNF α 、CCL の遺伝子発現が増加することを示した⁵²。本章では、高齢マウスの脳梁と海馬で TNF α mRNA の発現増加を検出したが、高齢 TRPM2-KO マウスでは発現増加が抑制される傾向にあった。これらの結果から、TRPM2 を介した免疫細胞の活性化が炎症シグナルを誘発し、加齢に伴いミエリンや神経細胞を傷害し、最終的に認知機能低下を引き起こす可能性が示さ

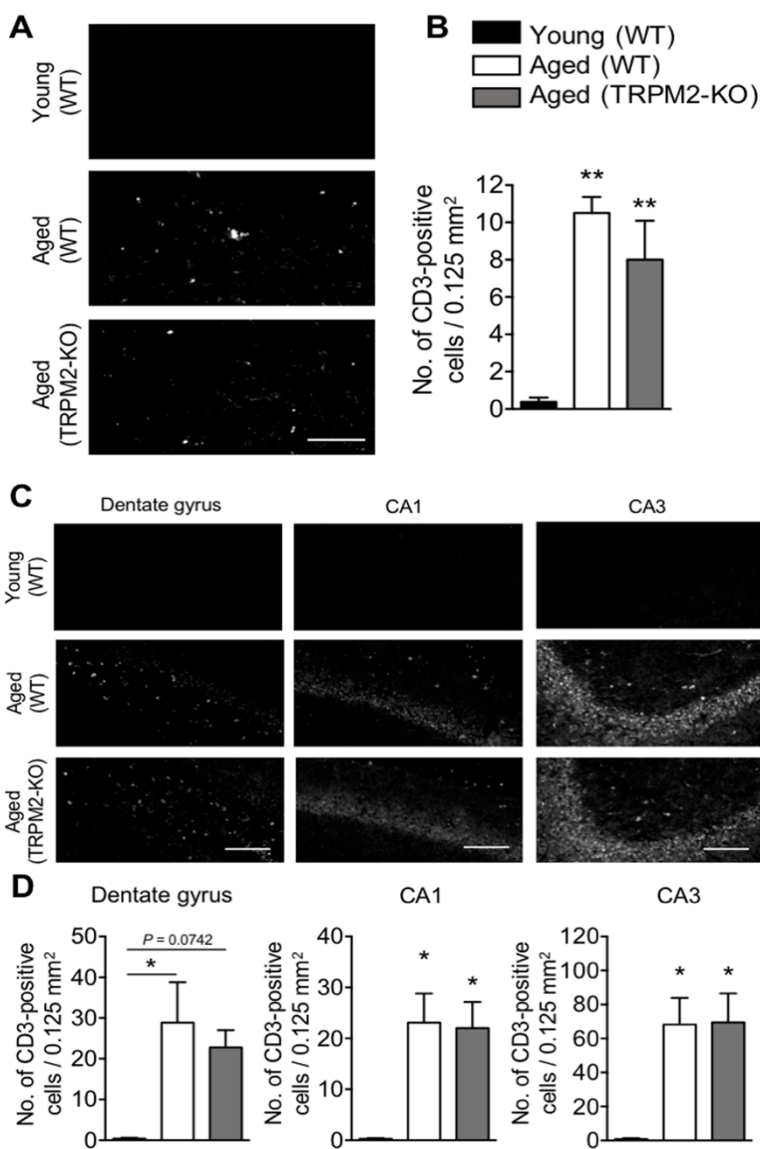


図 1-5. 加齢に伴い WT および TRPM2-KO マウスの脳梁と海馬に CD3 陽性細胞の浸潤が認められる

Young (2-3ヶ月齢) および aged (20-24ヶ月齢) マウスの脳梁における抗 CD3 抗体による免疫染色の代表画像 (A) および陽性細胞数の定量データ (B)。Young (2-3ヶ月齢) および aged (20-24ヶ月齢) マウスの海馬の歯状回 (左)、CA1 (中央)、CA3 (右) 領域における抗 CD3 抗体による免疫染色の代表画像 (C) および陽性細胞数の定量データ (D)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μ m. $n = 3-4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs young WT.

れた。今後、他の炎症性サイトカインが加齢に伴う脳機能変化に与える影響についても検討する必要がある。

本章で、加齢に伴う有害事象が、TRPM2-KO マウスでは抑制されることを明らかにした。そこで、どのようなメカニズムで加齢に伴い認知機能の低下が起こるのか、また、なぜ TRPM2 遺伝子が欠損されていると認知機能の低下が抑制されるのか、という疑問が生じる。以前の報告で、慢性脳低灌流マウスモデルにおいてサイトカインの白質傷害と認知機能障害への関与を証明しており、これらのサイトカインの放出は主に TRPM2 を介したミクログリアの活性化によって引き起こされる²⁷。以前の報告では、ヒトの皮質脳血流が年齢とともに減少することが示されており⁵³、別の報告では、3ヶ月

齢のマウスと比較して18ヶ月齢および24ヶ月齢のマウスでは脳血流反応の減衰と活性酸素種 (ROS) の産生が増大されることを示している⁵⁴。TRPM2 は ROS によって活性化されることから、これらの報告を総合すると、ROS による TRPM2 の活性化を介して加齢に伴う認知機能低下や炎症反応が誘導される可能性がある。白質は ROS に対して脆弱であり、白質傷害は海馬傷害の前に起こる傾向があることから、ROS は加齢に伴う病態に重要な役割を果たす可能性があるが、今後の研究では、高齢者の脳においてどの分子がどの細胞の TRPM2 を活性化しているかについてさらに解明することが必要となるであろう。また、以前の報告では、高齢ラットで ROS 産生の増加と神経細胞死が認められることが示されている⁵⁵。さらに、神経細胞に発現する TRPM2 が H₂O₂ による神経細胞死に関与していることを示す報告もある⁵⁶。本章では、海馬の NeuN 陽性細胞数が、高齢の WT マウスでは減少する一方 TRPM2-KO マウスでは減少しないことを見出した。これらの結果を総合すると、神経細胞死は ROS によって誘導され、加齢に伴う神経細胞傷害とその後の認知機能低下への TRPM2 の関与が示唆される。

TRPM2 は、CNS のミクログリア^{21,22} や末梢免疫細胞である単球/マクロファージ²³、好中球²⁴ などで多く発現している。これまでの研究で、TRPM2 が単球/マクロファージによる炎症性サイトカイン/ケモカインの産生や、潰瘍性大腸炎²³ や神経障害性疼痛²⁵ などの炎症関連疾患の増悪に関与していることが明らかになっていることから、他の CNS 疾患と同様の炎症過程を特徴とする老化時の慢性炎症にも TRPM2 が関与していると考えられる。さらに、著者らの最近の研究では、TRPM2 を介したミクログリア活性化が慢性脳低灌流により惹起される認知障害を悪化させることを明らかにした²⁷。本章では、高齢マウスで見られる Iba1 陽性細胞数の増加が TRPM2-KO マウスでは抑制される傾向があることを見出し、TRPM2 を標的とした免疫応答、特にミクログリア活性化の抑制により、加齢に伴う CNS 炎症が関与する認知機能低下を抑制する可能性が示された。

以上、第1章において著者は、TRPM2 が少なくとも部分的には、加齢に伴う CNS 炎症に重要な役割

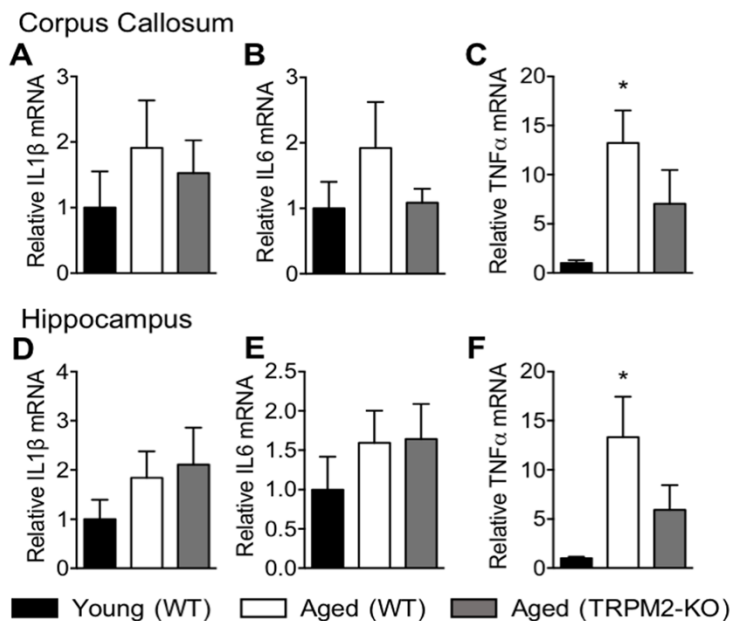


図 1-6. WT マウスの脳梁および海馬において、加齢に伴う炎症性サイトカインの遺伝子発現の変化を評価する
Young (2-3ヶ月齢) および aged (20-24ヶ月齢) マウスの脳梁 (A-C) および海馬 (D-F) における IL1β (A, D)、IL6 (B, E) および TNFα (C, F) mRNA の発現量。値は平均値 ± 標準誤差で表した。n = 6-9. *P < 0.05 vs young WT.

を果たすこと、そしてそれがミクログリアなどの免疫細胞の活性化を介している可能性があることを示した。したがって、TRPM2は老化や加齢に伴う認知機能低下を遅延、予防するための治療標的となりうると考えられる。

第2章 血管性認知障害におけるミクログリアの役割

ミクログリアは CNS¹⁶ に存在する免疫細胞で、CNS の恒常性を維持する機能の一部を担っている⁵⁷。この細胞は神経保護と神経毒性の両面で重要であり、アルツハイマー病⁵⁸、前頭側頭型認知症⁵⁹、虚血性脳卒中⁶⁰などの様々な中枢神経疾患や老化⁶¹で活性化される。老化したヒトの脳では、ミクログリアの退行変性が見られ¹⁷、最近の研究では、ミクログリアは老化に対して局所的な多様性と感受性を示し、複数のサブタイプが様々な CNS 疾患で活性化することが示唆されている^{45,62}。しかし、ミクログリアの正確な保護的・傷害的役割と疾患への寄与は完全には解明されていない。

慢性脳低灌流は炎症反応の進行を惹起し⁶³、慢性脳低灌流により誘発される認知機能障害は、マウス⁷やヒト⁸で炎症と深く関与していることが知られている。著者らは、免疫細胞に広く発現する TRPM2 を介したミクログリアの活性化が、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害を増悪させることを以前に明らかにした²⁷。本章では、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害におけるミクログリアの役割を直接的に明らかにするために、ミクログリアを除去できることが知られているコロニー刺激因子 1 受容体 (CSF1R) 阻害薬を投与したマウスを用いて、慢性脳低灌流誘発血管性認知障害の病態変化を検討した⁶⁴。CSF1R は骨髄系細胞の制御に必須な因子である。CSF1R 阻害薬の PLX3397 を 21 日間マウスに食餌投与すると、ほとんどすべてのミクログリアが除去されるが、末梢の骨髄系細胞および神経機能にはほとんど影響がないことが知られている⁶⁵。そこで本章では、マウスに PLX3397 を含む飼料を 21 日間与えた後、両側総頸動脈狭窄 (BCAS) 処置を行い、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害モデルを作製した。その後、これらのマウスの認知機能、白質傷害の程度を評価した。

実験方法

動物実験および PLX3397 食餌投与

すべての動物実験は、第 1 章と同様に京都大学動物実験委員会の倫理指針および日本薬理学会のガイドラインに準拠して実施した。雄の C57BL/6J マウス (8–12 週齢、20–30g) は日本 SLC から購入した。すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクルのもと、 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の一定の環境温度で飼育し、水と餌を自由に摂取できるようにした。

ミクログリアを除去するため、BCAS 処置の 21 日前から実験終了時まで、PLX3397 (290 mg/kg) を含む飼料をマウスに摂食させた。対照マウスには標準飼料を与えた。PLX3397 は Chemgood から購入し、ResearchDiets により AIN-76A chow に 0.029% で配合された。

両側総頸動脈狭窄処置 (Bilateral common carotid artery stenosis; BCAS)

内径 0.18 mm のマイクロコイル (Sawane Spring) を用いて、既報^{27,66}の通りマウスに BCAS 処置を行った。まず、マウスを 30% O₂、70% N₂O 中 3% イソフルランで麻酔導入し、手術中はフェイスマスクを用いて 30% O₂、70% N₂O 中 1.5% のイソフルランで維持した。正中に沿って皮膚を切開した後、マイクロコイルを両側の総頸動脈に装着した。対照群として、両側の総頸動脈を剥離し、マイクロコイルを装着し

ない sham 処置を行った。

新奇物体認識試験

新奇物体認識試験は、手術後 28 日目に実施した。実験プロトコルは第 1 章実験方法と同様に行った。

ミエリン染色

麻酔薬にペントバルビタール (50 mg/kg) または 3 種混合麻酔薬 (0.3 mg/kg メデトミジン、4.0 mg/kg ミダゾラム、5.0 mg/kg ブトルファノール) を用いた。また切片は Fluormyelin Green (1:1000; Invitrogen) により室温で 20 分間インキュベートした。その他の実験プロトコルは第 1 章実験方法と同様に行った。

免疫蛍光染色法

一次抗体として rabbit anti-GSTpi antibody (1:200; MBL Life Science)、rabbit anti-Iba1 antibody (1:500; Wako Pure Chemical Industries)、蛍光標識二次抗体として Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit antibody または Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rabbit antibody (1:300; Invitrogen) を用い、bregma + 0.7 mm に位置する脳梁部の 0.125 mm² の視野で細胞数を定量した。その他の実験プロトコルは第 1 章実験方法と同様に行った。

リアルタイム PCR

2 mm 厚の冠状脳切片から剥離した脳梁を用いてリアルタイム PCR を行った。実験プロトコルは第 1 章実験方法と同様に行った。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである。

IL6 (Fw: 5'-GTG GCT AAG GAC CAA GAC CA-3', Rv: 5'-TAA CGC ACT AGG TTT GCC GA-3'), TNF α (Fw: 5'-TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC-3', Rv: 5'-GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT-3'), 18S rRNA (Fw: 5'-GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG-3', Rv: 5'-GGC CTC ACT AAA CCA TCC AA-3')

統計解析

実験群間の比較のために、two-way ANOVA および Bonferroni's post hoc test を用いた。その他は第 1 章実験方法と同様に行った。

実験結果

BCAS 処置による認知機能障害の評価とミクログリア除去の影響

手術 21 日前から PLX3397 含有飼料または標準飼料を与えたマウスにおいて、BCAS 処置 28 日後に新奇物体認識試験を行い認知機能の評価した (図 2-1A)。トレーニング試行とテスト試行において 2 つの物体を探索した総探索時間には群間で差がなく (図 2-1B, C)、BCAS 処置およびミクログリア除去が運動量に影響を与えないことが確認された。トレーニング試行において、2 つの異なる物体に対する探索嗜好性は約 50% であり、群間に差は見られなかった (図 2-1D)。しかしテスト試行において、標準飼料を与えられたマウスでは BCAS 処置により新奇物体に対する探索嗜好性が sham 群に比べて有意に低下した一方、

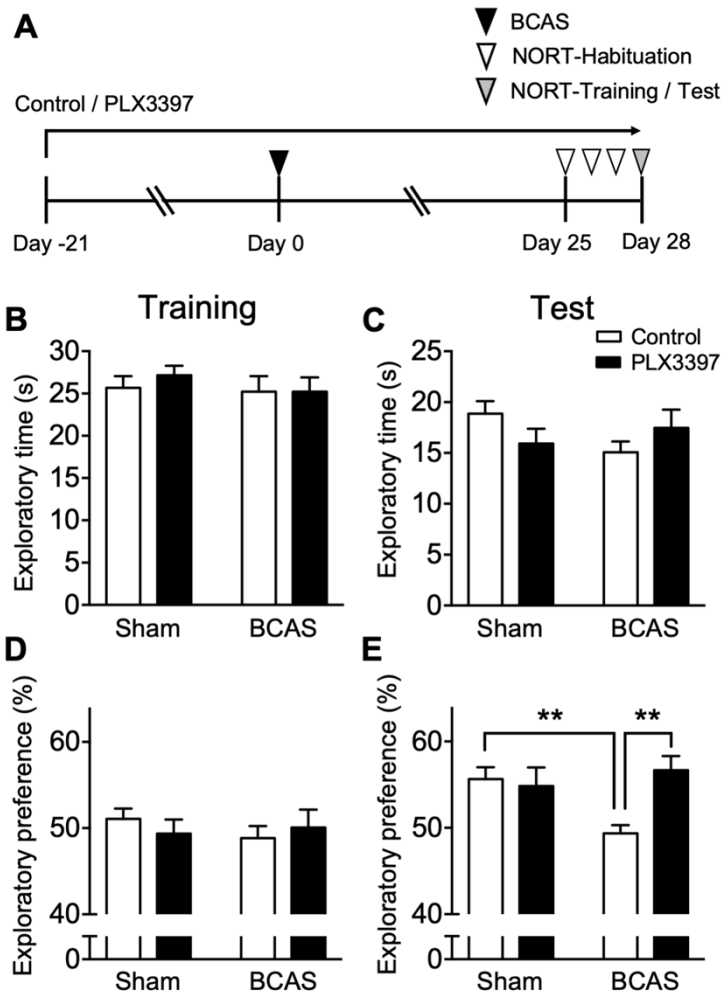


図 2-1. BCAS 処置による認知機能障害は、PLX3397 を投与したマウスでは認められない

(A) 新奇物体認識試験 (NORT) の実験タイムコース。(B, C) NORT におけるトレーニング試行 (B) およびテスト試行 (C) での 2 物体の総探索時間。(D, E) NORT におけるトレーニング試行 (D) とテスト試行 (E) での青の四角錐または木製の球に対する探索嗜好性。値は平均値 ± 標準誤差で表した。n = 12-17. **P < 0.01.

マイクログリア除去による慢性脳低灌流後の白質傷害への影響を脳梁のミエリン染色により評価した。標準飼料を与えたマウスでは、BCAS 処置により、ミエリン密度が sham 群と比較して低下する傾向が見られた。一方、PLX3397 を与えたマウスでは BCAS 処置群でもこのようなミエリン密度の減少は見られず、また標準飼料を与えた BCAS 処置マウスよりも大きかった (図 2-2D, E)。さらに、オリゴデンドロサイトのマーカーである GSTpi の免疫染色により、標準飼料を与えたマウスでは BCAS 処置により GSTpi 陽性細胞数が減少したが、PLX3397 を与えたマウスでは減少は見られなかった (図 2-2F, G)。これらの結果は、マイクログリアの除去により BCAS 誘発の白質傷害が抑制されることを示している。

BCAS 処置による脳梁の炎症反応の変化

慢性脳低灌流誘発血管性認知障害における CNS 炎症を調べるため、炎症性サイトカインとマイクログリアマーカーが増加することが以前に明らかにされている BCAS 処置 14 日後の脳梁における炎症性サイトカイン²⁷ の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した (図 2-3A)。標準飼料を与えたマウスでは、BCAS

PLX3397 を与えられたマウスでは探索嗜好性の低下が有意に抑制された (図 2-1E)。これらの結果は、慢性脳低灌流により惹起される認知機能障害がマイクログリアの除去により改善されることを示している。

マイクログリア除去と BCAS 処置による白質傷害の評価

BCAS 処置 28 日後にマイクログリア除去と白質障害を評価するため組織学的解析を行った (図 2-2A)。PLX3397 によるマイクログリア除去は、マイクログリアおよびマクローファージのマーカーである Iba1 の脳梁における免疫染色によって確認された (図 2-2B, C)。また、標準飼料を与えたマウスでは、BCAS 処置 28 日後に Iba1 陽性細胞数が有意に増加したのに対し、PLX3397 を与えたマウスでは、BCAS 処置後もマイクログリアの除去が維持されていた。これらの結果は、BCAS 処置によりマイクログリアが活性化され、また PLX3397 を与えられたマウスではマイクログリアが除去されたままであることを示している。

白質傷害は慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害に特徴的な所見であり^{27,67}、血管性認知症の認知機能障害と関連するため⁶⁸、

処置後に IL6 mRNA の発現が有意に増加し、PLX3397 を与えたマウスでは有意に抑制された (図 2-3B)。同様に、BCAS 処置後の TNF α mRNA の発現は、標準飼料を与えたマウスと比べ PLX3397 を与えたマウスで小さかった (図 2-3C)。これらの結果は、慢性脳低灌流誘発認知機能障害における炎症反応がミクログリアの除去により抑制されることを示している。

考察

本章では、PLX3397 を用いたミクログリアの除去により、BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルの CNS 炎症、白質傷害、認知機能障害が抑制されることを明らかにし、慢性脳低灌流を伴う様々な病態変化にミクログリアの活性化が寄与している可能性を示した。

著者らの以前の報告では、テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンによるミクログリア活性化の抑制は、BCAS 処置後の白質傷害および認知機能障害を改善することを見出した²⁷。したがって、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害に、ミクログリアが重要な役割を担っていると結論づけた。しかし、ミノサイクリンは、マクロファージ⁶⁹ やアストロサイト^{70,71}、5-リポキシゲナーゼ⁷² の活性化も抑制す

ることが知られている。そこでミノサイクリンによる慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害の抑制作用がミクログリア活性化の抑制によるものかを確認するために、本章では、PLX5622 とともに、さまざまな CNS 疾患研究で使用されている CSF1R 阻害薬の PLX3397 を用いた。過去の報告で、CSF1R 阻害薬により、マウス脳内出血モデルにおいて傷害体積、脳浮腫、神経機能障害が抑制され⁷³、またアルツハイマー病モデルマウスにおける神経突起でのプラークの蓄積、認知機能障害が CSF1R 阻害薬を用いたミクログリアの除去によって改善される⁷⁴ ことが知られている。同様に、高齢マウスを用いた研究では、CSF1R 阻害薬によるミクログリア除去後の再増殖がミクログリアの形態を若齢マウスの細胞と類似したものに回復させ、加齢に伴う認知機能障害を改善することが示された¹⁸。他の研究では、ミクログリアの除去は、緊張病⁷⁵ や多発性硬化症^{76,77} などの脱髄関連疾患モデルマウスにおける神経機能障害も改善することが示されている。しかし、Jin らの報告では、中大脳動脈閉塞処置による局所脳虚血モデルマウスにお

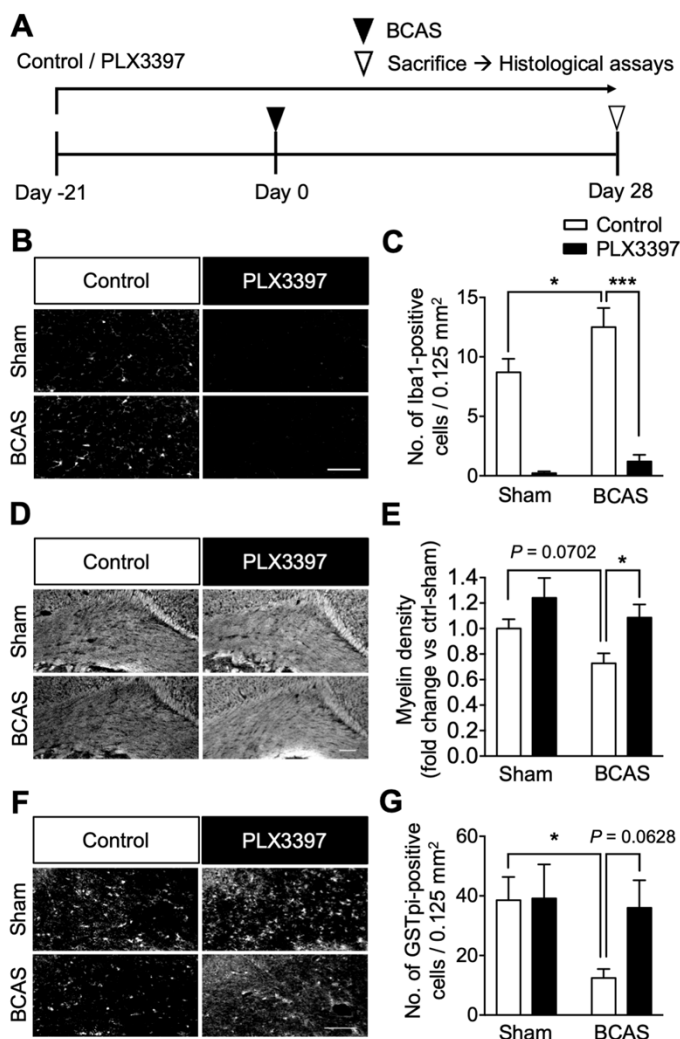


図 2-2. BCAS 処置による Iba1 陽性細胞数の増加および白質傷害は、PLX3397 投与マウスでは認められない

(A) 組織学的評価の実験タイムコース。(B, C) 脳梁における抗 Iba1 抗体による免疫染色の代表画像 (B) および陽性細胞数の定量データ (C)。(D, E) 脳梁におけるミエリン染色の代表画像 (D) と相対的ミエリン密度の定量データ (E)。(F, G) 脳梁における抗 GSTpi 抗体による免疫染色の代表画像 (F) と陽性細胞数の定量データ (G)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μ m. (C, E) $n = 9-14$; (G) $n = 6-11$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

いて、ミクログリアを除去することで脳梗塞巣や神経機能障害が増悪することを示しており⁷⁸、ミクログリアが脳虚血によるアストロサイト応答を制御し、神経保護機能を担っていることが示唆された。また、両側総頸動脈閉塞による慢性脳低灌流誘発血管性認知障害ラットモデルでは、運動が認知機能障害や脱髄を軽減することが示され、その効果はM1ミクログリアからM2ミクログリアへのサブタイプの変化と関連していた⁷⁹。本章の研究では、PLX3397の食餌投与により、M1およびM2サブタイプを含むほぼすべてのミクログリアが除去されたことから、今後は、慢性脳低灌流誘発血管性認知障害におけるミクログリアのサブタイプの違いによる影響を明らかにするために、さらなる検討が必要であると考えられる。

BCAS 処置による認知機能障害や白質傷害には、ミクログリアからの炎症性サイトカインの分泌が関与していることが本章で示唆された。IL6とTNF α は、ミクログリアだけでなく、アストロサイトからも分泌されるサイトカインである⁸⁰。これらのサイトカインの発現は、sham群と同様にBCAS処置群でもPLX3397の食餌投与によって減少したことから、脳梁におけるIL6とTNF α の発現には主にミクログリアが関与していることが示唆された。しかし、PLX3397を食餌投与したマウスでのIL6とTNF α の発現低下は、IL6とTNF α の受容体を発現しているアストロサイトにおけるシグナル伝達が減少した結果である可能性がある⁸¹。したがって、慢性脳低灌流誘発血管性認知障害におけるアストロサイトの関与について、今後さらなる検討が必要である。

本研究ではBCAS処置の21日前にミクログリアの除去を開始したため、白質傷害や認知機能障害へミクログリア活性化が関与するタイミングは不明である。わずか7日間の投与でミクログリアを除去できるCSF1R阻害薬PLX5622を用いることで、この点が明らかとなり、ミクログリアの除去の慢性脳低灌流誘発血管性認知障害の治療に最も効果的なタイミングを決定するのに役立つと思われる。また、ミクログリア除去後の再増殖が慢性脳低灌流誘発血管性認知障害の予後に影響を与えるかどうか、またどのように影響を与えるかについても、さらなる研究が必要であろう。

以上より本章では、慢性脳低灌流誘発血管性認知障害においてミクログリアが病態促進的な役割を担っていることを示した。今回得られた知見により、ミクログリアが慢性脳低灌流誘発血管性認知障害の治療標的として有望であることが示唆された。

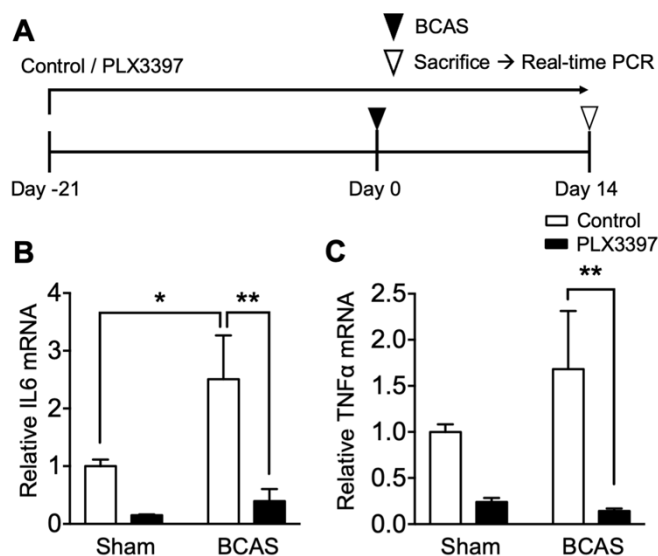


図 2-3. PLX3397 投与マウスでは脳梁における炎症性サイトカインの発現が抑制される (A) リアルタイム PCR の実験タイムコース。 (B, C) 脳梁における IL6 (B) と TNF α (C) mRNA の発現。値は平均値 \pm 標準誤差で表した。 $n=3-4$ 。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

第3章 血管性認知障害におけるアストロサイトの

TRPA1による保護機能

血管性認知障害は、血管性疾患に起因する認知機能低下と定義される症候群である⁸²。加齢や代謝性疾患、動脈硬化、高血圧、肥満⁶⁷、低血圧⁸³などによって惹起される慢性脳低灌流状態は、様々な型の認知症に共通して認められ⁸⁴⁻⁸⁶、慢性脳低灌流に関連する脳小血管病は血管性認知障害の主要な原因となっている^{87,88}。慢性脳低灌流が血管性認知障害の特徴的な所見である白質病変の原因であることを示唆する報告が増えてきている。慢性脳低灌流誘発血管性認知障害マウスモデルにおいて、神経機能障害に先行する白質病変が観察されている^{7,27}。さらにヒトにおいても、様々な型の認知症患者で白質病変が認められる⁶⁸。このように、血管性認知障害における慢性脳低灌流誘発の白質病変の重要性が広く注目されているものの、血管性認知障害病変を検出し制御する正確な分子機構は解明されておらず、血管性認知障害の有効な治療標的は未だ模索されているところである。

TRPチャンネルは、周辺環境の変化や細胞の酸化還元状態を検出するセンサーであり^{89,90}、いくつかのTRPチャンネルが様々な疾患の発症に関与することがこれまでに報告されてきた^{27,61,91,92}。TRPチャンネルの中で、TRPA1は、当初、侵害性の冷刺激感受性チャンネルとして発見された⁹³。TRPA1は末梢神経の侵害受容性感覚ニューロンのサブセットに発現しており、様々な種類の痛みの発生に関与していることが知られている⁹⁴。一方、CNSにおいては、アストロサイト⁹⁵⁻⁹⁷、脳血管内皮細胞⁹⁸、オリゴデンドロサイト⁹⁹などの非神経細胞にもTRPA1が発現していることが知られている。これらの細胞におけるTRPA1は、脳虚血性疾患^{99,100}やアルツハイマー病^{101,102}などの脳血管疾患や認知症において重要な役割を果たすことが報告されているが、TRPA1には病態抑制作用と病態増悪作用の両面が認められ、詳細な寄与について十分な理解は得られていない。これよりTRPA1は血管性疾患における多様なセンサーとして機能していると考えられ、TRPA1を介した分子機構の解明が、血管性認知障害に対する治療薬創出に有望なアプローチとなりうる。

本章では、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害におけるTRPA1の関与を明らかにするため、BCASマウスモデルと遺伝子改変マウス (TRPA1遺伝子欠損 (TRPA1-KO) マウスおよび細胞特異的TRPA1-KOマウス) を使用した。著者は、TRPA1の欠損がBCAS処置による認知機能障害および白質障害を増悪させること、また、アストロサイトにおけるTRPA1刺激を介した白血球阻止因子 (LIF) の増加が慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害に対して保護的な役割を果たすことを明らかにした。本章の成果は、血管性認知障害における白質の完全性を維持するためのTRPA1を介した内在的な保護メカニズムを初めて明らかにしたものである。

実験方法

動物実験

すべての動物実験は、第1章と同様に京都大学動物実験委員会および日本薬理学会の倫理指針に従っ

て実施された。すべての動物実験および研究計画は、京都大学動物実験委員会の承認を得た（承認番号：20-42）。雄の C57BL/6J WT マウス (RRID: IMSR_JAX:000664) は日本 SLC から入手し、TRPA1-KO マウスは、京都大学工学研究科 森泰生 教授より供与していただき、表現型に対するバックグラウンドの影響を排除するために、C57BL/6 J マウス (日本 SLC) と 10 世代にわたって戻し交配し、ゲノム PCR により遺伝子型を確認した。用いたプライマーは以下の通りである。

Fw: 5'-TCA TCT GGG CAA CAA TGT CAC CTG CT-3', Rv: 5'-TCC TGC AAG GGT GAT TGC GTT GTC TA-3'
すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクル下で $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の一定の周囲温度で飼育され、水と飼料を自由に摂取させた。使用動物数は経験的に決定したものであり、過去の報告^{27,103,104}と同程度であった。

アストロサイト特異的 TRPA1-KO (astrocyte-TRPA1-cKO) マウスの作製

Astrocyte-TRPA1-cKO マウスの作製のために、TRPA1 の S5/S6 膜貫通領域を loxP に挟まれたホモ接合マウス (*Trpa1*^{fl/fl}; Jackson Labs, #008650) と *Aldh1l1* promoter/enhancer の制御下に Cre リコンビナーゼが導入されたヘテロ接合型マウス (*Aldh1l1-Cre/ERT2*^{+/-}; Jackson Labs, #029655) を掛け合わせた。産仔の第 1 世代のうち Cre 陽性のマウスを *Trpa1*^{fl/fl} マウスと交配させた。第 2 世代は尾部生検から得たゲノム DNA を用いて PCR により遺伝子型を決定し、*Aldh1l1-Cre/ERT2*^{+/-}; *Trpa1*^{fl/fl} のマウスを *Trpa1*^{fl/fl} マウスと交配させた。Astrocyte-TRPA1-cKO (*Aldh1l1-Cre/ERT2*^{+/-}; *Trpa1*^{fl/fl}) マウスは生存可能で受胎可能であった。対照マウスは、*Trpa1*^{fl/fl} マウスを用いた。組換えを誘導するために、実験に用いた全てのマウス (astrocyte-TRPA1-cKO および対照マウスの両方) に、以前に報告された方法に一部修正を加えて、タモキシフェン (コーン油中 200 mg/kg、1 日 1 回) を隔日 5 日間腹腔内投与した¹⁰⁵。最後のタモキシフェン投与から 14 日後に BCAS または sham 処置を実施した。最初のタモキシフェン投与時、すべてのマウスは 6-9 週齢、体重 20-30 g であり、その後 BCAS または sham 処置は 9-12 週齢のマウスに対して実施した。

内皮細胞特異的 TRPA1-KO (endothelial cell-TRPA1-cKO) マウスの作製

Endothelial cell-TRPA1-cKO マウスの作製のために、*Trpa1*^{fl/fl} マウスと *Tek* promoter/enhancer の制御下に Cre リコンビナーゼが導入されたヘテロ接合型マウス (*Tek-Cre*^{+/-}; RBRC04495 (このマウス系統は、文部科学省/AMED のナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて、理研 BRC から提供された))¹⁰⁶ を掛け合わせた。以下、astrocyte-TRPA1-cKO マウスの作製方法と同様に行い、得た endothelial cell-TRPA1-cKO (*Tek-Cre*^{+/-}; *Trpa1*^{fl/fl}) マウスは生存可能で繁殖可能であった。対照マウスは *Trpa1*^{fl/fl} マウスを用いた。8-12 週齢のマウス (25-35 g) に対して BCAS または sham 処置を行った。

オリゴデンドロサイト系譜細胞特異的 TRPA1-KO (OPC/OL-TRPA1-cKO) マウスの作製

OPC/OL-TRPA1-cKO マウスの作製のために、*Trpa1*^{fl/fl} マウスと *Pdgfra* promoter/enhancer の制御下に Cre リコンビナーゼが導入されたヘテロ接合型マウス (*Pdgfra-Cre*^{+/-}; Jackson Labs, #013148) を掛け合わせた。以下、astrocyte-TRPA1-cKO マウスの作製方法と同様に行い、得た OPC/OL-TRPA1-cKO (*Pdgfra-Cre*^{+/-}; *Trpa1*^{fl/fl}) マウスは生存可能で繁殖可能であった。対照マウスは *Trpa1*^{fl/fl} マウスを用いた。8-12 週齢のマウス (20-30g) に対して BCAS または sham 処置を行った。

両側総頸動脈狭窄処置 (Bilateral common carotid artery stenosis; BCAS)

内径 0.18mm のマイクロコイル (Sawane Spring) を用いて、既報^{27,66,103} 及び第 2 章と同様にマウスに BCAS 処置を行った。BCAS 処置後の中大脳動脈領域の局所脳血流をレーザードップラー流量計 (Omegaflow, Omegawave) により測定した。処置前に測定プローブを側頭筋 (bregma の 2 mm 後方、6 mm 外側) に固定し BCAS 処置 60 分後に局所脳血流を測定した。マウスは BCAS 群と sham 群のいずれかに無作為に割り当てた。

薬物投与

マウスに trans-cinnamaldehyde (100 mg/kg; Tokyo Chemical Industry) を BCAS または sham 処置後 15–24 日目に 1 日 1 回腹腔内注射した。対照群には vehicle (0.5% Tween 80 (Nacalai Tesque) 含有生理食塩水) を投与した。さらに、マウスに SC144 (10 mg/kg; MedChemExpress) を BCAS または sham 処置後 0–10 日目に 1 日 1 回腹腔内注射した。対照群には、vehicle (40% プロピレングリコール、10% DMSO 含有生理食塩水) を投与した。

中和抗体投与

BCAS 処置直後にヤギポリクローナル LIF 中和抗体 (10 µg, 1 mg/ml in PBS; R&D Systems) を脳室内投与した。対照群には、ヤギ IgG (10 µg, 1 mg/ml in PBS; R&D Systems) を脳室内投与した。

初代培養マウスアストロサイト

既報¹⁰⁷ と同様に、生後 0–2 日の WT または TRPA1-KO C57BL/6J マウス的大脑皮質から初代培養アストロサイトを得た。細胞を分散し、10% 熱不活性化 FBS (JRH Biosciences, Lenexa, KS) を添加した EMEM (Nissui Pharmaceutical) 7mL とともに 75 cm² フラスコに播種し 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養を行った。2–4 週間培養した後、フラスコを振盪器を用いて 400 rpm で 10 分間振盪し、ミクログリアを除去した。上清を除去し、新しい培養液を加え、5% CO₂、37°C のインキュベーターで 2 時間培養した。OPC を除去するために、フラスコを 250 rpm、37°C で 16–18 時間、振盪器で振盪した。残ったアストロサイトは 0.25% トリプシン (Nacalai Tesque) で剥離し、新しい培地に再懸濁し、35 mm ディッシュ (20 × 10⁴ cells) または 60 mm ディッシュ (40 × 10⁴ cells) に再播種した。再播種 7 日後に培地を無血清 EMEM に置換し 16–18 時間インキュベートした後、薬物を処置した。細胞は薬物処置 3 時間後に実験に使用した。試薬は以下のものを使用した。

H₂O₂ (100 µM, Nacalai Tesque), PD98059 (10 µM, Cayman), SB203580 (30 µM, Cayman), chelerythrine chloride (1 µM, AdipoGen Life Sciences), BAPTA-AM (10 µM, Nacalai Tesque)

初代培養マウス OPC

生後 0–2 日の WT C57BL/6J マウス的大脑皮質から、初代培養 OPC を得た。大脑皮質を切り出した後、細胞をトリプシン (2.5 mg/mL; Nacalai Tesque) および DNase I (10 mg/mL; Sigma-Aldrich) とともに 37°C で 15 分間インキュベートした。分散した細胞を、10% 熱不活性化 FBS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液 (Nacalai Tesque) を含む Advanced DMEM/F12 medium (Invitrogen) とともに poly-L-ornithine でコーティングした 75 cm² フラスコに播種し、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。10–12 日後、グリア混合培養から 2 段階の手順で OPC を精製した。まず、振盪器を用いて 160 rpm で

2 時間振盪し、ミクログリアを除去した。上清を除去し、新しい培養液を加えた後、アストロサイト層上に生育している OPC を 230 rpm で 16–18 時間振盪して剥離した。上清をコーティングしていない 10 cm ディッシュで 37°C、5% CO₂ で 1 時間半培養し、アストロサイトを除去した。最終的な細胞懸濁液を poly-L-ornithine でコーティングした 10 mm ガラスに再播種し (0.6 × 10⁴ cells)、1×B27 (Invitrogen)、グルタミン (2 mM; Nacalai Tesque)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液、PDGF-AA (10 ng/mL; PeproTech) および basic FGF (10 ng/mL; PeproTech) を加えた Neurobasal medium (Invitrogen) で培養した (これを増殖条件培地として使用した)。培養 OPC は、再播種後 2 日目に培養上清置換実験に使用した。

アストロサイト培養上清

培養上清置換実験のために、アストロサイトの再播種から 6 日後にアストロサイトの培養液を 1×B27 (Invitrogen)、グルタミン (2 mM; Nacalai Tesque)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液を添加した Neurobasal medium (Invitrogen) に置換した。アストロサイトの再播種 7 日後に H₂O₂ (100 μM) の処置後、培養上清を回収し、過去の報告¹⁰⁸と同様に 2,000 × g、4°C で 5 分間遠心分離して細胞および残渣を除去し、使用するまで -80°C で保存した。

新奇物体認識試験 (NORT)

第 1 章および既報^{27,61,103}と同様に NORT による認知機能評価を BCAS または sham 処置 14 日後と 28 日後に行った。探索嗜好性は、discrimination index (DI) としてトレーニング試行時は、(青色の四角錐の探索に費やした時間 - 黄色の三角柱の探索に費やした時間) / (青色の四角錐の探索に費やした時間 + 黄色の三角柱の探索に費やした時間)、テスト試行時は (木製の球の探索に費やした時間 - 黄色の三角柱の探索に費やした時間) / (木製の球の探索に費やした時間 + 黄色の三角柱の探索に費やした時間) で算出した。DI を、認識記憶の指標とした。なお、両物体の総探索時間が 8 秒未満のマウスは除外した。

新奇場所認識試験 (NLRT)

第 1 章および既報⁶¹と同様に NLRT を行った。NORT と同様に、探索嗜好性は、DI として (青色の四角錐の探索に費やした時間 - 黄色の三角柱の探索に費やした時間) / (青色の四角錐の探索に費やした時間 + 黄色の三角柱の探索に費やした時間) で計算され、空間記憶の指標とされた。

ミエリン染色

第 2 章実験方法と同様に行った。

免疫組織化学

免疫蛍光染色: 一次抗体として rabbit anti-Iba1 (1:500; Wako Pure Chemical), rabbit anti-GFAP (1:5000; Abcam), mouse anti-APC (CC1) (1:200; Calbiochem), rat anti-LIF (1:500; Novus Biologicals), goat anti-CNTF (1:100; R&D Systems), mouse anti-MBP (1:500; BioLegend), rabbit anti-PDGFRα (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-OLIG2 (1:1000; GeneTex), or rabbit anti-SOX10 (1:100; Abcam)、蛍光標識二次抗体として AlexaFluor donkey anti-rabbit (488, 594, or 647), anti-mouse (488), anti-rat (488), or anti-goat (594) IgG (1:300; Invitrogen) を用いた。画像は全て bregma + 0.7 mm に位置する脳梁部を撮影し、MBP 陽性面積は

0.0400 mm²の視野で、Iba1、GFAP、CC1 陽性細胞数は 0.125 mm²の視野で、LIF/GFAP 二重陽性細胞面積および CNTF/GFAP 二重陽性細胞面積は 0.0450 mm²の視野で定量した。その他の実験プロトコルは第 1 章実験方法と同様に行った。

NeuN 染色: 第 1 章実験方法と同様に行った。

免疫細胞化学

OPC を 10 mm ガラス上で 2 日間培養した後、分化を評価するために LIF 中和抗体 (10 µg; R&D Systems) またはヤギ IgG (10 µg; R&D Systems) を添加または添加していないアストロサイト培養上清を適用し細胞をさらに 5 日間培養した。細胞を 4% PFA で固定し、3% ウシ血清アルブミンと 0.1% トリトン X-100 を含む PBS で 10 分間ブロッキングした。一次抗体として、rabbit anti-PDGFRα (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) 及び mouse anti-MBP (1:500; BioLegend) を処置し 4°C で一晩インキュベートした。次に、蛍光標識二次抗体として AlexaFluor donkey anti-rabbit (594) and anti-mouse (488) IgG (1:300; Invitrogen) を処置し、室温、暗所で 1.5 時間標識した。DAPI Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates) で核を染色した後、FluoView FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus) を用いて蛍光画像を取得した。

ウェスタンブロッティング

既報²²と同様に、全細胞溶解液を用いて行った。60 mm ディッシュで培養した初代培養アストロサイトを回収し、0.1% phosphatase inhibitor cocktails 2 および 3 (Sigma-Aldrich) を添加した SDS (Nacalai Tesque) 入り RIPA buffer で溶解させた。溶解液の一部を等量のサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 6% 2-mercaptoethanol with bromophenol blue, pH 6.8) で希釈し、10% SDS ポリアクリルアミドゲルにローディングした。タンパク質を Immobilon-PPVDF transfer membranes (Millipore) に転写した。転写後のメンブレンをブロッキングし、一次抗体として、rabbit anti-phospho-p38 MAPK (1:500), rabbit anti-p38 MAPK (1:500), rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000), rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000; all from Cell Signaling Technology), or mouse anti-β-actin (1:20000; Sigma-Aldrich) を処置し 4°C で一晩インキュベートした。翌日、メンブレンを 0.1% (v/v) Tween-20 含有トリス緩衝食塩水で短時間洗浄し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体として、donkey anti-rabbit IgG (1:5000; Cytiva) または goat anti-mouse IgG (1:20000; Jackson ImmunoResearch) を用いて室温で 1 時間インキュベートした。その後、immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore) を用いて陽性のバンドを検出した。

RNA sequencing (RNAseq)

ISOGEN 試薬 (Nippon Gene) を用いて、製造元のプロトコルに従って脳梁から total RNA を単離した。RNAseq 解析のために、total RNA から poly(A)+ RNA を取り出し、逆転写した。NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina により、製造元の指示に従い、ライブラリーを調製した。調製したライブラリーを NovaSeq 6000 で sequence した。クリーンリードは、HISAT version 2.1.0¹⁰⁹ を用いてマウスリファレンスゲノム GRCm38 にマッピングした。遺伝子発現は、subread version 2.0.1¹¹⁰ と edgeR version 3.34.1¹¹¹ を用いて計算し、対数変換した (例えば、発現量 8 (=2³) は 3 に、発現量 128 (=2⁷) は 7 となる)。反応性アストロサイトマーカー遺伝子セットは以前の報告¹¹²から入手し、アストロサイト関連 GO タームの上位 3 つ (GO:0014002, GO:0043615, GO:0048708) に含まれる遺伝子は QuickGO

(<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>) から入手した¹¹³。遺伝子と遺伝子セットの間の関連性の強さが 2.8 以上であることを表す標準化値を持つ遺伝子を解析に使用した。反応性アストロサイトのマーカー遺伝子の群間 Z スコア差は、トランスクリプトームプロファイリングに使用した。ヒートマップ可視化のため、対数変換した遺伝子発現をさらに標準化し (平均 = 0、分散 = 1)、群間の Z スコアの標準化値を Prism 9 ソフトウェア (GraphPad Software) を用いてヒートマップとして可視化した。GO 解析は、HOMER version 4.11¹¹⁴ を用いて行った。発現変動遺伝子は、 $p < 0.05$ によって定義された。オリジナルの sequence データセットは、NCBI sequence read archive にアクセス番号 GSE201513 で寄託された。

リアルタイム PCR

RNAseq の項で述べたように、マウス脳梁または 35 mm ディッシュで培養したアストロサイトから total RNA を単離した。次に、脳梁と培養アストロサイトのそれぞれ 1 μ g または 500 ng の total RNA から、ReverTra Ace® (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。全量 10 μ l (12.5 ng の cDNA と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, Toyobo) で反応を行った。その他の実験プロトコルは第 1 章実験方法と同様に行った。用いたマウス用のプライマーは以下の通りである。

TRPA1 (Fw: 5'-AGG TGA TTT TTA AAA CAT TGC TGA G-3', Rv: 5'-CTC GAT AAT TGA TGT CTC CTA GCA T-3'), GFAP (Fw: 5'-AGG GCG AAG AAA ACC GCA TC-3', Rv: 5'-GGT GAG CCT GTA TTG GGA CA-3'), LIF (Fw: 5'-AAA AGC TAT GTG CGC CTA ACA-3', Rv: 5'-GTA TGC GAC CAT CCG ATA CAG-3'), CNTF (Fw: 5'-GAC CTG ACT GCT CTT ATG GAA TCT-3', Rv: 5'-GCC TGG AGG TTC TCT TGG A-3'), 18S rRNA (Fw: 5'-GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG-3', Rv: 5'-GGC CTC ACT AAA CCA TCC AA-3')

Magnetic-activated cell sorting (MACS)

全脳を摘出、細断し、ハンクス平衡塩溶液で洗浄した。400 \times g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、collagenase D (5 mg / 6 mL / brain in 2% FBS in PBS) と DNase I (60 μ L, 10 mg/mL; Sigma-Aldrich) で 37°C で穏やかに振盪しながら 1 時間酵素的細胞分散を行った。分散した細胞を 30% Percoll (Sigma-Aldrich) に懸濁し、700 \times g、20°C で 30 分間遠心分離した。ミエリンを含む上清を捨て、ペレットを冷 MACS buffer (2 mM EDTA、0.5% ウシ血清アルブミン含有 PBS, pH7.2) に再懸濁させた。細胞ペレットを FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec) 中に再懸濁し、4°C で 10 分間インキュベートした。次に anti-ACSA2 Magnetic Microbeads (Miltenyi Biotec) を加え、4°C で 15 分間インキュベートした。MACS buffer で洗浄後、300 \times g、4°C で 10 分間遠心し、上清を除去した後、MACS buffer に再懸濁した細胞を Magnetic Separator (Miltenyi Biotec) で固定した MS column (Miltenyi Biotec) にアプライした。ACSA-2 陽性アストロサイトと ACSA-2 陰性 flow-through の total RNA を単離し、リアルタイム PCR の項と同様に cDNA を合成し、遺伝子発現を評価した。

BBB 透過性の評価

麻酔後、蛍光トレーサーであるフルオレセインナトリウムを静脈内注射した (40 mg/kg)。30 分後、脳を摘出し、ミエリン染色の項と同様に厚さ 20 μ m の凍結冠状切片を作製した。蛍光画像は FluoView FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus) で取得した。フルオレセインナトリウムの陽性面積は、bregma + 0.7 mm に位置する脳梁部の 0.125 mm² の視野で定量した。

統計解析

統計解析は、Prism 9 ソフトウェア (GraphPad Software) を用いて行った。単一の実験群と対照群との比較には、Student's t-test または Welch's t-test を使用した。複数の実験群間の比較には、one-way ANOVA および Tukey's post-hoc test または two-way ANOVA および Bonferroni's post-hoc test または Dunnett's post-hoc test を適宜使用した。その他は第 1 章実験方法と同様に行った。

実験結果

BCAS 処置による認知機能障害と白質傷害への TRPA1 欠損の影響

血管性認知障害における TRPA1 の関与を調べるため、リアルタイム PCR を用いて TRPA1 mRNA の発現を評価した。脳梁の TRPA1 mRNA 発現は、BCAS 処置 14 日後では変化しなかったが、28 日後において増加した (図 3-1A-C)。

次に、WT および TRPA1-KO マウスにおいて、BCAS 処置 14 日後および 28 日後の認知機能および白質ミエリン密度を評価した。まず、BCAS 処置により、60 分後の局所脳血流がベースライン比の約 65% まで減少し、この変化は WT マウスと TRPA1-KO マウス間で差が認められなかった (図 3-1D)。認知機能を評価するために、新奇物体認識試験を行った (図 3-2A, B)。慢性脳低灌流の初期段階である BCAS 処置 14 日後において、新奇物体の認識指数 (DI) はトレーニング試行において群間で差がなかった (図 3-2C)。しかし、テスト試行において、BCAS 処置をした TRPA1-KO マウスでは、sham 処置をした TRPA1-KO マウスと比較して DI が有意に減少した一方で、BCAS 処置後の WT マウスでは、sham 処置後の WT マウスと比較してそのような DI の減少は観察されなかった (図 3-2D)。また、2 つの物体に対する総探索時間には群間で差がなく、全ての群で同様の探索行動を示した (図 3-3A, B)。白質傷害は血管性認知障害の特徴的な所見であるため^{7,27}、BCAS 誘発血管性認知障害マウスモデルにおける白質傷害を評価するため、脳梁で Fluoromyelin によるミエリン染色を行った。認知機能障害と同様に、BCAS 処置 14 日後において、BCAS 処置をした TRPA1-KO マウスでは、sham 処置をした TRPA1-KO マウスと比較してミエリン密度が有意に減少した一方で、sham 処置をした WT マウスと BCAS 処置をした WT マウスの間では差が認められなかった (図 3-2E, F)。さらに白質傷害を詳細に評価するために、CC1 (オリゴデンドロサイトのマーカー) と MBP (成熟オリゴデンドロサイトのマーカー) の免疫染色を行った。ミエリン染色と同様に、BCAS 処置 14 日後において、BCAS 処置をした TRPA1-KO マウスでは、脳梁の CC1 陽性細胞数および MBP 陽性面積が減少していた一方で、WT マウスでは群間に差は認められなかった (図 3-3C-F)。さらに、オリゴデンドロサイト系譜細胞の関与を調べるために、OLIG2、SOX10 (オリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカー)、PDGFR α (オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) のマーカー) の免疫染色を行った。BCAS 処置をした TRPA1-KO マウスでは OLIG2 陽性細胞数が減少する傾向が見られたものの、オリゴデンドロサイト系譜細胞や OPC の数に群間で差は認められなかった (図 3-3G-L)。これらの結果は、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害では TRPA1 欠損が成熟オリゴデンドロサイト数の減少を悪化させるが、OPC などの未成熟なオリゴデンドロサイト系譜細胞には影響しないことを示唆するものであった。

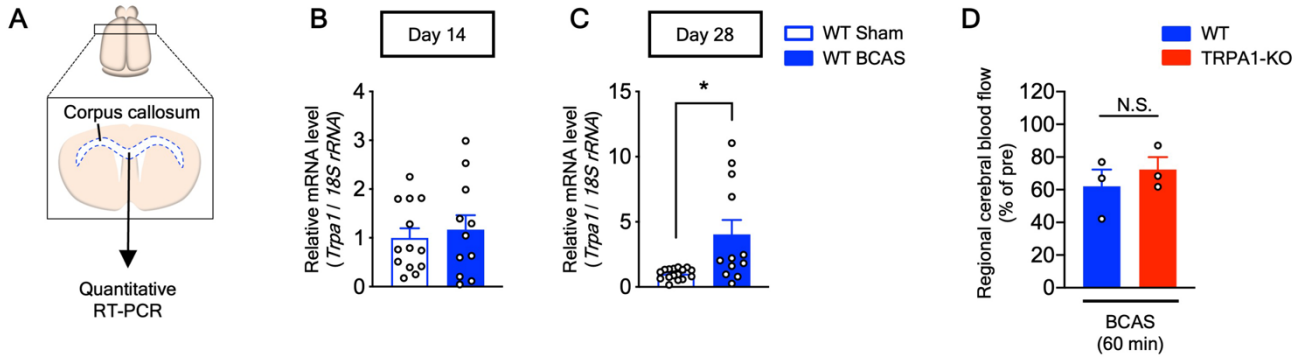


図 3-1. BCAS 処置 28 日後の脳梁において TRPA1 mRNA の発現が増加する

(A) 脳梁におけるリアルタイム PCR の模式図。(B, C) BCAS 処置 14 日後 (B) および 28 日後 (C) の脳梁における TRPA1 mRNA の発現量。(D) BCAS 処置 60 分後の中大脳動脈領域における局所脳血流のベースラインと比較した際の割合。値は平均値 ± 標準誤差で表した。(B) $n = 11-13$; (C) $n = 12-16$; (D) $n = 3$. * $P < 0.05$.

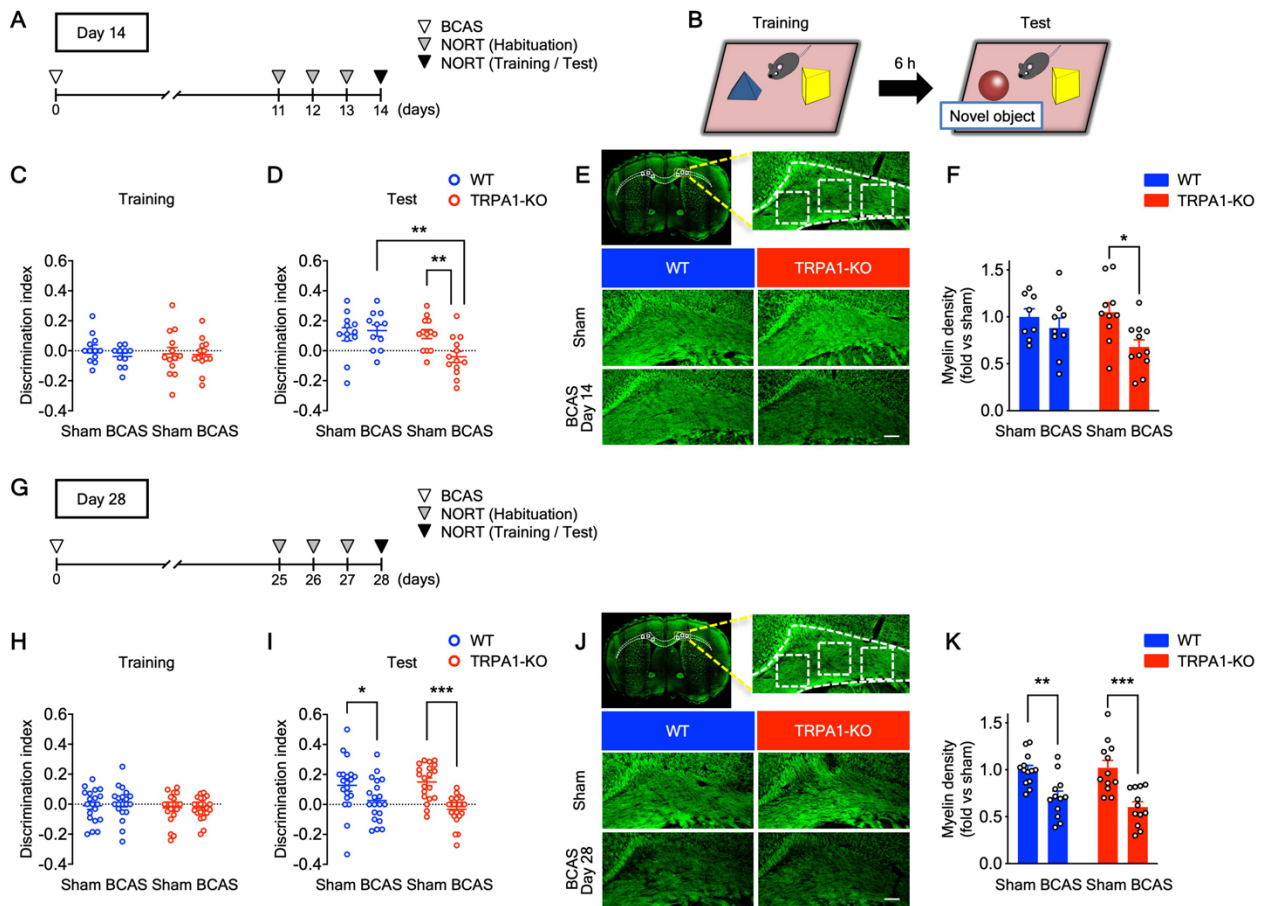


図 3-2. BCAS 処置により、TRPA1-KO マウスでは 14 日目に認知障害と白質障害が認められるが、WT マウスでは認められない

(A, B, G) BCAS 処置 14 日後 (A) および 28 日後 (G) の実験タイムコースと NORT の模式図 (B)。(C, D, H, I) BCAS 処置 14 日後 (C, D) と 28 日後 (H, I) のトレーニング試行 (C, H) で青い四角錐を、テスト試行 (D, I) で木製の球を探索した際の DI。(E, F, J, K) BCAS 処置 14 日後 (E, F) と 28 日後 (J, K) における脳梁のミエリン染色の代表画像 (E, J) および相対ミエリン密度の定量データ (F, K)。白い破線で囲まれた領域が脳梁、白い四角で囲まれた領域が定量化された領域 (E, J)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μm 。(C, D) $n = 11-13$; (F) $n = 8-11$; (H, I) $n = 20-22$; (K) $n = 12-13$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

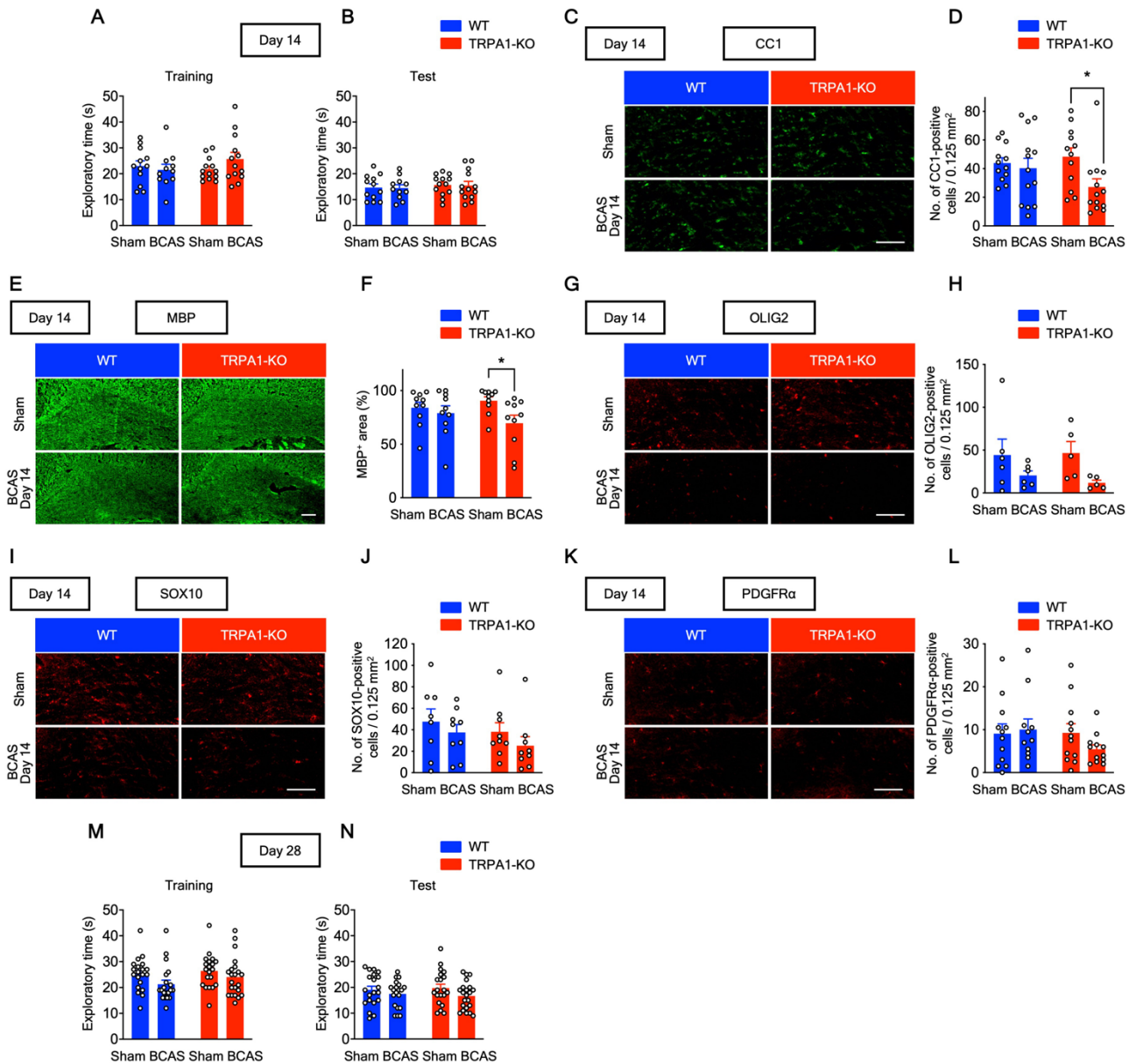


図 3-3. NORT における総探索時間は群間で同程度であり、BCAS 処置により、TRPA1-KO マウスでは 14 日目に成熟オリゴデンドロサイト数が減少するが、WT マウスでは減少しない

(A, B, M, N) BCAS 処置 14 日後 (A, B) および 28 日後 (M, N) のトレーニング試行 (A, M) およびテスト試行 (B, N) における総探索時間。(C-L) BCAS 処置 14 日後の脳梁における抗 CC1、MBP、OLIG2、SOX10、または PDGFR α 抗体による免疫染色の代表画像 (C, E, G, I, K) および CC1、OLIG2、SOX10 または PDGFR α 陽性細胞数 (D, H, J, L) と MBP 陽性面積の割合 (F) に関する定量データ。値は平均値 \pm 標準誤差で表した。Scale bar: 100 μ m. (A, B) $n = 11-13$; (D) $n = 12-13$; (F) $n = 10$; (H) $n = 5-6$; (J) $n = 8-9$; (L) $n = 11-12$; (M, N) $n = 20-22$. * $P < 0.05$.

慢性脳低灌流の中・後期段階である BCAS 処置 28 日後 (図 3-2G) において、新奇物体認識試験のトレーニング試行の DI に群間で差はなかった (図 3-2H)。一方テスト試行において、WT および TRPA1-KO マウスともに、BCAS 処置 28 日後では、BCAS 処置をしたマウスは sham 処置をしたマウスと比較して DI が有意に減少した (図 3-2I)。2 つの物体に対する総探索時間は、群間で同程度であった (図 3-3M, N)。認知機能障害と同様に、BCAS 処置 28 日後において、BCAS 処置をした WT および TRPA1-KO マウスは sham 処置をしたマウスと比較して、ミエリン密度が著しく減少していた (図 3-2J, K)。

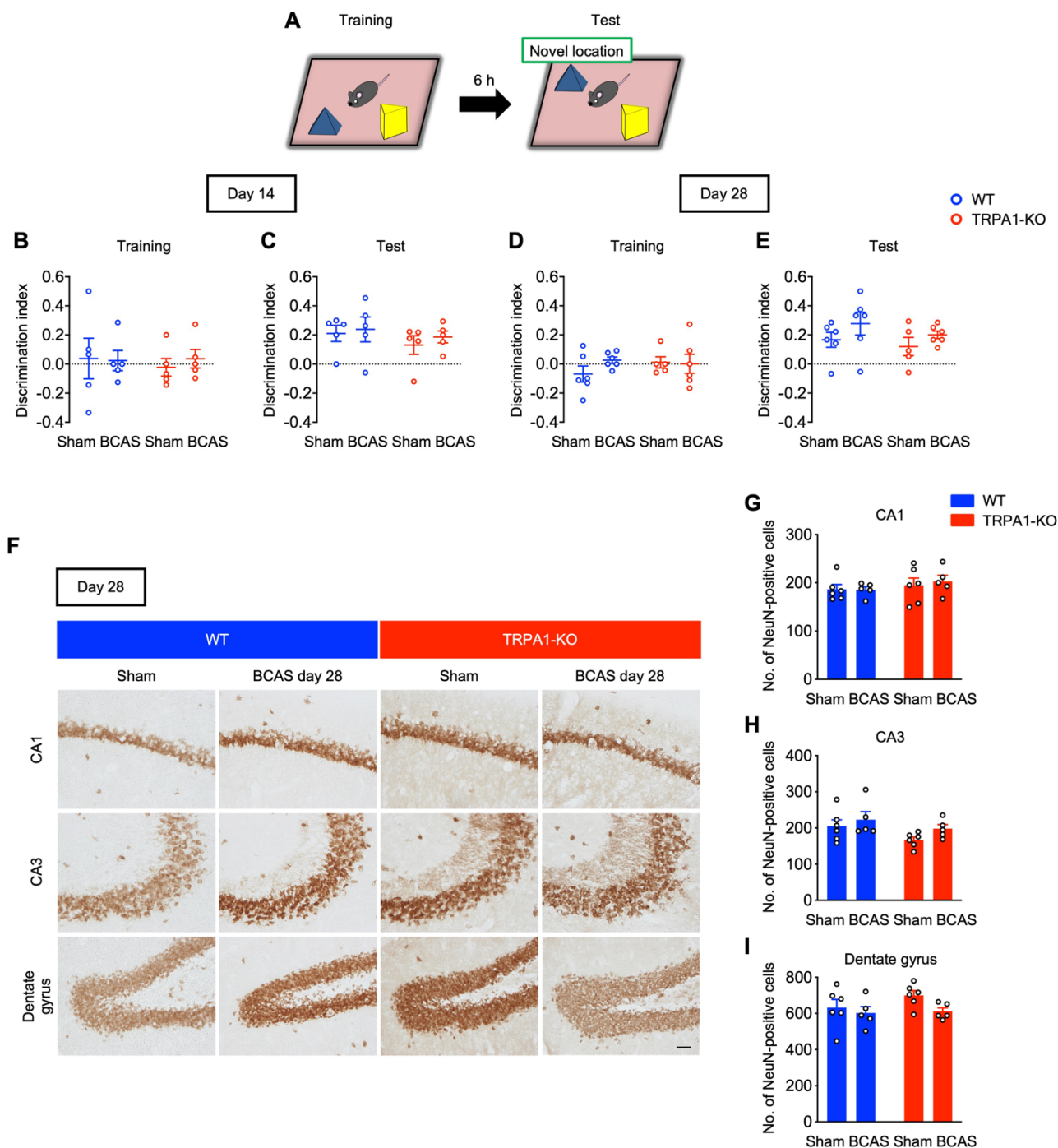


図 3-4. BCAS 処置は、空間記憶機能障害や海馬の神経細胞傷害は惹起しない

(A) NLRT 模式図。(B-E) BCAS 処置 14 日後 (B, C) と 28 日後 (D, E) のトレーニング試行(B, D) とテスト試行 (C, E) で青い四角錐を探索したときの DI。(F-I) BCAS 処置 28 日後の海馬における抗 NeuN 抗体による免疫染色の代表画像 (F)、および CA1 (G)、CA3 (H)、歯状回 (I) における NeuN 陽性細胞数の定量データ。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bar: 10 μ m。(B, C) $n = 5$; (D, E, G, H, I) $n = 5-6$ 。

次に、空間記憶機能を評価するために、新奇場所認識試験を行った (図 3-4A-E)。BCAS 処置 14 日後の DI は群間で差がなく、全ての群で再配置された物体への嗜好性が見られた (図 3-4 B, C)。BCAS 処置 14 日後と同様に、28 日後においても DI に群間で差は認められなかった (図 3-4D, E)。さらに、空間記憶を含む認知機能に重要な役割を果たす海馬の神経細胞数を評価するために、神経細胞のマーカーである NeuN による免疫染色を行った。BCAS 処置 28 日後の海馬 CA1、CA3、歯状回における NeuN 陽性細胞数は、群間で差は認められなかった (図 3-4F-I)。これらの結果は、過去の研究²⁷と一致し、28 日間の慢性

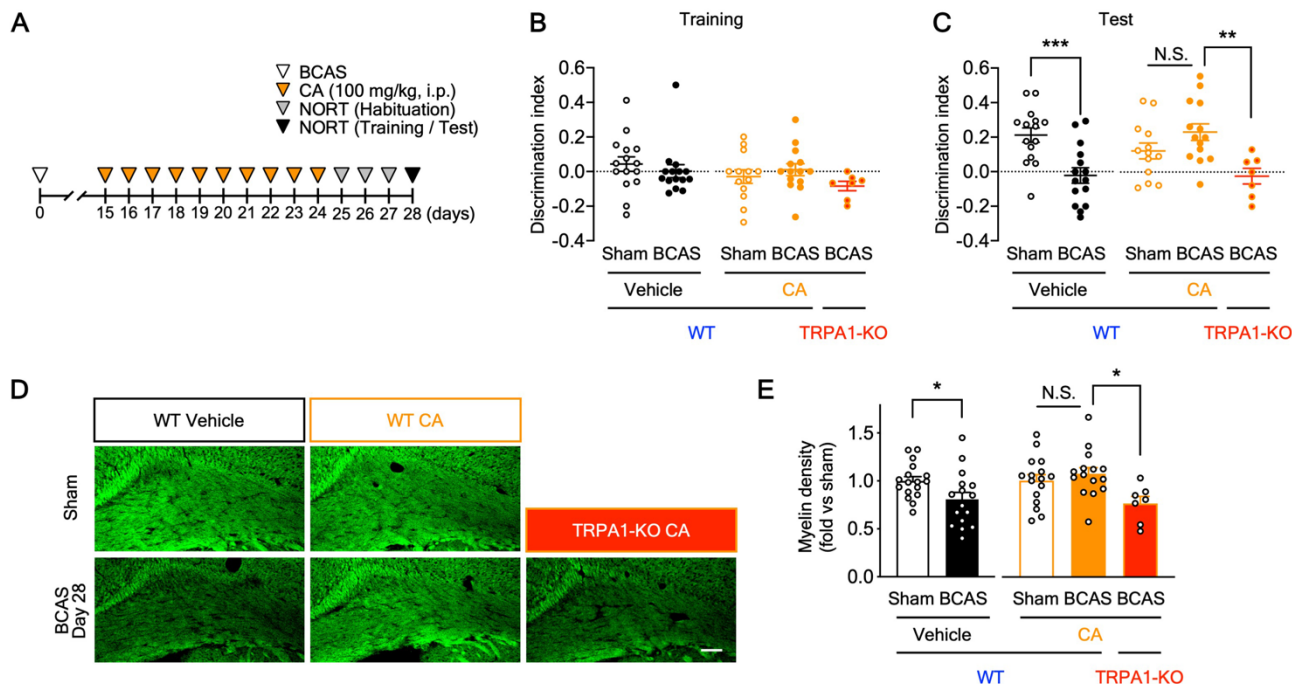


図 3-5. TRPA1 アゴニストであるシナムアルデヒド (CA) は、BCAS 処置による認知機能障害および白質傷害を減弱させる

(A) CA 投与と NORT の実験タイムコース。(B, C) BCAS 処置 28 日後のトレーニング試行 (B) における青い四角錐とテスト試行 (C) における木製の球を探索した際の DI。(D, E) BCAS 処置 28 日後の脳梁のミエリン染色の代表画像 (D) および相対的ミエリン密度の定量データ (E)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bar: 100 μm。(B, C) $n = 15$ (vehicle), $n = 7-14$ (CA); (E) $n = 16-17$ (vehicle), $n = 7-16$ (CA). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

脳低灌流状態は空間記憶機能障害や海馬の神経細胞死を誘発しないことを示唆している。以上より、TRPA1 の欠損は慢性脳低灌流により惹起される血管性認知障害および白質傷害を悪化・早期化させることが示された。

BCAS 処置による認知機能障害と白質傷害への TRPA1 刺激の影響

TRPA1 刺激の効果を調べるため、BCAS 処置後 15-24 日目に TRPA1 アゴニストであるシナムアルデヒド (CA) を連日腹腔内投与した (図 3-5A)。新奇物体認識試験において、トレーニング試行では、DI に群間で差は認められなかった (図 3-5B)。テスト試行では、vehicle を投与した BCAS 処置 WT マウスで DI が有意に低下したが、CA を投与した BCAS 処置 WT マウスでは DI の低下は認められなかった (図 3-5C)。一方で、BCAS 処置をした TRPA1-KO マウスでは CA 投与による DI 低下の抑制効果が消失した (図 3-5C)。2 つの物体に対する総探索時間には、群間で差は認められなかった (図 3-6A, B)。認知機能と同様に、vehicle を投与した BCAS 処置 WT マウスでミエリン密度が有意に低下したが、CA を投与した BCAS 処置 WT マウスではそのような低下は認められず、さらに BCAS 処置をした TRPA1-KO マウスでは CA 投与によるミエリン密度低下の抑制効果は消失し、有意にミエリン密度が低下した (図 3-5D, E)。以上のことから、TRPA1 刺激により、BCAS 処置で惹起される血管性認知障害や白質傷害などの症状が改善されることが明らかとなった。

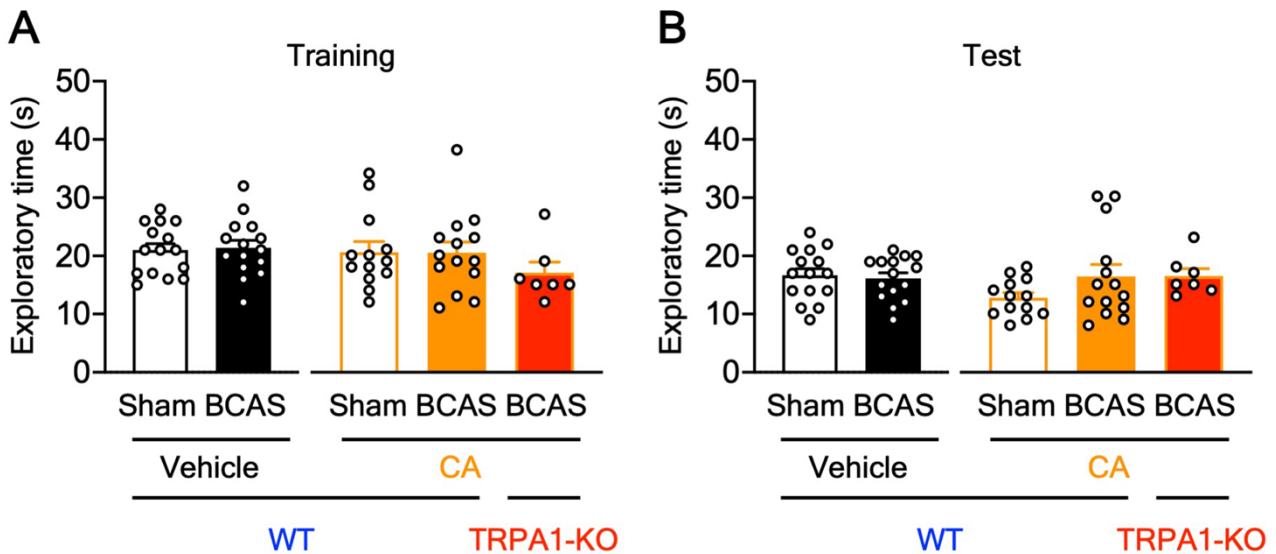


図 3-6. シンナムアルデヒド (CA) 連日投与後の NORT において、総探索時間は群間で同程度である (A, B) BCAS 処置 28 日後のトレーニング試行 (A) およびテスト試行 (B) における総探索時間。値は平均値 ± 標準誤差で表した。(A, B) $n = 15$ (vehicle), $n = 7-14$ (CA)。

BCAS 処置によるアストロサイト数の増加への TRPA1 欠損の影響

過去のいくつかの研究で、グリア細胞の活性化が血管性認知障害の症状に関与していることが示唆されている^{7,103}。WT マウスと TRPA1-KO マウスの BCAS 処置後の血管性認知障害、白質傷害の症状の違いにどのグリア細胞が寄与するかを特定するために、脳梁で Iba1 (ミクログリア/マクロファージのマーカー、図 3-7A-D) および GFAP (アストロサイトのマーカー、図 3-7E-H) の免疫染色を行った。BCAS 処置をしたマウスでは、sham 処置をしたマウスと比較して Iba1 陽性細胞数が増加する傾向にあり、BCAS 処置をした TRPA1-KO マウスでは処置 28 日後に有意な増加が認められた (図 3-7A-D)。一方 BCAS 処置 14 日後において、BCAS 処置をした WT マウスでは、sham 処置をした WT マウスと比較して GFAP 陽性細胞数が増加したが、TRPA1-KO マウスでは増加しなかった (図 3-7E, F)。処置 14 日後と同様に、処置 28 日後には BCAS 処置をした WT マウスで GFAP 陽性細胞数が増加したが、TRPA1-KO マウスでは増加しなかった (図 3-7G, H)。次に、脳梁における GFAP mRNA の発現をリアルタイム PCR で評価した (図 3-7I)。BCAS 処置 14 日後において、BCAS 処置をした WT マウスでは GFAP mRNA の発現が増加したが、TRPA1-KO マウスでは増加しなかった (図 3-7J)。これらの結果は、TRPA1 の欠損が慢性脳低灌流における GFAP 陽性アストロサイト数の増加を妨げるが、Iba1 陽性細胞数には影響を与えないことを示している。

BCAS 処置による認知機能障害と白質傷害へのアストロサイト特異的な TRPA1 欠損の影響

次に、TRPA1 が血管性認知障害において機能的に関与している細胞を明らかにした。TRPA1 は、脳ではアストロサイト⁹⁵、血管内皮細胞⁹⁸、オリゴデンドロサイト⁹⁹などで機能的に発現していることが知られている。そこで、アストロサイト、血管内皮細胞、オリゴデンドロサイト系譜細胞それぞれの特異的な TRPA1-KO マウスを作製した。アストロサイト特異的 TRPA1-KO (astrocyte-TRPA1-cKO) マウスは、ホモ接合型 *Trpa1^{fl/fl}* マウスとヘテロ接合型 *Aldh1l1-Cre/ERT2^{+/-}* マウスを交配して作製した (図 3-8A)。組換え誘導のため、タモキシフェンを隔日 5 日間腹腔内投与し、タモキシフェンの最終投与日から 14 日後に

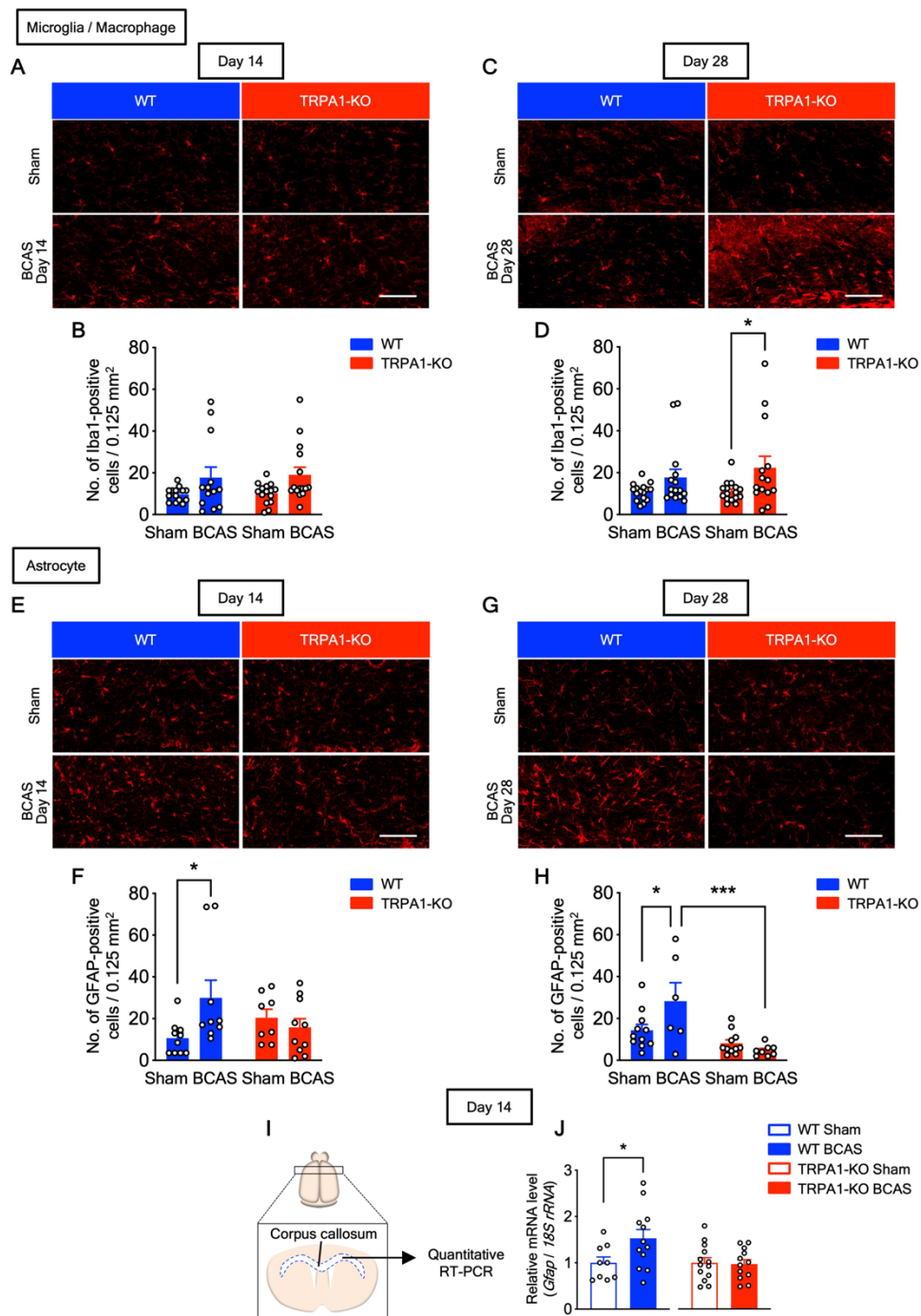


図 3-7. BCAS 処置により WT マウスでは GFAP 陽性アストロサイト数を増加させるが、TRPA1-KO マウスでは増加させない (A-D) BCAS 処置 14 日後 (A, B) および 28 日後 (C, D) の脳梁における抗 Iba1 抗体による免疫染色の代表画像 (A, C) および Iba1 陽性細胞数の定量データ (B, D)。 (E-H) BCAS 処置 14 日後 (E, F) および 28 日後 (G, H) の脳梁における抗 GFAP 抗体による免疫染色の代表画像 (E, G) および GFAP 陽性細胞数の定量データ (E, H)。 (I) 脳梁でのリアルタイム PCR の模式図。 (J) BCAS 処置 14 日後の脳梁における GFAP mRNA の発現量。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μm. (B) $n = 13-15$; (D) $n = 14-16$; (F) $n = 8-10$; (H) $n = 6-11$; (J) $n = 9-12$ (WT), $n = 12-13$ (TRPA1-KO). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

BCAS または sham 処置を行った (図 3-8B)。BCAS 処置 14 日後の新奇物体認識試験において、トレーニング試行では、DI に群間で差は認められなかった (図 3-8C)。一方テスト試行では、BCAS 処置をした astrocyte-TRPA1-cKO マウスで DI が有意に減少したが、対照群では DI の減少は認められなかつた (図 3-8D)。

2 つの物体に対する総探索時間に差はなく、全ての群で同様の探索行動をとることが示された (図 3-10A, B)。さらに、認知機能と同様に、BCAS 処置 14 日後において、BCAS 処置をした astrocyte-TRPA1-cKO マウスでミエリン密度が有意に減少したが、対照群ではミエリン密度の減少は認められなかつた (図 3-8E, F)。

さらに、血管内皮細胞特異的 TRPA1-KO (endothelial cell-TRPA1-cKO) およびオリゴデンドロサイト系特異的 TRPA1-KO (OPC/OL-TRPA1-cKO) マウスをそれぞれホモ接合型 *Trpa1^{fl/fl}* マウスとヘテロ接合型 *Tek-Cre^{+/-}* マウスまたは *Pdgfra-Cre^{+/-}* マウスを交配して作製した (図 3-9A, B, G, H)。BCAS 処置 14 日後において、astrocyte-TRPA1-cKO マウスと同様に、新奇物体認識試験のトレーニング試行では、endothelial cell-TRPA1-cKO、OPC/OL-TRPA1-cKO マウス共に DI に群間で差は認められなかつた (図 3-9C, I)。しか

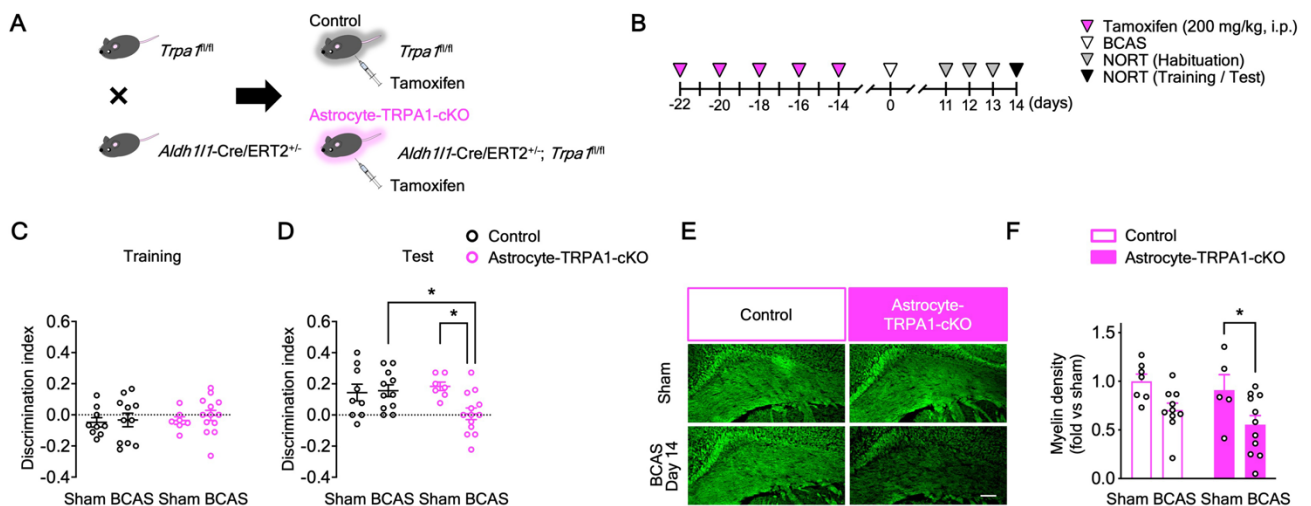


図 3-8. BCAS 処置により、astrocyte-TRPA1-cKO マウスでは 14 日目に認知機能障害と白質傷害が認められる

(A) タモキシフェンによる astrocyte-TRPA1-cKO マウスおよび対照マウスを得るための模式図。(B) タモキシフェン投与と NORT の実験タイムコース。(C, D) BCAS 処置 14 日後のトレーニング試行 (C) における青色の四角錐、テスト試行 (D) における木製の球を探索した際の DI。(E, F) BCAS 処置 14 日後の脳梁のミエリン染色の代表画像 (E) とミエリン相対密度の定量データ (F)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bar: 100 μ m。(C, D) $n = 7-13$; (F) $n = 5-11$ 。* $P < 0.05$ 。

しながら astrocyte-TRPA1-cKO マウスとは対照的に、endothelial cell-TRPA1-cKO、OPC/OL-TRPA1-cKO マウスでは共に、BCAS 処置によってもテスト試行における DI の減少は認められなかった (図 3-9D, J)。また、2 つの物体に対する総探索時間は、全ての群で同程度であった (図 3-10C-F)。さらに、認知機能と同様に、BCAS 処置 14 日後において、endothelial cell-TRPA1-cKO、OPC/OL-TRPA1-cKO マウス共に、BCAS 処置によってもミエリン密度の減少は認められなかった (図 3-9E, F, K, L)。

これらの結果は、血管内皮細胞やオリゴデンドロサイト系譜細胞ではなく、アストロサイトにおける TRPA1 の欠損が慢性脳低灌流により惹起される血管性認知障害および白質傷害を悪化させること、そして TRPA1 が慢性脳低灌流誘発血管性認知障害の初期にアストロサイトで機能的に関与していることを示唆している。

BCAS 処置により WT マウスで認められるアストロサイト関連遺伝子の増加への TRPA1 欠損の影響

TRPA1 による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害および白質傷害の抑制の分子機構を明らかにするため、sham 処置および BCAS 処置をした WT および TRPA1-KO マウスの脳梁で RNA sequencing (RNAseq) を行った (図 3-11A)。本章の結果より、脳梁における GFAP 陽性細胞数および GFAP mRNA 発現量が BCAS 処置により WT マウスで増加したが、TRPA1-KO マウスでは認められなかった (図 3-7)。また、アストロサイトは CNS の傷害および疾患において反応性プロファイルを示すことが広く知られている¹¹²。そこで、RNAseq により BCAS 処置後の反応性アストロサイトマーカーの発現を評価したところ、反応性アストロサイトのマーカー遺伝子¹¹²は、BCAS 処置をした WT マウスで発現が上昇したが、TRPA1-KO マウスでは上昇しなかった (図 3-11B)。また、BCAS 処置をした WT マウス (BCAS 処置 7、10、14 日後) と TRPA1-KO マウス (BCAS 処置 7、10、14 日後) 間で発現量の異なる遺伝子について Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を行うと、アストロサイト関連タームが濃縮されていた (図 3-11C)。慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害においてアストロサイトの TRPA1 刺激下で機能する分子を検出するために、アストロサイト関連 GO タームの上位 3 つ (GO:0014002, GO:0043615, GO:0048708) に含まれる遺伝子をヒートマップで可視化した (図 3-11D)。ヒートマップから、BCAS 処置をした WT マウスで発現が上昇した

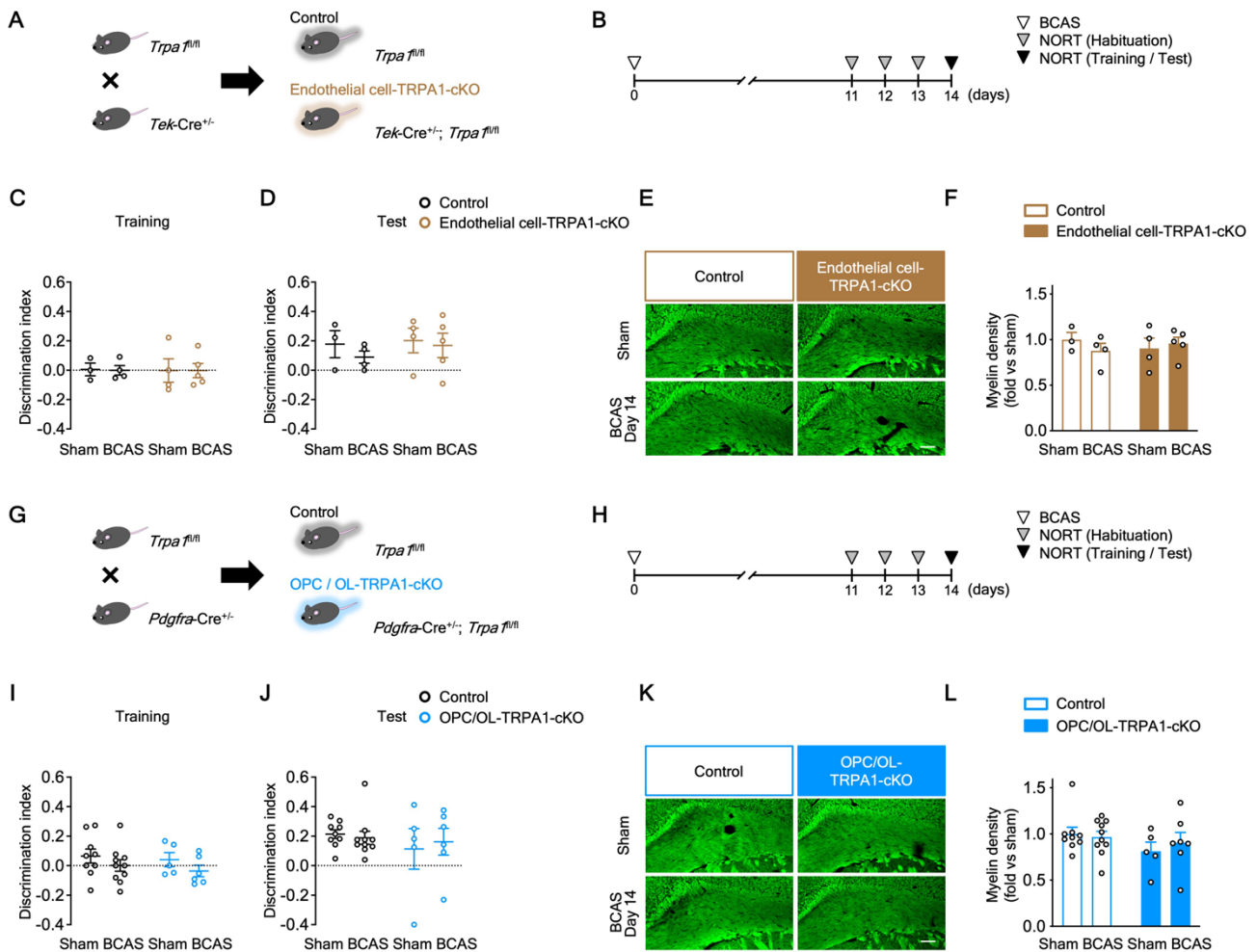


図 3-9. Endothelial cell-TRPA1-cKO および OPC/OL-TRPA1-cKO マウスは、BCAS 処置 14 日目に認知機能障害および白質傷害を示さない

(A, G) Endothelial cell-TRPA1-cKO (A) または OPC/OL-TRPA1-cKO (G) および対照マウスを得るための模式図。(B, H) NORT の実験タイムコース。(C, D, I, J) BCAS 処置 14 日後のトレーニング試行 (C, I) における青色の四角錐、テスト試行 (D, J) における木製の球を探索した際の DI。(E, F, K, L) BCAS 処置 14 日後の脳梁のミエリン染色の代表画像 (E, K) とミエリン相対密度の定量データ (F, L)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μm. (C, D, F) $n = 3-5$; (I, J, L) $n = 5-10$.

が、TRPA1-KO マウスでは上昇しない 19 の遺伝子が示された。これらの中で、LIF は、髄鞘形成の促進作用¹¹⁵、クプリゾンによる脱髄に対する保護機能¹¹⁶、低酸素虚血性脳傷害における神経機能傷害の改善作用¹¹⁷などが報告されており、アストロサイトから LIF の放出が促進されることも知られている^{115,118}。これより、LIF は血管性認知障害を予防、治療する有望な候補であると考えた。

BCAS 処置による LIF の増加への TRPA1 欠損の影響

次に、BCAS 処置 14 日後の脳梁における LIF mRNA の発現をリアルタイム PCR により評価した (図 3-12A, B)。Sham 処置をした WT マウスと比較し、BCAS 処置をした WT マウスでは、LIF mRNA の発現が増加したが、TRPA1-KO マウスでは発現増加は認められなかった (図 3-12B)。アストロサイトでの LIF mRNA の発現を評価するために、抗 ACSA-2 抗体を用いて magnetic-activated cell sorting (MACS) によりマウス全脳からアストロサイトを分取した (図 3-12C-E)。分取したアストロサイトにおける LIF mRNA の発現は、BCAS 処置をした WT マウスで増加したが、TRPA1-KO マウスでは差は認められなかった (図

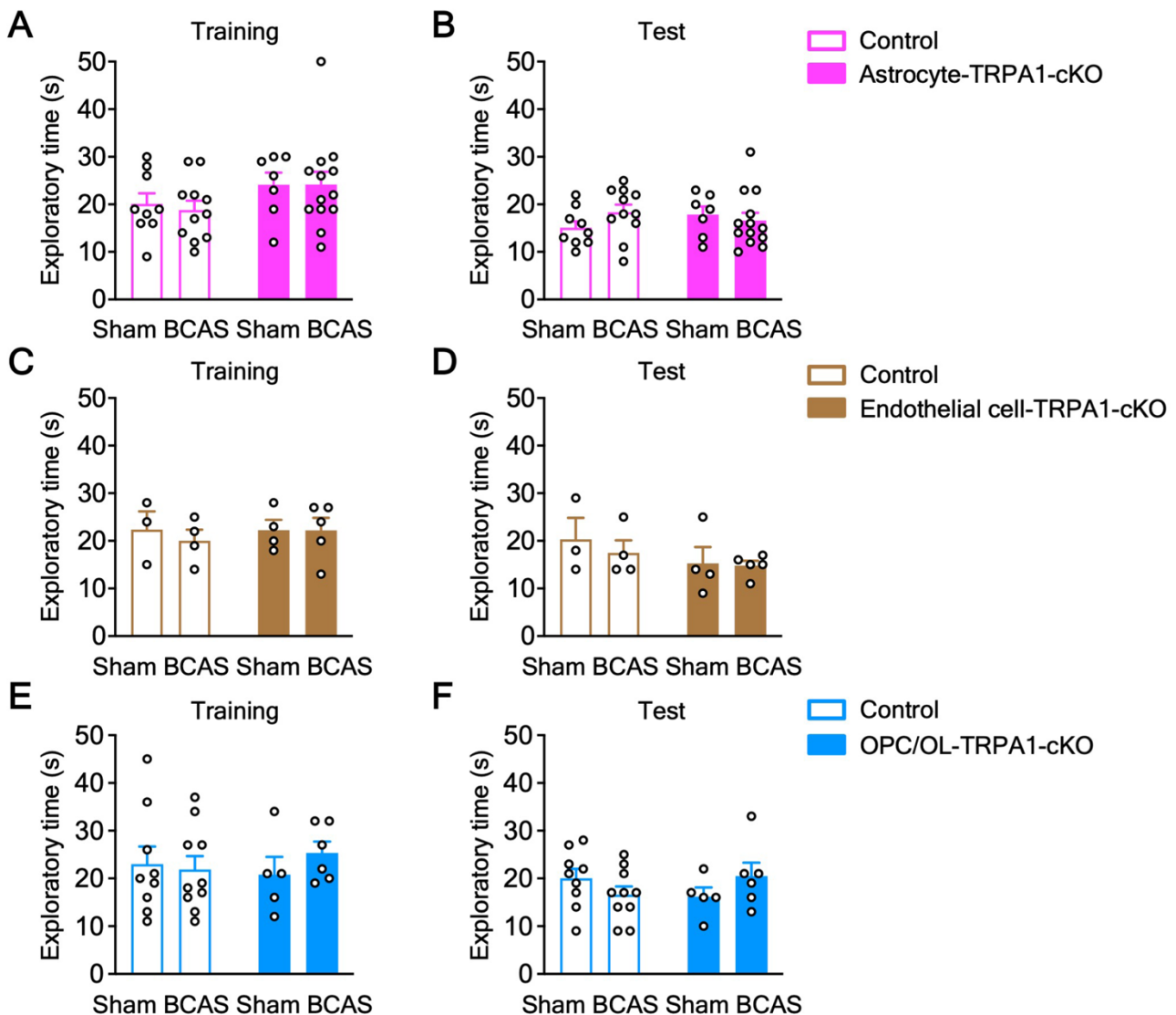


図 3-10. NORT において、細胞種特異的 TRPA1-cKO マウスの総探索時間は群間で同程度である (A-F) Astrocyte-TRPA1-cKO (A, B)、endothelial cell-TRPA1-cKO (C, D)、OPC/OL-TRPA1-cKO (E, F) マウスにおける BCAS 処置 14 日後のトレーニング試行 (A, C, E) およびテスト試行 (B, D, F) 中の総探索時間。値は平均値 \pm 標準誤差で表した。(A, B) $n=7-13$; (C, D) $n=3-5$; (E, F) $n=5-10$ 。

3-12D)。逆に、アストロサイト以外の細胞からなる flow-through 画分の LIF mRNA の発現は、アストロサイトの発現量よりも低く、WT マウス、TRPA1-KO マウスともに sham 処置群と BCAS 処置群で差は認められなかった (図 3-12E)。さらに、脳梁で免疫染色を行ったところ、BCAS 処置をした WT マウスでは GFAP 陽性アストロサイトで LIF が増加したが、TRPA1-KO マウスでは増加は認められなかった (図 3-12F, G)。BCAS 処置により増加する LIF の細胞ソースをさらに調べるため、脳梁において抗 LIF 抗体と抗 Iba1 抗体または抗 PDGFR α 抗体を用いた二重免疫染色を行った。その結果、GFAP 陽性アストロサイトとは異なり、Iba1 陽性ミクログリアや PDGFR α 陽性 OPC と LIF はほとんど merge しなかった (図 3-12F; 図 3-13)。これらの結果は、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害において、アストロサイトから LIF が分泌されることを示唆している。

図 3-11D に示した遺伝子のうち、毛様体神経栄養因子 (CNTF) も髄鞘形成を促進することが知られており、血管性認知障害に対する保護候補の一つであると考えられる¹¹⁹。そこで、CNTF mRNA の発現を

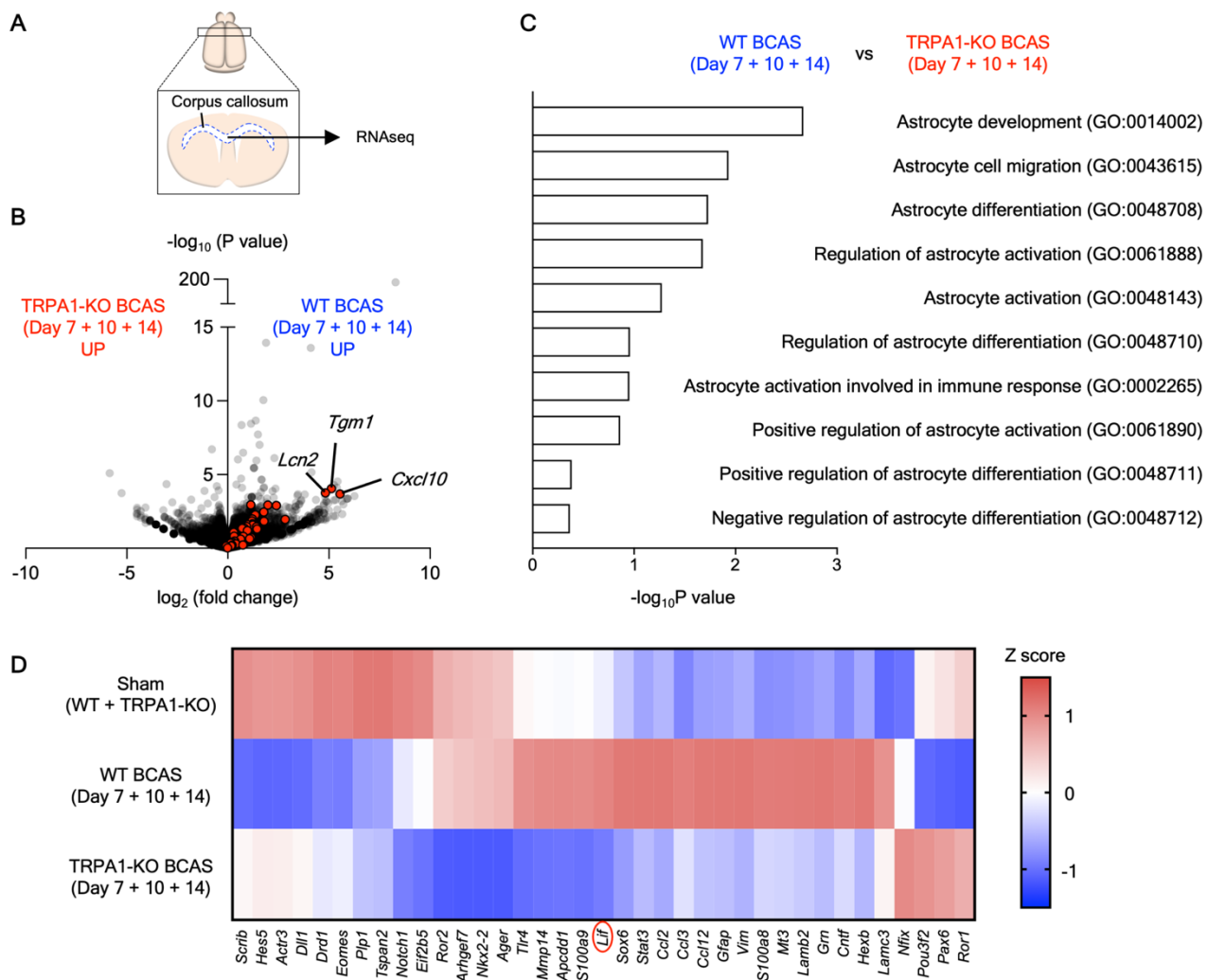


図 3-11. BCAS 処置により、WT マウスではアストロサイト関連遺伝子の発現が増加するが、TRPA1-KO マウスでは増加しない

(A) 脳梁における RNAseq の模式図。(B) BCAS 処置を行った WT マウスと TRPA1-KO マウス (7、10、14 日目の平均) のデータセット中の全遺伝子を比較した volcano plot。赤い点: 反応性アストロサイトマーカー遺伝子。(C) BCAS 処置をした WT マウスと TRPA1-KO マウスの間で発現量の異なる遺伝子について、Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析で上位 10 個のアストロサイト関連タームを示した (7、10、14 日目の平均値)。(D) Sham 処置群 (sham 処置をした WT マウスと TRPA1-KO マウスの平均)、BCAS 処置をした WT マウス群 (7、10、14 日目の平均)、BCAS 処置をした TRPA1-KO マウス群 (7、10、14 日目の平均) におけるアストロサイト関連 GO ターム上位 3 つ (GO : 0014002, GO : 0043615, GO : 0048708) に含まれる遺伝子発現のヒートマップ。 $n = 1$ 。

調べたところ (図 3-14A-C)、LIF と同様に、BCAS 処置をした WT マウスでは、sham 処置をしたマウスと比較して脳梁の CNTF mRNA 発現が増加したが、TRPA1-KO マウスでは差は認められなかった (図 3-14A)。一方 LIF mRNA の発現とは異なり、分取されたアストロサイトにおける CNTF mRNA の発現は、WT マウス、TRPA1-KO マウスともに増加は認められなかった。さらに、flow-through 画分における CNTF mRNA の発現は、アストロサイトでの発現量と差がなく、BCAS 処置によっても変化しなかった (図 3-14B, C)。さらに、脳梁における抗 LIF 抗体と抗 GFAP 抗体による二重免疫染色においても、WT マウスと TRPA1-KO マウスともに GFAP 陽性アストロサイトでの CNTF の発現に群間で差は認められなかった (図 3-14D, E)。

血管性認知障害における LIF の関与をさらに検討するため、gp130 の選択的阻害薬で LIF などの gp130 リガンドの下流シグナルを減少させる SC144 を使用した^{120,121}。BCAS または sham 処置後 0-10 日目に SC144 を連日腹腔内投与した (図 3-15A, B)。BCAS 処置 14 日後に新奇物体認識試験を行ったところ、トレーニング試行では、DI に群間で差は認められなかった (図 3-15C)。一方テスト試行において、vehicle

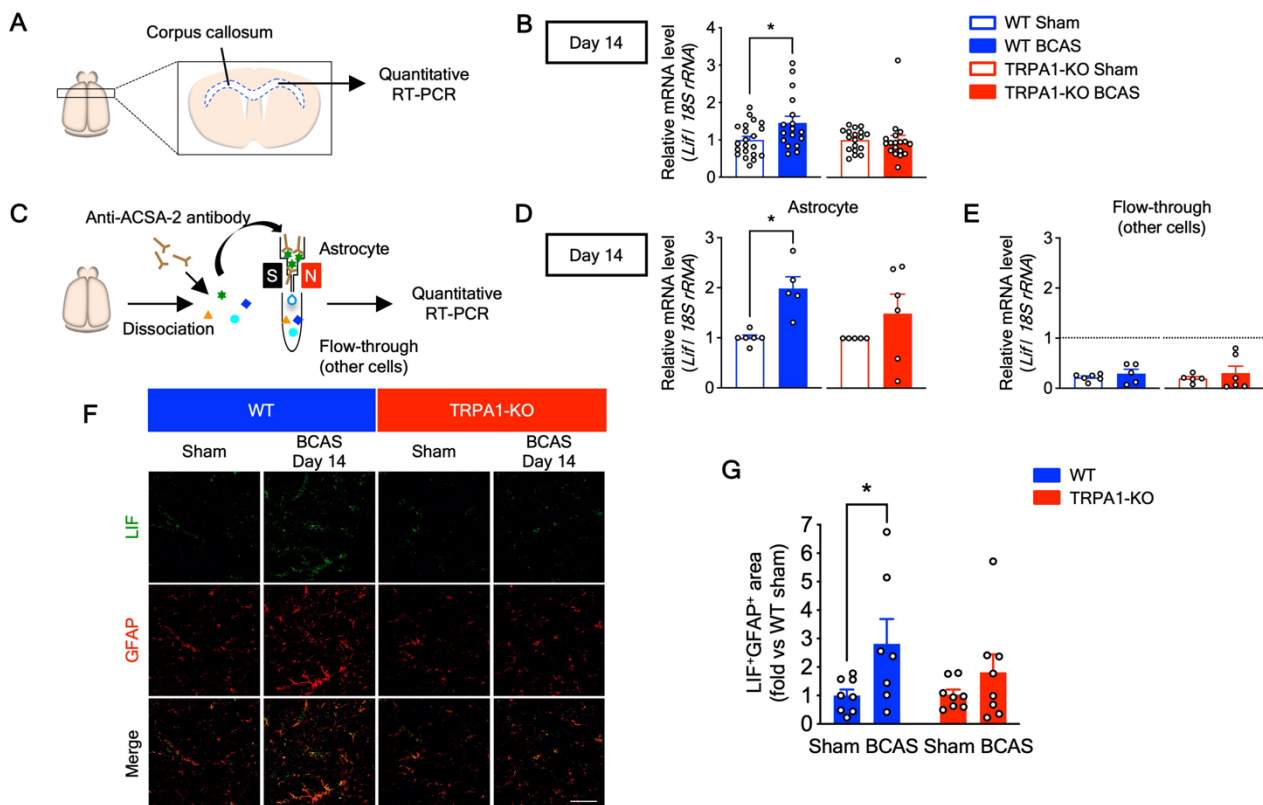


図 3-12. TRPA1 は、BCAS 処置 14 日後の WT マウスのアストロサイトにおける LIF 産生を仲介している

(A) 脳梁のリアルタイム PCR の模式図。(B) 脳梁における LIF mRNA の発現。(C) MACS を用いた全脳からのアストロサイトの分取の模式図。(D, E) 分取したアストロサイト (D) および flow-through (E) における LIF mRNA の発現。(F, G) 脳梁における抗 LIF 抗体 (緑) および抗 GFAP 抗体 (赤) による共免疫染色の代表画像 (F)、および 14 日目の LIF/GFAP 二重陽性面積の割合の定量データ (G)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 50 μ m. (B) $n = 17-21$ (WT), $n = 18$ (TRPA1-KO); (D, E) $n = 5-6$ (WT), $n = 5-6$ (TRPA1-KO); (G) $n = 7-8$. * $P < 0.05$.

を投与したマウスでは BCAS 処置マウスでも sham 処置マウスと比較し DI に差は認められなかったが、SC144 を投与したマウスでは BCAS 処置により sham 処置群と比べ DI が有意に減少した (図 3-15D)。また、2つの物体に対する総探索時間は、テスト試行では群間で差が認められなかったが、トレーニング試行では SC144 を投与した BCAS 処置マウスで減少した (図 3-14F, G)。さらに、SC144 を投与した BCAS 処置マウスでは、ミエリン密度も減少していた (図 3-15E, F)。続いて、BCAS 処置直後に LIF 中和抗体を脳室内投与し認知機能およびミエリン密度を評価した (図 3-15G)。新奇物体認識試験において、トレーニング試行では DI は群間で差が認められなかった (図 3-15H)。SC144 を用いた実験と同様に、テスト試行において、LIF 中和抗体を投与した BCAS 処置マウスでは、コントロール IgG 抗体を投与した BCAS 処置マウスと比較して DI が有意に減少した (図 3-15I)。2つの物体に対する総探索時間は、群間で差は認められなかった (図 3-14H, I)。また認知機能障害と同様に、LIF 中和抗体を投与した BCAS 処置マウスでは、コントロール IgG 抗体を投与した BCAS 処置マウスと比較してミエリン密度が減少した (図 3-15J, K)。これらの結果は、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害において、アストロサイトの TRPA1 が LIF 産生に関与し、LIF の増加が血管性認知障害に対して保護的に作用していることを示唆している。

H₂O₂ での TRPA1 刺激によるアストロサイトの LIF 産生の培養 OPC の髄鞘形成への影響

アストロサイトでの LIF 産生の分子機構をさらに明らかにするために、WT マウスまたは TRPA1-KO マウス由来の初代培養アストロサイトを用いて *in vitro* 実験を行った。H₂O₂ を培養細胞に 3 時間処置し

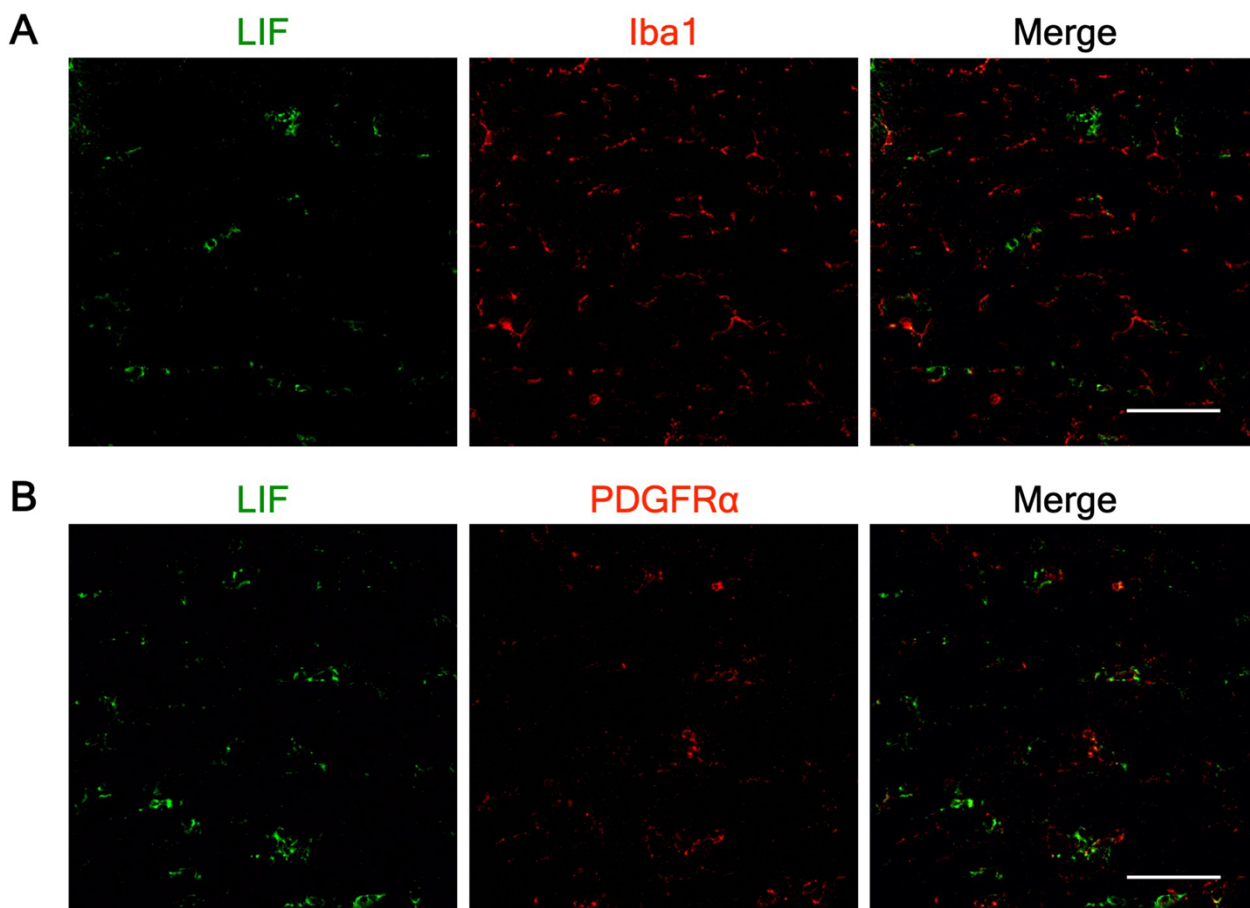


図 3-13. BCAS 処置による LIF の増加はミクログリアや OPC 由来ではない

(A, B) BCAS 処置 14 日後の WT マウスの脳梁における抗 LIF 抗体 (緑) および抗 Iba1 (A) または抗 PDGFRα (B) 抗体 (赤) による免疫染色の代表画像。Scale bar: 50 μm.

TRPA1 を刺激した際の LIF mRNA の発現をリアルタイム PCR で評価した (図 3-16A)。予想通り、 H_2O_2 を処置した WT アストロサイトでは LIF mRNA の発現が増加したが、TRPA1-KO アストロサイトでは増加が抑制された (図 3-16B)。過去の研究で、PKC、ERK1/2、p38-MAPK の活性化がアストロサイトでの LIF の発現と放出に関与することが示されていたため¹¹⁸、これらの経路が H_2O_2 による LIF mRNA 発現に及ぼす影響について検討した。 H_2O_2 による LIF mRNA の発現増加は、p38-MAPK 阻害薬の SB203580 の共処置により有意に抑制され、PKC 阻害薬の chelerythrine chloride の共処置で一部抑制され、ERK 阻害薬の PD98059 の共処置では抑制されなかった (図 3-16C)。さらに、細胞内 Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM の共処置により、 H_2O_2 による LIF mRNA の発現増加が抑制された (図 3-16C)。これらの結果と同様に、ウェスタンブロットにおいて、 H_2O_2 処置により ERK-MAPK のリン酸化は WT アストロサイト、TRPA1-KO アストロサイトともに認められなかった一方、p38-MAPK のリン酸化は WT アストロサイトで認められ、TRPA1-KO アストロサイトでは認められなかった (図 3-16D–G)。以上の結果から、 H_2O_2 による TRPA1 刺激は、p38-MAPK のリン酸化を増加させ、LIF の産生を促進することが示唆された。

最後に、LIF などの H_2O_2 を処置したアストロサイトからの分泌分子が OPC の髄鞘形成を促進するかどうかを調べるために、*in vitro* での培養上清置換実験を行った。アストロサイトの培養 7 日目に培養上清を回収し、OPC の培養 2 日目に培養液を増殖条件培地から回収したアストロサイト培養上清に置換した (図 3-16H)。アストロサイト培養上清に置換後 5 日間培養した後、OPC のマーカーである抗 PDGFRα 抗体および成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである抗 MBP 抗体による二重免疫染色を行い、OPC の

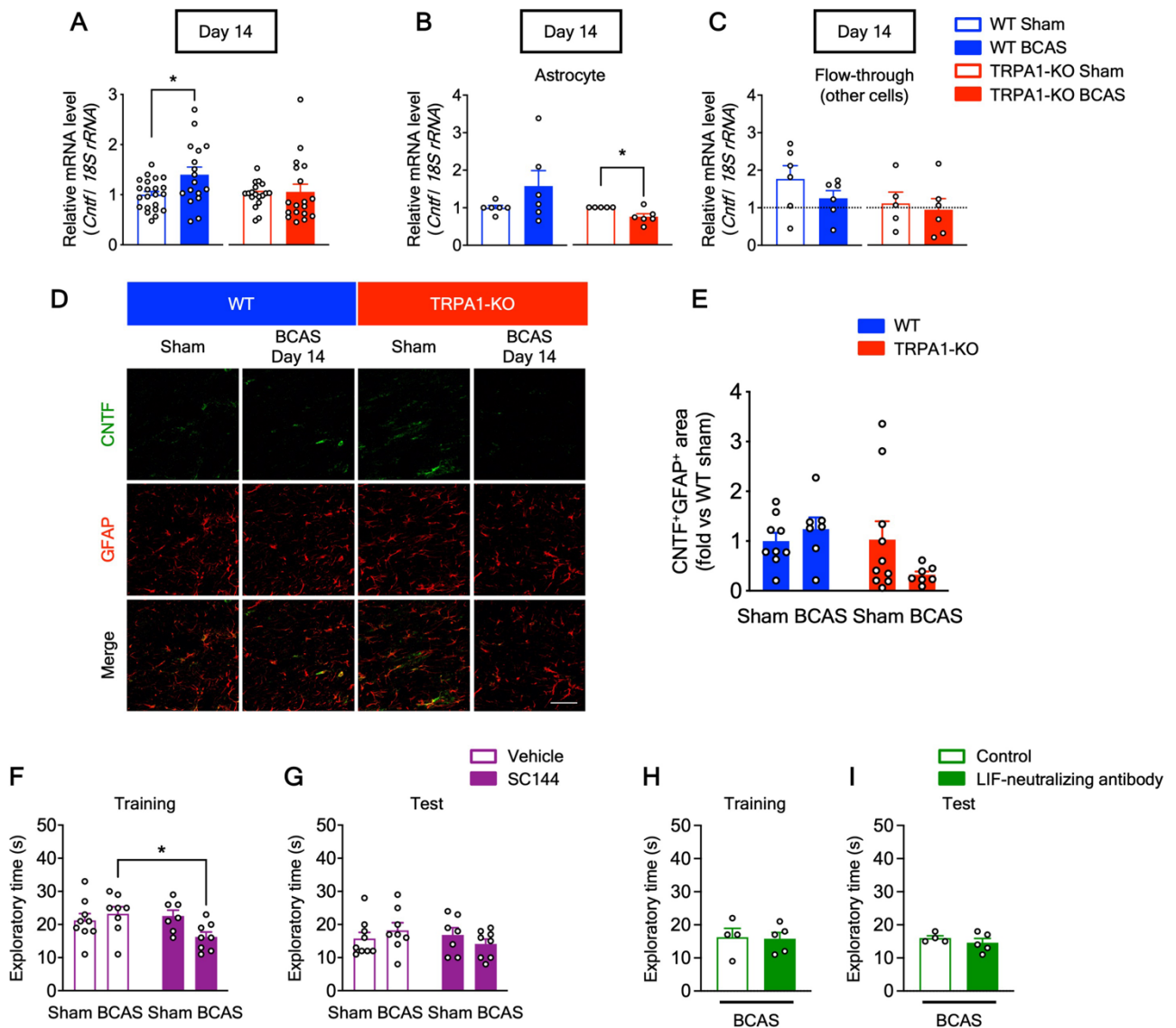


図 3-14. BCAS 処置はアストロサイトにおける CNTF mRNA の発現を増加させない

(A–C) BCAS 処置 14 日後にリアルタイム PCR で測定した脳梁 (A)、MACS で分取したアストロサイト (B)、MACS の flow-through (C) の CNTF mRNA 発現量。(D, E) BCAS 処置 14 日後の脳梁における抗 CNTF 抗体 (緑) および抗 GFAP 抗体 (赤) による免疫染色の代表画像 (D)、および CNTF/GFAP 二重陽性面積の割合の定量データ (E)。(F–I) BCAS 処置 14 日後のトレーニング試行 (F, H) およびテスト試行 (G, I) における総探索時間。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bar: 50 μ m. (A) $n = 17$ –22 (WT), $n = 18$ (TRPA1-KO); (B, C) $n = 6$ (WT), $n = 5$ –6 (TRPA1-KO); (E) $n = 7$ –10; (F, G) $n = 7$ –9; (H, I) $n = 4$ –5. * $P < 0.05$.

分化度を評価した。H₂O₂ を処置した WT アストロサイト培養上清では、MBP 陽性成熟オリゴデンドロサイトの面積が増加したが、H₂O₂ を処置した TRPA1-KO アストロサイト培養上清では MBP 陽性面積の増加が抑制された (図 3-16I, J)。H₂O₂ を処置した WT アストロサイト培養上清による OPC の髄鞘形成作用が、LIF によって媒介されているかを調べるために、LIF 中和抗体を用いた培養上清置換実験を行った。OPC の培養 2 日目に、培養液を増殖条件培地から H₂O₂ を処置した WT アストロサイト培養上清に置換し、LIF 中和抗体またはコントロール IgG を共処置し 5 日間培養後、抗 PDGFR α 抗体および抗 MBP 抗体による二重免疫染色を行った (図 3-17A)。コントロール IgG の共処置と比較し、LIF 中和抗体の共処置により MBP 陽性成熟オリゴデンドロサイトの面積は有意に減少した (図 3-17B, C)。以上のことから、H₂O₂ による TRPA1 刺激で産生されるアストロサイト由来の LIF は、OPC の髄鞘形成の促進に重要な役割を担っていることが示された。

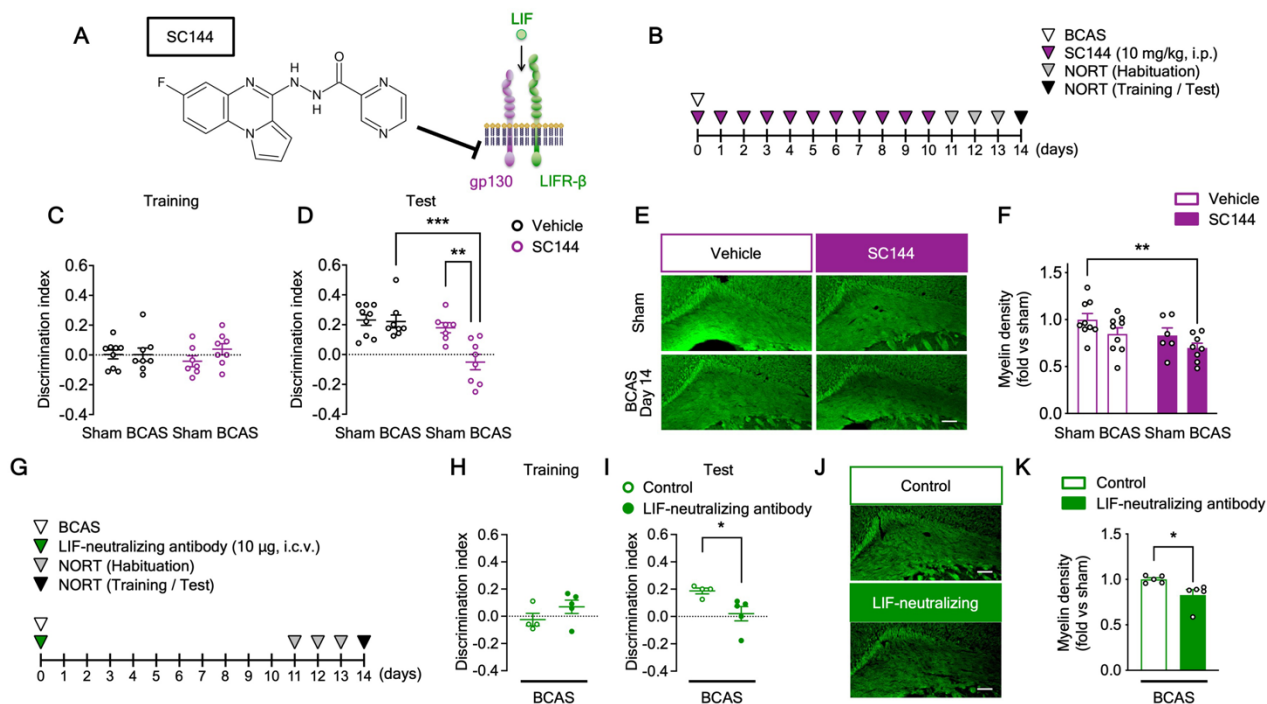


図 3-15. LIF シグナルの阻害は、BCAS 処置による認知機能障害と白質傷害を増悪させる

(A) SC144 の阻害メカニズムの模式図。(B, G) SC144 (B) または LIF 中和抗体 (G) の投与と NORT の実験タイムコース。(C, D, H, I) BCAS 処置 14 日後のトレーニング試行 (C, H) における青色の四角錐、テスト試行 (D, I) における木製の球を探索した際の DI。(E, F, J, K) BCAS 処置 14 日後の脳梁のミエリン染色の代表画像 (E, J) とミエリン相対密度の定量データ (F, K)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μm. (C, D) $n = 7-9$; (F) $n = 6-9$; (H, I) $n = 4-5$; (K) $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

考察

本章で得られた知見は以下の通りである (図 3-18)。(i) TRPA1 欠損は、慢性脳低灌流の初期段階 (BCAS 処置 14 日後) における認知機能障害および白質傷害を増悪させた。(ii) BCAS 処置後 15-24 日目のシナムアルデヒドによる TRPA1 刺激は、認知機能障害および白質傷害を改善した。(iii) 慢性脳低灌流の初期段階 (BCAS 処置 14 日後) において、BCAS 処置により脳梁の GFAP 陽性アストロサイト数が増加し、TRPA1 欠損によりアストロサイト数の増加は認められなくなった。(iv) BCAS 処置による認知機能障害および白質損傷は、血管内皮細胞またはオリゴデンドロサイト系譜細胞特異的な TRPA1 欠損ではなく、アストロサイト特異的な欠損によってのみ増悪された。(v) TRPA1 欠損は、慢性脳低灌流の初期段階 (BCAS 処置 14 日後) のアストロサイトにおける LIF の発現増加を抑制した。(vi) 初代培養アストロサイトをを用いた実験において、 H_2O_2 を処置した WT アストロサイトでは LIF の発現が増加したが、TRPA1-KO アストロサイトでは増加せず、 H_2O_2 を処置した WT アストロサイトの培養上清は OPC の髄鞘形成を促進した。これらの結果は、アストロサイトの TRPA1 が LIF 産生を介して、慢性脳低灌流により惹起される血管性認知障害の病態発症を防ぐ保護的な役割を担っていることを示唆している。

脳内血管の異常は、アルツハイマー病の発症においてアミロイドβの沈着やタウのリン酸化などの他の所見よりも早く起こることが報告されている¹²²。また、アルツハイマー病患者の高齢者の 80%以上にアルツハイマー病態に加えて脳血管障害が認められることから⁸⁷、血管性認知症のみならずアルツハイマー病においても脳小血管病が重要であることが示唆されている。過去の研究では、慢性脳低灌流が脳

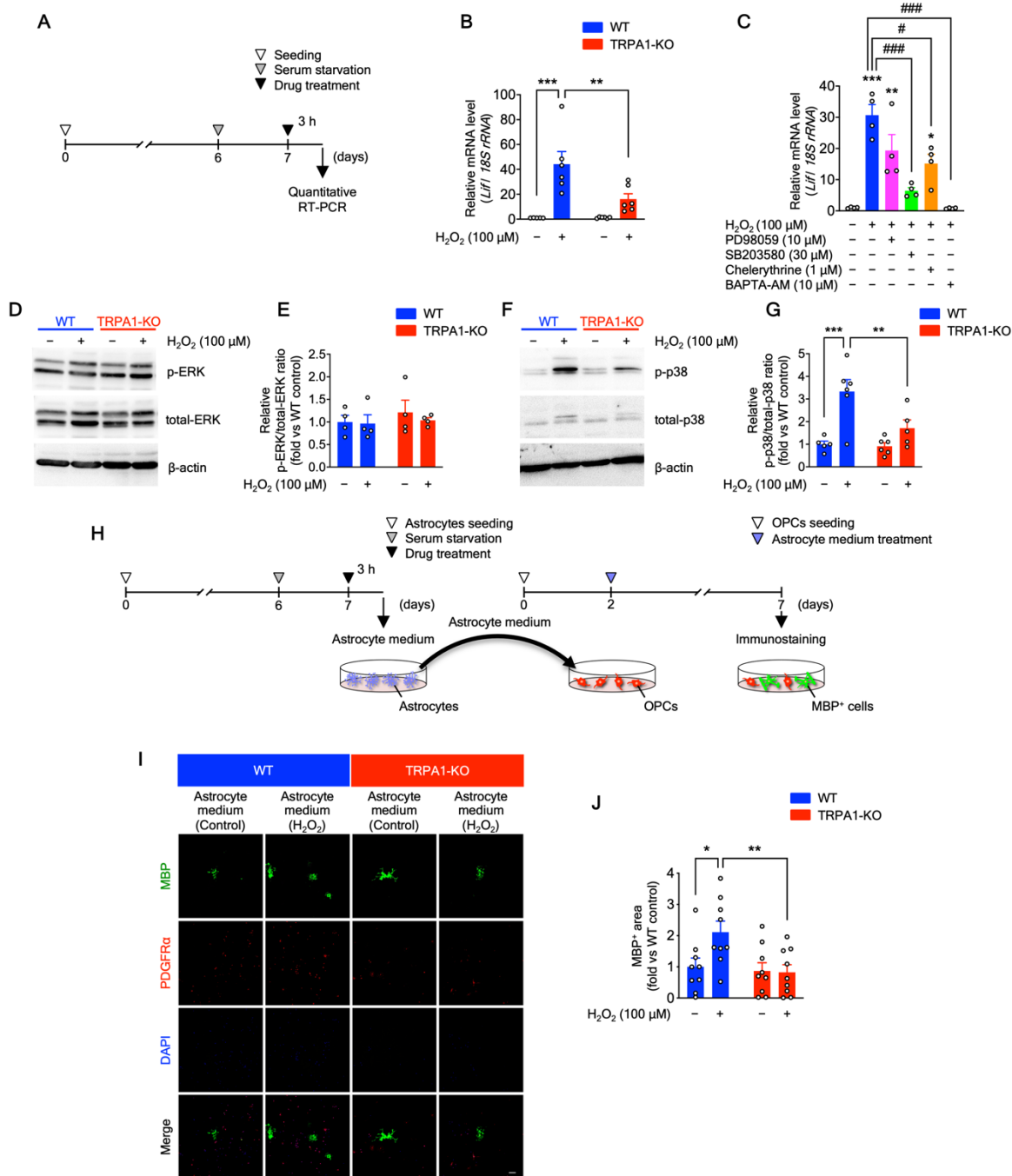


図 3-16. H₂O₂による TRPA1 を介したアストロサイトの LIF の増加は、培養 OPC の髄鞘化を促進する

(A) 初代培養アストロサイトを用いた *in vitro* 実験のタイムコース。(B) リアルタイム PCR による、H₂O₂ (100 μM, 3 時間) を処置した初代培養アストロサイトにおける LIF mRNA の発現評価。(C) リアルタイム PCR による、H₂O₂ (100 μM) と ERK 経路阻害薬 (PD98059, 10 μM)、p38 阻害薬 (SB203580, 30 μM)、PKC 阻害薬 (chelerythrine chloride (CHE), 1 μM)、Ca²⁺キレーター (BAPTA-AM, 10 μM) のいずれかを共処置した初代培養アストロサイトにおける LIF mRNA の発現評価。**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs control; #*p* < 0.05, ###*p* < 0.001 vs H₂O₂. (D–G) ERK (D) および p38 (F) のウェスタンブロットの代表画像、および ERK (E) および p38 (G) のタンパク質およびリン酸化レベル。(H) *In vitro* 培養上清置換実験の実験タイムコース。(I, J) アストロサイト培養上清を適用した初代培養 OPC における抗 MBP 抗体 (緑)、抗 PDGFRα 抗体 (赤) および DAPI (青) による免疫染色の代表画像 (I)、ならびに MBP 陽性面積の割合の定量データ (J)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bar: 100 μm. (B) *n* = 5–6; (C, E) *n* = 4; (G) *n* = 5–6; (J) *n* = 9. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

小血管病の主要な因子である可能性が強く示されている^{87,88}。興味深いことに、Deschaintre らは、糖尿病、脂質異常症、高血圧などの慢性脳低灌流に関連する脳小血管病を惹起する原因となる生活習慣病の治療により認知症が改善されることを報告した¹²³。また、認知症のリスク因子である心房細動¹²⁴の患者へのカテーテルアブレーション治療は、心機能を回復し慢性脳低灌流状態を緩和することで認知機能が改善

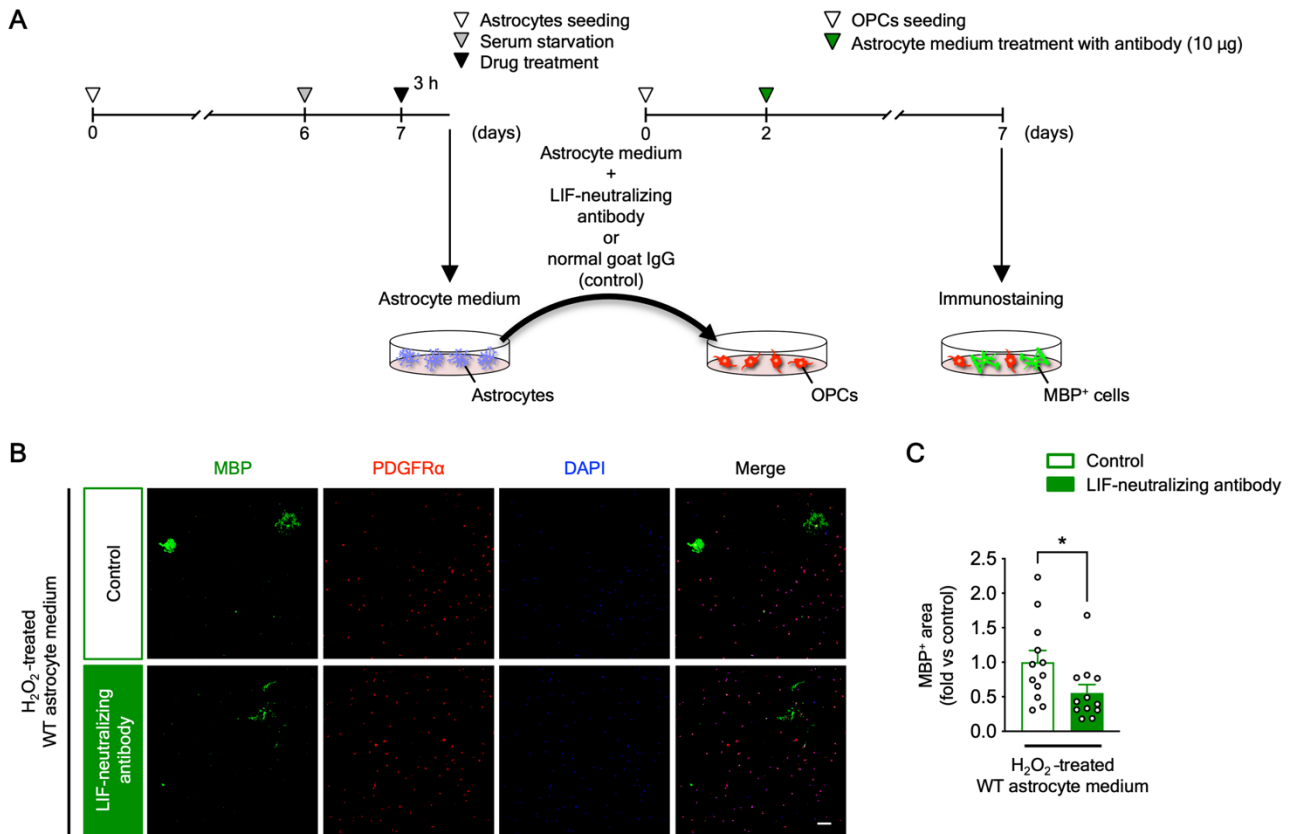


図 3-17. LIF 中和抗体は、H₂O₂を処置した WT アストロサイト培養上清で促進される培養 OPC の髄鞘形成を抑制する

(A) LIF 中和抗体を用いた *in vitro* 培養上清置換実験のタイムコース。(B, C) LIF 中和抗体またはコントロール IgG を添加した H₂O₂ を処置した WT アストロサイト培養上清を適用した初代培養 OPC における抗 MBP 抗体 (緑)、抗 PDGFRα 抗体 (赤) および DAPI (青) による免疫染色の代表画像 (B) および MBP 陽性面積の割合の定量データ (C)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bar: 100 μm. (C) n = 12. *P < 0.05.

されることから¹²⁵、慢性脳低灌流状態そのものを改善することも血管性認知障害を治療する有力な方法であることが示唆される。

血管性認知障害における TRPA1 の保護的役割と、どのような刺激に対して TRPA1 が機能しているのかを実証することは、興味深い点である。血管性認知障害において TRPA1 を刺激する候補分子として最も有力なのは、H₂O₂ などの活性酸素種である。TRPA1 は酸化還元変化を最も鋭敏に検知する TRP チャネルであり⁹³、低酸素をよく検知し開口しやすくなり^{126,127}、また H₂O₂ によっても活性化される¹²⁸。実際、H₂O₂ によって TRPM2 ではなく TRPA1 を介して Ca²⁺ が流入すると、がん細胞の酸化ストレス耐性が誘導される¹²⁹。また、感覚神経において H₂O₂ は TRPA1 依存的で TRPV1、TRPM3 に非依存的な熱刺激への反応を増強することが報告されている¹³⁰。興味深いことに、慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルを用いた著者らの以前の研究では、sham 処置群と比較し、BCAS 処置 14 日後に H₂O₂ 濃度が有意に増加することを明らかにした²⁷。血管性認知障害において活性酸素種は、病態の中・後期と、初期では逆の作用を果たすと想定される。BCAS 処置による血管性認知障害の後期では活性酸素種が有害な作用を及ぼすことが報告されている^{27,104}。著者らの過去の研究において、活性酸素種を検知する TRP チャネルで、ミクログリアに機能的に発現している TRPM2 が、BCAS 処置による血管性認知障害の中・後期において、CNS 炎症、白質傷害、認知機能障害を悪化させることを報告している²⁷。一方で、活性酸素種は必ずしも細胞毒性があるわけではなく、適度な活性酸素種レベルは細胞の恒常性維持にポジティブな作用を及ぼすことも報告されている¹³¹。軽度の酸化ストレスはアストロサイトの抗酸化反応を活性化し、

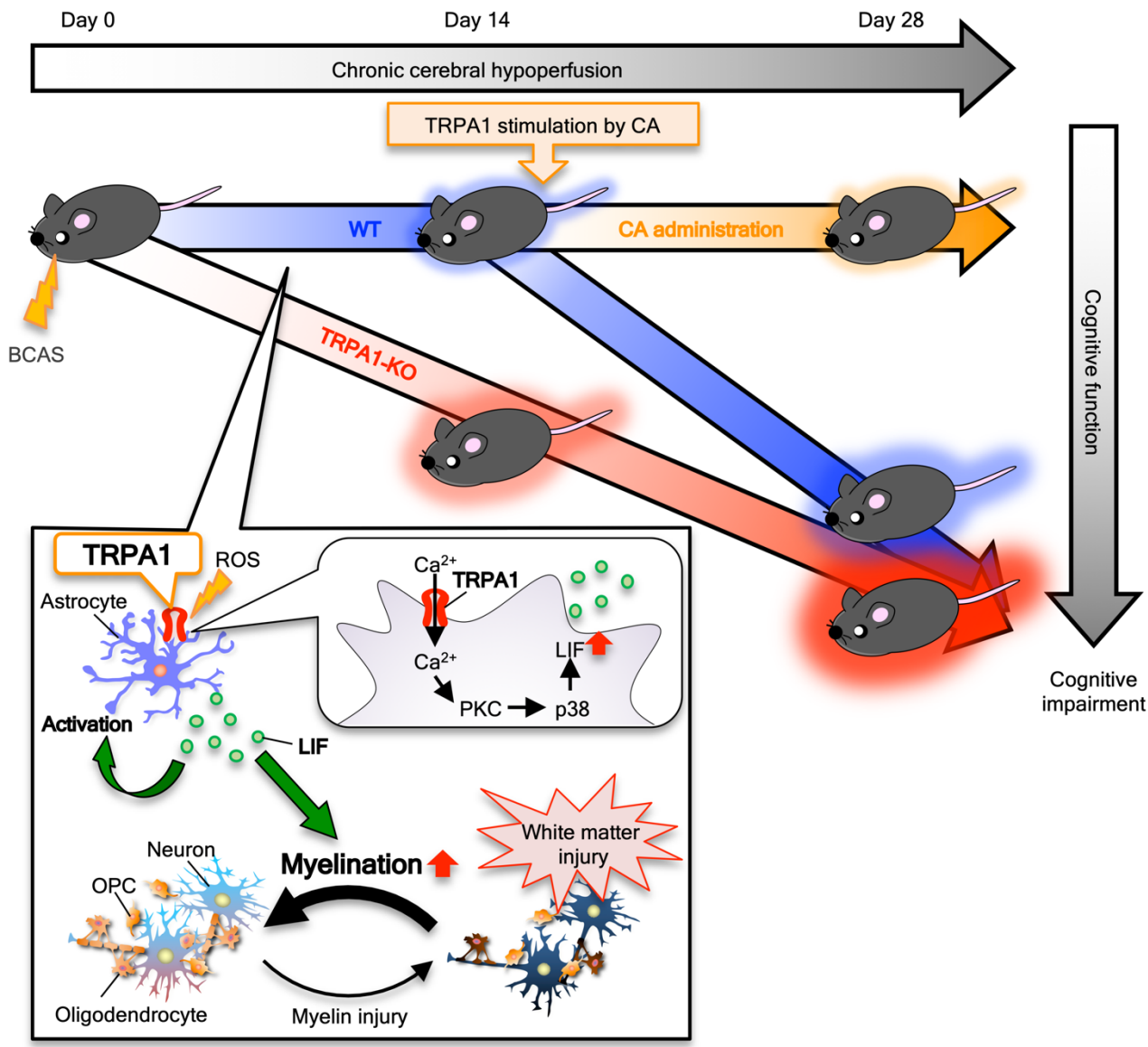


図 3-18. アstrocytes の TRPA1 は慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害において、LIF の産生を介して、保護的役割を担っている。慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害時の TRPA1 の役割と機序の模式図。慢性脳低灌流状態での Astrocytes の TRPA1 刺激は、 Ca^{2+} 流入の増加と p38-MAPK リン酸化の誘導により LIF 産生を増加させ、髄鞘形成を促進する。

一度脳虚血を経験した脳での神経細胞の生存に寄与することも知られている¹³²。本章の研究では、BCAS 処置 14 日後に、TRPA1-KO マウスで認知機能障害が観察されたが、WT マウスでは観察されなかった。したがって、活性酸素種感受性チャネルである TRPA1 は、慢性脳低灌流による血管性認知障害の初期段階において予防的な役割を果たす可能性がある。

慢性脳低灌流誘により惹起される血管性認知障害の病態に対して、脳の TRPA1 がどの細胞で関与しているかは重要である。本章の研究により、*in vitro* 実験および脳切片の免疫染色とリアルタイム PCR により、TRPA1 が Astrocytes の機能を媒介することが明らかになった。さらに、Cre リコンビナーゼ-loxP システムを用いて、細胞特異的な TRPA1 欠損マウスを作製した。その結果、血管内皮細胞やオリゴデンドロサイト系譜細胞ではなく、Astrocytes 特異的 TRPA1 欠損マウスのみが慢性脳低灌流の早期の認知機能障害や白質障害を増悪させることが明らかになった。TRPA1 は、Astrocytes に機能的に発現し、Astrocytes の Ca^{2+} レベルを制御していることが報告されている⁹⁵⁻⁹⁷。さらに、Astrocytes の TRPA1 は、pFRG/RTN における軽度の低酸素状態を選択的に検知する¹³³。また、TRPA1 は脳血管内皮細

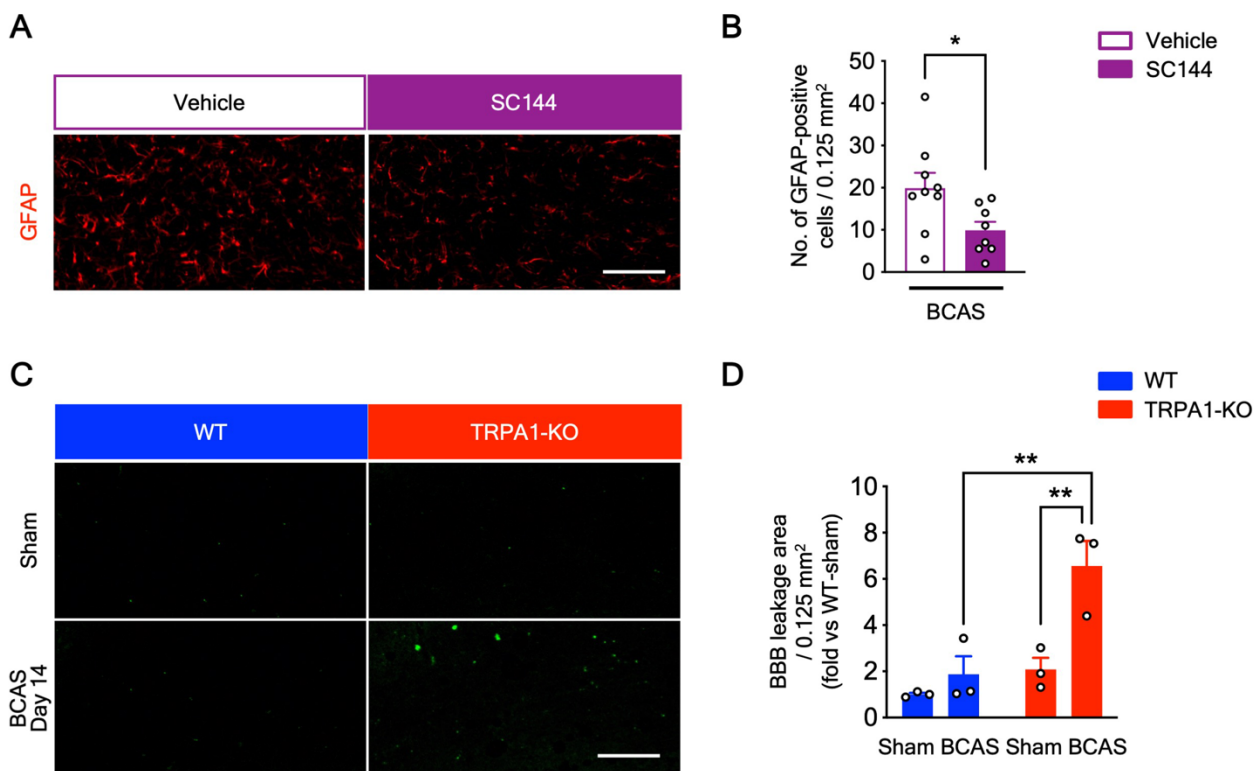


図 3-19. LIF シグナル阻害薬の SC144 は GFAP 陽性アストロサイト数を抑制し、BCAS 処置は WT マウスではなく TRPA1-KO マウスで 14 日目の血液脳関門の透過性を上昇させる (A, B) SC144 を用いた実験における BCAS 処置 14 日後の脳梁の抗 GFAP 抗体による免疫染色の代表画像 (A) および GFAP 陽性細胞数の定量データ (B)。 (C, D) BCAS 処置 14 日後の脳梁におけるフルオレセインナトリウム蛍光画像の代表画像 (C) および陽性面積の割合の定量データ (D)。値は平均値 ± 標準誤差で表した。Scale bars: 100 μ m. (B) $n = 8-9$; (D) $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

胞に存在し、脳血管の拡張に寄与していることが報告されている^{98,134}。さらに、脳血管内皮細胞における TRPA1 は低酸素のセンサーとして機能しており、急性の低酸素負荷により TRPA1 を介した Ca^{2+} 流入 sparklet 頻度が増加し、血管拡張をもたらすことから、TRPA1 は虚血性脳卒中において保護的役割を担っている¹⁰⁰。一方で、TRPA1 はオリゴデンドロサイトにも発現しており、TRPA1 の遮断が擬似虚血処置によるミエリン障害を軽減することも報告されている⁹⁹。

本章の研究で、オリゴデンドロサイトや脳血管内皮細胞の TRPA1 が血管性認知障害になぜ関与していないのかは不明である。本研究で用いた慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルは、神経細胞死や麻痺のような、オリゴデンドロサイト⁹⁹や脳血管内皮細胞¹⁰⁰の TRPA1 が関与する虚血性脳卒中モデルで生じる症状を引き起こさない軽症の病態モデルである。つまり、刺激に TRPA1 が応答する細胞種は、病態によって異なる可能性がある。脳血管内皮細胞やオリゴデンドロサイトの TRPA1 は、虚血性脳卒中のような重度の低酸素状態において重要な役割を果たすと考えられる。一方、アストロサイトの TRPA1 は、BCAS 処置による血管性認知障害マウスモデルのような少量の活性酸素種が発生する環境や、生体に備わっている防御機構が CNS 傷害に保護的に機能する環境において重要な役割を担っている可能性がある。しかしながら、血管内皮細胞やオリゴデンドロサイトにおける TRPA1 の血管性認知障害への関与については、さらなる検討が必要である。

過去の研究において、LIF が CNS において重要な役割を担っていることが報告されている¹³⁵。LIF はアストロサイトから放出され、髄鞘形成を促進し¹¹⁵、クプリゾンによる脱髄から保護し¹¹⁶、低酸素虚血性脳傷害において髄鞘形成と神経機能を改善する¹¹⁷。著者は、BCAS 処置 14 日後の慢性脳低灌流初期段

階において、WT アストロサイトで LIF の発現が増加するが、TRPA1-KO アストロサイトでは増加しないことを明らかにした。このことは、TRPA1 を介したシグナルが血管性認知障害を初期から抑制していることを示唆している。さらに、本研究では、H₂O₂ の処置により WT アストロサイトの LIF mRNA 発現が増加し、H₂O₂ を処置した WT アストロサイト培養上清が初代培養 OPC の髄鞘形成を誘導することを明らかにした。このことから、アストロサイト由来の LIF は、血管性認知障害における白質傷害に対する代償機構として、再髄鞘化を促進する可能性が示唆された。また、LIF はアストロサイトの分化¹³⁶ および CNS 傷害に対する応答を誘導する¹³⁷ ことも知られている。LIF をはじめとする様々なサイトカインによって活性化される STAT3 をアストロサイト選択的に欠損させると、脊髄損傷後の細胞肥大、GFAP の発現上昇、瘢痕形成などの反応性アストログリオーシスに見られる応答が著しく減弱される¹³⁸⁻¹⁴⁰。実際に、SC144 を用いた実験で GFAP の免疫染色を行ったところ、SC144 を投与した BCAS 処置マウスでは、vehicle を投与した BCAS 処置マウスより GFAP 陽性細胞数が少ないことが観察された (図 3-19A, B)。さらに、傷害を受けた CNS 組織において、アストロサイトは、神経保護、血液脳関門 (BBB) の維持、および炎症の制御に寄与していることも知られている¹⁴¹。これらのことは、アストロサイトから放出された LIF は OPC に作用して髄鞘形成を促進するだけでなく、STAT3 依存的な機構を介して隣接するアストロサイトにも作用し、傷害を受けた CNS 組織の修復に広く寄与することを示唆している。

そこで、慢性脳低灌流誘発血管性認知障害の初期段階である BCAS 処置 14 日後において WT マウスと TRPA1-KO マウスの BBB 機能を比較検討した。アストロサイト数が有意に増加した WT マウスでは、フルオレセインナトリウムの BBB の透過性に有意な変化は見られなかった。一方、アストロサイト数が変化しなかった TRPA1-KO マウスでは、フルオレセインナトリウムの BBB の透過性が有意に増加した (図 3-7, 図 3-19C, D)。これは、TRPA1 の欠損がアストロサイトの機能障害を引き起こし、結果として慢性脳低灌流誘発血管性認知障害の初期段階に BBB の完全性を維持できないことを示唆している。このことはさらに、LIF がオートクラインやパラクラインシグナルとして細胞外に放出されることで、アストロサイトが神経血管ユニットの完全性の維持に寄与すること、つまりアストロサイト由来の LIF が血管性認知障害における BBB 障害からも保護する可能性があることを示している。しかしながら、CNS における炎症反応など、血管性認知障害における LIF の他の保護メカニズムに関してはさらなる研究が必要である。

TRPA1 開口の下流シグナルに関して、TRPA1 が軟骨細胞において LIF を含む IL-6 ファミリーサイトカインの発現上昇に関与すること¹⁴²、アデノシン受容体を介したアストロサイトからの LIF 発現、放出には PKA ではなく PKC の活性化を必要とし、JNK ではなく ERK1/2-および p38-MAPK 活性化に依存すること¹¹⁸ などが過去の報告から明らかにされている。本章の研究では、ERK 阻害薬 PD98059 ではなく、p38 MAPK 阻害薬 SB203580 と Ca²⁺キレーターの BAPTA-AM が、H₂O₂ 処置による LIF mRNA 発現の増加を抑制することが確認された。さらに、H₂O₂ の処置により ERK-MAPK のリン酸化に差は見られなかったものの、p38-MAPK のリン酸化は WT アストロサイトでは観察されたが、TRPA1-KO アストロサイトでは認められなかった。以上のことから、H₂O₂ は TRPA1 を刺激し、アストロサイトの Ca²⁺流入、p38-MAPK リン酸化、LIF 産生を増加させ、OPC の髄鞘形成を促進させることが明らかになった。しかしながら、アストロサイトにおける LIF の産生における他の経路や分子の関与については、さらなる研究が必要である。

結論として、TRPA1 はアストロサイトの活性化、LIF 産生の増加、OPC の髄鞘形成促進により、慢

性脳低灌流により惹起される血管性認知障害および白質傷害に対して保護的な役割を担っていることが明らかになった。血管性認知障害におけるアストロサイトの TRPA1-LIF と髄鞘形成の一連の作用は、生体に備わっている内在性の保護機構であると考えられる。以上のことから、本章の研究は、アストロサイトの TRPA1 が血管性認知障害に対する有望な治療標的となる可能性を示している。

総括および結論

本研究において著者は、血管性認知障害におけるグリア細胞の病態生理学的役割について検討を行い、以下の新規知見を得た。

第1章

- 高齢マウスを用いた検討により、野生型マウスで認知機能の低下が認められたが、TRPM2 遺伝子欠損マウスでは認められなかった。
- 高齢マウスを用いた検討により、野生型マウスで脳梁の白質傷害、海馬の神経細胞傷害が認められたが、TRPM2 遺伝子欠損マウスでは認められなかった。
- 高齢マウスを用いた検討により、脳梁において野生型マウスで Iba1 陽性ミクログリア数の増加、TNF α mRNA の増加が認められたが、TRPM2 遺伝子欠損マウスでは認められなかった。

第2章

- BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおける認知機能障害、白質傷害が、ミクログリアの除去により抑制された。
- IL6 や TNF α mRNA 発現がミクログリアの除去により抑制された。

第3章

- BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおける認知機能障害、白質傷害が、TRPA1 欠損マウスで早期から認められた。
- BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおける認知機能障害、白質傷害が、TRPA1 刺激薬のシンナムアルデヒドにより抑制された。
- BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおいて、野生型マウスで認められる GFAP 陽性アストロサイト数の増加が TRPA1 欠損マウスでは認められなかった。
- BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおける認知機能障害、白質傷害が、アストロサイト特異的 TRPA1 欠損マウスで早期から認められた。
- BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおいて、野生型マウスでアストロサイトでの LIF の発現の増加が認められたが、TRPA1 欠損マウスでは認められなかった。
- BCAS 処置による慢性脳低灌流誘発の血管性認知障害マウスモデルにおける認知機能障害、白質傷害が、LIF シグナルの阻害により早期から認められた。
- H₂O₂ 刺激をした野生型アストロサイトでは LIF mRNA の発現増加が認められたが、TRPA1 欠損アストロサイトでは発現増加が抑制された。
- H₂O₂ 刺激をした野生型アストロサイトの培養上清は OPC の髄鞘化を促進したが、その作用は TRPA1 欠損アストロサイトの培養上清では認められず、LIF の阻害により抑制された。

以上、著者はマウスモデルを用いて、血管性認知障害におけるグリア細胞の病態生理学的役割の一端を明らかにし、さらにその制御分子として TRP チャネルの関与を見出した。本研究の成果は、血管性認知障害が関与する様々な中枢神経疾患の病態解明および新薬の創出に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 金子周司 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科 白川久志 准教授、永安一樹 助教ならびに京都大学医学部附属病院薬剤部 中川貴之 准教授に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました和歌山県立医科大学薬学部 赤池昭紀 教授、富山大学大学院医学薬学研究部 久米利明 教授、神戸薬科大学薬学部 泉安彦 講師に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、本研究に多大なるご協力をいただきました京都大学大学院工学研究科 森泰生 教授、高橋重成 特定准教授、中尾章人 助教、山梨大学大学院総合研究部医学域 小泉修一 教授、豊富英治 GLIA センター准教授、ハーバード大学医学部 荒井健 准教授、京都大学薬学研究科実験動物施設 松下淳 修士に深く感謝いたします。また、森泰生 教授には TRPM2-KO マウス、TRPA1-KO マウス、*Trpa1*^{fl/fl} マウスを、小泉修一 教授には *Aldh1l1-Cre/ERT2*^{+/-} マウスをご提供いただき深く感謝いたします。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました宮之原遵 博士、京都大学大学院薬学研究科 三宅崇仁 助教、勇昂一 博士、金沢大学医薬保健研究域 西谷直也 助教、京都大学大学院医学研究科 浅岡希美 特定助教、日本大学医学部 長島卓也 助教、浅尾靖仁 学士、大阪公立大学医学研究科 河合洋幸 助教をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。また、本研究にご協力いただきました戸堀翔太 学士、森嶋美沙 学士、中島弘貴 学士、川下綾香 さんに心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた大橋佳奈 修士、澁井紀宏 学士、古田晴香 学士、山本浩貴 学士、永井佑菜 博士、長岡巧樹 博士、矢野佑一 学士に心からお礼を述べるとともに、出屋敷綾音 学士、富澤恵里 学士、平瀬僚 学士、樋口拓哉 修士、楊秋斌 修士、栗田沙織 学士、藤田沙也香 修士、宮村咲映 学士、中澤駿基 学士、松尾凜紗 学士、國政椋太郎 くん、谷山一修 くん、山下志織 学士、植村凜 くんをはじめとする京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しましてご援助をいただきました日本学術振興会特別研究員制度、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念出来るように終始支えて下さった父 隆史、母 章子、姉 恵子に心から感謝いたします。

発表論文目録

1. Pathophysiological role of TRPM2 in age-related cognitive impairment in mice
(加齢マウスにおける認知機能低下に対する TRPM2 の病態生理学的役割)
Masashi Kakae, Jun Miyanohara, Misa Morishima, Kazuki Nagayasu, Yasuo Mori, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko
2019年6月1日発行 *Neuroscience* 第408巻204頁～213頁に掲載
2. Depletion of microglia ameliorates white matter injury and cognitive impairment in a mouse chronic cerebral hypoperfusion model.
(ミクログリアの除去により慢性脳低灌流マウスモデルにおける白質傷害、認知機能障害が改善される)
Masashi Kakae, Shota Tobori, Misa Morishima, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko
2019年7月5日発行 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 第514巻第4号1040頁～1044頁に掲載

参考文献

1. A. Young. Ageing and physiological functions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **352**, 1837-1843 (1997).
2. C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194-1217 (2013).
3. S. Sharma, S. Rakoczy, H. Brown-Borg. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* **87**, 521-536 (2010).
4. P. B. Gorelick, A. Scuteri, S. E. Black, C. DeCarli, S. M. Greenberg, C. Iadecola, L. J. Launer, S. Laurent, O. L. Lopez, D. Nyenhuis, R. C. Petersen, J. A. Schneider, C. Tzourio, D. K. Arnett, D. A. Bennett, H. C. Chui, R. T. Higashida, R. Lindquist, P. M. Nilsson, G. C. Roman, F. W. Sellke, S. Seshadri. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **42**, 2672-2713 (2011).
5. H. Bruunsgaard, M. Pedersen, B. K. Pedersen. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 131-136 (2001).
6. P. Grammas, R. Ovasse. Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **22**, 837-842 (2001).
7. R. Saggi, T. Schumacher, F. Gerich, C. Rakers, K. Tai, A. Delekate, G. C. Petzold. Astroglial NF- κ B contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 76 (2016).
8. Y. Kawamoto, I. Akiguchi, H. Tomimoto, Y. Shirakashi, Y. Honjo, H. Budka. Upregulated expression of 14-3-3 proteins in astrocytes from human cerebrovascular ischemic lesions. *Stroke* **37**, 830-835 (2006).
9. X. Fu, J. Zhang, L. Guo, Y. Xu, L. Sun, S. Wang, Y. Feng, L. Gou, L. Zhang, Y. Liu. Protective role of luteolin against cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **126**, 122-130 (2014).
10. B. A. in 't Veld, A. Ruitenbergh, A. Hofman, L. J. Launer, C. M. van Duijn, T. Stijnen, M. M. Breteler, B. H. Stricker. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1515-1521 (2001).
11. A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Kauppinen. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* **4**, 166-175 (2012).
12. A. Csiszar, Z. Ungvari, A. Koller, J. G. Edwards, G. Kaley. Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in rat coronary arteries. *FASEB J.* **17**, 1183-1185 (2003).
13. W. R. Swindell. Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse. *BMC Genomics* **10**, 585 (2009).
14. J. P. De Magalhães, J. Curado, G. M. Church. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* **25**, 875-881 (2009).
15. J. T. Rogers, C. C. Liu, N. Zhao, J. Wang, T. Putzke, L. Yang, M. Shinohara, J. D. Fryer, T. Kanekiyo, G. Bu. Subacute ibuprofen treatment rescues the synaptic and cognitive deficits in advanced-aged mice. *Neurobiol.*

Aging **53**, 112-121 (2017).

16. Q. Li, B. A. Barres. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 225-242 (2018).
17. R. M. Ransohoff. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* **353**, 777-783 (2016).
18. M. R. P. Elmore, L. A. Hohsfield, E. A. Kramár, L. Soreq, R. J. Lee, S. T. Pham, A. R. Najafi, E. E. Spangenberg, M. A. Wood, B. L. West, K. N. Green. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell* **17**, e12832 (2018).
19. A. L. Perraud, A. Fleig, C. A. Dunn, L. A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. J. Stokes, Q. Zhu, M. J. Bessman, R. Penner, J. P. Kinet, A. M. Scharenberg. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**, 595-599 (2001).
20. S. Kaneko, S. Kawakami, Y. Hara, M. Wakamori, E. Itoh, T. Minami, Y. Takada, T. Kume, H. Katsuki, Y. Mori, A. Akaike. A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J. Pharmacol. Sci.* **101**, 66-76 (2006).
21. R. Kraft, C. Grimm, K. Grosse, A. Hoffmann, S. Sauerbruch, H. Kettenmann, G. Schultz, C. Harteneck. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **286**, C129-C137 (2004).
22. T. Miyake, H. Shirakawa, A. Kusano, S. Sakimoto, M. Konno, T. Nakagawa, Y. Mori, S. Kaneko. TRPM2 contributes to LPS/IFN γ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 212-217 (2014).
23. S. Yamamoto, S. Shimizu, S. Kiyonaka, N. Takahashi, T. Wajima, Y. Hara, T. Negoro, T. Hiroi, Y. Kiuchi, T. Okada, S. Kaneko, I. Lange, A. Fleig, R. Penner, M. Nishi, H. Takeshima, Y. Mori. TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.* **14**, 738-747 (2008).
24. T. Hiroi, T. Wajima, T. Negoro, M. Ishii, Y. Nakano, Y. Kiuchi, Y. Mori, S. Shimizu. Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **97**, 271-281 (2013).
25. K. Haraguchi, A. Kawamoto, K. Isami, S. Maeda, A. Kusano, K. Asakura, H. Shirakawa, Y. Mori, T. Nakagawa, S. Kaneko. TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J. Neurosci.* **32**, 3931-3941 (2012).
26. V. G. Ostapchenko, M. Chen, M. S. Guzman, Y. F. Xie, N. Lavine, J. Fan, F. H. Beraldo, A. C. Martyn, J. C. Belrose, Y. Mori, J. F. MacDonald, V. F. Prado, M. A. Prado, M. F. Jackson. The transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel contributes to β -amyloid oligomer-related neurotoxicity and memory impairment. *J. Neurosci.* **35**, 15157-15169 (2015).
27. J. Miyanohara, M. Kakae, K. Nagayasu, T. Nakagawa, Y. Mori, K. Arai, H. Shirakawa, S. Kaneko. TRPM2 channel aggravates CNS inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion. *J. Neurosci.* **38**, 3520-3533 (2018).
28. C. Andoh, N. Nishitani, E. Hashimoto, Y. Nagai, K. Takao, T. Miyakawa, T. Nakagawa, Y. Mori, K. Nagayasu, H. Shirakawa, S. Kaneko. TRPM2 confers susceptibility to social stress but is essential for behavioral

- flexibility. *Brain Res.* **1704**, 68-77 (2019).
29. K. Nishio, M. Ihara, N. Yamasaki, R. N. Kalaria, T. Maki, Y. Fujita, H. Ito, N. Oishi, H. Fukuyama, T. Miyakawa, R. Takahashi, H. Tomimoto. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41**, 1278-1284 (2010).
 30. N. Pitsikas, P. A. Tarantilis. Crocins, the active constituents of *Crocus sativus* L., counteracted apomorphine-induced performance deficits in the novel object recognition task, but not novel object location task, in rats. *Neurosci. Lett.* **644**, 37-42 (2017).
 31. S. N. Lockhart, A. B. Mayda, A. E. Roach, E. Fletcher, O. Carmichael, P. Maillard, C. G. Schwarz, A. P. Yonelinas, C. Ranganath, C. Decarli. Episodic memory function is associated with multiple measures of white matter integrity in cognitive aging. *Front. Hum. Neurosci.* **6**, 56 (2012).
 32. G. Douaud, R. A. Menke, A. Gass, A. U. Monsch, A. Rao, B. Whitcer, G. Zamboni, P. M. Matthews, M. Sollberger, S. Smith. Brain microstructure reveals early abnormalities more than two years prior to clinical progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **33**, 2147-2155 (2013).
 33. J. C. de Groot, F. E. de Leeuw, M. Oudkerk, A. Hofman, J. Jolles, M. M. Breteler. Cerebral white matter lesions and depressive symptoms in elderly adults. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 1071-1076 (2000).
 34. D. R. Vago, R. P. Kesner. Disruption of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus interferes with spatial working memory and novelty detection. *Behav. Brain Res.* **189**, 273-283 (2008).
 35. Q. Shi, K. J. Colodner, S. B. Matousek, K. Merry, S. Hong, J. E. Kenison, J. L. Frost, K. X. Le, S. Li, J. C. Dodart, B. J. Caldarone, B. Stevens, C. A. Lemere. Complement C3-deficient mice fail to display age-related hippocampal decline. *J. Neurosci.* **35**, 13029-13042 (2015).
 36. G. J. Larrabee, T. H. Crook. Estimated prevalence of age-associated memory impairment derived from standardized tests of memory function. *Int. Psychogeriatr.* **6**, 95-104 (1994).
 37. N. A. Bishop, T. Lu, B. A. Yankner. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* **464**, 529-535 (2010).
 38. K. E. Stahon, C. Bastian, S. Griffith, G. J. Kidd, S. Brunet, S. Baltan. Age-related changes in axonal and mitochondrial ultrastructure and function in white matter. *J. Neurosci.* **36**, 9990-10001 (2016).
 39. C. Bastian, J. Zaleski, K. Stahon, B. Parr, A. McCray, J. Day, S. Brunet, S. Baltan. NOS3 inhibition confers post-ischemic protection to young and aging white matter integrity by conserving mitochondrial dynamics and miro-2 levels. *J. Neurosci.* **38**, 6247-6266 (2018).
 40. N. C. Woodward, P. Pakbin, A. Saffari, F. Shirmohammadi, A. Haghani, C. Sioutas, M. Cacciottolo, T. E. Morgan, C. E. Finch. Traffic-related air pollution impact on mouse brain accelerates myelin and neuritic aging changes with specificity for CA1 neurons. *Neurobiol. Aging* **53**, 48-58 (2017).
 41. S. R. Das, K. R. Magnusson. Changes in expression of splice cassettes of NMDA receptor GluN1 subunits within the frontal lobe and memory in mice during aging. *Behav. Brain Res.* **222**, 122-133 (2011).
 42. J. O. Ojo, P. Rezaie, P. L. Gabbott, M. G. Stewart. Impact of age-related neuroglial cell responses on hippocampal deterioration. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 57 (2015).
 43. E. Martin, C. Boucher, B. Fontaine, C. Delarasse. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and

- monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease models: effects of aging and amyloid pathology. *Aging cell* **16**, 27-38 (2017).
44. D. Raj, Z. Yin, M. Breur, J. Doorduyn, I. R. Holtman, M. Olah, I. J. Mantingh-Otter, D. Van Dam, P. P. De Deyn, W. den Dunnen, B. J. L. Eggen, S. Amor, E. Boddeke. Increased white matter inflammation in aging- and Alzheimer's disease brain. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 206 (2017).
 45. B. A. Friedman, K. Srinivasan, G. Ayalon, W. J. Meilandt, H. Lin, M. A. Huntley, Y. Cao, S. H. Lee, P. C. G. Haddick, H. Ngu, Z. Modrusan, J. L. Larson, J. S. Kaminker, M. P. van der Brug, D. V. Hansen. Diverse brain myeloid expression profiles reveal distinct microglial activation states and aspects of Alzheimer's disease not evident in mouse models. *Cell Rep.* **22**, 832-847 (2018).
 46. C. C. Stichel, H. Luebbert. Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol. Aging* **28**, 1507-1521 (2007).
 47. S. J. Campbell, R. O. Carare-Nnadi, P. H. Losey, D. C. Anthony. Loss of the atypical inflammatory response in juvenile and aged rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33**, 108-120 (2007).
 48. J. E. Tichauer, B. Flores, B. Soler, L. Eugenín-von Bernhardt, G. Ramírez, R. von Bernhardt. Age-dependent changes on TGFβ1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation. *Brain Behav. Immun.* **37**, 187-196 (2014).
 49. A. J. Farrall, J. M. Wardlaw. Blood–brain barrier: ageing and microvascular disease—systematic review and meta-analysis. *Neurobiol. Aging* **30**, 337-352 (2009).
 50. A. Moranis, J. C. Delpech, V. De Smedt-Peyrusse, A. Aubert, P. Guesnet, M. Laviaille, C. Joffre, S. Layé. Long term adequate n-3 polyunsaturated fatty acid diet protects from depressive-like behavior but not from working memory disruption and brain cytokine expression in aged mice. *Brain Behav. Immun.* **26**, 721-731 (2012).
 51. T. Singh, A. B. Newman. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res. Rev.* **10**, 319-329 (2011).
 52. A. Deczkowska, O. Matcovitch-Natan, A. Tzitsou-Kampeli, S. Ben-Hamo, R. Dvir-Szternfeld, A. Spinrad, O. Singer, E. David, D. R. Winter, L. K. Smith, A. Kertser, K. Baruch, N. Rosenzweig, A. Terem, M. Prinz, S. Villeda, A. Citri, I. Amit, M. Schwartz. Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner. *Nat. Commun.* **8**, 717 (2017).
 53. J. Aanerud, P. Borghammer, M. M. Chakravarty, K. Vang, A. B. Rodell, K. Y. Jónsdóttir, A. Møller, M. Ashkanian, M. S. Vafaee, P. Iversen, P. Johannsen, A. Gjedde. Brain energy metabolism and blood flow differences in healthy aging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1177-1187 (2012).
 54. L. Park, K. Koizumi, S. El Jamal, P. Zhou, M. L. Previti, W. E. Van Nostrand, G. Carlson, C. Iadecola. Age-dependent neurovascular dysfunction and damage in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* **45**, 1815-1821 (2014).
 55. R. P. Ureshino, A. J. Costa, A. G. Erustes, G. J. D. S. Pereira, R. Sinigaglia-Coimbra, S. S. Smaili. Effects of aging in the striatum and substantia nigra of a Parkinson's disease animal model. *Toxicol. Pathol.* **46**, 348-358 (2018).
 56. X. Li, W. Yang, L. H. Jiang. Alteration in intracellular Zn²⁺ homeostasis as a result of TRPM2 channel activation contributes to ROS-induced hippocampal neuronal death. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 414 (2017).

57. M. Prinz, D. Erny, N. Hagemeyer. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat. Immunol.* **18**, 385-392 (2017).
58. H. Keren-Shaul, A. Spinrad, A. Weiner, O. Matcovitch-Natan, R. Dvir-Szternfeld, T. K. Ulland, E. David, K. Baruch, D. Lara-Astaiso, B. Toth, S. Itzkovitz, M. Colonna, M. Schwartz, I. Amit. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* **169**, 1276-1290 (2017).
59. E. L. Clayton, R. Mancuso, T. T. Nielsen, S. Mizielinska, H. Holmes, N. Powell, F. Norona, J. O. Larsen, C. Milioto, K. M. Wilson, M. F. Lythgoe, S. Ourselin, J. E. Nielsen, P. Johannsen, I. Holm, J. Collinge; FReJA; P. L. Oliver, D. Gomez-Nicola, A. M. Isaacs. Early microgliosis precedes neuronal loss and behavioural impairment in mice with a frontotemporal dementia-causing CHMP2B mutation. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 873-887 (2017).
60. A. C. Wendeln, K. Degenhardt, L. Kaurani, M. Gertig, T. Ulas, G. Jain, J. Wagner, L. M. Häsler, K. Wild, A. Skodras, T. Blank, O. Staszewski, M. Datta, T. P. Centeno, V. Capece, M. R. Islam, C. Kerimoglu, M. Staufenbiel, J. L. Schultze, M. Beyer, M. Prinz, M. Jucker, A. Fischer, J. J. Neher. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* **556**, 332-338 (2018).
61. M. Kakae, J. Miyanohara, M. Morishima, K. Nagayasu, Y. Mori, H. Shirakawa, S. Kaneko. Pathophysiological role of TRPM2 in age-related cognitive impairment in mice. *Neuroscience* **408**, 204-213 (2019).
62. T. R. Hammond, C. Dufort, L. Dissing-Olesen, S. Giera, A. Young, A. Wysoker, A. J. Walker, F. Gergits, M. Segel, J. Nemes, S. E. Marsh, A. Saunders, E. Macosko, F. Ginhoux, J. Chen, R. J. M. Franklin, X. Piao, S. A. McCarroll, B. Stevens. Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes. *Immunity* **50**, 253-271 (2019).
63. P. Venkat, M. Chopp, J. Chen. Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp. Neurol.* **272**, 97-108 (2015).
64. M. R. Elmore, A. R. Najafi, M. A. Koike, N. N. Dagher, E. E. Spangenberg, R. A. Rice, M. Kitazawa, B. Matusow, H. Nguyen, B. L. West, K. N. Green. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82**, 380-397 (2014).
65. G. Szalay, B. Martinecz, N. Lénárt, Z. Környei, B. Orsolits, L. Judák, E. Császár, R. Fekete, B. L. West, G. Katona, B. Rózsa, Á. Dénes. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat. Commun.* **7**, 11499 (2016).
66. T. Temma, M. Yamazaki, J. Miyanohara, H. Shirakawa, N. Kondo, K. Koshino, S. Kaneko, H. Iida. Sequential PET estimation of cerebral oxygen metabolism with spontaneous respiration of ¹⁵O-gas in mice with bilateral common carotid artery stenosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 3334-3343 (2017).
67. M. A. Daulatzai. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **95**, 943-972 (2017).
68. M. Dichgans, D. Leys. Vascular cognitive impairment. *Circ. Res.* **120**, 573-591 (2017).
69. C. C. Liu, N. Lu, Y. Cui, T. Yang, Z. Q. Zhao, W. J. Xin, X. G. Liu. Prevention of paclitaxel-induced allodynia by minocycline: effect on loss of peripheral nerve fibers and infiltration of macrophages in rats. *Mol. Pain* **6**, 1744-8069 (2010).
70. C. R. Robinson, H. Zhang, P. M. Dougherty. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and

- bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* **274**, 308-317 (2014).
71. K. Miyamoto, K. Kume, M. Ohsawa. Role of microglia in mechanical allodynia in the anterior cingulate cortex. *J. Pharmacol. Sci.* **134**, 158-165 (2017).
 72. Y. Song, E. Q. Wei, W. P. Zhang, L. Zhang, J. R. Liu, Z. Chen. Minocycline protects PC12 cells from ischemic-like injury and inhibits 5-lipoxygenase activation. *Neuroreport* **15**, 2181-2184 (2004).
 73. M. Li, Z. Li, H. Ren, W. N. Jin, K. Wood, Q. Liu, K. N. Sheth, F. D. Shi. Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 2383-2395 (2017).
 74. J. Sosna, S. Philipp, R. Albay, J. M. Reyes-Ruiz, D. Baglietto-Vargas, F. M. LaFerla, C. G. Glabe. Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **13**, 11 (2018).
 75. H. Janova, S. Arinrad, E. Balmuth, M. Mitjans, J. Hertel, M. Habes, R. A. Bittner, H. Pan, S. Goebbels, M. Begemann, U. C. Gerwig, S. Langner, H. B. Werner, S. Kittel-Schneider, G. Homuth, C. Davatzikos, H. Völzke, B. L. West, A. Reif, H. J. Grabe, S. Boretius, H. Ehrenreich, K. A. Nave. Microglia ablation alleviates myelin-associated catatonic signs in mice. *J. Clin. Invest.* **128**, 734-745 (2018).
 76. J. C. Nissen, K. K. Thompson, B. L. West, S. E. Tsirka. Csf1R inhibition attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes recovery. *Exp. Neurol.* **307**, 24-36 (2018).
 77. F. Tahmasebi, P. Pasbakhsh, K. Mortezaee, S. Madadi, S. Barati, I. R. Kashani. Effect of the CSF1R inhibitor PLX3397 on remyelination of corpus callosum in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *J. Cell. Biochem.* **120**, 10576-10586 (2019).
 78. W. N. Jin, S. X. Y. Shi, Z. Li, M. Li, K. Wood, R. J. Gonzales, Q. Liu. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 2224-2236 (2017).
 79. T. Jiang, L. Zhang, X. Pan, H. Zheng, X. Chen, L. Li, J. Luo, X. Hu. Physical exercise improves cognitive function together with microglia phenotype modulation and remyelination in chronic cerebral hypoperfusion. *Front. Cell Neurosci.* **11**, 404 (2017).
 80. M. V. Sofroniew. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 249-263 (2015).
 81. M. V. Sofroniew. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist* **20**, 160-172 (2014).
 82. G. A. Rosenberg, A. Wallin, J. M. Wardlaw, H. S. Markus, J. Montaner, L. Wolfson, C. Iadecola, B. V. Zlokovic, A. Joutel, M. Dichgans, M. Duering, R. Schmidt, A. D. Korczyn, L. T. Grinberg, H. C. Chui, V. Hachinski. Consensus statement for diagnosis of subcortical small vessel disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 6-25 (2016).
 83. Y. Ma, P. J. Tully, A. Hofman, C. Tzourio. Blood pressure variability and dementia: a state-of-the-art review. *Am. J. Hypertens.* **33**, 1059-1066 (2020).
 84. K. Kisler, A. R. Nelson, A. Montagne, B. V. Zlokovic. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 419-434 (2017).
 85. C. Iadecola. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* **80**, 844-866 (2013).

86. C. Iadecola. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron* **96**, 17-42 (2017).
87. J. Attems, K. A. Jellinger. The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease-lessons from pathology. *BMC Med.* **12**, 206 (2014).
88. K. Koizumi, Y. Hattori, S. J. Ahn, I. Buendia, A. Ciacciarelli, K. Uekawa, G. Wang, A. Hiller, L. Zhao, H. U. Voss, S. M. Paul, C. Schaffer, L. Park, C. Iadecola. ApoE4 disrupts neurovascular regulation and undermines white matter integrity and cognitive function. *Nat. Commun.* **9**, 3816 (2018).
89. R. Sakaguchi, Y. Mori. Transient receptor potential (TRP) channels: Biosensors for redox environmental stimuli and cellular status. *Free. Radic. Biol. Med.* **146**, 36-44 (2020).
90. N. Takahashi, T. Kuwaki, S. Kiyonaka, T. Numata, D. Kozai, Y. Mizuno, S. Yamamoto, S. Naito, E. Knevels, P. Carmeliet, T. Oga, S. Kaneko, S. Suga, T. Nokami, J. Yoshida, Y. Mori. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 701-711 (2011).
91. S. Oyama, K. Dogishi, M. Kodera, M. Kakae, K. Nagayasu, H. Shirakawa, T. Nakagawa, S. Kaneko. Pathophysiological role of transient receptor potential ankyrin 1 in a mouse long-lasting cystitis model induced by an intravesical injection of hydrogen peroxide. *Front. Physiol.* **8**, 877 (2017).
92. M. Tsutsui, R. Hirase, S. Miyamura, K. Nagayasu, T. Nakagawa, Y. Mori, H. Shirakawa, S. Kaneko. TRPM2 exacerbates central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing production of CXCL2 chemokines. *J. Neurosci.* **38**, 8484-8495 (2019).
93. G. M. Story, A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, A. Patapoutian. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829 (2003).
94. D. M. Bautista, M. Pellegrino, M. Tsunozaki. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 181-200 (2013).
95. E. Shigetomi, X. Tong, K. Y. Kwan, D. P. Corey, B. S. Khakh. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* **15**, 70-80 (2011).
96. E. Shigetomi, O. Jackson-Weaver, R. T. Huckstepp, T. J. O'Dell, B. S. Khakh. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J. Neurosci.* **33**, 10143-10153 (2013).
97. S. J. Oh, J. M. Lee, H. B. Kim, J. Lee, S. Han, J. Y. Bae, G. S. Hong, W. Koh, J. Kwon, E. S. Hwang, D. H. Woo, I. Youn, I. J. Cho, Y. C. Bae, S. Lee, J. W. Shim, J. H. Park, C. J. Lee. Ultrasonic neuromodulation via astrocytic TRPA1. *Curr. Biol.* **29**, 3386-3401 (2019).
98. S. Earley, A. L. Gonzales, R. Crnich. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. *Circ. Res.* **104**, 987-994 (2009).
99. N. B. Hamilton, K. Kolodziejczyk, E. Kougioumtzidou, D. Attwell. Proton-gated Ca²⁺-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature* **529**, 523-527 (2016).
100. P. W. Pires, S. Earley. Neuroprotective effects of TRPA1 channels in the cerebral endothelium following ischemic stroke. *eLife* **7**, e35316 (2018).
101. K. I. Lee, H. T. Lee, H. C. Lin, H. J. Tsay, F. C. Tsai, S. K. Shyue, T. S. Lee. Role of transient receptor potential

- ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **13**, 92 (2016).
102. A. Paumier, S. Boisseau, M. Jacquier-Sarlin, K. Pernet-Gallay, A. Buisson, M. Albrieux. Astrocyte–neuron interplay is critical for Alzheimer's disease pathogenesis and is rescued by TRPA1 channel blockade. *Brain* **145**, 388-405 (2022).
 103. M. Kakae, S. Tabori, M. Morishima, K. Nagayasu, H. Shirakawa, S. Kaneko. Depletion of microglia ameliorates white matter injury and cognitive impairment in a mouse chronic cerebral hypoperfusion model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **514**, 1040-1044 (2019).
 104. N. Miyamoto, T. Maki, L. D. Pham, K. Hayakawa, J. H. Seo, E. T. Mandeville, J. B. Mandeville, K. W. Kim, E. H. Lo, K. Arai. Oxidative stress interferes with white matter renewal after prolonged cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke* **44**, 3516-3521 (2013).
 105. R. Srinivasan, T. Y. Lu, H. Chai, J. Xu, B. S. Huang, P. Golshani, G. Coppola, B. S. Khakh. New transgenic mouse lines for selectively targeting astrocytes and studying calcium signals in astrocyte processes in situ and in vivo. *Neuron* **92**, 1181-1195 (2016).
 106. Y. Y. Kisanuki, R. E. Hammer, J. Miyazaki, S. C. Williams, J. A. Richardson, M. Yanagisawa. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev. Biol.* **230**, 230-242 (2001).
 107. H. Nakajima, S. Fujita, M. Kakae, K. Nagayasu, M. Oh-Hora, H. Shirakawa, S. Kaneko. Orai2 channel regulates prostaglandin E2 production in TNF α /IL1 α -stimulated astrocytes. *Glia* **70**, 1666-1680 (2022).
 108. N. Miyamoto, T. Maki, A. Shindo, A. C. Liang, M. Maeda, N. Egawa, K. Itoh, E. K. Lo, J. Lok, M. Ihara, K. Arai. Astrocytes promote oligodendrogenesis after white matter damage via brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* **35**, 14002-14008 (2015).
 109. D. Kim, B. Langmead, S. L. Salzberg. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* **12**, 357-360 (2015).
 110. Y. Liao, G. K. Smyth, W. Shi. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923-930 (2014).
 111. M. D. Robinson, D. J. McCarthy, G. K. Smyth. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140 (2010).
 112. S. A. Liddelow, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Münch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens, B. A. Barres. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481-487 (2017).
 113. D. Binns, E. Dimmer, R. Huntley, D. Barrell, C. O'Donovan, R. Apweiler. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* **25**, 3045-3046 (2009).
 114. S. Heinz, C. Benner, N. Spann, E. Bertolino, Y. C. Lin, P. Laslo, J. X. Cheng, C. Murre, H. Singh, C. K. Glass. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38**, 576-589 (2010).
 115. T. Ishibashi, K. A. Dakin, B. Stevens, P. R. Lee, S. V. Kozlov, C. L. Stewart, R. D. Fields. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* **49**, 823-832 (2006).
 116. B. Emery, H. S. Cate, M. Marriott, T. Merson, M. D. Binder, C. Snell, P. Y. Soo, S. Murray, B. Croker, J. G.

- Zhang, W. S. Alexander, H. Cooper, H. Butzkueven, T. J. Kilpatrick. Suppressor of cytokine signaling 3 limits protection of leukemia inhibitory factor receptor signaling against central demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7859-7864 (2006).
117. J. Lin, Y. Niimi, M. G. Clausi, H. D. Kanal, S. W. Levison. Neuroregenerative and protective functions of Leukemia Inhibitory Factor in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Exp. Neurol.* **330**, 113324 (2020).
118. S. Moidunny, J. Vinet, E. Wesseling, J. Bijzet, C. H. Shieh, S. C. van Ijzendoorn, P. Bezzi, H. W. Boddeke, K. Biber. Adenosine A2B receptor-mediated leukemia inhibitory factor release from astrocytes protects cortical neurons against excitotoxicity. *J. Neuroinflammation* **9**, 198 (2012).
119. S. Pöyhönen, S. Er, A. Domanskyi, M. Airavaara. Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: expression and properties in neurodegeneration and injury. *Front. Physiol.* **10**, 486 (2019).
120. S. Rose-John. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a028415 (2018).
121. C. Guo, J. Dong, Y. Ma, S. Zhou, W. Zeng, G. Liu, C. Zhang. LIF and bFGF enhanced chicken primordial follicle activation by Wnt/ β -catenin pathway. *Theriogenology* **176**, 1-11 (2021).
122. Y. Iturria-Medina, R. C. Sotero, P. J. Toussaint, J. M. Mateos-Pérez, A. C. Evans. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat. Commun.* **7**, 11934 (2016).
123. Y. Deschaintre, F. Richard, D. Leys, F. Pasquier. Treatment of vascular risk factors is associated with slower decline in Alzheimer disease. *Neurology* **73**, 674-680 (2009).
124. M. Gardarsdottir, S. Sigurdsson, T. Aspelund, H. Rokita, L. J. Launer, V. Gudnason, D. O. Arnar. Atrial fibrillation is associated with decreased total cerebral blood flow and brain perfusion. *Europace* **20**, 1252-1258 (2018).
125. N. Kato, K. Muraga, Y. Hirata, A. Shindo, K. Matsuura, Y. Ii, M. Shiga, K. Tabei, M. Satoh, S. Fujita, T. Fukuma, Y. Kagawa, E. Fujii, M. Umino, M. Maeda, H. Sakuma, M. Ito, H. Tomimoto. Brain magnetic resonance imaging and cognitive alterations after ablation in patients with atrial fibrillation. *Sci. Rep.* **11**, 18995 (2021).
126. T. Miyake, S. Nakamura, M. Zhao, K. So, K. Inoue, T. Numata, N. Takahashi, H. Shirakawa, Y. Mori, T. Nakagawa, S. Kaneko. Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nat. Commun.* **7**, 12840 (2016).
127. K. So, Y. Tei, M. Zhao, T. Miyake, H. Hiyama, H. Shirakawa, S. Imai, Y. Mori, T. Nakagawa, K. Matsubara, S. Kaneko. Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci. Rep.* **6**, 23261 (2016).
128. Y. Sawada, H. Hosokawa, K. Matsumura, S. Kobayashi. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 1131-1142 (2008).
129. N. Takahashi, H. Y. Chen, I. S. Harris, D. G. Stover, L. M. Selfors, R. T. Bronson, T. Deraedt, K. Cichowski, A. L. Welm, Y. Mori, G. B. Mills, J. S. Brugge. Cancer cells co-opt the neuronal redox-sensing channel TRPA1 to promote oxidative-stress tolerance. *Cancer Cell* **33**, 985-1003 (2018).
130. I. Vandewauw, K. De Clercq, M. Mulier, K. Held, S. Pinto, N. Van Ranst, A. Segal, T. Voet, R. Vennekens, K. Zimmermann, J. Vriens, T. Voets. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* **555**, 662-

666 (2018).

131. A. Tauffenberger, P. J. Magistretti. Reactive oxygen species: beyond their reactive behavior. *Neurochem. Res.* **46**, 77-87 (2021).
132. K. F. Bell, B. Al-Mubarak, J. H. Fowler, P. S. Baxter, K. Gupta, T. Tsujita, S. Chowdhry, R. Patani, S. Chandran, K. Horsburgh, J. D. Hayes, G. E. Hardingham. Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, E1-E2 (2011).
133. M. Uchiyama, A. Nakao, Y. Kurita, I. Fukushi, K. Takeda, T. Numata, H. N. Tran, S. Sawamura, M. Ebert, T. Kurokawa, R. Sakaguchi, A. J. Stokes, N. Takahashi, Y. Okada, Y. Mori. O₂-dependent protein internalization underlies astrocytic sensing of acute hypoxia by restricting multimodal TRPA1 channel responses. *Curr. Biol.* **30**, 3378-3396 (2020).
134. M. N. Sullivan, A. L. Gonzales, P. W. Pires, A. Bruhl, M. D. Leo, W. Li, A. Oulidi, F. A. Boop, Y. Feng, J. H. Jaggar, D. G. Welsh, S. Earley. Localized TRPA1 channel Ca²⁺ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Sci. Signal.* **8**, ra2 (2015).
135. S. M. Metcalfe. Neuroprotective immunity: leukaemia inhibitory factor (LIF) as guardian of brain health. *Med. Drug. Discov.* **2**, 100006 (2019).
136. H. Mi, H. Haeberle, B. A. Barres. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J. Neurosci.* **21**, 1538-1547 (2001).
137. K. H. Holmberg, P. H. Patterson. Leukemia inhibitory factor is a key regulator of astrocytic, microglial and neuronal responses in a low-dose pilocarpine injury model. *Brain Res.* **1075**, 26-35 (2006).
138. J. E. Herrmann, T. Imura, B. Song, J. Qi, Y. Ao, T. K. Nguyen, R. A. Korsak, K. Takeda, S. Akira, M. V. Sofroniew. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **28**, 7231-7243 (2008).
139. M. V. Sofroniew. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends. Neurosci.* **32**, 638-647 (2009).
140. I. B. Wanner, M. A. Anderson, B. Song, J. Levine, A. Fernandez, Z. Gray-Thompson, Y. Ao, M. V. Sofroniew. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **33**, 12870-12886 (2013).
141. M. V. Sofroniew. Astrogliosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020420 (2014).
142. E. Nummenmaa, M. Hämäläinen, A. Pemmari, L. J. Moilanen, L. Tuure, R. M. Nieminen, T. Moilanen, K. Vuolteenaho, E. Moilanen. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is involved in upregulating interleukin-6 expression in osteoarthritic chondrocyte models. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 87 (2020).