

ラット脳挫傷モデルにおける MRS2179 および  
Pyrazol-3 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

高峰 裕介

修了年 2019 年

指導教員 吉野 篤緒

## 目次

1.	概要	1
2.	略語表	3
3.	緒言	4
4.	材料と方法	6
4.1	脳挫傷モデル	6
4.2	組織染色	7
4.3	Western blotting	7
4.4	Polymearase chain reaction	8
4.5	グリオース体積の測定	8
4.6	残存脳体積の測定	9
4.7	統計解析	9
5.	動物取り扱いおよび実験における倫理的配慮	10
6.	結果	11
6.1	アストログリアの免疫染色	11
6.2	アストログリアの組織染色	11
6.3	Glial fibrillary acidic protein の定量	11
6.4	グリオース体積	11
6.5	残存脳体積	12
6.6	P2Y1 受容体の発現定性	12
6.7	Transient receptor potential canonical 3 チャンネルの発現定性	12
7.	考察	13
7.1	脳挫傷とグリオース	13
7.2	脳損傷と P2Y1 受容体	14
7.3	脳損傷と Transient receptor potential canonical 3	14
7.4	まとめ	15
8.	結論	16
9.	謝辞	17
10.	図表	18
11.	引用文献	30
12.	研究業績	34

## 1 概要

頭部外傷や脳梗塞などによる脳損傷の急性期にはアストロサイトとマイクログリアが活性化し外的刺激に対処している。アストロサイトは刺激に応じて肥大化し、その活性化は形態学的な変化以外には、細胞内カルシウム濃度の上昇と、glial fibrillary acidic protein (GFAP) や S100B などのアストロサイト特有抗原の発現上昇としてとらえることが可能である。アストロサイトが活性化のために細胞内カルシウム濃度を上昇させる機序にはいくつかあるが、最も主要な機序は P2 受容体を介したものである。しかし頭部外傷などの出血性疾患では特に transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) チャンネルを介した細胞外からのカルシウムの流入も大きく関与していると考えられている。

外傷などの外的刺激がアストロサイトに加わるとアストロサイトは活性化し、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) を細胞外液中に放出する。この ATP はパラクリンにより次々と隣接するアストロサイトの膜上の P2 受容体に結合する。P2 受容体からのシグナルは細胞内小胞体に伝わり、大量のカルシウムが細胞内に放出される。するとこのアストロサイトも活性化され 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し外的刺激に対応するのである。この連鎖反応を培養アストロサイトでカルシウムイメージングを用いて観察すると、アストロサイトが次々同心円状に活性化していく現象が観察でき、これはカルシウムウェーブと呼ばれている。カルシウムウェーブの伝達には P2 受容体のうちアストロサイトの細胞膜上に存在する P2Y1 受容体が大きく貢献している。

また頭部外傷などの出血性疾患では血管内から血管外へ血液に由来する因子が漏出する。その中でも凝固に関与する酵素であるトロンビンの漏出はアストロサイトに大きな影響を及ぼすことがわかっている。トロンビンはアストロサイトの細胞膜に存在するトロンビン受容体に結合すると TRPC3 チャンネルを刺激し、カルシウムの細胞内流入を促す。これにより細胞内カルシウム濃度が上昇したアストロサイトも活性化することがわかっている。さらに TRPC3 チャンネルを経由したアストロサイトの活性化はグリオシスを引き起こすことが証明されている。

グリオシスは頭部外傷や脳卒中、脳腫瘍、放射線照射などにより引き起こされるグリア細胞の異常増殖であり、これらの病態の慢性期にみられるグリア細胞による瘢痕である。その詳細な発生メカニズムは解明されていないが、グリオシスは周囲組織を破壊し神経細胞の回復の妨げ、てんかん発作の焦点になるとされ、神経機能の回復の妨げになると考えられている。しかし一方では病巣からのなんらかの細胞障害性因子が正常脳に波及するのを防ぐ防波堤のような働きをしているのではないとも考えられている。グリオシスは組織学的検討以外にも、GFAP や S100B の発現が上昇することで証明可能である。

本研究では、頭部外傷後急性期のアストロサイトの活性化を抑制することにより、慢性期のグリオシスの発生を制御できるという仮説を検証した。頭部外傷後にアストロサイトの活性化にかかわる二つの重要な経路であるカルシウムウェーブの伝達と TRPC3 チャネルを介したカルシウムの細胞内流入を拮抗し、慢性期のグリオシス抑制効果を検討した。カルシウムウェーブの拮抗にはカルシウムウェーブが伝達されるうえで不可欠な P2Y1 受容体の拮抗薬である MRS2179 を用い、細胞膜上のカルシウムチャネルの阻害には選択的 TRPC3 チャネル阻害薬である Pyrazol-3 (Pyr3) を用い、その効果を検討した。

脳挫傷モデルとしてラット cortical contusion injury (CCI) モデルを作製した。脳挫傷直後から浸透圧ポンプを用いコントロールとしての dimethyl sulfoxide (CCI-Control 群)、MRS2179 (CCI-MRS2179 群)、Pyr3 (CCI-Pyr3 群) を挫傷組織中心部に持続投与した。正常対照群として処置を行っていない Naïve 群と比較した。神経組織の一般的な Nissl 染色、アストロサイトに対する免疫染色、グリオシス観察のため Holzer 染色とリンタングステン酸・ヘマトキシリン染色を行った。アストロサイトの発現定量のために Western blotting、P2Y1 受容体および TRPC3 チャネルの発現定性のため Polymerase chain reaction を行い MRS2179 および Pyr3 の効果を検討した。

脳挫傷 28 日後の組織に抗 GFAP 抗体を用いてアストロサイトの免疫染色を行うと、Naïve 脳と比較し CCI-Control 群のアストロサイトは大腦皮質を中心に肥大化し、その密度も高くなっていることが確認された。しかし CCI-MRS2179 群および CCI-Pyr3 群では陽性細胞数、細胞体の肥大化はともに抑制されていた。これらの陽性細胞を定量化するために抗 GFAP 抗体を用いた Western blotting を行った。外傷 3 日後には CCI-Control 群の GFAP 発現量は Naïve 群と比較して有意に高い値を示したが、CCI-Pyr3 群では CCI-Control 群と比較して有意に低い値を示した。外傷 28 日後には CCI-Control 群の GFAP 発現量はさらに増大したが、CCI-MRS2179 群、CCI-Pyr3 群では CCI-Control 群と比較して有意に低い値を示した。CCI を与えたすべての群で脳挫傷組織周囲に Holzer 染色で陽性の細胞が認められた。これらはリンタングステン酸・ヘマトキシリン染色では深青色に染色され、グリオシスであると考えられた。グリオシスの程度を比較するため連続切片を用いて外傷 28 日後のグリオシス体積を測定した。CCI-Control 群では非外傷側と比較し著明なグリオシスの増加を認めたが、CCI-MRS2179 群、CCI-Pyr3 群の外傷側では CCI-Control 群と比較し有意にグリオシス体積の抑制を認めた。

ラット脳挫傷モデル急性期の MRS2179、Pyr3 の投与は、慢性期のグリオシスを抑制した。今後グリオシスを制御することにより、外傷後の神経再生の促進やてんかんの予防や治療が可能になると考えられた。

## 2 略語表

ANOVA: analysis of variance

ATP: adenosine triphosphate

CCI: cortical contusion injury

DMSO: dimethyl sulfoxide

GAPDH: glycerol-3-phosphate dehydrogenase

GFAP: glial fibrillary acidic protein

mRNA: messenger ribonucleic acid

PBS: phosphate buffer saline

PCR: polymerase chain reaction

Pyr3: pyrazol-3

TRPC3: transient receptor potential canonical 3

### 3 緒言

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) 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 P2Y1 受容体が大きく貢献していることが分かっている。図 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[3]。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のである。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[4]、脳血流の調整[5, 6]、記憶の形成[7]、マイクログリアの活性化[8-10]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。図 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[11]やグリオシス[12]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) チャネルという細胞膜上のカルシウムチャネルの働きに着目し、*in vitro* の研究において TRPC3 チャ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[13]。

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[11]。急性期のアストロサイトの活性化はグルタミン毒性の緩和[14]、酸化ストレスからの保護[15]、血液脳関門の保護[16]、脳浮腫の軽減[17]、炎症反応の抑制[18]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

astrocytesは慢性期に異常増殖し線維性変化したgliosisとして残存し[11]、神経再生の妨げ[19]、てんかんの焦点[20]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。

本研究では脳挫傷急性期に選択的 P2Y1 受容体拮抗薬の MRS2179 を投与しastrocytesのカルシウムウェーブを抑制することで、慢性期のgliosisを抑制可能か検討する。また、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astrocytes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gliosisを抑制可能か検討する。gliosisの制御が可能であれば、今後gliosisの抑制を通じた治療戦略が展開可能であると考えている。

## 4 材料と方法

### 4-1 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、定位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。イソフルレン 4%で吸入麻酔を導入し、十分な深度が得られた後、イヤーパ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さず強度とされている[21]。ラットはランダムに表 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き、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  $\mu$ l/h の速度で薬剤を投与した。骨窓に人工硬膜と吸収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[22]。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[23]。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[24, 25]。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[26, 27]。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[26, 27]。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%イソフルレ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。氷上で超音波破碎機を用いて検体を破碎し、毎分15,000回転で15分遠心分離し上清を-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日後に塩酸メドトミジン 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。

#### 4-2 組織染色

凍結脳組織をクライオスタットにて20 μmに薄切し、500 μm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。

リタングステン酸・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、リタングステン酸・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。

#### 4-3 Western blotting

検体を 20 倍希釈し、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 (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  $\mu$ 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 ルビータンパク質ブロット染色 (1703127: Bio-Rad, USA) を行った。

#### 4-4 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。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。

#### 4-5 グリオーシス体積の測定

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シス体積を求めた。非外傷側の総体積も同様に測定しコントロールとした。

#### 4-6 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。

#### 4-7 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±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

動物の取り扱いと実験は、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 時を暗記として 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 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 (図 3)。Naïve ラットの脳皮質の陽性細胞の大きさは約 40  $\mu\text{m}$  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 (図 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 (図 4B)。CCI-MRS2179 群、CCI-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 (図 4C・D)。

### 6-2 アストロサイトの組織染色

Holzer 染色では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 (図 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 (図 5B・C)。

リンタングステン酸・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た (図 6)。これらは線維状の形態をしており、深青色に染色されていた。

### 6-3 GFAP の定量

アストロサイトの発現を定量化するため、脳挫傷周囲の脳皮質を検体として抗 GFAP 抗体を用いて Western blotting を行った (図 7A・B)。Naïve 群の値は  $312.6 \pm 101.9$  であった。外傷 3 日後では CCI-Control 群の値が  $595.7 \pm 150.4$  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  $458 \pm 333.4$  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  $347.5 \pm 227.8$  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  $1,099.2 \pm 102.9$ 、 $846.5 \pm 162.3$ 、 $889.7 \pm 371.2$  であった。また CCI-MRS2179 群 ( $p=0.010$ )、CCI-Pyr3 群 ( $p=0.044$ ) では CCI-Control 群と比較して有意に発現が抑制された。

### 6-4 グリオーシス体積

脳損傷後のグリオーシ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シス体積を外傷側、非外傷側で測定した (図 8)。外傷側のグリオーシス体積は

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  $13.3 \pm 3.4 \text{ mm}^3$  ( $p < 0.001$ ) と有意なグリオーシ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シス体積を測定し 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。

#### 6-5 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。

#### 6-6 P2Y 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 (図 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 日後ではいずれの群でも P2Y1 受容体の発現を認めた。

#### 6-7 Transient receptor potential canonical 3 チャネルの発現定性

TRPC3 チャネルの発現定性のために PCR を行った (図 10)。外傷 3 日後には Naïve 群、CCI-Control 群、CCI-Pyr3 群では TRPC3 チャ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 チャネルの発現を認めた。

## 7 考察

### 7-1 脳挫傷とグリオシス

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ミッターを用いたシグナル伝達[28]、シナプス強度の調整[4]、脳血流の調整[6]、記憶の形成[7]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、それに続発してアストロサイト近傍のマイ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。わたくしの研究室ではこれまでアストロサイトの機能を制御し、それに続発する現象を抑制しようと研究を行ってきた[22]。これまでは炎症反応の抑制に重点を置いてきたが、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、なかでもグリオシスの制御は数多くの病態に関与しているようである[29]。最近これら急性期のアストロサイトの活性化と、慢性期のグリオシスの制御に着目した研究を行うべきだと提言された[30]。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[31, 32]、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[32, 33]。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考えられている[34]。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、グリオシスとして残存し神経再生の障壁[19]やてんかん発作の焦点[20] [35]となることが指摘されている。頭部外傷以外の分野でもグリオシスはさまざまな病態に関与すると考えられている。筋萎縮性側索硬化症[36, 37]やアルツハイマー型認知症[38, 39]などの変性疾患、脊髄損傷[40]、中枢感染症[41]さらには脳深部刺激療法[42]など多岐にわたる病態で関与が指摘されている。これまでさまざまな手法を用いてグリオシスの抑制が検討されている。Perez らは 4'-fluoro-cannabidiol を末梢神経損傷モデルに投与すると、グリオシ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[43]。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、グリオシスも抑制されていたと報告している[44]。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

ろう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[11]。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。

## 7-2 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。P2Y1 受容体、TRPC3 チャンネルの発現の抑制に関して機序は不明である。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、TRPC3 チャンネルも発現が抑制されたことは、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という結果だと推察される[45-47]。

## 7-3 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[48, 49]。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[49, 50]、異常増殖を伴ったグリオシスを引き起こす[49, 50]。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[51]。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[52]。In vitro 培養アストロサイトにトロンビンを作用させると 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ることが明らかになった[13]。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も明らかになった[53]。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[23]。また 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、脳浮腫とグリオシスの抑制が示されている[54]。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、慢性期のグリオシスも抑制可能であった。本研究では過去に 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

#### 7-4 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。今後グリオシスの抑制を目的として MRS2179 や Pyr3 を使用する際は、さらに詳細な機序を解明してから用いる必要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 のグリオシス抑制効果を検討した研究は存在しない。グリオシスの影響は頭部外傷を含めた多彩な病態に関与しており、それを制御した本研究結果は今後の科学の発展に重要な影響を与えられられる。今後、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。

## 8 結論

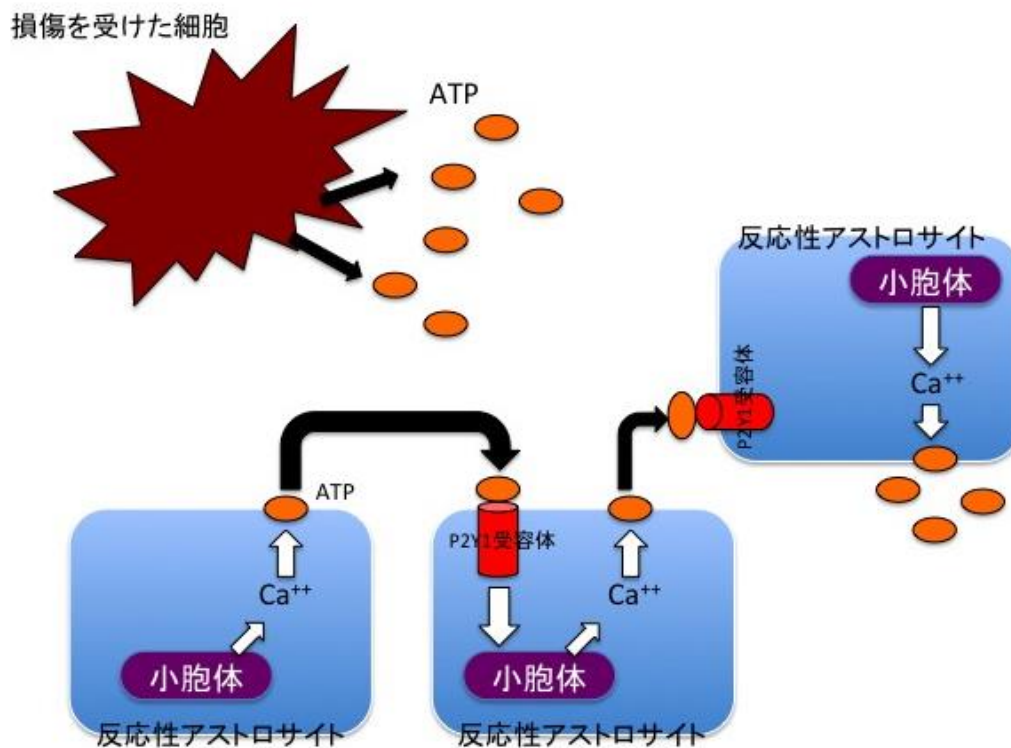
ラット脳挫傷モデルにおいて選択的 P2Y<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 MRS2179 および選択的 TRPC3 チャンネル阻害薬 Pyrazol-3 の急性期投与は、慢性期のグリオシスを抑制した。

## 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、日本大学医学部病態病理学系人体病理分野准教授の本間琢先生、日本大学医学部附属板橋病院・病理部の吉田一代さんに深く感謝致します。

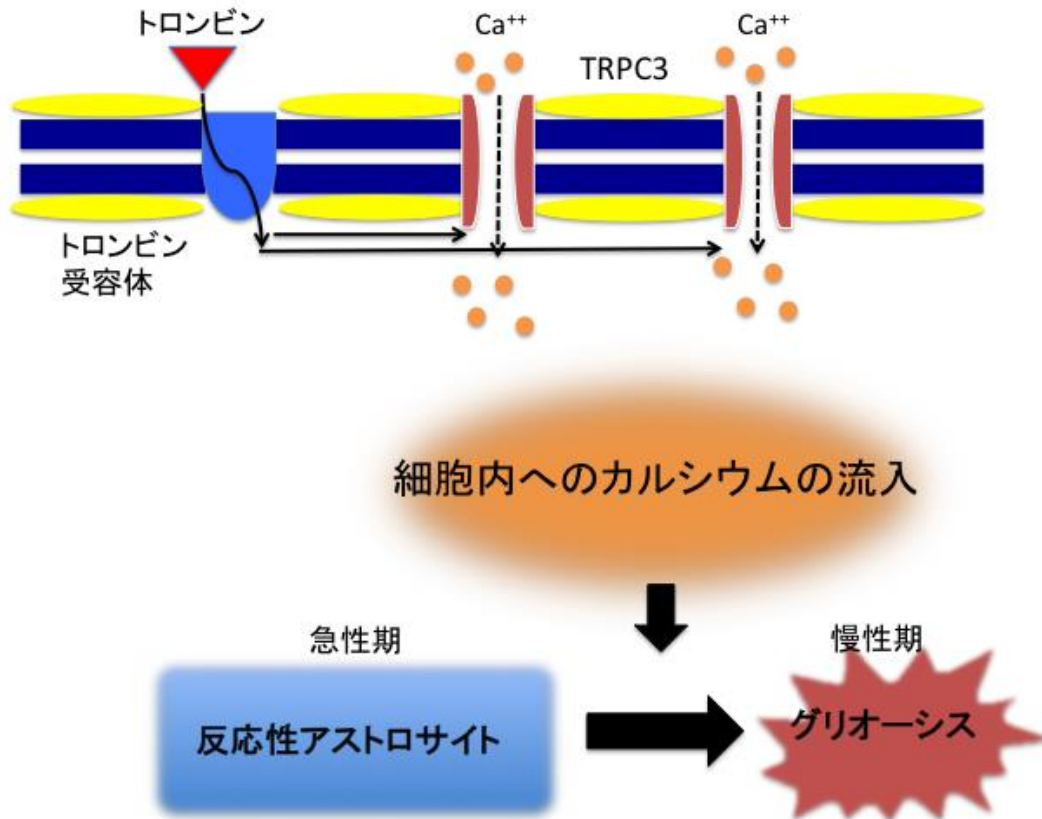
10 図表

図1 カルシウムウェーブのシエーマ



細胞外に放出された ATP が隣接アストロサイトの P2Y1 受容体に結合し小胞体からカルシウムが細胞内に放出される。この繰り返しのにより次々とアストロサイトが活性化し反応性アストロサイトに変化する。

図2 トロンビン刺激による TRPC3 チャンネルの細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの流入



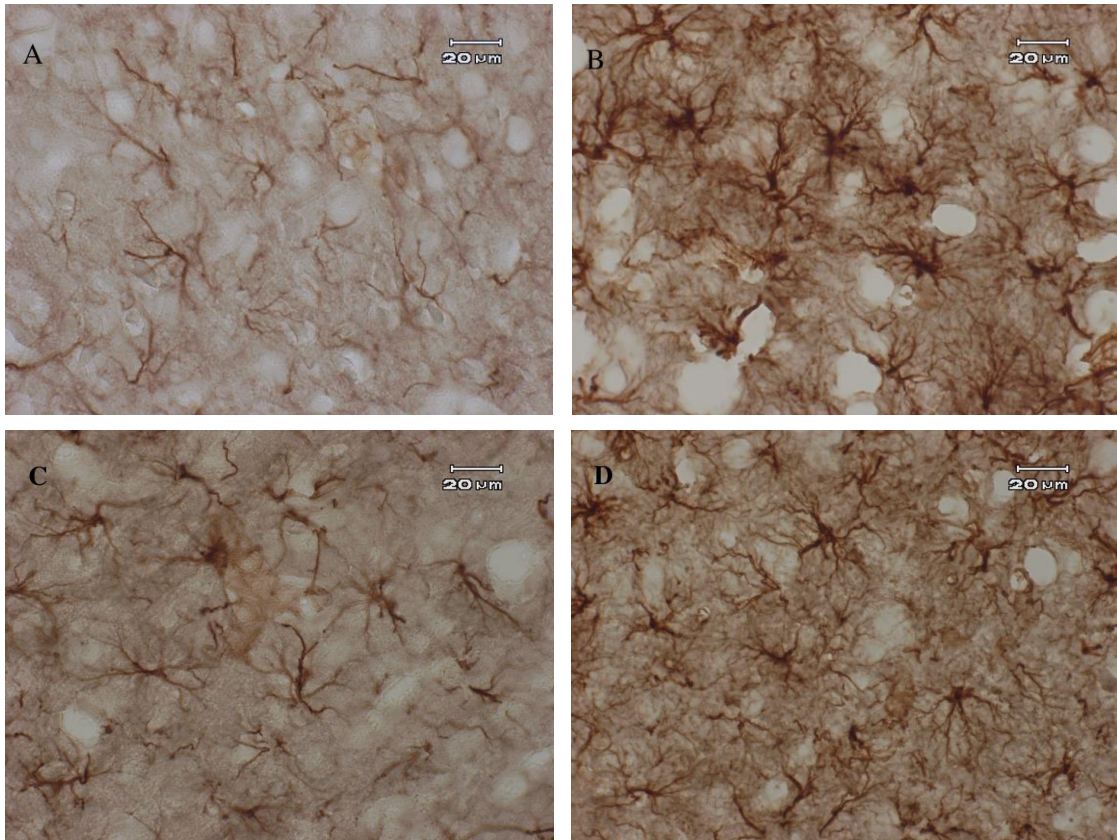
トロンビンの刺激によってアストロサイト上の TRPC3 チャンネルが活性化し細胞外から細胞内へカルシウムを流入させ、細胞内カルシウム濃度を上昇させる。これによりアストロサイトの活性化が起こり慢性期グリオシスの原因となる。

図3 Naïve 群の脳縦裂近傍の GFAP 染色の弱拡大



脳全体に陽性細胞が観察される。15倍。

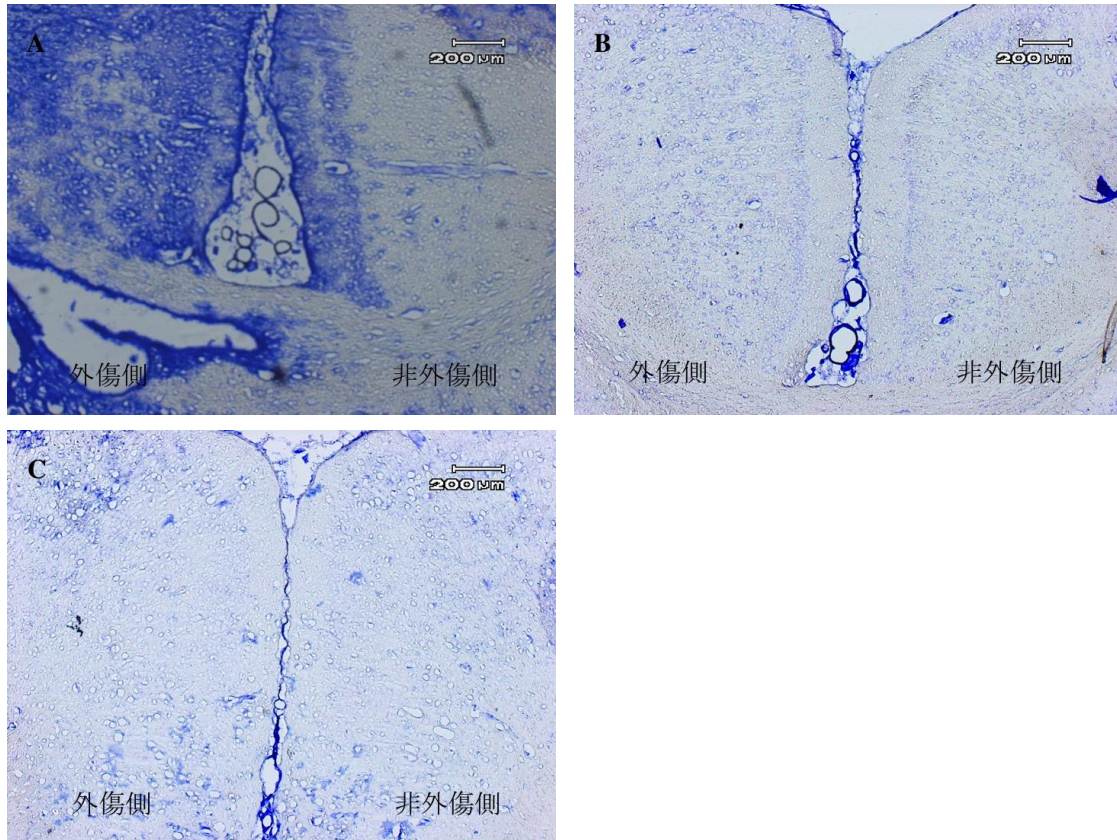
図4 外傷側大脳皮質のGFAP染色の強拡大



Naïve 群 (A) と比較して CCI-Control 群 (B) のアストロサイトは細胞体、突起共に肥大化している。CCI-MRS2179 群 (C) と CCI-Pyr3 群 (D) は CCI-Control 群 (B) と比較してアストロサイトの肥大化が抑制されている。

A・B・C・D : 300 倍。

図5 大脳縦裂近傍の Holzer 染色の弱拡大



A : CCI-Control 群。大脳縦裂を境界にし、外傷側の皮質および皮質下には非外傷側と比較し陽性細胞が多数認められる。

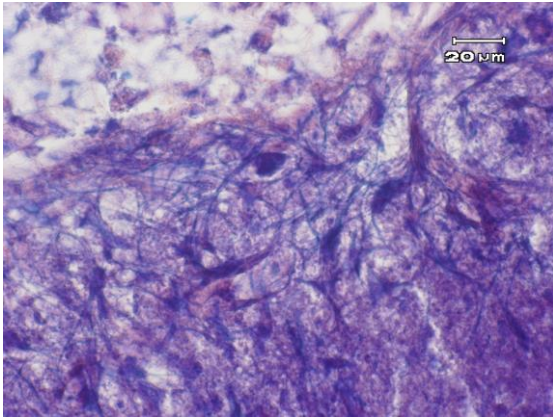
B : CCI-MRS2179 群。CCI-Control 群 (A) と比較し外傷側と非外傷側で著明に陽性細胞が減少している。

C : CCI-Pyr3 群。CCI-Control 群 (A) と比較し外傷側と非外傷側で著明に陽性細胞が減少している。

A・B・C : 30 倍



図 6 CCI-Control 群の外傷側大脳皮質のリンタングステン酸・ヘマトキシリン染色の強拡大



深青色の多数の陽性細胞を認める。300倍。

図 7 Western blotting による外傷 3、28 日後の脳挫傷周辺の大脳皮質における GFAP の発現量

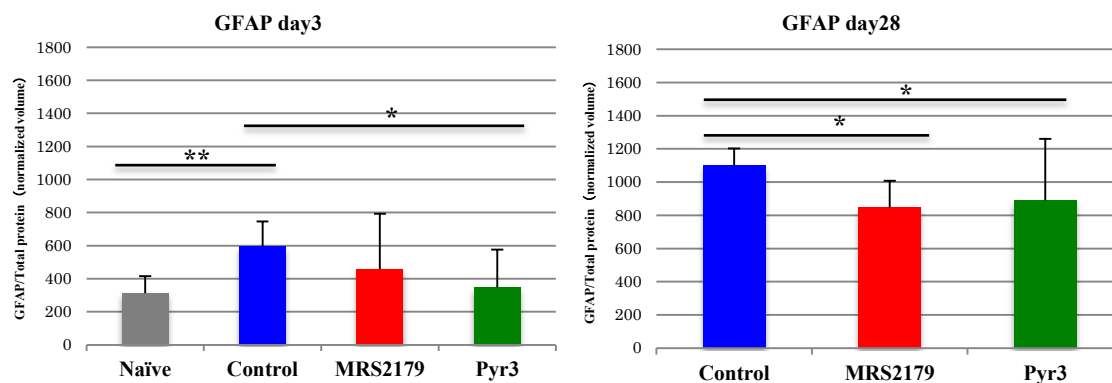


図 7A GFAP day3

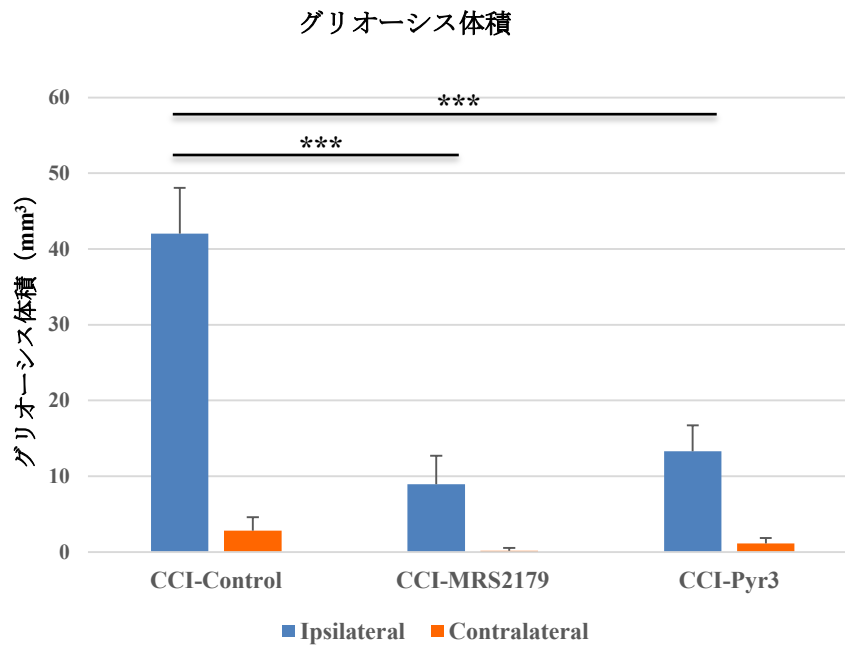
図 7B GFAP day28

\*:p<0.05、\*\*:p<0.01

図 7A : 外傷 3 日後では Naïve 群 (n=4) と比較して CCI-Control 群 (n=6) で有意な発現の増加を認めた。また CCI-Control 群と比較して CCI-Pyr3 群 (n=6) は有意に発現が抑制された。

図 7B : 外傷 28 日後では CCI-Control 群と比較して CCI-MRS2179 群 (n=6) 、CCI-Pyr3 群では有意に発現が抑制された。

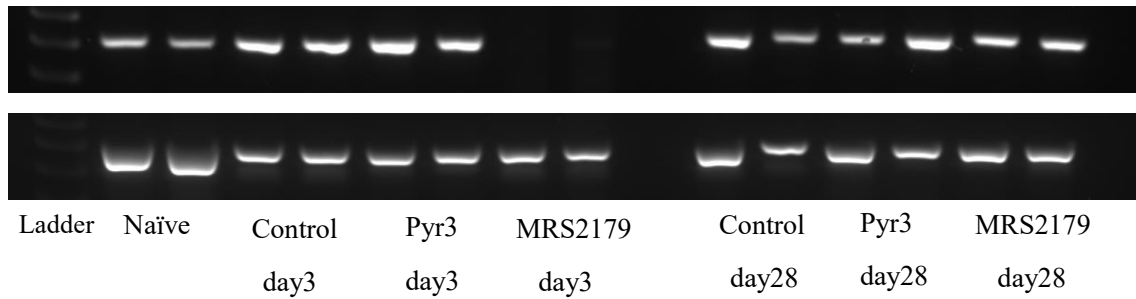
図8 グリオーシス体積



\*\*\*:  $p < 0.001$ 、Ipsilateral : 外傷側、Contralateral : 非外傷側

CCI-Control 群 (n=6) と比較して CCI-MRS2179 群 (n=6) 、CCI-Pyr3 群 (n=6) でグリオーシス体積の有意な抑制を認めた。

図9 PCRによる外傷3、28日後におけるP2Y1受容体の発現定性

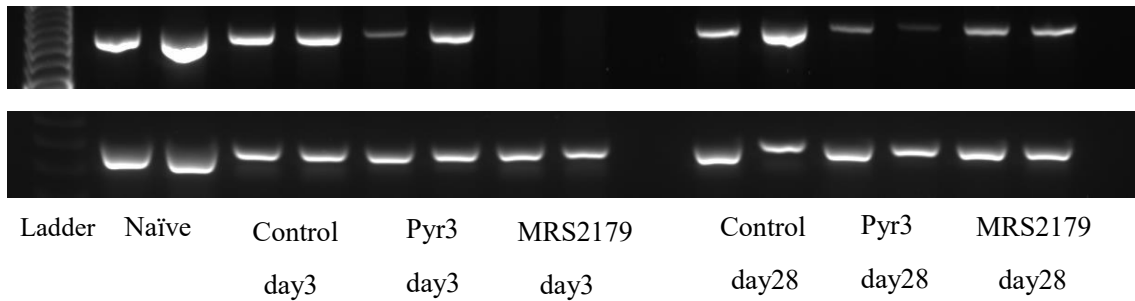


外傷3日後のCCI-MRS2179群ではP2Y1受容体の発現が抑制された。

上段：P2Y1受容体

下段：GAPDH

図 10 PCR による外傷 3、28 日後における TRPC3 チャンネルの発現定性



外傷後 3 日の CCI-MRS2179 群では TRPC3 チャンネルの発現が抑制された。

上段 : TRPC3 チャンネル

下段 : GAPDH

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 用
Naïve 群	n=1	n=4
CCI-Control 群	n=4	n=12 (day3、28 の各 n=6)
CCI-MRS2179 群	n=4	n=12 (day3、28 の各 n=6)
CCI-Pyr3 群	n=4	n=12 (day3、28 の各 n=6)

表 2 本研究に使用したプライマーと PCR 条件

	Forward	Reverse	AT	Cy
P2Y1 受容体	GCTCCCTTTGGGGAAACAGT	ACATGTACACCGAGATGCCG	58	30
TRPC3	TGAGGTGAACGAAGGTGAACTG	CCTGTCCCCCAAGGAACTCT	56	32
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCCACCACCTGTTGCTGTA	63	23

AT: Annealing temperature、Cy: Cycle

## 11 引用文献

1. Cornell-Bell, A.H., et al., *Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling*. Science, 1990. **247**(4941): p. 470-3.
2. Guthrie, P.B., et al., *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*. J Neurosci, 1999. **19**(2): p. 520-8.
3. Haydon, P.G., *GLIA: listening and talking to the synapse*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(3): p. 185-93.
4. Coppi, E., et al., *Role of P2 purinergic receptors in synaptic transmission under normoxic and ischaemic conditions in the CA1 region of rat hippocampal slices*. Purinergic Signal, 2007. **3**(3): p. 203-19.
5. Simard, M., et al., *Signaling at the gliovascular interface*. J Neurosci, 2003. **23**(27): p. 9254-62.
6. Takano, T., et al., *Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow*. Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 260-7.
7. Henneberger, C., et al., *Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 232-6.
8. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-8.
9. Haynes, S.E., et al., *The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides*. Nat Neurosci, 2006. **9**(12): p. 1512-9.
10. Koizumi, S., et al., *UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1091-5.
11. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.
12. Nicole, O., et al., *Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury*. J Neurosci, 2005. **25**(17): p. 4319-29.
13. Shirakawa, H., 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**(39): p. 13116-29.
14. Rothstein, J.D., et al., *Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate*. Neuron, 1996. **16**(3): p. 675-86.
15. Shih, A.Y., et al., *Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress*. J Neurosci, 2003. **23**(8): p. 3394-406.



16. Bush, T.G., et al., *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. *Neuron*, 1999. **23**(2): p. 297-308.
17. Zador, Z., et al., *Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190): p. 159-70.
18. Okada, S., et al., *Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury*. *Nat Med*, 2006. **12**(7): p. 829-34.
19. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. *Nat Rev Neurosci*, 2004. **5**(2): p. 146-56.
20. Oberheim, N.A., et al., *Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain*. *J Neurosci*, 2008. **28**(13): p. 3264-76.
21. Goodman, J.C., et al., *Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity*. *J Neurotrauma*, 1994. **11**(5): p. 587-97.
22. Moro, N., D.A. Hovda, and R.L. Sutton, *Massive flux of the gliotransmitter ATP into the extracellular space following traumatic brain injury in the rat*. *Journal of Neurotrauma*, 2009. **26**(8): p. A6-A6.
23. Munakata, M., et al., *Transient receptor potential canonical 3 inhibitor Pyr3 improves outcomes and attenuates astrogliosis after intracerebral hemorrhage in mice*. *Stroke*, 2013. **44**(7): p. 1981-7.
24. Kiyonaka, S., et al., *Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(13): p. 5400-5.
25. Qi, Z., et al., *TRPC3 regulates the automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. *Int J Cardiol*, 2016. **203**: p. 169-81.
26. Povlishock, J.T. and C.W. Christman, *The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts*. *J Neurotrauma*, 1995. **12**(4): p. 555-64.
27. Bramlett, H.M. and W.D. Dietrich, *Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies*. *Prog Brain Res*, 2007. **161**: p. 125-41.
28. Fiacco, T.A. and K.D. McCarthy, *Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling*. *Glia*, 2006. **54**(7): p. 676-90.
29. Dossi, E., F. Vasile, and N. Rouach, *Human astrocytes in the diseased brain*. *Brain Res Bull*, 2018. **136**: p. 139-156.
30. Pekny, M., et al., *Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke?* *Neurosci Lett*, 2018.

31. Nishino, A., et al., *Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury*. J Neurotrauma, 1993. **10**(2): p. 167-79.
32. Pekny, M. and M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. Glia, 2005. **50**(4): p. 427-34.
33. Perea, G. and A. Araque, *Glial calcium signaling and neuron-glia communication*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 375-82.
34. Halford, J., et al., *New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment*. J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(10): p. 3278-3299.
35. Dash, G.K., et al., *Predictors of seizure outcome following resective surgery for drug-resistant epilepsy associated with focal gliosis*. J Neurosurg, 2018: p. 1-9.
36. Martinez-Palma, L., et al., *Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Neurotherapeutics, 2018.
37. Gomes, C., et al., *Cortical Neurotoxic Astrocytes with Early ALS Pathology and miR-146a Deficit Replicate Gliosis Markers of Symptomatic SOD1G93A Mouse Model*. Mol Neurobiol, 2018.
38. Merluzzi, A.P., et al., *Neurodegeneration, synaptic dysfunction, and gliosis are phenotypic of Alzheimer dementia*. Neurology, 2018. **91**(5): p. e436-e443.
39. Frost, G.R. and Y.M. Li, *The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease*. Open Biol, 2017. **7**(12).
40. Noristani, H.N., 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.
41. Wilson, K.D., et al., *Elimination of intravascular thrombi prevents early mortality and reduces gliosis in hyper-inflammatory experimental cerebral malaria*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 173.
42. Vedam-Mai, V., et al., *Deep Brain Stimulation associated gliosis: A post-mortem study*. Parkinsonism Relat Disord, 2018.
43. Perez, M., et al., *Neuronal preservation and reactive gliosis attenuation following neonatal sciatic nerve axotomy by a fluorinated cannabidiol derivative*. Neuropharmacology, 2018. **140**: p. 201-208.
44. Luo, H., et al., *Resveratrol Delays Retinal Ganglion Cell Loss and Attenuates Gliosis-Related Inflammation From Ischemia-Reperfusion Injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018. **59**(10): p.

- 3879-3888.
45. Gachet, C., *ADP receptors of platelets and their inhibition*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(1): p. 222-32.
  46. Reading, S.A., et al., *TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(5): p. H2055-61.
  47. Sugihara, M., et al., *Dual signaling pathways of arterial constriction by extracellular uridine 5'-triphosphate in the rat*. *J Pharmacol Sci*, 2011. **115**(3): p. 293-308.
  48. Suidan, H.S., et al., *Astrocyte spreading in response to thrombin and lysophosphatidic acid is dependent on the Rho GTPase*. *Glia*, 1997. **21**(2): p. 244-52.
  49. Majumdar, M., et al., *Requirement for Rho-mediated myosin light chain phosphorylation in thrombin-stimulated cell rounding and its dissociation from mitogenesis*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(17): p. 10099-106.
  50. Wang, H., et al., *Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(5): p. C1351-64.
  51. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
  52. Ubl, J.J. and G. Reiser, *Characteristics of thrombin-induced calcium signals in rat astrocytes*. *Glia*, 1997. **21**(4): p. 361-9.
  53. Shirakawa, H., *[Pathophysiological significance of the canonical transient receptor potential (TRPC) subfamily in astrocyte activation]*. *Yakugaku Zasshi*, 2012. **132**(5): p. 587-93.
  54. Belkacemi, T., et al., *TRPC1- and TRPC3-dependent Ca(2+) signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo*. *Glia*, 2017. **65**(9): p. 1535-1549.

12 研究業績

高峰裕介

- I. 発表 ①一般発表  
②特別発表

4 (筆頭 4/共同 0)

なし

- II. 論文 ①原著論文  
②症例報告  
③総説

なし

1

なし

- III. 著書

なし

## I 発表

### ① 一般発表

1. 高峰裕介、渡辺充、角光一郎、小林一太、大島秀規、深谷親、吉野篤緒、山本隆充、中井俊子、平山篤志：心臓ペースメーカー留置患者に対する MRI ガイド下 DBS 手術，第 56 回日本定位・機能神経外科学会，大阪，2017 年 1 月
2. 高峰裕介、渡辺充、角光一郎、小林一太、大島秀規、深谷親、吉野篤緒、山本隆充、中井俊子、平山篤志：心臓ペースメーカー留置患者に対して MRI ガイド下脳深部刺激療法を施行した 1 例，第 44 回関東機能的脳外科カンファレンス，金沢，2017 年 9 月
3. 高峰裕介、山室俊、角光一郎、太田隆、四條克倫、大島秀規、吉野篤緒：頭蓋内出血で発症した小児 Pleomorphic xanthoastrocytoma の 1 例，第 136 回日本脳神経外科学会関東支部会，東京，2018 年 9 月
4. Yusuke Takamine, Hiroshi Negishi, Yuto Furukawa, Masato Kobayashi, Takahiro Kumagawa, Katsunori Shijo, Nobuhiro Moro, Takeshi Maeda, Atsuo Yoshino : Effects of Transient Receptor Potential Canonical 3 Inhibitor Pyr3 and P2Y1 Receptor Inhibitor MRS2179 in a rat model of cerebral contusion injury, Neuroscience 2018, San Diego, CA, 2018 年 11 月

## II. 論文

### ② 症例報告

1. Yusuke Takamine, Shun Yamamuro, Koichiro Sumi, Takashi Ohta, Katsunori Shijo, Yoko Nakanishi, Taku Homma, and Atsuo Yoshino : *A Case of Pleomorphic Xanthoastrocytoma with Intracranial Hemorrhage in a Child*. NMC Case Report Journal, December 18, 2018.