

頭部外傷後の細胞外液中 ATP とグルタミン酸の動向  
ならびに神経細胞死との関連

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

稲原 裕也

修了年 2021 年

指導教員 吉野 篤緒

頭部外傷後の細胞外液中 ATP とグルタミン酸の動向  
ならびに神経細胞死との関連

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

稲原 裕也

修了年 2021 年

指導教員 吉野 篤緒

## 目次

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 1. 概要                       | 1  |
| 2. 略語表                      | 4  |
| 3. 緒言                       | 5  |
| 4. 材料と方法                    |    |
| 4.1 Stab wound injury モデル   | 8  |
| 4.2 Western blotting        | 9  |
| 4.3 組織染色                    | 10 |
| 4.4 統計解析                    | 11 |
| 5. 動物取り扱いおよび実験における倫理的配慮     | 11 |
| 6. 結果                       |    |
| 6.1 Stab 外傷後の細胞外液中 ATP 値測定  | 11 |
| 6.2 Stab 外傷後の細胞外液中グルタミン酸値測定 | 12 |
| 6.3 GFAP の定量                | 13 |
| 6.4 CD11b の定量               | 13 |
| 6.5 Fluoro-Jade 染色          | 14 |
| 7. 考察                       |    |
| 7.1 細胞外液中への ATP 放出          | 14 |
| 7.2 細胞外液中へのグルタミン酸放出         | 15 |
| 7.3 ATP とグルタミン酸の相互関係        | 16 |
| 7.4 頭部外傷と遅発性細胞死             | 17 |
| 8. 結論                       | 20 |
| 9. 謝辞                       | 21 |
| 10. 図表                      | 22 |
| 11. 引用文献                    | 45 |
| 12. 研究業績                    | 50 |

## 1 概要

脳内の伝達物質はいくつか同定されているが、古くから報告され、有名なものにグルタミン酸がある。しかし、最近になりアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) や D-セリンがグリア細胞の伝達物質として同定され注目を浴びている。頭部外傷後の伝達物質の関与については fluid percussion injury を用いた研究で外傷後超急性期に大量のグルタミン酸とカリウムが細胞外液中に放出されることが報告されている。これらの放出はテトロドトキシンの投与下には減少するため、ニューロンから放出されるものと考えられている。放出された大量のグルタミン酸は細胞毒性を有し、細胞死を引き起こすことが知られている。また、controlled cortical impact injury を用いた研究で外傷後超急性期に大量に ATP が細胞外液中に放出されることも報告されている。しかし最近の In vitro 研究では、ニューロンも ATP を使用し、グリア細胞もグルタミン酸を利用すると考えられるようになり、細胞の種類に依存しない放出と受容が報告されている。現時点でどの細胞がどの伝達物質をどのように利用しているのかは解明されていない。ただし正常シナプスの機能として、記憶を形成する際など、グリア細胞が ATP をシナプス間隙に放出することによりシナプス強度を調整していることが解明されている。つまりニューロンのグルタミン酸放出は、ニューロンを取り囲むグリア細胞の支配下であり制御されていることが分かっている。

我々はこれまで外傷後超急性期に起こるグルタミン酸の放出と、それによる細胞死の関連を研究してきた。本研究では、外傷直後に細胞外液中に放出されたグルタミン酸と ATP のシグナルが関与するかを検討した。すなわち、ATP 分解酵素であるアピレースを外傷に用いると細胞外液中のグルタミン酸が減少し、さらに細胞死を防ぐことができるかどうかを検討した。アストロサイトやニューロンが ATP シグナルを利用してグルタミン酸の放出を助長しているとしたら新知見となる。さらに、外傷後にグルタミン酸を放出するニューロンをテトロドトキシンの抑制すると ATP の放出はどうなるのかを検討した。

バイオセンサーを用いた **Stab wound injury** モデルを作製した。外傷のみのコントロール群、外傷時にアピレースを投与したアピレース群、外傷時にテトロドトキシンを投与したテトロドトキシン群の3つの群を作製した。**Stab wound injury** 後の細胞外液中の ATP 値とグルタミン酸値をバイオセンサーで測定した。それぞれの群でモデル作製 3 日、7 日、28 日後に脳検体を摘出した。コントロール群とアピレース群ではアストロサイトの発現定量のために **glial fibrillary acidic protein (GFAP)**、炎症細胞であるミクログリアの発現定量のために **CD11b** の **Western blotting** を行った。モデル作製 3 日後の 3 群の脳検体を用いて **Fluoro-Jade** 染色を行い、細胞死の程度を評価した。

外傷直後に大量の ATP 放出が観察された。ATP 値の立ち上がりは急激で、1 秒以内にピークに到達した。細胞外液中の ATP ピーク値はコントロール群で  $79.18 \pm 0.29$  nA、アピレース群で  $23.40 \pm 2.92$  nA、テトロドトキシン群で  $69.15 \pm 3.84$  nA であり、コントロール群と比較しアピレース、テトロドトキシンの両群で有意に低い値を示した。また、ATP ピーク値とバイオセンサー抜去直前の値との差から濃度変化 ( $\Delta$ ATP) を検討した。 $\Delta$ ATP はコントロール群で  $1.62 \pm 0.42$  nM、アピレース群で  $0.094 \pm 0.16$  nM、テトロドトキシン群で  $0.31 \pm 0.19$  nM であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意に低い値を示した。一方、アピレース群とテトロドトキシン群間には有意差を認めなかった。

グルタミン酸も外傷直後に放出された。細胞外液中のグルタミン酸ピーク値はコントロール群で  $44.80 \pm 3.40$  nA、アピレース群で  $32.17 \pm 4.47$  nA、テトロドトキシン群で  $28.04 \pm 2.96$  nA であり、コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意に低い値を示した。また、グルタミン酸ピーク値とバイオセンサー抜去直前の値との差から濃度変化 ( $\Delta$ Glutamate) を検討した。 $\Delta$ Glutamate はコントロール群で  $0.97 \pm 0.11$  mM、アピレース群で  $0.42 \pm 0.063$  mM、テトロドトキシン群で  $0.32 \pm 0.072$  mM であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意に低い値を示した。一方、アピレース群とテトロドトキシン群間には有意差を認めなかった。

GFAP の発現量は、モデル作製 3 日後では、コントロール群で  $0.87 \pm 0.033$ 、アピレース群で  $0.42 \pm 0.080$  であった。モデル作製 7 日後では、コントロール群で  $1.09 \pm 0.11$ 、アピレース群で  $0.83 \pm 0.028$  であった。モデル作製 28 日後では、コントロール群で  $0.71 \pm 0.054$ 、アピレース群で  $0.50 \pm 0.024$  であった。すべての群においてコントロール群と比較してアピレース群で有意に低い値を示した。

CD11b の発現量は、モデル作製 3 日後では、コントロール群で  $0.79 \pm 0.0080$ 、アピレース群で  $0.33 \pm 0.016$  であった。モデル作製 7 日後では、コントロール群で  $0.81 \pm 0.020$ 、アピレース群で  $0.74 \pm 0.028$  であった。モデル作製 28 日後では、コントロール群で  $0.44 \pm 0.0053$ 、アピレース群で  $0.21 \pm 0.0058$  であった。すべての群においてコントロール群と比較してアピレース群で有意に低い値を示した。

細胞死の評価では、Stab 周囲の脳皮質に Fluoro-Jade 陽性細胞を認めた。Fluoro-Jade 陽性細胞数はコントロール群で  $86.13 \pm 26.30$  個、アピレース群で  $23.92 \pm 13.67$  個、テトロドトキシン群で  $15.50 \pm 8.14$  個であった。コントロール群と比較してアピレース群とテトロドトキシン群で有意に減少した。一方、Stab 周囲以外の脳皮質、CA1、CA3、Hilus、Stab 直下の被殻には Fluoro-Jade 陽性細胞は認めなかった。

Stab wound injury モデルにおいて、アピレースによって外傷による細胞外液中のグルタミン酸は抑制され、細胞死も抑制された。また、外傷による ATP 放出はニューロン (約 13%)、グリア細胞 (約 87%) 両方から放出されることが分かった。今後頭部外傷後のグリア細胞とニューロンの関与解明にあたり重要な結果と考えられた。

## 2 略語集

ATP: adenosine triphosphate

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EAAC1: excitatory amino acid carrier 1

EAAT4: excitatory amino acid transporter 4

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GLAST: glutamate aspartate transporter

GLT-1: glutamate transporter-1

### 3 緒言

神経系は多数のニューロンが信号をやり取りすることでさまざまな機能を果たしている。ニューロン同士の接合部位をシナプスと呼ぶ。シナプスは、シナプス前細胞神経終末、シナプス後細胞、両者の間のシナプス間隙により構成される。活動電位がシナプス前ニューロン神経終末まで伝わると神経終末の細胞膜は脱分極する。脱分極により電位依存性カルシウムイオンチャネルが開き細胞内にカルシウムが流入する。細胞内カルシウム濃度上昇により神経伝達物質がシナプス間隙に放出される。放出された神経伝達物質はシナプス後細胞のさまざまな受容体に結合し信号が伝達される（図 1）。

中枢神経系における神経伝達物質には多くの種類があり、さらにそれぞれの神経伝達物質に対し複数の種類の受容体が存在している。その中でも、脳内伝達物質にはこれまでの報告でいくつか同定されているが、古くから知られている有名な伝達物質としてグルタミン酸がある。Fluid percussion injury モデルを用いた検討で、外傷直後から細胞外液中に大量のグルタミン酸とカリウムが放出されることが古くから報告されている[1]。これらの放出はテトロドトキシンの投与下では減少するため、ニューロンから放出されるものと考えられている[2]。また、controlled cortical impact injury を用いた研究では、外傷直後から大量にアデノシン三リン酸（adenosine triphosphate: ATP）が細胞外液中に放出されることも報告されている[3]。さらに、外傷や虚血による脳損傷によりアストロサイトが活性化され炎症反応を引き起こすことも報告されている[4]。アストロサイトに刺激が加わると、細胞内のカルシウム濃度が上昇し、細胞外に ATP を放出する[5]。放出された ATP が近隣細胞の P2Y1 受容体に結合し、周辺のアストロサイトを次々と活性化させる。さらに同じ ATP シグナルによりミクログリアの活性化が起こる。集団として活性化することによりアストロサイトはさまざまな反応を励起することで外的刺激に対応していると考えられている。例えばシナプス強度の調整[6]、脳血流の調整[7, 8]、記憶の形成[9]、ミクログリアの活性化[10-12]、などを行っていると考えられている。活性化されたミクログリアは遊走、貪食能を有し、脳内



の死細胞の除去などにあたる。それと同時に大量の炎症性サイトカインの放出、過剰炎症を起こし、グリオシスと呼ばれる線維性変化などの二次損傷反応を引き起こすと言われている[4] (図 2)。2005 年に Davalos らはミクログリアの活性化には ATP シグナルが必須であることを証明した[10]。また Stence らは In vivo モデルで脳に ATP を微小注入すると周辺のミクログリアは活性型に形態変化し、注入部位に遊走してくる現象を報告した[13]。ところが、アピレースという ATP 分解酵素の存在下に ATP を注入してもミクログリアの活性化や遊走は起こらなかった。以上のことから、以前から分かっていたミクログリアの活性化を引き起こすシグナルは ATP であることが判明した[10]。また 2015 年に Allahyari らは Stab wound injury モデルにおいても、アストロサイトが活性化されグリオシスを引き起こすことを報告している[14]。

しかし、近年伝達物質をめぐる概念に統一した見解は得られていない。すなわち、グルタミン酸はニューロンの伝達物質であり、ATP はグリア細胞の伝達物質という単純な概念ではなく、グリア細胞からもグルタミン酸の放出が認められるなど、これまで関与していると考えられていた細胞以外からのさまざまな放出と受容が報告されている[15]。確かに、アストロサイト上には多種の伝達物質受容体が発現している[16]。さらに伝達物質の作用に関しても一定の見解を得ない。同じ伝達物質にも関わらず、シナプス強度を増強したり抑制したりすると報告されている[17-20]。またある報告によると、単一アストロサイト細胞から放出された ATP にも関わらず、アストロサイトの活性レベルにより神経伝達を刺激したり抑制したりすると報告されている[21]。アストロサイトはあらゆる刺激に反応し何らかの調整を行っていると言われている[22-25]。ただし正常シナプス機能において、アストロサイトの放出する ATP がシナプス強度を制御しているという点は統一された見解である[26-28]。

グルタミン酸は古くからニューロンの神経伝達物質として知られており、認知、記憶、学習などの高次脳機能に関与していると言われている[29, 30]。しかし、細胞外の過剰なグルタミン酸は神経毒性を持ち、外傷や虚血における神経細胞死を引き起こす[31, 32] (図 3)。

神経毒性による神経細胞死の機序としては、グルタミン酸受容体過剰活性化、シスチン/グルタミン酸交換輸送体の抑制を介するものが知られている[33]。細胞外グルタミン酸濃度上昇の機序としては、シナプス前終末神経からの過剰なグルタミン酸の放出[34]、グルタミン酸輸送体の取り込み低下[35]、グルタミン酸輸送体の逆作動によるアストロサイトからのグルタミン酸放出[35]、の3つが報告されている。この中でも、グルタミン酸輸送体が正常であれば細胞外グルタミン酸濃度は神経毒性を生じるほど高濃度にならない。そのため、グルタミン酸輸送体の機能が神経毒性の発生に大きく寄与していると考えられている [35]。脳内には4種類のグルタミン酸輸送体 (GLAST、GLT1、EAAC1、EAAT4) があり、GLASTとGLT1は主にアストロサイトに、EAAC1とEAAT4はニューロンに存在している。脳における細胞外グルタミン酸濃度の制御は、アストロサイトに存在するGLAST、GLT1が重要な機能を持っている[36]。特に、脳出血、脳虚血においてはGLT1の機能異常によるグルタミン酸の神経毒性が関与すると報告されている[37-39]。

我々のこれまでの研究において、ラット脳挫傷モデルでのアストロサイトの活性化抑制、ミクログリアの活性化抑制による抗炎症効果を検討し、その結果、炎症性サイトカイン放出の抑制ならびに抗炎症効果を認めた。また、外傷後に細胞外液中にグルタミン酸とATPが放出されることが報告されている[1, 3]。しかし、外傷におけるグルタミン酸とATPの放出来由や相互関係に明確な報告はない。これを解明することで頭部外傷後の病態解明の一助になると考えた。そこで本研究では、これまでの我々の研究とは異なる *Stab wound injury* モデルで、外傷後の細胞外液中のATPとグルタミン酸において、ATP分解酵素であるアピレースを外傷時に用いてATPシグナルが抑制された状態での細胞外液中のグルタミン酸を検討した。もしアストロサイトやニューロンが外傷を受けた時に、ATPシグナルとグルタミン酸に相互関係があるとしたら新知見となりうる。またそれに伴い、細胞外液中のグルタミン酸の変化が細胞死にどう関与するかを検討した。さらに、外傷時にグルタミン酸を放出するとされるニューロンをテトロドトキシンで抑制するとATPの放出はどうかを検討し

た。本研究の仮説は「外傷直後の細胞外液中のグルタミン酸に ATP シグナルが関与している」である (図 4)。

## 4 材料と方法

### 4.1 Stab wound injury モデル

Stab wound injury モデルには 250-300 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した。このモデルは Fujita らによって 1998 年に報告されている[40]。まず、ラットにイソフルレン 4%の吸入麻酔を導入し、十分な麻酔深度を得たのちにイヤバーを用いて定位脳手術装置に固定した。術中の維持麻酔はイソフルレン 2%の吸入麻酔で行った。体温測定プローブを直腸内に挿入し体温パッドで術中体温を 37 度に管理した。皮膚切開部はエタノールを用いて消毒した。10 万倍エピネフリン入り 1%キシロカインを用いて局所麻酔を行った。頭皮を正中切開し、骨膜も同様に切開、剥離し頭蓋骨を露出した。ハイスピードドリルを用いて Bregma から 3 mm 後方、3.5 mm 側方を中心に半径 4 mm の骨窓を設け、硬膜を切開し脳を露出した。27 G 針でくも膜と軟膜を切開し、人工髄液[41]、もしくはアピレース (10 U/ml) [10]、テトロドトキシン溶液 (10  $\mu$ M) [2]、を 30 分間骨窓に満たして浸透させた。各群の薬物投与終了後、ATP 値測定およびグルタミン酸値測定のため、脳内に ATP バイオセンサー (7002: PINNACLE technology, USA、図 5) もしくはグルタミン酸バイオセンサー (7011: PINNACLE technology, USA、図 5) を留置した。留置にはマイクロマニピレーターを用い、各バイオセンサーを脳表から 2 mm の大脳皮質内に留置した。本研究では、バイオセンサーを大脳皮質に挿入することによって Stab を行った。つまり、Stab wound injury モデルは各バイオセンサーを留置することで作製した (図 6)。留置したバイオセンサーを用いて細胞外液中の ATP およびグルタミン酸のピーク値と、そのピーク値と抜去直前のベースライン値の差を測定した。バイオセンサーはキャリブレーションを行い、測定結果から ATP とグルタミン酸の濃度変化を換算した[2, 3]。ATP とグルタミン酸は細胞外、受容体、細胞内それぞれに存在

している。バイオセンサーで測定した結果は、外傷後に細胞外に存在する脳内伝達物質を反映している。測定後、バイオセンサーを抜去し、頭皮を縫合した。

バイオセンサーは、先端に付着している酵素を利用することで分析物を触媒的に処理し  $\text{H}_2\text{O}_2$  を産生する。その  $\text{H}_2\text{O}_2$  から発生する電流を記録している。産生された  $\text{H}_2\text{O}_2$  は分析物の濃度に比例している。

ラットをランダムに表 1 のように群分けを行った。コントロール群は人工髄液を浸透させた。その他は、前述した薬物と濃度を使用し浸透させた。

Western blotting 用の脳検体は、それぞれの群でモデル作製 3 日、7 日、28 日後に 5% イソフルレンを用いて深麻酔し、十分な麻酔深度が得られた後に断頭し脳を摘出した。脳を摘出後、2 mm 間隔に薄切し皮質を摘出した。Western blotting 用の脳検体は凍結乾燥機 (FDU-12AS: AS ONE, JAPAN) で真空乾燥し、乾燥重量の 5 倍量の超純水を加えた。氷上で超音波破碎機を用いて組織を破碎した後、毎分 15,000 回転で 15 分間遠心分離し、上清を -80 度で保存した。

組織染色用の脳検体採取は、Western blotting 用と同様にそれぞれの群でモデル作製 3 日後に行った。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深麻酔した。深麻酔を確認後、開胸し左心室内に留置針を穿刺し、経心臓的に生理食塩水 200 mL で脱血した後に 4% パラホルムアルデヒド溶液 200 mL で灌流固定し脳を摘出した。同じ 4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて 24 時間固定後、10%、20%、30% のスクロース加リン酸緩衝液でそれぞれ 24 時間ずつ段階的にクライオプロテクションを行った。その後液体窒素で瞬間凍結し、組織を -80 度で保存した。

## 4.2 Western blotting

採取した上清検体を 20 倍に希釈し、RC DC Protein assay Kit (5000122JA: Bio-Rad, USA) を用いて総タンパク量を測定した。濃度の測定には吸光度計 (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調整した。1 ウェルあたりの総タンパクとして 27  $\mu\text{g}$  の検体をゲルにローディングした。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 (567-1094: Bio-Rad, USA) を用いて、120 V、400 mA で 60 分間泳動した。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) を使用した。転写には iBlot システム (IB401001: Thermo Fisher Scientific, USA) を使用した。一次抗体反応は、ミクログリアの発現量を定量化するために 500 倍希釈の抗 CD11b 抗体 (bs-1014R: Bioss, USA)、アストロサイトの発現量を定量化するために 20,000 倍希釈の抗 GFAP 抗体 (ab7260: abcam, USA) および内因性コントロールとして 20,000 倍希釈の抗 beta-Actin 抗体 (GTX109639: GeneTex, USA) を使用した。一次抗体感作はそれぞれ 4 度内で 24 時間反応させた。二次抗体反応には 10,000 倍希釈の抗ウサギ IgG 抗体 (AP182P: Millipore, USA) を使用し、室温で 1 時間感作させた。発色には Enhanced chemi lumescence 法 (WP20005: Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、検出器 (ChemiDocXRS: Bio-Rad, USA) にてバンドを検出した。測定には Image Lab ソフトウェア (version 6.0: Bio-Rad, USA) を使用した。結果は目的タンパク/beta-Actin として表示した。

#### 4.3 組織染色

凍結保存したモデル作製 3 日後の脳組織をクライオスタットで 20  $\mu\text{m}$  に薄切し 500  $\mu\text{m}$  ごとに切片を採取した。

細胞死の評価のために Fluoro-Jade 染色を行った。スライドガラス上に組織切片を採取した上で染色を行った。染色には Fluoro-Jade C 染色キット (TR-100-FJT:funakoshi, JAPAN) を使用した。脱水、透徹後にカバースリップした。核染色として 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (TR-100-FJT:funakoshi, JAPAN) を用いた。倍率 40 倍で、Stab 部位、CA1、CA3、

Hilus、Stab 直下の被殻、Stab を加えていない正常大脳皮質を観察し、穿刺部でバイオセンサー先端と思われる部分を中心とした全視野に認める Fluoro-Jade 陽性細胞をカウントした。

#### 4.4 統計解析

統計解析には SPSS statistics (version21:IBM,USA) を使用した。2 群間の比較には t 検定を行った。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 の方法で行った。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 の方法を使用した。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。

### 5 動物取り扱い及び実験における倫理的配慮

実験動物の取り扱い及び実験は、日本大学医学部実験指針を遵守し、日本大学動物実験マニュアルに準じて行った (AP19MED028-1 号)。実験動物の苦痛を最小限にするべく最大限の配慮を行った。実験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% の室内で、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 時間毎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 1 回の講習会を受講している。

### 6 結果

#### 6.1 Stab wound injury 後の細胞外液中 ATP 値測定

Stab 後の細胞外液中の ATP 値をバイオセンサーで測定した。

コントロール群では刺入直後より急激な値の上昇を認め 1 秒以内にピーク値に達した。また、各群でピーク値に差はあるものの、波形の変化やピークへの立ち上がり、潜時に変化はなかった。

コントロール群の ATP ピーク値は  $79.18 \pm 0.29$  nA であった (図 7)。アピレース群でも同様に鋭い上昇を示したがピーク値は低く、 $23.40 \pm 2.92$  nA であった。テトロドトキシン群では、コントロール群と同様に急激な上昇を認め 1 秒以内にピークに達した。テトロドトキシン群の ATP ピーク値は  $69.15 \pm 3.84$  nA であった。コントロール群、アピレース群、テトロドトキシン群それぞれの群間に有意差を認めた (図 8)。

また、ATP ピーク値とバイオセンサー抜去直前のベースライン値との差から濃度変化 ( $\Delta$ ATP) を検討した。コントロール群の  $\Delta$ ATP は  $1.62 \pm 0.42$  nM であった。アピレース群で  $0.094 \pm 0.16$  nM であった。テトロドトキシン群で  $0.31 \pm 0.19$  nM であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意に低い値を示した。一方、アピレース群とテトロドトキシン群間には有意差を認めなかった (図 9)。

## 6.2 Stab wound injury 後の細胞外液中グルタミン酸値測定

Stab 後の細胞外液中のグルタミン酸値をバイオセンサーで測定した。

コントロール群では刺入直後より急激な値の上昇を認め 1 秒以内にピーク値に達した。また、各群でピーク値に差はあるものの、波形の変化やピークへの立ち上がり、潜時に変化はなかった。

コントロール群のグルタミン酸ピーク値は  $44.80 \pm 3.40$  nA であった (図 10)。アピレース群ではコントロール群と比較しピークは低く、グルタミン酸ピーク値は  $32.17 \pm 4.47$  nA であった。テトロドトキシン群ではピークが最も低く、グルタミン酸ピーク値は  $28.04 \pm 2.96$  nA であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意に低い値を示した。一方、アピレース群とテトロドトキシン群間には有意差を認めなかった (図 11)。

また、グルタミン酸ピーク値とバイオセンサー抜去直前のベースライン値との差から濃度変化 ( $\Delta$ Glutamate) を検討した。コントロール群の  $\Delta$ Glutamate は  $0.97 \pm 0.11$  mM であった。アピレース群で  $0.42 \pm 0.063$  mM であった。テトロドトキシン群で  $0.32 \pm 0.072$  mM であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意に低い値を示した。一方、アピレース群とテトロドトキシン群間には有意差を認めなかった (図 12)。

### 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、抗 GFAP 抗体を用いた Western blotting を行った。

GFAP の発現量は、コントロール群でのモデル作製 3 日、7 日、28 日後でそれぞれ  $0.87 \pm 0.033$ 、 $1.09 \pm 0.11$ 、 $0.71 \pm 0.054$  であった (図 13)。アピレース群でのモデル作製 3 日、7 日、28 日後でそれぞれ  $0.42 \pm 0.080$ 、 $0.83 \pm 0.028$ 、 $0.50 \pm 0.024$  であった (図 13)。モデル作製 3 日、7 日、28 日後すべての時点においてコントロール群と比較してアピレース群が有意に低い値を示した (図 13)。

### 6.4 CD11b の定量

ミクログリアの発現を定量化するために、抗 CD11b 抗体を用いた Western blotting を行った。

CD11b の発現量は、コントロール群でのモデル作製 3 日、7 日、28 日後でそれぞれ  $0.79 \pm 0.0080$ 、 $0.81 \pm 0.020$ 、 $0.44 \pm 0.0053$  であった (図 14)。アピレース群でのモデル作製 3 日、7 日、28 日後でそれぞれ  $0.33 \pm 0.016$ 、 $0.74 \pm 0.028$ 、 $0.21 \pm 0.0058$  であった (図 14)。モデル作製 3 日、7 日、28 日後すべての時点においてコントロール群と比較してアピレース群が有意に低い値を示した (図 14)。



## 6.5 Fluoro-Jade 染色

脳挫傷モデルにおいて、遅発性細胞死のピークが3-5日と言われている。そのため、本研究では、Stab wound injury モデルに対してモデル作製3日後で細胞死の評価を行った。モデル作製3日後の脳検体を用いて Fluoro-Jade 染色を行った。Stab を加えたスライスに細胞死が最も多いと考えられるため、そのスライスを中心として前後 500  $\mu\text{m}$  間隔の2スライス、つまり 2 mm の領域で計 5 スライスの Fluoro-Jade 陽性細胞をカウントした (図 15-16)。

各群において、Stab 部位には Fluoro-Jade 陽性細胞を認めた (図 17A-C)。一方、CA1、CA3、Hilus、Stab 直下の被殻、Stab を加えていない正常大脳皮質には Fluoro-Jade 陽性細胞は認めなかった (図 18-21)。コントロール群の Fluoro-Jade 陽性細胞数は  $86.13 \pm 26.30$  個であった (図 22)。アピレース群の Fluoro-Jade 陽性細胞数は少なく  $23.92 \pm 13.67$  個であった (図 22)。テトロドトキシン群の Fluoro-Jade 陽性細胞数は最も少なく  $15.50 \pm 8.14$  個であった (図 22)。コントロール群と比較して、アピレース群、テトロドトキシン群で Fluoro-Jade 陽性細胞数は有意に低い値を示した。

## 7 考察

### 7.1 外傷後の細胞外液中への ATP 放出

頭部外傷後に細胞外液中に ATP が放出されていることはすでに報告されている[3]。外傷という刺激によりアストロサイトが活性化され、カルシウムウェーブを介して大量の ATP シグナルが細胞外液中に放出される[42]。この放出された ATP が隣接するアストロサイトを活性化させるという一連の流れはグリオトランスミッションと呼ばれ[15]、その伝達物質は ATP であると考えられている。活性化されたアストロサイトの異常増殖はグリオシスを引き起こし、脳に瘢痕を形成する。また ATP シグナルによりミクログリアも活性化され、さまざまな炎症性サイトカインを放出するとされており、これも脳の二次損傷に大きく関与している[43]。一方近年、ニューロンの脳内伝達物質としても ATP が使われていると考え

られるようになってきた[15]。しかしながら、外傷直後の ATP 放出がニューロン由来なのか、アストロサイト由来なのか、もしくは両方からの放出なのか、そうであればどれぐらいの割合で放出されているのかに関しては解明されていない。

本研究の結果から、テトロドトキシンによりニューロンの作用を抑制したところ、細胞外液中の ATP ピーク値、濃度変化ともにコントロール群と比較して有意に低下した。これは外傷直後の ATP 放出には少なくともニューロン由来のものがあることを示している。テトロドトキシン群の ATP ピーク値はコントロール群の 87.3%であり、この Stab wound injury モデルでは約 13%がニューロン由来であると考えられた。アピレース群の ATP 値は低い値を示しているが、これは ATP の放出が抑制されていることを示していない。ATP が分泌されていたとしてもすぐに分解されてしまうためこの結果になっていることを明記しておく。

GFAP ならびに CD11b の発現は、コントロール群と比較してアピレース群では、モデル作製 3 日、7 日、28 日後のすべてで有意に低い値を示した。これはアピレースによるアストロサイト活性化の抑制を意味している。さらに、モデル作製 3 日後と 7 日後で比較すると、GFAP はコントロール群、アピレース群ともに 3 日後から 7 日後にかけて上昇し、7 日後から 28 日後にかけて低下している。これは少なくともモデル作製 3 日後よりも 7 日後の方がアストロサイトの活性化が進んでいることを示唆している。モデル作製 7 日後以前、もしくは以降に GFAP、CD11b のピークがあるかは本研究では結論できなかった。しかし少なくとも外傷後 7 日まではアストロサイトの活性化は進んでおり、この間の治療介入が二次性脳損傷を防ぐ一助になると考えられる。また受傷時点での ATP シグナルの抑制のみで 28 日間にわたり効果が持続するという点は外傷受傷後超急性期の治療が非常に重要であることを示している。

## 7.2 外傷後の細胞外液中へのグルタミン酸放出

グルタミン酸は神経終末のシナプス小胞に蓄えられている。神経活動時には、神経終末に流入するカルシウムイオンシグナルによりシナプス小胞と前シナプス膜が癒合する。これによりシナプス間隙にグルタミン酸が放出され、後シナプスに存在する受容体に結合することで情報が伝達される[44]。その後、シナプス間隙のグルタミン酸はアストロサイトに存在するグルタミン酸輸送体である GLT-1、GLAST によって再取り込みされることで、シナプス間隙のグルタミン酸濃度が異常高値になることを防いでいる。何らかの障害によってこのサイクルがうまく作用しなかった場合、ニューロンは高濃度のグルタミン酸に暴露され続けることになり、これが神経細胞死につながると言われている[31]。

テトロドトキシンにより外傷後のグルタミン酸放出が減少することは古くから知られている[2]。しかし本研究の結果から、アピレースの投与でも細胞外液中グルタミン酸が抑えられることが明らかとなった。正常シナプスでは、特に記憶の形成などの際 ATP シグナルがシナプス強度を調整していることが判明している[26-28]。外傷後の細胞外液中グルタミン酸は単にニューロンが制御不能に陥っているのではなく、ATP を介したシグナル伝達に関与していることを示している。今後、どの細胞がどのような制御を行い、何を分泌しているのかの解明が望まれる。

### 7.3 ATP とグルタミン酸の相互関係

$\Delta$ ATP の結果で、外傷後の細胞外液中の ATP は、テトロドトキシン群ではコントロール群と比較して有意に低下した。ATP ピーク値と同様に、外傷直後の ATP 放出は少なくともニューロン由来のものがあることを示している。

$\Delta$ Glutamate の結果で、テトロドトキシン群はコントロール群と比較して有意に低下した。テトロドトキシン群はニューロンを抑制しており、テトロドトキシン群における細胞外液中のグルタミン酸は、アストロサイトから放出されたものと考えられる。また、アピ

レース群も同様にコントロール群と比較して有意に低下した。この低下は、外傷により放出された細胞外液中 ATP を抑制することでグルタミン酸が低下したものと考えられる。

外傷によりアストロサイトから ATP が放出され、その ATP が次々にアストロサイトを活性化していく。またアストロサイトはグルタミン酸輸送体 (GLAST、GLT1) を利用し、細胞外液中グルタミン酸の再取り込みを行うことで濃度を制御している。我々のラット脳挫傷モデルの研究において、アストロサイトの活性化抑制やミクログリアの活性化抑制が炎症性サイトカイン放出の抑制ならびに抗炎症効果につながるということが分かっている。本研究ではこれまでの我々の研究とは異なる Stab wound injury モデルを用いて外傷後の変化について同様の検討を行った。Western blotting でのアストロサイトの定量、ミクログリアの定量では、アピレース群において抗炎症作用を認めた。外傷によりグルタミン酸トランスポーターは機能障害を引き起こす。アピレースによって脳損傷を軽減することでグルタミン酸トランスポーター機能低下を抑え、グルタミン酸の再取り込みが可能となったと考えられる。この結果、アピレース群でのグルタミン酸はコントロール群と比較して有意に低下したものと考えられた。

本研究に使用した Stab wound injury モデルにおける伝達物質の測定では、必ず Stab を加えなければならない。そのため、Stab のない状態での伝達物質の測定が不可能である。また、ニューロン抑制や ATP 分解を目的に薬物投与を行っているが、細胞外液中のグルタミン酸と ATP の変化による影響を検討しているものであり、各伝達物質の受容体結合以降のカスケードに関しては本研究では言及できない。

#### 7.4 頭部外傷と遅発性細胞死

脳損傷は一次性脳損傷と二次性脳損傷に分けられる。頭部に加わった外力が強ければ強いほど瞬時に細胞破壊が起こる。これを一次性細胞障害と呼ぶ。一次性細胞障害部位の周辺には、外傷が加わったその時点では細胞死を免れた細胞も、時間経過とともに二次性細胞障

害が引き起こされる[45]。二次性細胞障害の原因としては、酸化ストレス[46-49]、興奮性アミノ酸放出[50]、炎症性サイトカインの放出[43]、などがあげられる。一次性細胞障害は、外傷を受けたときに決定してしまうため、頭部外傷の治療は二次性細胞障害をいかに防ぐかが重要になってくる。

外傷直後に、グルタミン酸が細胞外液中に大量に放出されることはすでに報告されている[51-53]。このグルタミン酸の細胞毒性により細胞死が引き起こされる[54]。脳挫傷モデルにおいては、時間経過によって細胞外液中のグルタミン酸濃度が正常化したとしても細胞死が継続し、そのピークは外傷後 3-5 日と言われている[55]。また、遅発性細胞死の原因の一つとして外傷直後から生じる炎症反応があげられる[56]。前述のとおり、グリオトランスミッションにより細胞外液中に放出された ATP によってアストロサイトは次々と活性化されていく[57]。アストロサイトから放出された ATP が不活性型ミクログリアの P2 受容体に結合することでミクログリアが活性化する[58]。つまり、ミクログリアの活性化はアストロサイトが制御していると言える。活性化されたミクログリアからさまざまな炎症性サイトカインが放出される[43]。頭部外傷によって過剰な炎症反応が生じることで遅発性神経細胞死が引き起こされる。これら神経細胞死は、ネクロシスによるもの、アポトーシスによるもの、オートファジーによるものの可能性が提唱されているが、統一した見解はない[59-61]。一部の活性化したアストロサイトは経時的に異常増殖することでグリオシスを引き起こし[62]、神経再生の妨げになると言われている[63]。また、急性期のアストロサイトの増加は GFAP の増加と相関すると考えられている[64]。グリオシスは他にてんかん焦点にもなるため、これまでグリオシスの抑制に関するさまざまな研究、検討が行われている[65, 66]。

本研究の組織染色の結果から、モデル作製 3 日後の脳検体において、アピレース群ではコントロール群に比べて Fluoro-Jade 陽性細胞が有意に減少している。これは、細胞外液中グルタミン酸が抑制されたことに最も起因すると考えられた。しかし本研究では、外傷により細胞外液中に放出されたグルタミン酸がどの程度イオンチャネル型受容体、代謝活性

型受容体を介して細胞内に取り込まれ細胞死につながるかは結論できなかった。細胞外液中グルタミン酸がどの程度細胞内に取り込まれるかは不明だが、アピレースによる ATP 分解により細胞外液中グルタミン酸を抑制することが細胞死抑制につながっていると考えられた。また、アピレース群では炎症反応も抑制されており、外傷後に生じる過剰な炎症による細胞死が制御できている可能性もある。グルタミン酸が直接的にグリオトランスミッションに関与しているかどうかは言及できないが、少なくともアピレースによる脳損傷軽減がグルタミン酸再取り込み抑制を低減させ、細胞死の抑止につながると考えられた。つまり、頭部外傷へのアピレースの投与は ATP シグナルを抑制し、グルタミン酸毒性の低減と抗炎症反応の二つの観点から二次性脳損傷治療、病態解明に寄与すると考えられた。本研究ではモデル作製 3 日後以前に関しては結論できておらず、Stab wound injury モデルにおける遅発性細胞死のピークに関しては今後の検討課題である。

テトロドトキシン群ではニューロンを抑制することでグルタミン酸の細胞外液中への放出を抑制できる。そのためテトロドトキシン群ではコントロール群と比較して、神経細胞死は有意に減少した。アピレース群とテトロドトキシン群で比較すると、細胞死数に有意な差は認めなかった。すなわち、テトロドトキシンの効果をアピレースで再現できるものであった。テトロドトキシンは低濃度でも選択的に電位依存性ナトリウムチャンネルを阻害する[67]。そのため、さまざまな研究で幅広く使用されている。その一方で、テトロドトキシンはフグ毒に代表されるように、全身性に投与すると最悪の場合呼吸筋麻痺により死に至る非常に危険な毒物であり、臨床への応用に関しては期待できない。したがって、今後さまざまな検討は必要であるが、本研究で用いたアピレースは、頭部外傷後の二次性脳損傷の治療薬候補として検討するものである。

## 8 結論

アピレースによる ATP シグナルが抑制された状態での Stab wound injury では、細胞外液中のグルタミン酸が抑制され、さらに細胞死も抑制された。

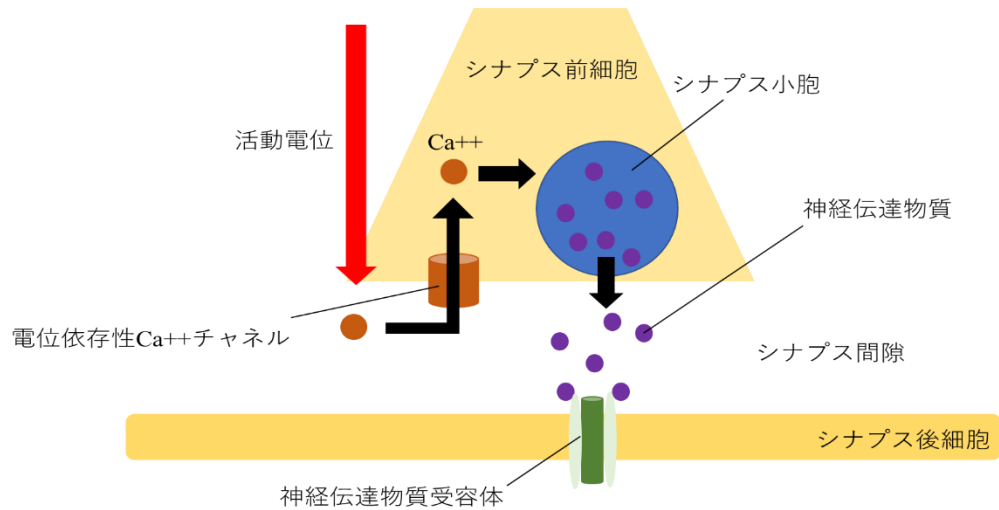
## 9 謝辞

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に深く感謝申し上げます。



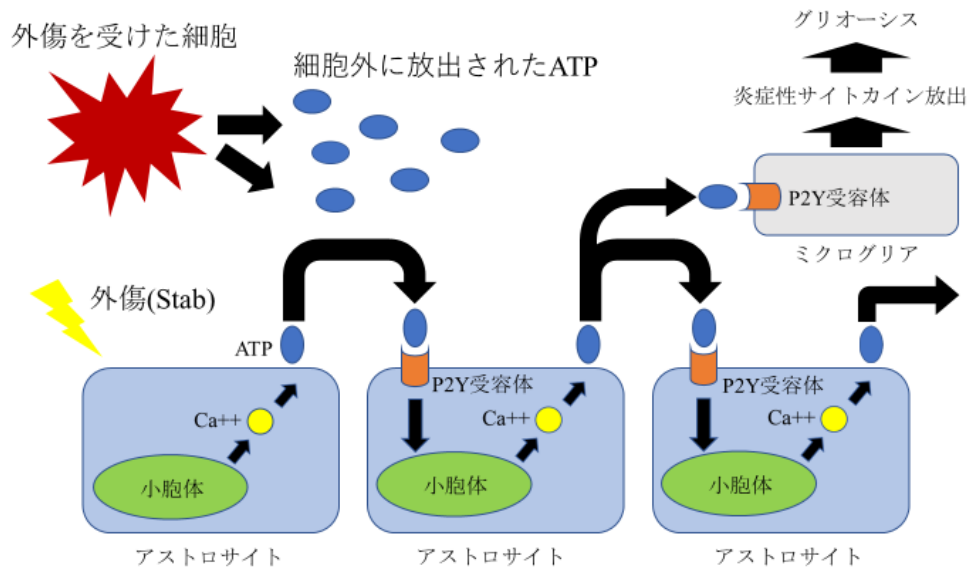
## 10 図表

図1 シナプスの構造



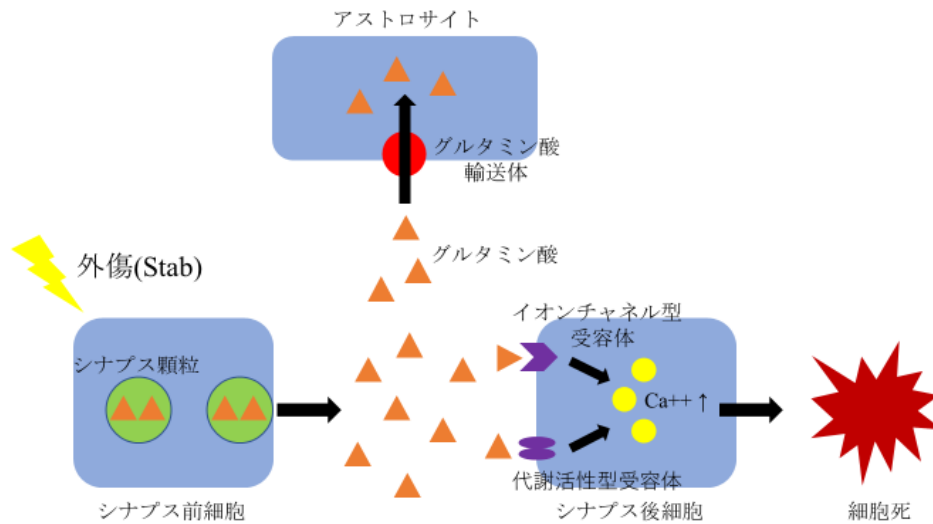
活動電位により神経終末の細胞膜が脱分極し、電位依存性カルシウムチャンネルが開くことでカルシウムが細胞内に流入する。シナプス小胞より神経伝達物質がシナプス間隙に放出され、シナプス後細胞のさまざまな受容体に結合し信号伝達を行う。

図2 外傷と ATP の関係



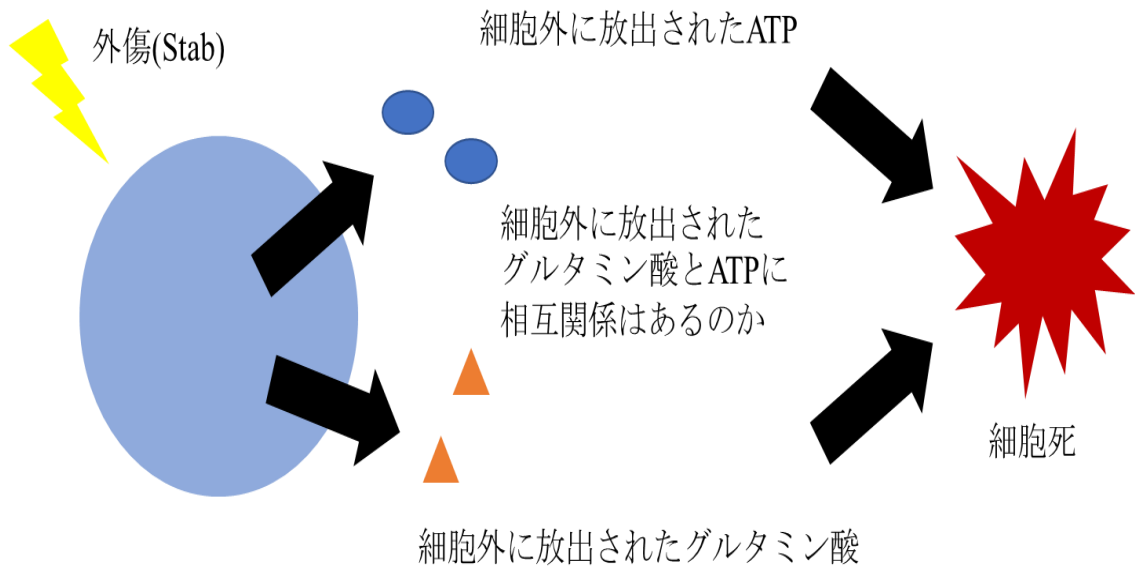
外傷 (Stab) によりアストロサイトに刺激が加わると細胞内カルシウム濃度が上昇し細胞外液中に ATP を放出する。放出された ATP が隣接アストロサイトの P2Y 受容体に結合し、小胞体からカルシウムが細胞内に放出される。また、放出された ATP によりミクログリアが活性化され、炎症性サイトカインを放出し、グリオシスを引き起こす。本研究では、外傷後の細胞外液中の ATP を測定しているが、細胞内 ATP、あるいは細胞外に放出された ATP が受容体に結合した後のカスケードへの影響に関しては言及できない。

図3 外傷とグルタミン酸の関係



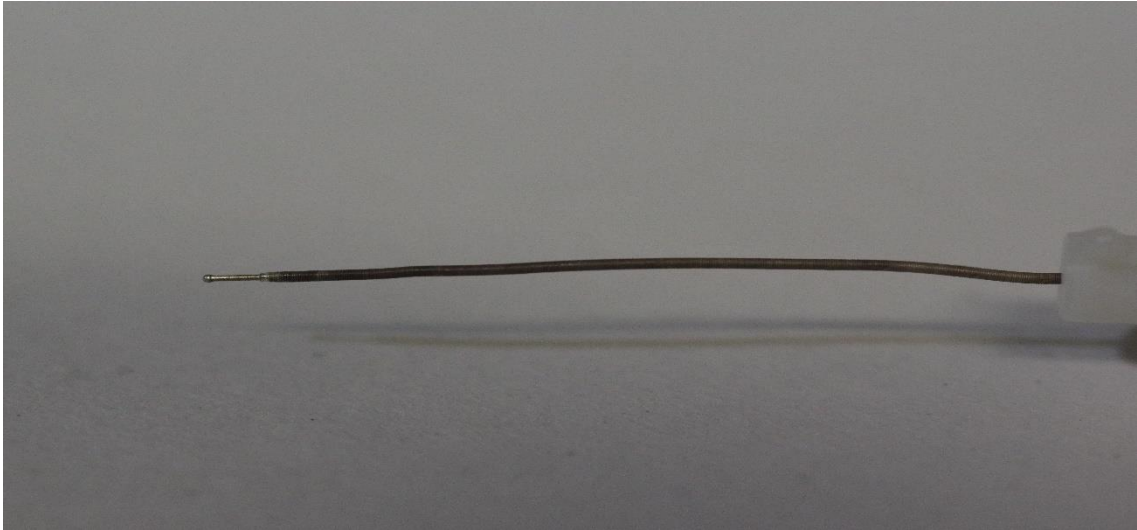
外傷（Stab）によってシナプス前細胞からグルタミン酸が異常流出する。グルタミン酸はイオンチャネル型受容体、代謝活性型受容体によりシナプス後細胞に取り込まれ、細胞内カルシウム濃度が上昇し細胞死を引き起こす。また、放出されたグルタミン酸は、アストロサイト上のグルタミン酸輸送体により細胞内へ取り込まれる。本研究では、外傷後の細胞外液中のグルタミン酸を測定しているが、細胞内グルタミン酸、あるいは細胞外に放出されたグルタミン酸が受容体に結合した後のカスケードへの影響に関しては言及できない。

図4 仮説



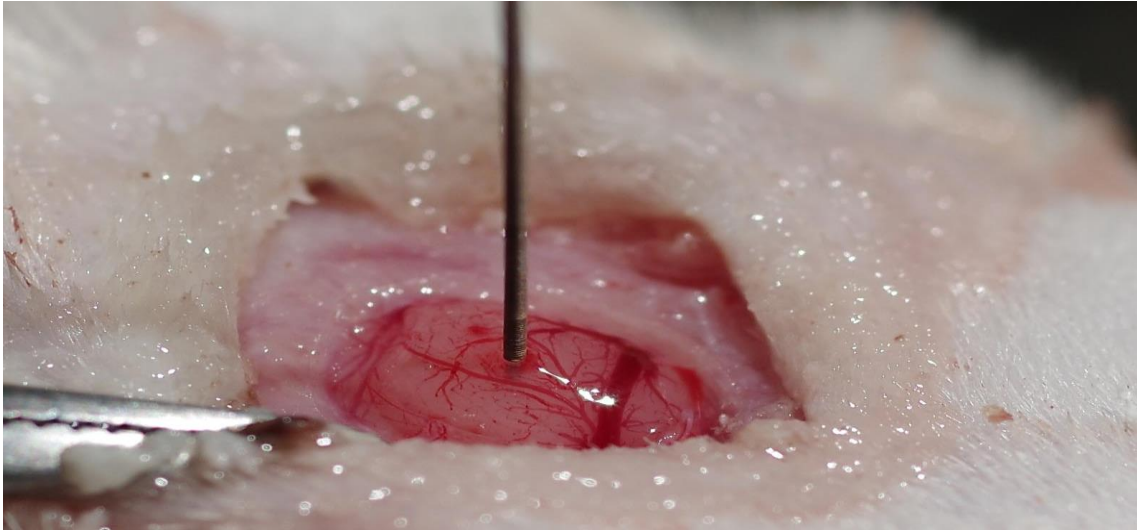
外傷 (Stab) により、細胞外液中にグルタミン酸と ATP が放出される。そこで「外傷直後の細胞外液中のグルタミン酸に ATP シグナルが関与している」という仮説を立てた。

図5 使用したバイオセンサー



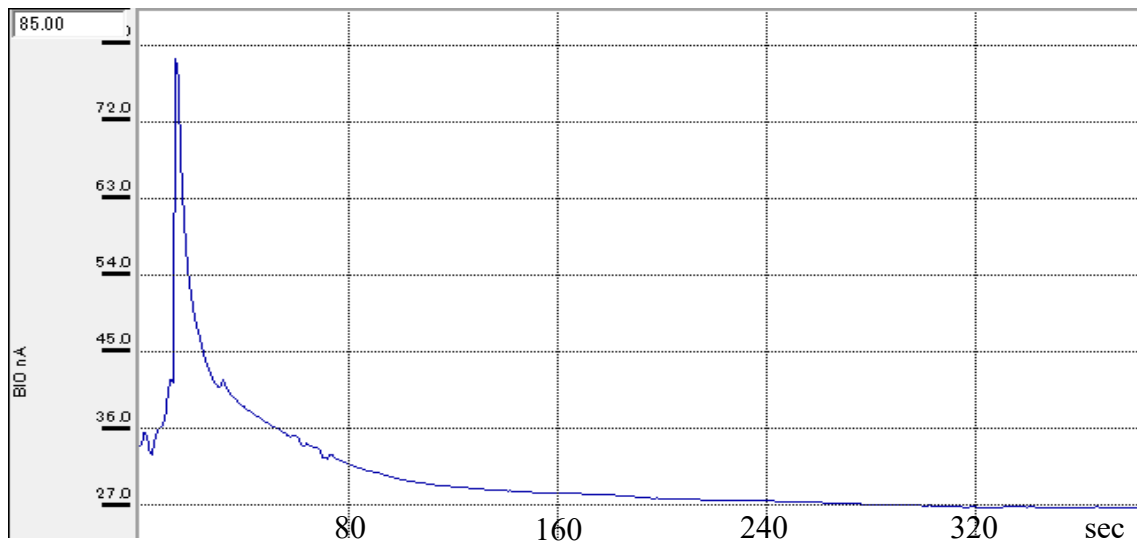
バイオセンサーをマイクロマニピレーターを用いて大脳皮質に穿刺した。

図 6 実際の Stab wound injury モデル作製



バイオセンサーを大脳皮質に挿入することで Stab wound injury モデルを作製した。

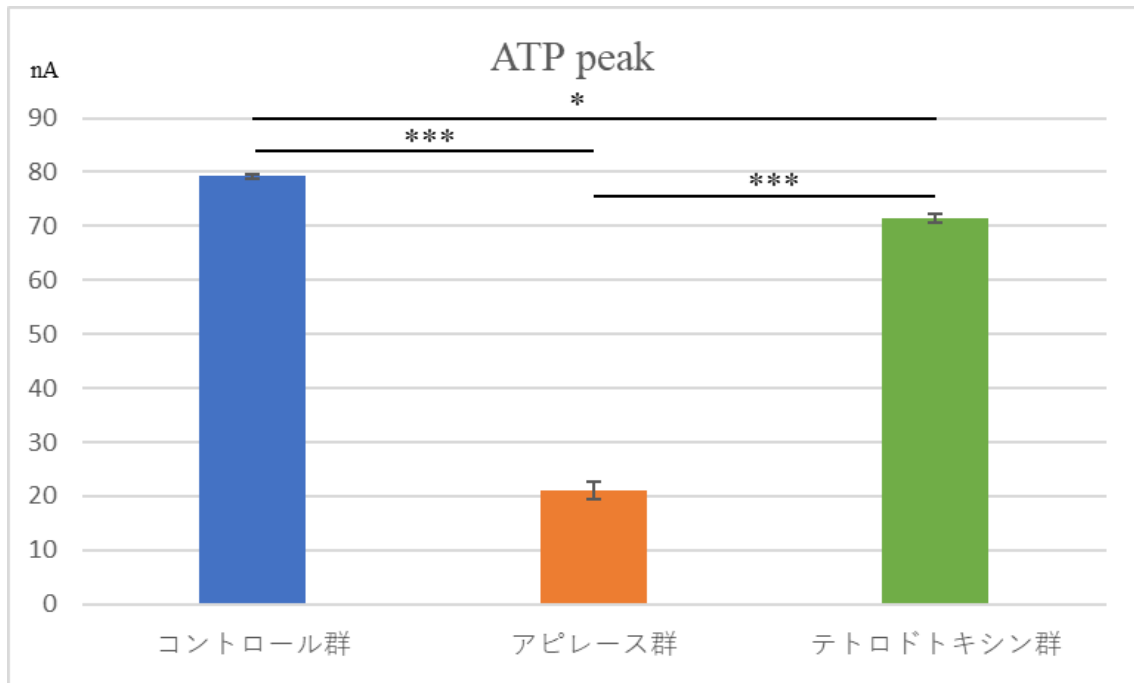
図7 コントロール群の ATP 値測定



コントロール群では、ATP ピーク値は  $79.18 \pm 0.29$  nA であった。

濃度変化 ( $\Delta$ ATP) はコントロール群で  $1.62 \pm 0.42$  nM であった (n=6)。

図 8 Stab wound injury モデルにおける細胞外液中の ATP ピーク値の比較

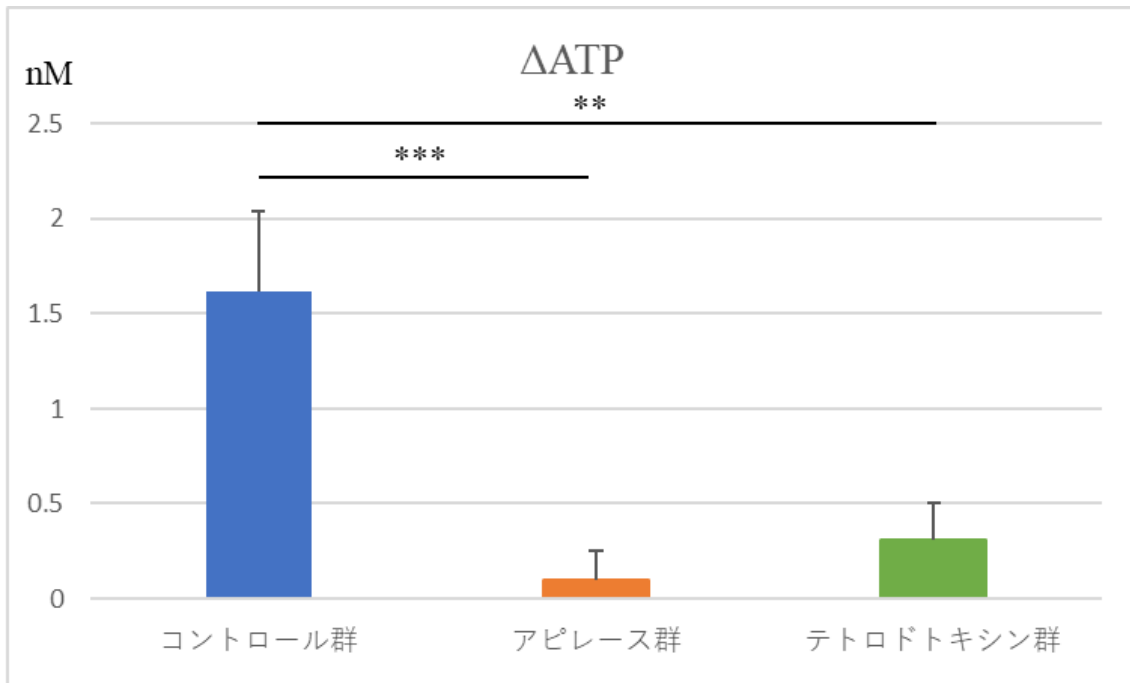


\*:p<0.05、\*\*\*:p<0.001

ATP ピーク値はコントロール群で  $79.18 \pm 0.29$  nA、アピレース群で  $23.40 \pm 2.92$  nA、テトロドトキシン群で  $69.15 \pm 3.84$  nA であり、3 群間に有意差を認めた。



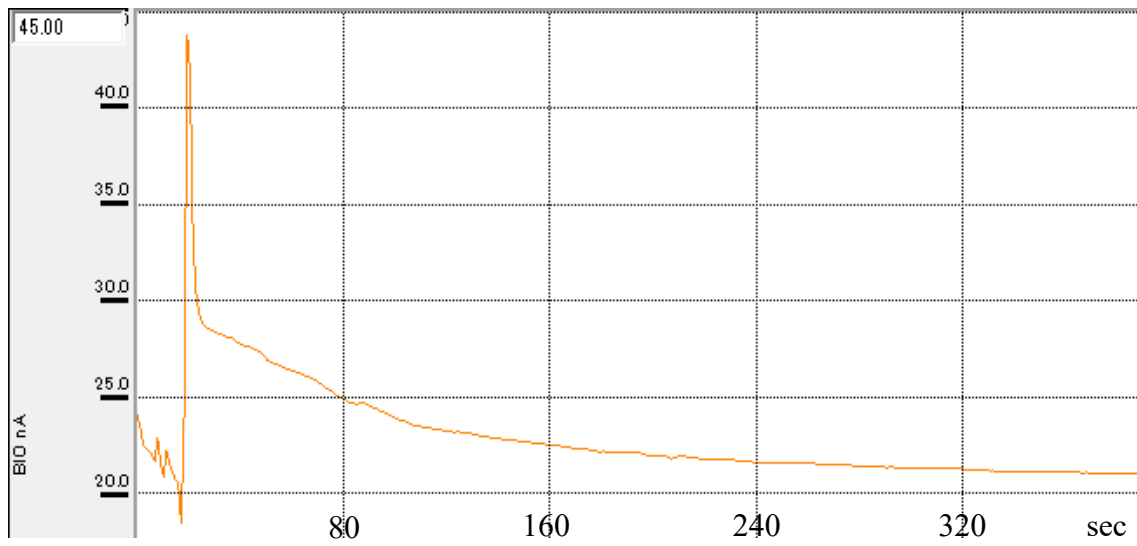
図9 Stab wound injury モデルにおける細胞外液中 ATP の濃度変化



\*\*: $p < 0.01$  \*\*\*: $p < 0.001$

$\Delta$ ATP はコントロール群で  $1.62 \pm 0.42$  nM、アピレース群で  $0.094 \pm 0.16$  nM、テトロドトキシン群で  $0.31 \pm 0.19$  nM であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意に低い値を示した。一方、アピレース群とテトロドトキシン群間には有意差を認めなかった。

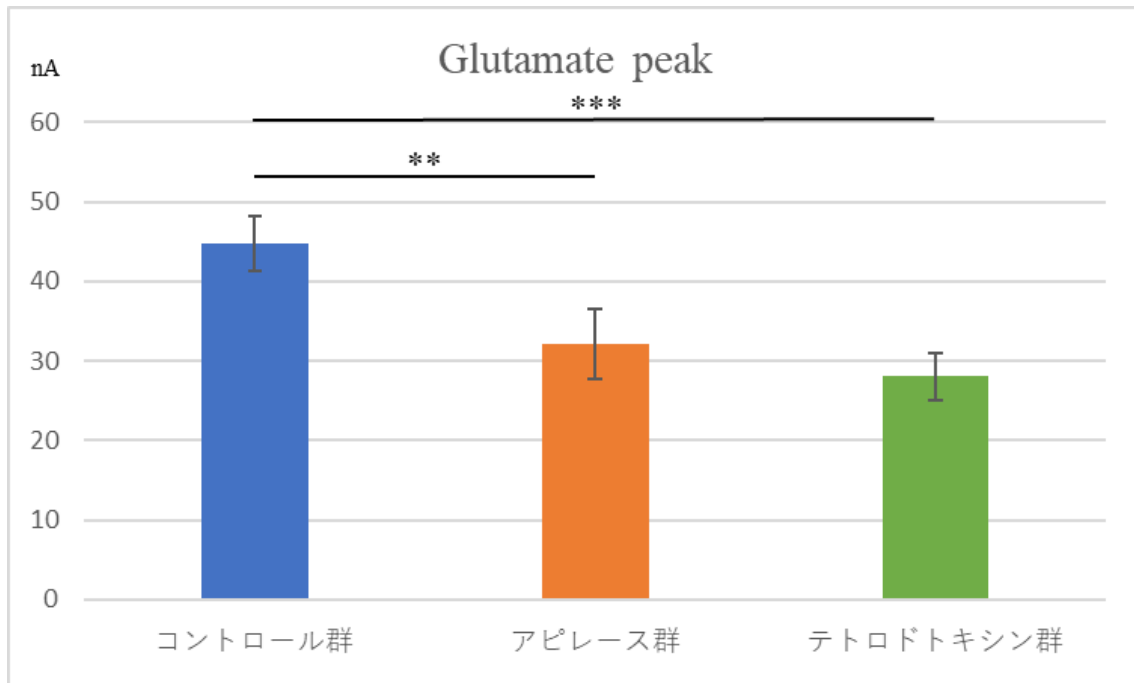
図 10 コントロール群のグルタミン酸値測定



コントロール群では、グルタミン酸ピーク値は  $44.80 \pm 3.40$  nA であった。

濃度変化 ( $\Delta$ Glutamate) はコントロール群で  $0.97 \pm 0.11$  mM であった (n=6)。

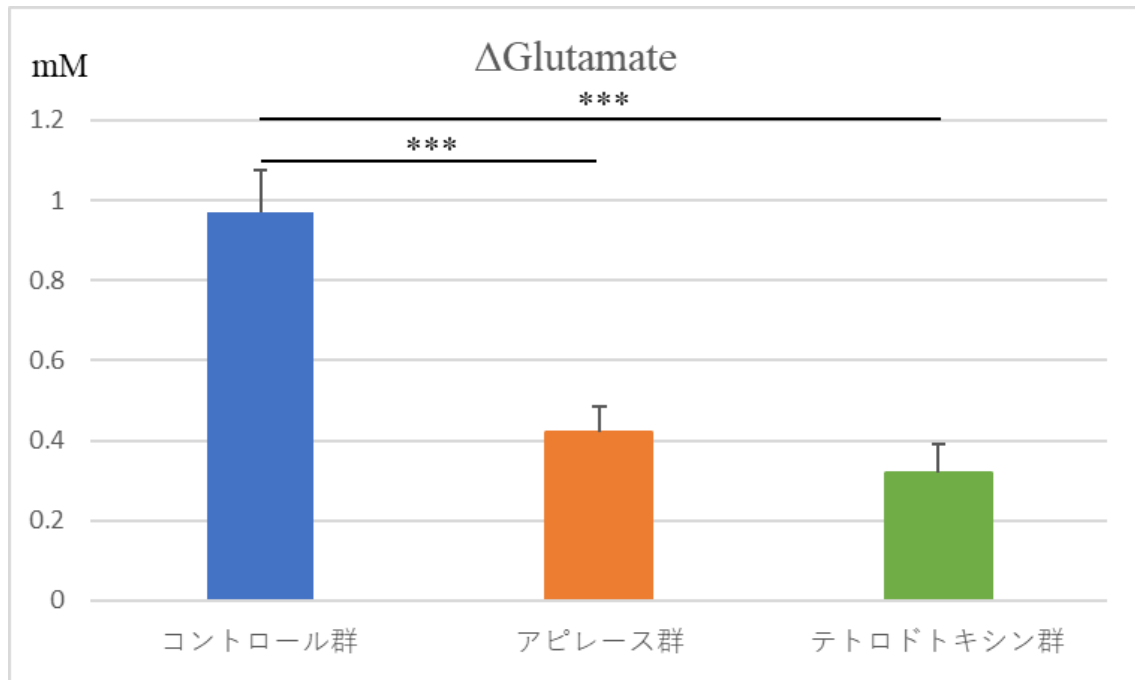
図 11 Stab wound injury モデルにおける細胞外液中のグルタミン酸ピーク値の比較



\*\*: $p < 0.01$  \*\*\*: $p < 0.001$

グルタミン酸ピーク値は、コントロール群で  $44.80 \pm 3.40$  nA、アピレース群で  $32.17 \pm 4.47$  nA、テトロドトキシン群で  $28.04 \pm 2.96$  nA であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシン群で有意差を認めた。アピレース群とテトロドトキシン群間で有意差は認めなかった。

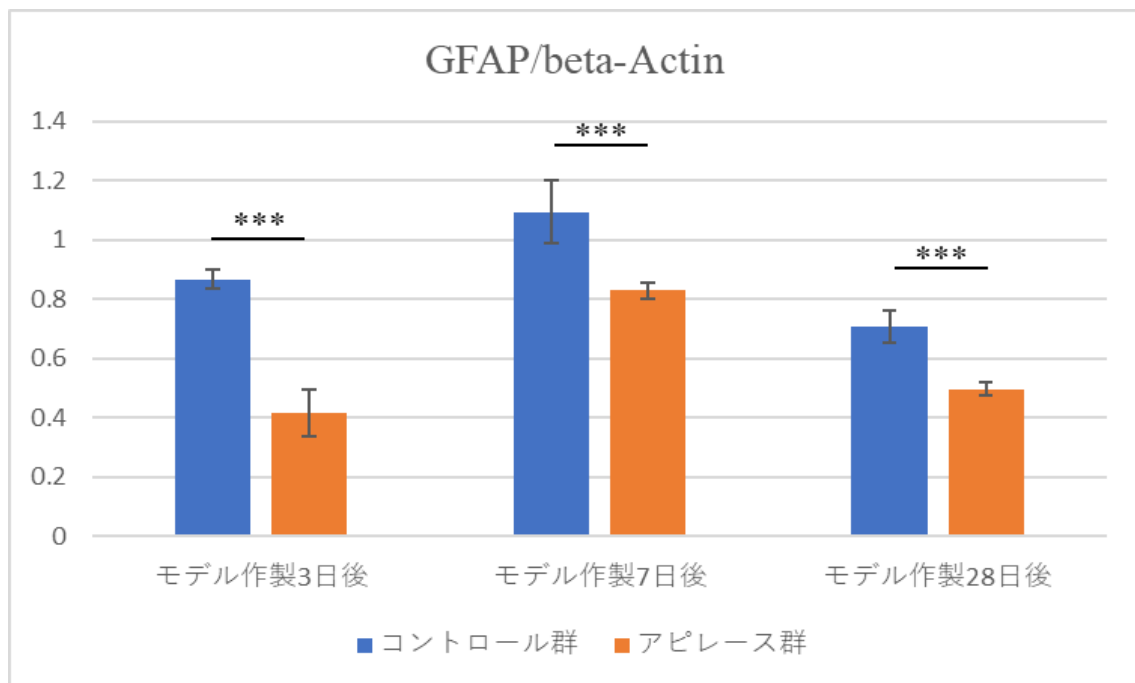
図 12 Stab wound injury モデルにおける細胞外液中グルタミン酸の濃度変化



\*\*\*:p<0.001

ΔGlutamate はコントロール群で  $0.97 \pm 0.11$  mM、アピレース群で  $0.42 \pm 0.063$  mM、テトロドトキシシン群で  $0.32 \pm 0.072$  mM であった。コントロール群と比較してアピレース群、テトロドトキシシン群で有意に低い値を示した。一方、アピレース群とテトロドトキシシン群間には有意差を認めなかった。

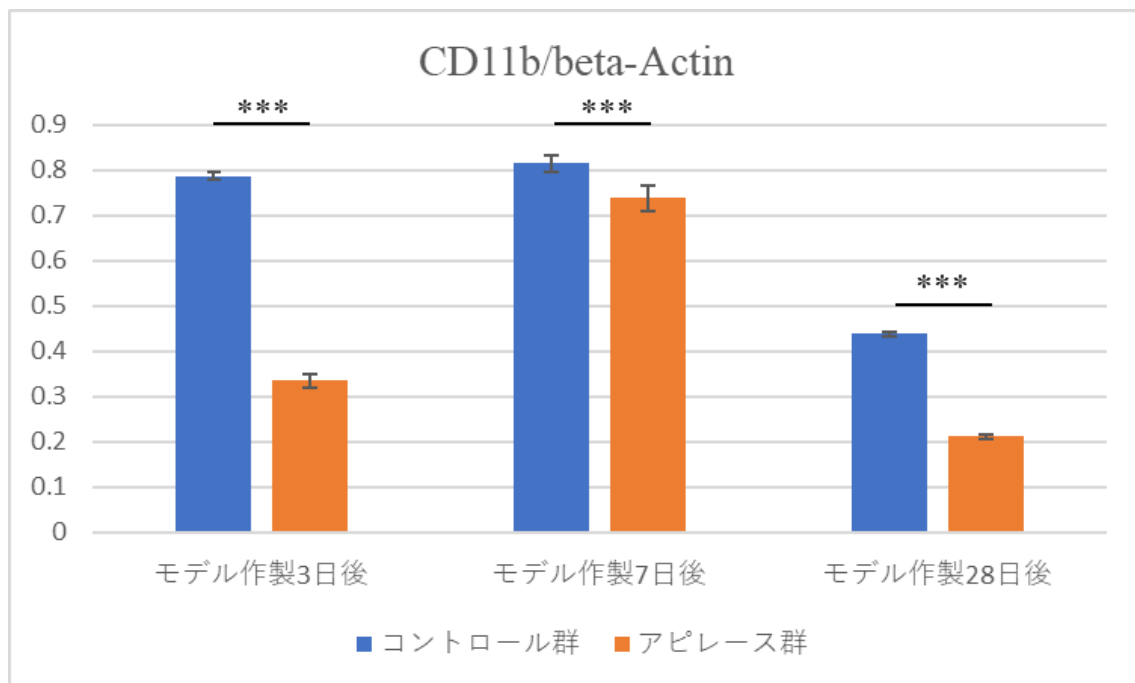
図 13 Stab wound injury 周囲大脳皮質における抗 GFAP 抗体を用いた Western blotting



\*\*\*:  $p < 0.001$

GFAP の発現量は、モデル作製 3 日後では、コントロール群で  $0.87 \pm 0.033$ 、アピレース群で  $0.42 \pm 0.080$  であった。モデル作製 7 日後では、コントロール群で  $1.09 \pm 0.11$ 、アピレース群で  $0.83 \pm 0.028$  であった。モデル作製 28 日後では、コントロール群で  $0.71 \pm 0.054$ 、アピレース群で  $0.50 \pm 0.024$  であった。すべての時点においてコントロール群と比較してアピレース群が有意に低い値を示した。

図 14 Stab wound injury 周囲大脳皮質における抗 CD11b 抗体を用いた Western blotting

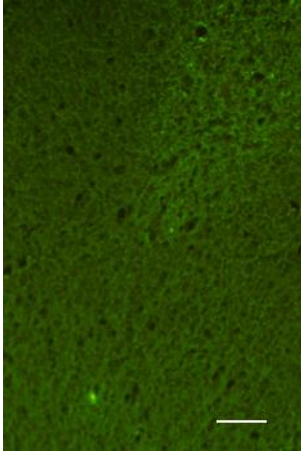


\*\*\*:p<0.001

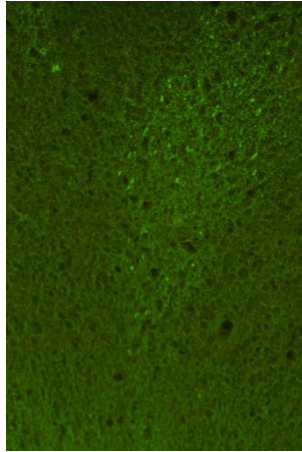
CD11b の発現量は、モデル作製 3 日後ではコントロール群で  $0.79 \pm 0.0080$ 、アピレース群で  $0.33 \pm 0.016$  であった。モデル作製 7 日後では、コントロール群で  $0.81 \pm 0.020$ 、アピレース群で  $0.74 \pm 0.028$  であった。モデル作製 28 日後では、コントロール群で  $0.44 \pm 0.0053$ 、アピレース群で  $0.21 \pm 0.0058$  であった。すべての時点においてコントロール群と比較してアピレース群が有意に低い値を示した。

図 15 Fluoro-Jade 染色 穿刺部とその周囲の Fluoro-Jade 染色陽性細胞 (倍率: 40 倍)

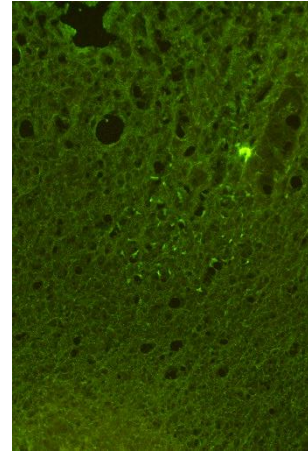
穿刺部-2



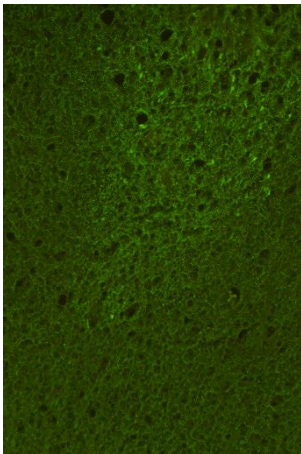
穿刺部-1



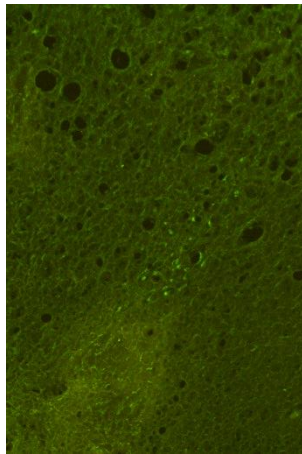
穿刺部



穿刺部+1



穿刺部+2

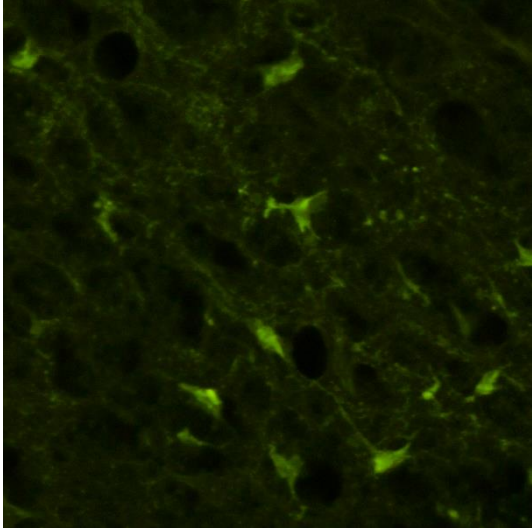


スケールバー: 100  $\mu$ m

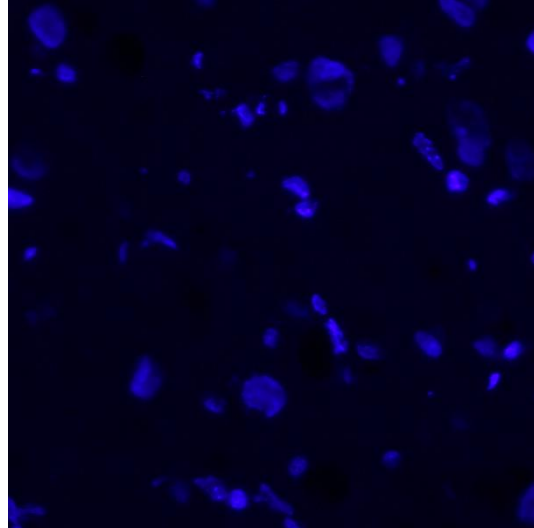
穿刺部を中心として 500  $\mu$ m 幅に計 5 スライス、大脳皮質 2 mm の領域の Fluoro-Jade 染色。  
穿刺部の Fluoro-Jade 陽性細胞と比較して、中心から外れるほど Fluoro-Jade 陽性細胞数は減少する。

図 16 Fluoro-Jade 染色 拡大した Fluoro-Jade 染色陽性細胞 (倍率: 80 倍)

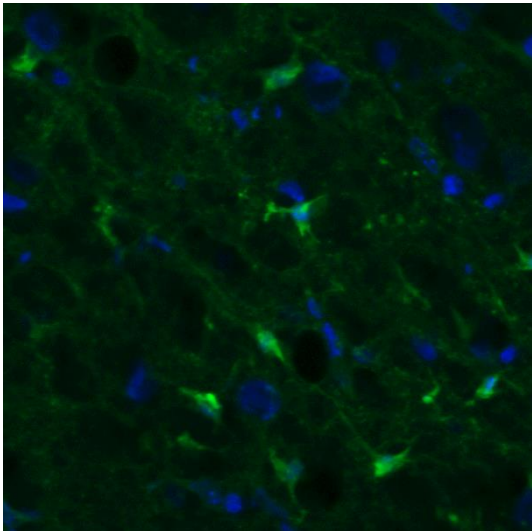
Fluoro-Jade



DAPI



Merge

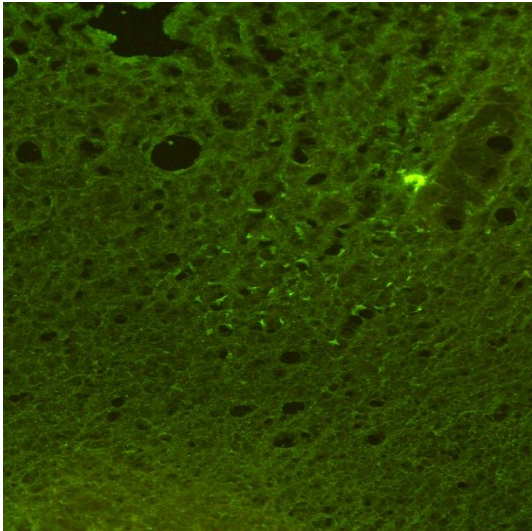


Fluoro-Jade 陽性細胞の拡大写真。細胞体は長い突起を有し、ニューロンと思われる。

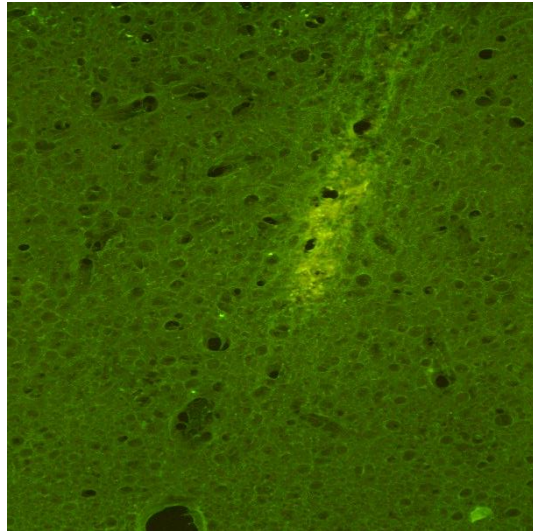


図 17 Fluoro-Jade 染色 各群における Stab 部位 (倍率: 80 倍)

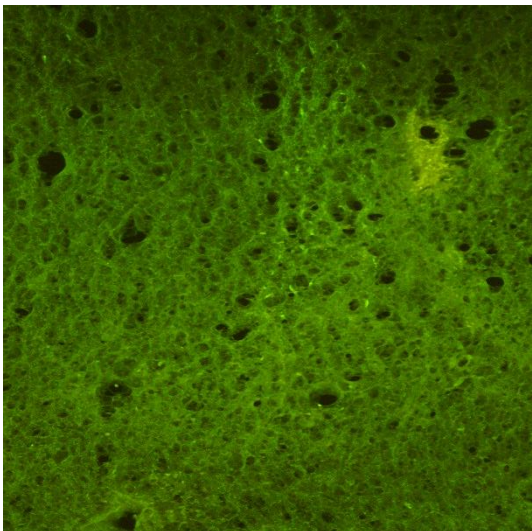
A コントロール群



B アピレース群



C テトロドトキシン群



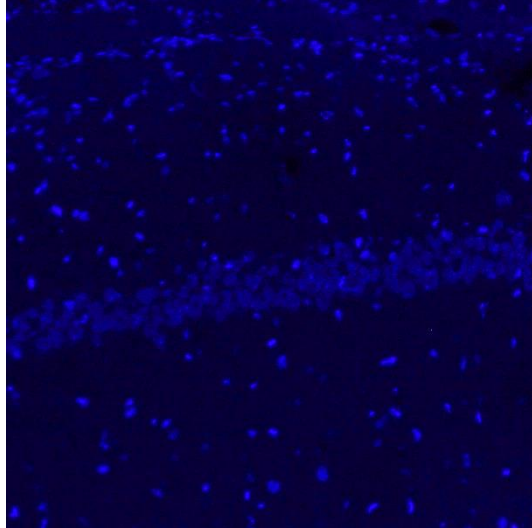
各群 Stab を加えた部分に沿って Fluoro-Jade 染色陽性細胞が確認できる。コントロール群と比較してアピレース群とテトロドトキシン群で Fluoro-Jade 陽性細胞は少ない。

図 18 Fluoro-Jade 染色 CA1 (倍率: 80 倍)

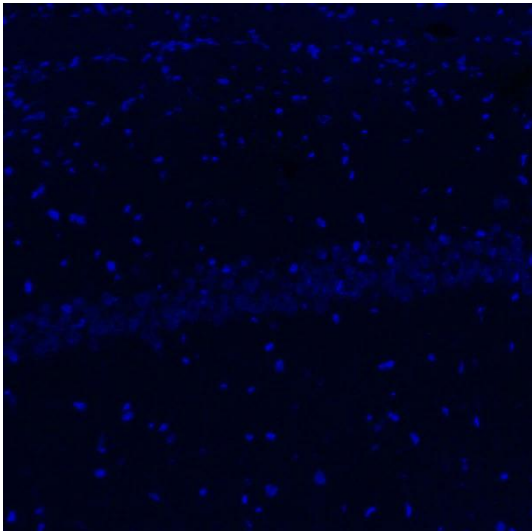
Fluoro-Jade



DAPI



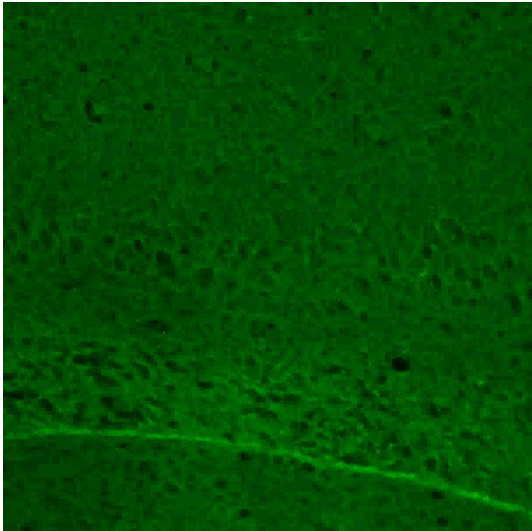
Merge



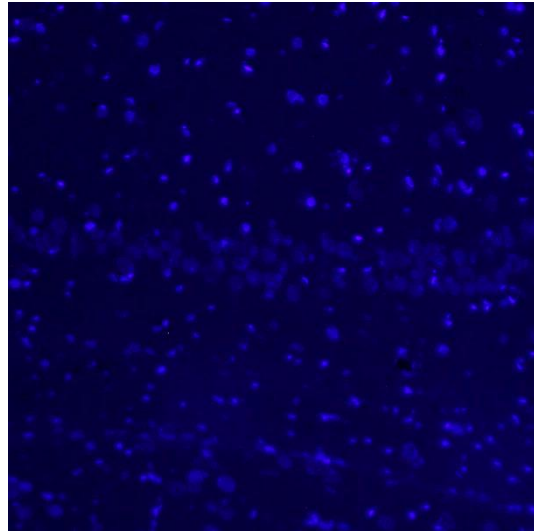
CA1 には Fluoro-Jade 陽性細胞は認めない。

図 19 Fluoro-Jade 染色 CA3 (倍率: 80 倍)

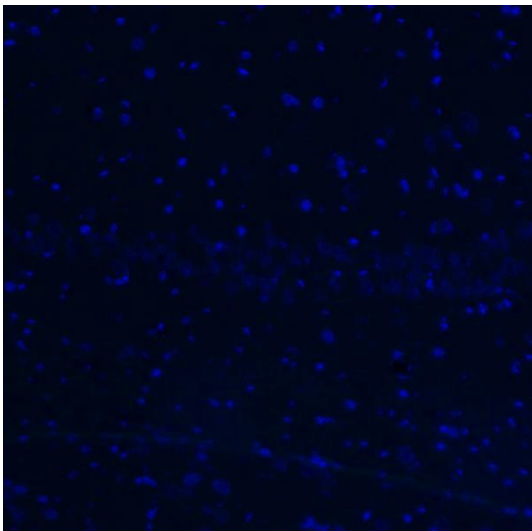
Fluoro-Jade



DAPI



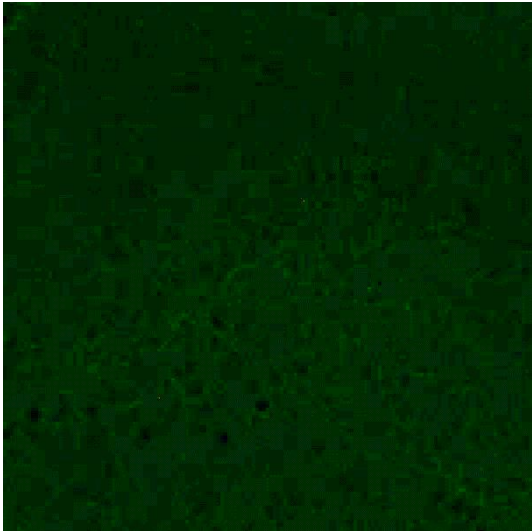
Merge



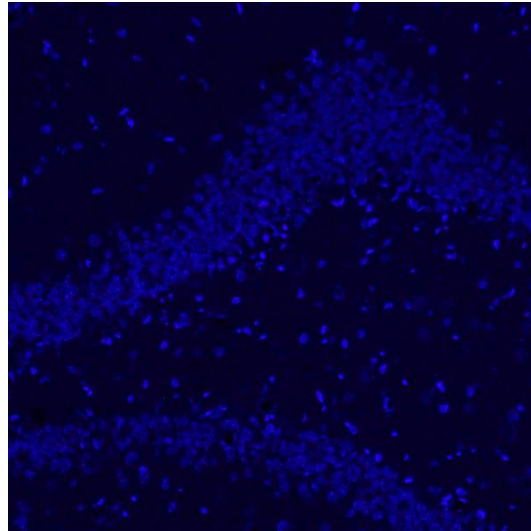
CA3 には Fluoro-Jade 陽性細胞は認めない。

図 20 Fluoro-Jade 染色 Hilus (倍率: 80 倍)

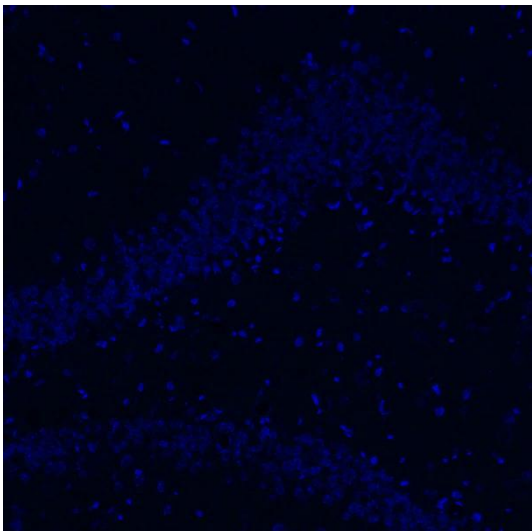
Fluoro-Jade



DAPI



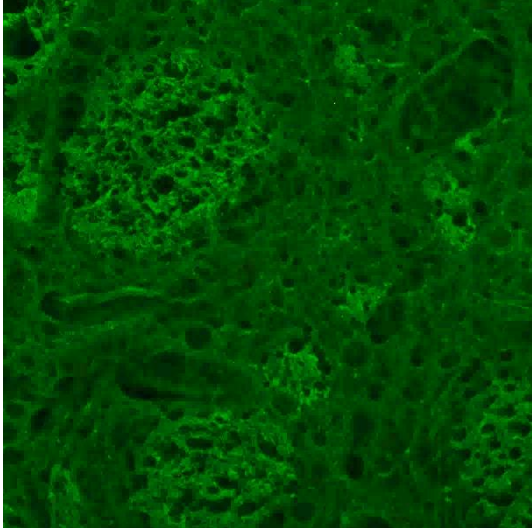
Merge



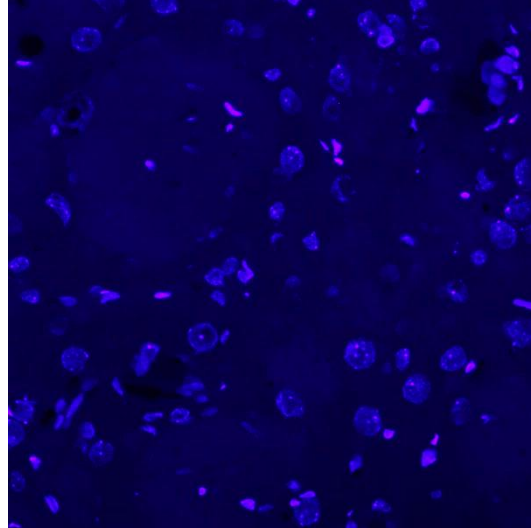
Hilus には Fluoro-Jade 陽性細胞は認めない。

図 21 Fluoro-Jade 染色 Stab 部直下の被殻 (倍率: 80 倍)

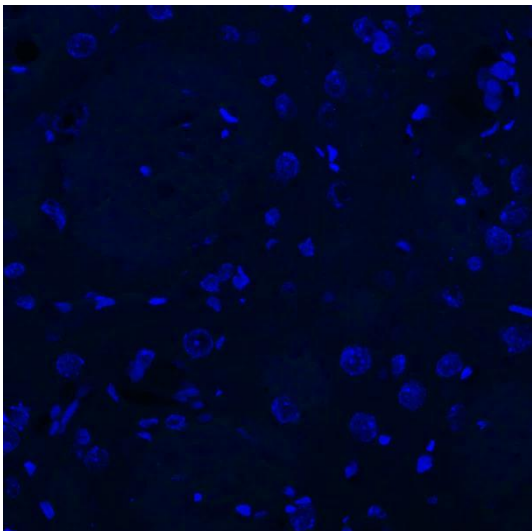
Fluoro-Jade



DAPI

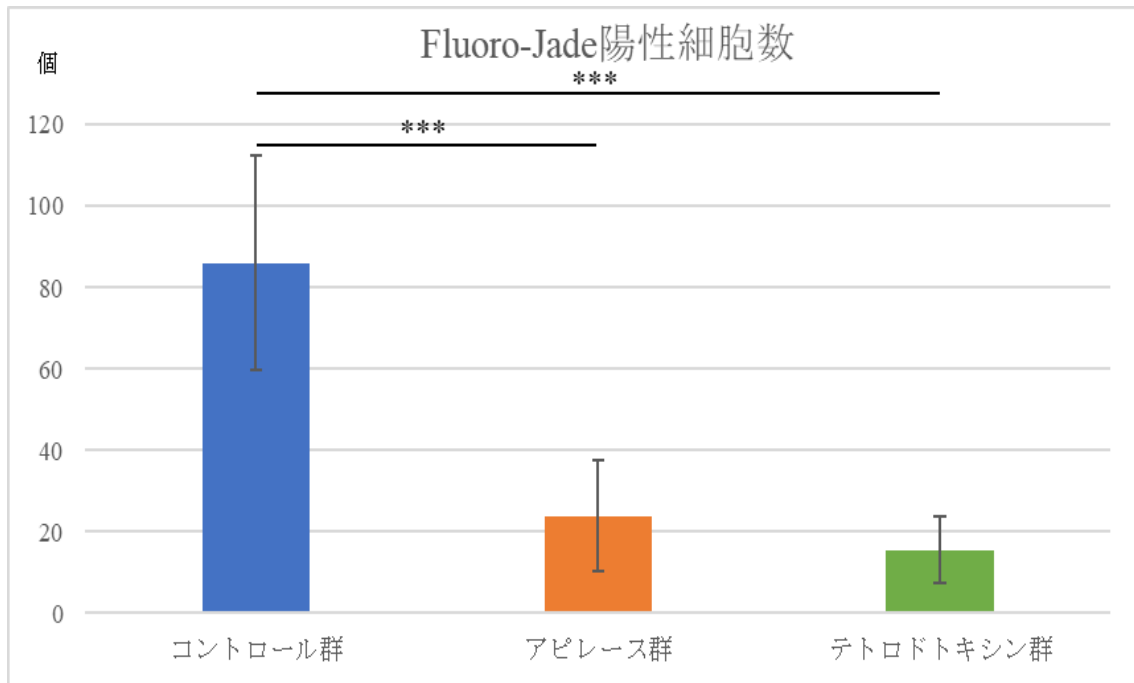


Merge



Stab 部直下の被殻には Fluoro-Jade 陽性細胞は認めない。

図 22 Fluoro-Jade 染色における神経細胞死数



\*\*\*:p<0.001

Fluoro-Jade 陽性細胞数はコントロール群で 86.13±26.30 個、アピレース群で 23.92±13.67 個、テトロドトキシシン群で 15.50±8.14 個であった。コントロール群と比較してアピレース群とテトロドトキシシン群で有意に低い値を示した。

表1 本研究に使用した外傷モデルの内訳

|           | Western blotting 用                   | ATP<br>バイオセンサー | グルタミン酸<br>バイオセンサー | 組織染色用 |
|-----------|--------------------------------------|----------------|-------------------|-------|
| コントロール群   | n=18<br>モデル作製<br>3日、7日、28日後<br>各 n=6 | n=6            | n=6               | n=6   |
| アピレーズ群    | n=18<br>モデル作製<br>3日、7日、28日後<br>各 n=6 | n=6            | n=6               | n=6   |
| テトロドトキシン群 |                                      | n=6            | n=6               | n=6   |

## 11 参考文献

1. Faden, A.I., P. Demediuk, S.S. Panter, et al., *The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury*. Science, 1989. **244**(4906): p. 798-800.
2. Katayama, Y., D.P. Becker, T. Tamura, 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.
3. 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.
4. Ransom, B., T. Behar, and M. Nedergaard, *New roles for astrocytes (stars at last)*. Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 520-2.
5. Haydon, P.G., *GLIA: listening and talking to the synapse*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(3): p. 185-93.
6. Coppi, E., A.M. Pugliese, H. Stephan, 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.
7. Simard, M., G. Arcuino, T. Takano, et al., *Signaling at the gliovascular interface*. J Neurosci, 2003. **23**(27): p. 9254-62.
8. Takano, T., G.F. Tian, W. Peng, et al., *Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow*. Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 260-7.
9. Henneberger, C., T. Papouin, S.H. Oliet, et al., *Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 232-6.
10. Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-8.
11. Haynes, S.E., G. Hollopeter, G. Yang, et al., *The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides*. Nat Neurosci, 2006. **9**(12): p. 1512-9.
12. Koizumi, S., Y. Shigemoto-Mogami, K. Nasu-Tada, et al., *UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1091-5.
13. Stence, N., M. Waite, and M.E. Dailey, *Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices*. Glia, 2001. **33**(3): p. 256-66.
14. Allahyari, R.V. and A.D. Garcia, *Triggering Reactive Gliosis In Vivo by a Forebrain Stab Injury*. J Vis Exp, 2015(100): p. e52825.
15. Savtchouk, I. and A. Volterra, *Gliotransmission: Beyond Black-and-White*. J Neurosci, 2018. **38**(1): p. 14-25.



16. Benvenga, S., L. Li Calzi, and J. Robbins, *Effect of free fatty acids and nonlipid inhibitors of thyroid hormone binding in the immunoradiometric assay of thyroxin-binding globulin*. Clin Chem, 1987. **33**(10): p. 1752-5.
17. Andersson, M., F. Blomstrand, and E. Hanse, *Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region*. J Physiol, 2007. **585**(Pt 3): p. 843-52.
18. Jourdain, P., L.H. Bergersen, K. Bhaukaurally, et al., *Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength*. Nat Neurosci, 2007. **10**(3): p. 331-9.
19. Navarrete, M. and A. Araque, *Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes*. Neuron, 2010. **68**(1): p. 113-26.
20. Han, J., P. Kesner, M. Metna-Laurent, et al., *Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD*. Cell, 2012. **148**(5): p. 1039-50.
21. Martin-Fernandez, M., S. Jamison, L.M. Robin, et al., *Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior*. Nat Neurosci, 2017. **20**(11): p. 1540-1548.
22. Kang, J., L. Jiang, S.A. Goldman, et al., *Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission*. Nat Neurosci, 1998. **1**(8): p. 683-92.
23. Bowser, D.N. and B.S. Khakh, *ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks*. J Neurosci, 2004. **24**(39): p. 8606-20.
24. Perea, G. and A. Araque, *Glial calcium signaling and neuron-glia communication*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 375-82.
25. Navarrete, M. and A. Araque, *Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication*. Neuron, 2008. **57**(6): p. 883-93.
26. Araque, A., G. Carmignoto, P.G. Haydon, et al., *Gliotransmitters travel in time and space*. Neuron, 2014. **81**(4): p. 728-39.
27. De Pitta, M., N. Brunel, and A. Volterra, *Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity?* Neuroscience, 2016. **323**: p. 43-61.
28. Guerra-Gomes, S., N. Sousa, L. Pinto, et al., *Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 427.
29. Nakanishi, S., Y. Nakajima, M. Masu, et al., *Glutamate receptors: brain function and signal transduction*. Brain Res Brain Res Rev, 1998. **26**(2-3): p. 230-5.
30. Tanaka, K., *[Role of glutamate transporters in the pathophysiology of major mental illnesses]*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2013. **142**(6): p. 291-6.
31. Olney, J.W., *Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. Science, 1969. **164**(3880): p. 719-21.

32. Siesjo, B.K. and F. Bengtsson, *Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis*. J Cereb Blood Flow Metab, 1989. **9**(2): p. 127-40.
33. Murphy, T.H., M. Miyamoto, A. Sastre, et al., *Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress*. Neuron, 1989. **2**(6): p. 1547-58.
34. Konradi, C. and S. Heckers, *Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment*. Pharmacol Ther, 2003. **97**(2): p. 153-79.
35. Nicholls, D. and D. Attwell, *The release and uptake of excitatory amino acids*. Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(11): p. 462-8.
36. Grewer, C., P. Balani, C. Weidenfeller, et al., *Individual subunits of the glutamate transporter EAAC1 homotrimer function independently of each other*. Biochemistry, 2005. **44**(35): p. 11913-23.
37. Tanaka, K., *Functions of glutamate transporters in the brain*. Neurosci Res, 2000. **37**(1): p. 15-9.
38. Danbolt, N.C., *Glutamate uptake*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(1): p. 1-105.
39. Mitani, A. and K. Tanaka, *Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1*. J Neurosci, 2003. **23**(18): p. 7176-82.
40. Fujita, T., T. Yoshimine, M. Maruno, et al., *Cellular dynamics of macrophages and microglial cells in reaction to stab wounds in rat cerebral cortex*. Acta Neurochir (Wien), 1998. **140**(3): p. 275-9.
41. Doi, K., Y. Morioka, M. Nishimura, et al., *Perfusion fluids used in neurosurgery affect cerebrospinal fluid and surrounding brain parenchyma in the rat ventriculocisternal perfusion model*. J Toxicol Sci, 2009. **34**(5): p. 511-8.
42. Guthrie, P.B., J. Knappenberger, M. Segal, et al., *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*. J Neurosci, 1999. **19**(2): p. 520-8.
43. Bal-Price, A. and G.C. Brown, *Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity*. J Neurosci, 2001. **21**(17): p. 6480-91.
44. Zhou, Y. and N.C. Danbolt, *Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain*. J Neural Transm (Vienna), 2014. **121**(8): p. 799-817.
45. Langfitt, T.W., T.A. Gennarelli, W.D. Obrist, et al., *Prospects for the future in the diagnosis and management of head injury: pathophysiology, brain imaging, and population-based studies*. Clin Neurosurg, 1982. **29**: p. 353-76.

46. Hall, E.D., J.A. Wang, and D.M. Miller, *Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury*. *Exp Neurol*, 2012. **238**(2): p. 176-82.
47. Greco, T., T.C. Glenn, D.A. Hovda, et al., *Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016. **36**(9): p. 1603-13.
48. Kobeissy, F.H., J.D. Guingab-Cagmat, Z. Zhang, et al., *Neuroproteomics and Systems Biology Approach to Identify Temporal Biomarker Changes Post Experimental Traumatic Brain Injury in Rats*. *Front Neurol*, 2016. **7**: p. 198.
49. Chen, W., Y. Guo, W. Yang, et al., *Connexin40 correlates with oxidative stress in brains of traumatic brain injury rats*. *Restor Neurol Neurosci*, 2017. **35**(2): p. 217-224.
50. Kotapka, M.J., D.I. Graham, J.H. Adams, et al., *Hippocampal pathology in fatal human head injury without high intracranial pressure*. *J Neurotrauma*, 1994. **11**(3): p. 317-24.
51. Nilsson, P., L. Hillered, U. Ponten, et al., *Changes in cortical extracellular levels of energy-related metabolites and amino acids following concussive brain injury in rats*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990. **10**(5): p. 631-7.
52. Palmer, A.M., D.W. Marion, M.L. Botscheller, et al., *Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model*. *J Neurochem*, 1993. **61**(6): p. 2015-24.
53. Alessandri, B., E. Schwandt, Y. Kamada, et al., *The neuroprotective effect of lactate is not due to improved glutamate uptake after controlled cortical impact in rats*. *J Neurotrauma*, 2012. **29**(12): p. 2181-91.
54. Belousov, A.B., *The regulation and role of neuronal gap junctions during neuronal injury*. *Channels (Austin)*, 2012. **6**(5): p. 390-2.
55. Turtzo, L.C., J. Lescher, L. Janes, et al., *Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat*. *J Neuroinflammation*, 2014. **11**: p. 82.
56. Perez-Polo, J.R., H.C. Rea, K.M. Johnson, et al., *Inflammatory consequences in a rodent model of mild traumatic brain injury*. *J Neurotrauma*, 2013. **30**(9): p. 727-40.
57. Fiacco, T.A. and K.D. McCarthy, *Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions*. *J Neurosci*, 2018. **38**(1): p. 3-13.
58. Khakh, B.S. and R.A. North, *P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease*. *Nature*, 2006. **442**(7102): p. 527-32.
59. Ishimaru, M.J., C. Ikonomidou, T.I. Tenkova, et al., *Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain*. *J Comp Neurol*, 1999. **408**(4): p. 461-76.

60. Yang, X., S. Yang, J. Zhang, et al., *Role of Caspase 3 in neuronal apoptosis after acute brain injury*. Chin J Traumatol, 2002. **5**(4): p. 250-3.
61. Nagley, P., G.C. Higgins, J.D. Atkin, et al., *Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(1): p. 167-85.
62. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.
63. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-56.
64. Halford, J., S. Shen, K. Itamura, et al., *New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment*. J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(10): p. 3278-3299.
65. Luo, H., J. Zhuang, P. Hu, 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.
66. Perez, M., L.P. Cartarozzi, G.B. Chiarotto, et al., *Neuronal preservation and reactive gliosis attenuation following neonatal sciatic nerve axotomy by a fluorinated cannabidiol derivative*. Neuropharmacology, 2018. **140**: p. 201-208.
67. Melnikova, D.I., Y.S. Khotimchenko, and T.Y. Magarlamov, *Addressing the Issue of Tetrodotoxin Targeting*. Mar Drugs, 2018. **16**(10).

## 12 研究業績

### 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 稲原裕也、松本直樹、本田真之、香川敦宣、牧野加織、石井大雄、熊川まりこ、宮澤祥一、水谷卓、上村慎也、永井慎太郎、中村仁美、楡井和重、山上裕晃、松岡俊一、後藤田卓志、森山光彦：Denver型PV-Shunt留置後2年目に敗血症を繰り返す肝硬変患者の1例，日本消化器病学会関東支部第339回，東京，2016年5月

2 稲原裕也、吉田宏一朗、澁谷浩司、渡辺充、茂呂修啓、吉野篤緒：慢性硬膜下血腫術後7日目の頭部単純CTによる再発の予見，日本脳神経CI学会 第41回日本脳神経CI学会総会，新潟，2018年3月

3 稲原裕也、大滝遼、落合祐之、栗原淳、吉野篤緒：低ホスファターゼ血症に伴う二次性頭蓋骨縫合早期癒合症に頭蓋骨延長術を施行した一例，第137回日本脳神経外科学会関東支部学術集会，東京，2018年12月