

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

Reactive pericytes trigger glial activation and late-onset hypersusceptibility  
to seizure after traumatic brain injury in mice

福岡大学 薬学部 生物薬剤学教室

薬学疾患管理学専攻

PD171003 坂井研太

2021

## 目次

緒言.....	3
第1章 TBI後の病変化脳ペリサイトが牽引するミクログリア活性化および pilocarpine 誘発けいれん感受性の遅発性亢進	
1. 序論.....	7
2. 方法.....	10
3. 結果.....	17
4. 考察.....	35
5. 結論.....	40
第2章 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化脳ペリサイトの関与	
1. 序論.....	41
2. 方法.....	44
3. 結果.....	51
4. 考察.....	66
5. 結論.....	73
総括.....	74
参考文献.....	78
謝辞.....	86

## 緒言

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<sup>1,2</sup>。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<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。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<sup>5</sup>、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<sup>6,7</sup>、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<sup>8</sup>。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<sup>9</sup>。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<sup>5</sup>、NVU 構成細胞であるミクログリア<sup>10</sup> やアストロサイトの活性化<sup>11</sup>、また神経細胞の過剰興奮<sup>12,13,14</sup> 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<sup>15,16</sup>、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。TBI の外傷部位で、脳ペリサイトにおける PDGFR $\beta$  発現が増加することが報告されている<sup>17</sup>。PDGFR $\beta$  シグナルが活性化した脳ペリサイトでは様々な液性因子が産生されるが<sup>18</sup>、頭部外傷後のグリア細胞の活性化等の NVU 機能異常に伴うけいれん易発症病態の形成に脳ペリサイト

が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。第 1 章では、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。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。CCI 負荷に対する脳ペリサイトの反応を抑制するため PDGFR $\beta$  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脳ペリサイトの関与について検討した。第 2 章では、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<sup>+</sup>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。次にアストロサイトの Na<sup>+</sup>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。

これまでの頭部外傷後の遅発性けいれんに関する研究は、脳神経活動異常、脳血管機能障害、グリア細胞活性化についてそれぞれ個別で議論されてきたため、その発症機構の全貌を捉えることが困難であった。本研究で、「脳ペリサイト-グリア細胞連関」という新たな視点を導入することにより、遅発性けいれん易発症の病態形成過程を段階的かつ複合的に捉えることができれば、遅発性けいれん発作の発症前段階から治療介入が可能になるかもしれない。

## 第1章

### 1. 序論

Neurovascular unit (NVU) 構成細胞間の協調的なクロストークは、脳機能を維持するために極めて重要である。外傷性脳損傷 (traumatic brain injury: TBI) は、最初の外傷から数か月または数年後に、慢性的な認知障害や遅発性てんかんなどの二次性障害を惹き起こす<sup>19-21</sup>。TBI は、NVU 構成細胞であるミクログリア<sup>10</sup>やアストロサイトの活性化<sup>11</sup>、神経細胞の過剰興奮<sup>12-14</sup>など特徴的な反応を誘発する。このようなTBIによるNVU機能の制御不良は、二次的な脳機能障害の起因となる可能性がある。従って、TBI後の各NVU構成細胞の動態を精細に解析することが、その病因を明らかにするために重要である。

脳ペリサイトは血管の基底膜と内皮細胞に囲まれており、血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) の生理学的機能を維持している。また脳ペリサイトは、脳低酸素症、脳出血、脳神経炎症や脳神経変性疾患などの病態に関連する様々な生理活性物質に対し、高い反応性を示すことが報告されている<sup>22,23</sup>。実際、NVU構成細胞の中で、脳ペリサイトは炎症性サイトカインに高い反応性を示し、それら液性因子に応答したペリサイトはミクログリアを活性化する<sup>8,9,24,25</sup>。これらの知見は、活性化された脳ペリサイトが、グリア細胞の活性化を含むNVU機能の不調和を誘導することを示唆する。TBI後の大脳皮質におけるグリア瘢痕形成機構を明らかにするため、脳ペリサイトに着目した報告が幾

つかある。大脳皮質の TBI は、急速な脳ペリサイトの喪失または血管からの離脱とそれに続く反応性ペリサイトの異常増加を誘発する。このペリサイトーシスは、TBI 後 3～5 日に損傷周辺部で、血小板由来成長因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor: PDGFR) の PDGFR $\beta$  発現量が増加することを特徴とする<sup>17, 26</sup>。海馬は TBI の直接的な脳損傷領域から離れているものの、ミクログリアとアストロサイトは TBI 後の初期段階 (数日後) で活性化され、それは長期間持続する。これら海馬のグリア細胞活性化は進行性の脳神経変性に関連している<sup>27-30</sup>。従って、TBI に応答した海馬の各 NVU 構成細胞の反応性を解明することは、二次的な脳障害に関連する NVU 機能の不調和および神経機能の変容を理解するための鍵となり得る。しかし、TBI が海馬における脳ペリサイト活性化を誘導するかは不明である。さらに、海馬における反応性脳ペリサイトが TBI の病理学的過程でどのような時期に出現し、病態形成に寄与するかは明らかにされていない。

TBI 後の NVU 機能障害の全体像を捉えるために、損傷側の海馬における NVU 構成細胞 (脳ペリサイト、ミクログリア、アストロサイト) の時空間的動態を解析した。Controlled cortical impact (CCI) 負荷後 1 時間から 28 日の期間、海馬の脳ペリサイト、ミクログリアおよびアストロサイトの指標として、それぞれ PDGFR $\beta$ 、ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) および glial fibrillary acidic protein (GFAP) の免疫活性について組織学的に観察した。



TBI 後の神経活動の連続的な変化を評価するため、CCI マウスに発作閾値下限量の pilocarpine を投与し、けいれん発作誘発試験を行った。さらに、PDGFR $\beta$  阻害剤である imatinib を CCI 負荷後早期に投与し、海馬の Iba1 および GFAP 免疫活性の増加と pilocarpine 誘発けいれんの易発症性について反応性脳ペリサイトが関連しているかを検討した。我々の結果は、急速な PDGFR $\beta$  発現量増加を特徴とする反応性脳ペリサイトが、TBI 後の NVU 協調の不調和および脳の過剰興奮性の進展を牽引する可能性を提示するものと考えられる。

## 2. 方法

### 2.1. 実験動物

すべての実験は、動物の愛護及び管理に関する法律（No. 105、1973 年）および通知（No. 71 および 88、2006 年）に従い、福岡大学動物委員会の承認後に実施した。

実験動物は、雄性 C57BL/6J マウス（6–8 週齢、体重 18-23g、Charles River Laboratory Japan、Yokohama）を使用した。各マウスは次の環境下（自由摂食および飲水、個別飼育、室温  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル）で飼育した。

### 2.2. 頭部外傷モデルマウス作製（CCI マウス）

頭部外傷の負荷は controlled cortical impact（CCI）の手法を用いて行った。マウスを 2.5% イソフルランで麻酔し、頭部固定装置（SGM-4, Narishige, Tokyo）に固定した。手術中は鼻部から 1.5% イソフルランを噴霧吸入させ、麻酔状態を維持した。頭部剃毛後、頭皮を切開し、頭蓋骨を露出させた。5 mm  $\phi$  トレフィンを装着した電動ドリル（Kiso Power Tool MFG. Co., Ltd., Osaka）を用いて、bregma から -2.5 mm および sagittal suture から左脳側に 2.75 mm の位置に 4 mm  $\phi$  の開頭を施した。次に 3 mm  $\phi$  の flat-tip を取り付けた controlled pneumatic impactor（AMS 201, AmScien Instruments, Richmond, VA, USA）を使用し、開頭部に次の条件（深度 0.5 mm、速度  $3.0 \pm 0.02$  m/s、インパクト持続時間 120 ms）で flat-tip を打ち付け、頭部外傷（CCI 負荷）を与えた。CCI 負荷後、開頭時に取り外した頭蓋骨を開頭部に戻し、その領域にプラスチックシートを被せ、レジンセメント

(RelyXTM Unicem2 Automix, 3M, St. Paul, MN, USA) で接着した。CCI 負荷後のマウスを 37°C 設定の恒温機上に置き、麻酔から覚醒するまで体温を維持した。その後、個々のケージに戻した。CCI 負荷を除く上記の処置を行った動物を sham マウスとした。

### 2.3. CCI マウスにおける神経学的重症度評価

10-point neurological severity score (NSS)<sup>31</sup> 用い、CCI 負荷後の神経学的重症度を評価した。NSS は 10 項目の試験（運動機能、平衡感覚等）が設定されており、1 試験の失敗に対して 1 ポイント、成功に対して 0 ポイントを付与した。従って、合計のポイント数が高いほど、神経学的重症度が高いと評価される (Table 2)。NSS は CCI 負荷後 1 時間および 7、14、21、28 日の各時点で測定した。CCI の負荷強度は、1 時間後のスコアで評価した。安定した NSS を得るために、すべてのマウスは事前に試験を 1 回行った。また、各時点の NSS 試験前に体重を測定した。

### 2.4. 組織学的解析

#### 2.4.1. 脳資料作製

マウスをイソフルランで深麻酔し、氷冷した phosphate buffered saline (2 mL/min で約 5 分間) を心臓から還流した。続いて氷冷した 4% paraformaldehyde (PFA) (2 mL/min で約 5 分間) で灌流固定した。採り出した全脳を 4% PFA 溶液で浸潤固定 (4°C、一晚) 後、20%スクロース溶液に移し、脳組織を固定した。脳を optimal cutting temperature

compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo) で覆い、ドライアイスで凍結包埋後、クリオスタット (-20°C) を使用して脳切片 (厚さ 20 μm) を作製した。

#### 2.4.2 Hematoxylin & eosin (H&E) 染色

脳切片をヘマトキシリン溶液中で 3 分間染色し、水道水で 10 分間洗浄した。その後、エオジン溶液中で 2 分間染色した。次に、脳切片をエタノールとキシレンで脱水し、Mount-Quick (Daido Sangyo Co. Ltd., Saitama) で封入した。観察および組織学的評価は、BZ-X710 microscope (Keyence, Osaka) を用いた。

#### 2.4.3 免疫組織化学実験

Tris-buffered saline で希釈した 0.2% Triton-X100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液 (T-TBS) で脳切片を洗浄し (15 分、3 回)、続いて blocking one histo (Nacalai Tesque, Kyoto) に 30 分間浸した後、脳切片を一次抗体とインキュベートした (4°C、一晚)。使用した一次抗体と希釈倍率 (5% blocking one histo in T-TBS で希釈) は次の通りである (Table 1)。一次抗体で処置した脳切片を T-TBS で洗浄後 (10 分、5 回)、一次抗体に応じた二次抗体で 2 時間反応させた。使用した二次抗体と希釈倍率 (5% blocking one histo in T-TBS で希釈) を下記に示す (Table 1)。二次抗体で処置した脳切片を T-TBS で洗浄後 (10 分、6 回)、vectashield containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で核を染色した。

Table. 1 Antibodies used in immunohistochemical analysis

Primary Antibody (Catalog #, manufacture, dilution used)	Secondary antibody (Catalog #, manufacture, dilution used)	Application
Goat anti-PDGFR $\beta$ (AF1042, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, 1:100)	Donkey anti-goat Cy3 (#705-165-147, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, 1:500)	Immunofluorescent pericyte marker
Rat anti-CD13 (SM2298P, Acris Antibodies, Herford, Germany, 1:200)	Donkey anti-rat Alexa Fluor 488 (#ab150149, Abcam, Cambridge, United Kingdom, 1:500)	Immunofluorescent pericyte marker
Rabbit anti-Laminin (L9393, Sigma Aldrich, 1:100)	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (#A21206, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA, 1:500)	Immunofluorescent basement membrane marker
Rabbit anti-Iba1 (019-19741, Wako, Osaka, 1:100)	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (#A21206, Thermo Fisher, 1:500)	Immunofluorescent microglia marker
Rabbit anti-GFAP (AB5804, Merck Millipore, Burlington, MA, USA, 1:500)	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (#A21206, Thermo Fisher, 1:500)	Immunofluorescent astrocyte marker

#### 2.4.4 PDGFR $\beta$ 、Iba1 および GFAP 免疫活性の定量的解析

各標識細胞の分布と形態は、BZ-X710 microscope (20 倍の対物レンズ) を用いて観察し、CCI 負荷後の各時点における免疫活性について比較・検討した。選択された脳切片 (bregma から約-1.8mm~-2.3mm) について、海馬 dentate gyrus (DG) および CA1 領域を含む観察対象領域 (ROI) の免疫活性を定量的に測定した。PDGFR $\beta$  陽性細胞の蛍光強度は、ROI の 98,470 $\mu\text{m}^2$  領域 2 箇所 (同じ個体から採取された脳切片の隣接する 2 領域) について BZ-X Analyzer software (Keyence) を用いて定量化した。Iba1 および GFAP 陽性細胞は、ROI の 393,880 $\mu\text{m}^2$  領域における蛍光強度を測定した。データは、ROI 1 $\mu\text{m}^2$  あたりの陽性細胞の任意単位における平均蛍光強度として表し、CCI 負荷後の各時点で 3~4 匹のマウスについて解析した。

免疫活性の共局在を検討するため、二重染色された細胞を confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany) によって可視化した。画像を 20 倍の対物レンズを使用し

て撮影し、単染色された細胞の ROI とほぼ同じ位置を選んだ。ZEN 2012 ソフトウェア (Carl Zeiss) を使用してオーバーレイ画像を取得した。

## 2.5. CCI マウスの Pilocarpine 誘発けいれん感受性に関する評価

CCI および sham マウスにおける pilocarpine 誘発けいれん感受性は、CCI 負荷後 7、14、21 および 28 日目に評価した。午前中に約 2 時間絶食させた後、0.9% NaCl (Otuka Pharmaceutical Factory, Inc. Tokushima) に溶解した (-) scopolamine methyl nitrate (1 mg/kg、i.p.、Sigma Aldrich) をマウスに投与した。30 分後、0.9% NaCl に溶解した pilocarpine hydrochloride (250、290、350 mg/kg、Sigma Aldrich、i.p.) を投与し、けいれん発作の重症度を 90 分間評価した。けいれん発作重症度は、一般的な Racine scale<sup>32</sup> を一部改変した方法で評価した。以下に示す Stage1-6 が測定に用いた評価項目である。

Stage 1: immobility

Stage 2: head nodding, stiff tail

Stage 3: forelimb myoclonus

Stage 4: severe seizure with rearing without falling

Stage 5: severe seizure with jumping and falling

Stage 6: tonic-clonic convulsion culminating in death

## 2.6. Imatinib 投与方法

PDGFR $\beta$  シグナルの活性化を阻害するために、PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤

imatinib (200 mg/kg, p.o., Wako) を、CCI 負荷当日 (0 日目) から CCI 負荷後 4 日目まで (計 5 日間)、12 時間間隔で 1 日 2 回経口投与した。但し、0 日目は CCI 負荷の 12 時間前と 2 時間前に投与した。Vehicle には distilled water (dH<sub>2</sub>O) を使用した。

## 2.7. 外傷側海馬組織における PDGF-BB 量測定

CCI 負荷 1 日後のマウス (対照として sham 1 日後のマウス) をイソフルランで深麻酔し、氷冷した PBS (2 mL/min で約 5 分間) を心臓から還流した。その後全脳を摘出し、ブレインマトリックスを用いて、嗅球後方から -5~-7mm の位置 (CCI 負荷の影響を受けた位置) でスライスした後、海馬を摘出した。海馬組織を PBS 100 $\mu$ L 中で、電動ミキサー (23M, I.S.O. Inc., Jersey City, NJ, USA) を使用してホモジネートし (10 秒 $\times$ 3 回)、その後ソニケーション (10 秒 $\times$ 3 回) を行った (Vibra-cell<sup>TM</sup>, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)。この組織懸濁液を遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 15000g, 15 分) し、海馬組織上清を回収した。この海馬組織上清中に含まれる PDGF-BB 量を、ELISA kit (MBB00, R & D Systems) を用いて測定した。ELISA 製造業者が提供する実験手順に従って PDGF-BB 濃度を測定した。海馬組織上清中のタンパク量を BCA 法に準拠し測定した。海馬組織中の PDGF-BB 量はタンパク量で補正して表した (pg/mg protein)。

## 2.8. 統計学的解析

GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) を使用し統計解析を行っ

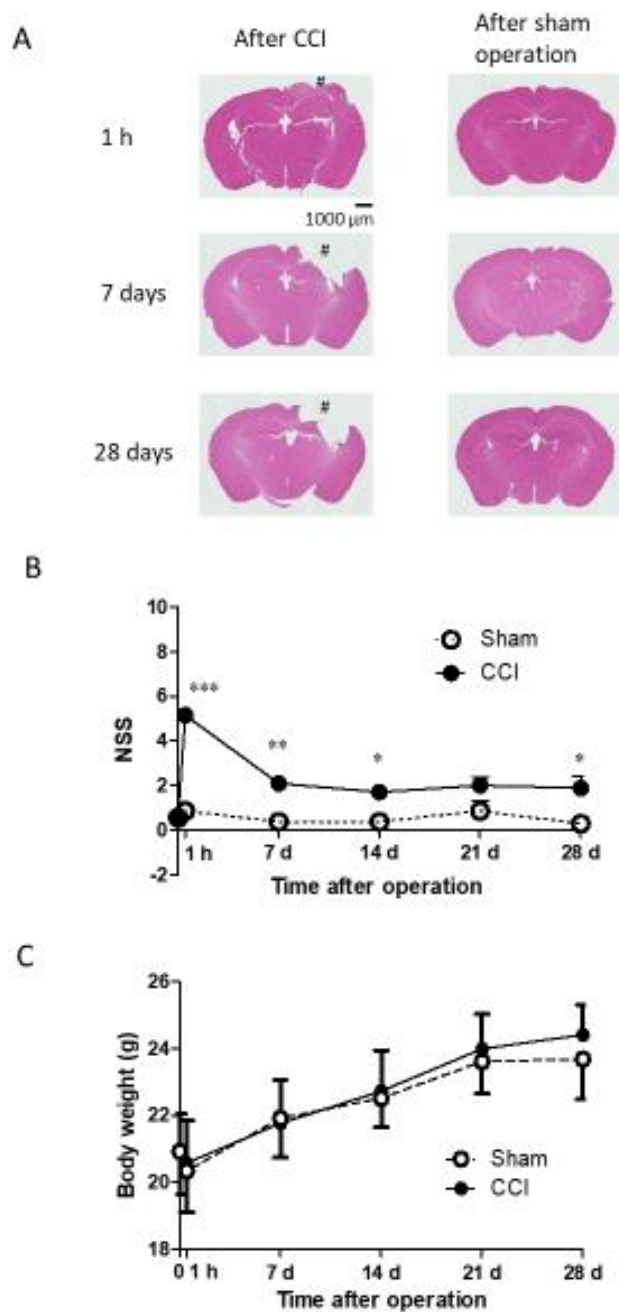
た。NSS の経時的变化および各免疫標識細胞の蛍光強度における群間差は、two-way analysis of variance (ANOVA) とそれに続く Bonferroni 検定で評価した。CCI 負荷後の経時的な Racine scale は Kruskal-Wallis 検定とそれに続く Dunn's 検定により評価した。CCI 負荷後の imatinib 処置群と vehicle 処置群における各標識細胞の蛍光強度および Racine scale 群間比較には、unpaired t-test (片側検定) および Mann Whitney-U 検定 (片側検定) をそれぞれ用いた。結果は、平均±標準誤差 (SEM) または中央値として表示し、p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意であると判定した。



### 3. 結果

#### 3.1. CCI マウスの特徴

術後の各時点（1時間および7日と28日）で採取された脳資料におけるH&E染色の結果から、CCI負荷により大脳皮質が損傷され重篤な組織学的変性をきたすことが判った。このCCIを負荷した同側部の損傷領域は、時間依存的に拡大した（Fig. 1A）。これらのCCIマウスにおけるNSS評価では、CCI負荷1時間後に中程度の神経障害症状（ $5.15 \pm 0.21$ ）を示したが、CCI負荷7日後にはその症状は回復した（ $2.10 \pm 0.22$ ）（Fig. 1B）。CCI負荷28日後においても、改善したNSS値（ $1.89 \pm 0.48$ ）は、sham群のそれ（ $0.29 \pm 0.26$ ）よりも高かった。健康状態の指標として測定した体重は、CCIマウスにおいてCCI負荷後の数日間わずかに減少した（Fig. 1C）。しかし、それ以降は体重増加を認め、7日後にはshamマウスと同程度にまで回復した。今回のCCI負荷条件では、負荷後28日間、CCIマウス（9匹）には死亡は認められなかった。



**Figure 1**

**Histological and behavioral characteristics of the CCI mice.**

(A) Coronal brain sections of CCI and sham mice were stained with H&E at the indicated times. #: injury site, scale bar: 1 mm. (B and C) Time-courses of changes in NSS (B) and body weight (C) after CCI. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. corresponding sham mice.

Table 2.

NSS in sham and CCI mice after operation.

Task	Operation	NSS (after operation)				
		1 h	7 days	14 days	21 days	28 days
Exit a circle within 3 min	Sham	0.07 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	CCI	0.15 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Presence of seeking behavior	Sham	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	CCI	0.06 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Ability to walk straight	Sham	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	CCI	0.03 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Ability to walk on a 3 cm wide beam	Sham	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.13	0.00 ± 0.00
	CCI	0.67 ± 0.08	0.10 ± 0.09	0.10 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Ability to walk on a 2 cm wide beam	Sham	0.04 ± 0.04	0.13 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.13	0.14 ± 0.13
	CCI	0.82 ± 0.07	0.10 ± 0.09	0.20 ± 0.13	0.10 ± 0.09	0.11 ± 0.10
Ability to walk on a 1 cm wide beam	Sham	0.33 ± 0.09	0.25 ± 0.15	0.25 ± 0.15	0.29 ± 0.17	0.14 ± 0.13
	CCI	0.94 ± 0.04	0.50 ± 0.16	0.50 ± 0.16	0.40 ± 0.15	0.56 ± 0.17
Ability to balance on a 7 mm wide beam	Sham	0.11 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.13	0.00 ± 0.00
	CCI	0.55 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.09	0.11 ± 0.10
Ability to balance on a round stick	Sham	0.22 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.12	0.14 ± 0.13	0.00 ± 0.00
	CCI	0.97 ± 0.03	0.60 ± 0.15	0.30 ± 0.14	0.50 ± 0.16	0.44 ± 0.17
Absence of mono- or hemiparesis	Sham	0.07 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	CCI	0.97 ± 0.03	0.80 ± 0.13	0.50 ± 0.16	0.90 ± 0.09	0.67 ± 0.16
Presence of startle reflex	Sham	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	CCI	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Total score	Sham	0.85 ± 0.19	0.38 ± 0.25	0.38 ± 0.17	0.86 ± 0.43	0.29 ± 0.26
	CCI	5.15 ± 0.21	2.10 ± 0.22	1.70 ± 0.28	2.00 ± 0.35	1.89 ± 0.48

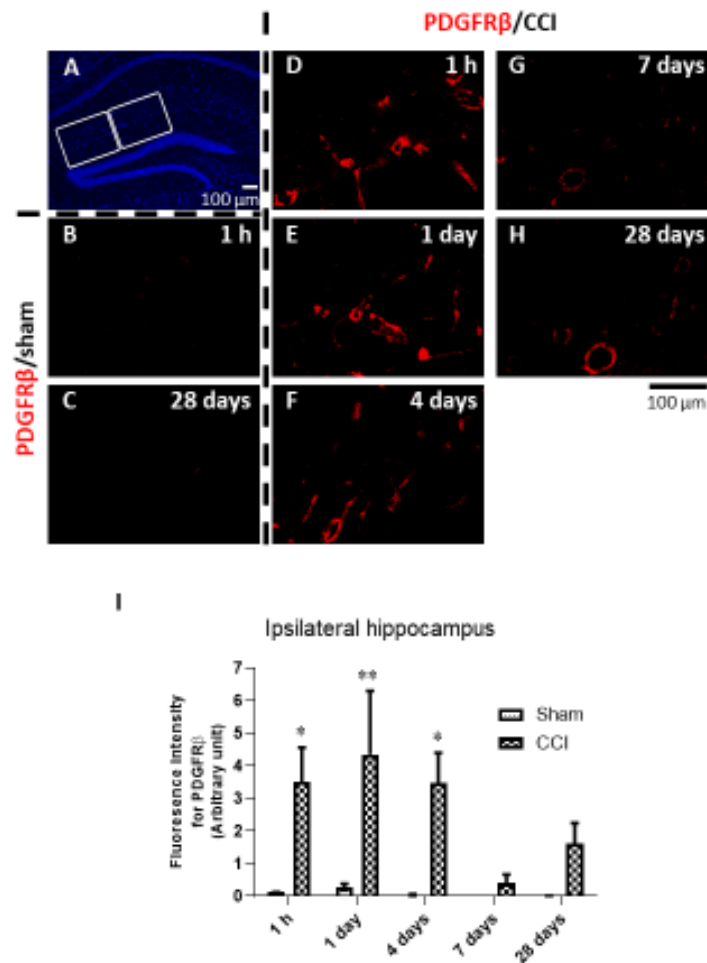
One point is awarded for failure to perform a task. Maximum=10 (failure in all tasks), minimum=0 ( success in all tasks).  
The data are expressed as the mean ± S.E.M.

### 3.2. CCI マウスの外傷側海馬脳ペリサイトにおける PDGFR $\beta$ 発現増加

Fig. 2 に示すように、sham マウスの外傷側海馬では、低い PDGFR $\beta$  免疫活性を示す細胞がわずかに認められた (Fig. 2A for ROI、Fig. 2B および C)。CCI マウスの外傷側海馬では、負荷 1 時間後から PDGFR $\beta$  陽性細胞が sham マウスと比較して増加した (Fig. 2B および D)。この CCI マウス海馬における PDGFR $\beta$  免疫活性の蛍光強度は、sham マウスと比較して 29.3 倍の増加を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2I)。この有意に増加した PDGFR $\beta$  免疫活性は、CCI 負荷 1 日後と 4 日後にも観察された (CCI 負荷 1 時間後の蛍光強度のそれぞれ 124% および 99%)。外傷側海馬における PDGFR $\beta$  発現増加は二相性であった。CCI 負荷後 1 時間から 4 日後に最初の著しい上昇、次に 7 日後でわずかな増加 (CCI 負荷 4 日後の強度の 11%) となり (Fig. 2G)、続いて 28 日後における中程度の上昇 (CCI 負荷 4 日後の強度の 46%) (Fig. 2H) という二相性の変化を呈した。また、CCI マウスの損傷反対側海馬では、PDGFR $\beta$  免疫活性は CCI 負荷 1 時間後と 1 日後にわずかに増加した (Fig. S1)。これらの活性増加度は、同一マウスの外傷側海馬と比較して、それぞれ 11% および 8% 程度であった (Fig. 2 および S1)。CCI 負荷 4 日後まで、PDGFR $\beta$  陽性細胞の形態は、脳微小血管周囲細胞の形態に類似していた。そこで、脳ペリサイトマーカー CD13 および基底膜タンパク質 laminin をそれぞれ PDGFR $\beta$  と共染色した。その結果、CCI 負荷 4 日後の CCI マウスでは、PDGFR $\beta$  陽性細胞の多くが CD13 陽性細胞であり (Fig. 3A–C)、それらは基底膜 laminin 近傍に局在していることが判った (Fig. 3D–

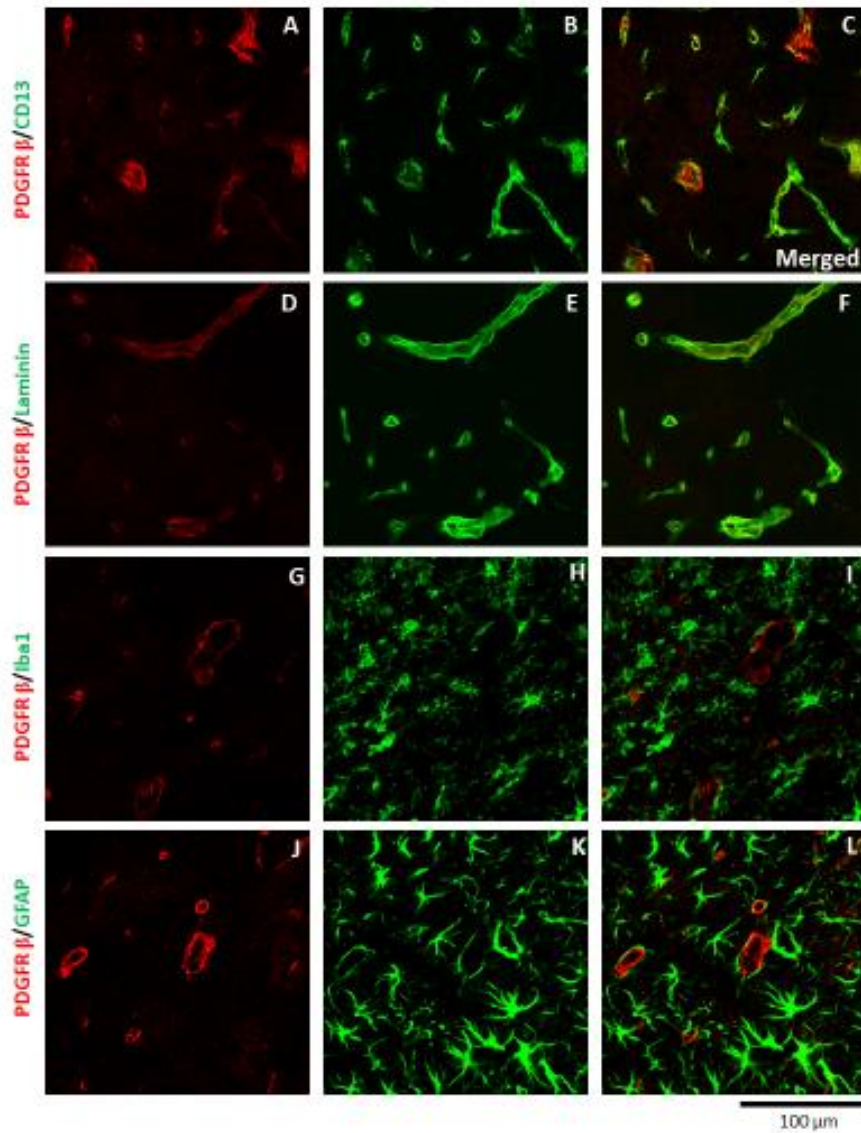
F)。一方、Iba1 (Fig. 3G-I) および GFAP 陽性細胞 (Fig. 3J-L) では、PDGFR $\beta$  との共発現は殆ど認められなかった。

CCI 負荷により PDGFR $\beta$  のアゴニストである PDGF-BB の発現量が変化するかを評価するため、ELISA 法を用いて海馬中の PDGF-BB 量を測定した。外傷側海馬における PDGF-BB 量は、sham および CCI 負荷 1 日後のマウスでそれぞれ  $4.96 \pm 0.44$  および  $18.35 \pm 2.62$  pg/mg protein であった。CCI 負荷により海馬中の PDGF-BB 量は sham マウスと比較して 3.7 倍に増加した ( $p < 0.01$ , Fig. S3)。



**Figure 2**  
**Temporal profiles of PDGFRβ immunoreactivity in the injured ipsilateral hippocampus after CCI.**

(A) Representative DAPI-stained image of the hippocampus in sham mice. The selected hippocampal region is determined according to the mouse brain atlas<sup>33</sup>. The two square areas outlined in white show the positions of the ROI in the following panels. Scale bar in panel A: 100 μm. (B–H) Representative images of PDGFRβ immunoreactivity (red) in the injured ipsilateral hippocampus of sham mice at 1 h (B) and 28 days (C) and that of CCI mice at 1 h (D) and 1 (E), 4 (F), 7 (G) and 28 days (H) after CCI. (I) Quantification of PDGFRβ immunoreactivity at the indicated times after CCI and in sham mice. The data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=3–4). Scale bar for B–H is shown under panel H: 100 μm. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 vs. corresponding sham mice.



**Figure 3**  
**Double immunofluorescence staining for PDGFR $\beta$  and CD13, laminin, Iba1 or GFAP in the injured ipsilateral hippocampus at 4 days after CCI.**

Left panels (A, D, G and J) show PDGFR $\beta$  immunoreactivity (red). Middle panels show immunoreactivities (green) for CD13 (B), laminin (E), Iba1 (H) and GFAP (K). Each right panel (C, F, I and L) shows the merged image of the left and middle panels. Scale bar: 100  $\mu$ m.

### 3.3. CCI マウスの外傷側海馬における PDGFR $\beta$ 発現増加後のミクログリアおよびアストロサイト活性化

#### トロサイト活性化

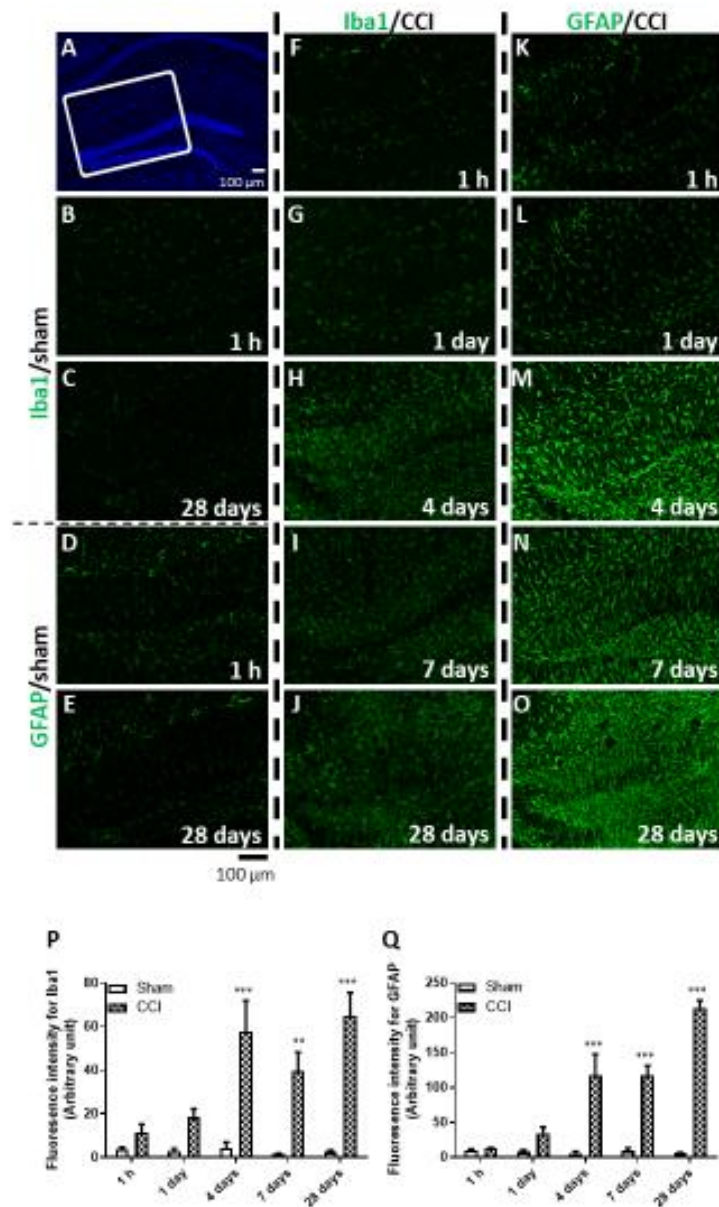
術後 1 時間および 28 日の sham マウスでは、蛍光強度の低い Iba1 および GFAP 免疫活性が海馬に散見された (Fig. 4A for ROI および Fig. 4B-E)。Iba1 の蛍光強度は、CCI 負荷 1 時間後および 1 日後にわずかに増加した (Sham マウスと比較して、それぞれ 3.0 倍と 6.6 倍の増加) (Fig. 4F、G、P)。CCI 負荷 4 日後に、CCI マウスは sham マウスと比較して Iba1 免疫活性が 13.4 倍の増加を示し、この有意な増加は 28 日後まで持続していた (26.5 倍の増加) (Fig. 4H、I、J および P)。外傷側海馬の Iba1 陽性細胞は、CCI 負荷 4 日後に肥大化した形態を示した (Fig. 3H および 4H)。28 日後には、肥大化した Iba1 陽性細胞の突起部の退縮が認められた (Fig. 4J)。また、CCI マウスの反対側海馬における Iba1 免疫活性は、CCI 負荷 4 日後に sham マウスの 6.9 倍になり有意に増加した (Fig. S2A および B)。しかし、この増加した蛍光強度は、同一マウスの外傷側海馬と比較して低かった (43%) (Fig. 4P および S2B)。

外傷側海馬の GFAP 免疫活性は、術後 1 時間では CCI マウスと sham マウスの両方で非常に低く (Fig. 4D、K および Q)、術後 1 日の CCI マウスでわずかに増加した (Fig. 4L および Q)。CCI 負荷 4、7 および 28 日後、CCI マウス (Fig. 4M、N および O) では、対応する sham マウス (Fig. 4E および Q) と比較して、GFAP 免疫活性がそれぞれ 21.9 倍、13.1 倍および 36.2 倍増加した。CCI マウスの GFAP 陽性細胞は、4 日後に肥大お



よび肥厚した突起部を伴う形態変化を示した (Fig. 3K および 4M)。これらの変化に加えて、GFAP 陽性細胞の突起部は、28 日後には典型的な多分枝様外観を呈した (Fig. 4O)。

一方、CCI マウスの反対側海馬では、GFAP 免疫活性は CCI 負荷 4 日後に sham マウスと比較して 7.1 倍に有意に増加し、7 日および 28 日後にはそれぞれ 3.5 倍および 2.2 倍とわずかな増加を認めた (Fig. S2A と C)。しかし、これら CCI 負荷 4、7 日および 28 日後の反対側海馬で増加した GFAP 活性は、同一マウスの外傷側海馬と比較して低かった (それぞれ 35%、17% および 6%) (Fig. 4Q および S2C)。



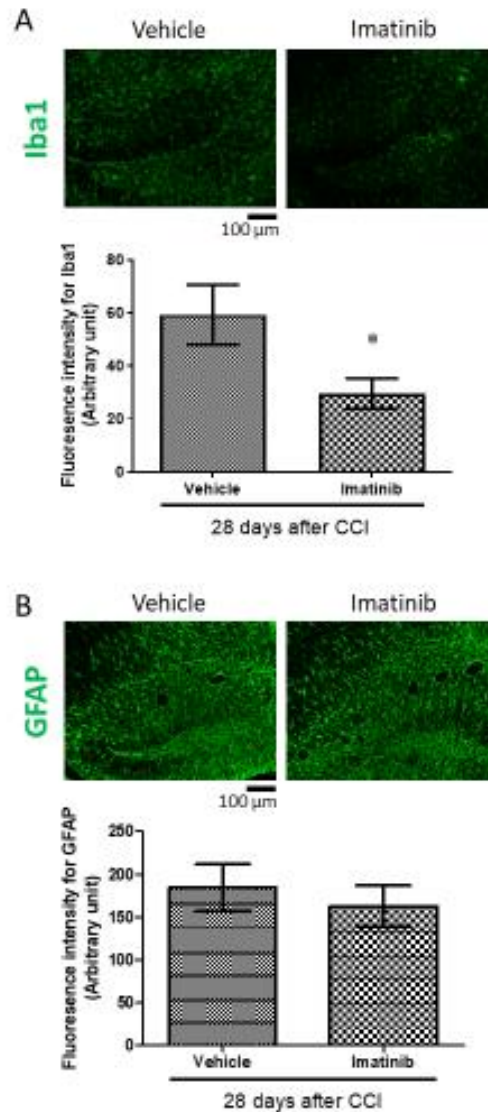
**Figure 4**

**Time-dependent changes in Iba1 and GFAP immunoreactivities in the injured ipsilateral hippocampus after CCI.**

(A) Representative DAPI-stained image of the hippocampus in sham mice. The selected hippocampal region is determined according to the mouse brain atlas<sup>56</sup>. The area outlined in white show the positions of the ROI in the following panels. Scale bar in panel A: 100  $\mu$ m. (B–O) Representative images of Iba1 immunoreactivity (green) in the ipsilateral hippocampus of sham mice at 1 h (B) and 28 days (C) and of CCI mice at 1 h (F) and 1 (G), 4 (H), 7 (I) and 28 days (J) after CCI. Representative images of GFAP immunoreactivity (green) in the ipsilateral hippocampus of sham mice at 1 h (D) and 28 days (E) and of CCI mice at 1 h (K) and 1 (L), 4 (M), 7 (N) and 28 days (O) after CCI. The scale bar for B–O is shown under panel E: 100  $\mu$ m. (P and Q) Quantification of Iba1 (P) and GFAP (Q) immunoreactivities at indicated times after CCI and sham operation. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=3–4) \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 vs. corresponding sham mice.

### 3.4. CCI 後早期における imatinib 亜慢性投与および CCI 負荷 28 日後のグリア細胞活性化に対するその効果

Imatinib (200mg/kg、p.o.) を、手術日(0 日)から術後 4 日までの 5 日間、12 時間間隔で 1 日 2 回投与した。初期段階でのこの亜慢性 imatinib 処置は、CCI 負荷 28 日後に vehicle 投与 CCI マウスの Iba1 免疫活性上昇を有意に減少させた (Vehicle 処置 CCI マウスの 49.8%) (Fig. 5A)。一方、GFAP 免疫活性増加は、imatinib の影響を受けなかった (Vehicle 処置 CCI マウスの 88.3%) (Fig. 5B)。



**Figure 5**  
**Effect of subchronic imatinib treatment in the early phase after CCI on activated microglia and astrocytes in the injured ipsilateral hippocampus at postoperative day 28.**

CCI mice were treated with imatinib for 5 days after injury (postoperative day 0–4) and were then analyzed histologically at 28 days after CCI. (A) Representative images of Iba1 immunoreactivity (green) in the ipsilateral hippocampus of CCI mice treated with vehicle (top left panel) and imatinib (top right panel). Bottom panel shows quantification of Iba1 immunoreactivity in CCI mice at postoperative day 28. (B) Representative images of GFAP immunoreactivity (green) in the ipsilateral hippocampus of CCI mice treated with vehicle (top left panel) and imatinib (top right panel). Bottom panel shows quantification of GFAP immunoreactivity in CCI mice at postoperative day 28. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=4). Scale bar: 100  $\mu$ m. \*p < 0.05 vs. vehicle-treated CCI mice.

### 3.5. CCI マウスの pilocarpine 誘発けいれん感受性の増加に対する CCI 負荷後早期の imatinib 亜慢性投与の効果

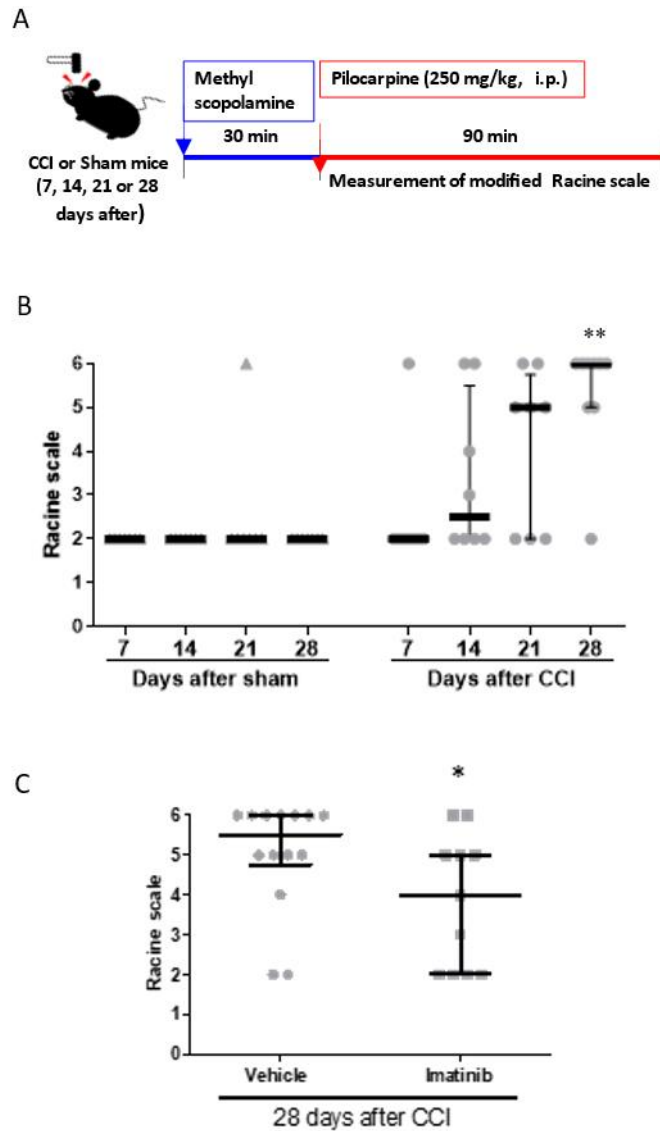
実験計画を Fig. 6A に示す。高用量 pilocarpine (290 および 350 mg/kg, i.p.) は、sham マウスにおいても Racine scale stage 5 以上のけいれん発作を誘発したが (オペ 28 日後の sham マウスにおいて、290 mg/kg 投与で stage 5 以上のけいれん発生率 100%、350 mg/kg 投与で発生率 67%、各 n=3 )、250 mg/kg を投与した sham マウスでは stage 3 を超える発作をほとんど誘発しなかった (n=1 of 28 mice) (Fig. 6B)。従って、CCI マウスの pilocarpine 誘発けいれん感受性の評価には、発作閾値下限用量である 250 mg / kg を使用した (Fig. 6B)。pilocarpine によって誘発される stage 5 以上のけいれん発作発生率は、CCI 負荷 7、14、21 および 28 日後と経時的に増加し、28 日後で最も高い発生率 (89%) を認めた (Fig. 6B)。一方、sham マウスでは、術後 28 日において stage 5 以上のけいれん発作を示さなかった。

Pilocarpine 投与と stage 5 以上のけいれん発作発症との間の平均潜伏時間は、CCI 負荷 21 日後で  $77.0 \pm 4.0$  分 (stage 5 以上のけいれん発作を起こしたマウス; n = 5/8) および 28 日後で  $56.5 \pm 4.4$  分 (stage 5 以上のけいれん発作を起こしたマウス; n = 8/9)。Pilocarpine 誘発性けいれん発作の重症度は、CCI マウスでは時間とともに上昇したが、sham マウスでは上昇しなかった (Fig. 6B)。CCI 負荷 28 日後 (中央値として stage 6) では、7 日後 (中央値として stage 2) よりも有意にけいれん発作重症度が高かった。一方、sham 群

は、術後 28 日間、一貫して低い発作重症度（中央値として stage 2）を示した。

CCI 負荷後 0~4 日に imatinib を投与された CCI マウスは、28 日後に中央値として stage 4 のけいれん発作を示した。Imatinib 処置 CCI マウスのけいれん発作重症度は、vehicle を用いた CCI マウス（中央値としてステージ 5.5）よりも有意に低かった（Fig. 6C）。

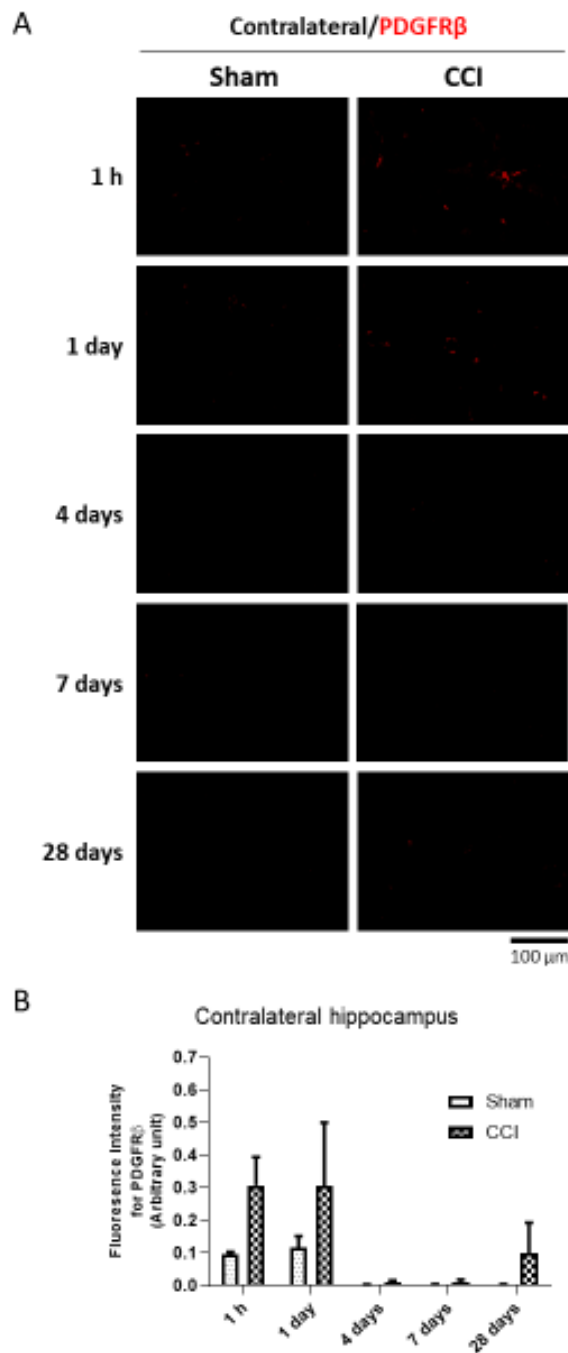
Pilocarpine 投与による stage 5 以上のけいれん発作の発症までの平均潜伏時間は、vehicle 処置マウスで  $49.8 \pm 3.5$  分（stage 5 以上のけいれん発作を起こしたマウス; n = 11/14）および imatinib 処置マウスで  $54.6 \pm 6.1$  分（stage 5 以上のけいれん発作を起こしたマウス; n = 5/11）であった。



**Figure 6**  
**Hypersusceptibility to a sub-threshold dose of pilocarpine in CCI mice and effect of imatinib treatment in the early phase after CCI on the hypersusceptibility at postoperative day 28.**

(A) Experimental design for evaluating seizure susceptibility to a sub-threshold dose of pilocarpine (250 mg/kg, i.p.). Convulsive behavior induced by pilocarpine was graded using the modified Racine scale. (B) The severity of convulsive behavior in sham and CCI mice at postoperative day 7, 14, 21 and 28 (n=7-9). \*\*p < 0.01 vs. sham mice at postoperative day 28. (C) The severity of convulsive behavior in vehicle- or imatinib-treated CCI mice at postoperative day 28. The data are expressed as medians with interquartile ranges (n=11-14). Each point represents data from one animal. \*p < 0.05 vs. vehicle-treated CCI mice.

### Supplementary figures (S1-3)

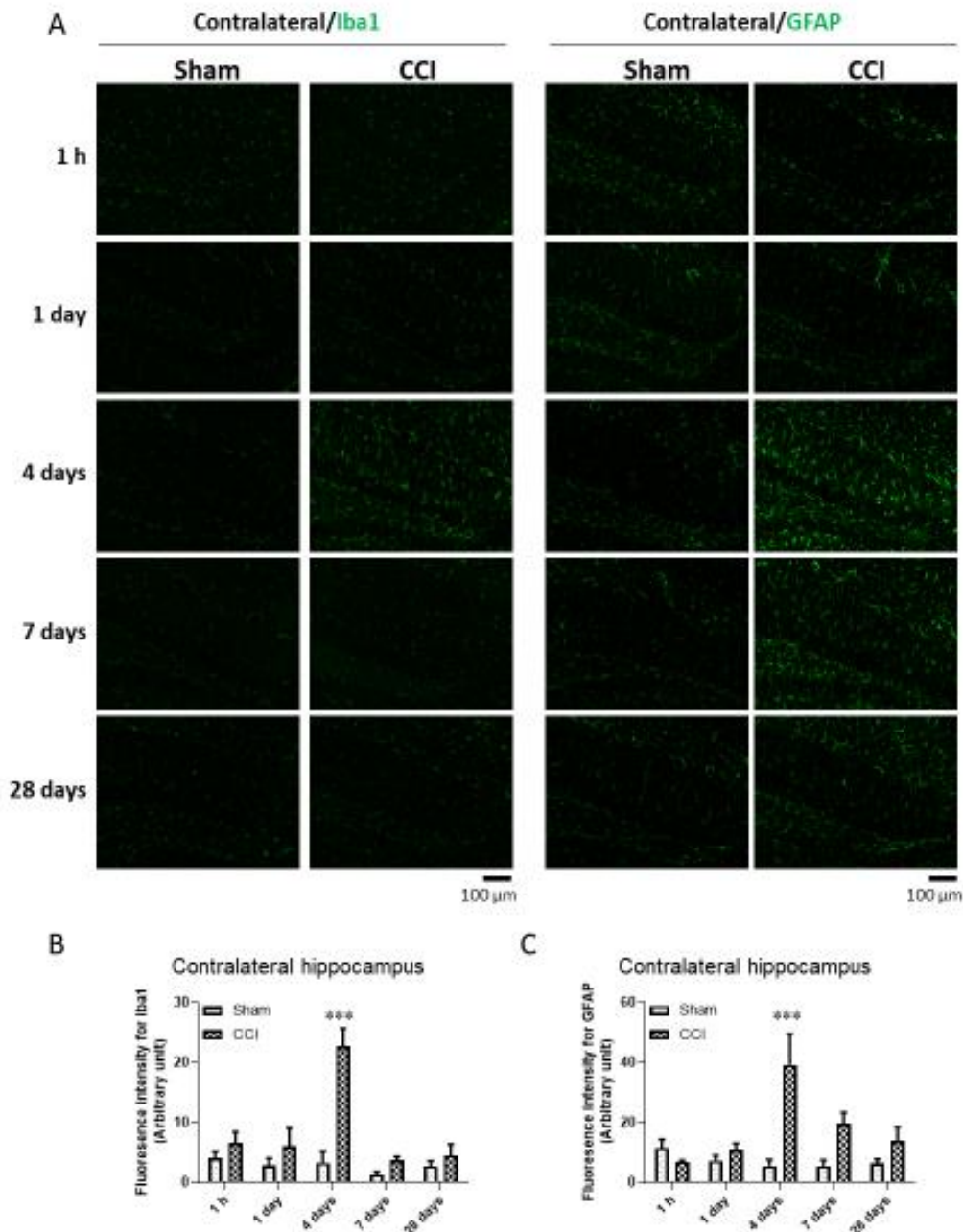


#### Supplementary figure 1.

#### Time-dependent changes of PDGFR $\beta$ immunoreactivity in the contralateral hippocampus of CCI mice.

(A) Representative images of PDGFR $\beta$  immunoreactivity in the contralateral hippocampus of sham and CCI mice at 1 h and 1, 4, 7 and 28 days after operation. The scale bar is shown under the panel: 100  $\mu$ m. (B) Quantification of PDGFR $\beta$  immunoreactivity at indicated times in the contralateral hippocampus after CCI or sham operation. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=3–4).

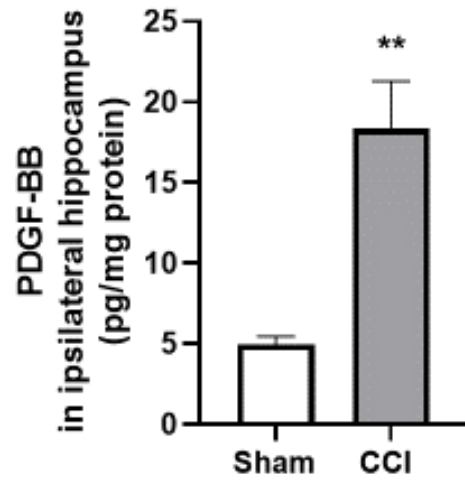




**Supplementary figure 2.**

**Time-dependent changes in Iba1 and GFAP immunoreactivities in the contralateral hippocampus of CCI mice.**

(A) Representative images of Iba1 (left panel) and GFAP (right panel) immunoreactivity in the contralateral hippocampus of sham mice and CCI mice at 1 h and 1, 4, 7 and 28 days after operation. The scale bar is shown under the panel: 100  $\mu$ m. (B and C) Quantification of Iba1 (B) and GFAP (C) immunoreactivities at indicated times in the contralateral hippocampus after CCI or sham operation. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=3–4) \*\*\*p < 0.001 vs. corresponding sham mice.



**Supplementary figure 3.**

**Elevated PDGF-BB levels in injured hippocampus at 1 day after CCI**

PDGF-BB levels in the ipsilateral hippocampus of sham and CCI mice at 1 day after operation were measured by ELISA (MBB00, R&D systems). The data are expressed as the mean  $\pm$ S.E.M. (n=5) \*\*p < 0.01 vs. sham mice

#### 4. 考察

TBI 発症には転倒・転落、スポーツ外傷、交通事故など様々な要因がある<sup>1</sup>。TBI 受傷者は急性傷害からの回復後、数か月から十数年の期間を経て、遅発性てんかん、慢性的な認知障害、パーキンソン病などの二次性障害を惹き起こすことが報告されている<sup>3,34,35</sup>。しかし、TBI がこれらの神経疾患発症リスクを上昇させる機序は未だ不明である。

TBI は 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および脳血管障害を誘発し、脳機能障害へと導く<sup>36-38</sup>。従って TBI は、NVU 構成細胞間に不調和をもたらし、これらは TBI 後の二次性障害に関連している可能性がある。本研究では、NVU 構成細胞の中でも、外傷側海馬領域における脳ペリサイトの高反応性に焦点を当て、TBI が NVU の非協調的な細胞間クロストークを誘発し、神経活動を変化させる可能性を明らかにした。我々は、CCI 法<sup>39</sup>を用いてマウスに TBI を負荷した。CCI マウスは、CCI 負荷 1 時間後に平均 5 の NSS を示した。この行動学的障害は 7 日後までに回復し（スコア 2）、28 日後まで低スコアが持続した。CCI マウスは、CCI 負荷 1 時間後に運動能力障害と反対側後脚の麻痺を示したが、7 日後には運動能力の回復を認めた。また NSS の結果から、本研究で設定した TBI 負荷強度は中程度であることが判った<sup>40</sup>。免疫組織化学実験の結果、CCI 負荷 1 時間後から 4 日後に、外傷側海馬における PDGFR $\beta$ （脳ペリサイトマーカー）発現が有意に増加することが明らかになった（Fig. 2）。この PDGFR $\beta$  陽性細胞では、別の脳ペリサイトマーカーである CD13<sup>41</sup> の共局在が認められた（Fig.

3)。一方、ミクログリアとアストロサイトは、CCI モデル<sup>28,42</sup> 含む TBI の殆どの動物モデルにおいて顕著な活性化が生じる。我々の成績も同様に、Iba1 (ミクログリア活性化マーカー) および GFAP (アストロサイト活性化マーカー) 発現が、CCI 負荷 4 日後の外傷側海馬領域において有意に増加することを示した。しかし、1 時間後と 1 日後においては統計学的に有意な変化を認めなかった (Fig. 4)。また、CCI 負荷 4 日後の Iba1 および GFAP 陽性細胞は、ミクログリアおよびアストロサイトの活性化に特徴的な形態学的変化を示した (Fig.3 および 4)<sup>43,44</sup>。このミクログリアおよびアストロサイトの活性化は、CCI 負荷 28 日後まで持続した (Fig3. および 4)。興味深いことに、CCI に対するグリア細胞の反応開始が脳ペリサイトと比較して遅発的であることが判った。これらの結果から、CCI 負荷後の脳ペリサイトの急速な反応性上昇が、CCI 負荷 28 日後の Iba1 および GFAP 発現の増加と関連している可能性が考えられる。

PDGFR $\beta$  はチロシンキナーゼ受容体ファミリーに属し、imatinib は PDGFR $\beta$  チロシンキナーゼ活性の阻害剤である<sup>45</sup>。そこで、我々は CCI 負荷 0~4 日後に imatinib を経口投与し、脳ペリサイト PDGFR $\beta$  シグナル活性阻害を試みた。この TBI 負荷後早期 (CCI 負荷 4 日まで) では、外傷側海馬における脳ペリサイトの PDGFR $\beta$  発現が著しく増加したが、ミクログリア (Iba1 陽性) およびアストロサイト (GFAP 陽性) は PDGFR $\beta$  を殆どまたは全く発現しなかった (Fig.3)。次に、CCI 負荷 28 日後の Iba1 および GFAP 発現における Imatinib 投与の効果を検討した。Imatinib による脳ペリサイト PDGFR $\beta$  シ

グナル活性阻害は、CCI負荷28日後の外傷側海馬における Iba1 発現上昇を抑制したが、GFAP 発現上昇は抑制しなかった (Fig. 5)。これらの結果に基づくと、CCI 負荷後早期における脳ペリサイト PDGFR $\beta$  発現増加は、28 日後のミクログリア活性化に關与している可能性を示唆する。一方、アストロサイト活性化に高反応性脳ペリサイトは影響を及ぼさないことが示唆された。我々はこれまでに、in vitro において脳ペリサイトから放出されたインターロイキン (IL) -6 がミクログリアの活性化を誘導することを明らかにした<sup>25</sup>。さらに、PDGFR $\beta$  アゴニストである PDGF-BB に応答した脳ペリサイトは IL-6 を分泌し<sup>18</sup>、IL-6 を含む脳ペリサイト由来可溶性因子がミクログリアを活性化する可能性を報告した。CCI マウスのミクログリア活性化における脳ペリサイト由来因子を特定するには、さらなる実験が必要である。

CCI マウスにおける神経興奮性の進展を明らかにするために、pilocarpine に対するけいれん発作誘発感受性を経日的に試験 (7、14、21、28 日後) した。けいれん行動の評価には Racine scale を一部修正 (stage 6: tonic-clonic convulsion culminating in death を追加) した方法を用いた。Pilocarpine は、正常マウスに対し約 300 mg/kg (i.p.) の用量でけいれん発作を誘発する薬剤である<sup>46</sup>が、本研究では 250 mg/kg (i.p.) の用量を使用した。この用量では、sham 群の殆どのマウスで stage 2 を超えるけいれん発作を誘発しなかった (Fig. 6B)。また、250mg/kg (i.p.) では、正常マウスにおけるけいれん発作誘発に不十分であることも報告されている<sup>47,48</sup>。従って、この用量を pilocarpine 誘発けいれ

んの発作閾値下限用量として選択した。興味深いことに、250mg/kg (i.p) の pilocarpine は、CCI 負荷 7 日後から一部の CCI マウスでけいれん発作を誘発した。CCI 負荷 28 日後の、stage5 および 6 のけいれん発作発生率は、CCI 負荷 7 日後および 28 日後 sham マウスのけいれん発作発生率と比較して増加した (Fig.6B)。これらの結果は、発作閾値下限用量の pilocarpine に対するけいれん誘発感受性が、CCI マウスにおいて経時的に増加することを示している。Pilocarpine によるけいれん発作誘発機序については未だ不明な点が多い。発作閾値用量の pilocarpine を正常マウスに投与すると、コリン作動性の過剰活性化やグルタミン酸や GABA などの神経伝達物質が変動するとの報告がある。これらの変化が、神経回路網の興奮/抑制系の不均衡が生じ、けいれん発作が誘発されることが考えられる<sup>46, 49-51</sup>。従って、CCI 後に形成された異常な神経回路網が、CCI マウスにおける発作閾値下限用量の pilocarpine 誘発性けいれんに関連していると考えられる。Pilocarpine に対するけいれん誘発感受性が経日的に増加するという結果と合わせて考えれば、神経興奮性の変化は、CCI 後に徐々に進展する可能性がある。

CCI28 日後の pilocarpine に対する高感受性は、imatinib 処置 (CCI 負荷後 0~4 日) によって低減した (Fig. 6C)。従って、CCI 後の脳ペリサイトにおける PDGFR $\beta$  の急速な増加は、遅発的に進行する脳の過剰興奮性を加速させる可能性がある。CCI 負荷 1 日後の外傷側海馬で、PDGFR $\beta$  のアゴニストである PDGF-BB の発現量が有意に増加していた (Fig. S3)。また、脳ペリサイトにおける PDGF-BB を介した PDGFR $\beta$  の活性化は、in

in vitro で BDNF および NGF の放出を誘導する<sup>18</sup>。これらの液性因子は、海馬における発作の発生と神経の過剰興奮性の加速に関係しており<sup>52,53</sup>、CCI 後の神経過剰興奮性は反応性脳ペリサイト由来の液性因子に起因することが示唆される。TBI 後の脳ペリサイトと神経間の異常なクロストークの発生をより理解するには、さらなる研究が必要である。

炎症条件下でのミクログリア活性化は、海馬における神経回路網の興奮性を増加させる<sup>54,55</sup>。CCI 負荷 28 日後の Iba1 発現と pilocarpine によるけいれん誘発感受性の上昇は、imatinib 治療 (CCI 負荷後 0~4 日) によって抑制された (Fig. 5A および 6C)。さらに、CCI による海馬のミクログリア活性化は、pilocarpine に対する感受性上昇で示した神経および脳の興奮性増強に先行していた (Fig. 5 および 6)。これらの結果は、CCI 後の興奮性神経回路網の発達において、海馬ミクログリアの活性化が寄与していることを示唆する。CCI に対する脳ペリサイトの反応性がミクログリアの反応性よりも先行することを考慮すると、PDGFR $\beta$  発現の増加はミクログリアの活性化過程の上流で機能し、CCI 後の神経の過剰興奮を誘発する可能性がある。

## 5. 結論

本結果は、CCI 負荷後の外傷側海馬における脳ペリサイト PDGFR $\beta$  発現増加が、ミクログリアの Iba1 およびアストロサイトの GFAP 発現増加に先行することを明らかにした。CCI 負荷後の遅発期におけるミクログリア活性化と脳の過剰興奮は、早期における imatinib 処置によって抑制された。従って、TBI による脳ペリサイトの活性化は、ミクログリア活性化や脳の過剰興奮を含む NVU の非協調的病態の形成に寄与し、TBI の二次的な障害に繋がる可能性がある。



## 第2章

### 1. 序論

脳ペリサイトは脳微小血管に存在し、NVU 構成細胞であるアストロサイトや血管内皮細胞と血液脳関門を構成する<sup>56</sup>。血液脳関門において脳ペリサイトは、アストロサイトのエンドフィートに覆われるように存在する<sup>57</sup>。これら2細胞は近接していることから、脳ペリサイトがアストロサイト機能に影響を及ぼしている可能性がある。実際、アストロサイトのエンドフィートにおける aquaporin-4 の発現は、脳ペリサイトと隣接する領域で増強することが報告されている<sup>58</sup>。しかし健常下および病態下において、脳ペリサイトがアストロサイト機能に及ぼす影響についての研究報告は少なく、未だ不明な点が多い。

第1章において我々は、頭部外傷後の神経易興奮性に先行し、まず脳ペリサイトが病変変化 (PDGFR $\beta$  発現増加) し、遅発的にアストロサイトが活性化 (GFAP 発現増加) することを明らかにした。脳神経の興奮性を評価するために使用した pilocarpine のけいれん発作誘発機序には、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の細胞外濃度増加による、脳神経興奮性上昇の関与が報告されており<sup>49</sup>、頭部外傷後の脳内においてグルタミン酸動態に異常が生じることが示唆される。頭部外傷後、ヒトおよびげっ歯類に共通して、アストロサイトの GFAP 発現量が増加する<sup>59,60</sup>。この GFAP 発現が増加した活性化アストロサイトでは、Na<sup>+</sup>駆動性のグルタミン酸輸送体 (excitatory amino acid transporter:

EAAT) である EAAT1 (げっ歯類における GLAST) および EAAT2 (同 GLT-1) の発現が低下することが報告されている<sup>60,61</sup>。アストロサイトにおける EAAT の発現低下および機能低下は脳神経の興奮性を誘導し、けいれんやてんかん病態形成に寄与することが示唆されている<sup>62</sup>。これらのことから、頭部外傷後の脳ペリサイトが牽引するけいれん易発症病態の形成に、活性化アストロサイトにおける EAAT 発現低下および細胞外グルタミン酸調節機能異常が関与している可能性を考えた。

正常な脳では、細胞外に存在する過剰なグルタミン酸の大半が、EAAT1 および EAAT2 を介してアストロサイトに取り込まれることで<sup>63,64</sup> 細胞外のグルタミン酸濃度が適切に管理され、脳神経の興奮性は厳密に制御されている<sup>65,66</sup>。このアストロサイトの EAAT を介したグルタミン酸取り込み機能は、NVU 構成細胞により制御される。これまでに、活性化ミクログリア<sup>67</sup> および脳血管内皮細胞<sup>68</sup> により、アストロサイトのグルタミン酸取り込み活性が上方制御されることが報告されている。しかし、脳ペリサイトのアストロサイトのグルタミン酸取り込み活性に対する作用については明らかにされていない。我々は正常マウス海馬において、EAAT1 および EAAT2 発現が、脳ペリサイト近傍に認められることを明らかにした (Fig. 2A)。このことから脳ペリサイトが、アストロサイトにおける EAAT1 および EAAT2 発現と、それらを介した細胞外グルタミン酸取り込み能に影響を与えている可能性を考えた。

本研究では、まず頭部外傷マウスにおいて、活性化アストロサイトの EAAT 発現変化に

おける病変化脳ペリサイトの寄与を検討した。さらに、脳ペリサイトがアストロサイトの細胞外グルタミン酸取り込み機能に及ぼす直接的な影響を明らかにするため、ヒト由来の脳ペリサイトと共培養したアストロサイトを用いてグルタミン酸取り込み機能の変化を評価した。本研究は、頭部外傷病態下および健常下における脳ペリサイトが、アストロサイトの細胞外グルタミン酸調節機能に及ぼす影響を提示するものである。

## 2. 方法

### 2.1 実験動物

すべての実験は、動物の愛護及び管理に関する法律 (No. 105、1973 年) および通知 (No. 71 および 88、2006 年) に従い、福岡大学動物委員会の承認後に実施した。実験動物は、雄性 C57BL/6J マウス (6–8 週齢、体重 18-25g、Charles River Laboratory Japan、Yokohama) を使用した。各マウスは次の環境下 (自由摂食および飲水、個別飼育、室温  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル) で飼育した。

### 2.2. 組織学的評価

#### 2.2.1. 組織サンプル作製

マウスをイソフルランで深麻酔し、氷冷した phosphate buffered saline (PBS) を心臓から灌流した (2 mL/min で約 5 分間)。続いて氷冷した 4% paraformaldehyde (PFA) を用いて灌流固定した (2 mL/min で約 5 分間)。摘出した全脳を 4% PFA 中で、一晚浸潤固定した ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 後、20%スクロースで置換した。脳を optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek Japan Co.,) で覆い、ドライアイスを使用して凍結包埋した。凍結包埋後の脳を、クリオスタット ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) を使用して厚さ  $20 \mu\text{m}$  にスライスした。

## 2.2.2 免疫組織化学実験

Primary Antibody (Catalog #, manufacture, dilution used)	Secondary antibody (Catalog #, manufacture, dilution used)	Application
Rat anti-CD13 (#SM2298P, Acris Antibodies, 1:200)	Donkey anti-rat Alexa Fluor 488 (#ab150149, Abcam, 1:500)	Immunofluorescent pericyte marker
Rabbit anti-EAAT2 (GLT-1) (#ab41621, Abcam, 1:500)	Donkey anti-rabbit Cy3 (#711-165-152, Jackson ImmunoResearch, 1:500)	Immunofluorescent astrocyte marker
Rabbit anti-EAAT1 (GLAST) (#ab416, Abcam, 1:100)	Donkey anti-rabbit Cy3 (#711-165-152, Jackson ImmunoResearch, 1:500)	Immunofluorescent astrocyte marker

脳切片を 0.2% Triton-X100 (Sigma Aldrich) を含む tris-buffered saline (T-TBS) 中で洗  
 浄した (15 分、3 回)。続いて blocking one histo (Nacalai Tesque) 中に移し、ブロッキ  
 ングを行った (30 分)。その後、脳切片を一次抗体とインキュベートした (4°C、一晩)。  
 一次抗体は 5% blocking one histo in T-TBS で希釈した (Table 1)。一次抗体処理後、脳切  
 片を T-TBS で洗浄 (10 分、5 回) し、一次抗体の宿主に応じた二次抗体を室温で 2 時間  
 インキュベートした。二次抗体は 5% blocking one histo in T-TBS で希釈した。一次抗体  
 および二次抗体の希釈倍率を下記に示す。Table 1. Antibodies used in immunohistochemical  
 analysis

二次抗体処理後、脳切片を T-TBS で洗浄 (10 分、6 回) した後、vectashield containing  
 DAPI (Vector Laboratories) で核を染色し、脳切片を封入した。

標的タンパク質の発現分布および共局在性を検討するため、染色した脳切片標本を  
 BZ-X710 microscope (Keyence) および共焦点顕微鏡 (LSM 710, Carl Zeiss) を用いて観  
 察した。脳切片は Bregma から約-1.8mm~-2.3mm のものを使用し、海馬 dentate gyrus  
 (DG) および CA1 領域を含む領域を観察した。標本をそれぞれ 20 倍の対物レンズを使

用して観察した。共焦点画像においては、2倍のデジタルズームを施した画像を取得し、その画像を ZEN 2012 ソフトウェア (Carl Zeiss) を使用して重ね合わせ、オーバーレイ画像を構成した。

EAAT2 発現量変化は、BZ-X710 microscope で撮影した画像を用いて評価した。観察対象領域 (ROI) (領域面積:  $393,880 \mu\text{m}^2$ ) における EAAT2 由来の蛍光強度を、BZ-X analyzer software (Keyence) を用いて測定した。データは、外傷側海馬における ROI 領域の単位面積 ( $\mu\text{m}^2$ ) 当たりの EAAT2 (任意単位) の蛍光強度 (ROI あたり) を、反対側海馬の単位面積 ( $\mu\text{m}^2$ ) 当たりの EAAT2 蛍光強度に対する割合 (%) で表した。CCI 負荷 7 または 28 日後のマウス ( $n=4-5$ ) を用いて解析した。

## 2.3. In vitro 実験

### 2.3.1 脳ペリサイトおよびアストロサイトの共培養系作製

ヒト由来脳ペリサイト (4~8 回継代) を用いた (Human brain vessel pericytes, #1200, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA)。本細胞を 2% fetal bovine serum (#0010, ScienCell Research Laboratories)、1% pericyte growth supplement (#1252, ScienCell Research Laboratories) および 1% penicillin/streptomycin solution (#0503, ScienCell Research Laboratories) を含む培地 (#1201, ScienCell Research Laboratories) を用いて培養した。

ヒト由来アストロサイト (4~5 回継代) を用いた (Normal human astrocytes, #CC-2565, Lonza, Basel, Switzerland)。本細胞を ABM™ 基本培地 (#CC-3187, Lonza) および AGM™

SingleQuots™ 添加因子セット (#CC-4123, Lonza) で構成された培地 (AGM™ astrocyte growth medium, #CC-3186, Lonza) を用いて培養した。細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub> / 95% air および加湿環境下で培養された。

脳ペリサイトは、poly-L-lysine (Sigma Aldrich) で被覆されたインサート (ThinCert™-24well, 0.4 μm pore size, Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) に  $2.5 \times 10^4$  cells/well で播種した。アストロサイトは、poly-L-lysine でコーティングされた 24-well プレートに  $10 \times 10^4$  cells/well で播種した。翌日、脳ペリサイトを含むインサートを、アストロサイトを含む 24-well プレートに移動し、アストロサイトの培養用培地である AGM™ astrocyte growth medium 中で 72 時間共培養した (pericyte coculture)。対照群として、アストロサイト単一培養系を作製した (astrocyte monoculture)。培養 48 時間後に培地を交換した。

### 2.3.2 アストロサイトにおける <sup>3</sup>H-L-glutamate の取り込み実験

培養用培地を除去後、ペリサイトと共培養および単一培養したアストロサイトを、assay buffer (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 23 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose and 2 mM MgSO<sub>4</sub>, buffered to pH 7.4, 37 °C) で 2 回洗浄した。その後、<sup>3</sup>H-L-glutamate (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, 0.5 μCi/ mL, 10.2 nM) を含む assay buffer (37 °C) を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C) 内で 1, 2, 5 および 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、プレートを氷上に置き、氷冷した PBS で 3 回洗浄することで <sup>3</sup>H-L-glutamate の取り込みを停止させた。細胞を溶解させるため、0.3

mol/LNaOH を 200  $\mu$ L 添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 日間留置した。細胞溶解液をシンチレーションカクテル (Pico-Fluor™ Plus, PerkinElmer) に入れ、液中に含まれる放射活性を、液体シンチレーションカウンター (LSA 2910TR, PerkinElmer) を用いて測定した。細胞溶解液中のタンパク質量は、BCA 法 (Pierce™ BCA protein assay kit, Thermo Fisher) を用いて測定した。また、Na<sup>+</sup>-free assay buffer は、assay buffer 中の NaCl を等モルの choline chloride (Wako) に置換することにより調製した。<sup>3</sup>H-L-glutamate の取り込み活性は、論文 (Biol. Pharm. Bull. 38, 901-908, 2015) を参考にし、cell/medium ratio ( $\mu$ L/mg protein)として表した。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein}) = \frac{{}^3\text{H-radioactivities in the cells (disintegration per minute (dpm)/mg protein)}}{{}^3\text{H-radioactivities in assay buffer (dpm}/\mu\text{L})}$$

### 2.3.3 EAAT 阻害剤処理

EAAT1 阻害剤 UCPH-101 (10  $\mu$ M, Abcam) もしくは EAAT2 阻害剤 dihydrokainic acid (DHK, 500  $\mu$ M, Tocris, UK) を添加した<sup>3</sup>H]-L-glutamate 含有 assay buffer を、ペリサイトと共培養および単一培養したアストロサイトに 10 分間処理し、<sup>3</sup>H]-L-glutamate の取り込み実験を行った。対照群には、UCPH-101 の溶媒 dimethyl sulfoxide あるいは DHK の溶媒 distilled water を添加した<sup>3</sup>H]-L-glutamate 含有 assay buffer を使用した。

### 2.3.4 脳ペリサイト培養培地の作製

脳ペリサイト (2.5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well) を poly-L-lysine で被覆されたインサート



(ThinCert™- 24well)に播種し、脳ペリサイト用培養培地中で培養した。翌日、培地を AGM™ astrocyte growth medium に交換し、さらに 24 あるいは 48 時間培養した。その培養液を non-stick チューブに回収し、4000 rpm で 5 分間遠心した。その上清を脳ペリサイト培養培地 (pericyte-conditioned medium (CM))とした。Pericyte-CM で 72 時間処理された単一培養アストロサイトを用いて <sup>3</sup>H-L-glutamate 取り込み実験を行った。2.3.1 で示した脳ペリサイト共培養時の培地交換スケジュールに合わせるため、pericyte-CM を処理して 48 時間後に、新鮮な pericyte-CM に交換し、さらに 24 時間処理した。

アストロサイトによるグルタミン酸の取り込みに対する pericyte-CM の濃度依存的な影響を検討するため、AGM™ astrocyte growth medium を 2 倍希釈した pericyte-CM (pericyte-CM (50%))および希釈していない pericyte-CM (pericyte-CM (100%))を、それぞれ単一培養アストロサイトに 72 時間処理した。Pericyte-CM を含まない AGM™ astrocyte growth medium (pericyte-CM (0%)) を 72 時間処理したアストロサイトを対照群とした。

また、pericyte-CM 中の脳ペリサイト由来液性因子を不活化するため、pericyte-CM を加熱処理した (65°C、30 分間)<sup>73</sup>。この加熱処理された pericyte-CM を希釈せずに(heat inactivated pericyte-CM (100%))、単一培養アストロサイトに 72 時間処理した。

## 2.4. 統計解析

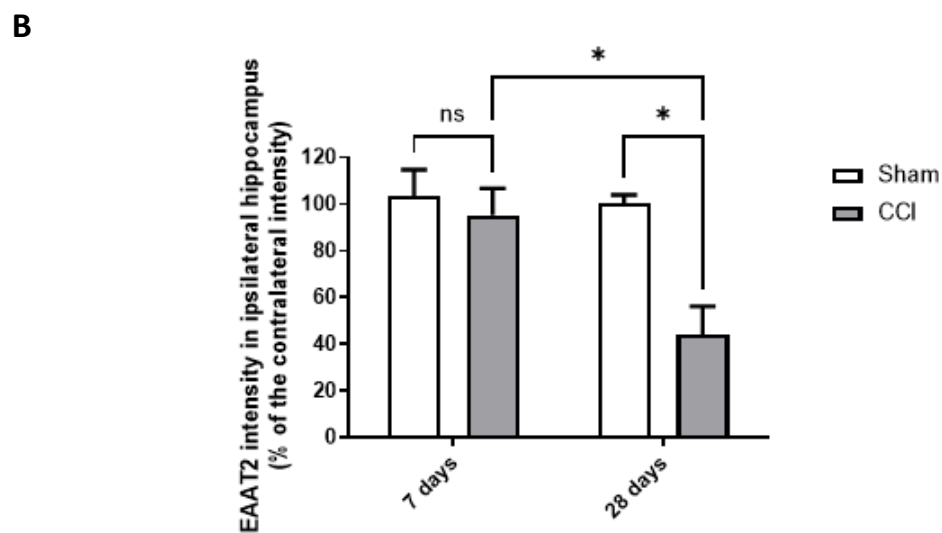
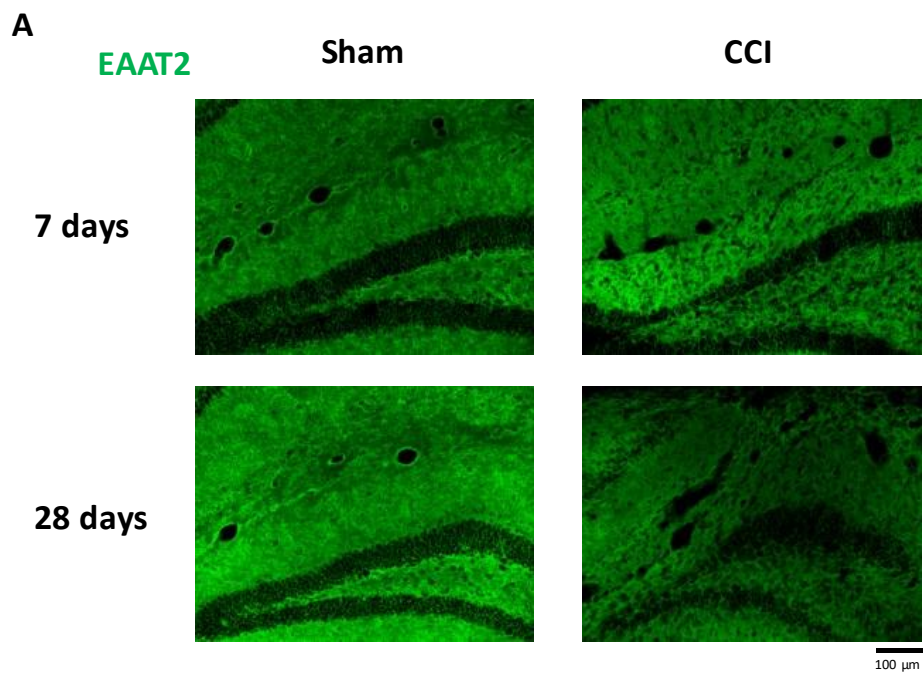
GraphPad Prism 8 software (GraphPad) を使用し、統計解析を行った。Fig.1B で示す EAAT2 発現の経時変化および Fig.3C で示す 4 群間の比較は two-way analysis of variance

(ANOVA) と、それに続く Bonferroni's multiple comparisons test で評価した。Fig.3B で示す <sup>3</sup>H-L-glutamate 取り込み量の経時的变化は、linear regression analysis を用いた。Fig.2B で示す CCI 負荷後の imatinib 処置群と vehicle 処置群における EAAT2 発現変化、Fig.4 で示すアストロサイト単一群とペリサイト共培養群間における、DHK および UCPH-101 による <sup>3</sup>H-L-glutamate 取り込み阻害効果並びに Fig.4A の inset データ、Fig. 5 で示す EAAT タンパク発現量は、unpaired t-test (two-tailed) で評価した。Fig.6 で示す pericyte-CM による影響は one-way ANOVA と、それに続く Dunnett's multiple comparisons test で評価した。実験結果は、平均±標準誤差 (SEM) で表し、p 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判定した (\* p<0.05, \*\*or ## p<0.01)。

### 3. 結果

#### 3.1 CCI 負荷 28 日後の外傷側海馬において EAAT2 発現が減少し、亜慢性 imatinib 投与はその減少を抑制させた

術後 7 日の外傷側海馬におけるグルタミン酸輸送体 EAAT2 発現（反対側の蛍光強度に対する割合）は、CCI 負荷マウス ( $95.23 \pm 10.34\%$ ) と sham マウス ( $103.63 \pm 9.63\%$ ) 間で差を認めなかった。一方、術後 28 日の外傷側海馬では、CCI 負荷マウス ( $44.01 \pm 10.94\%$ ) は、sham マウス ( $100.57 \pm 2.97\%$ ) および CCI 負荷 7 日後のマウス（前述）それぞれと比較して、EAAT2 発現の有意な減少を認めた (Fig. 1A and B)。CCI 負荷後の脳ペリサイト PDGFRB シグナル活性の増加が、CCI 負荷 28 日後の EAAT2 発現に及ぼす影響検討した。亜慢性 imatinib 投与により CCI 負荷後の脳ペリサイト PDGFR $\beta$  シグナル活性を阻害した。CCI 負荷 28 日後に vehicle 投与群 ( $69.80 \pm 4.42\%$ ) で認められた EAAT2 発現減少は、imatinib 投与群 ( $102.71 \pm 6.41\%$ ) ではその減少が有意に抑制された (Fig. 2A and B)。

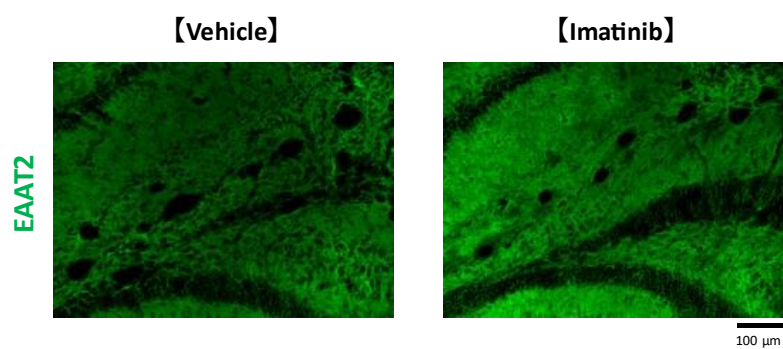


**Figure 1.**  
**Time-dependent changes in EAAT2 immunoreactivities in the injured ipsilateral hippocampus after CCI**

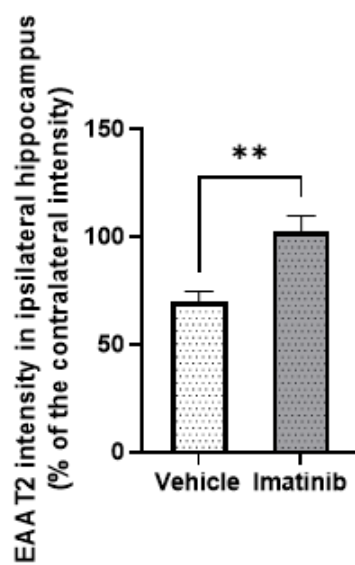
(A) Representative images of EAAT2 immunoreactivity (green) in the ipsilateral hippocampus of sham mice at 7 (top left panel) and 28 days (bottom left panel) and of CCI mice at 7 (top right panel)

and 28 days (bottom right panel) after operation. The scale bar: 100  $\mu$ m.  
(B) Graph shows quantification of EAAT2 immunoreactivity in ipsilateral hippocampus at postoperative day 7 and 28. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=4-5). \*p < 0.05

**A**



**B**



## Figure 2

### Effect of subchronic imatinib treatment in the early phase after CCI on EAAT2 expression in the injured ipsilateral hippocampus at postoperative day 28.

(A) Mice were treated with imatinib for 5 days after injury (postoperative day 0–4) and were then analyzed histologically at 28 days after operation. Representative images of EAAT2 immunoreactivity (green) in the ipsilateral hippocampus of CCI mice treated with vehicle (left panel) and CCI mice treated with imatinib (right panel). The scale bar: 100  $\mu$ m. (B) Graph shows quantification of EAAT2 immunoreactivity in ipsilateral hippocampus of CCI mice at postoperative day 28. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=5). \*\*p < 0.01 vs. vehicle-treated CCI mice.

### 3.2 正常マウス海馬のアストロサイト EAAT1 および EAAT2 発現は、脳ペリサイト近傍に認められた

正常マウス海馬微小血管の脳ペリサイト (CD13 陽性) 近傍において、アストロサイトの代表的なグルタミン酸輸送体である EAAT1 および EAAT2 の発現が認められた (Fig. 3A)。

### 3.3 脳ペリサイトは、アストロサイトにおけるグルタミン酸取り込み活性を増加させた

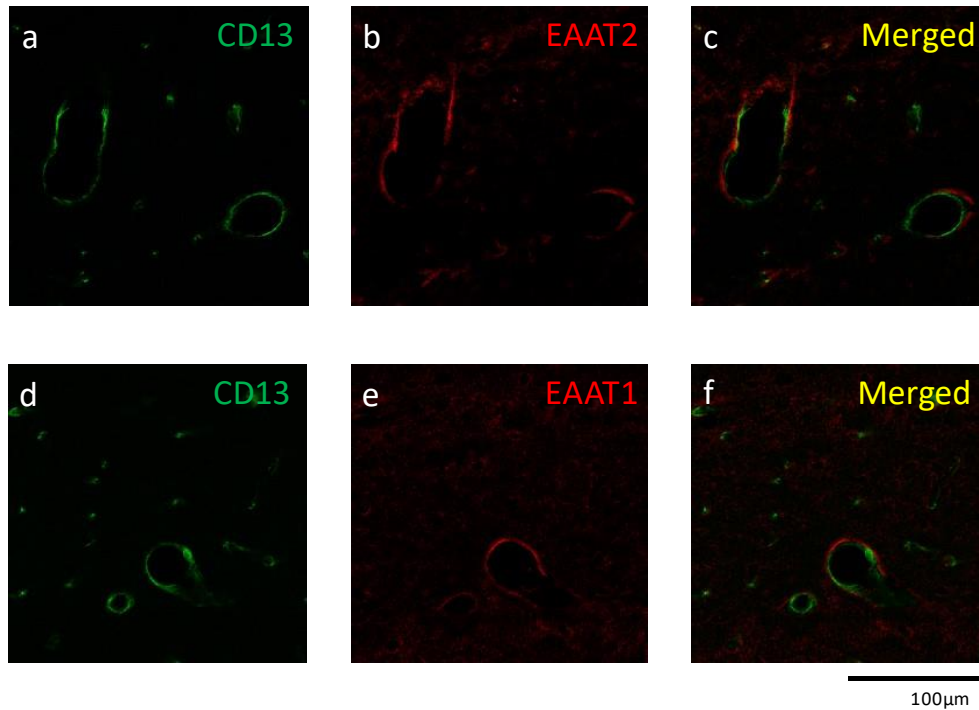
$^3\text{H-L-glutamate}$  の取り込み量は、cell/medium ratio ( $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ )として表した。アストロサイト単一群における 1 分間の  $^3\text{H-L-glutamate}$  取り込み量は  $8.72 \pm 1.38 \mu\text{L}/\text{mg protein}$  であった。各実験毎のアストロサイト単一群における 1 分間の取り込み量を 100%として、経時的な取り込み量変化および共培養群における取り込み量変化を評価

した。3H-L-glutamate を 10 分間負荷した際の取り込み量は、アストロサイト単独群 (1123.34±58.64%) と比較し、共培養群 (1609.27±145.18%) ではその取り込み量が 1.43 倍と有意に増加した (Fig. 3B)。さらに linear regression analysis を用いた検討において、これら 2 直線の傾き (アストロサイト単一群は 111.6、共培養群は 161.3) に有意な差を認めた ( $p<0.01$ , Fig. 3B)。従って共培養群では取り込み速度が増加したことが解った。

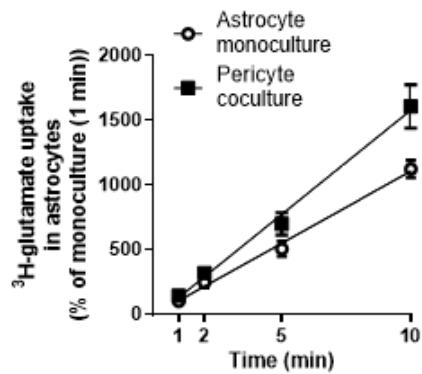
### 3.3 Na<sup>+</sup>駆動性輸送体は、共培養後アストロサイトのグルタミン酸取り込みに寄与した

アストロサイトにおけるグルタミン酸取り込みの主たる経路である、Na<sup>+</sup>駆動性輸送体 EAAT1 および EAAT2 の寄与を検討する為、細胞外 Na<sup>+</sup>非存在下における <sup>3</sup>H-L-glutamate の取り込み実験を行った。Na<sup>+</sup>含有 assay buffer (control) を使用したアストロサイト単一群における 10 分間の取り込みを 100 %とした時、共培養群においては 129.32±7.65 %となり、脳ペリサイトがグルタミン酸取り込みを有意に増強した。さらに、Na<sup>+</sup>-free assay buffer の使用により、単一群は 18.97±0.97 %、共培養群は 22.96±2.20 %と有意な減少を示した。この Na<sup>+</sup>非存在下における取り込み阻害効果は、アストロサイト単一群と比較して、脳ペリサイトがグルタミン酸取り込み増強を誘導する共培養群でより顕著であった [ $F(1, 8) = 6.69, p<0.05$ , Fig. 3C]。この結果から、共培養群において脳ペリサイトが誘導するグルタミン酸取り込み増強作用に、Na<sup>+</sup>駆動性輸送体が関与していることが示唆された。

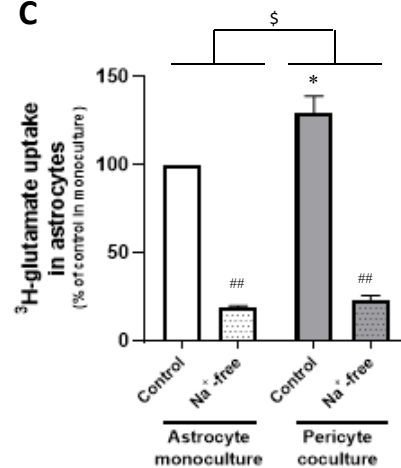
A



B



C



**Figure 3.**

**Brain pericytes increase the sodium-dependent glutamate uptake in astrocyte cultures.**

(A) Double immunofluorescence staining for CD13 and EAAT2 or EAAT1 in intact mouse hippocampus. Left panels (a and d) show CD13 immunoreactivity (pericyte marker, green). Middle panels show immunoreactivities (red) for EAAT2 (b) and EAAT1 (e). Each right panel (c and f) shows the merged image of the left and middle panels. Scale bar: 100 μm.

(B) Time-course of [<sup>3</sup>H]-L-glutamate uptake in astrocytes cultured with pericytes (pericyte coculture)



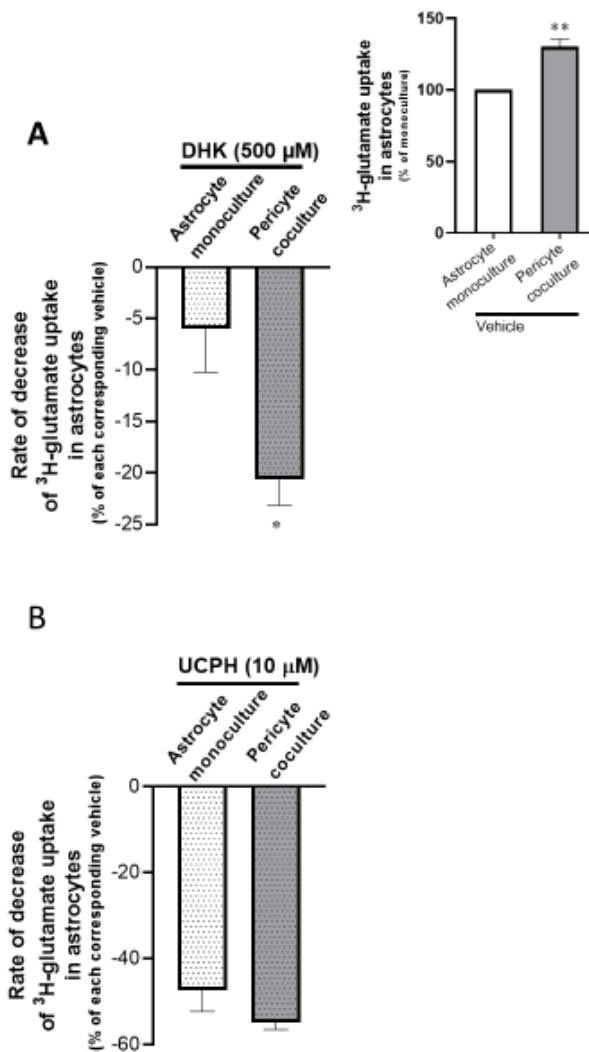
or without pericytes (astrocyte monoculture). Three days after astrocytes were cultured with or without pericytes, the uptake assay was performed. Astrocytes were incubated with assay buffer containing [<sup>3</sup>H]-L-glutamate for 1, 2, 5 and 10 min. Results were expressed as the percentage of glutamate uptake in astrocyte monoculture incubated with assay buffer containing [<sup>3</sup>H]-L-glutamate for 1 min ( $8.72 \pm 1.38 \mu\text{L}/\text{mg protein}$ ). Values represent mean  $\pm$  SEM (n=4).

(C) Effect of Na<sup>+</sup>-free condition on the glutamate uptake of astrocytes in astrocyte monoculture and pericyte coculture. Three days after astrocytes were cultured with or without pericytes, the uptake assay was performed. Astrocytes were incubated for 10 min with assay buffer containing [<sup>3</sup>H]-L-glutamate in the presence (control) and absence (Na<sup>+</sup>-free) of the extracellular Na<sup>+</sup>. Results were expressed as the percentage of glutamate uptake in astrocyte monoculture incubated with assay buffer containing [<sup>3</sup>H]-L-glutamate and Na<sup>+</sup> (control) ( $113.96 \pm 2.97 \mu\text{L}/\text{mg protein}$ ). Values represent mean  $\pm$  SEM (n=3). \**P*<0.05 compared with control in the astrocyte monoculture. ##*P*<0.01 compared with each corresponding control.

### 3.4 脳ペリサイトは、アストロサイトにおける EAAT2 を介したグルタミン酸取り込み

#### 活性を増加させた

薬理的阻害実験を用いて、共培養群における Na<sup>+</sup>駆動性輸送体 EAAT1 および EAAT2 を介した取り込み能を評価した。アストロサイトに対し、<sup>3</sup>H-L-glutamate と DHK (500μM) または UCPH-101 (10μM) を含む Na<sup>+</sup>含有 assay buffer 中で 10 分間の取り込みを行い、阻害剤により減少した取り込み量の割合を求めた (vehicle 処理における取り込み量を 100% した) で。EAAT2 選択的阻害剤である DHK 処理により <sup>3</sup>H-L-glutamate 取り込みは、アストロサイト単一群では vehicle 処理に対して 6.00±3.90 % 阻害された。一方、共培養群では vehicle 処理に対して 20.66±2.29 % 阻害された。DHK 処理によるグルタミン酸取り込み阻害効果は、単一群と比較して共培養群で有意に高かった (p<0.05, Fig. 4A)。一方、EAAT1 選択的阻害剤である UCPH-101 処理による <sup>3</sup>H-L-glutamate 取り込みは、アストロサイト単一群では 47.36±4.39 %、共培養群では 54.94±1.42 % 阻害されたが、2 群間に差を認めなかった (Fig. 4B)。



**Figure 4.**

**Brain pericytes increase the glutamate uptake in astrocytes via EAAT2.**

(A) Effect of DHK (500  $\mu$ M), a selective inhibitor of EAAT2, on the glutamate uptake in astrocytes cultured with pericytes (pericyte coculture) or without pericytes (astrocyte monoculture).

(B) The effect of UCPH-101 (10  $\mu$ M), a selective inhibitor of EAAT1, on the glutamate uptake of astrocytes in astrocyte monoculture and pericyte coculture.

Three days after astrocytes were cultured with or without pericytes, the uptake assay was performed. Astrocytes were incubated for 10 min with assay buffer containing [ $^3\text{H}$ ]-L-glutamate and each inhibitor or its solvent. Results were expressed as the % of decrease from glutamate uptake of astrocytes in each corresponding vehicle ( $75.32 \pm 7.45$   $\mu\text{L}/\text{mg}$  protein (A and the inset of A) and  $92.11 \pm 12.34$   $\mu\text{L}/\text{mg}$  protein (B) in astrocyte monoculture and  $98.42 \pm 10.88$   $\mu\text{L}/\text{mg}$  protein (A and the inset of A) and  $111.15 \pm 14.40$   $\mu\text{L}/\text{mg}$  protein (B) in pericyte coculture). Values represent mean  $\pm$  SEM (n=5-7). \* $P$ <0.05 compared with astrocyte monoculture incubated with assay buffer containing [ $^3\text{H}$ ]-L-glutamate and DHK. \*\* $P$ <0.01 compared with astrocyte monoculture incubated with assay buffer containing [ $^3\text{H}$ ]-L-glutamate and solvent for each inhibitor (as vehicle).

3.4 脳ペリサイトは、アストロサイトにおける EAAT1 および EAAT2 発現量に影響を及ぼさなかった

アストロサイトのグルタミン酸輸送体(EAAT2、EAAT1)発現量に対する脳ペリサイトの影響を、ウェスタンブロット法を用いて評価した。脳ペリサイトの共培養により、EAAT2 (Fig. 5 A)および EAAT1 (Fig. 5 B)のタンパク発現量は変化しなかった。従って脳ペリサイトは、アストロサイトにおける EAAT2 および EAAT1 発現量に影響を及ぼさないことが判った。

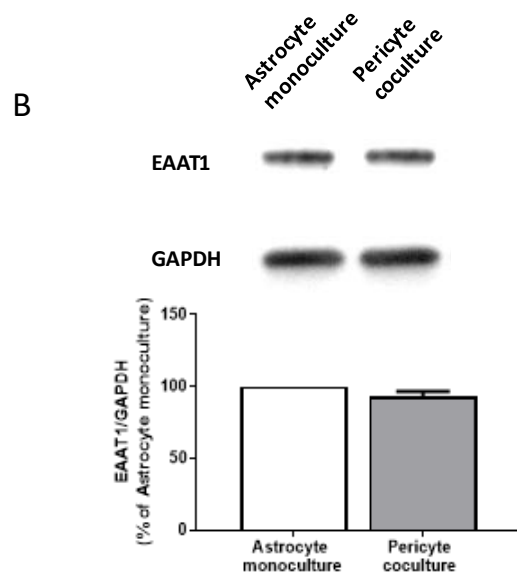
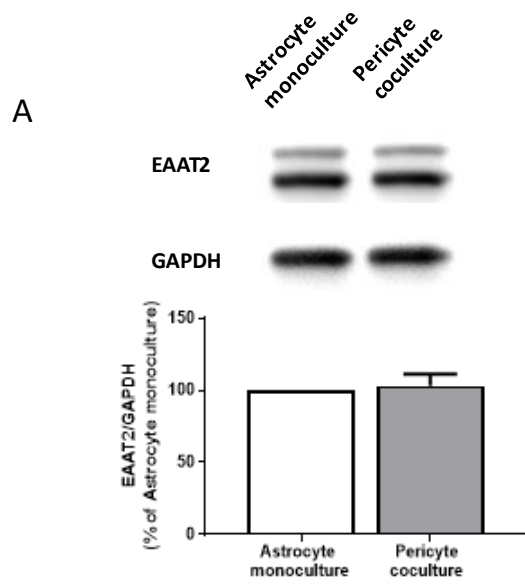


Figure 5

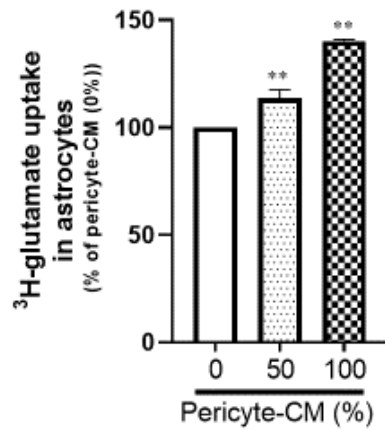
Effect of pericytes on expression of glutamate transporter (excitatory amino acid transporter: EAAT) protein in astrocytes. Each panel contains representative western blot images (top) and bar graphs showing quantitative analysis (bottom) of the expression of EAAT2 (A) and EAAT1

(B). Band intensities were quantified by scanning densitometry and protein levels of EAAT2 and EAAT1 were normalized to GAPDH. Pericytes coculture data are expressed as a percentage of astrocyte monoculture. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=3).

### 3.6 脳ペリサイト培養培地 (Pericyte-CM) 負荷はアストロサイトにおけるグルタミン

酸取り込み活性を増加させた。

脳ペリサイト由来液性因子が、アストロサイトにおけるグルタミン酸取り込み能に及ぼす影響を検討するため、Pericyte-CM をアストロサイト負荷し、72 時間培養後に、 $^3\text{H-L-glutamate}$  取り込み活性を検討した。結果は、AGM<sup>TM</sup> astrocyte growth medium のみ (Pericyte-CM 0%) で培養したアストロサイトにおける 10 分間の  $^3\text{H-L-glutamate}$  取り込み量を 100% として表した。Pericyte-CM を 50% 含む AGM<sup>TM</sup> astrocyte growth medium (Pericyte-CM 50%) を処理したアストロサイトにおける  $^3\text{H-L-glutamate}$  取り込み量は  $113.68 \pm 3.42\%$  で、Pericyte-CM のみ (Pericyte-CM 100%) を処理したアストロサイトにおける  $^3\text{H-L-glutamate}$  取り込み量は  $140.26 \pm 9.17\%$  だった。よって、Pericyte-CM の含有率に依存してその取り込み活性が有意に増加することが判った ( $p < 0.01$ , Fig. 6)。



**Figure 6.**

**Treatment with pericyte-conditioned medium (CM) upregulates the glutamate uptake in astrocyte monoculture.**

Astrocyte monocultures were treated for 3 days with culture medium (pericyte-CM (0%)), pericyte-CM diluted by 2-fold (pericyte-CM (50%)) and pericyte-CM (100%). In the next uptake assay, astrocytes were incubated with assay buffer containing [<sup>3</sup>H]-L-glutamate for 10 min. Results were expressed as the percentage of glutamate uptake in astrocyte monoculture treated with pericyte-CM (0%) ( $72.35 \pm 8.84 \mu\text{L}/\text{mg protein}$ ). Values represent mean  $\pm$  SEM (n=3-6). \*\* $P < 0.01$  compared with astrocyte monoculture treated with pericyte-CM (0%).

3.7 加熱処理した Pericyte-CM 負荷は、ペリサイト由来液性因子によるアストロサイトにおけるグルタミン酸取り込み活性増加を抑制しなかった。

脳ペリサイト由来液性因子を不活化させるため、AGM<sup>TM</sup> astrocyte growth medium のみ (Pericyte-CM (0%)) または Pericyte-CM (100%) を 65°C で 30 分間、加熱処理した (AGM<sup>TM</sup> astrocyte growth medium のみ (Pericyte-CM (0%))) 対照にはそれぞれの非加熱メディウム)。結果は、非加熱の Pericyte-CM (0%) 群における 10 分間の取り込み量を 100% として表した。3.6 の結果と同様に、非加熱 Pericyte-CM (100%) を負荷したアストロサイトでは 133.66% と、非加熱 Pericyte-CM (0%) を負荷したアストロサイトと比較して取り込み量が増強する傾向を認めた。

加熱処理した Pericyte-CM (0%) を負荷した群では 160.68% と、非加熱 Pericyte-CM (0%) を負荷したアストロサイトと比較して取り込み量が増強上昇する傾向を認めた。

加熱処理した Pericyte-CM (100%) を負荷したアストロサイトでは 199.10% と、非加熱 Pericyte-CM (100%) を負荷したアストロサイトと比較して取り込み量が増強する傾向を認めた。



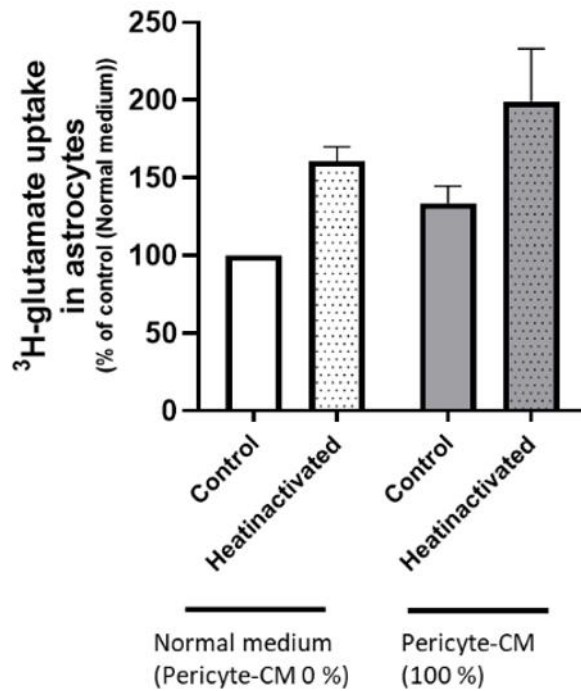


Figure 7. Effects of treatment with heat-inactivated pericyte conditioned medium on the glutamate uptake in astrocytes.

Astrocytes monoculture were treated for 3 days with intact culture medium (pericyte-CM (0%)), heat-inactivated (65°C, 30 min) culture medium (heat-inactivated pericyte-CM (0%)), intact pericyte-CM (100%) and heat-inactivated pericyte-CM (100%). In the uptake assay, astrocytes were incubated with assay buffer containing [<sup>3</sup>H]-L-glutamate for 10 min. Results were expressed as the percentage of glutamate uptake in astrocyte monoculture treated with intact pericyte-CM (0%). Values represent mean ± SEM (n=5).

#### 4. 考察

我々はこれまでの研究において、CCI 負荷後早期から脳ペリサイトにおける PDGFR $\beta$  発現が急増し（脳ペリサイトの病変化）、それは遅発的な NVU 構成細胞の異常（ミクログリア活性化）や脳神経回路網の易興奮性を誘導することを明らかにした<sup>69</sup>。しかし、1 章において、GFAP 発現を指標としたアストロサイト機能変化に対する病変化脳ペリサイトの寄与を捉えることができなかった。アストロサイトはグルタミン酸等の神経伝達物質や細胞外イオンの恒常性維持を介して脳神経の興奮性に関与する<sup>70</sup>。このことから、TBI 後の病変化脳ペリサイトが、アストロサイトによる神経機能制御に影響を及ぼしている可能性を考えた。TBI により GFAP 発現が増加する活性化アストロサイトでは、グルタミン酸輸送体 EAAT1 および EAAT2 の発現低下が生じる<sup>71</sup>。この EAAT の発現低下およびその機能低下は、けいれんやてんかん病態の形成に寄与することが報告されている<sup>72</sup>。そこで本研究では、CCI 負荷後の海馬における活性化アストロサイトの EAAT 発現変化に、病変化した脳ペリサイトが関与しているのかを検討した。EAAT2 は成人の脳内アストロサイトにおける主要なグルタミン酸輸送体であり、中枢神経系のグルタミン酸クリアランスの 90% 以上を占める<sup>73</sup>。さらに海馬アストロサイトにおける EAAT2 発現量は EAAT1 と比較して 4 倍以上高い<sup>74</sup>ことから、CCI 負荷後の海馬における EAAT2 発現変化を検討した。Fig.1 に示すように、CCI 負荷 28 日後の海馬では、EAAT2 が、sham および CCI 負荷 7 日後の海馬と比較して有意に減少した。(Fig. 1)。第一章で述べ

た様に、sham マウスおよび CCI 負荷 7 日後のマウスでは pilocarpine けいれん感受性が上昇しておらず、CCI 負荷 28 日後のマウスで有意な感受性上昇が生じた。これらの結果を考え合わせると、CCI 負荷 28 日後の海馬では、EAAT2 発現低下に伴ってアストロサイトにおけるグルタミン酸調節機能が低下しており、pilocarpine けいれん感受性が有意に上昇したことが考えられる。さらに亜慢性 imatinib 投与による頭部外傷後早期の脳ペリサイト PDGFR $\beta$  シグナル阻害により、CCI 負荷 28 日後の EAAT2 発現減少が抑制された (Fig. 2)。この結果は、頭部外傷後早期の脳ペリサイト PDGFR $\beta$  シグナル活性の増加が、アストロサイトの EAAT2 発現減少を牽引している可能性を示唆した。EAAT2 発現の負の制御因子として Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) が挙げられる<sup>75,76</sup>。TBI 後については不明であるが、脳ペリサイトは TNF- $\alpha$  の産生能力を有していることから、脳ペリサイト由来 TNF- $\alpha$  が EAAT2 発現減少に関与している可能性がある。また、病態下において、Iba1 陽性活性化ミクログリアの増加と EAAT2 発現減少が相関することが報告されている<sup>77</sup>。第一章において我々は CCI 負荷後の病変脳ペリサイトがミクログリアの活性化を誘導することを報告した。このことから、CCI 負荷後のアストロサイトにおける EAAT 発現減少、およびそれに伴うグルタミン酸調節機能異常は、病変脳ペリサイトが直接的に、またはミクログリア活性化を介して間接的に誘導する可能性が考えられる。

次に、アストロサイトの細胞外グルタミン酸調節機能に対する脳ペリサイトの直接的

な影響を検討するため、脳ペリサイト-アストロサイト共培養系を用いて脳ペリサイトのアストロサイトに対する作用を評価した。脳ペリサイトと共培養したアストロサイト（共培養群）は、アストロサイト単一群と比較し、グルタミン酸取り込み量および速度が増加したことから（Fig. 3B-C, 4A inset）、脳ペリサイトが直接アストロサイトのグルタミン酸取り込み機能を制御している可能性がある。

Na<sup>+</sup>非存在下において、単一群および共培養群共に、取り込みに有意な減少を示した。二要因分散分析の結果から、この阻害効果は、単一群と比較して脳ペリサイト共培養群でより顕著であった（Fig. 3C）。この結果は、脳ペリサイトが誘導する共培養後のグルタミン酸取り込み増強に Na<sup>+</sup>駆動性輸送体が関与していることを示唆する<sup>78</sup>。

次に、EAAT1 および EAAT2 の選択的な阻害剤を用いて<sup>79</sup>、脳ペリサイトによる EAAT1 および EAAT2 を介したグルタミン酸取り込み活性の変化を検討した。EAAT2 の選択的阻害剤である DHK 処理によるグルタミン酸取り込み阻害効果は、単一群と比較して共培養群で有意に高かった（ $p < 0.05$ , Fig. 4A）。一方、EAAT1 選択的阻害剤である UCPH-101 処理によるグルタミン酸取り込み阻害効果は、単一群と共培養間で統計学的に有意な影響を認めなかった（Fig. 4B）。この結果から、脳ペリサイトがアストロサイトの EAAT2 を介したグルタミン酸取り込みを増強することが解った。この脳ペリサイトによるアストロサイトのグルタミン酸取り込み増強作用は、アストロサイトにおける EAAT2 発現増加が関与している可能性を考えた。実際、脳血管内皮細胞と共培養した

アストロサイトでは、EAAT2 発現が増加し、EAAT2 を介したグルタミン酸取り込み活性が増強されることが報告されている<sup>68</sup>。一方、活性化マイクログリア培養培地を処理したアストロサイトでは、EAAT2 発現の増加を伴わずに EAAT2 を介した取り込み活性が増強される<sup>67</sup>。そこで脳ペリサイトが誘導するアストロサイトのグルタミン酸取り込み増強メカニズムに、EAAT2 タンパク発現量が関与するのかを検討したが、変化を認めなかった (Fig 5)。従って、脳ペリサイトはアストロサイトの EAAT2 発現量に影響せず、EAAT2 を介した取り込み活性を増強させることが解った。一方、グルタミン酸取り込み量増加が EAAT のタンパク量ではなく、細胞膜表面における局在の増加によって媒介されることを示唆する報告がある<sup>80</sup>。正常マウスの海馬では、CD13 陽性脳ペリサイト近傍に、アストロサイトの EAAT1 および EAAT2 発現が認められた (Fig. 3A)。脳ペリサイト近傍のアストロサイトでは aquaporin-4 の発現が増強し<sup>58</sup>、AQP4 を介した細胞外液濃度の制御に関与すると考えられる<sup>81</sup>。健常下において、脳ペリサイトがアストロサイトの EAAT 発現近傍に存在することから、アストロサイトにおける EAAT の発現局在および EAAT を介したグルタミン酸調節能に脳ペリサイトが直接制御している可能性がある。今後の実験においては、脳ペリサイトのアストロサイト膜表面における EAAT2 の局在に対する作用についても検討する必要がある。

これまでに認められたグルタミン酸取り込み増強作用が、脳ペリサイト由来の液性因子によるかを検討するため、Pericyte-CM を使用した実験を企てた。Pericyte-CM を処理

したアストロサイトでは、Pericyte-CM 濃度依存的にグルタミン酸取り込み活性が有意に増加することが解った (Fig. 6)。従って、脳ペリサイトが産生する液性因子は、アストロサイトのグルタミン酸取り込み活性を増強することが解った。さらにこの結果から、これまでの共培養系において認められたグルタミン酸取り込み増強作用も、脳ペリサイト由来液性因子の寄与が多くを占めていることが示唆される。アストロサイトのグルタミン酸取り込み能の増強には、各種液性因子の関与が報告されており、basic fibroblast growth factor (bFGF)、epidermal growth factor (EGF)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 等の成長因子はその取り込み活性を上昇させる<sup>78,82-83</sup>。さらにこれら成長因子の複合的な組み合わせは、アストロサイトのグルタミン酸取り込みを相加的に増強させる<sup>78</sup>。脳ペリサイトはそれらを含む様々な成長因子の分泌能力を有している<sup>18</sup>ことから、これらが複合的にアストロサイトに作用し、グルタミン酸取り込み活性を増強させていることが示唆された。脳ペリサイトが産生する液性因子の関与を明らかにするため、Pericyte-CM を 65°C で 30 分間加熱処理し、液性因子の影響を阻害することを試みた。この加熱条件では、易熱性液性因子の不活性化が可能である<sup>84</sup>。非加熱である Control と比較し、加熱処理群では、その取り込み活性が Pericyte-CM (0%) 群および Pericyte-CM (100%) 群のどちらも上昇する傾向にあった (Fig. 7)。従って今回の加熱条件では不活性化されない、または加熱により性質が変化する液性因子がこの作用機序に関与していることを示唆する。さらにその液性因子は Pericyte-CM (0%) に含まれている成分かつ、脳ペリサイ

トが産生する成分であることが考えられる。これらの条件を踏まえ、それを満たす候補因子として bFGF が考えられる。先述したように、bFGF は脳ペリサイトから産生され<sup>18</sup>、アストロサイトのグルタミン酸取り込み機能を増強させる<sup>78</sup>。さらに加熱処理することにより、その活性が変化することが報告されている<sup>85</sup>。今後は Pericyte-CM 中の成長因子量を定量し、候補因子の中和抗体を用いた阻害実験を行う予定である。さらに加熱条件を再検討し、因子の同定に繋げていきたい。

以上より、健常下では、脳ペリサイトがアストロサイト近傍に存在することで、アストロサイトにおけるグルタミン酸調節能が促進的に維持されていることが判った。一方、TBI を含む各種脳疾患や加齢においては脳ペリサイトの病変化や血管周囲からの離脱が生じる<sup>26,86,87</sup>。これら病態下においてはアストロサイトのグルタミン酸制御機能に異常が起きていることが報告されている<sup>71,88,89</sup>。今後の研究においては、TBI による病変化脳ペリサイトがアストロサイトにおけるグルタミン酸取り込み活性に及ぼす影響を検討したいと考えている。脳ペリサイトに PDGFR $\beta$  シグナル活性化因子 (PDGF-BB) を負荷し、病変化脳ペリサイトがアストロサイトの EAAT 発現や、グルタミン酸取り込み活性に及ぼす直接的な影響を検討し、TBI 後の神経易興奮性に寄与するかを明らかにしたい。本研究は脳ペリサイトによるアストロサイトのグルタミン酸制御機能に及ぼす影響を示す最初の報告である。本研究結果をもとにさらなる実験を行い、脳ペリサイトによるアストロサイトのグルタミン酸制御機構が明らかになれば、これらを標的とした

TBIによる遅発性けいれんの新規治療法の開発に繋がることが期待できる。



## 5. 結論

本研究は、頭部外傷後の病変脳ペリサイトによる PDGFR $\beta$  シグナルの亢進により、アストロサイトにおける EAAT2 発現が減少している可能性を明らかにした。EAAT2 減少に伴って、細胞外グルタミン酸の取り込みが低下し、細胞外グルタミン酸濃度の上昇と神経易興奮性に繋がり、けいれん病態に寄与することが考えられる。さらに正常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活性を増強させることを明らかにした。また、その取り込み増強には、脳ペリサイト由来の液性因子が関与していることが示唆された。以上を総合し、頭部外傷後の脳ペリサイト-アストロサイト関連の異常は、グルタミン酸調節機能を低下させ、脳神経回路網の過剰興奮を特徴とするけいれん易発症病態形成に寄与する可能性を提起する。

## 総括

脳ペリサイトは国内外を問わず注目されている細胞であるものの、未だその生理学的・病態生理学的な役割について不明な点が多く、本細胞を TBI 後の遅発性けいれん治療の標的とする研究は皆無であった。本研究では、脳ペリサイトが 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ことを目的とし、実験を行ってきた。

第 1 章では、脳ペリサイトとグリア細胞であるミクログリア、アストロサイトの TBI 後の変化に着目した。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 $\beta$  発現が急増し、外傷後 4 日目までその増加は持続した。さらに外傷後 1 日目の外傷側海馬において、PDGFR $\beta$  のアゴニストである PDGF-BB 発現量が増加していたことから、外傷後の脳ペリサイトでは PDGFR $\beta$  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それぞれ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、外傷後 4 日目から認められた。脳ペリサイトにおける PDGFR $\beta$  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。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 $\beta$  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。従って PDGFR $\beta$  発現が増大した脳ペリサイト（すなわち病変化脳ペリサイト）がグリア細胞機能変化および TBI による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。実際、脳ペリサイトにおける PDGFR $\beta$  発現増加が認められた受傷後 5 日間 PDGFR シグナル阻害剤 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 発現量の増加およびけいれん強度の増大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。以上の知見は、TBI による PDGFR $\beta$  発現急増を特徴とする脳ペリサイトの病変化が、ミクログリアの活性化や TBI 後の脳神経回路の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可能性を示唆する。

第 2 章では、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化脳ペリサイトの関与を検討した。第 1 章において、GFAP 発現量を指標にして TBI 後のアストロサイト機能変化における脳ペリサイトの影響を解明することを試みたが、その関与を捉えることはできなかった。TBI 後のアストロサイトでは、GFAP 発現増加だけでなく、グルタミン酸取り込み輸送体である EAAT2 発現が低下することが報告されている。そこで、TBI 後早期に認められる脳ペリサイト病変化が、アストロサイトのグルタミン酸取り込み能の変化に影響するかを検討した。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 $\beta$  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。そこで、細胞外グルタミン酸濃度調節を担う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。まず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、正常ヒト脳ペリサイトと正常ヒト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<sup>+</sup>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。アストロサイトには EAAT1 および EAAT2 を介した Na<sup>+</sup>依存的なグルタミン酸取り込み経路が存在する。EAAT2 の選択的阻害薬 DHK 処理で処理すると、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。一方、EAAT1 の選択的阻害薬である UCPH-101 処理によるグルタミン酸取り込み阻害効果は、脳ペリサイトと培養したアストロサイト共培養群とアストロサイト単一群において同程度であった。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す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。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が判った。以上、CCI マウスにおいて外傷後早期の脳ペリサイト PDGFR $\beta$  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 $\beta$  シグナルが活性化した病変化脳ペリサイトが 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。以上のことから、TBI 後の病変化脳ペリサイトによるアストロサイトの細胞外グルタミン酸調節作用の低下が、TBI 後の脳神経回路の易興奮性を誘導し遅発性けいれんの易発症環境の形成に関与しているかもしれない。

本研究は、CCI 負荷後早期の脳ペリサイト PDGFR $\beta$  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。薬物治療により、TBI 後の病変化脳ペリサイトの機能を制御することで、グリア細胞機能および脳神経機能の恒常性を維持できれば、TBI 受傷患者はその二次的な脳機能障害発症の恐怖から解放され良質な QOL を受容することが期待できる。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。

## 参考文献

- 1 Bruns, J., Jr. & Hauser, W. A. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* **44**, 2-10, doi:10.1046/j.1528-1157.44.s10.3.x (2003).
- 2 Maas, A. I. R. *et al.* Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol* **16**, 987-1048, doi:10.1016/s1474-4422(17)30371-x (2017).
- 3 Christensen, J. *et al.* Long-term risk of epilepsy after traumatic brain injury in children and young adults: a population-based cohort study. *Lancet* **373**, 1105-1110, doi:10.1016/s0140-6736(09)60214-2 (2009).
- 4 Lucke-Wold, B. P. *et al.* Traumatic brain injury and epilepsy: Underlying mechanisms leading to seizure. *Seizure* **33**, 13-23, doi:10.1016/j.seizure.2015.10.002 (2015).
- 5 Webster, K. M. *et al.* Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* **14**, 10, doi:10.1186/s12974-016-0786-1 (2017).
- 6 Dohgu, S. *et al.* Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res* **1038**, 208-215, doi:10.1016/j.brainres.2005.01.027 (2005).
- 7 Takahashi, H. *et al.* Brain pericyte-derived soluble factors enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **457**, 532-537, doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.016 (2015).
- 8 Takata, F. *et al.* Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- $\alpha$ , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation* **8**, 106, doi:10.1186/1742-2094-8-106 (2011).
- 9 Matsumoto, J. *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett* **578**, 133-138, doi:10.1016/j.neulet.2014.06.052 (2014).
- 10 Lier, J., Ondruschka, B., Bechmann, I. & Dreßler, J. Fast microglial activation after severe traumatic brain injuries. *Int J Legal Med* **134**, 2187-2193, doi:10.1007/s00414-020-02308-x (2020).
- 11 Xu, S. *et al.* Role of Astrocytes in Post-traumatic Epilepsy. *Front Neurol* **10**, 1149, doi:10.3389/fneur.2019.01149 (2019).
- 12 Vespa, P. M. *et al.* Nonconvulsive seizures after traumatic brain injury are associated with hippocampal atrophy. *Neurology* **75**, 792-798, doi:10.1212/WNL.0b013e3181f07334 (2010).
- 13 Hunt, R. F., Scheff, S. W. & Smith, B. N. Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. *Exp Neurol* **215**, 243-252,

- doi:10.1016/j.expneurol.2008.10.005 (2009).
- 14 Guo, D., Zeng, L., Brody, D. L. & Wong, M. Rapamycin attenuates the development of posttraumatic epilepsy in a mouse model of traumatic brain injury. *PLoS One* **8**, e64078, doi:10.1371/journal.pone.0064078 (2013).
- 15 Karve, I. P., Taylor, J. M. & Crack, P. J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* **173**, 692-702, doi:10.1111/bph.13125 (2016).
- 16 Mukherjee, S. *et al.* Neuroinflammatory mechanisms of post-traumatic epilepsy. *J Neuroinflammation* **17**, 193, doi:10.1186/s12974-020-01854-w (2020).
- 17 Reeves, C., Pradim-Jardim, A., Sisodiya, S. M., Thom, M. & Liu, J. Y. W. Spatiotemporal dynamics of PDGFR $\beta$  expression in pericytes and glial scar formation in penetrating brain injuries in adults. *Neuropathol Appl Neurobiol* **45**, 609-627, doi:10.1111/nan.12539 (2019).
- 18 Gaceb, A., Özen, I., Padel, T., Barbariga, M. & Paul, G. Pericytes secrete pro-regenerative molecules in response to platelet-derived growth factor-BB. *J Cereb Blood Flow Metab* **38**, 45-57, doi:10.1177/0271678x17719645 (2018).
- 19 Reeves, R. R. & Panguluri, R. L. Neuropsychiatric complications of traumatic brain injury. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* **49**, 42-50, doi:10.3928/02793695-20110201-03 (2011).
- 20 Vaishnavi, S., Rao, V. & Fann, J. R. Neuropsychiatric problems after traumatic brain injury: unraveling the silent epidemic. *Psychosomatics* **50**, 198-205, doi:10.1176/appi.psy.50.3.198 (2009).
- 21 Kharatishvili, I. & Pitkänen, A. Posttraumatic epilepsy. *Curr Opin Neurol* **23**, 183-188, doi:10.1097/WCO.0b013e32833749e4 (2010).
- 22 Uemura, M. T., Maki, T., Ihara, M., Lee, V. M. Y. & Trojanowski, J. Q. Brain Microvascular Pericytes in Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Front Aging Neurosci* **12**, 80, doi:10.3389/fnagi.2020.00080 (2020).
- 23 Su, X., Huang, L., Qu, Y., Xiao, D. & Mu, D. Pericytes in Cerebrovascular Diseases: An Emerging Therapeutic Target. *Front Cell Neurosci* **13**, 519, doi:10.3389/fncel.2019.00519 (2019).
- 24 Machida, T. *et al.* Brain pericytes are the most thrombin-sensitive matrix metalloproteinase-9-releasing cell type constituting the blood-brain barrier in vitro. *Neurosci Lett* **599**, 109-114, doi:10.1016/j.neulet.2015.05.028 (2015).
- 25 Matsumoto, J. *et al.* TNF- $\alpha$ -sensitive brain pericytes activate microglia by releasing IL-6 through cooperation between I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B and JAK-STAT3 pathways. *Brain Res* **1692**, 34-44, doi:10.1016/j.brainres.2018.04.023 (2018).
- 26 Zehendner, C. M. *et al.* Traumatic brain injury results in rapid pericyte loss followed by

- reactive pericytosis in the cerebral cortex. *Sci Rep* **5**, 13497, doi:10.1038/srep13497 (2015).
- 27 Glushakov, A. V., Fazal, J. A., Narumiya, S. & Doré, S. Role of the prostaglandin E2 EP1 receptor in traumatic brain injury. *PLoS One* **9**, e113689, doi:10.1371/journal.pone.0113689 (2014).
- 28 Nikolakopoulou, A. M. *et al.* Astrocytic Ephrin-B1 Regulates Synapse Remodeling Following Traumatic Brain Injury. *ASN Neuro* **8**, 1-18, doi:10.1177/1759091416630220 (2016).
- 29 Sajja, V. S. *et al.* Enduring deficits in memory and neuronal pathology after blast-induced traumatic brain injury. *Sci Rep* **5**, 15075, doi:10.1038/srep15075 (2015).
- 30 Browne, K. D., Iwata, A., Putt, M. E. & Smith, D. H. Chronic ibuprofen administration worsens cognitive outcome following traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* **201**, 301-307, doi:10.1016/j.expneurol.2006.04.008 (2006).
- 31 Flierl, M. A. *et al.* Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc* **4**, 1328-1337, doi:10.1038/nprot.2009.148 (2009).
- 32 Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32**, 281-294, doi:10.1016/0013-4694(72)90177-0 (1972).
- 33 Franklin KBJ, P. G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact 3rd ed.* (Elsevier, 2008).
- 34 Scott, G. *et al.* Amyloid pathology and axonal injury after brain trauma. *Neurology* **86**, 821-828, doi:10.1212/wnl.0000000000002413 (2016).
- 35 Gardner, R. C. *et al.* Mild TBI and risk of Parkinson disease: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study. *Neurology* **90**, e1771-e1779, doi:10.1212/wnl.0000000000005522 (2018).
- 36 Muradashvili, N., Tyagi, S. C. & Lominadze, D. Localization of Fibrinogen in the Vasculo-Astrocyte Interface after Cortical Contusion Injury in Mice. *Brain Sci* **7**, doi:10.3390/brainsci7070077 (2017).
- 37 Johnson, V. E. *et al.* Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain* **136**, 28-42, doi:10.1093/brain/aws322 (2013).
- 38 Tomkins, O. *et al.* Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* **2011**, 765923, doi:10.1155/2011/765923 (2011).
- 39 Saatman, K. E., Feeko, K. J., Pape, R. L. & Raghupathi, R. Differential behavioral and histopathological responses to graded cortical impact injury in mice. *J Neurotrauma* **23**, 1241-1253, doi:10.1089/neu.2006.23.1241 (2006).



- 40 Wu, Q. *et al.* Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths. *Lasers Surg Med* **44**, 218-226, doi:10.1002/lsm.22003 (2012).
- 41 Crouch, E. E. & Doetsch, F. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. *Nat Protoc* **13**, 738-751, doi:10.1038/nprot.2017.158 (2018).
- 42 Lee, S. H. *et al.* Administration of Protocatechuic Acid Reduces Traumatic Brain Injury-Induced Neuronal Death. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18122510 (2017).
- 43 Shitaka, Y. *et al.* Repetitive closed-skull traumatic brain injury in mice causes persistent multifocal axonal injury and microglial reactivity. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**, 551-567, doi:10.1097/NEN.0b013e31821f891f (2011).
- 44 Wagner, D. C. *et al.* Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **73**, 79-87 (2013).
- 45 Vlahovic, G., Rabbani, Z. N., Herndon, J. E., 2nd, Dewhirst, M. W. & Vujaskovic, Z. Treatment with Imatinib in NSCLC is associated with decrease of phosphorylated PDGFR-beta and VEGF expression, decrease in interstitial fluid pressure and improvement of oxygenation. *Br J Cancer* **95**, 1013-1019, doi:10.1038/sj.bjc.6603366 (2006).
- 46 Reddy, D. S. & Kuruba, R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* **14**, 18284-18318, doi:10.3390/ijms140918284 (2013).
- 47 Mazzuferi, M., Kumar, G., Rospo, C. & Kaminski, R. M. Rapid epileptogenesis in the mouse pilocarpine model: video-EEG, pharmacokinetic and histopathological characterization. *Exp Neurol* **238**, 156-167, doi:10.1016/j.expneurol.2012.08.022 (2012).
- 48 Nirwan, N., Siraj, F. & Vohora, D. Inverted-U response of lacosamide on pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in C57BL/6 mice is independent of hippocampal collapsin response mediator protein-2. *Epilepsy Res* **145**, 93-101, doi:10.1016/j.eplepsyres.2018.06.009 (2018).
- 49 da Cruz, G. M. *et al.* Piperine decreases pilocarpine-induced convulsions by GABAergic mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav* **104**, 144-153, doi:10.1016/j.pbb.2013.01.002 (2013).
- 50 Smolders, I., Khan, G. M., Manil, J., Ebinger, G. & Michotte, Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* **121**, 1171-1179, doi:10.1038/sj.bjp.0701231 (1997).
- 51 Maslanski, J. A., Powelt, R., Deirmengiant, C. & Patelt, J. Assessment of the muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced seizures in mice. *Neurosci Lett* **168**,

- 225-228, doi:10.1016/0304-3940(94)90456-1 (1994).
- 52 Binder, D. K., Croll, S. D., Gall, C. M. & Scharfman, H. E. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* **24**, 47-53, doi:10.1016/s0166-2236(00)01682-9 (2001).
- 53 Adams, B. *et al.* Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci* **17**, 5288-5296, doi:10.1523/jneurosci.17-14-05288.1997 (1997).
- 54 Ferrini, F. & De Koninck, Y. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast* **2013**, 429815, doi:10.1155/2013/429815 (2013).
- 55 Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A. & Bessis, A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E197-205, doi:10.1073/pnas.1111098109 (2012).
- 56 Zheng, Z., Chopp, M. & Chen, J. Multifaceted roles of pericytes in central nervous system homeostasis and disease. *J Cereb Blood Flow Metab* **40**, 1381-1401, doi:10.1177/0271678x20911331 (2020).
- 57 Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* **21**, 193-215, doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001 (2011).
- 58 Gundersen, G. A., Vindedal, G. F., Skare, O. & Nagelhus, E. A. Evidence that pericytes regulate aquaporin-4 polarization in mouse cortical astrocytes. *Brain Struct Funct* **219**, 2181-2186, doi:10.1007/s00429-013-0629-0 (2014).
- 59 van Landeghem, F. K., Weiss, T., Oehmichen, M. & von Deimling, A. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **23**, 1518-1528, doi:10.1089/neu.2006.23.1518 (2006).
- 60 Piao, C. S., Holloway, A. L., Hong-Routson, S. & Wainwright, M. S. Depression following traumatic brain injury in mice is associated with down-regulation of hippocampal astrocyte glutamate transporters by thrombin. *J Cereb Blood Flow Metab* **39**, 58-73, doi:10.1177/0271678x17742792 (2019).
- 61 Zou, H. *et al.* Neuroprotective, neuroplastic, and neurobehavioral effects of daily treatment with levetiracetam in experimental traumatic brain injury. *Neurorehabil Neural Repair* **27**, 878-888, doi:10.1177/1545968313491007 (2013).
- 62 Fontana, A. C. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem* **134**, 982-1007, doi:10.1111/jnc.13200 (2015).
- 63 Malik, A. R. & Willnow, T. E. Excitatory Amino Acid Transporters in Physiology and Disorders of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20225671

- (2019).
- 64 Rothstein, J. D. *et al.* Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-686, doi:10.1016/s0896-6273(00)80086-0 (1996).
- 65 Guerriero, R. M., Giza, C. C. & Rotenberg, A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* **15**, 27, doi:10.1007/s11910-015-0545-1 (2015).
- 66 Coulter, D. A. & Eid, T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* **60**, 1215-1226, doi:10.1002/glia.22341 (2012).
- 67 Tilleux, S., Goursaud, S. & Hermans, E. Selective up-regulation of GLT-1 in cultured astrocytes exposed to soluble mediators released by activated microglia. *Neurochem Int* **55**, 35-40, doi:10.1016/j.neuint.2008.12.021 (2009).
- 68 Lee, M. L., Martinez-Lozada, Z., Krizman, E. N. & Robinson, M. B. Brain endothelial cells induce astrocytic expression of the glutamate transporter GLT-1 by a Notch-dependent mechanism. *J Neurochem* **143**, 489-506, doi:10.1111/jnc.14135 (2017).
- 69 Sakai, K. *et al.* Reactive pericytes in early phase are involved in glial activation and late-onset hypersusceptibility to pilocarpine-induced seizures in traumatic brain injury model mice. *J Pharmacol Sci* **145**, 155-165, doi:10.1016/j.jphs.2020.11.008 (2021).
- 70 Barreto, G. E., Gonzalez, J., Torres, Y. & Morales, L. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res* **71**, 107-113, doi:10.1016/j.neures.2011.06.004 (2011).
- 71 Dorsett, C. R. *et al.* Traumatic Brain Injury Induces Alterations in Cortical Glutamate Uptake without a Reduction in Glutamate Transporter-1 Protein Expression. *J Neurotrauma* **34**, 220-234, doi:10.1089/neu.2015.4372 (2017).
- 72 Todd, A. C. & Hardingham, G. E. The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21249607 (2020).
- 73 Rao, P., Yallapu, M. M., Sari, Y., Fisher, P. B. & Kumar, S. Designing Novel Nanoformulations Targeting Glutamate Transporter Excitatory Amino Acid Transporter 2: Implications in Treating Drug Addiction. *J Pers Nanomed* **1**, 3-9 (2015).
- 74 Lehre, K. P. & Danbolt, N. C. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* **18**, 8751-8757, doi:10.1523/jneurosci.18-21-08751.1998 (1998).
- 75 Sitcheran, R., Gupta, P., Fisher, P. B. & Baldwin, A. S. Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *Embo j* **24**, 510-520, doi:10.1038/sj.emboj.7600555 (2005).

- 76 Boycott, H. E., Wilkinson, J. A., Boyle, J. P., Pearson, H. A. & Peers, C. Differential involvement of TNF alpha in hypoxic suppression of astrocyte glutamate transporters. *Glia* **56**, 998-1004, doi:10.1002/glia.20673 (2008).
- 77 Xing, H. Q. *et al.* Reduced expression of excitatory amino acid transporter 2 and diffuse microglial activation in the cerebral cortex in AIDS cases with or without HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 199-209, doi:10.1097/NEN.0b013e31819715df (2009).
- 78 Suzuki, K. *et al.* Transient upregulation of the glial glutamate transporter GLAST in response to fibroblast growth factor, insulin-like growth factor and epidermal growth factor in cultured astrocytes. *J Cell Sci* **114**, 3717-3725 (2001).
- 79 Takahashi, K., Foster, J. B. & Lin, C. L. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci* **72**, 3489-3506, doi:10.1007/s00018-015-1937-8 (2015).
- 80 Duan, S., Anderson, C. M., Stein, B. A. & Swanson, R. A. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* **19**, 10193-10200, doi:10.1523/jneurosci.19-23-10193.1999 (1999).
- 81 Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M. & Ottersen, O. P. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* **129**, 905-913, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.053 (2004).
- 82 Prabhu, D., Khan, S. M., Blackburn, K., Marshall, J. P. & Ashpole, N. M. Loss of insulin-like growth factor-1 signaling in astrocytes disrupts glutamate handling. *J Neurochem* **151**, 689-702, doi:10.1111/jnc.14879 (2019).
- 83 Figiel, M., Maucher, T., Rozyczka, J., Bayatti, N. & Engele, J. Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp Neurol* **183**, 124-135, doi:10.1016/s0014-4886(03)00134-1 (2003).
- 84 Machida, T. *et al.* Role of thrombin-PAR1-PKC $\theta/\delta$  axis in brain pericytes in thrombin-induced MMP-9 production and blood-brain barrier dysfunction in vitro. *Neuroscience* **350**, 146-157, doi:10.1016/j.neuroscience.2017.03.026 (2017).
- 85 Chou, M. L., Burnouf, T. & Wang, T. J. Ex vivo expansion of bovine corneal endothelial cells in xeno-free medium supplemented with platelet releasate. *PLoS One* **9**, e99145, doi:10.1371/journal.pone.0099145 (2014).
- 86 Ding, R. *et al.* Loss of capillary pericytes and the blood-brain barrier in white matter in poststroke and vascular dementias and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **30**, 1087-1101, doi:10.1111/bpa.12888 (2020).
- 87 Yang, A. C. *et al.* Physiological blood-brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. *Nature* **583**, 425-430, doi:10.1038/s41586-020-2453-z (2020).

- 88 Huang, S. *et al.* Astrocytic glutamatergic transporters are involved in A $\beta$ -induced synaptic dysfunction. *Brain Res* **1678**, 129-137, doi:10.1016/j.brainres.2017.10.011 (2018).
- 89 Han, X., Zhang, T., Liu, H., Mi, Y. & Gou, X. Astrocyte Senescence and Alzheimer's Disease: A Review. *Front Aging Neurosci* **12**, 148, doi:10.3389/fnagi.2020.00148 (2020).

## 謝辞

本研究の機会を与えられ、終始懇切なご指導ならびにご鞭撻を賜りました福岡大学薬学部生物薬剤学教室 山内 淳史 教授、福岡大学薬学部応用薬剤学教室 片岡 泰文 名誉教授に心より深甚なる謝意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御高閲を賜りました福岡大学薬学部応用薬剤学教室 道具 伸也 教授、福岡大学薬学部医薬品情報学教室 右田 啓介 教授に謹んで感謝いたします。

本研究の遂行と本論文の作成にあたって終始懇切なご指導を賜りました福岡大学薬学部応用薬剤学教室 高田 芙友子 准教授に謹んで感謝いたします。

本研究に対して多大なる御協力と御助言を賜りました、横浜薬科大学 渡邊 泰雄 教授、福岡大学薬学部生物薬剤学教室 中川 慎介 助教、松本 純一 助教、福岡大学薬学部応用薬剤学教室 岩尾 卓朗助教、稲田 紘舜 助教、第一薬科大学薬学部 首藤 英樹 教授、福岡大学薬学部薬物送達学教室 古賀 允久 准教授、福岡大学薬学部実務薬剤学教室 冨永 宏治 准教授、金岡 祐輝 博士、木村 郁哉 博士、青野 健太郎 学士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行に多大なる御協力を賜りました、瀬崎 由愛 学士、田中 淑恵 学士、冨永 一樹さん、橋口 夏奈さん、安永 美保さん、池田 理開さん、兼村 和稀さん、土居 礼子さん、良永 侑子さんに心より感謝致します。また、本研究に御協力を賜りまし

た、生物薬剤学教室、応用薬剤学教室の皆様にご深くお礼申し上げます。

筆末になりますが、大学院生活を通して惜しめない支援と多大なる御理解をいただき、精神的、経済的支援を賜りました祖父母、両親、姉兄に心から感謝致します。