

氏名	さかい けんた 坂井 研太		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1879 号		
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	頭部外傷後の遅発性けいれん易発症における「脳ペリサイト／グリア細胞連関」の関与		
論文審査委員	（主査）	福岡大学	教授 山内 淳史
	（副査）	福岡大学	教授 道具 伸也
		福岡大学	教授 右田 啓介

内容の要旨

転倒・転落、スポーツ外傷、交通事故などによる頭部外傷（traumatic brain injury: TBI）受傷者は、全世界において年間 5000 万人に昇る。TBI 受傷者は急性傷害からの回復後、数か月から十数年の無症候期を経て、遅発性けいれんを発症する。その生涯発症率は数十%に上るが、TBI 後の遅発性けいれんに対する抗けいれん薬の効果は限定的なため、予防・治療法の開発は喫緊の課題である。脳神経活動は、脳微小血管構成細胞、グリア細胞および脳神経細胞から構成される neurovascular unit (NVU) により協調的に制御されている。TBI 後の遅発性けいれんに神経細胞を標的とした抗けいれん薬が奏功しないことから、TBI 後の無症候期における NVU 不調和がけいれん発症へと導いている可能性がある。すなわち、TBI 後の遅発性けいれんを予防・軽減するには、受傷後緩徐に進行する NVU 不調和を複合的に治療する必要がある。

脳ペリサイトは脳微小血管に存在する血管周皮細胞で、脳血管内皮細胞およびアストロサイトと共に血液脳関門（BBB）を構成する。また脳ペリサイトが存在する脳微小血管は、NVU 構成細胞であるアストロサイトのエンドフィート、ミクログリアおよび神経軸索突起に囲まれていることから、脳ペリサイトがこれら NVU 構成細胞機能の調節に関わっている可能性がある。実際に脳ペリサイトは脳血管内皮細胞の密着結合能や神経細胞機能を直接制御し血液脳関門および脳神経機能の恒常性維持に関与する。すなわち正常な脳ペリサイトは NVU 構成員として、他の NVU 構成細胞と協調し、脳神経回路網を制御し得る。一方、病態下では NVU における脳ペリサイトの機能は一変する。炎症性メディエーター刺激に応答した脳ペリサイトは matrix metalloproteinase 9 を放出し BBB 機能を障害する。脳ペリサイトの炎症刺激に対する反応性は、他の BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞やアストロサイトのそれよりも高かった。大変興味深いことに、脳内炎症担当細胞であるミクログリアの炎症刺激に対する反応性は、脳ペリサイトのそれと比較して著しく低く、炎症反応性脳ペリサイトから放出される液性因子は、ミクログリアの活性

化を誘導する。これらの知見は、脳内炎症および炎症を伴う病態の形成において脳ペリサイトは中核的な役割を担い、グリア細胞の活性化を含む非協調的な NVU 病態を誘導している可能性を示唆する。

TBI は脳損傷を契機として、脳内の炎症性関連因子の増加、NVU 構成細胞であるミクログリアやアストロサイトの活性化、また神経細胞の過剰興奮など特徴的な反応を誘発する。このような TBI による NVU 機能異常が、遅発性の二次的脳機能障害の起因となる可能性がある。実際に、ミクログリアとアストロサイトの TBI 後の活性化は、脳神経回路の易興奮を誘導することから、頭部外傷後の遅発性けいれん易発症病態の形成に NVU 機能異常が寄与することが示唆される。しかし、脳ペリサイトが頭部外傷後のグリア細胞の活性化などの NVU 機能異常に伴うけいれん易発症病態の形成に関与するかは不明である。そこで本研究では、脳ペリサイトを TBI 後のグリア細胞活性化や神経易興奮性などの NVU 機能異常を牽引する基幹細胞であると捉え、遅発性けいれんの易発症病態形成機構を解明する。

① CCI 負荷によるミクログリアおよびアストロサイト活性化に先行して増加する脳ペリサイト PDGFR β 発現

TBI 後の NVU 機能障害の全体像を捉えるために、controlled cortical impact (CCI) 法で頭部外傷を受傷したマウスを用いて受傷後 1 時間から 28 日の期間、外傷側海馬における NVU 構成細胞（脳ペリサイト、ミクログリアおよびアストロサイト）の時空間的動態を解析した。CCI 負荷マウスの外傷側海馬では、受傷後早期（1 時間後）から脳ペリサイトマーカーである PDGFR β （図 1 A）発現が急増し、外傷後 4 日目までその増加は持続した。一方、ミクログリアおよびアストロサイトそれぞれの特異的マーカーである Iba1（図 1 B）および GFAP（図 1 C）の発現量の顕著な増加は、外傷後 4 日目から認められた。脳ペリサイトにおける PDGFR β 発現量増加は、受傷後 7 日目でほとんど認められなくなるものの、Iba1 および GFAP の顕著な発現増加は 28 日目まで持続した。これら知見は、TBI 後早期では、脳ペリサイトの TBI に対する反応性は、グリア細胞のそれと比較し高いことを示す。

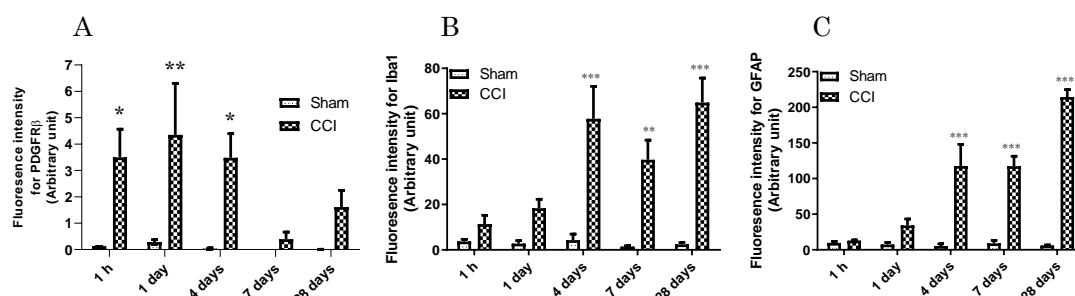


図 1. CCI 負荷後の外傷側海馬における (A) 脳ペリサイト (PDGFR β)、(B) ミクログリア (Iba1)、(C) アストロサイト (GFAP) の時空間的動態変化

② CCI 負荷後の pilocarpine 誘発けいれん感受性の遅発性亢進

TBI 後の神経易興奮性を経時的に評価するため、受傷後 7, 14, 21 および 28 日に発作閾値下限量のけいれん誘発剤 pilocarpine を CCI マウスに投与し、けいれん強度を測定した。Pilocarpine に対する感受性は CCI 受傷後経日的に上昇（経日的なけいれん閾値の低下）し、受傷後 28 日において最も増大することから、TBI 後の脳神経回路網の易興奮性は、脳ペリサイトの病変化（PDGFR β 発現の急増）およびグリア細胞の活性化に遅延して形成されることが判った。

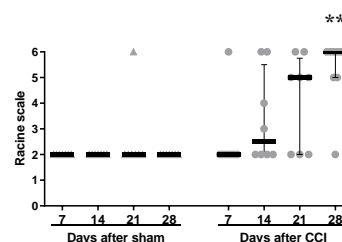


図 2. CCI マウスにおける pilocarpine けいれん感受性の経日的な増強

③ CCI 後早期の脳ペリサイト PDGFR β 発現増大が誘導するミクログリア活性化と pilocarpine 誘発けいれん感受性亢進

CCI 負荷に対する脳ペリサイトの反応を抑制するため PDGFR β シグナル阻害剤 imatinib を CCI 負荷後早期に投与した。その後、外傷側海馬のミクログリアおよびアストロサイトの各特異的マーカーの発現増加と pilocarpine 誘発けいれんの感度上昇に対する病変化脳ペリサイトの関与について検討した。脳ペリサイトにおける PDGFR β 発現量増加が認められた受傷後の 5 日間 imatinib を CCI マウスに投与すると、受傷後 28 日のミクログリア Iba1 発現量の増加（図 3 A）およびけいれん強度の増大（図 3 B）が有意に抑制された。一方で、増加したアストロサイト GFAP 発現量に変化は認められなかった。従って PDGFR β 発現が急増した脳ペリサイト（すなわち CCI 負荷により病変化した脳ペリサイト）がグリア細胞機能変化および遅発性のけいれん感受性亢進を惹起させた可能性がある。

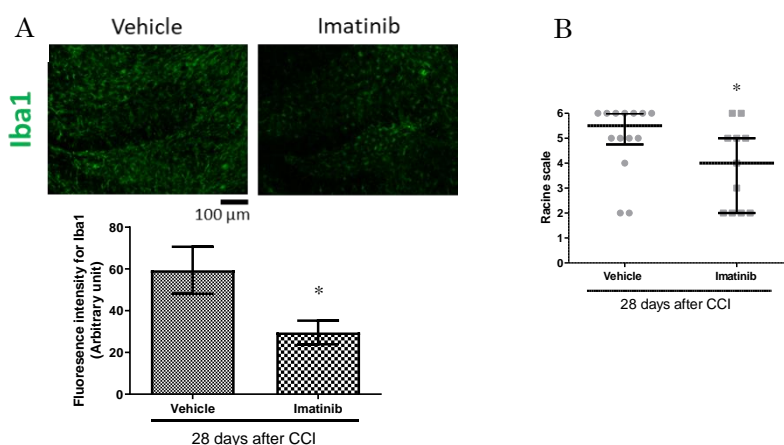


図 3. CCI 後早期の imatinib 投与による脳ペリサイト PDGFR β シグナル阻害が、CCI 負荷 28 日後の (A) ミクログリア活性化および (B) pilocarpine けいれん感受性に及ぼす影響

④ CCI により病変化した脳ペリサイトが誘導する外傷側海馬のグルタミン酸輸送体の発現低下

TBI によるアストロサイトの細胞外グルタミン酸調節機能異常における病変脳ペリサイトの関与を明らかにするため、CCI 負荷後のアストロサイトにおける Na⁺ 駆動性グルタミン酸輸送体 excitatory amino acid transporter (EAAT) 2 (別称 glutamate transporter 1: GLT-1) の発現に、脳ペリサイトが及ぼす影響を検討した。CCI 負荷 28 日後の外傷側海馬において EAAT2 発現量が減少することを免疫組織学的染色により明らかにした。脳ペリサイトの PDGFR β 発現が増加した受傷後 5 日間の imatinib 投与では、受傷後 28 日における EAAT2 発現量減少が抑制される傾向が認められた。これら知見は、TBI 後の病変脳ペリサイトが、アストロサイトのグルタミン酸輸送体の発現やグルタミン酸取り込み能に影響している可能性を示唆する。

⑤ 脳ペリサイトによるアストロサイト EAAT2 を介したグルタミン酸取り込み能の上昇

アストロサイトの Na⁺ 駆動性グルタミン酸輸送体を介したグルタミン酸取り込み能に及ぼす脳ペリサイトの影響についてヒト由来細胞を用いて検討した。脳ペリサイトとアストロサイトを共培養し、アストロサイトのグルタミン酸取り込み能を評価した。脳ペリサイトの共存により、アストロサイトの Na⁺ 依存的なグルタミン酸取り込み経路が活性化することが判った (図 4 A, B)。EAAT2 の選択的阻害薬 DHK で処理すると、脳ペリサイトにより増強されたアストロサイトのグルタミン酸取り込み能が阻害された (図 4 C)。従って、脳ペリサイトはアストロサイトの EAAT2 を介したグルタミン酸取り込み能を活性化させる可能性が考えられる。脳ペリサイト培養培地 (Pericyte-conditioned medium: Pericyte-CM) を負荷したアストロサイトでは、その負荷量に依存してグルタミン酸取り込み活性が増加した (図 4 D)。従って、健常下では、脳ペリサイトは液性因子の放出を介してアストロサイトのグルタミン酸取り込み能を促進的に維持していることを示唆する。以上、CCI マウスにおいて外傷後早期の脳ペリサイト PDGFR β シグナル阻害が遅発的な EAAT2 発現量減少を抑制するとの結果と総合すれば、PDGFR β シグナルが活性化した病変脳ペリサイトが CCI 後のアストロサイトのグルタミン酸取り込み能低下を誘導している可能性がある。

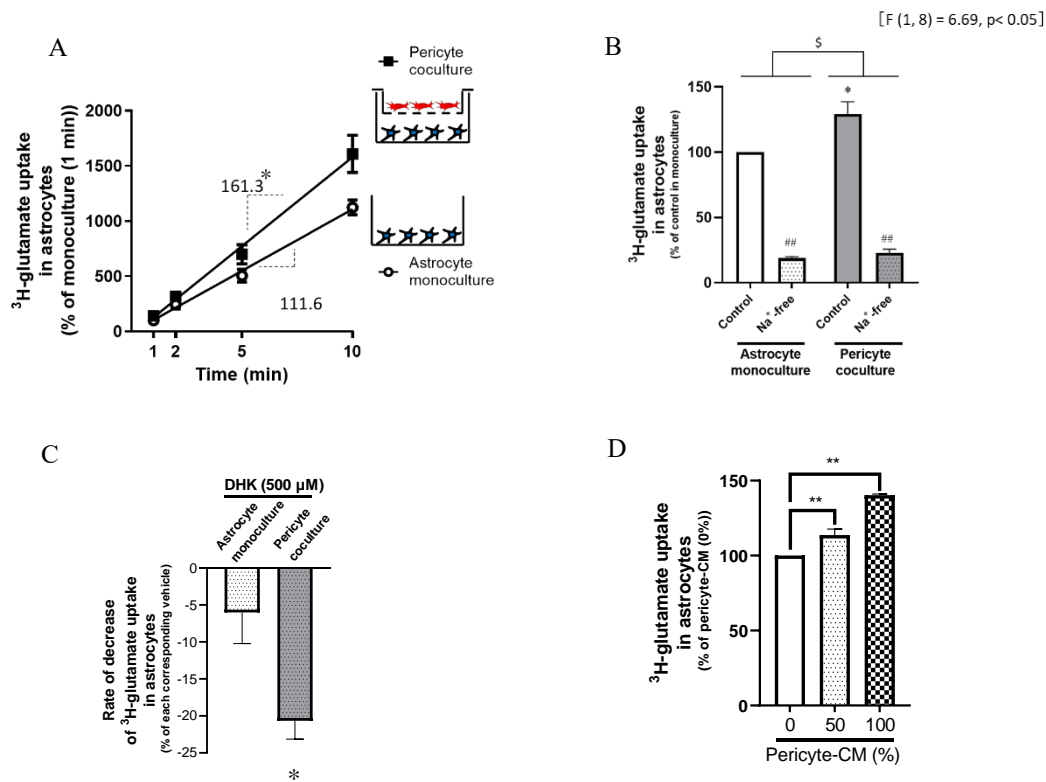


図4. 脳ペリサイト共培養による、Na⁺駆動性グルタミン酸輸送体 (EAAT2) を介したアストロサイトのグルタミン酸取り込み能の亢進 (A) 脳ペリサイトと共培養したアストロサイト (共培養群) におけるグルタミン酸取り込み活性変化 (B) 共培養群における Na⁺非存在下におけるグルタミン酸取り込みの顕著な低下 (C) 共培養群における EAAT2 選択的阻害薬 DHK 処理によるグルタミン酸取り込み低下 (D) 脳ペリサイト培養培地 (Pericyte-conditioned medium: Pericyte-CM) を負荷したアストロサイトにおけるグルタミン酸取り込み能の亢進

本研究は、CCI 負荷後早期の脳ペリサイト PDGFR β 発現上昇が、グリア細胞機能異常および遅発性の脳神経回路網の易興奮性を誘導することを解明した。本知見は、TBI により病変化した脳ペリサイトが NVU 不調和を牽引し、遅発性けいれん発症へと導く可能性を提示する。未だ発症機序が不明で有効な治療法が確立されていない TBI 後の遅発性けいれんに関して、その病態形成の基幹細胞として脳ペリサイトを提起する本研究は、遅発性けいれんを予防・抑制するための治療法開発の隘路を切り開くものである。

審査の結果の要旨

転倒・転落、スポーツ外傷、交通事故などによる頭部外傷 (traumatic brain injury: TBI) 受傷者は、全世界において年間 5000 万人にのぼる。TBI 受傷者の数十%は、急性傷害からの回復後、数ヶ月から十数年の無症候期を経て、遅発性けいれん (posttraumatic epilepsy: PTE) を発症する。その発症時期を予測することは困難であるうえ、既存の抗けいれん薬に抵抗性を示す難治性てんかんであることから、PTE の予防・治療法の開発は喫緊の課題である。これまでに、脳神経血管機構ネットワーク (neurovascular unit: NVU) を構成するグリア細胞 (アストロサイト・ミクログリア) や神経の TBI 後の変化は議論されてきた。しかし NVU 構成細胞である脳ペリサイトが PTE 発症に関与するとの報告は皆無である。本学位論文は、TBI 後のてんかん発症前病態形成の「基幹細胞」として脳ペリサイトに着目し、グリア細胞活性化を含む NVU 機能変化を段階的・複合的に捉え、PTE へと導く過程を明らかにすることを目的としている。

第 1 章では、TBI モデルである CCI マウスを作成し、NVU 構成細胞である脳ペリサイト、ミクログリアおよびアストロサイトの変化を、時空間的に比較検討した。CCI 負荷マウスの外傷側海馬では、受傷後早期 (1 時間後) から脳ペリサイトの PDGFR β 発現が急増し、受傷後 4 日目までその増加は持続した。さらに受傷後 1 日目の外傷側海馬において、PDGFR β のリガンドである PDGF-BB 発現量が増加していたことから、受傷後の脳ペリサイトでは PDGFR β シグナルが活性化していると考えられる。一方、ミクログリアおよびアストロサイトの特異的マーカーである Iba1 および GFAP の発現量の顕著な増加は、受傷後 4 日目から認められ、28 日目まで持続した。これら知見は、TBI 後早期では、脳ペリサイトの TBI に対する応答性は、グリア細胞のそれと比較し高いことを示す。けいれん誘発剤である pilocarpine に対する感受性は CCI 受傷後 7 日目以降から経日的に上昇し、受傷後 28 日において最も増大することから、TBI 後の脳神経易興奮性は、脳ペリサイトの病変変化 (PDGFR β 発現の急増) およびグリア細胞の活性化に遅延して形成されることが判った。さらに、CCI 負荷後 28 日のミクログリア Iba1 発現量の増加およびけいれん強度の増大は、脳ペリサイトにおいて PDGFR β 発現増加が認められた受傷後 5 日間の PDGFR シグナル阻害剤 imatinib 投与により有意に抑制された。以上、TBI による PDGFR β 発現急増を特徴とする脳ペリサイトの病変変化が、ミクログリアの活性化や TBI 後の脳神経易興奮性を誘導し、遅発性けいれんの易発症環境の形成を牽引していることを明らかにした点において意義深い。

第 2 章では、TBI による活性化アストロサイトの細胞外グルタミン酸調節機能異常における病変変化脳ペリサイトの関与を検討した。アストロサイトのグルタミン酸輸送体 (EAAT2) を介した細胞外グルタミン酸の取り込み能は、神経興奮の調節に関与する。CCI 負荷後 28 日の外傷側海馬の活性化アストロサイトにおいて、EAAT2 の発現量が有意に減少した。こ

の EAAT2 減少は、受傷後 5 日間の imatinib 投与により、有意に抑制された。これら知見は、TBI 後の病変脳ペリサイトが、アストロサイトのグルタミン酸輸送体の発現低下を誘導したことを示唆する。しかし、アストロサイトのグルタミン酸調節機能に対する脳ペリサイトの影響を検討した研究はこれまで皆無である。本研究では、アストロサイトのグルタミン酸取り込み能に対する脳ペリサイトの作用について培養細胞を用いて検討した。健常下における脳ペリサイトの作用を明らかにするため、正常な脳ペリサイトとアストロサイトを共培養し、グルタミン酸取り込み能を評価した。脳ペリサイトの存在は、アストロサイトの EAAT2 を介したグルタミン酸取り込みを有意に促進した。また脳ペリサイト培養培地をアストロサイトに負荷したところ、グルタミン酸取り込み量が増加した。本結果は、健常下では、脳ペリサイトは液性因子を介して、アストロサイトの EAAT2 によるグルタミン酸取り込み能を活性化することを示す。病変脳ペリサイトを用いた検討はなされていないが、第 1 章での CCI マウスでの結果を考え合わせると、脳ペリサイトの病変に伴うアストロサイトのグルタミン酸取り込み能低下により、TBI 後の脳神経易興奮性の誘導が惹起される可能性が強く示唆された。以上より、PTE 病態形成における病変脳ペリサイトを基点とする分子メカニズムの一端を明らかにした点で、高く評価された。

本学位論文は、「脳ペリサイト病変」という独創的な視点を基に、TBI 後の PTE 病態形成を段階的かつ複合的に捉えることに成功し、PTE の新たな治療標的として脳ペリサイトを提案するとともに、TBI 後早期からの治療介入の重要性を提起した。すなわち、本学位論文は、PTE の克服を目指す治療戦略開発の端緒となる基礎研究であると位置づけられ、新規性および独創性を有し、医療分野での有用性は高く、博士学位論文として十分な内容であると判定した。併せて、公聴会審査における申請者の発表および質疑応答を鑑み、学位を授与するに応分の能力を有すると結論した。