原 著

ラット脳挫傷後グリオシスに対する
Pyrazol-3 および MRS2179 の効果

高峰 裕介^{1,2)} 根岸 弘¹⁾ 古川 雄都^{1,3)}
 小林 真人¹⁾ 熊川 貴大¹⁾ 四條 克倫¹⁾
 茂呂 修啓¹⁾ 前田 剛¹⁾ 吉野 篤緒¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野

²⁾ 長汐病院脳神経外科

³⁾ タムス浦安病院リハビリテーション科

Effect of Pyrazol-3 and MRS2179 Against Gliosis in a Rat Model of Cerebral Contusion Injury

Yusuke TAKAMINE^{1,2)}, Hiroshi NEGISHI¹⁾, Yuto FURUKAWA^{1,3)},
 Masato KOBAYASHI¹⁾, Takahiro KUMAGAWA¹⁾, Katsunori SHIJO¹⁾,
 Nobuhiro MORO¹⁾, Takeshi MAEDA¹⁾ and Atsuo YOSHINO¹⁾

¹⁾ Department of Neurological Surgery, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Neurosurgery, Nagashio Hospital, Tokyo, Japan

³⁾ Department of Rehabilitation Tsumi Urayasu Hospital, Chiba Japan

Injuries to the brain, such as ischemia and trauma, cause activation of astrocytes immediately following the injury. Activated astrocytes form gliosis in the chronic period. Gliosis will exacerbate pathology, prevent neuronal recovery and will be an epileptic focus. Several mechanisms are known to increase intracellular calcium levels to activate astrocytes. Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) is a calcium channel that has a major contribution to calcium levels. Pyrazole-3 (Pyr3), a TRPC3 channel blocker, is reported to prevent gliosis in a cerebral ischemia rat model. Another major mechanism of calcium increase is gliotransmission affected by calcium wave. Stimulation of the P2Y1 receptor triggers calcium release from intracellular stores, and blockade of the P2Y1 receptor with MRS2179 prevents calcium elevation. In the present study, Pyr3 and MRS2179 were administered to a rat cerebral contusion injury (CCI) model to prevent injury-induced astrocyte activation. The aim of the present study was to determine the effects of CCI with prevention of astrocyte activation on long-term gliosis formation. Male rats were randomized to the naïve, CCI-Control, CCI-Pyr3 and CCI-MRS2179 groups. Drugs were directly injected into contused tissue. Rats were sacrificed on days 3, 7 and 28 following injury. The expression of TRPC3 channels and P2Y1 receptors was suppressed in the CCI-MRS2179 group. On day 3, the glial fibrillary acidic protein (GFAP) level of the CCI-Control group was significantly higher than that of the naïve group. The GFAP levels of the CCI-Pyr3 and CCI-MRS2179 groups were higher but not significantly different from those of the naïve group. On day 28, the GFAP level of the CCI-Control group further increased but that of the CCI-Pyr3 and CCI-MRS2179 groups was significantly lower than that of the CCI-Control group. Holzer-stained brain volumes of both the CCI-Pyr3 and CCI-MRS2179 groups showed significantly less gliosis than those of the CCI-Control group on postinjury day 28. Both TRPC3 channel and P2Y1 receptor blockade immediately following injury reduced gliosis in the chronic phase.

Key words: astrocyte, brain injury, calcium wave, gliosis

アストロサイト, 頭部外傷, カルシウムウェーブ, グリオシス

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2021; 80 (6): 319–329)

要旨

脳梗塞や頭部外傷などの脳損傷急性期にアストロサイトは活性化し、活性化したアストロサイトは慢性期にグリオシスを引き起こす。グリオシスは組織の瘢痕性

変化であり、神経回路回復を妨げ、てんかん焦点となる。また、様々な経路でアストロサイトは細胞内カルシウム濃度を上昇させ活性化する。Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) チャンネルは細胞内カルシウム濃

受付：2021年7月28日，受理：2021年9月6日

本論文の要旨は Neuroscience 2018 (2018年11月, San Diego, CA, USA) にて発表された。

Fig. 1 Schematic diagram of the calcium wave.

Extracellular ATP and its degradation products bind to the adjacent P2Y1 receptor on astrocyte. Then calcium is released intercellularly from the ER to activate this astrocyte. Activated astrocyte will release ATP to further stimulate nearby astrocyte. By repeating this process, astrocytes will be activated as a group.

ATP: adenosine triphosphate, Ca^{2+} : calcium, ER: endoplasmic reticulum.

度に大きく関与する。ラット虚血モデルでは Pyrazole-3 (Pyr3) を用いて TRPC3 チャンネルを拮抗するとグリオーシスが抑制されることが報告されている。また、グリオトランスミッションも細胞内カルシウム濃度上昇に大きく寄与する。P2Y1 受容体を刺激するとカルシウムが細胞内貯蔵庫から放出されカルシウムウェーブを介したグリオトランスミッションが励起されるが、P2Y1 受容体を MRS2179 で拮抗すると細胞内カルシウム濃度上昇が抑制される。本研究はラット cerebral contusion injury (CCI) モデルに Pyr3 と MRS2179 を用い、アストロサイト活性化を抑制し、慢性期のグリオーシス形成を制御することを目的とした。雄性ラットを Naïve, CCI-Control, CCI-Pyr3, CCI-MRS2179 の 4 群に振り分け、薬物は挫傷組織中心部に直接投与した。外傷後 3, 7, 28 日後に脳を摘出した。CCI-MRS2179 では TRPC3 チャンネルと P2Y1 受容体の発現が低下した。外傷 3 日後の CCI-Control の glial fibrillary acidic protein (GFAP) 発現量は Naïve より有意に高い値を示した。しかし CCI-Pyr3 と CCI-MRS2179 では Naïve より高いものの、有意な差は認めなかった。外傷 28 日後の GFAP 値は CCI-Control group でさらに上昇した。それに対し CCI-Pyr3 と CCI-MRS2179 では CCI-Control と比較し有意に低い値を示した。外傷 28 日後の Holzer 染色陽性グリオーシス体積は CCI-Pyr3, CCI-MRS2179 でともに CCI-Control より有意に低い値を示した。外傷後急性期の TRPC3 チャンネルと P2Y1 受容体の拮抗は外傷後慢性期のグリオーシス形成を抑制した。

序 文

脳挫傷における病態は、外力による機械的損傷である一次性脳損傷と、それに引き続く虚血性障害、代謝障害、炎症反応、髄液循環障害、神経シナプス機能障害などの時間的、空間的に病態が変化する二次性脳損傷に大別される。これらのさまざまな要因がアストロサイトを活性化し、形態を変化させ、最終的に慢性期のグリオーシスを引き起こす。

アストロサイトが外的刺激に対応するために集団として活性化する現象は 1990 年に初めて Cornell-Bell らにより報告された¹⁾。Cornell-Bell らは培養アストロサイトの中心の単一細胞にグルタミン酸刺激を与えるとそのアストロサイトは細胞内カルシウム濃度を上昇させ活性化型アストロサイトに変化するが、それに引き続いて周辺のアストロサイトも経時的に同心円状に細胞内カルシウム濃度を上昇させていく現象を発見した。この現象はカルシウムウェーブと名付けられた。カルシウムウェーブの詳細は現在では解明がすすんでおり、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) とその分解産物をシグナル伝達物質としたパラクリンによることが分かっている²⁾。また細胞外液中の ATP シグナルを受容する受容体は P2 受容体であり、特に頭蓋内においては P2Y1 受容体が大きく貢献していることが分かっている。Figure 1 のように P2Y1 受容体から ATP シグナルを受容すると、イノシトール三リン酸経路を経由し、シグナルは細胞内小胞体に伝わる。すると小胞体から大量のカルシウムが細胞内に放出される。それによりこのアストロサイトも活性

Fig. 2 Schematic diagram of calcium influx through thrombin stimulated TRPC3 channels.

Thrombin activates the TRPC3 channels on astrocytes increasing the intracellular calcium concentration by allowing calcium inflow. Activated astrocyte will change to chronic gliosis.

Ca²⁺: calcium, TRPC3: transient receptor potential canonical 3.

化され ATP を細胞外に放出する。この反応が連鎖的に起こることによりアストロサイトは集団として活性化することができる。その後、さまざまな研究結果からアストロサイトはシナプス強度の調整³⁾、脳血流の調整⁴⁾、記憶の形成⁵⁾、マイクログリアの活性化⁶⁾などを行っていることが明らかになった。

カルシウムウェーブとは別に、外傷などの出血性疾患では別の経路がアストロサイトの活性化に大きく関与することが分かっている。Figure 2 のように血液由来のトロンビンが脳内に漏出するとアストロサイトは活性化し、細胞形態変化⁷⁾やグリオシスを引き起こすことが知られている。2010年にShirakawaらはトロンビン受容体により活性化される transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) チャンネルという細胞膜上のカルシウムチャンネルの働きに着目し、in vitro の研究において TRPC3 チャンネルの発現量を特異的に抑制したラットの培養アストロサイトではトロンビンによるグリオシスを抑制することを証明した⁸⁾。

以上のような機序でアストロサイトは、外傷や虚血などの外的刺激が加わると細胞内カルシウム濃度を上昇させた活性型になる⁷⁾。急性期のアストロサイトの活性化はグルタミン酸毒性の緩和、酸化ストレスからの保護⁹⁾、血液脳関門の保護¹⁰⁾、脳浮腫の軽減¹¹⁾、炎症反応の抑制¹²⁾など神経保護的に働くと考えられている。しかし、一部の活性化したアストロサイトは慢性期に異常増殖し線維性変化したグリオシスとして残存し⁷⁾、神経再生の妨げ¹³⁾、てんかんの焦点¹⁴⁾などの原因となり神経細胞に悪影響をもたらすと考えられている。

本研究ではマウス脳挫傷モデルに対し、脳挫傷急性期

に選択的 P2Y1 受容体拮抗薬の MRS2179 を投与しアストロサイトのカルシウムウェーブを抑制することで、慢性期のグリオシスを抑制可能か検討した。さらに、出血に反応して活性化する TRPC3 チャンネルの選択的阻害薬である Pyrazol-3 (Pyr3) を投与しアストロサイトの細胞内カルシウム濃度上昇を抑制することで、慢性期のグリオシスを抑制可能か検討した。グリオシスの制御が可能であれば、グリオシス形成の抑制を通じた治療が、神経損傷後の機能回復や外傷後てんかんの発症抑制に有効である可能性がある。

研究材料と方法

1 実験動物の取り扱いおよび倫理的配慮

本実験における動物の扱いは、日本大学医学部実験指針と日本大学動物実験マニュアルを遵守して行った。動物の苦痛を最小限にするべく最大限の配慮を行った。動物の飼育は上記で認定の施設で行った。飼育環境は気温 22–23 度、湿度 50–60% の室内であり、飼育室の明暗設定は午前 8 時から午後 8 時を明期、午後 8 時から午前 8 時を暗期として 12 時間ごとの明暗サイクルを設けた。実験中は食事、水分を自由に摂取させた。経過中に過侵襲と判断された場合の人的エンドポイントの設定を行った上で研究を行った。研究者は上記委員会が決定する年一回の講習会を受講している。

2 脳挫傷モデル

脳挫傷モデルには 250–400 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用し、定量的に等強度の脳挫傷を作製するのに汎用されている cortical contusion injury (CCI) を用い

た。イソフルラン 4% で吸入麻酔を導入し、十分な深度が得られた後、イヤバーを用いて定位脳手術台に固定した。術中は 2% のイソフルランで麻酔を維持した。体温測定プローベを直腸内に留置し術中は保温パッドで深部体温を 37 度に維持した。皮膚切開部をエタノール消毒し 10 万倍エピネフリン入り 1% キシロカイン 1 mL で局所麻酔を行った。頭皮正中を 20 mm 切開後骨膜を剥離、頭蓋骨を露出し、Bregma から 3 mm 後方、3.5 mm 左側方を中心に半径 2 mm の骨窓をハイスピードドリルで設けた。その中心に硬膜上から専用の CCI インパクターで等強度の脳挫傷を作製した。CCI の強度条件は速度：3.50 m/sec、深さ：2 mm、接触時間 100 msec、インパクターヘッドの直径：2 mm で行った。この強度は海馬への直接損傷をきたさず、皮質脳挫傷および海馬の二次性脳損傷をきたす強度とされている¹⁵⁾。ラットはランダムに Table 1 のごとく群分けした。CCI 後に dimethyl sulfoxide (DMSO) を投与した CCI-Control 群、CCI 後に選択的 P2Y1 受容体拮抗薬である MRS2179 を投与した CCI-MRS2179 群、CCI 後に選択的 TRPC3 チャネル阻害薬である Pyr3 を投与した CCI-Pyr3 群そして外科的処置を加えていない Naïve 群の 4 群を作製した。事前に Alzet Brain Infusion Kit2 (Alzet8663; Alzet, USA) および浸透圧ポンプ (Alzet2001; Alzet, USA) に各々薬剤を注入しておく、CCI 直後に脳挫傷中心部 2 mm の深さに留置針を留置した。浸透圧ポンプは背部皮下に留置し、持続的に 1 μ l/h の速度で薬剤を投与した。骨窓に人工硬膜と吸引糸を用いて注入針を固定し、骨膜と皮膚を縫合し処置を終了した。維持麻酔を終了し、37 度保温箱内で覚醒させた。MRS2179 と Pyr3 は DMSO を溶媒として 1 mM に調整した。MRS2179 の投与量はラット外傷モデルに使用された過去の in vivo 研究を参照し決定した¹⁶⁾。同様に Pyr3 の投与量は in vivo マウスの脳内出血モデルに使用した量を参照した¹⁷⁾。対照薬として DMSO を用いた。投与方法は薬剤の全身への影響を考慮して脳挫傷部位への局所投与とした。投与期間は外傷後に強い炎症反応や神経細胞死が起こる外傷後 7 日間とした。また外傷直後から脳挫傷体積は経時的に増大していくが、その増大が停止し、挫傷体積が固定するとされる 21 日以降を慢性期とした¹⁸⁾。したがって検体の摘出は急性期の外傷 3 日後と慢性期の外傷 28 日後に行った。

Western blotting 用および Polymerase chain reaction (PCR) 用の検体は外傷 3 日後および 28 日後に採取した。5% イソフルランで深麻酔し断頭後に脳を摘出した。脳検体は摘出後 2 mm 間隔に薄切し、挫傷皮質部位を含む挫傷皮質周辺部位、挫傷皮質から遠い同側皮質、外傷側海馬、対側皮質、対側海馬の 5 部位に分けて摘出した。Western blotting 用の検体は摘出後、真空乾燥し乾燥重量の 4 倍量の超純水を加えた。氷上で超音波破砕機を用いて検体を破砕し、毎分 15,000 回転で 15 分遠心分離し

Table 1 Number and assignment of rats used in the present study.

	組織染色用	Western blotting, PCR 用
Naïve 群	n = 1	n = 4
CCI-Control 群	n = 4	n = 12 (day3, 28 に各 n = 6)
CCI-MRS2179 群	n = 4	n = 12 (day3, 28 に各 n = 6)
CCI-Pyr3 群	n = 4	n = 12 (day3, 28 に各 n = 6)

PCR: polymerase chain reaction, Pyr3: Pyrazole-3.

上清を -80 度で保存した。PCR 用の検体は摘出後に細断し、RNA Later (AM7024; Thermo Fisher Scientific, USA) 内に -80 度で保存した。

組織染色用の脳検体採取は外傷から 28 日後に塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg の三種混合薬を腹腔内投与し麻酔した。開胸後に左心室から 200 mL の生理食塩水で脱血したのち、200 mL の 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定し脳検体を摘出した。灌流液と同じ 4% パラホルムアルデヒドで 24 時間固定後、10%、20%、30% ショ糖加 phosphate buffer saline (PBS) 溶液で各々 24 時間ずつ段階的クライオプロテクションした。液体窒素で瞬間凍結し -80 度内に保存した。

3 組織染色

凍結脳組織をクライオスタットにて 20 μ m に薄切し、500 μ m ごとに切片を採取した。

Nissl 染色はキシレンで組織を脱脂後に 0.2% クレシルバイオレット溶液中で 15 分間染色し、2.5% 酢酸加アルコールで分別した。脱水、透徹後にカバースリップし観察に用いた。

Holzer 染色は 0.5% 過マンガン酸カリウム水溶液で 5 分、2% シュウ酸水溶液で 5 分、0.5% リンモリブテン酸アルコールで 3 分、2% クリスタルバイオレットで 1 分、10% 臭化カリウム水溶液で 1 分染色し、アニリンキシレン液で分別を行った。脱水、透徹後にカバースリップした。

リントングステン酸・ヘマトキシリン染色は 3% 重クロム酸カリウム液で 60 度内に 2 時間、0.5% 過マンガン酸カリウム水溶液で 10 分、5% シュウ酸水溶液で 5 分、リントングステン酸・ヘマトキシレン液に 37 度で 24 時間染色した。脱水、透徹を行いカバースリップした。

免疫染色は PBS 溶液中に組織を浮遊させた状態（フリーフローティング法）で行った。まず 3% 過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼの除去を行い、2% ウマ血清を用いてブロッキングを行った。一次抗体として 1,000 倍希釈の抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (ab7260; abcam, USA) を使用した。4 度内で 24 時間一次抗体感作した。二次抗体反応から ABC 法までは VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (PK-6101; Vector Laboratories, USA) を製品プロトコールに沿って使用した。発

Table 2 Primer sequence and PCR condition.

	Forward	Reverse	AT	Cy
P2Y1 受容体	GCTCCCTTTGGGGAACAGT	ACATGTACACCGAGATGCCG	58	30
TRPC3 チャネル	TGAGGTGAACGAAGGTGAAGT	CCTGTCCCCCAAGGAAGTCT	56	32
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCCACCACCTGTTGCTGTA	63	23

AT: annealing temperature, Cy: cycle number, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, PCR: polymerase chain reaction, TRPC3: transient receptor potential canonical 3.

色はジアミノベンジジンで行い、アミノシランコートスライドガラス上にマウントし脱水、透徹後にカバースリップした。

4 Western blotting

検体を 20 倍希釈し、RC DC Protein assay Kit (5000122 JA: Bio-Rad, USA) を用いて総タンパク濃度を測定した。測定には吸光度計 (Model680: Bio-Rad, USA) を使用した。Laemmli sample buffer (1610737: Bio-Rad, USA) と beta-mercaptoethanol (1610710: Bio-Rad, USA) を用いてサンプルを溶解した。1 ウェルあたり 15 μ g のタンパク量をローディングした。タンパク分離はポリアクリルアミド電気泳動で行い、4–20%濃度勾配ゲル (567-1095: Bio-Rad, USA) に展開した。分子量マーカーにはプレジジョンプラスプロテイン 2 色スタンダード (1610374: Bio-Rad, USA) を用い、電気泳動は 120 V, 400 mA で 70 分間行った。転写には乾燥法である iBlot システム (IB401001: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。一次抗体は 10,000 倍希釈の抗 GFAP 抗体 (ab7260: abcam, USA) を使用し、4 度で 24 時間反応させた。二次抗体は抗ウサギ IgG 抗体 (AP182P: Milipore, USA) を用い、室温で 2 時間感作させた。発色には ECL 法 (Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) でバンド検出を行った。内因性コントロールとして SYPRO ルビータンパク質プロット染色 (1703127: Bio-Rad, USA) を行った。

5 Polymerase chain reaction

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (74804: Quiagen, GERMANY) を用いて messenger ribonucleic acid (mRNA) を精製し、RNA 量を超微量分光光度計 (NanoDrop Lite: Thermo Fisher Scientific, USA) で測定した。逆転写は SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit (18090010: Thermo Fisher Scientific, USA) で行い、complementary deoxyribonucleic acid を作製した。PCR には Platinum Taq (10966-034: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。各プライマーを Table 2 のように設計し、サーマルサイクラー (T100 Thermal Cycler: Bio-Rad, USA) で行った。電気泳動には Gel Red (41003: Biotium, USA) 添加 2% アガロースゲルを用い、120 V, 400 mA, 38 分間行った。検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) でバンドを検出した。

内因性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

6 グリオース体積の測定

外傷作製 28 日後の脳検体を用いた。まず脳挫傷腔前後の正常脳を含む脳切片として Bregma を基準として AP 2 mm から -5 mm の 1 mm 間隔、計 8 スライスを使用し計測した。Holzer 染色した切片の青紫色の陽性部位を Image J ソフト (version1.52a: NIH, USA) 上でトレースし各切片の合計面積を求めた。これを積分しグリオース体積を求めた。非外傷側の総体積も同様に測定しコントロールとした。

7 残存脳体積の測定

外傷作製 28 日後の脳検体を用いた。まず脳挫傷腔前後の正常脳を含む脳切片として Bregma を基準として AP 2 mm から -5 mm の 1 mm 間隔、計 8 スライスを使用し計測した。Nissl 染色した切片を Image J ソフト上でトレースし各切片の合計残存脳面積を求めた。これを積分し残存脳体積を求めた。非外傷側の残存脳体積も同様に測定しコントロールとした。

8 統計解析

統計解析には SPSS statistics (version21: IBM, USA) を使用した。多群間の比較には one way analysis of variance (ANOVA) を使用した。要因に有意差を認めた場合のみ post-hoc 検定に Tukey の方法を使用し行った。分散が等しくないデータに関してイプシロンにより自由度を補正した (Games-Howell の方法)。すべての検定で p 値が 0.05 未満を有意とした。全てのデータは平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

結 果

1 アストロサイトの免疫染色

Naïve ラットの脳皮質切片を抗 GFAP 抗体で染色したところ、脳全体に陽性細胞を認めた (Fig. 3)。Naïve ラットの脳皮質の陽性細胞の大きさは約 40 μ m であり、細胞体は小さく多数の突起を有し星状構造を有していた (Fig. 4A)。CCI-Control 群の脳皮質切片を抗 GFAP 抗体で染色したところ、脳皮質の陽性細胞は細胞体と突起共に肥大化していた (Fig. 4B)。CCI-MRS2179 群、CCI-

Fig. 3 Microphotograph of GFAP immunostained tissue around the longitudinal fissure of the Naïve group.

The GFAP positive cells were observed throughout the brain. Scale bar: 400 μm.

GFAP: Glial fibrillary acidic protein.

Pyr3 群の脳皮質の陽性細胞は CCI-Control 群と比較し細胞体と突起の肥大化が共に少なかった (Figs. 4C, D).

2 アストロサイトの組織染色

Holzer 染色では大脳縦裂を境界にして外傷側と非外傷側の陽性細胞を比較した。CCI-Control 群では外傷側に非

外傷側と比較し著明に多い陽性細胞を認めた (Fig. 5A)。CCI-MRS2179 群および CCI-Pyr3 群での外傷側にも陽性細胞を認めたが、その数は CCI-Control 群と比較し明らかに減少していた (Figs. 5B, C)。

リンタンゲステン酸・ヘマトキシリン染色ではすべての外傷を与えた群で、脳挫傷周囲の Holzer 染色で陽性の部位に多数の陽性細胞を認め (Fig. 6)、これらは繊維状の形態を呈した。

3 GFAP の定量

アストロサイトの発現を定量化するため、脳挫傷周囲の大脳皮質を検体として抗 GFAP 抗体を用いて Western blotting を行った (Figs. 7A, B)。Naïve 群の値は 312.6 ± 101.9 であった。外傷 3 日後では CCI-Control 群の値が 595.7 ± 150.4 と Naïve 群と比較して有意な発現の増加を認めた ($p = 0.007$)。CCI-MRS2179 群は 458 ± 333.4 と CCI-Control 群より低い値を示したが、有意な差ではなかった。しかし CCI-Pyr3 群では 347.5 ± 227.8 と発現が抑制され CCI-Control 群と比較して有意差を認めた ($p = 0.032$)。外傷 28 日後には CCI-Control 群、CCI-MRS2179 群、CCI-Pyr3 群の値は Naïve 群に比べ高い値を示し、それぞれ $1,099.2 \pm 102.9$, 846.5 ± 162.3 , 889.7 ± 371.2 であった。また CCI-MRS2179 群 ($p = 0.010$)、CCI-Pyr3 群

Fig. 4 High magnification image of GFAP immunostained cerebral cortex.

Compared from the Naïve group (A), astrocytes of the CCI-Control group (B) presented enlarged cell bodies and protrusion. Astrocytes in the CCI-MRS2179 (C) and CCI-Pyr3 (D) group showed less hypertrophy as compared with the CCI-Control group. Scale bars: 20 μm. CCI: cerebral contusion injury, GFAP: Glial fibrillary acidic protein, Pyr3: Pyrazole-3.

Fig. 5 Image of Holzer stained tissue around the longitudinal fissure of cerebrum.

Numerous number of positive cells were found in the cortex and subcortex of the injured side and few in the contralateral side of the CCI-Control group (A). In the CCI-MRS2179 (B) and CCI-Pyr3 (C) group, the number of positive cells were significantly less on the both hemispheres compared with the CCI-Control group. Scale bars: 200 μ m.

CCI: cerebral contusion injury, Pyr3: Pyrazole-3.

($p = 0.044$) では CCI-Control 群と比較して有意に発現が抑制された。

4 グリオース体積

脳損傷後のグリオースの程度を定量するために、外傷 28 日後の Holzer 染色切片を用いてグリオース体積を外傷側、非外傷側で測定した (Fig. 8)。外傷側のグリオース体積は CCI-Control 群で $42.0 \pm 6.0 \text{ mm}^3$ であった。CCI-Control 群と比較して CCI-MRS2179 群は $9.0 \pm 3.8 \text{ mm}^3$ ($p < 0.001$)、CCI-Pyr3 群は $13.3 \pm 3.4 \text{ mm}^3$ ($p < 0.001$) と有意なグリオース体積の抑制を認めた。コントロールとして非外傷側のグリオース体積を測定し CCI-Control 群、CCI-MRS2179 群、CCI-Pyr3 群はそれぞれ、 $2.8 \pm 1.8 \text{ mm}^3$ 、 $0.2 \pm 0.4 \text{ mm}^3$ 、 $1.1 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ であり各群間での有意差は認めなかった。

5 残存脳体積

脳挫傷による組織損傷の評価として外傷 28 日後の残存脳体積を測定し、脳挫傷の程度を評価した。外傷側の体積は CCI-Control 群で $313.4 \pm 6.9 \text{ mm}^3$ 、CCI-MRS2179 群で $307.7 \pm 32.1 \text{ mm}^3$ 、CCI-Pyr3 群で $274.3 \pm 38.3 \text{ mm}^3$ であった。各群間に有意差は認められなかった。

Fig. 6 Figure 6: High magnification image of PTAH stained injured cerebral cortex of the CCI-Control group.

In the Holzer staining positive area, glial fibers were stained positive by PTAH staining. Scale bar: 20 μ m.

CCI: cerebral contusion injury, PTAH: phosphotungstic acid/hematoxylin.

6 P2Y1 受容体の発現定性

P2Y1 受容体の発現定性のために PCR を行った (Fig. 9)。外傷 3 日後には Naïve 群、CCI-Control 群、CCI-Pyr3 群では P2Y1 受容体の発現を認めたが、CCI-MRS2179 群では発現を認めなかった。外傷 28 日後ではいずれの

Fig. 7 Western blotting evaluated GFAP expression level in the cerebral cortex around the contusion site on post injury day 3 and 28.

A: On post-injury day 3, significant increase of GFAP expression was observed in the CCI-Control group compared to the Naïve group. The GFAP expression of the CCI-Pyr3 group was significantly lower compared with that of the CCI-Control group. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

B: On post-injury day 28, the GFAP expression further increased in the CCI-Control group. But the expressions were significantly lower in both CCI-MRS2179 and CCI-Pyr3 groups compared with the CCI-Control group. *: $p < 0.05$.

CCI: cerebral contusion injury, GFAP: Glial fibrillary acidic protein, Pyr3: Pyrazole-3.

群でも P2Y1 受容体の発現を認めた。

7 TRPC3 チャンネルの発現定性

TRPC3 チャンネルの発現定性のために PCR を行った (Fig. 10). 外傷 3 日後には Naïve 群, CCI-Control 群, CCI-Pyr3 群では TRPC3 チャンネルの発現を認めたが, CCI-MRS2179 群では発現を認めなかった. 外傷後 28 日モデルではいずれの群でも TRPC3 チャンネルの発現を認めた.

考 察

1 脳挫傷とグリオース

アストロサイトは中枢神経系の細胞の中で最も豊富な細胞である. 従来アストロサイトは細胞内外のイオン濃度や pH の維持, 神経細胞への酸素とグルコースの供給, シナプス間に放出されたグルタミン酸の吸収などの限定

Fig. 8 Gliosis volume of the 3 groups on post-injury day 28.

Gliosis volumes of the injured hemisphere were significantly lower in the CCI-MRS2179 and CCI-Pyr3 groups compared with the CCI-Control group. ***: $p < 0.001$.

CCI: cerebral contusion injury, Pyr3: Pyrazole-3.

した働きを行っていると考えられてきた. しかし, アストロサイトは ATP などのグリオトランスマッターを用いたシグナル伝達, シナプス強度の調整³⁾, 脳血流の調整⁴⁾, 記憶の形成⁵⁾ など多岐な活動に関与していることが明らかとなり注目されている. アストロサイトのシグナル伝達はカルシウムウェーブによる隣接アストロサイトの活性化, それに続発するアストロサイト近傍のマクログリアの活性化による炎症の賦活に不可欠で, 脳損傷において重要な役割を果たしていると考えられている. 近年さまざまな病態にアストロサイトの機能が関与することが解明されており, なかでもグリオースの形成は数多くの病態に関与していると考えられている. 脳挫傷におけるアストロサイトの変化において生理学的な働きと同時に注目されることは, 形態学的な変化である. 脳挫傷におけるアストロサイトの形態学的変化は古典的には反応性アストロサイトと呼ばれ, これら反応性アストロサイトは脳挫傷の急性期に増加しさまざまな因子から神経細胞を保護する働きを有すると考えられている¹⁹⁾. また急性期の反応性アストロサイトの増加は, 急性期の GFAP 値の増加と相関するとされている²⁰⁾. しかし, これら反応性アストロサイトの一部が慢性期に線維性変化を起こし, グリオースとして残存し神経再生の障壁¹³⁾ やてんかん発作の焦点¹⁴⁾ となることが指摘されている. グリオースは頭部外傷以外の分野でも筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー型認知症²¹⁾ などの変性疾患, 脊髄損傷²²⁾, 中枢感染症²³⁾ さらには脳深部刺激療法²⁴⁾ など多岐にわたる病態で関与が指摘されており, これまでさまざまな手法を用いてその抑制効果が検討されている. Perez らは 4'-fluoro-cannabidiol を末梢神経損傷モデルに投与すると, グリオースの抑制と細胞死の減少が可能であったと報告している²⁵⁾. また Luo らは網膜虚血再灌流モデルに Resveratrol を投与すると細胞死が抑制されるが, さらに GFAP 発現量が低下しており, グリオース

Fig. 9 Expression of P2Y1 receptor, 3 and 28 days after trauma.

Expression of P2Y1 receptor was suppressed in the CCI-MRS2179 group 3 days after trauma but not on day 28.

CCI: cerebral contusion injury, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Pyr3: Pyrazole-3.

Fig. 10 Expression of TRPC3 channel, 3 and 28 days after trauma.

Expression of TRPC3 channel was suppressed in the CCI-MRS2179 group 3 days after trauma but not on day 28.

CCI: cerebral contusion injury, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Pyr3: Pyrazole-3, TRPC3: transient receptor potential canonical 3.

スも抑制されていたと報告している²⁶⁾。

本研究では MRS2179 と Pyr3 の投与により共に慢性期のグリオシスの抑制が可能であった。この結果は急性期に活性化したアストロサイトの一部が慢性期に瘢痕形成するのであるというこれまでの仮説を立証するものである。またグリオシスは神経回復の悪化因子となる説がある一方で、線維性変化により脳挫傷の拡大を防ぐ働きを持つという説も存在する⁷⁾。本研究ではグリオシスの発生を抑制しても、残存脳体積は減少しなかった。これはグリオシスが脳挫傷の拡大を防ぐ働きを持つという説を否定する結果であった。

2 脳損傷と P2Y1 受容体

脳損傷では P2Y1 受容体は ATP を介したアストロサイトの活性化において重要な役割を持つ。グリオシスを抑制する上で、アストロサイトの活性化を抑えることが重要であると考えられる。本研究では MRS2179 を局所投与すると、慢性期の GFAP の発現とグリオシスの抑制を認めた。また、急性期の P2Y1 受容体、TRPC3 チャンネルの発現が抑制された。これまで MRS2179 投与によって in vivo および in vitro においてグリオシス、P2Y1 受容体そして TRPC3 チャンネルの発現を抑制した研究の

報告はない。グリオシスの抑制に関してはカルシウムウェーブを抑制することによりアストロサイトの活性化を抑制でき、グリオシスを抑制可能だと考えた。TRPC3 チャンネルの発現の抑制に関して機序は不明であるが、G タンパク質共役型トロンビン受容体は血小板活性化の過程において P2 受容体のうち P2Y1 受容体と P2Y12 受容体が関係していることから、P2Y1 受容体の抑制により何らかの形で G タンパク質共役型トロンビン受容体が抑制され、その下流にある TRPC3 チャンネルが抑制された結果だと推察される²⁷⁾。

3 脳損傷と Transient receptor potential canonical 3

脳血管障害においてアストロサイトを活性化させる大きな要因の一つは、血管外に漏出したトロンビンである。トロンビンが作用し活性化したアストロサイトは細胞形態変化を起こし、異常増殖を伴ったグリオシスを引き起こす。これらの反応はトロンビンによって活性化される G タンパク質共役型トロンビン受容体によって調節されている。トロンビンによって G タンパク質共役型トロンビン受容体が活性化されると、アストロサイトの細胞膜上に存在する TRPC3 チャンネルが活性化し自身の発現を増大させながら働き TRPC3 チャンネルを介して細胞外

カルシウムを細胞内に流入させる²⁸⁾。In vitro 培養アストロサイトにトロンビン作用させると TRPC3 チャンネルの発現が増大し、選択的 TRPC3 チャンネル阻害薬である Pyr3 を作用させると TRPC3 チャンネルの発現の増大は抑制され⁸⁾、また RNA 干渉によって TRPC3 チャンネルの発現を特異的に抑制したアストロサイトでは、トロンビンによる細胞形態変化や異常増殖を伴ったグリオーシスを抑制することが証明されている²⁹⁾。In vivo モデルを用いた報告では、マウスの頭蓋内出血モデルへの Pyr3 の投与は脳浮腫の抑制、アストロサイトの活性化の抑制において有効性が示された¹⁷⁾。その他にも TRPC3 チャンネルの発現を抑制したマウス脳に針を一時的に刺入するモデルで、脳浮腫とグリオーシスの抑制が示されている³⁰⁾。これまで外傷モデルを用いて Pyr3 の効果を検討した研究は存在しない。本研究では脳挫傷モデルに Pyr3 を局所投与すると、急性期および慢性期の GFAP の発現が抑制され、慢性期のグリオーシスも抑制可能であったが、過去に Pyr3 を in vitro で使用した研究と異なり、Pyr3 を投与しても TRPC3 チャンネルの発現は抑制されなかった。これは使用したモデルの差などを反映している可能性が考えられるが、その詳細については今後の研究課題と考えられた。

4 まとめ

本研究では in vivo 脳挫傷モデルにおいて MRS2179 および Pyr3 の局所投与により、急性期から慢性期の GFAP の発現を抑制し、慢性期のグリオーシスを抑制した。両薬剤はこれまでの研究で完全に異なる作用機序が解明されており、本研究でも別個の経路を拮抗する目的で用いた。しかし本研究の結果からこの二つの経路には相互に作用する部分があると考えられた。これまで in vivo 外傷モデルを用いて MRS2179 や Pyr3 のグリオーシス抑制効果を検討した研究は存在しない。グリオーシスの影響は頭部外傷を含めた多彩な病態に関与している。グリオーシスの抑制を目的とした MRS2179 や Pyr3 の臨床応用にはさらに詳細な機序の解明が必要であるが、外傷後慢性期のグリオーシスを制御した本研究結果は外傷後てんかんや神経再生の研究を進める際に有用な結果であると考えられた。

結 論

ラット脳挫傷モデルにおいて選択的 P2Y1 受容体拮抗薬 MRS2179 および選択的 TRPC3 チャンネル阻害薬 Pyr3 の急性期投与は、慢性期のグリオーシスを抑制した。

謝 辞

本論文の主旨を含む学位総括論文は、日本大学リポジトリに公開されています。

本研究は JSPS 科研費 25861292, 16K10741 の助成を受けたものです。

本論文に記載する COI はありません。

文 献

- 1) Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, et al. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 1990; **247**: 470–473.
- 2) Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, et al. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 1999; **19**: 520–528.
- 3) Coppi E, Pugliese AM, Stephan H, et al. Role of P2 purinergic receptors in synaptic transmission under normoxic and ischemic conditions in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Purinergic Signal* 2007; **3**: 203–219.
- 4) Takano T, Tian GF, Peng W, et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 2006; **9**: 260–267.
- 5) Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, et al. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 2010; **463**: 232–236.
- 6) Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, et al. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 2006; **9**: 1512–1519.
- 7) Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; **32**: 638–647.
- 8) Shirakawa H, Sakimoto S, Nakao K, et al. Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) mediates thrombin-induced astrocyte activation and upregulates its own expression in cortical astrocytes. *J Neurosci* 2010; **30**: 13116–13129.
- 9) Shih AY, Johnson DA, Wong G, et al. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 2003; **23**: 3394–3406.
- 10) Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999; **23**: 297–308.
- 11) Zador Z, Stiver S, Wang V, et al. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol* 2009; **190**: 159–170.
- 12) Okada S, Nakamura M, Katoh H, et al. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 2006; **12**: 829–834.
- 13) Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004; **5**: 146–156.
- 14) Oberheim NA, Tian GF, Han X, et al. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci* 2008; **28**: 3264–3276.
- 15) Goodman JC, Cherian L, Bryan RM Jr, et al. Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. *J Neurotrauma* 1994; **11**: 587–597.
- 16) Moro N, Ghavim SS, Sutton RL. Massive efflux of adenosine triphosphate into the extracellular space immediately after experimental traumatic brain injury. *Exp Ther Med* 2021; **21**: 575.
- 17) Munakata M, Shirakawa H, Nagayasu K, et al. Transient receptor potential canonical 3 inhibitor Pyr3 improves outcomes and attenuates astrogliosis after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* 2013; **44**: 1981–1987.

- 18) Bramlett HM, Dietrich WD. Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies. *Prog Brain Res* 2007; **161**: 125–141.
- 19) Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; **50**: 427–434.
- 20) Halford J, Shen S, Itamura K, et al. New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; **37**: 3278–3299.
- 21) Merluzzi AP, Carlsson CM, Johnson SC, et al. Neurodegeneration, synaptic dysfunction, and gliosis are phenotypic of Alzheimer dementia. *Neurology* 2018; **91**: e436–e443.
- 22) Noristani HN, Saint-Martin GP, Cardoso M, et al. Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Analysis and Histological Characterization after Spinal Cord Injury in Two Mouse Strains with Different Functional Recovery: Gliosis as a Key Factor. *J Neurotrauma* 2018; **35**: 2924–2940.
- 23) Wilson KD, Ochoa LF, Solomon OD, et al. Elimination of intravascular thrombi prevents early mortality and reduces gliosis in hyper-inflammatory experimental cerebral malaria. *J Neuroinflammation* 2018; **15**: 173.
- 24) Vedam-Mai V, Rodgers C, Gureck A, et al. Deep Brain Stimulation associated gliosis: A post-mortem study. *Parkinsonism Relat Disord* 2018; **54**: 51–55.
- 25) Perez M, Cartarozzi LP, Chiarotto GB, et al. Neuronal preservation and reactive gliosis attenuation following neonatal sciatic nerve axotomy by a fluorinated cannabidiol derivative. *Neuropharmacology* 2018; **140**: 201–208.
- 26) Luo H, Zhuang J, Hu P, et al. Resveratrol Delays Retinal Ganglion Cell Loss and Attenuates Gliosis-Related Inflammation From Ischemia-Reperfusion Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; **59**: 3879–3888.
- 27) Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 222–232.
- 28) Uhl JJ, Reiser G. Characteristics of thrombin-induced calcium signals in rat astrocytes. *Glia* 1997; **21**: 361–369.
- 29) 白川久志. アストロサイト異常活性化における TRPC subfamily の生理学的重要性. *薬学雑誌* 2012; **132**: 587–593.
- 30) Belkacemi T, Niermann A, Hofmann L, et al. TRPC1- and TRPC3-dependent Ca(2+) signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo. *Glia* 2017; **65**: 1535–1549.