

ラット脳挫傷モデルにおける
選択的 P2X4、P2X7 受容体拮抗薬の効果

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

小林 真人

修了年 2018 年

指導教員 大島 秀規

目次

1. 概要	1
2. 略語集	3
3. 緒言	4
4. 材料と方法	
4-1 脳挫傷モデル	6
4-2 組織染色	7
4-3 Western blotting	7
4-4 Polymerase chain reaction	8
4-5 Enzyme linked immunosorbent assay	8
4-6 統計解析	8
5. 動物取り扱いおよび実験における倫理的配慮	9
6. 結果	
6-1 マイクログリアの免疫染色	10
6-2 Iba-1 の定量	11
6-3 GFAP の定量	11
6-4 炎症関連因子、ケモカインの分泌	11
6-5 サイトカインの定量	12
7. 考察	
7-1 神経疾患とマイクログリア	13
7-2 脳損傷と P2X4、P2X7 受容体	13
7-3 頭部外傷とグリオシス	15
8. 結論	17
9. 謝辞	18
10. 図表	19
11. 引用文献	37
12. 研究業績	44

1. 概要

頭部外傷では外力が直接脳に伝わることにより生じる一次性脳損傷と、その後生じる虚血や脳浮腫、炎症反応によるサイトカインの大量放出などにより生じる二次性脳損傷によって細胞が障害を受ける。外傷直後に細胞外液中に大量に放出される adenosine triphosphate が、マイクログリア上の P2 受容体に結合すると、マイクログリアは形態変化し静止型から活性型となる。このマイクログリアの活性化により炎症反応が起こる。活性型マイクログリアからは大量のサイトカインやケモカインが放出され、二次性脳損傷を引き起こす。本研究はラット脳挫傷モデルを用いて、マイクログリア上の P2 受容体を拮抗することにより炎症反応を抑制し、二次性脳損傷を防ぐことを目的とした。近年の *in vivo* 研究により、マイクログリアの活性化を引き起こす P2 受容体は P2X4 と P2X7 の二つのサブタイプであることが分かっている。選択的 P2X4 受容体拮抗薬である 5-BDBD 及び、選択的 P2X7 受容体拮抗薬 AZ11645373 を用いて、外傷後の炎症反応が抑制可能かを観察した。

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。正常対照群として処置を行っていない Naïve 群と比較した。一般組織染色および、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) を用いた。

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。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 Naïve 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 Naïve 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。Naïve 群と比べて CCI-Control 群では脳挫傷周囲大脳皮質、脳挫傷から遠い同側の大脳皮質、外傷側海馬における interleukin-1 beta (IL-1 β) の有意な上昇を認めた。すべての部位で IL-1 β 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同側の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 の発現は低下したが、特に CCI-5-BDBD 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群の低下は顕著で、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 両方の受容体が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-1 β は ELISA 法にて定量を行った。IL-1 β 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-1 β の発現量低下を認めた。しかし IL-1 β 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。In vivo モデルで外傷後におけるグリオトランスミッション制御により、サイトカインの抑制効果を示した研究はこれまでにない。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、有効な治療となりうる可能性が考えられた。

2. 略語集

ATP: adenosine triphosphate

CCI: cortical contusion injury

CXCL10: C-X-C motif chemokine 10

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IL-1 β : interleukin-1 beta

IL-6: interleukin-6

mRNA: messenger ribonucleic acid

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

PCR: polymerase chain reaction

TNF α : tumor necrosis factor alpha

3. 緒言

脳は神経細胞と神経膠細胞で成り立っている。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。アストロサイトは細胞外液中のナトリウムやカリウムといったイオン濃度や pH の維持を行っており、さらに酸素やグルコースを神経細胞に供給している。また神経終末から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。こうして神経細胞の恒常性を維持するためにアストロサイトが不可欠であることはよく知られている。一方で、脳における炎症反応はマイクログリアが担っている。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 (15)。前述したアストロサイトの機能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クロストークが次々に解明され、その関係に着目した研究がさかんに行われている。

アストロサイトとマイクログリアのクロストークが注目をあびる要因となった鮮烈な報告は、1990 年に Cornell-Bell らが行った研究である (8)。Cornell-Bell らはアストロサイトをディッシュで培養し、カルシウムイメージングで細胞の活性化を測定した。まず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は細胞内カルシウム濃度を上昇させ活性化型のアストロサイトとなる。しかし驚くべきことに、経時的に観察すると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におけるカルシウム濃度の上昇の流れ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。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

(5)。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 (19)。細胞間の間隙が 120 μm までであれば有効にカルシウムウェーブは無細胞の間隙を超えて伝わっていく。さらに Hassinger らは培養皿中心部中心のアストロサイトを刺激すると同時に培養皿辺縁の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。これらの結果は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示していた。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 (17)。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。図 1 に示したようにグルタミン酸や ATP、機械的刺激を受けると、アストロサイト内では inositol-1,4,5-trisphosphate 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 (21)。こうしてアストロサイトは活性化すると ATP を細胞外液中に開口放出する (57)。この ATP はパラクリンにより周囲に拡散してゆき、隣接するアストロサイトの 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 inositol-1,4,5-trisphosphate 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 を用いてグルタミン酸も細胞外液中に放出し、シナプス伝達の強度を調整する機能を有している (27、39)。アストロサイトは外的刺激に対し集団として活性化し、応答するのであろう。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ぼし、シナプスや血管を包み込む構造をしている (18、20)。これはアストロサイトが他の細胞やシナプス終末、血管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态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 共にいくつも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シグナル交換を行っている。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、29)。脳挫傷により神経細胞や周囲のグリア細胞が損傷を受けると、細胞内の ATP が細胞外に放出される。また放出された ATP は先述したカルシウムウェーブを生じ、アストロサイトからも ATP が細胞外に放出される。ATP はマイクログリア上に存在する P2X4、P2X7 受容体に結合し、そのシグナルによりマイクログリアは活性化し、各種のサイトカインを放出する (図 1)。外傷後にはマイクログリアが活性化され、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ことが報告されている。一方でアストロサイトはイオン濃度や pH などの恒常性を維持する働きを有している。本研究はアストロサイトのこれらの働きを抑制することなく、二次性脳損傷を抑えることを目的とした。また本研究では P2X4 と P2X7 受容体を拮抗することにより脳挫傷によるマイクログリアの過剰な活性化を抑制し、サイトカインの放出を抑制することで、それに伴う周囲の正常脳への二次性脳損傷を防ぐことを目的とした。

4. 材料と方法

4-1 脳挫傷モデル

脳挫傷モデルには 270-330 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した cortical contusion injury (CCI) を用いた。イソフルレン 4% で麻酔導入し、イヤーパーを用いて定位脳手術台に固定した。イソフルレン 2% で麻酔の維持を行った。体温測定プローブを直腸内に留置し、術中は保温パッドで体温を 37 度に維持した。ポピドンヨードとエタノールを用いて皮膚切開部を消毒し、10 万倍エピエフリン入りの 1% キシロカインで局所麻酔を行った。頭皮の正中部を前後方向に約 20 mm 切開し、骨膜も同様に切開した。骨膜を剥離したのちに左右に観音開きに翻転させ、頭蓋骨を露出した。Bregma から 3 mm 後方、3.5 mm 左側方を中心に半径 3 mm の骨窓を設けた。その中心に専用の CCI インパクターで等しい強度の脳挫傷を作成した。CCI の条件は速度 : 3.50 m/sec、深さ : 2 mm、接触時間 100 msec、インパクターの直径 : 4 mm で行った。この強度は Goodman らの研究で、海馬への直接打撃をきたさないが、皮質の脳挫傷及び海馬の二次性脳損傷をきたす外傷の強度とされている (7)。表 1 のようにラットをランダムに群分けした。外科的処置を行っていない Naïve 群、外傷コントロールとして CCI 後に dimethyl sulfoxide を投与した CCI-Control 群、CCI 後に選択的 P2X4 受容体拮抗薬である 5-BDBD を投与した CCI-5-BDBD 群、同じく CCI 後に選択的 P2X7 受容体拮抗薬である AZ11645373 を投与した CCI-AZ11645373 群、CCI 後に 5-BDBD と AZ11645373 の両方を投与した CCI-5-BDBD+AZ11645373 群を製作した。事前に Alzet Brain Infusion Kit 2 (Alzet 8663: Alzet, USA) 及び浸透圧ポンプ (Alzet 2001: Alzet, USA) に各々薬剤を注入しておき、CCI 直後に脳挫傷の中心部に 2 mm の深さで留置針を留置した。浸透圧ポンプは背部の皮下に留置し、持続的に 1 μ L/h の速度で薬剤を注入した。骨窓は人工硬膜を敷き吸収糸で縫合し閉鎖した。骨膜、皮膚を縫合したのちに、維持麻酔を終了し、37 度の温室内で覚醒させた。5-BDBD と AZ11645373 を *in vivo* で使用した先行研究がないため、過去の *in vitro* における使用濃度を参照した。5-BDBD、AZ11645373 はそれぞれ dimethyl sulfoxide で希釈し 1 mM に調製した。対照薬として dimethyl sulfoxide を単独で用いた。

Dalgard らの報告 (9) を元に、サイトカインやケモカインが活発に産生される CCI から 3 日間、dimethyl sulfoxide、5-BDBD、AZ11645373 を投与し、CCI から 3 日後に 5% イソフルレンで深麻酔をかけ、断頭後に PCR、western blotting 用の検体を摘出した。脳を摘出したのちに 2mm 間隔に薄切し、脳挫傷組織、脳挫傷周囲皮質、脳挫傷から遠い同側の皮質、外傷側海馬、対側皮質、対側海馬の 6 部位に分けて摘出した。PCR 用の検体は摘出後すぐに細断し RNALater (AM7024: Thermo Fisher Scientific, USA) 内に保存した。Western blotting および enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 用の検体は、摘出した後に真空

乾燥をかけ乾燥重量を測定し、その4倍量の超純水を加えた。氷上で超音波破碎機を用いて検体を破碎した。その後15,000回転/分で15分間遠心し、上清を-80度で保存した。

組織染色用の検体採取にはCCIから3日後にペントバルビタールを腹腔内投与して深麻酔した。疼痛刺激に反応がなくなったのを確認し、開胸した。左心室に留置針を留置し、200 mLの生理食塩水で脱血したのちに200 mLの4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し脳を摘出した。同様の固定液で24時間固定し、10%、20%、30%ショ糖加 phosphate buffer saline (PBS) 溶液内で24時間ずつ段階的にクライオプロテクションした。液体窒素で瞬間凍結し、組織を保存した。

4-2 組織染色

免疫染色用の組織は凍結状態のままクライオスタットで20 µmに薄切し、500 µm毎に切片を採取した。PBS溶液中に組織を浮遊させた状態で染色した。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った。次に2%ウマ血清を用いてブロッキングを行った。一次抗体として抗Iba-1抗体(019-19741: Wako Pure Chemical Industry, JAPAN)と抗Galectin-3抗体(sc32790: Santa Cruz Biotechnology, USA)を使用した。一次抗体感作を4度内で24時間行った。二次抗体反応からABC法まではVECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (PK-6101, 6102: Vector Laboratories, USA)を用いた。発色はジアミノベンチジンで行った。組織をスライドガラスにマウントし、脱水、透徹後にカバースリップした。

4-3 Western blotting

検体を20倍に希釈し、RC DC Protein assay Kit (5000122JA: 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 (Model 680: Bio-Rad, USA) を使用した。2X Laemmli sample buffer (1610737: Bio-Rad, USA) と beta-mercaptoethanol (1610710: Bio-Rad, USA) を用いてサンプルを調製した。1ウェルあたり15 µgのタンパク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%の濃度勾配ゲル (567-1095: Bio-Rad, USA) を用いた。分子量マーカーにはプレシジョンプラスプロテイン2色スタンダード (1610374: Bio-Rad, USA) を用いた。泳動は120 V、400 mAで70分を行った。転写は乾燥法を用いたiBlotシステム (IB1001: Thermo Fisher Scientific, USA) を使用し、メンブレンはポリビニルピロリデンジフルオロライド膜 (IB401001: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて転写した。一次抗体は1,000倍希釈の抗Iba-1抗体 (019-20001: Wako Pure Chemical Industry, JAPAN) と10,000倍希釈の抗GFAP抗体 (ab7260: abcam, USA) を使用した。一次抗体には4度で24時間反応させた。二次抗体は抗ウサギIgG抗体 (AP182P: Millipore, USA) を用い、室温で2時間感作させた。発色はECL法で行い (WP20005:

Thermo Fisher Scientific, USA)、検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) でバンドを検出した。ストリッピングバッファー (T7135A: Takara, JAPAN) でストリッピングした後、20,000 倍希釈の抗 beta-Actin 抗体 (GTX109639: GeneTex, USA) を一次抗体として 4 度、24 時間反応させ、二次抗体反応を行った上で同様にバンドを検出した。インターナルコントロールとして beta-Actin を使用し、結果は目的タンパク/beta-Actin として表示した。

4-4 Polymerase chain reaction

RNA Later 内から組織を摘出し、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (74804: Qiagen, GERMANY) を用いて messenger ribonucleic acid (mRNA) を精製した。RNA 量は超微量分光光度計 (NanoDrop Lite: Thermo Fisher Scientific, USA) を用い測定した。逆転写には SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit (18090010: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて complementary deoxyribonucleic acid を作製した。Polymerase chain reaction (PCR) には Platinum Taq (10966-034: Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、プライマーは表 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。泳動は Gel Red (41003: Biotium, USA) 添加 2% アガロースゲルを用い、120 V、0.4 mA で 35 分間行った。検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) でバンドを検出した。インターナルコントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

4-5 Enzyme linked immunosorbent assay

Interleukin-1 beta (IL-1 β) の定量には ELISA を行った。IL-1 beta Rat ELISA Kit (BMS630: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。用意されている 96 穴ウェルプレートに調製したスタンダードおよび 5 倍に希釈した検体を入れた。洗浄液で 4 回洗浄し、検出抗体を入れて 2.5 時間感作させた。再度 4 回洗浄し、horse radish peroxidase 溶液を加えて 45 分間反応させた。One-step substrate reagent を加え暗室で 30 分間反応させた。反応を停止させ、吸光度計 (Model 680: Bio-Rad, USA) を使用し 450 nm の吸光度を測定した。

4-6 統計解析

統計解析には SPSS Statistics (version 21: IBM, USA) を使用した。多群間の比較には一変量 analysis of variance (ANOVA) を使用した。ANOVA の要因に有意差があった場合のみ post-hoc 検定を Tukey の方法を使用して行った。分散が等しくないデータに関してはイブシロンにより自由度を補正した。すべての検定で p 値が 0.05 以下を有意とした。データは平均±標準偏差で示した。

5. 動物取り扱いおよび実験における倫理的配慮

動物の取り扱いおよび実験は、日本大学医学部実験指針を遵守して行い、日本大学動物実験委員会が制定する日本大学動物実験マニュアルに準じて行った。動物が苦痛を感じないよう最大限の配慮を行った。動物の飼育は上記で認定された施設で行った。飼育環境は気温 22-23 度、湿度 50-60%の室内とし、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道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制定する年一回の講習会を受講している。

6. 結果

6-1 マイクログリアの免疫染色

Naïve ラットの脳切片を抗 Iba-1 抗体で染色したところ、大脳皮質、海馬、基底核など、両側の脳全体に陽性細胞を認めた（図 2）。陽性細胞の大きさは約 20 μm であり、細胞体が小さく多数の突起を有していることから静止型の ramified 型マイクログリアであった。

次に CCI-Control 群の脳切片を抗 Iba-1 抗体で染色したところ、外傷側、非外傷側ともに陽性細胞を認めた（図 3）。非外傷側では naïve 脳と同様に突起を有した静止型マイクログリアが観察された。一方で、外傷側では静止型マイクログリアの細胞数が増加しており、さらにその中に円形の細胞が散見された。強拡大で観察すると円形の細胞体は静止型のマイクログリアよりも肥大化しており、突起は有しておらず、活性型の amoeboid 型マイクログリアの形態をしていた。

次に naïve 脳を抗 Galectin-3 抗体で染色すると、脳全域で陽性細胞は観察されなかった（図 4）。脳挫傷を加えて 3 日後の脳切片を抗 Galectin-3 抗体で染色すると明らかに外傷側に多くの陽性細胞が観察された。陽性細胞は脳挫傷周囲の大脳皮質のみならず、外傷側海馬にも認められた。非外傷側ではほとんど陽性細胞は観察できなかった。

以上の結果より、抗 Iba-1 抗体は静止型、活性型マイクログリアの両方を検出し、抗 Galectin-3 抗体は活性型マイクログリアのみを検出した。静止型マイクログリアは naïve 脳、外傷側、非外傷側すべてで観察されたが、一方で活性型マイクログリアは脳挫傷周囲の大脳皮質に明らかに増加していた。

次に CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群の脳を抗 Iba-1 抗体、抗 Galectin-3 抗体で免疫染色した。

CCI-5-BDBD 群の脳切片を抗 Iba-1 抗体で染色したところ、外傷側でわずかに活性型マイクログリアを認めるものの、その数は CCI-Control 群と比べて明らかに低下していた（図 4、5）。非外傷側ではほとんどが静止型マイクログリアであった。活性型マイクログリアの観察のために抗 Galectin-3 抗体で染色を行ったが、脳挫傷周囲の大脳皮質、外傷側の海馬、基底核などすべての領域で活性型マイクログリアはほとんど観察されなかった。非外傷側でも同様に活性型マイクログリアは認めなかった。

同様に CCI-AZ11645373 群と、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群でも同様に外傷側での活性型マイクログリアの低下を認めた（図 4、6、7）。CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群の 3 群間において明らかな違いは見いだせなかった。

6-2 Iba-1 の定量

マイクログリアの発現を定量化するために、脳挫傷周囲の大脳皮質を検体として抗 Iba-1 抗体を用いた western blotting を行った (図 8)。Naïve 群の値は 0.01 ± 0.01 であったが、外傷により Iba-1 の発現は大きく増加し CCI-Control 群では、 0.11 ± 0.03 と有意に上昇を認めた ($p < 0.001$)。CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群の値は CCI-Control 群と比較し有意に低下しそれぞれ 0.04 ± 0.02 ($p < 0.001$)、 0.05 ± 0.02 ($p < 0.001$)、 0.03 ± 0.02 ($p < 0.001$) であった。

6-3 GFAP の定量

アストロサイトの発現を定量化するために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 (図 9)。Naïve 群の値は 0.14 ± 0.10 であった。CCI-Control 群では 0.42 ± 0.22 と上昇を認めたが、Naïve 群と比較し有意な差は認めなかった。CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群の値は CCI-Control 群と比較し有意に上昇し、それぞれ 0.95 ± 0.33 ($p = 0.029$)、 0.90 ± 0.30 ($p = 0.042$)、 1.19 ± 0.34 ($p < 0.001$) となった。

6-4 炎症関連因子、ケモカインの分泌

炎症性サイトカインとして IL-1 β 、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor alpha (TNF α)、炎症の総合的な指標として nuclear factor-kappa B (NF- κ B)、ケモカインとして C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) の mRNA の発現を測定した。

脳挫傷周囲大脳皮質では CCI により IL-1 β ($p = 0.011$)、IL-6 ($p = 0.005$)、TNF α ($p < 0.001$) の有意な発現上昇が認められた (図10)。IL-6 の発現は CCI-5-BDBD 群で CCI-Control 群と比較し有意に抑制された ($p = 0.010$)。また TNF α の発現は CCI-5-BDBD 群 ($p = 0.004$)、CCI-AZ11645373 群 ($p = 0.013$)、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群 ($p < 0.001$) で有意に抑制された。CXCL10 の発現は Naïve 群と比較し CCI-Control 群 ($p = 0.002$)、CCI-5-BDBD 群 ($p = 0.001$)、CCI-AZ11645373 群 ($p < 0.001$)、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群 ($p = 0.024$) で増加したが、薬剤による作用は認められなかった。

脳挫傷から遠い大脳皮質における IL-1 β の発現は CCI により上昇し、CCI-Control 群は Naïve 群と比較し有意に ($p = 0.001$) 高い発現が認められた (図 11)。薬物の投与により IL-1 β の発現は抑制され、CCI-Control 群と比較し CCI-5-BDBD 群 ($p = 0.012$)、CCI-AZ11645373 群 ($p = 0.003$)、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群 ($p = 0.013$) と有意に抑制された。IL-6 の発現も CCI により上昇した。Naïve 群と比較し CCI-Control 群は有意に高い ($p < 0.001$) 発現が認められた。CCI-5-BDBD 群 ($p = 0.001$) と CCI-5-BDBD+AZ11645373 群

($p < 0.001$) は CCI-Control 群と比較し有意に発現が低下した。さらに IL-6 の発現は投与薬物により発現が異なり、CCI-AZ11645373 群と比較し CCI-5-BDBD 群 ($p = 0.023$) と CCI-5-BDBD+AZ11645373 群 ($p = 0.005$) では有意に発現が抑制された。TNF α の発現は CCI により上昇したものの、その差は有意ではなかった。しかし CCI-5-BDBD+AZ11645373 群の TNF α の発現は CCI-Control 群と比較し有意に ($p = 0.005$) 低下していた。

海馬における IL-1 β の発現は CCI により有意に ($p < 0.001$) 上昇した (図 12)。IL-1 β の発現は P2X 受容体の拮抗により強く抑制され、CCI-Control 群と比較し CCI-5-BDBD 群 ($p < 0.001$)、CCI-AZ11645373 群 ($p < 0.001$)、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群 ($p < 0.001$) と有意に抑制された。IL-6 の発現も CCI により有意に ($p = 0.001$) 上昇した。IL-6 の発現も薬物投与群で強く抑制され、CCI-5-BDBD 群 ($p = 0.002$)、CCI-AZ11645373 群 ($p < 0.001$)、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群 ($p < 0.001$) と CCI-Control 群と比較し有意に抑制された。

6-5 サイトカインの定量

脳挫傷周囲大脳皮質における IL-1 β 濃度を ELISA 法を用いて定量した。Naïve 群の IL-1 β 濃度は 80.4 ± 7.30 pg/mL であった (図 13)。CCI-Control 群では発現が増加し 345.8 ± 42.1 pg/mL となり、Naïve 群と比べて有意な増加を認めた ($p = 0.001$)。また CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群ではそれぞれ 178.8 ± 22.4 pg/mL ($p = 0.002$)、 221.1 ± 30.1 pg/mL ($p = 0.005$)、 169.4 ± 54.9 pg/mL ($p = 0.001$) であり、それぞれ CCI-Control 群と比較し有意に低下した。

7. 考察

7-1 神経疾患とマイクログリア

1919年に Pio del Rio Hortega は大脳皮質に小さな傷をつくり、その周囲の神経細胞の間隙に集積する小さな細胞体を発見し、マイクログリアと名付けた (33)。当時からその細胞は中胚葉由来であり、通常は突起を有した形態で存在し、刺激が加わるとその突起を縮める形態変化を起こし貪食能を有するなどの仮説が立てられていた。その後現代に至るまで様々な研究がなされ、胎生 8 日以前に卵黄嚢に存在する前駆細胞が脳内に移動し、マイクログリアに分化することも明らかになっている (15)。また Stence らの脳スライスモデルを用いた報告では、生理的状态ではマイクログリアは突起を伸ばした ramified 型の形態をしているが、外的刺激を加えると、急速に伸長と退縮を繰り返し、最終的には突起のない amoeboid 型のマイクログリアに変化するとされている (48)。この活性化に関与する因子が ATP であることも解明された。脳内の唯一の免疫担当細胞であるマイクログリアの活性化因子が明らかにされ、マイクログリア側の受容体も同定されたことにより、炎症が関与する多岐にわたる疾患の治療に大きな希望が寄せられるようになった。マイクログリアの活性化やサイトカインの分泌は、パーキンソン病 (13、14、24、49)、アルツハイマー病 (32、43、51)、筋萎縮性側索硬化症 (16、26)、ハンチントン舞踏病 (50)、てんかん (4、53)、難治性疼痛 (52) などの発症や病状進行に関与している。こうした疾患への新たなアプローチとして、グリオトランスミッター制御による治療が注目されている。

本研究の結果はまず、グリオトランスミッションに関与する受容体の拮抗薬を投与することにより、in vivo モデルでも人為的にグリオトランスミッションを制御可能であるという点を示した点で有用な研究であると思われる。

7-2 脳損傷と P2X4、P2X7 受容体

中枢神経系の細胞には様々な P2 受容体が発現している。P2X 受容体は fast acting の受容体で P2X1 から P2X7 が、P2Y 受容体は slow acting の受容体で P2Y1 から P2Y14 が同定されている (41)。特に P2X4、P2X7、P2Y1、P2Y6 は脳内で重要な働きをしていると考えられており、今日でも盛んに研究が行われている。CCI モデルのような頭部外傷モデルを用いて P2 受容体の機能を報告した論文は少ないが、脳虚血モデルを用いた論文は多く報告されている。Bramlett らの報告によると、頭部外傷による細胞死は神経細胞や血管内皮の細胞膜の損傷に起因し、虚血による細胞死は代謝ストレスや電解質の変化により惹起されるといった違いはあるものの、最終的には細胞毒性や酸化ストレス、フリーラジカルの影響、アポトーシスや炎症性反応が関与する点で非常に共通する点が多いことを指摘している (2)。Li らは脳虚血ラットモデルにおいて、活性型マイクログリアには P2X4 受容体

が強く発現しており、P2X4 受容体を拮抗すると IL-1 β や TNF α といった炎症性サイトカインを有意に抑制したと報告している (30)。また Wang らは海馬のスライスを用いた虚血モデルにおいて P2X4 受容体や P2X7 受容体を拮抗すると、IL-1 β の発現が抑制できたと報告している (55)。また脳虚血モデルにおいて、P2X7 受容体の拮抗により細胞死が抑制できたとの報告や (10)、同じく虚血モデルにおいて P2X7 受容体の拮抗がミトコンドリア機能の改善に有用であったなどの報告がある (35)。さらには P2X7 受容体のアゴニストを投与すると活性酸素の産生が上昇し細胞死を引き起こすと報告されている (3)。多くの報告が P2X4 受容体、P2X7 受容体刺激による炎症反応の惹起による悪影響と、その拮抗による有益性を報告している。しかし一方で特に脳虚血モデルにおいて P2X4 や P2X7 受容体の拮抗が予後を悪化させるとの報告もある。Ozaki らは中大脳動脈閉塞モデルにおいてプレコンディショニングに対する P2X4 受容体拮抗の効果を検討している (38)。プレコンディショニング後に 5-BDBD を投与し P2X4 受容体を拮抗した状態で中大脳動脈を閉塞すると、プレコンディショニングによる梗塞巣縮小効果が消失し、神経症状も悪化したと報告している。この報告では血管内皮細胞には P2X4 受容体が強く発現しており、これが何らかの形でプレコンディショニングによる有益性と関係しているのではないかと推測している。同じく Hirayama らは P2X7 受容体の発現上昇がプレコンディショニングによる有益性を得るには必須であると報告している (23)。さらに Kaiser らは P2X7 受容体ノックアウトマウスを用いて中大脳動脈を閉塞すると、脳梗塞体積には変化は無いものの、脳浮腫はワイルドタイプと比較し増強したと報告している (28)。この報告では強いマイクログリアの抑制と反応性アストロサイトの活性化も同時に報告している。

虚血や外傷後のサイトカインの作用機序は完全には解明されていない。Perz-Polo らはラット外傷モデルにおいて IL-1 β 受容体拮抗薬や TNF α 阻害剤が外傷後に生じる神経細胞死を抑制し、機能予後を改善したと報告している (40)。またマウス外傷モデルにおいて IL-1 β 中和抗体の投与が機能予後を改善した (11) など、サイトカインの分泌を抑制することによる有効性を証明した報告が多い。しかし、サイトカインは単純に拮抗すれば抗炎症効果が得られるものではないという報告や (22)、外傷後の時期によりサイトカインは予後の改善、悪化のいずれにも寄与すると報告しているものもある (44)。また外傷性脳損傷に対し、これまでに様々な薬剤の投与により予後を改善すべく研究が行われてきた。なかでも抗 NMDA 受容体拮抗薬やエダラボンなどに代表されるフリーラジカルスカベンジャーを用いた研究は第三層臨床試験まで行われたが、有効性は証明されなかった (34)。

本研究では P2X4 拮抗薬、P2X7 拮抗薬の投与により炎症性サイトカイン mRNA の発現低下が認められた。IL-1 β に関しては mRNA だけでなく ELISA を用いて定量し、mRNA の発現が実際の濃度とよく相関していることを確認した。外傷後にサイトカイン自体を拮抗

するのではなく、グリオトランスミッションを制御することによりサイトカインの分泌を抑制した *in vivo* の報告はこれまで存在しない。グリオトランスミッション制御によるサイトカインの分泌抑制の利点は、複数のサイトカインを同時に抑制可能なことと考えられた。P2X4 受容体と P2X7 受容体を拮抗した際の違いについて、サイトカインの発現量に差を認めた。P2X4 受容体はよりサイトカインの分泌にかかわっており、P2X4 受容体と P2X7 受容体拮抗薬を併用することによる相乗効果は認められなかった。また免疫染色においては、P2X4、P2X7 受容体拮抗薬、さらにはその 2 剤を投与した群ではそれぞれにマイクログリアの形態の変化や、細胞数の増加は認めなかったが、細胞数の計測は行っていないため、客観的にはその違いが提示できておらず、この点はさらなる検討が必要と考える。さらにマイクログリアの遊走に必須とされるケモカインである CXCL10 の発現も観察した (25)。CXCL10 の発現は P2X4、P2X7 受容体の拮抗により左右されなかったため、マイクログリアの遊走誘発因子は他にあると考えられた。Koizumi らはマイクログリアの遊走には P2Y12 受容体が重要な働きをしていると報告している。本研究では P2Y12 受容体は拮抗していないため CXCL10 の発現は影響されなかったものと考えられた (29)。また本研究では機能評価まで行っていないためこの結果が予後をどう変化させるかも不明である。本研究の結果から、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の治療に貢献できる可能性がある。

7-3 頭部外傷とグリオシス

頭部外傷後にグリオシスを生じることはよく知られている (12)。急性期に起こる GFAP の発現上昇は反応性グリア細胞の増加を反映するとされており、この一部が慢性期にグリオシスとして残存すると考えられている (47)。反応性グリアはグルタミン酸毒性の緩和 (42)、酸化ストレスからの保護 (45)、血液脳関門の保護 (6)、脳浮腫の軽減 (56)、炎症波及の抑制 (31、37、54) など急性期に生じるさまざまな因子から脳細胞を保護するように働く一方で、慢性期のグリオシスは神経再生の障壁になる (46)、てんかんの焦点となる (36) などの悪影響も報告されている。

本研究では外傷後にアストロサイトのマーカーである GFAP の上昇がみられ、これまでの報告通り急性期の反応性グリアの上昇を反映していると考えられた。しかし驚くべきことに P2X4、P2X7 受容体を拮抗すると GFAP の発現がさらに上昇した。これは P2X4、P2X7 受容体拮抗薬ではアストロサイトの発現は抑制されず、当初目的としたマイクログリアの活性化のみを抑制したと考えられた。この現象を *in vivo* 外傷モデルで報告した研究はこれまでにないが、P2X7 受容体ノックアウトマウスを用いて脳梗塞モデルを作製した Kaiser らの結果 (28) と類似しており、外傷においても虚血と同様の反応が生じることを

示している。おそらくこの GFAP のさらなる発現上昇は、損傷を受けたにもかかわらず活性化しないマイクログリアへのシグナルを強調したアストロサイトの動態を反映しているのであろうと推察された。これまで脳挫傷後の二次性脳損傷に対して様々な研究がなされてきた。しかしながら依然として有効な治療法は確立していない。本研究は二次性脳損傷における新たな治療の可能性を見出した点で、非常に意義の高いものであると考える。

8. 結論

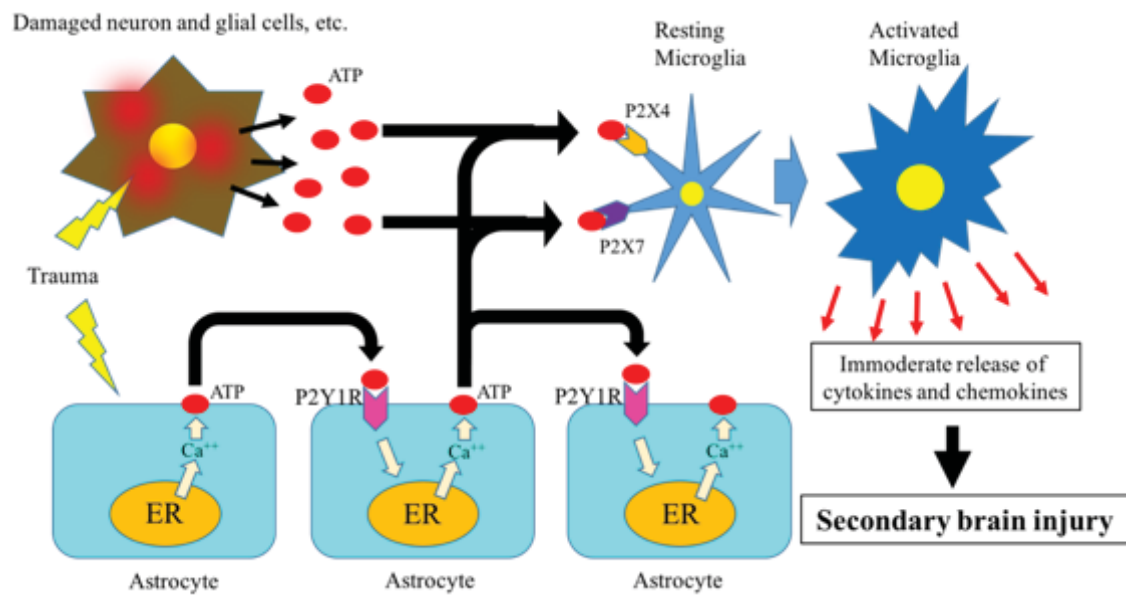
脳挫傷後の大脳皮質や海馬には広範囲に活性型マイクログリアを認めた。選択的 P2X4、P2X7 受容体拮抗薬は活性型マイクログリアの発現を抑制し、それに伴う炎症性サイトカインの分泌を抑制すると考えられた。また、P2X4、P2X7 受容体を拮抗すると反応性アストロサイトの増加を反映する GFAP のタンパク発現量が増加した。

9. 謝辞

本研究の遂行におきまして、懇切なご指導を賜りました日本大学医学部脳神経外科学系
主任教授の吉野篤緒先生、准教授の大島秀規先生に深く感謝いたします。

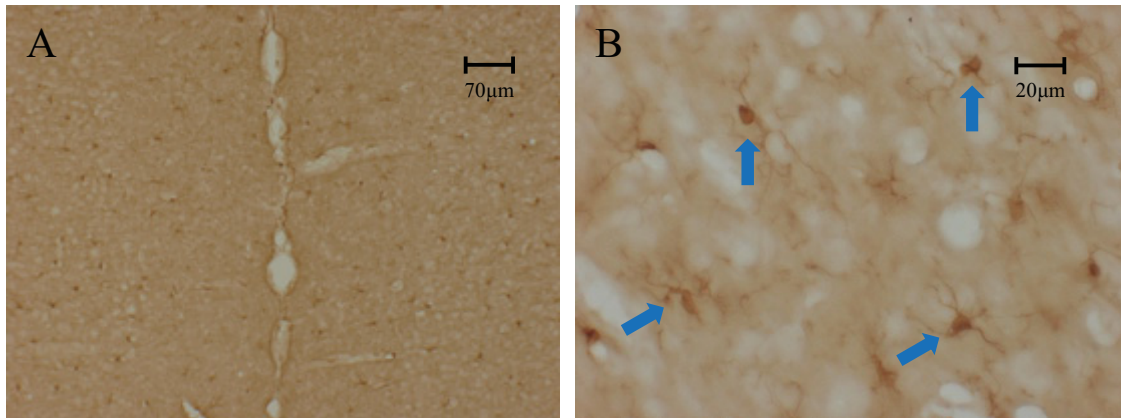
10. 図表

図1 グリोटランスミッションのシエーマ



ER: 小胞体。

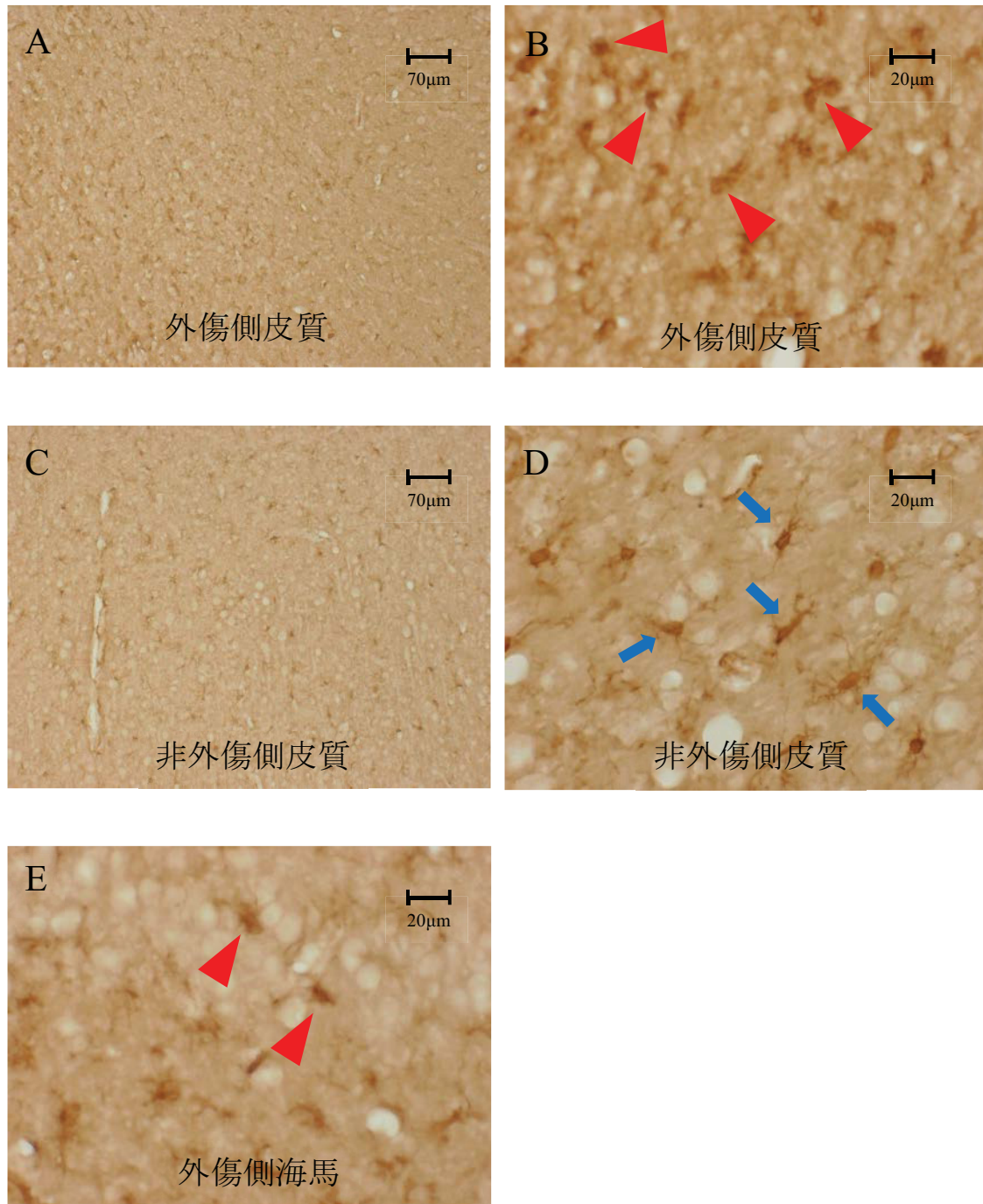
図2 Naïve 群における Iba-1 染色



Iba-1 染色を行った Naïve 群の脳縦裂を観察すると両側の脳半球にび漫性にマイクログリアが存在する (A)。強拡大で観察すると細胞体の周囲に突起を伸ばした状態の ramified 型のマイクログリアが観察される (B)。A : 75 倍、B : 300 倍。

↑ Ramified 型マイクログリア。

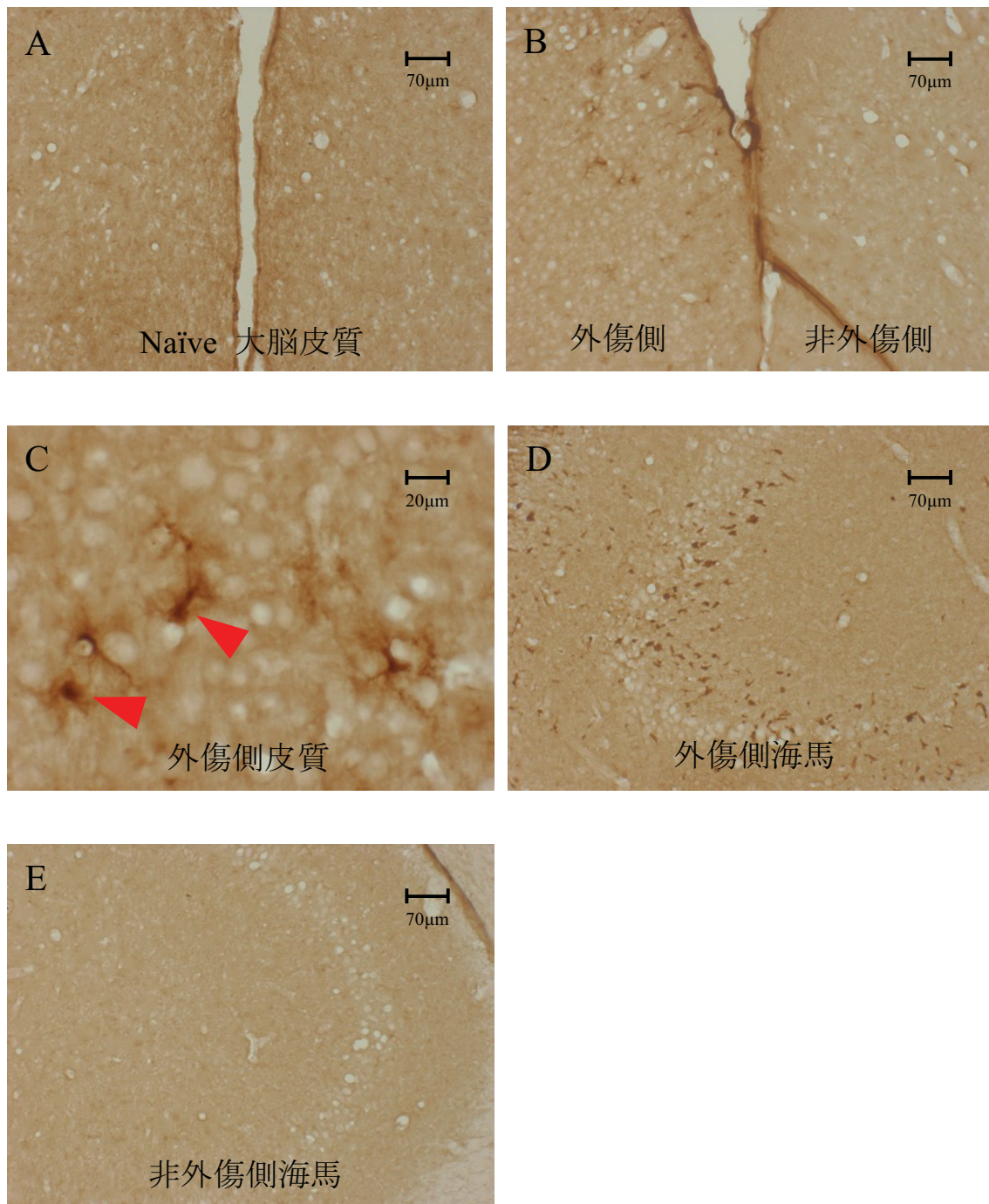
図3 CCI-Control 群における Iba-1 染色



外傷側の脳皮質では、ramified 型のマクログリアよりも細胞体の大きな円形の細胞を認め、amoeboid 型のマクログリアが発現している (A・B)。対側の非外傷側では、ほぼ全てのマクログリアは ramified 型である (C・D)。外傷側の海馬においても amoeboid 型のマクログリアが確認できる (E)。A・C : 75 倍、B・D・E : 300 倍。

▲ Amoeboid 型マクログリア、 ↑ Ramified 型マクログリア。

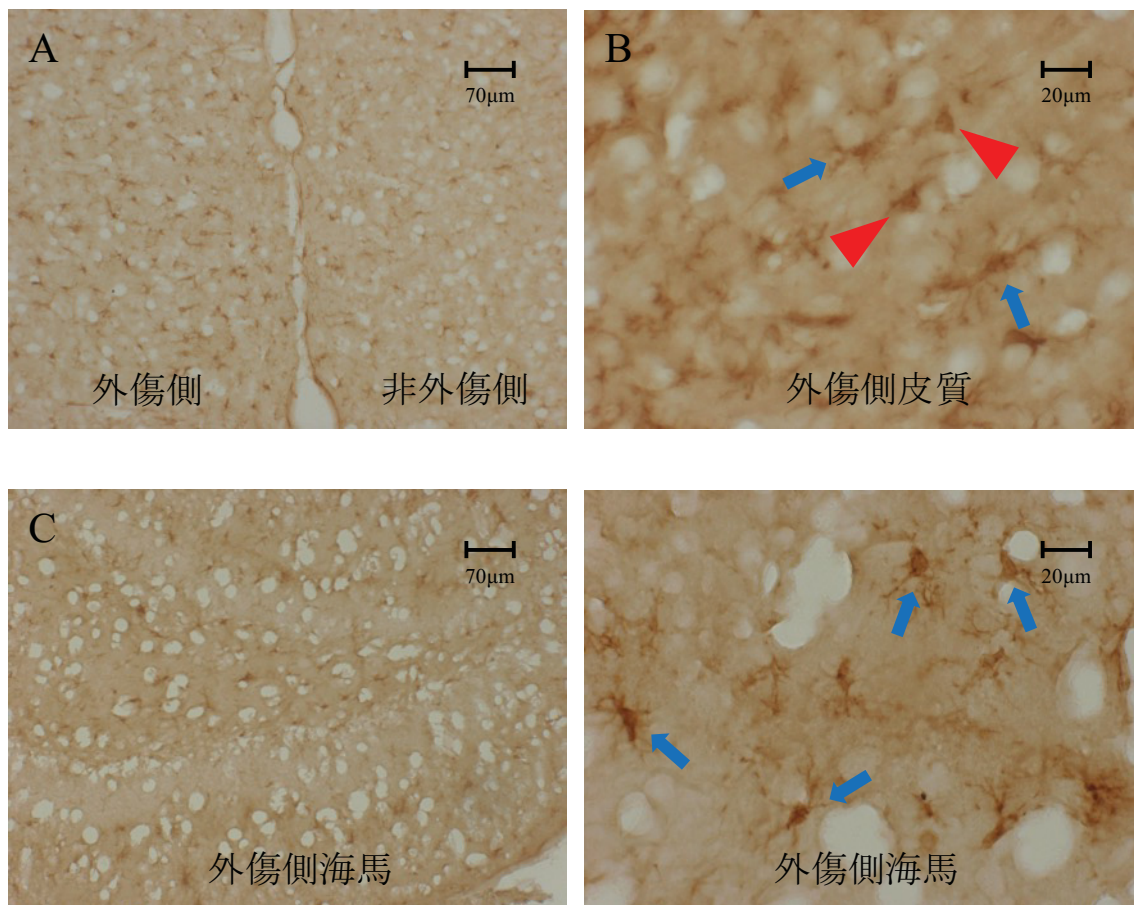
図4 Naïve 群および CCI-Control 群における Galectin-3 染色



Galectin-3 染色で Naïve 群 (A) および CCI-Control 群 (B・C) を染色し大脳縦裂を観察したところ、CCI-Control 群の外傷側のみで amoeboid 型のマクログリアを認めた。また同様に海馬を観察したところ、外傷側のみで amoeboid 型のマクログリアを認めた (D・E)。A・B・D・E : 75 倍、C : 300 倍。

▲ Amoeboid 型マクログリア。

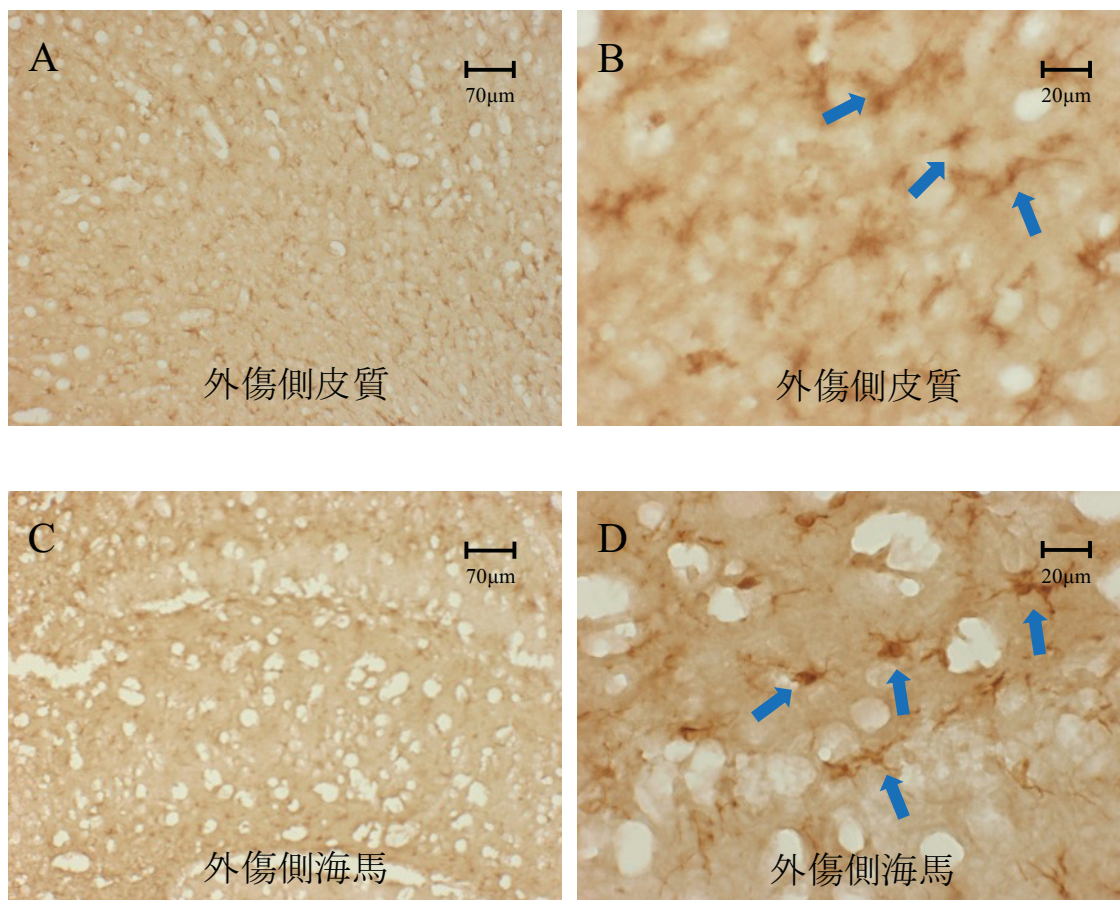
図5 CCI-5-BDBD 群における Iba-1 染色



CCI-5-BDBD 群でも外傷側にマクログリアが多く集積していた (A)。強拡大で観察すると、一部に amoeboid 型のマクログリアが観察されたが、そのほとんどが ramified 型のマクログリアであった (B)。外傷側の海馬の観察を行ったが、CCI-Control 群と比べるとマクログリアの集積は少なく、そのほとんどが ramified 型のマクログリアであった (C・D)。A・C : 75 倍、B・D : 300 倍。

▲ Amoeboid 型マクログリア、↑ Ramified 型マクログリア。

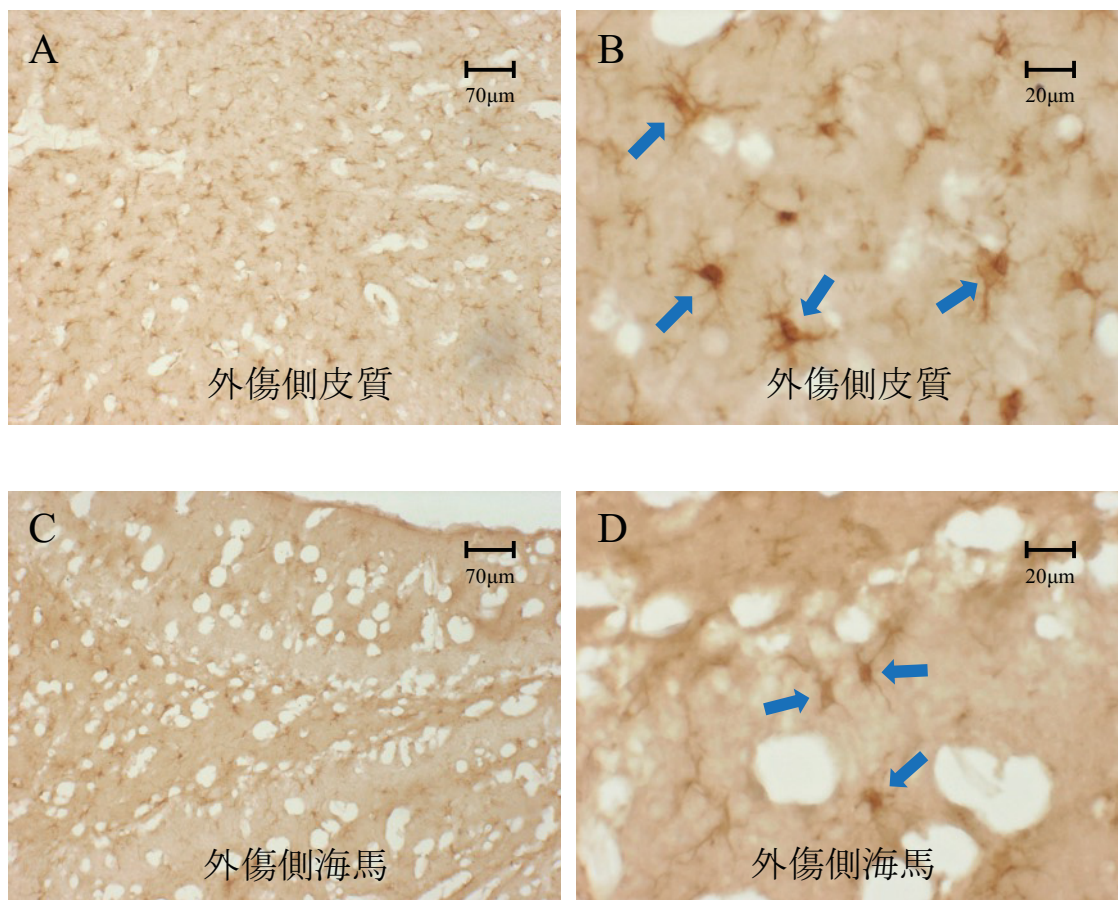
図6 CCI-AZ11645373 群における Iba-1 染色



CCI-AZ11645373 投与群でも外傷側には ramified 型のマクログリアが主に集積しており (A・B)、海馬においても amoeboid 型のマクログリアはほとんど存在しなかった (C・D)。A・C : 75 倍、B・D : 300 倍。

↑ Ramified 型マクログリア。

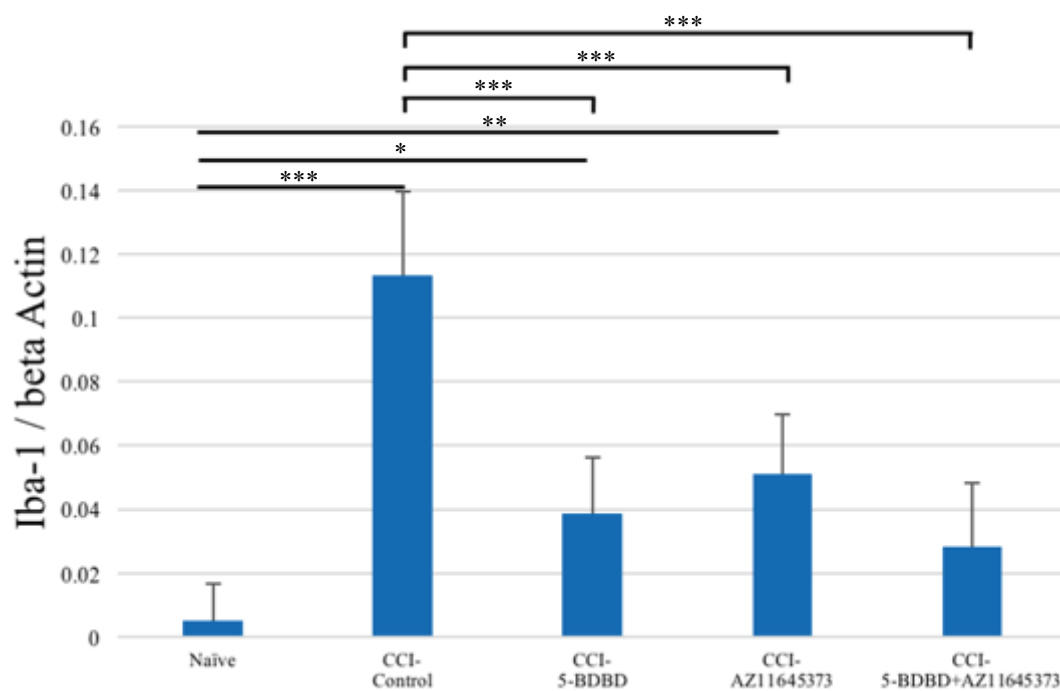
図7 CCI-5-BDBD+CCI-AZ11645373 群における Iba-1 染色



CCI-5-BDBD+CCI-AZ11645373 群でも同様に外傷側ではそのほとんどが ramified 型のマイクログリアであった (A・B)。同様に海馬においても ramified 型のマイクログリアのみ発現していた (C・D)。A・C : 75 倍、B・D : 300 倍。

↑ Ramified 型マイクログリア。

図 8 脳挫傷周囲大脳皮質における抗 Iba-1 抗体を用いた western blotting

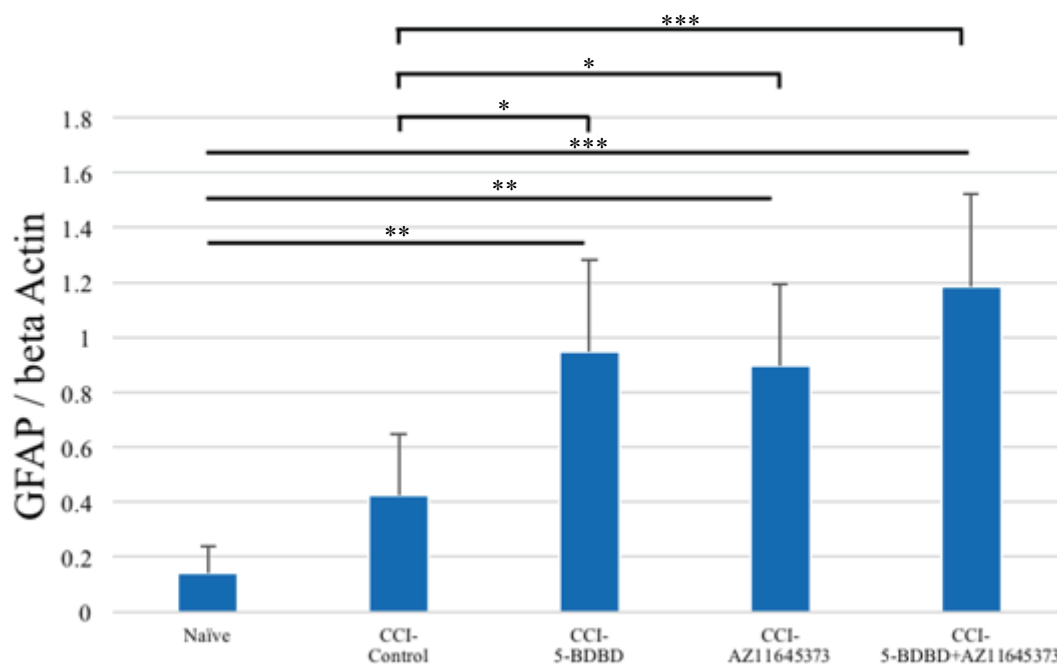


Naïve 群と比べると、CCI-Control 群、CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群では有意に Iba-1 の発現は上昇していた。また CCI-Control 群と比べ、CCI-5-BDBD、CCI-AZ11645373、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群では有意に Iba-1 の発現の低下を認めた。

*:p<0.05、**:p<0.01、***:p<0.001。

有意差に関して、Naïve 群との比較には直線、Control 群との比較には角括弧、薬剤同士の比較には両矢印を用いた。

図9 脳挫傷周囲大脳皮質における抗 GFAP 抗体を用いた western blotting

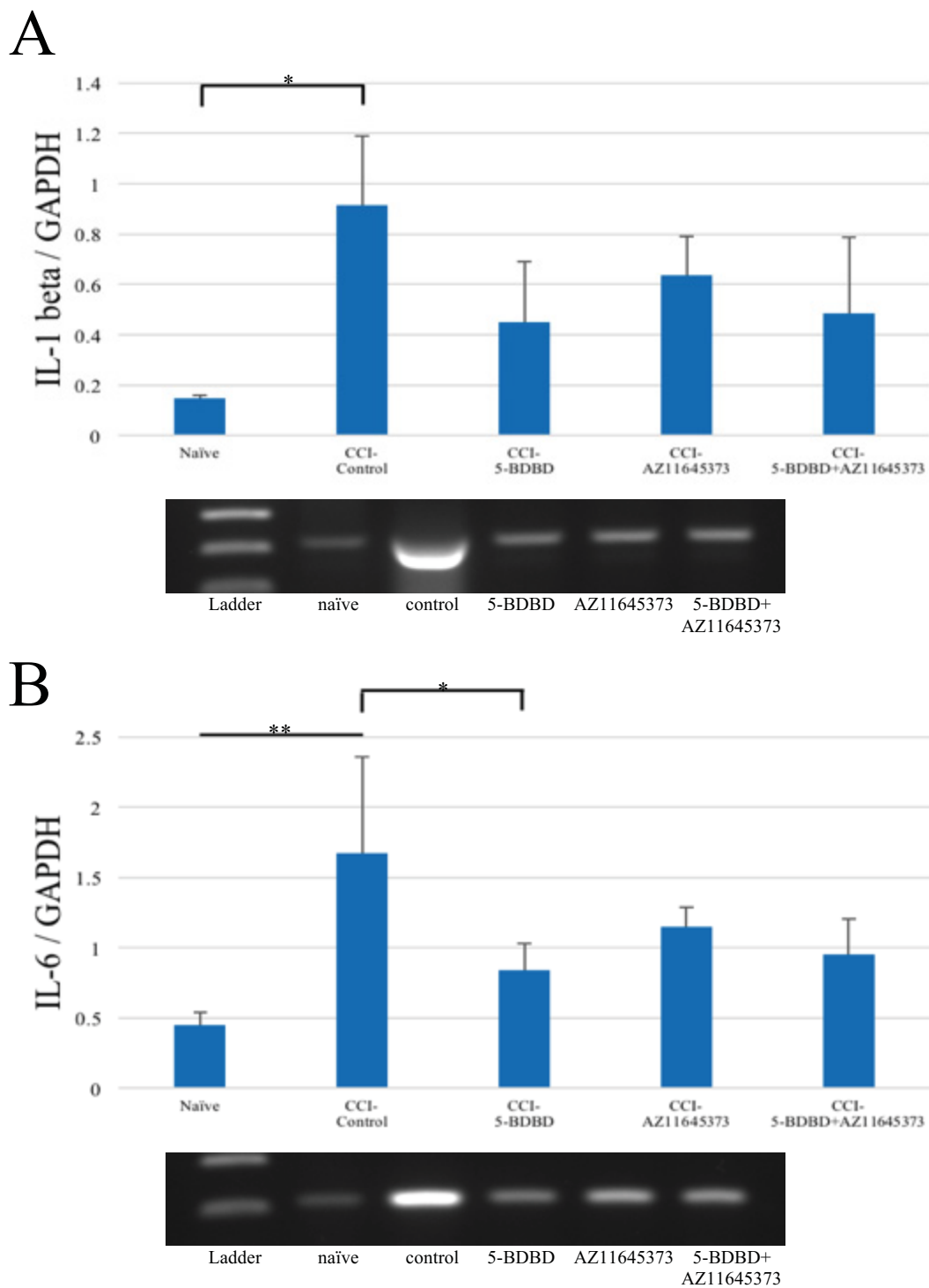


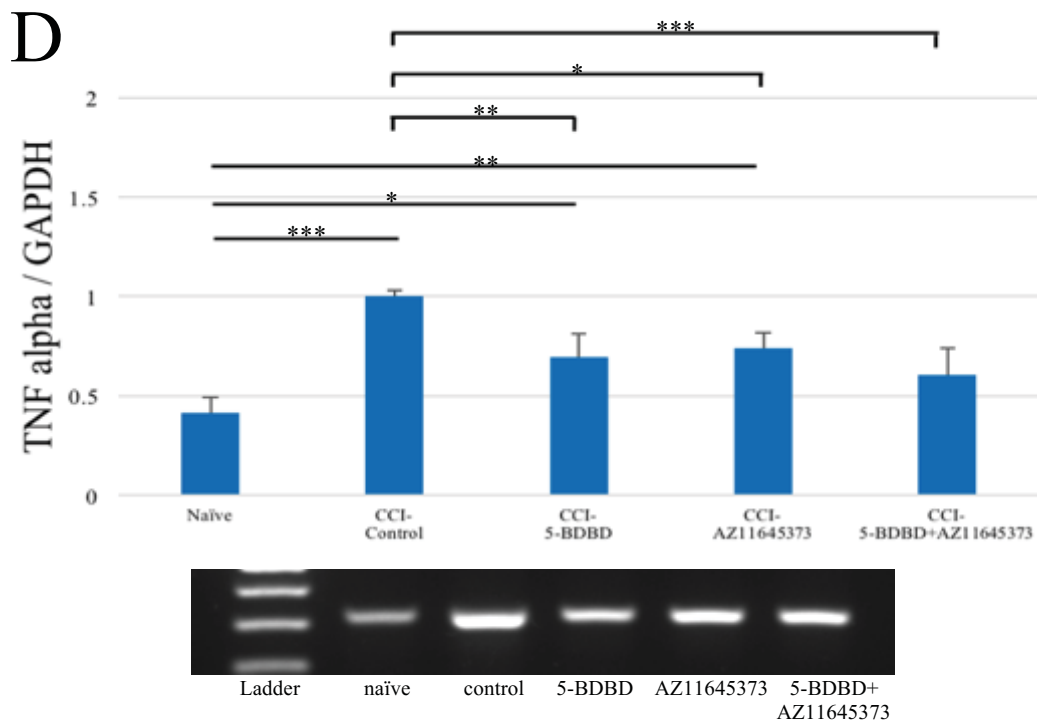
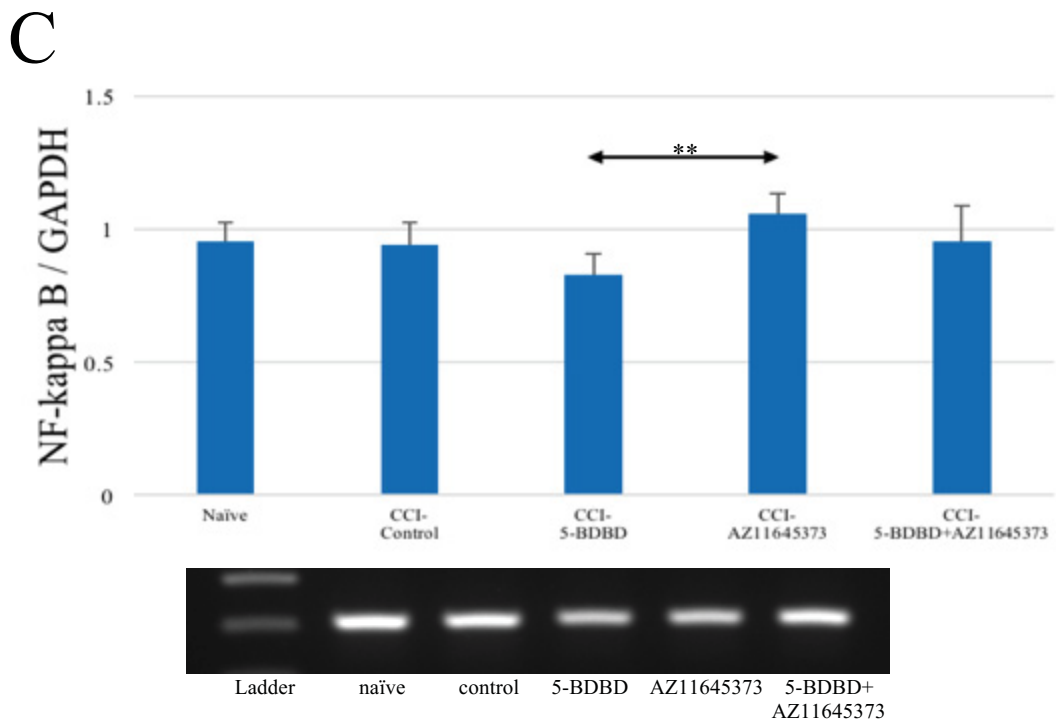
Naïve 群と比べると、CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群では有意に GFAP の発現は上昇していた。CCI-Control 群と比べて CCI-5-BDBD および CCI-AZ11645373 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群では有意に GFAP の発現は上昇を認めた。

*:p<0.05、**:p<0.01、***:p<0.001。

有意差に関して、Naïve 群との比較には直線、Control 群との比較には角括弧、薬剤同士の比較には両矢印を用いた。

図 10 脳挫傷周囲大脳皮質における炎症関連因子の発現



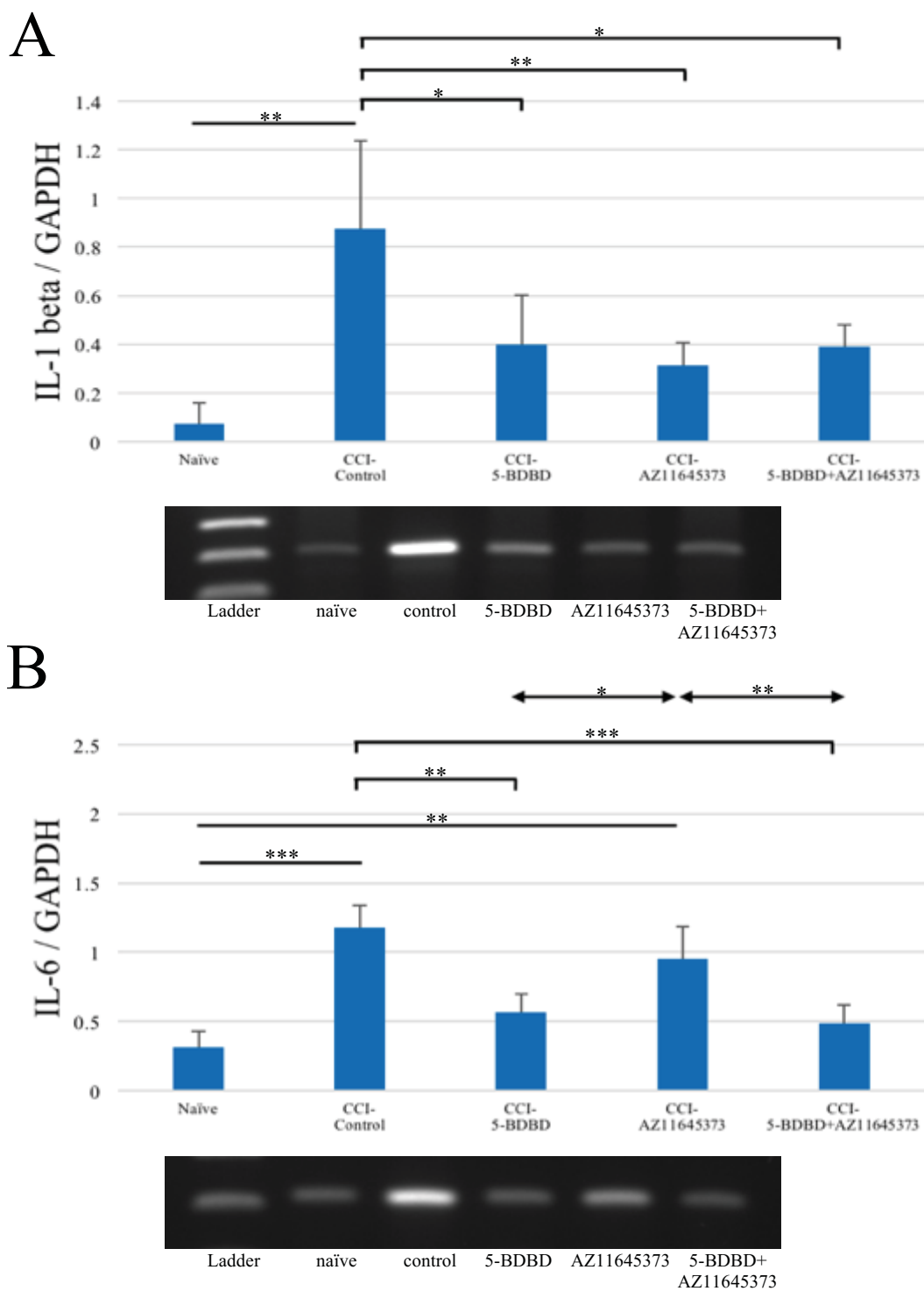


A: interleukin-1 beta (IL-1 β)、B: interleukin-6 (IL-6)、C: nuclear factor-kappa B (NF κ B)、D: tumor necrosis factor alpha (TNF α)

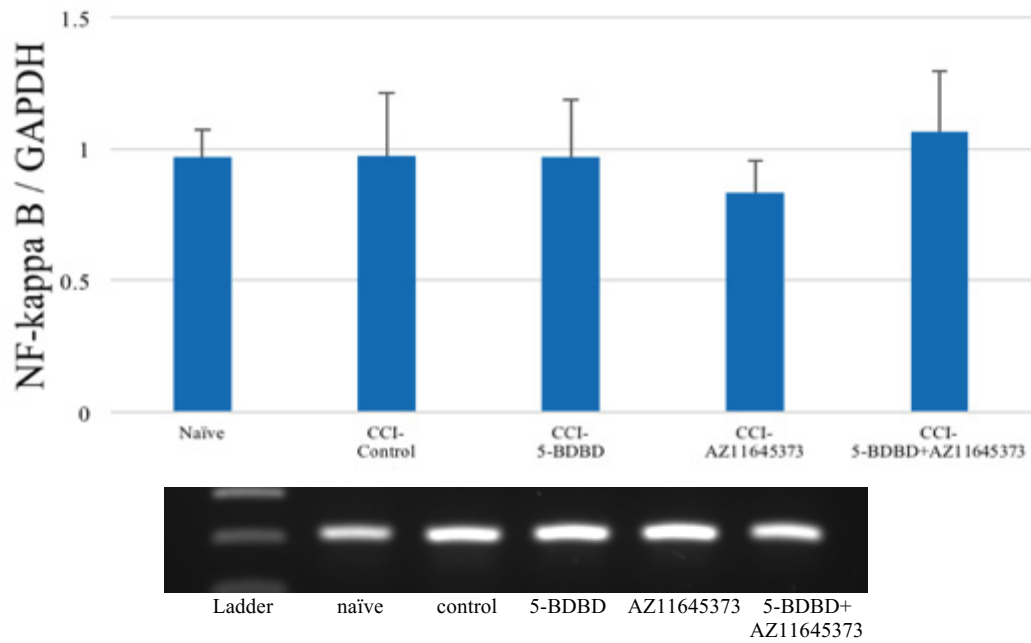
*:p<0.05、**:p<0.01、***:p<0.001。

有意差に関して、Naïve 群との比較には直線、Control 群との比較には角括弧、薬剤同士の比較には両矢印を用いた。

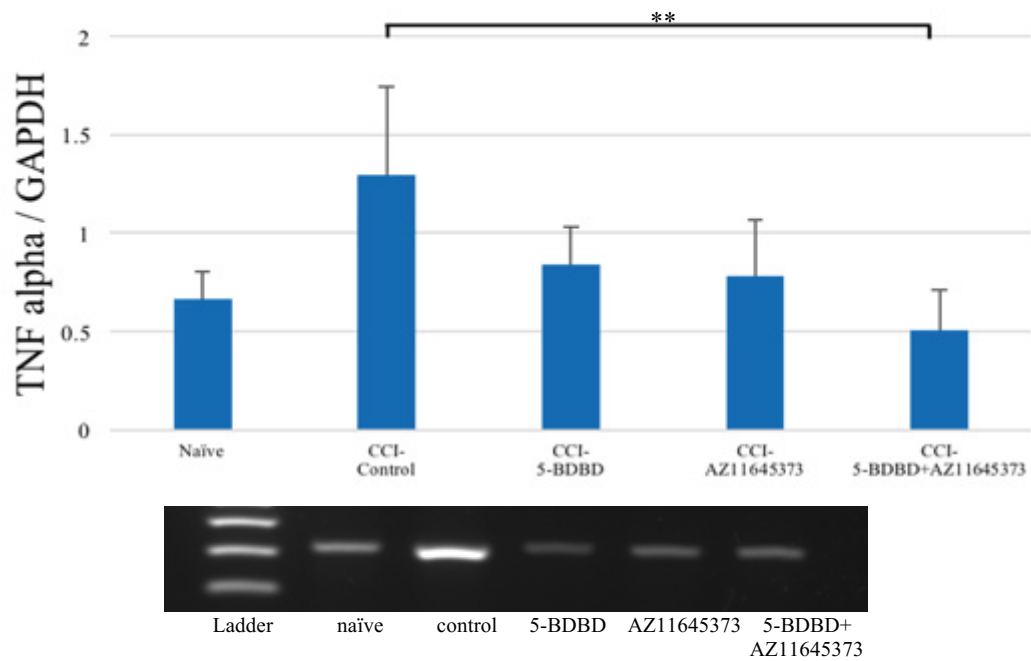
図 11 脳挫傷から遠い同側の脳皮質における炎症関連因子の発現



C



D

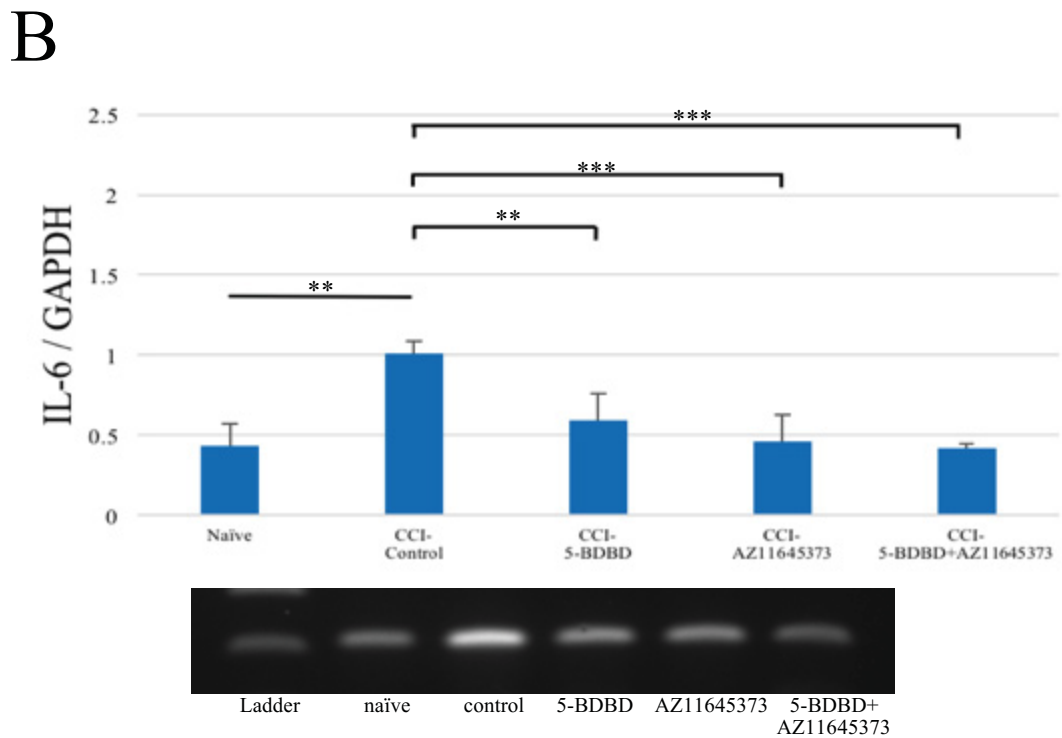
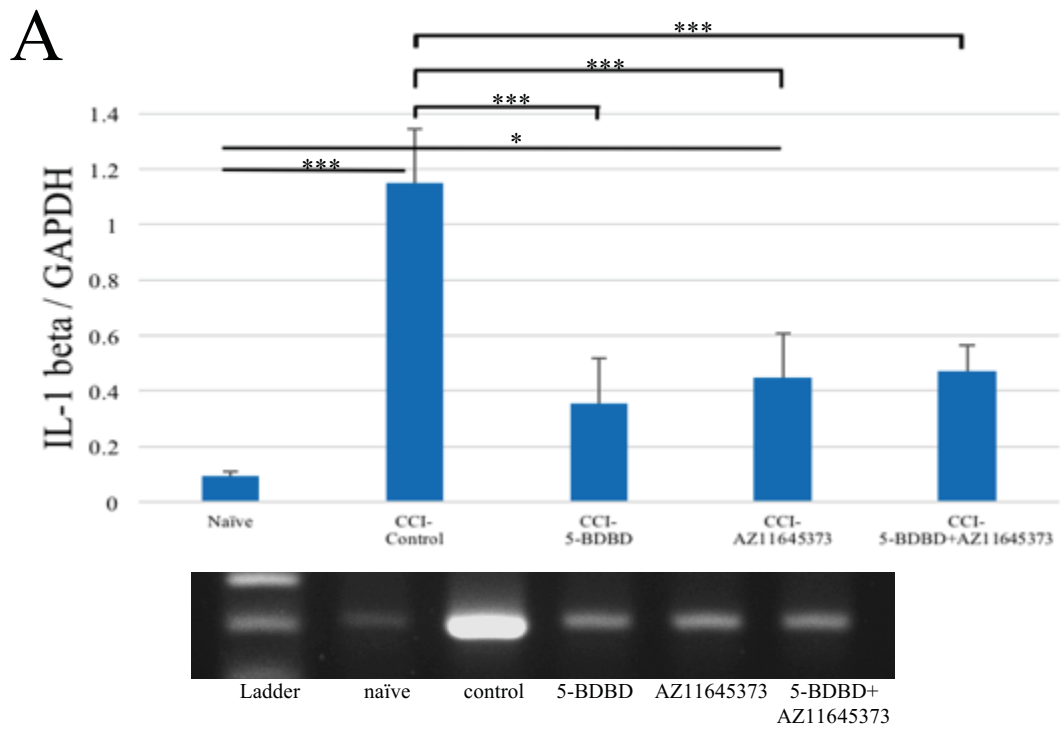


A: IL-1 β , B: IL-6, C: NF κ B, D: TNF α

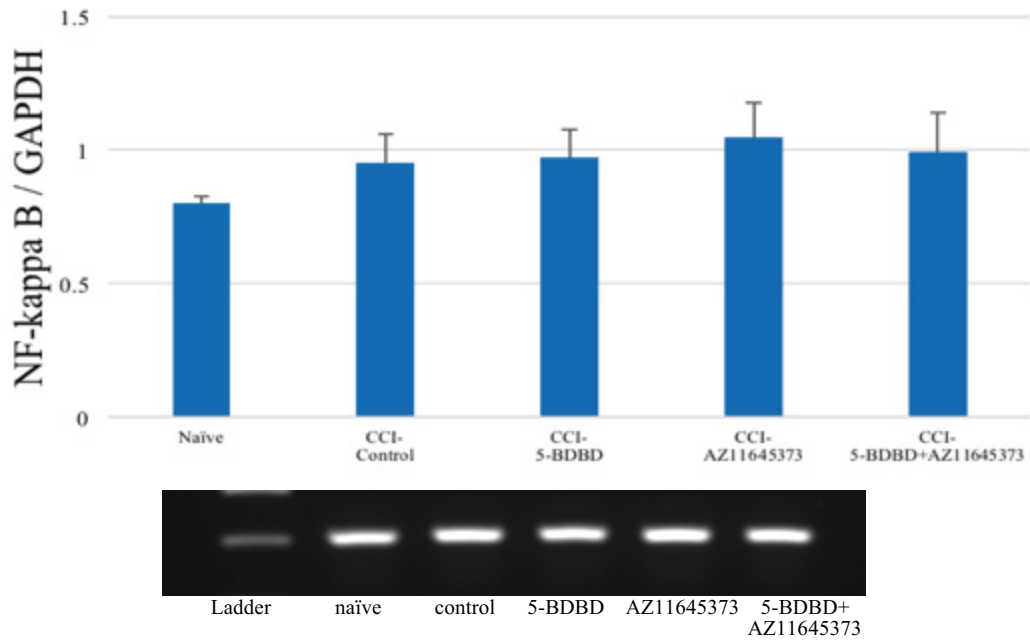
*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001。

有意差に関して、Naïve 群との比較には直線、Control 群との比較には角括弧、薬剤同士の比較には両矢印を用いた。

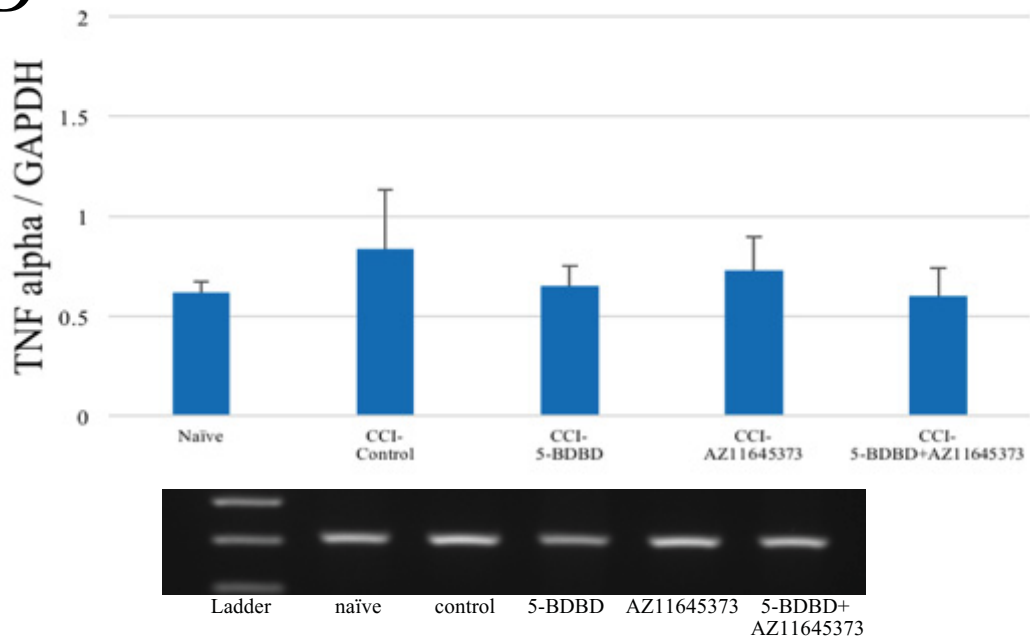
図 12 外傷側海馬における炎症関連因子の発現



C



D

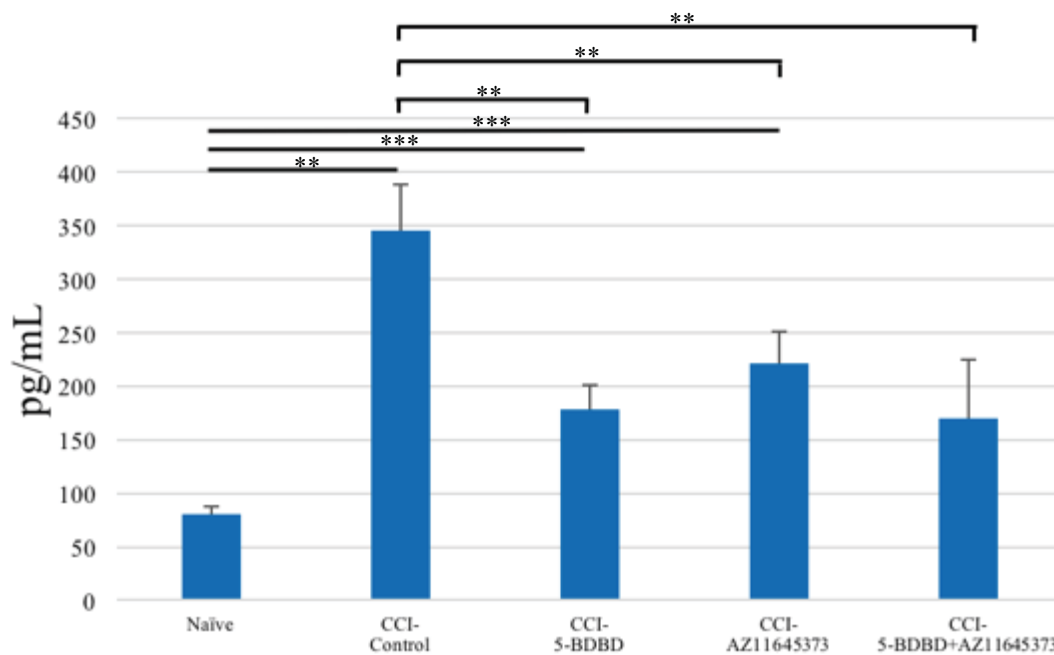


A: IL-1 β , B: IL-6, C: NF κ B, D: TNF α

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001。

有意差に関して、Naïve 群との比較には直線、Control 群との比較には角括弧、薬剤同士の比較には両矢印を用いた。

図 13 ELISA 法による脳挫傷周囲大脳皮質における IL-1 β の定量



Naïve 群と比べると、IL-1 β は CCI-Control 群、CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群で有意に増加した。また IL-1 β は CCI-Control 群と比べると、CCI-5-BDBD 群、CCI-AZ11645373 群、CCI-5-BDBD+AZ11645373 群で有意に低下していた。

: $p < 0.01$ 、*: $p < 0.001$ 。

有意差に関して、Naïve 群との比較には直線、Control 群との比較には角括弧、薬剤同士の比較には両矢印を用いた。

表 1 本研究に使用した外傷モデルの内訳

	組織染色用	Western blotting、 PCR、ELISA 用
Naïve 群	n=2	n=2
CCI 群	n=2	
CCI-DMSO 群		n=5
CCI-5-BDBD 群	n=2	n=7
CCI-AZ11645373 群	n=2	n=7
CCI-5-BDBD+AZ11645373 群	n=2	n=6

表2 本研究に使用したプライマーとその条件

	Forward	Reverse	AT	Cy
IL-1 β	GGATGATGACGACCTGC	CTTGTTGGCTTATGTTCTG	54	32
IL-6	AAGTCGGAGGCTTAATTACACATGT	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	62	32
NF- κ B	ACGATCTGTTTCCCCTCATC	TGCTTCTCTCCCCAGGAATA	55	32
TNF α	CTTATCTACTCCCAGGTTCTCTTCAA	GAGACTCCTCCCAGGTACATGG	57	31
CXCL-10	CCGCATGTTGAGATCATTGCC	TCTTTGGCTCACCGCTTCA	66	33
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	63	23

AT: Annealing Temperature、Cy: Cycle。

11. 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. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Feb;24(2):133-50.
3. Bartlett R, Yerbury JJ, Sluyter R. P2X7 receptor activation induces reactive oxygen species formation and cell death in murine EOC13 microglia. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:271813.
4. Bhandare AM, Kapoor K, Powell KL, Braine E, Casillas-Espinosa P, O'Brien TJ, Farnham MMJ, Pilowsky PM. Inhibition of microglial activation with minocycline at the intrathecal level attenuates sympathoexcitatory and proarrhythmogenic changes in rats with chronic temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 2017 May 14;350:23-38.
5. Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science.* 1992 Oct 9;258(5080):292-5.
6. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron.* 1999 Jun;23(2):297-308.
7. Goodman JC, Cherian L, Bryan RM Jr, Robertson CS. Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. *J Neurotrauma.* 1994 Oct;11(5):587-97.
8. 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.
9. Dalgard CL, Cole JT, Kean WS, Lucky JJ, Sukumar G, McMullen DC, Pollard HB, Watson WD. The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. *Front Mol Neurosci.* 2012 Jan 25;5:6.

10. Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia*. 2010 Apr 15;58(6):730-40.
11. Ekmark-Lewén S, Flygt J, Fridgeirsdottir GA, Kiwanuka O, Hånell A, Meyerson BJ, Mir AK, Gram H, Lewén A, Clausen F, Hillered L, Marklund N. Diffuse traumatic axonal injury in mice induces complex behavioural alterations that are normalized by neutralization of interleukin-1 β . *Eur J Neurosci*. 2016 Apr;43(8):1016-33.
12. Fehily B, Fitzgerald M. Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage. *Cell Transplant*. 2017 Jul;26(7):1131-55.
13. Gagne JJ, Power MC. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology*. 2010 Mar 23;74(12):995-1002.
14. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2006 Feb;21(2):404-12.
15. 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.
16. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):918-34.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev.* 2006 Jul;86(3):1009-31.
21. Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Mar;2(3):185-93.
22. Helmy A, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Pickard JD, Menon DK, Hutchinson PJ. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist promotes M1 microglia biased cytokines and chemokines following human traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Aug;36(8):1434-48.
23. Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y, Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, Koizumi S. Astrocyte-mediated ischemic tolerance. *J Neurosci.* 2015 Mar 4;35(9):3794-805.
24. Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol.* 2003 Dec;106(6):518-26.
25. Israelsson C, Bengtsson H, Lobell A, Nilsson LN, Kylberg A, Isaksson M, Wootz H, Lannfelt L, Kullander K, Hillered L, Ebendal T. Appearance of Cxcl10-expressing cell clusters is common for traumatic brain injury and neurodegenerative disorders. *Eur J Neurosci.* 2010 Mar;31(5):852-63.
26. Jara JH, Genç B, Stanford MJ, Pytel P, Roos RP, Weintraub S, Mesulam MM, Bigio EH, Miller RJ, Özdinler PH. Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *J Neuroinflammation.* 2017 Jun 26;14(1):129.
27. 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.

28. Kaiser M, Penk A, Franke H, Krügel U, Nörenberg W, Huster D, Schaefer M. Lack of functional P2X7 receptor aggravates brain edema development after middle cerebral artery occlusion. *Purinergic Signal*. 2016 Sep;12(3):453-63.
29. 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.
30. Li F, Wang L, Li JW, Gong M, He L, Feng R, Dai Z, Li SQ. Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci*. 2011 Nov 4;12:111.
31. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Maragakis N, Nilsson M, Pekny M. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Mar;28(3):468-81.
32. Lucin KM, O'Brien CE, Bieri G, Czirr E, Mosher KI, Abbey RJ, Mastroeni DF, Rogers J, Spencer B, Masliah E, Wyss-Coray T. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2013 Sep 4;79(5):873-86.
33. McGeer PL, McGeer EG. History of innate immunity in neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol*. 2011 Dec 2;2:77.
34. Narayan R.K. et al. Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma*. 2002;19(5):503–557.
35. Nishida K, Nakatani T, Ohishi A, Okuda H, Higashi Y, Matsuo T, Fujimoto S, Nagasawa K. Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death. *J Neurochem*. 2012 Sep;122(6):1118-28.
36. Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci*. 2008 Mar 26;28(13):3264-76.

37. Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1151-9.
38. Ozaki T, Muramatsu R, Sasai M, Yamamoto M, Kubota Y, Fujinaka T, Yoshimine T, Yamashita T. The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning. *Sci Rep*. 2016 May 13;6:25893.
39. Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 2007 Aug 24;317(5841):1083-6.
40. Perez-Polo JR, Rea HC, Johnson KM, Parsley MA, Unabia GC, Xu GY, Prough D, DeWitt DS, Paulucci-Holthausen AA, Werrbach-Perez K, Hulsebosch CE. Inflammatory cytokine receptor blockade in a rodent model of mild traumatic brain injury. *J Neurosci Res*. 2016 Jan;94(1):27-3
41. Puchałowicz K, Tarnowski M, Baranowska-Bosiacka I, Chlubek D, Dziedziejko V. P2X and P2Y receptors—role in the pathophysiology of the nervous system. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 18;15(12):23672-704.
42. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 1996 Mar;16(3):675-86.
43. Ryu, J.K., McLarnon, J.G. Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2007 19 (17), 1715-19.
44. Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, Marino MW, McIntosh TK. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8721-6.
45. Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently

- protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci*. 2003 Apr 15;23(8):3394-406.
46. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Feb;5(2):146-56.
 47. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan;119(1):7-35.
 48. 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.
 49. Subramaniam SR, Federoff HJ. Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2017 Jun 8;9:176.
 50. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P. Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*. 2007 Jul;130(Pt 7):1759-66.
 51. Tan J, Town T, Paris D, Mori T, Suo Z, Crawford F, Mattson MP, Flavell RA, Mullan M. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science*. 1999 Dec 17;286(5448):2352-5.
 52. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003 Aug 14;424(6950):778-83.
 53. Ulmann, L., Levavasseur, F., Avignone, E., Peyroutou, R., Hirbec, H., Audinat, E., Rassendren, F. Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia*. 2013. 61, 1306-19.
 54. Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*. 2009 Sep 16;29(37):11511-22.

55. Wang H, Guo W, Liu H, Zeng R, Lu M, Chen Z, Xiao Q. Inhibition of inflammatory mediator release from microglia can treat ischemic/hypoxic brain injury. *Neural Regen Res.* 2013 May 5;8(13):1157-68.
56. Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(190):159-70.
57. 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.

13. 研究業績

小林真人

I. 発表 ①一般発表 3 (筆頭 3 / 共同 0)

②特別発表 なし

II. 論文 ①原著論文 なし

②症例報告 なし

③総説 なし

III. 著書 なし

I. 発表

① 一般発表

1. 小林真人、前田剛、古川雄都、熊川貴大、田戸雅弘、四條克倫、茂呂修啓、福島匡道、吉野篤緒：頭部外傷による高次脳機能障害と意識障害の関連：日本頭部外傷データバンクプロジェクト 2009 から、日本脳神経外科学会第 75 回学術総会，福岡，2016 年 10 月
2. 小林真人、神谷光樹、高峰裕介、四條克倫、茂呂修啓、福島匡道、前田剛、川又達朗、吉野篤緒：頭部外傷データバンクにおける急性硬膜外血腫の予後因子について，第 40 回日本脳神経外傷学会，東京，2017 年 3 月
3. Kobayashi Masato, Furukawa Yuto, Kumagawa Takahiro, Shijo Katsunori, Moro Nobuhiro, Fukushima Masamichi, Maeda Takeshi, Yoshino Atsuo : P2X4 and P2X7 receptor blocker in a rat model of cerebral contusion injury, Neuroscience 2017, Washington, D.C., 2017 年 11 月