

ラット脳挫傷モデルにおける ATP 分解酵素
Apyrase の効果 (要約)

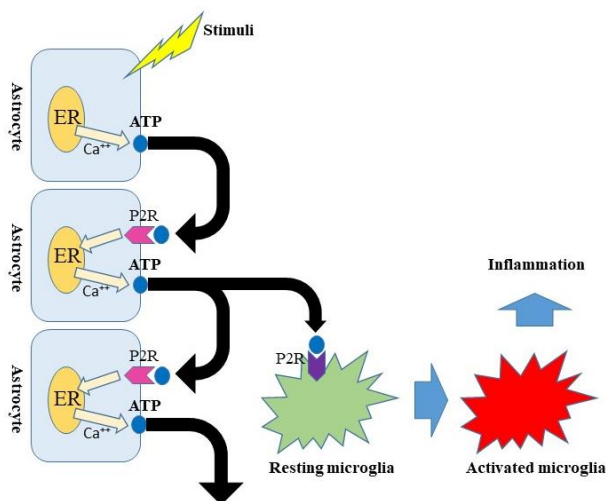
日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

古川雄都

修了年 2018 年

指導教員 吉野篤緒

頭部外傷や脳梗塞などの刺激によりアストロサイトが活性化され、それに続発してマイクログリアが活性化されることは近年の様々な研究で明らかになっている。外傷や虚血などの刺激を受けるとアストロサイトは活性化し、adenosine triphosphate (ATP) を細胞外液中に放出する。ATP がパラクリンにより隣接するアストロサイト上の P2 受容体に結合すると、そのアストロサイトも活性化される。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することができる。この連鎖反応はグリオトランスミッション



と呼ばれている。脳内の炎症担当細胞であるマイクログリアはアストロサイトの制御下であり、アストロサイトの指令により炎症反応を開始する。ATP のパラクリンはアストロサイトとアストロサイト間だけでなく、アストロサイトからマイクログリアへの連絡にも使われる。マイクログリアはアストロサイトからの ATP シグナルを受けて初めて活性化し、活動性を有することとなる。マイクログリアは生理的な状態

では脳内に生じたゴミを除去する役割を担っており、死んだ細胞の貪食などを行っている重要な細胞である。しかし頭部外傷や脳梗塞などで過剰なアストロサイトの活性化が起こると、マイクログリアも過剰に反応し、結果的に強い炎症反応が起こることになる。活性型マイクログリアにより放出される炎症性サイトカインの異常高値はこうして起こるものと考えられている。この過剰な炎症反応や炎症性サイトカインの放出は脳に悪影響を及ぼし、二次性脳損傷を引き起こす。私の研究室では以前よりラット脳挫傷モデルである cortical contusion injury (CCI) モデルを用いて、二次性脳損傷を抑制できないかと研究を行ってきた。アストロサイト間のシグナル伝達に重要な P2 受容体である P2Y1 受容体の拮抗薬、MRS2179 を外傷脳に投与すると強い抗炎症効果を発揮することを解明した。MRS2179 の投与は外傷後のマイクログリアの活性化を抑制し、炎症性サイトカインの一部を抑制した。しかし行動学的評価では MRS2179 投与による神経症状の改善はみられたものの、有意な差まで至らなかった。そこで私はグリオトランスミッターである ATP 自体をアピレーズを用いて加水分解することにより、更なる二次性脳損傷の抑制ができないかと考え本研究を行った。またアピレーズには ATP 分解作用と共に内皮細胞保護効果があると報告されている。本研究では内皮細胞保護効果、すなわち血液脳関門の評価のためエバンスブルーの漏出実験も併せて行った。

外傷モデルはラットの CCI モデルを用い、外傷直後に人工髄液 (aCSF: artificial cerebrospinal fluid) もしくはアピレーズを挫傷組織内に投与した。脳挫傷後 1 日目、3 日目、7 日目に脳を摘出しサンプルとした。免疫組織染色、western blotting、polymerase chain

reaction を用いて炎症関連因子を解析した。

処置を施していない naïve 脳をマイクログリアのマーカーとして汎用されている抗 Iba-1 抗体で免疫染色した。大脳皮質や海馬、基底核、脳梁を含めたすべての部位に Iba-1 陽性細胞を認めた。ここで認める陽性細胞は形態学的にすべて静止型のマイクログリアであった。活性型マイクログリアに特異的なマーカーである抗 Galectin-3 抗体で naïve 脳を免疫染色すると、大脳皮質や海馬などすべての部位に Galectin-3 陽性細胞は認めなかった。外傷 3 日後の CCI-aCSF 群では、外傷側の大脳皮質、海馬、基底核、脳梁など広範囲な部位に Iba-1 陽性細胞を認めた。挫傷周辺の大脳皮質や、海馬におけるこれらの陽性細胞は Naïve 群と比較し明らかに細胞数が多く、大部分は細胞体が肥大し、樹状の突起を縮めた活性型のマイクログリアであった。抗 Galectin-3 抗体で染色した切片を観察すると、外傷周辺の大脳皮質や外傷直下の海馬には多くの Galectin-3 陽性細胞を認めた。これは形態学的にも明らかに活性型のマイクログリアであった。外傷 3 日後の CCI-アピレース群の外傷側大脳皮質や海馬では CCI-aCSF 群と同様に Iba-1 陽性細胞が増加していた。挫傷部近傍大脳皮質の細胞の多くは胞体が肥大しており、活性型の形態を示していたが、海馬の陽性細胞は形態学的に静止型のマイクログリアが多く観察された。抗 Galectin-3 抗体で染色した組織を観察すると、大脳皮質には陽性細胞が存在するもののその数は CCI-aCSF 群と比較すると明らかに少なかった。海馬には Galectin-3 陽性細胞はほとんど認められなかった。

挫傷部近傍の大脳皮質、挫傷部から遠く離れた頭蓋底の大脳皮質そして海馬の活性型マイクログリアを定量するために抗 Galectin-3 抗体を一次抗体とした western blotting を行った。まず CCI-aCSF 群の挫傷部近傍大脳皮質の Galectin-3 を定量すると、外傷 1 日後には 0.154 ± 0.023 であったが 3 日後には 0.269 ± 0.026 まで上昇した。7 日目には 0.042 ± 0.029 まで低下した。CCI-アピレース群では 1 日目に 0.108 ± 0.034 に上昇していたが、3 日目には 0.027 ± 0.015 と低下し、7 日目も 0.037 ± 0.017 と低下したままであった。1 日後 ($p=0.004$)、3 日後 ($p<0.001$) でアピレース投与による有意な Galectin-3 の発現低下が認められた。

次に挫傷部位から遠くの大脳皮質内の Galectin-3 の発現を定量した。CCI-aCSF 群では外傷 1 日後は 0.046 ± 0.013 であったが、3 日後には上昇し 0.089 ± 0.012 となった。7 日目には 0.019 ± 0.017 まで低下した。アピレース投与群では外傷 1 日後は 0.047 ± 0.014 であった。外傷 3 日後にはほとんどかわらず 0.062 ± 0.007 であり、7 日目には 0.001 ± 0.008 まで低下した。外傷 3 日後 ($p=0.001$) と 7 日後 ($p=0.001$) の値はアピレース投与群で有意に低かった。

最後に海馬における Galectin-3 の発現を定量した。CCI-aCSF 群の値は 1 日後で 0.056 ± 0.019 、3 日後が 0.032 ± 0.026 、7 日後は 0.045 ± 0.021 であった。アピレース投与群では外傷 1 日後が 0.036 ± 0.010 、3 日後は 0.030 ± 0.014 であったが、7 日後にはさらに低下し -0.004 ± 0.018 となり検出限界を下回った。外傷 1 日後 ($p=0.011$) と 7 日後 ($p<0.001$) の値はアピレース投与群で有意に低かった。

外傷 3 日後の挫傷周辺大脳皮質組織を用いて、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-12A、IL-12B、TNF α および、炎症の総合的な指標として NF- κ B の発現を観察した。

IL-1 β の発現は外傷によって Naïve 群の発現量の 2 倍近くまで上昇した。しかしアピレーズの投与により発現は大きく低下した。Naïve 群、CCI-aCSF 群、CCI-アピレーズ群の 3 群間では外傷による効果 ($p<0.001$) と薬物による効果 ($p=0.003$) の両方に有意な差が認められた。IL-12A と IL-12B の発現量は IL-1 β と比較して非常に低かった。IL-12A と IL-12B には外傷による発現量の変化も薬物の効果も認められなかった。TNF α の発現量は CCI により Naïve 群と比較して増加したが有意な差は認めなかった。またアピレーズによる効果も認められなかった。NF- κ B の発現量は外傷によって有意な増加は認められなかった。しかしアピレーズの投与は大きく発現量を低下させ、Naïve 群 ($p=0.045$) や CCI-aCSF 群 ($p=0.001$) と比較し有意に低いものとなった。

外傷 3 日後のラットを用いてエバンスブルーの漏出実験を行った。血清エバンスブルー濃度は CCI-aCSF 群が 2.68 ± 0.31 uM、CCI-アピレーズ群が 2.27 ± 0.12 uM であった。CCI-アピレーズ群の値は有意に低かった ($p=0.012$)。挫傷部近傍の大脳皮質におけるエバンスブルー濃度は CCI-aCSF 群が 2.01 ± 0.64 uM、CCI-アピレーズ群が 0.63 ± 0.06 uM であった。アピレーズ群の濃度は有意に低下していた ($p=0.003$)。挫傷部から遠い大脳皮質のエバンスブルー濃度は CCI-aCSF 群と CCI-アピレーズ群でそれぞれ 2.37 ± 0.41 uM、 1.39 ± 0.55 uM であった。アピレーズ投与群で有意に低い値であった ($p=0.006$)。外傷測海馬におけるエバンスブルー濃度は CCI-aCSF 群で 2.62 ± 0.55 uM、CCI-アピレーズ群で 0.90 ± 0.49 uM であった。CCI-アピレーズ群で有意に低い値であった ($p<0.001$)。

ラット脳挫傷モデルにおいてグリオトランスミッターである ATP をアピレーズを用いて加水分解すると、マイクログリアの活性化が抑制され、抗炎症効果を認めた。アピレーズは外傷後の血液脳関門の血管透過性亢進を抑制すると考えられた。

近年の研究で細胞外液中の ATP の上昇は様々な炎症性疾患に関与することが報告されており、治療のターゲットとして注目されている。アピレーズはグリオトランスミッションを抑制するためアストロサイトの活性化と、それに引き続いて生じるマイクログリアの活性化を同時に制御可能である。実際、本研究では強力なマイクログリアの活性化の抑制と、一部サイトカインの分泌抑制が可能であった。またこの手法は本研究以外にもグリオトランスミッションがかかわっていると思われる様々な病態に適応が可能である。本研究では予後の検討まで行っていないが、今後さらに研究を進めることにより不幸な転帰をたどることが多い重症頭部外傷患者の治療に貢献できる可能性がある。