

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861292

研究課題名(和文) アストロサイト制御による脳損傷の治療

研究課題名(英文) Influence of astrocyte in traumatic brain injury

研究代表者

茂呂 修啓 (MORO, Nobuhiro)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：00386012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：頭部外傷においてグリオトランスミッター制御が治療効果をもつかをラットの脳挫傷モデルを用い検討した。挫傷中心部に人工髄液もしくはP2Y1の選択的拮抗薬MRS2179を投与した。活性型マイクログリアのマーカーとしてGalectin-3を定量した。Galectin-3陽性細胞は外傷脳にのみ認められた。外傷1日後からGalectin-3の強い発現が認められたが発現量は経時的に低下した。Galectin-3は挫傷脳周囲で最も強い発現が認められ、MRS2179投与により有意に低下した。外傷遠位部の大脳皮質や海馬でも3日目以降に有意な発現量低下を認めた。MRS2179投与群では一部の行動試験で改善を認めた。

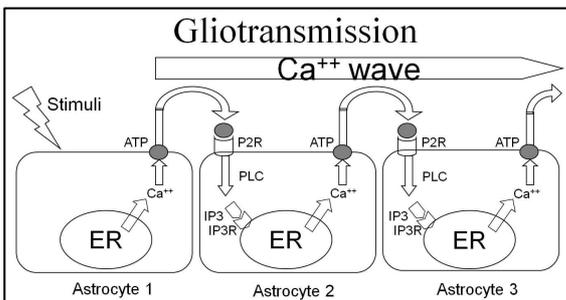
研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated if suppression of gliotransmitter potent therapeutic effect in a rat traumatic injury model. Rat cerebral contusion model was made and either cerebrospinal fluid or MRS2179, a selective P2Y1 blocker was in situ administrated. Galectin-3 was used as a marker of active microglia. Galectin-3 positive amoeboid microglia was observed mainly around the contused tissue from 1 day after injury. Administration of MRS2179 significantly suppressed the expression of Galectin-3 after day 3. MRS2179 injection improved some behavioral test score.

研究分野：脳神経外科

キーワード：アストロサイト 脳挫傷 グリオトランスミッター

1. 研究開始当初の背景

Cornell-Bell 等 (1990, Cornell-Bell AH, Science) が 1990 年にアストロサイトも情報伝達能をもつことを発見して以来アストロサイトの機能が見直されてきた。以降様々な報告がなされ現在では脳内でシナプス強度の調整、記憶の形成、マイクログリア活性化による炎症反応の賦活、脳血流の調整などあらゆる機能に参与していることが解明された。具体的にはアストロサイトは機械的あるいはその他の刺激を受けると細胞内の小胞体から大量のカルシウムを放出し活性化状態となる。活性化したアストロサイトは細胞外にグリオトランスミッターである ATP を放出する。放出された ATP はパラクリンにより隣接するアストロサイトに到達しその膜状にある P2 受容体と結合する。すると PLC 経路が活性化され IP<sub>3</sub> が小胞体上の IP<sub>3</sub> 受容体に結合することによりこのアストロサイトも細胞内のカルシウム濃度を上昇させ活性化される。この反応が次々と起こることにより集団としてアストロサイトは活性化する。このカルシウムの上昇をシャーレなどの平面で観察すると刺激点から同心円状にアストロサイトが活性化されることが観察されることからこの現象はカルシウムウェーブと呼ばれている(図 1; 2001, Hydon PG, Nat Rev Neurosci) 図 1



さらに重要なことはアストロサイトが作り出すスポンジのような空間にはその他の細胞が存在しそれらの細胞も P2 受容体を有することである。これらのその他の細胞もアストロサイトが作るカルシウムウェーブの中で活性化され、様々な働きを開始する。例えば脳内の炎症細胞であるマイクログリアや伝達にかかわる神経細胞とそのシナプスも ATP による影響を大きく受けるようである。このカルシウムウェーブが成立するためには様々な受容体が関与しているようだが特に P2Y1 受容体は重要と考えられている。そのほかにも様々な受容体が存在し、それぞれの機能を有している。例えばマイクログリアが活性化し活動するには P2X<sub>4</sub>、P2X<sub>7</sub> や P2Y<sub>12</sub> が大きな働きをすると考えられている (2006, Haynes S, Nat Neurosci, 2007, Koizumi S, Nature)。これらのアストロサイトの研究で特に大きな成果をあげているのは炎症反応の惹起に関する研究である (2005, Davalos D, Nat Neurosci)。

長らく脳研究は神経細胞の研究を中心としてなされてきたが今日ではシナプスさえもアストロサイトの調整がかかわっていることが判明しており脳におこる様々な疾患でアストロサイトが重要な役割を果たしているであろうことが推察される。そこでラットの外傷モデルを用いてアストロサイトの活動をコントロールすることが何らかの治療効果につながるのではないかと考えこの研究を行うこととした。

2. 研究の目的

これまでのアストロサイトをめぐる多くの現象は In vitro 研究で証明されており、In vivo のものは少ない。当研究は In vivo 脳外傷 (Cortical Contusion Injury: CCI) モデルを用い、アストロサイトの活性化制御を通して脳損傷後に悪影響を及ぼす炎症反応の鎮静化、最終的には予後を改善出来るかを検討した。一連のカルシウムウェーブは様々な過程がありどこを拮抗することが最善なのかは現在わかっていない。先ず今回はカルシウムウェーブの主要受容体である P2Y<sub>1</sub> 受容体を拮抗することにより何らかの治療効果が得られるかを検討した。

3. 研究の方法

イソフルレン麻酔下 (4% で導入、2% で維持) に SD ラットを定位脳手術台に固定した。体温測定プローブを直腸内に挿入し体温パッドで術中の体温を管理した。切開部位をイソジンと 70% エタノールを用いて消毒する。頭皮を 1% キシロカインで麻酔し頭部皮膚を正中切開し頭蓋骨を露出した。ハイスピードリルを用いて Bregma から 3 mm 後方、3.5 mm 側方を中心に半径 3 mm の骨窓を設けた。硬膜を露出しその中心に CCI を用いて脳挫傷を作成する。CCI の条件はチップの速度: 3.5m/sec、接触時間: 100 msec、深さ: 2 mm、チップの直径: 2mm とした。これは我々のこれまでの実験から軽度 ~ 中等度の脳挫傷を作る条件である。外傷直後に Alzet Brain Infusion kit (Alzet 8851) を人工硬膜とスペーサーを用いて固定し針先端を脳皮質内に 2 mm 挿入し固定した。薬物を充填した小動物用浸透圧ポンプ (Alzet 292) をラット背部皮下に移植し脳内留置針と接続した。皮膚を縫合した後、保温室内でラットを覚醒させた。十分に覚醒するまでは保温器内で管理し、その後個々のケージにて飼育した。皮下に埋め込んだ Alzet pump から挫傷脳内に 1. 人工髄液、もしくは 2. MRS2179 のいずれかを投与した。MRS2179 は選択的 P2Y<sub>1</sub> レセプターの拮抗薬である。MRS2179 の希釈には人工髄液を用いた。モデル作成後 1 日後、3 日後、7 日後もしくは 28 日後に脳組織を摘出しサンプルとして用いた。

第一に経時的な炎症細胞の変化と炎症性サイトカインの定量を Western blotting と PCR を用いて行った。具体的にはマイクログリアの定量には抗 Iba-1 抗体で全マイクログリアの定量を行い、抗 Galectin-3 抗体で活性型のマイクログリアの定量を行った。これらには 1 日後、3 日後、7 日後の脳を用いた。組織学的にもマイクログリアの状態を観察するため一部のラットは経心臓的に 4% パラホルムアルデヒドで還流固定し脳を固定後摘出した。これらの標本はスライディングマイクロトームで 20  $\mu\text{m}$  に薄切した。脳挫傷中心部から前後に合計 6000  $\mu\text{m}$  を 500  $\mu\text{m}$  ごとに薄切した。一般的な染色法としてヘマトキシリン・エオジンなどの組織染色を行った。さらに特定抗体を用いた免疫染色を行った。一次抗体としてマイクログリアの観察に抗 Galectin-3 抗体、アストロサイトの観察に抗 GFAP 抗体、神経細胞の観察には抗 NeuN 抗体を用いた。この組織学的検討には 3 日後の脳を用いた。

第二の実験として MRS2179 投与が機能予後を改善するかを行動評価試験を用いて評価した。モデルの作製と薬物の投与は同じである。運動機能の評価法としてロタロッド試験を行った。これは回転する円柱上をどれだけ長くラットが歩いていられるかを観察するものである。モデル作成前に 5 rpm で 120 秒歩いていられるように訓練しておく。モデル作製 1 日後、3 日後、7 日後、28 日後に 3 rpm から徐々に加速するロタロッド上で試験しどれだけ運動機能が保たれているかを評価した。次に空間認知機能の評価として Y 字迷路試験を行った。外傷 28 日後にラットを Y 字型をした迷路の中にいれ 10 分間の観察を行った。ラットは正常であればそれぞれのアームを均等に探索行動するはずであり、この配分を計算して空間認知機能の指標とした。最後に前足、後ろ足の立ち直りなどの神経反射をモデル作製 1 日後、3 日後、7 日後、28 日後に評価した。前足の評価には Tactile placing 反射を、後ろ足の評価には Hind limb extension 反射を、両前足の評価に Contraflexion 反射を調べた。行動評価を行ったラットは 28 日後に還流固定し組織評価を行った。

#### 4. 研究成果

まずはマイクログリアに対するどの抗体が評価として優れているかを検討した。抗 Iba-1 抗体で染色すると陽性細胞は naïve なラットでも両側大脳皮質や海馬に認められそれらは非活性化型の ramified 型であった (2001, Stence N, Glia)。挫傷脳組織でも Iba-1 陽性細胞は認められたがそのほとんどは活性型である amoeboid 型をしていた。挫傷部周辺のみならず、その直下の海馬や対側大脳皮質にさえも陽性細胞が認められた (図 2)。一方で Galectin-3 陽性細胞は naïve なラットではどの部位にも発現は認められなかった。しかし挫

傷脳においては挫傷部周囲とその直下に陽性細胞が認められ、形態学的にすべて amoeboid 型のマイクログリアであった (図 3)。蛍光二重染色を用いて評価すると Galectin-3 陽性細胞は Iba-1 と共染色された。以上から Galectin 3 は活性型マイクログリアの良いマーカーになると考えた。

図 2

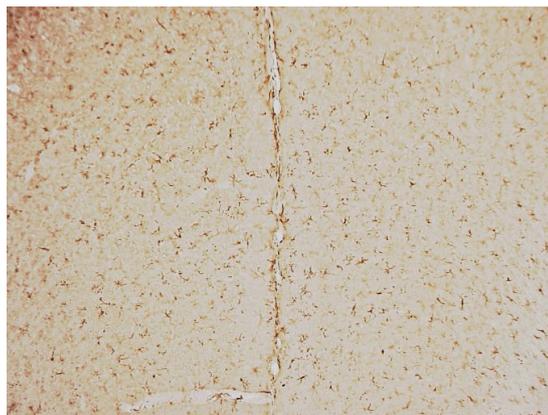
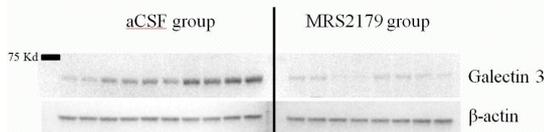


図 3



傷を挫傷中心部、周辺部、遠位部、同側海馬、対側大脳皮質、対側海馬の 6 つの領域に分けてサンプリングした。外傷後 1 日後から Galectin-3 の強い発現が認められた。Galectin-3 は壊死組織を除いた脳挫傷周囲において最も強い発現が認められたが MRS2179 投与群では人工髄液投与群と比較して全体的に発現を抑制した。図 4 は 3 日後の挫傷周辺組織の発現量である。

図 4



各部位で経時的に Galectin-3 を定量してみると挫傷周辺組織では MRS2179 投与群で 3 日後、7 日後に人工髄液投与群と比し有意な発現の低下を認めた (図 5)。外傷遠位部の大脳皮質や海馬でも外傷 1 日後には強い Galectin-3 の発現を認めた。これらの部位は挫傷周辺組織と比較して人工髄液投与群でも素早い発現量の低下が認められ

た。しかし外傷後3日目ではMRS2179の投与は人工髄液投与に比較して有意に発現を抑制し炎症反応の励起を抑制しているものと考えられた(図6、7)。体側大脳皮質や馬馬にはそもそも発現が認められなかった。

図5

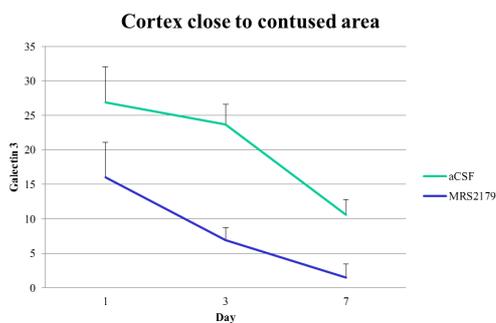


図6

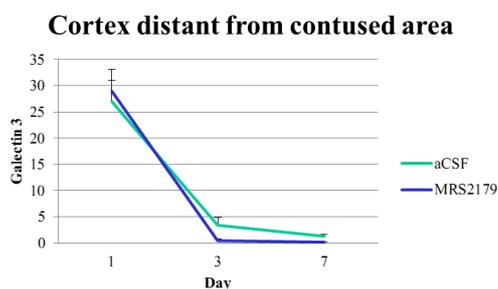
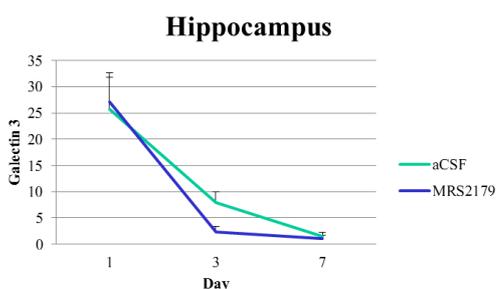


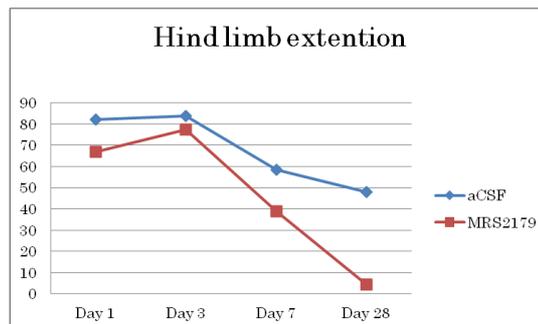
図7



次にMRS2179の投与がラットの行動を改善するかを検討した(n=4/群)。運動機能の評価であるロタロッド試験では外傷後1日目よりも3日目に機能の悪化が認められた。人工髄液投与群では以降7日目、28日目と改善を認めなかったが、MRS2179投与群では7日目に改善傾向を示した。しかしこれらの差は統計学的な有意差を示さなかった。前足と後ろ足の神経反射試験では共に人工髄液投与群では3日目に最低値を示した。MRS2179投与群では3日後、7日後と有意に良好な改善を示した(図8)。

空間認知機能試験であるY字迷路試験では両群ともに同様のスコアを示し、MRS2179投与による改善は認められなかった。

図8



以上の結果からMRS2179の投与は脳挫傷後の炎症反応の励起を抑制するものと考えられた。また一部の行動評価試験においてMRS2179投与による改善が認められた。今後のさらなる検討により何らかの治療効果に結びつく可能性がある。

< 引用文献 >

Cornell-Bell AH<sup>1</sup>, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ.

Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. Science. 1990 Jan 26;247(4941):470-3.

Haydon PG.

GLIA: listening and talking to the synapse. Nat Rev Neurosci. 2001 Mar;2(3):185-93.

Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D.

The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. Nat Neurosci. 2006 Dec;9(12):1512-9.

Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K.

UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature. 2007 Apr 26;446(7139):1091-5.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB.

ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci. 2005 Jun;8(6):752-8.

Stence N, Waite M, Dailey ME.

Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. Glia. 2001 Mar 1;33(3):256-66.

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

茂呂 修啓

ラット脳挫傷モデルにおけるグリオトランスミッター制御の効果

第38回日本脳神経外傷学会

2015年3月6日

あわぎんホール(徳島県・徳島市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

茂呂 修啓(MORO, Nobuhiro)

日本大学・医学部・助手

研究者番号:00386012

(2)研究分担者

(3)連携研究者