

令和元年6月8日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10741

研究課題名(和文) マイクログリア制御による頭部外傷後脳損傷の治療

研究課題名(英文) Effects of microglial suppression 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脳挫傷モデルを用いて頭部外傷後に選択的P2X4受容体拮抗薬である5-BDBDおよび選択的P2X7受容体拮抗薬AZ11645373を投与した際のグリア細胞の反応を観察した。外傷後の大脳皮質や海馬などに多数の活性化型マイクログリアが観察された。Iba-1の発現を調べたところ、5-BDBDやAZ11645373を投与した群ではIba-1の発現は抑制された。さらに頭部外傷後に5-BDBDやAZ11645373の投与により炎症関連サイトカインの分泌が抑制された。ラット頭部外傷後にP2X4、P2X7受容体を拮抗すると、マイクログリアの発現は抑制され、一部の炎症関連サイトカインの分泌も抑制される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転落や転倒、交通事故による頭部外傷は常に発生し続けている疾患である。頭部外傷の中でも特に脳挫傷は現時点では有効な治療法がなく、不幸な転帰をたどることも多い。脳挫傷の治療対象は外傷後に引き起こされるさまざまな脳内の反応に限定される。これには炎症や血流の異常、脳浮腫、活性酸素の発生などがあげられる。本研究は脳挫傷後の炎症を引き起こすシグナル伝達系を遮断することにより、炎症反応を抑制しようとする研究である。今後頭部外傷の治療の一助になることを期待している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effects of 5-BDBD a selective P2X4 receptor blocker and AZ11645373 a selective P2X7 receptor blocker against glial response in a rat cerebral contusion mode.

Following cerebral contusion, enormous number of activated microglia were found in the cortex and hippocampus. Administration of 5-BDBD, AZ11645373 or both significantly reduced the total number of microglia and the percentage of activated microglia. In a western blotting analysis, the expression of Iba-1 was reduced by administration of either 5-BDBD or AZ11645373 compare to the injury alone group. IL-1beta and IL-6 significantly increased after injury, but administration of either 5-BDBD, AZ11645373 or both decreased the amount of cytokine release.

The present study shows that inhibition of P2X4 and P2X7 receptor after cerebral contusion injury restricts the activation of microglia and reduce the release of some inflammatory cytokines.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳挫傷 マイクログリア 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は神経細胞と神経膠細胞で成り立っており、神経膠細胞にはアストロサイト、マイクログリア、オリゴデンドロサイトがある。元来アストロサイトは細胞外液中のカリウム濃度や pH の維持を行っており、さらには神経細胞に酸素やグルコースを供給するとされていた。またシナプス間隙に放出された神経伝達物質であるグルタミン酸の再吸収を行っていることが分かっていた。このようなことからアストロサイトは神経細胞の恒常性維持のために不可欠な細胞であることはよく知られている。その一方で脳における炎症反応にはマイクログリアが大きく関与している。Ginhoux らの報告によると、マウスでは胎生 8 日までに卵黄囊前駆細胞が脳内に移行し、マイクログリアに分化するとされている(4)。前述のアストロサイトのさまざまな働きは以前より知られていたものだが、近年アストロサイトとマイクログリアの関連性が次々に解明され、その関係に着目した研究がさかんに行われている。

1990 年に Cornell-Bell らはアストロサイトの機能について鮮烈な報告を行った(3)。Cornell-Bell らはアストロサイトをディッシュ上で培養し、カルシウムイメージングにより細胞の活性化を観察した。ディッシュ中心の単一細胞にグルタミン酸刺激を与えるとその細胞の細胞内カルシウム濃度が上昇し、活性型のアストロサイトとなる。しかし驚くべきことに、その後直接刺激を受けていない周辺の細胞も徐々に同心円状に細胞内カルシウム濃度を上げ活性化していく現象を発見したのである。このアストロサイト間のカルシウム濃度の上昇の一連の反応はカルシウムウェーブと名付けられた。アストロサイトは単に神経細胞を補助する細胞ではなく、シグナル伝達能をもつことが証明されたのである。この研究によりアストロサイトを中心としたシグナル伝達、グリオトランスミッションが注目を浴びることとなった。当初このシグナル伝達は細胞間をつなぐギャップジャンクションを通じて行われると考えられていた(2)。しかし Hassinger らは同じく培養アストロサイトとカルシウムイメージングを用いて、細胞同士が直接接触していなくてもカルシウムウェーブは伝播していくことを証明した(7)。細胞の間隙が 120 μm 以内であれば有効にカルシウムウェーブは細胞間を伝わっていく。さらに Hassinger らはディッシュ中心のアストロサイトを刺激すると同時に一方からピペットを用いて培養液を刺激点に向けて灌流すると、灌流の下流にのみカルシウムウェーブが生じることを報告した。これらの研究結果から、シグナル伝達がパラクリンによって行われており、伝達物質が培養液を通じて伝わることを証明した。その後の研究によりパラクリンで伝わるシグナル伝達物質の本体は adenosine triphosphate (ATP) であることが証明された(5)。現在ではグリオトランスミッションに関する多くのことが解明されている。グルタミン酸や ATP、機械的刺激を受けると、アストロサイト内ではイノシトール三リン酸経路が活性化し、小胞体から細胞内にカルシウムが放出される(9)。こうしてアストロサイトは活性化すると ATP を細胞外液中に放出する(13)。この ATP はパラクリンにより周囲に拡散していき、隣接するアストロサイト上の P2 受容体に結合する。P2 受容体からのシグナルは phospholipase C 経路を活性化し、これによりそのアストロサイト内でもイノシトール三リン酸経路が活性化する。この反応が次々と起こることによりアストロサイトは集団として活性化していくのである。ATP のみならず活性化したアストロサイトは soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex を用いて、これまで神経細胞の伝達物質とされていたグルタミン酸をも細胞外液中に放出し、シナプス強度を調整する機能を有している(10、12)。このようにしてアストロサイトは集団として活性化することにより、外的刺激に対応しているのであろう。アストロサイトが作り出す空間にはマイクログリアやオリゴデンドロサイトが含まれ、さらにアストロサイトは複数の突起をのばしシナプスや血管を包み込む構造をしている(6、8)。これはアストロサイトが他の細胞やシナプス終

末、血流を調整しているためであり、アストロサイトの指令により脳内では生理的状態でも病的状態でも多くのことが行われていると考えられている。各細胞や血管の表面には ATP の受容体である P2 受容体が発現している。P2 受容体にはリガンド依存性イオンチャンネル型受容体である P2X 受容体と、G タンパク質共役型受容体である P2Y 受容体が存在する。さらに P2X、P2Y 共に複数のサブタイプが存在する。各細胞や血管はそれぞれ機能にあわせて P2 受容体を発現しておりアストロサイトとの交信を行っている。病的状態において最も解明がすすんでいるアストロサイトの機能はマイクログリアとの関係であろう。虚血や外傷により活性化したアストロサイトは、ATP のパラクリンを用いてマイクログリアを活性化する。マイクログリア上の P2X4 受容体と P2X7 受容体がマイクログリアの活性化に必要とされており、活性化したマイクログリアが貪食を行うには P2Y6 受容体が必要とされている (1, 11)。外傷後には過剰な炎症が生じることが知られており、特にサイトカインの異常高値は予後と相関するとされている。

我々はこれまでラット脳挫傷モデルを用いて、外傷後にグリオトランスミッションを制御することにより、さまざまな頭部外傷後の反応を抑制できないかと考え研究を行ってきた。カルシウムウェーブの形成に不可欠である P2Y1 受容体の拮抗薬である MRS2179 を外傷脳に投与するとマイクログリアの活性化が抑制され、一部のサイトカインの放出も抑制されることを証明した。しかし P2Y1 受容体を拮抗するとマイクログリアと共にアストロサイトの活性化も抑制される。アストロサイトの機能は外傷後にも必要であると考えられ、抗炎症効果を得るためにアストロサイトまで拮抗する必要性はないのではないかと考え本研究を行うこととした。

2 . 研究の目的

本研究ではマイクログリアの活性化に不可欠とされる P2X4 受容体と P2X7 受容体を拮抗することにより、脳挫傷に対する治療効果が得られるかを検討した。

3 . 研究の方法

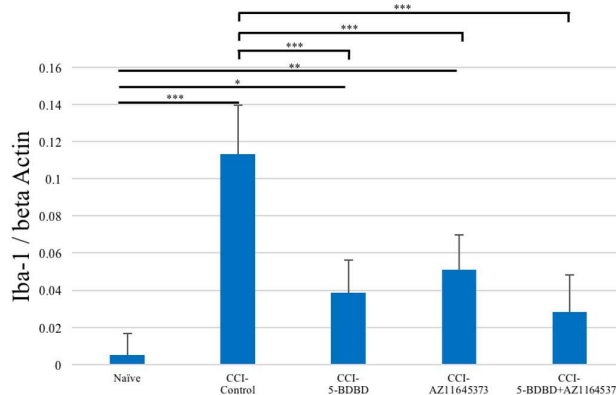
脳挫傷モデルとしてラットの cortical contusion injury (CCI) モデルを用いた。脳挫傷を与えた直後から皮下埋め込み型浸透圧ポンプを用い、コントロールとしての dimethyl sulfoxide (CCI-Control 群)、5-BDBD (CCI-5-BDBD 群)、AZ11645373 (CCI-AZ11645373 群)、5-BDBD+AZ11645373 (CCI-5-BDBD+AZ11645373 群) を脳挫傷中心部に局所投与した。正常対照群として外傷を与えていない Naïve 群と比較した。一般的な組織染色および、マイクログリアに対する免疫組織染色を行った。またマイクログリアやアストロサイトの発現量を定量するために western blotting を行った。サイトカインなど炎症関連物質の messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現をみるために polymerase chain reaction (PCR) を行った。サイトカインの定量には enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた。

4 . 研究成果

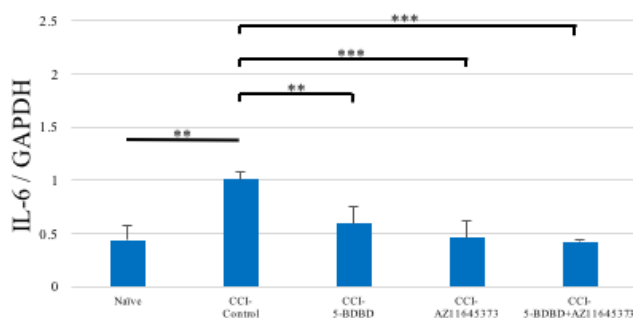
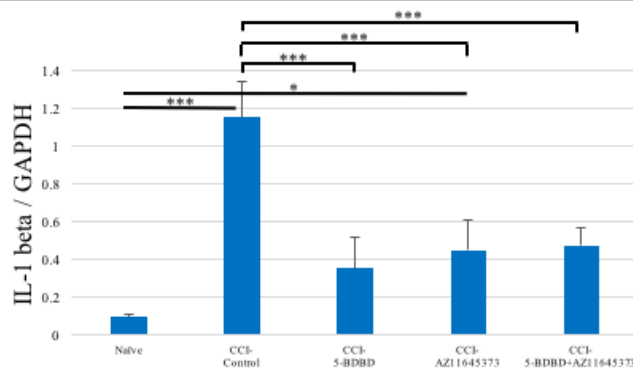
抗 Iba-1 抗体によりマイクログリアを免疫染色したところ、ラットの naïve 脳内には無数の静止型マイクログリアが確認された。次に活性型マイクログリアを標識する抗 Galectin-3 抗体で染色し naïve 脳を観察したところ、活性型マイクログリアは全く認めなかった。CCI-Control 群では、Iba-1 陽性細胞が naïve 脳と比較して著明に増殖しており、その多くは形態学的に活性型マイクログリアであった。これらの細胞の多くは抗 Galectin-3 抗体で染色すると陽性を示した。特に脳挫傷周囲大脳皮質や外傷側の海馬には活性型マイクログリアが多く集積していたが、外傷部位から遠い大脳皮質にも陽性細胞は存在した。次に CCI-5-BDBD 群の脳を抗 Iba-1 抗体で免疫染色すると、外傷側の大脳皮質や海馬では、CCI-Control 群と比べて細胞数も、活性型マイ

クログリアの割合も明らかに低かった。同様に CCI-AZ11645373 群でも活性型マイクログリアの細胞数の低下を認めた。CCI-5-BDBD+AZ11645373 群でも同様に活性型マイクログリアの細胞数の低下を認めた。次に抗

Iba-1 抗体を用いて western blotting を行い、マイクログリアの定量を行った(右図)。CCIにより有意に Iba-1 の発現は上昇した。CCI 後に 5-BDBD、AZ11645373 もしくはその両方を投与すると、Iba-1 の発現は CCI-Control 群と比較して有意に低下した。さらにアストロサイ



トを標識する抗 GFAP 抗体を用いてアストロサイトの発現量を定量した。CCI-Control 群では Naive 群と比較し GFAP の発現は増加したものの、その差は有意ではなかった。しかし 5-BDBD、AZ11645373 もしくはその両方を投与した群では Naive 群や CCI-Control 群と比較し有意に GFAP の発現が増加していた。Western blotting の結果は免疫染色の所見を裏付ける結果となった。また P2X 受容体を拮抗しマイクログリアの発現を抑制すると、それに反応してアストロサイトの発現が上昇することが分かった。活性型マイクログリアが放出する炎症性サイトカインの



mRNA の発現をみるために PCR を行った。Naive 群と比べて CCI-Control 群では脳周囲大脳皮質、脳挫傷から遠い同側の大脳皮質、外傷側海馬（左図上）における interleukin-1 beta (IL-1beta) の有意な上昇を認めた。すべての部位で IL-1beta の発現は P2X 受容体の拮抗により低下したが、特に脳挫傷から遠い大脳皮質と海馬ではその低下は有意であった。また CCI により interleukin-6 (IL-6) の発現も 3 部位で有意に上昇した。P2X 受容体の拮抗により 3 部位の IL-6 の発現は低下した(左図下：脳挫傷から遠い大脳皮質)。しかし特に外傷側海馬においては CCI-5-BDBD 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 の低下は

顕著で、CCI-AZ11645373 群よりも有意に IL-6 の発現を抑制していた。サイトカインの発現には P2X4、P2X7 両方の受容体に関与しているようだが、P2X4 受容体がより大きく影響しているものと考えられた。脳の二次損傷を大きく左右するとの報告が多い IL-1beta は ELISA 法にて定量を行った。IL-1beta の発現は CCI によって有意に上昇した。CCI-Control 群に比べて 5-BDBD、AZ11645373、その両方を投与した群で有意に IL-1beta の発現量低下を認めた。しかし IL-1beta の発現量に投与薬物の違いによる有意な差は認められなかった。

本研究により外傷後に 5-BDBD および AZ11645373 を用いて P2X4、P2X7 受容体を拮抗すると活性型マイクログリアの発現を抑制し、一部のサイトカインの放出も抑制することが分かった。5-BDBD および AZ11645373 の投与が脳挫傷後の二次性脳損傷である過剰な炎症反応を抑制し、有効な治療法となりうる可能性が考えられた。

< 引用文献 >

1. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 2009 Jan;32(1):19-29.
2. Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science.* 1992 Oct 9;258(5080):292-5.
3. Cornell-Bell AH, 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.
4. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010 Nov 5;330(6005):841-5.
5. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci.* 1999 Jan 15;19(2):520-8.
6. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med.* 2007 Feb;13(2):54-63.
7. Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. Nov 12;93(23):13268-73.
8. Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev.* 2006 Jul;86(3):1009-31.
9. Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Mar;2(3):185-93.
10. Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci.* 2007 Mar;10(3):331-9.
11. 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.
12. Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.* 2007 Aug 24;317(5841):1083-6.
13. Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2007 Aug;9(8):945-53.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

小林 真人 稲原 裕也 大滝 遼 梶原 遼 神谷 光樹 根岸 弘 高峰 裕介 古川 雄
都 熊川 貴大 四條 克倫 茂呂 修啓 前田 剛 吉野 篤緒
ラット脳挫傷モデルにおける選択的 P2X4、P2X7 受容体拮抗薬における効果
第 42 回日本脳神経外傷学会 2019.3.8-9 淡路島夢舞台国際会議場、兵庫県、日本

Kobayashi M. Furukawa Y. Kumagawa T. Shijo K. Moro N. Fukushima M. Maeda T. Yoshino A.
P2X4 and P2X7 receptor blocker in a rat model of cerebral contusion injury
Neuroscience 2017 2017.11.11-15 Washington DC USA

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：四條 克倫

ローマ字氏名：(SHIJO, katsunori)

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 90800433

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。