

繰り返し軽微脳損傷におけるグリア細胞の動向(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

神谷 光樹

修了年 2020 年

指導教員 大島 秀規

## 1 要約

外傷性脳損傷において、最も頻度が高いのは軽傷頭部外傷に分類される群であり、その頻度は全体のおよそ 80%とされている[1, 2]。その中で最も問題となるのは脳振盪である。脳振盪は交通事故や転倒、転落による頭部への直接打撃あるいは振動により発症し、一過性の意識障害を呈するものの予後は良好である。しかし近年スポーツに起因する脳振盪症例の解析により、脳振盪に繰り返し暴露されると、遅発性に認知機能の低下、気分の変化、行動の変化、筋肉の異常など多彩な障害を後遺することが報告されている[3-6]。現在は脳振盪を繰り返すことが原因であると確立されており、その多彩な症状を呈する病態は慢性外傷性脳症と呼ばれている。なぜ脳振盪を繰り返すと遅発性に慢性外傷性脳症に陥るのかわかっておらず、その病態の解明が急がれている[7]。

単回脳振盪後の脳内変化については古くから研究されており、動物実験レベルでは打撃直後からおこるグルタミン酸[8]とカリウム[9]の細胞外液中への大量放出が意識障害を引き起こすとされている。その他にも単回の脳振盪であっても炎症反応の励起[10]、軸索の障害[11]、ミトコンドリアの異常[12]、グリア細胞の異常[13]などが生じると報告されている。

繰り返し脳損傷を対象とした研究はかなり限定されている。動物実験レベルでは繰り返し脳損傷は単回損傷と比較し、酸化ストレスの増強[14]、神経細胞死の増加[15]、炎症の悪化[15, 16]、神経学的機能の悪化[15-17]を来すと報告されている。

本研究では、繰り返し軽微脳損傷モデルにおいて、単回損傷と比しどのような病態の悪化がみられるかを観察した。特に我々の研究室で主に扱っているグリア細胞の動向に注目し、グリア細胞の活性化とそれに起因する変化を生化学的および組織病理学的に観察、検討した。

Weight drop 法を用いた closed head injury (CHI) によるラット繰り返し脳振盪モデルを作製した。単回脳振盪 (S) 群と 5 回脳振盪 (M) 群を作製し、最終外傷当日と 28 日後に脳検体を摘出した。それぞれ S1 群、S28 群、M1 群、M28 群とした。正常対照群として外科的処置を行っていない Naïve 群を作製した。最終脳振盪直後に細胞外液中 adenosine triphosphate (ATP) 濃度をバイオセンサーで測定した。またアストロサイトの発現定量のために glial fibrillary acidic protein (GFAP)、炎症細胞であるマイクログリアの発現定量のために CD11b の Western blotting を行った。組織染色として Nissl 染色、アストロサイトに対する免疫染色、グリオーシス評価のためリンタンングステン酸・ヘマトキシリン染色を行った。Polymerase chain reaction にて細胞死の指標である Caspase3、組織炎症の指標である inducible nitric oxide synthase (iNOS)、組織破壊の指標である matrix metalloproteinase-9 (MMP9) を測定した。

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 one way analysis of variance を使用し、要因に有意差があった場合のみ post-hoc 検定を Tukey の方法

を使用し行った。分散が等しくないデータに関してはイプシロンにより自由度を補正し、Games-Howellの方法を用いた。すべての検定でp値が0.05未満を有意とした。すべてのデータは平均±標準偏差で示した。

外傷後の細胞外液中のATP値を測定した。Naïve群の細胞外液中ATP値は $2.92 \pm 0.09$  nMであった。単回脳振盪群では外傷後のピーク値は $9.66 \pm 1.21$  nM ( $p < 0.001$ )、5回脳振盪群は $6.94 \pm 1.09$  nM ( $p < 0.001$ )でありそれぞれNaïve群と比較して有意に高かった。単回脳振盪群と5回脳振盪群の外傷後ピーク値を比較すると、単回群は有意に高い値を示した( $p=0.007$ )。外傷によるATPピーク後、速やかにすべての群でATP値はプラトーに達した。Naïve群のプラトー値は $0.70 \pm 0.02$  nMであった。単回脳振盪群のプラトー値は $1.86 \pm 0.28$  nM ( $p=0.004$ )、5回脳振盪群は $2.60 \pm 0.57$  nM ( $p < 0.001$ )であり両群ともNaïve群と比較して有意に高かった。単回脳振盪群と5回脳振盪群のプラトー値を比較したところ、5回脳振盪群は有意に高い値を示した( $p=0.048$ )。

アストロサイトの発現を定量化するため、大脳皮質および海馬を検体として抗GFAP抗体を用いたWestern blottingを行った。大脳皮質のNaïve群の値は $0.31 \pm 0.08$ であった。S1群、S28群、M1群およびM28群ではそれぞれ $0.37 \pm 0.13$ 、 $0.60 \pm 0.15$  ( $p < 0.001$ )、 $0.60 \pm 0.21$  ( $p=0.018$ ) および  $0.42 \pm 0.09$  ( $p=0.005$ ) であり、S1群以外はNaïve群と比較して有意に高い値を示した。海馬のNaïve群の値は $0.17 \pm 0.09$ であった(図3)。S1群、S28群、M1群およびM28群ではそれぞれ $0.26 \pm 0.17$ 、 $0.48 \pm 0.10$  ( $p < 0.001$ )、 $0.74 \pm 0.13$  ( $p < 0.001$ )、 $0.90 \pm 0.07$  ( $p < 0.001$ ) であり、S1群以外はNaïve群と比較して有意に高い値を示した。さらにS1群と比較しM1群( $p < 0.001$ ) およびS28群と比較しM28群( $p < 0.001$ ) で有意に高い発現を認めた。またS1群と比較しS28群で有意に高い値を示した( $p=0.002$ )。

マイクログリアの発現を定量化するため、大脳皮質および海馬を検体として抗CD11b抗体を用いたWestern blottingを行った。大脳皮質のNaïve群の値は $0.48 \pm 0.07$ であった。S1群では $1.44 \pm 0.27$  ( $p < 0.001$ )、S28群では $1.01 \pm 0.17$  ( $p < 0.001$ )、M1群では $1.37 \pm 0.20$  ( $p < 0.001$ )、M28群では $0.68 \pm 0.25$  ( $p=0.050$ ) であり、Naïve群と比較していずれも有意にCD11bの高い発現を認めた。S1群とS28群を( $p < 0.001$ ) およびM1群とM28群を( $p < 0.001$ ) 比較すると、単回でも5回脳振盪でも28日後には有意に発現が低下した。S28群とM28群の比較ではM28群で有意に低い値を示した( $p=0.002$ )。海馬のNaïve群の値は $0.58 \pm 0.15$ であった。S1群では $0.76 \pm 0.25$ 、S28群では $0.65 \pm 0.14$ 、M1群では $0.85 \pm 0.28$ 、M28群では $0.72 \pm 0.06$ であった。M1群( $p=0.035$ ) とM28群( $p=0.030$ ) の値はNaïve群と比較して有意に高い値であった。

Naïve群の大脳皮質切片を抗GFAP抗体で染色したところ、Naïve群脳全体に陽性細胞を認め、その大きさは約40 μmで、細胞体の小さい、多数の突起を有する星状構造を呈して

いた。S1 群では Naïve 群と比較し大きな変化は認めなかった。しかし S28 群と M1 群の GFAP 陽性細胞は細胞体も突起も共に肥大化していた。さらに灰白質に多くの陽性細胞を認めた。M28 群でも同じく灰白質に細胞体と突起の肥大した陽性細胞を多く認めたが、白質には陽性細胞が島状に欠損した無細胞領域を多数認めた。

単回脳振盪群と 5 回脳振盪群の 28 日後の検体を用いて、膠原繊維染色であるリンタングステン酸・ヘマトキシリン染色を行なった。陽性コントロールとして使用した脳挫傷標本においては、大脳皮質に多数の深青色に染まる繊維構造を認める。単回脳振盪群では明らかな繊維性組織は認めなかったが、5 回脳振盪群では大脳皮質に深青色に染まる繊維構造を認めた。

Caspase3 について、大脳皮質では Naïve 群と比較して、S1 群 ( $p=0.001$ )、S28 群 ( $p=0.001$ )、M1 群 ( $p<0.001$ )、および M28 群 ( $p=0.002$ ) のいずれの群でも有意に高い発現を認めた。海馬では Naïve 群と比較して、M1 群 ( $p=0.013$ )、および M28 群 ( $p=0.046$ ) で有意に高い発現を認めた。

iNOS について、大脳皮質では Naïve 群と比較して、S28 群で有意に高い発現を認めた ( $p=0.011$ )。海馬では Naïve 群と比較して、M1 群で有意に高い発現を認めた ( $p=0.027$ )。M1 群と比較すると M28 群では有意に低い発現を認めた ( $p=0.016$ )。

MMP9 について、大脳皮質では Naïve 群と比較して、S1 群 ( $p=0.013$ )、S28 群 ( $p<0.001$ )、M1 群 ( $p=0.004$ )、M28 群 ( $p<0.001$ ) の全てで有意に高い発現を認めた。海馬では Naïve 群と比較して、S1 群 ( $p=0.017$ ) および M1 群 ( $p<0.001$ ) で有意に高い発現を認めた。M1 群と M28 群を比較すると M28 群の発現は有意に低い値を示した ( $p=0.025$ )。

脳振盪による組織損傷の評価として残存脳体積を測定した。Naïve 群の脳体積は  $701.6\pm 1.8\text{ mm}^3$  であった。S1 群は  $677.8\pm 58.9\text{ mm}^3$ 、S28 群は  $634.5\pm 48.9\text{ mm}^3$  であった。M1 群では  $564.8\pm 9.3\text{ mm}^3$  ( $p<0.001$ )、M28 群では  $556.6\pm 29.8\text{ mm}^3$  ( $p<0.001$ ) であり、Naïve 群と比較し有意に低い値を示した。M1 群の残存脳体積は、S1 群と比較して有意に低い値を示した ( $p=0.001$ )。M28 群の値は、S28 群と比較して有意に低い値を示した ( $p<0.001$ )。

頭部外傷において、これまで多くの研究が重症頭部外傷である脳挫傷や急性硬膜下血腫を対象としており、軽傷頭部外傷の研究は少ない傾向にある[18] 脳振盪モデルにおいても脳挫傷モデルでみられる現象の一部がおきていることが解明されており、前述のとおりグルタミン酸[8]の細胞外液中への大量放出、炎症反応の励起[10]、軸索の障害[11]、ミトコンドリアの異常[12]、グリア細胞の異常[13]などが報告されている。しかし神経機能予後の観点からみると、単回の CHI では機能の悪化が一時的であるか正常と変わらないにも関わらず、複数回の CHI を加えると機能悪化が永続することが報告されている[19]。これは臨床の脳挫傷と脳振盪の違いをよく反映していると考えられ、その原因の究明が求められる。ア

アストロサイトは脳内であらゆる因子を制御している細胞であることが近年解明されてきた。アストロサイトは伝達物質 ATP を使用してシナプスやマイクログリアと交信しており、マイクログリアの遊走も貪食もアストロサイトの ATP シグナル依存性であることが解明されている[20, 21]。

本研究で解明された重要な事項は、単回脳震盪直後には ATP の細胞外放出が行われるということである。そしてさらに重要なことは、これを繰り返すと、そもそものアストロサイトの活性化レベルが上昇し、5 回目の脳振盪直後の ATP 放出はむしろ低下するということである。この結果から頻回の刺激がアストロサイトに何らかの警戒信号を与え続ける一方で、頻回ダメージを受けたアストロサイトが初回ほどの反応ができなくなっている可能性が示唆された。

また GFAP 染色において 5 回外傷群の 28 日後を観察すると、グリオシスは大腦皮質に生じているものの、髄質の GFAP 陽性細胞が島状に消失している箇所が多発しており、アストロサイトの細胞死も同時に進行しているものと考えられ、これらは定量化の結果からも同様の可能性が示唆された。一方で CD11b、各サイトカインよりマイクログリアの活性化も明確に観察されたが、これらについては繰り返し脳損傷による効果は認められなかった。

本研究の結果から、繰り返し脳振盪モデルにおけるアストロサイトの反応性の違いが証明された。今後研究を発展させ、慢性外傷性脳症の病態解明に繋げていきたい。

## 2 引用文献

1. Bolton, A.N. and K.E. Saatman, *Regional neurodegeneration and gliosis are amplified by mild traumatic brain injury repeated at 24-hour intervals*. J Neuropathol Exp Neurol, 2014. **73**(10): p. 933-47.
2. Ghadiri, T., et al., *A novel traumatic brain injury model for induction of mild brain injury in rats*. J Neurosci Methods, 2014. **233**: p. 18-27.
3. Collins, M.W., et al., *Relationship between concussion and neuropsychological performance in college football players*. JAMA, 1999. **282**(10): p. 964-70.
4. Matser, E.J., et al., *Neuropsychological impairment in amateur soccer players*. JAMA, 1999. **282**(10): p. 971-3.
5. Inserra, C.J. and B.W. DeVrieze, *Chronic Traumatic Encephalopathy (CTE, Sports-related Traumatic Brain Injury, TBI, Pugilistica Dementia)*, in *StatPearls*. 2019: Treasure Island (FL).
6. Ling, H., J. Hardy, and H. Zetterberg, *Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports*. Mol Cell Neurosci, 2015. **66**(Pt B): p. 114-22.
7. Alosco, M.L., et al., *Association of White Matter Rarefaction, Arteriolosclerosis, and Tau With Dementia in Chronic Traumatic Encephalopathy*. JAMA Neurol, 2019.
8. Faden, A.I., et al., *The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury*. Science, 1989. **244**(4906): p. 798-800.
9. Katayama, Y., et al., *Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury*. J Neurosurg, 1990. **73**(6): p. 889-900.
10. Perez-Polo, J.R., et al., *Inflammatory consequences in a rodent model of mild traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2013. **30**(9): p. 727-40.
11. Deng-Bryant, Y., et al., *Chronic Cognitive Deficits and Associated Histopathology Following Closed-Head Concussive Injury in Rats*. Front Neurol, 2019. **10**: p. 699.
12. Fraunberger, E.A., T.E. Shutt, and M.J. Esser, *Sex-dependent and chronic alterations in behavior and mitochondrial function in a rat model of pediatric mild traumatic brain injury*. Brain Inj, 2019. **33**(4): p. 534-542.
13. Pham, L., et al., *Mild Closed-Head Injury in Conscious Rats Causes Transient Neurobehavioral and Glial Disturbances: A Novel Experimental Model of Concussion*. J Neurotrauma, 2019. **36**(14): p. 2260-2271.
14. Yates, N.J., et al., *Repeated mild traumatic brain injury in female rats increases lipid*

- peroxidation in neurons*. Exp Brain Res, 2017. **235**(7): p. 2133-2149.
15. Mountney, A., et al., *Functional and Molecular Correlates after Single and Repeated Rat Closed-Head Concussion: Indices of Vulnerability after Brain Injury*. J Neurotrauma, 2017. **34**(19): p. 2768-2789.
  16. Aungst, S.L., et al., *Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits*. J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(7): p. 1223-32.
  17. Fidan, E., et al., *Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in the Developing Brain: Effects on Long-Term Functional Outcome and Neuropathology*. J Neurotrauma, 2016. **33**(7): p. 641-51.
  18. Kane, M.J., et al., *A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury*. J Neurosci Methods, 2012. **203**(1): p. 41-9.
  19. Kao, Y.J., et al., *Behavioral and Structural Effects of Single and Repeat Closed-Head Injury*. AJNR Am J Neuroradiol, 2019. **40**(4): p. 601-608.
  20. Koizumi, S., et al., *UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1091-5.
  21. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-8.