

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06712

研究課題名(和文) 頭部外傷後の遅延性てんかん発症をBMP4/PDGFR 活性化ペリサイトが牽引する

研究課題名(英文) The role of pericytes in the development of epileptogenesis after traumatic brain injury

研究代表者

高田 芙友子 (TAKATA, Fuyuko)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：70412575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭部外傷(TBI)による遅発性てんかんは、抗てんかん薬に抵抗性を示すことから、未解決な課題として取り残されている。TBIマウスを用いた本実験で、受傷後のグリア細胞活性化や遅発的なピロカルピン感受性けいれん発症に先行してペリサイト活性化(PDGFR 発現上昇)が認められた。さらに外傷後早期のPDGFR 活性化阻害薬イマチニブ投与は、グリア細胞活性化や神経易興奮性を特徴とするneurovascular unitの不調和を軽減した。以上の知見は、脳ペリサイトが遅発性てんかん発症前の病態形成に関与することを示しており、外傷後の遅発性てんかん発症を予防するための治療標的となる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの頭部外傷後の遅発性てんかん研究では、脳神経活動異常、BBB機能障害、グリア細胞活性化についてそれぞれ個別で議論されてきたため、その発症機構の全貌を捉えることが困難であったと推測される。本研究は、頭部外傷後のペリサイト活性化がneurovascular unitの不調和を牽引することを明らかにし、遅発性てんかんの病態形成過程を段階的かつ複合的に捉えることを可能とした点に学術的意義がある。抗てんかん薬に抵抗性を示す遅発性てんかんの治療法は、未だ確立されていない。ペリサイトを本疾患の新規治療標的として提案することは、新たな治療薬開発の隘路を切り開く可能性があり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Traumatic brain injury TBI produces the secondary damages including late-onset epilepsy. To understand how TBI causes an uncoordinated crosstalk in the neurovascular unit (NVU) and neuronal hyperexcitability, we focused on pericyte reactivity in the NVU cell properties in TBI mice. PDGFR immunoreactivities in pericytes were significantly increased in the early phase (up to 4 days after TBI). Microglial and astrocyte activations were found during a period from 4 to 28 days after TBI. The severity of seizure induced by pilocarpine gradually increased, becoming significant at 28 days after TBI. Then, treatment of imatinib, an inhibitor of PDGFR signaling, during the early phase lowered seizure susceptibility to pilocarpine, suppressed microglial activation and decreased expression of the astrocytic glutamate transporter. These findings indicate that brain pericytes with rapidly increased PDGFR expression may drive TBI-induced dysregulation of NVU function and brain hyperexcitability.

研究分野：応用薬剤学

キーワード：ペリサイト 頭部外傷 てんかん アストロサイト ミクログリア 神経易興奮性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

交通事故や転倒・転落などによる頭部外傷 (Traumatic Brain Injury: TBI)の受傷者は、本邦では年間 28 万人、世界的には年間 1000 万人にも昇る。TBI 後に発症する後遺症は、脳損傷を背景として多彩な症候を呈し、患者の QOL を著しく低下させる。なかでも、頭部外傷性てんかん(post traumatic epilepsy: PTE)は、TBI 患者の約 35%に発症する。その 15%は外傷後一週間以内に認められる早期てんかん (早期 PTE)で、85%はそれ以降に発症する遅延性てんかん (遅発性 PTE)である。早期 PTE は旧世代抗てんかん薬により治療可能である。一方、遅発性 PTE は外傷後数ヶ月から十数年後にかけて発症し(Christensen et al., 2009 Lancet, DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60214-2)、旧世代抗てんかん薬に抵抗性を示す難治性てんかんであり (Temkin, 2001 Epilepsia, DOI: 10.1046/j.1528-1157.2001.28900.x)、TBI の未解決な課題として取り残されている。

遅発性 PTE は、脳神経を直接標的とする旧世代抗てんかん薬に抵抗性を示すことから、その発症機序は既知のてんかん発症機構とは異なることが想定される。TBI では、外傷に伴う神経損傷を契機として、急激な神経新生と神経制御サブユニット(グリア細胞; アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト) 不良による不完全な自己修復機構が働く。TBI から遅発性 PTE 発症までには長期間を要することから、この不完全な自己修復の期間にてんかん発症前病態 (epileptogenesis; てんかん原生) が形成され、てんかん発症へと導く可能性が考えられる。実際、症候性てんかん (各種疾病を背景とした遅発性てんかん) モデルマウスにおいて、血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB)障害、血管新生、アストロサイト活性化という一連の過程に起因したてんかん原生の獲得が、遅発性てんかん発症に先行して起こる (Itoh et al., 2016 Brain Res., DOI: 10.1016/j.brainres.2016.09.038)。また、TBI により BBB 障害やグリア細胞の機能異常を発現するとの報告は多い。これらは BBB 構成細胞や神経制御サブユニットの不良と TBI によるてんかん原生形成との関連性を示唆する。

一方、ペリサイトは、脳微小血管において脳血管内皮細胞と併存する脳血管周皮細胞である。ペリサイトが BBB や神経細胞の機能維持に促進的に働くことが報告されている。また病態下では、ペリサイトは様々な炎症性サイトカインやケモカインを放出し、ミクログリアの活性化を誘導する。従って、ペリサイトは、BBB 機能調節装置としてだけではなく脳神経血管ユニット (Neurovascular unit : NVU)の一員として、脳神経および脳神経制御サブユニットを統括し脳環境の恒常性維持を担う「神経環境制御装置」と捉えられる。しかし、頭部外傷後のてんかん原生獲得における、神経環境制御装置ペリサイトの役割は不明である。

2. 研究の目的

頭部外傷後の遅発性てんかん発症に関わる脳神経易興奮性およびグリア細胞活性化を伴う遅発性けいれん易発症病態の形成に、頭部外傷後早期に活性化される脳ペリサイトが関与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) CCI モデルマウスの作製:6-8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの左脳に controlled cortical impact (CCI) 装置を用いて頭部外傷を受傷させ、頭部外傷モデルマウス (CCI マウス) を作製した。頭部外傷の重症度は、neurological severity score (NSS)を用いて評価した。本実験で用いた CCI マウスにおける受傷後 1 時間の NSS は、 5.15 ± 0.21 (中等度の神経障害)であった。
- (2) ピロカルピンに対するけいれん感受性評価: CCI 負荷後、7, 14, 21, 28 日後にピロカルピンに対するけいれん感受性を評価した。1 mg/kg メチルスコポラミンを腹腔内に投与した 30

分後に 250 mg/mL のピロカルピンを腹腔内投与し、modified Racine scale を用いてけいれん行動を評価した(Racine, 1972 Electroencephalogr Clin Neurophysiol, doi: 10.1016/0013-4694(72)90177-0.)。

- (3) CCI マウスへのイマチニブ投与：CCI 負荷する当日から 4 日後まで、12 時間毎に 200 mg/kg のイマチニブを経口投与した。CCI 当日は、負荷の 12 時間前と 2 時間前に投与した。Vehicle として dH₂O を経口投与した。
- (4) CCI マウスへの noggin 投与：イソフルラン麻酔下で、CCI 負荷する当日（負荷 1 時間前）から 4 日後まで、1 μg noggin を経鼻投与した。CCI オペ時には外傷部位に直接 1 μg noggin を投与し、その後縫合した。
- (5) CCI マウス海馬における PDGF-BB 量の測定：CCI マウスから海馬を摘出し、PBS 中でホモジネートした。この海馬組織液を遠心分離し、上清中の PDGF-BB 濃度を ELISA kit (MBB00, R & D Systems) を用いて測定した。
- (6) 蛍光免疫組織染色：4% paraformaldehyde で固定した脳組織から脳切片（厚さ 20 μm）を作製し、免疫組織染色に供した。各標的タンパク質を蛍光染色後、BZ-X710 microscope(Keyence) で観察し、その蛍光強度を BZ-X Analyzer software を用いて解析した。
- (7) ペリサイト/アストロサイト共培養モデルの作製：ヒト由来アストロサイトを 24 プレートに 10 × 10⁴ cells/well 播種した。翌日に、ヒト由来ペリサイト 2.5 × 10⁴ cells を播種した 24 well セルカルチャーインサートを、アストロサイトを播種したプレートに設置した。72 時間共培養したアストロサイトを、グルタミン酸取り込み実験に用いた。
- (8) アストロサイトのグルタミン酸取り込み能の評価：ペリサイトと共培養したアストロサイトに、³H-グルタミン酸を含む緩衝液を 1, 2, 5, 10 分間処理した。その後、NaOH を用いて細胞を溶解し、細胞内に取り込まれた ³H-グルタミン酸の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。グルタミン酸取り込みトランスポーターである EAAT1 および EAAT2 の阻害実験では、それぞれの阻害薬である UCPH-101 もしくは dihydrokainic acid を混合した ³H-グルタミン酸を含む緩衝液を 10 分間処理し、³H-グルタミン酸の取り込み量を測定した。グルタミン酸取り込み能は、cell/medium ratio (μL/mg protein)として表した。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein}) = \frac{\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein}) \times \text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein})}{\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein})}$$

4. 研究成果

- (1) 頭部外傷後の脳ペリサイトにおける PDGFRβ 発現の変化：CCI 負荷後 1 時間から外傷側海馬において PDGFRβ の発現上昇が認められ、4 日目までその上昇は持続した。7 日目以降は、PDGFRβ 発現増加は軽微であった（図 1）。
- (2) 頭部外傷後のミクログリアの変化：CCI 負荷後 1 時間および 1 日目では、外傷側海馬における Iba1（ミクログリアマーカー）発現はわずかに上昇した。CCI 負荷後 4 日以降は、著しく Iba1 発現量が増加し、その増加は 28 日目まで持続した（図 2）。

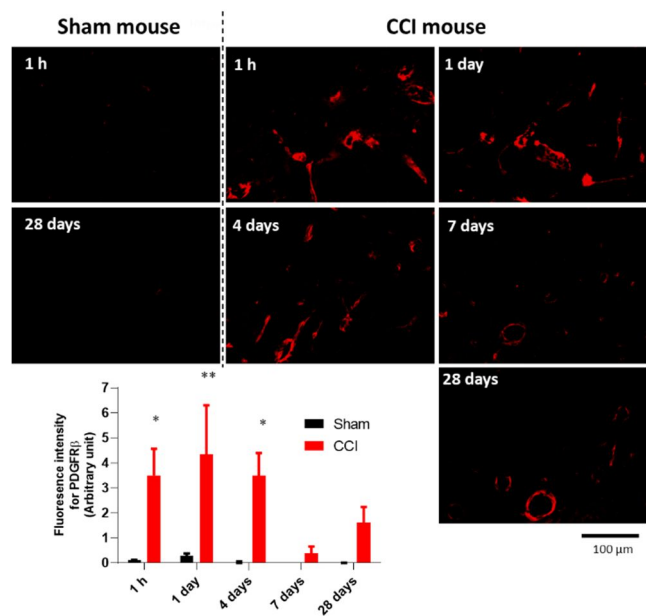


図1. 外傷側海馬におけるPDGFRβ(脳ペリサイトマーカー)発現の経時的な変動

- (3) 頭部外傷後のアストロサイトの変化：CCI 負荷後 1 時間および 1 日目では、外傷側海馬における GFAP (アストロサイトマーカー) 発現はわずかに上昇した。CCI 負荷後 4 日目には、GFAP 発現量は sham マウスと比較し有意に高くなり、CCI 負荷後 28 日目ではさらに増加した (図 2)。CCI 負荷後 28 日では、アストロサイトにおけるグルタミン酸取り込みトランスポーター-EAAT2 発現量は、sham マウスと比較し有意に低下した。一方 CCI 負荷後 7 日目では EAAT2 発現量に変化は認められなかった。

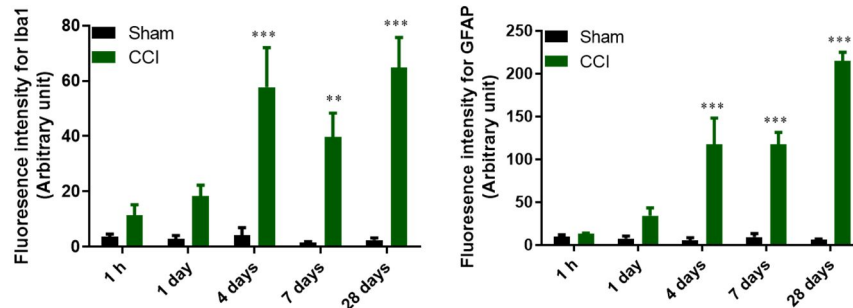


図2. 外傷側海馬におけるIba1およびGFAP発現の経時的な変動

- (4) 頭部外傷後のけいれん誘発剤ピロカルピンに対する感受性変化：Sham マウスではけいれん (Racine scale 3 以上) を誘発しない発作閾値下限用量である 250 mg/kg (i.p.) のピロカルピン量を用いて、CCI マウスのピロカルピンに対する感受性を評価した。ピロカルピンに対する感受性は、CCI 負荷後経日的に上昇し、CCI 負荷後 28 日では sham マウスと比較し、ピロカルピン誘発性のけいれん強度が有意に上昇した (図 3)。

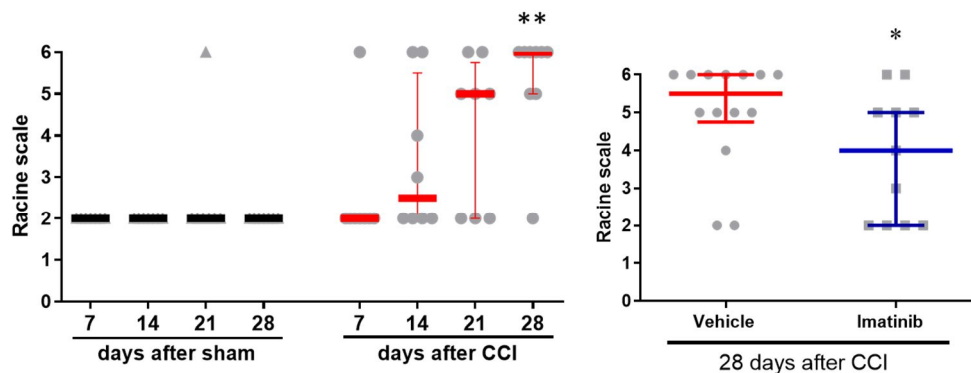


図3. CCI負荷後のpilocarpineけいれん感受性の上昇とそれに対するイマチニブの作用

- (5) CCI 負荷後の外傷側海馬における PDGF-BB の発現：頭部外傷後 1 日目の CCI マウス外傷側海馬における PDGF-BB 発現量は、sham マウスのそれと比較して有意に増加した。
- (6) CCI 負荷による遅発的なピロカルピン誘発けいれん感受性亢進に対する外傷後早期のイマチニブ短期投与の効果：頭部外傷後早期 (CCI 負荷後 1 時間~4 日目) から脳ペリサイトにおける PDGFR β 発現上昇が認められた。さらに外傷後 1 日目にはそのリガンドである PDGF-BB が上昇していたことから、外傷後早期に脳ペリサイトにおける PDGFR β シグナルは活性化していると考えられる。この脳ペリサイト活性化が遅発性のピロカルピン感受性上昇に関与するかを明らかにするため、PDGFR β シグナル阻害作用を有するイマチニブを外傷後 4 日目まで経口投与し、28 日目にピロカルピン誘発性けいれん感受性を評価した。イマチニブ投与により、ピロカルピン誘発性のけいれん重症度は有意に減少した (図 3)。よって、脳ペリサイトの外傷後早期の PDGFR β 活性化が、外傷後の神経興奮性の形成に関与していることが判った。
- (7) CCI 負荷後 28 日目のミクログリアおよびアストロサイト活性化に対する外傷後早期のイマ

チニブ短期投与の効果：脳ペリサイトの PDGFR β 発現上昇は、ミクログリアおよびアストロサイトの活性化に先行していた。そこで、イマチニブを投与した CCI マウスを用いて、活性化ペリサイトのミクログリアおよびアストロサイトに対する作用を検討した。CCI 負荷後 28 日目の Iba1 発現上昇を伴うミクログリアの活性化は、イマチニブ早期短期投与により有意に抑制された。また、イマチニブ早期短期投与により、CCI 負荷後 28 日目の GFAP 発現上昇を伴うアストロサイトの活性化は抑制されなかったが、CCI 負荷により減少した EAAT2 発現は回復した。よって、頭部外傷後の脳ペリサイトの早期活性化が、ミクログリアの活性化やアストロサイトのグルタミン酸取り込み能の低下を誘導している可能性がある。

- (8) BMP 阻害剤 noggin の CCI 負荷による PDGFR β 発現上昇に対する作用：CCI 負荷後 BMP4 シグナル増強物質である RGMb が増加していた。BMP シグナルは、脳ペリサイトの PDGFR β 発現上昇作用を有することが報告されている (Uemura et al., 2018 Brain pathol, DOI: 10.1111/bpa.12523)。そこで、CCI 負荷後の脳ペリサイト PDGFR β 発現上昇に BMP が関与するか検証するため、noggin を CCI マウスに投与し、PDGFR β 発現量を測定した。CCI 負荷により増加した PDGFR β 発現量は、noggin 投与により変化しなかった。このことから、頭部外傷後の BMP シグナルの増強は、脳ペリサイトの PDGFR β 発現上昇に関与しないことが明らかになった。また、noggin 投与は、外傷後増加した Iba1 発現量に対しても影響しなかった。

- (9) アストロサイトにおけるグルタミン酸取り込み能に対するペリサイトの作用 (in vitro 実験)：頭部外傷後の PDGFR β 活性化を伴うペリサイトが、アストロサイトの EAAT2 発現低下に関与することが、CCI マウスを用いた実験により明らかになった。EAAT2 は、アストロサイトによる細胞外グルタミン酸取り込みを担うトランスポーターである。そのため、頭部外傷後のアストロサイトのグルタミン酸取り込み変化に活性化ペリサイトが関与している可能性がある。しかし、ア

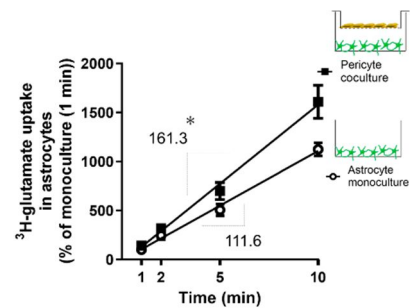


図4. 脳ペリサイト共培養後のアストロサイトのグルタミン酸取り込み能の変化

ストロサイトのグルタミン酸取り込みに脳ペリサイトが直接関与するかを評価した研究はこれまでにない。そこでペリサイト/アストロサイト共培養モデルを作製し、アストロサイトのグルタミン酸取り込みに対するペリサイトの作用を検討した。ペリサイトはアストロサイトによる ^3H グルタミン酸取り込みを有意に増加した(図4)。さらにこの作用は EAAT2 阻害剤の併用により減弱したことから、脳ペリサイトはアストロサイトの EAAT2 を介したグルタミン酸取り込みを促進的に制御していると考えられる。今後はアストロサイトによるグルタミン酸取り込みに対する PDGFR β 活性化ペリサイトの影響を検討する必要がある。

以上より、頭部外傷に伴うグリア細胞の活性化および神経興奮性の形成に先行して脳ペリサイトが活性化することが明らかになった。またイマチニブを用いた頭部外傷後のペリサイト PDGFR β 活性化阻害は、外傷後遅発的に認められるピロカルピン誘発性てんかんやグリア細胞の活性化を低下させた。これら知見は、頭部外傷後の遅発性てんかんへと導く NVU 不調和の形成(てんかん原生の獲得)を脳ペリサイトが牽引している可能性を示しており、てんかん原生獲得を阻止するための治療標的として脳ペリサイトを提起するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakai K, Takata F, Yamanaka G, Yasunaga M, Hashiguchi K, Tominaga K, Itoh K, Kataoka Y, Yamauchi A, Dohgu S.	4. 巻 145(1)
2. 論文標題 Reactive pericytes in early phase are involved in glial activation and late-onset hypersusceptibility to pilocarpine-induced seizures in traumatic brain injury model mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 155-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.11.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Fuyuko Takata, Kenta Sakai, Takuro Iwao, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka, Shinya Dohgu
2. 発表標題 Enhanced glutamate uptake in the astrocytes cocultured with brain pericytes.
3. 学会等名 3rd Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research（リモート）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 美友子, 坂井研太, 岩尾 卓朗, 松本 純一, 片岡 泰文, 山内淳史, 道具 伸也
2. 発表標題 Brain pericytes increase sodium-dependent glutamate uptake in astrocytes.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（リモート）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fuyuko Takata
2. 発表標題 Activated pericytes in the early stage after traumatic brain injury is a key trigger of the progression of microglial activation and neuronal hyperexcitability in the stage in mice.
3. 学会等名 2nd Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fuyuko Takata, Kenta Sakai, Atsushi Yamauchi, Shinya Dohgu, Yasufumi Kataoka
2. 発表標題 Increased PDGFR expression of the pericytes in the early stage after traumatic brain injury is a major cause of the subsequent activation of microglia and hypersusceptibility to pilocarpine-induced seizure in mice.
3. 学会等名 NEURO 2019 (Late Breaking) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Sakai, Fuyuko Takata, Yoshie Tanaka, Yume Sezaki, Kazuki Tominaga, Kana Hashiguchi, Miho Yasunaga, Atsushi Yamauchi, Shinya Dohgu, Yasufumi Kataoka.
2. 発表標題 PDGFR signal inhibition in brain pericytes suppresses glial activation and increased seizure susceptibility to pilocarpine in mice with traumatic brain injury.
3. 学会等名 13th International Conference at Cerebral Vascular Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井研太、高田英友子、富永一樹、橋口夏奈、安永美保、山内淳史、道具伸也、片岡泰文
2. 発表標題 頭部外傷後の脳ペリサイトPDGFR シグナル阻害は、pilocarpineけいれん発作の感受性を減弱させる
3. 学会等名 日本薬学会第139回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田英友子、坂井研太、道具伸也、瀬崎由愛、田中淑恵、山中岳、河島尚志、伊藤康一、山内淳史、片岡泰文
2. 発表標題 ピロカルピン誘発けいれん感受性テストを用いた頭部外傷後のてんかん原性評価
3. 学会等名 第92回日本薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Sakai, Fuyuko Takata, Shinya Dohgu, Mitsuhisa Koga, Ikuya Kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka
2. 発表標題 Dysregulation of the CNS supporting vascular and glial cells induces the late posttraumatic epilepsy in mice with mild traumatic brain injury.
3. 学会等名 18th World Congress of basic and clinical pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片岡 泰文 (Yasufumi Kataoka) (70136513)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	
研究分担者	岩尾 卓朗 (Takuro Iwao) (30846374)	福岡大学・薬学部・助教 (37111)	
研究分担者	古賀 允久 (Mitsuhisa Koga) (60570801)	福岡大学・薬学部・准教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------