

## 論文内容の要旨

論文題目 Molecular mechanism underlying secondary neuronal death following rat brain injury through astrocyte connexin hemichannel  
(アストロサイトのコネキシンヘミチャンネルを介した外傷後の2次性神経細胞死のメカニズム)

氏名 石井康博

### 背景

平成23年度人口動態調査によるとわが国における不慮の事故による死亡者数は総死亡者数の約5%を占めている。また不慮の事故の原因疾患のうち頭部外傷による死亡例が約半数を占めており、頭部外傷が非常に重要な疾患であると考えられる。臨床経過においても重傷頭部外傷では脳浮腫や虚血による2次的に引き起こされる損傷が高次脳機能障害や後遺症に影響すると考えられている。近年の動物を用いた実験によると、2次性神経細胞死のモデルにおいて神経細胞の損傷が神経細胞間で伝播するという現象が報告されており、この神経細胞損傷の伝播を抑制することが新たな治療ターゲットになる可能性があると考えられている。

この現象の背景には中枢神経細胞ネットワークを形成するシナプスともう一つの細胞間の結合であるギャップジャンクション(GJ)と細胞内外を繋ぐヘミチャンネル(HC)が非常に重要な役割をしている事が判明してきている。このGJは神経細胞間だけでなく神経細胞とアストロサイト、アストロサイト間など別種の細胞間を繋ぐ事で各細胞間の情報ネットワークを構築している。またHCは細胞外とコンタクトする事で離れた細胞にも情報を伝達することができると考えられている。特に細胞内と細胞外を繋ぐHCは細胞内Ca<sup>2+</sup>動態に強く関わっており、このHCを介して放出されるATPが周辺の細胞のATP受容体に作用することで、隣接する細胞内のCa<sup>2+</sup>の上昇に関わると考えられている。この現象はCa<sup>2+</sup>waveと呼ばれ、特に近年注目されているのがアストロサイトの神経細胞への作用であり、中枢神経細胞ネットワークで非常に重要な位置を占めると理解され始めている。

### 目的

神経細胞とアストロサイト各々のHC及びGJには特異的に発現するコネキシン(Cx)が存在している。このCxは代謝回転速度が1-2時間と速く、環境変化に対してきわめて速やかに適応できると考えられている。特にアストロサイトに存在するCx43は脳虚血モデルにおいても数時間で急速に増加することが知られている。さらにCxの発現量の変化により細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が起こると考えられ、その急速な細胞内環境の変化により、細胞内に存

在する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテアーゼである  $\mu$ -calpain が活性化される結果、細胞死を惹起すると考えられている。

以上の知見から、本研究では頭部外傷の新しい実験モデルを独自に開発し、脳損傷隣接領域への 2 次性神経細胞死の新しいメカニズムとして 1) 神経細胞とアストロサイトの Cx isoform の変化による各細胞あるいは両細胞間に存在する GJ 及び CxHC を介した 2 次性神経細胞死の拡大と 2)  $\text{Ca}^{2+}$  wave に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇による神経細胞内  $\mu$ -calpain の活性化とそれによる 2 次性神経細胞死発生の有無について検討することとした。

## 方法

今回行った頭部外傷モデルは海馬スライスモデルを用いた 2 次性神経細胞死モデルや脳皮質の stab wound モデルなどの過去に報告されたモデルを参考にラット大脳皮質切開モデルを作成した。特に本実験では実際の法医学にて経験される重傷頭部外傷を想定するため切開モデルを選択し、実際の脳挫傷に近いモデルを作成した。

このモデルを用いて 2 次性神経細胞死のインディケータとして propidium iodide (PI) を、また HC 活性は etidium bromide (EtBr) を損傷部に投与し、ローディング後組織学的に評価した。またローディング後蛍光免疫染色をすることで細胞死とアストロサイトならびに神経細胞の HC 活性を評価した。

本研究では  $\text{Ca}^{2+}$  wave に伴う 2 次性神経細胞死仮説を証明する上で直接細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を証明することは技術的に難しいため、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性 protease である活性型  $\mu$ -calpain を認識する抗体を用いて、損傷部と隣接領域の  $\mu$ -calpain の活性化とこれにより分解される細胞膜骨格の主要な構成成分の 1 つである fodrin の分解産物を western blotting を用いて評価した。また 2 次性神経細胞死において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に伴う神経細胞内の  $\mu$ -calpain 活性化が神経細胞死に寄与するという仮説を証明するため、PI ローディング後活性型  $\mu$ -calpain での免疫染色を用いて細胞死に  $\mu$ -calpain の活性化を認めるのかを検証することとした。

## 結果

損傷 6 時間後の損傷隣接領域において、PI 陽性細胞を大脳皮質第 5・6 層中心に認めた。1 時間後では PI 陽性細胞は少数であることから時間依存的に PI 陽性細胞が増加する傾向を認めた。この PI 陽性細胞種について詳細に検討した。神経細胞に発現する Cx36 と NSE (neuron specific enolase: 神経細胞マーカー) を用いて 2 重染色したところ、PI 陽性細胞では多くは Cx36 陽性及び NSE 陽性であった。また GFAP (glial fibrillary acidic protein: アストロサイトの主要マーカー) を用いて 2 重染色したところ PI 周囲に強く GFAP が染色されていた。以上の結果より、PI 陽性細胞は神経細胞が主体であることが判明した。

この細胞死の過程において  $\mu$ -calpain が活性化されているかどうかを PI と活性型  $\mu$ -calpain との免疫染色で確認した。その結果、PI 陽性細胞内に活性型  $\mu$ -calpain 抗体陽性

を認めた。これは隣接領域での細胞死では  $\mu$ -calpain の活性化が強く関連し、2 次性神経細胞死と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に重要な関連性があることが示唆された。

さらに隣接領域でこの PI 陽性細胞が GJ・HC 阻害剤である CBX、非特異的 HC 阻害剤である  $\text{La}^{3+}$ 、Cx43 特異的阻害ペプチドである Gap26 を用いて阻害されるか検討したところ、すべての阻害剤で PI 陽性細胞が抑制された。

次にこの神経細胞死において細胞 HC 活性の上昇の有無を EtBr にて検討した。通常 HC は閉じており、細胞外環境の変化、特に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇や細胞内から放出される ATP の P2 受容体への作用により開口する事が知られている。脳損傷が起こると通常神経細胞が過剰に興奮し、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度に変化が起こると考えられている。今回の実験では 1 時間後には損傷周囲の細胞 HC が開口（活性化）し EtBr を取り込む実験結果を得た。この現象は周辺組織への HC 開口刺激が周囲に伝播している事を示唆し、2 次性神経細胞死に強く関連している現象と考えられた。

そこでこの開口している HC を阻害した場合における神経細胞死抑制の有無を Cx43 特異的阻害剤である Gap26 と ATP（HC から放出され隣接する細胞の P2 受容体に結合し、隣接細胞の HC を開口する細胞間伝達物質）受容体（P2 受容体）阻害剤であるスラミンを用いて検討した。その結果 Cx43 から構成されるアストロサイトの HC だけでなく Cx36 から構成される神経細胞の HC の開口も阻害した。この結果、神経細胞死の伝播において神経細胞間だけでなくアストロサイトの HC から放出される ATP が重要な要因であり、このアストロサイトの活性化を抑制する事が 2 次性神経細胞死を抑制するために重要であると考えられた。

さらに損傷部と隣接部において Cx43 と GFAP、神経細胞の HC に発現する Cx36 の蛋白量に変化の有無を western blotting にて定量化し検討した。この結果 Cx43 ならびに GFAP は損傷 1 時間後から急速に増加し、6 時間後まで持続する傾向を認めたが、Cx36 に変化は認めなかった。また活性型  $\mu$ -calpain と fodrin の分解産物を特異的に認識する抗体を用いて同様に検討したところ、隣接部において 1 時間後より両者とも急速に増大する傾向を認めた。

## 考察

本研究では法医学実務や臨床現場で遭遇する脳挫傷に可能な限り近いモデルを再現できたと考える。外傷モデルのこれまでの報告では、実際の生体内における脳挫傷後の大脳皮質 2 次性神経細胞死を検討した脳挫傷モデルの報告は存在しない。本モデルを用いることで初めて神経細胞死が 6 時間以内に損傷部から隣接領域に伝播する現象を捉える事が可能となった。これは臨床現場において急性期における症状の悪化する現象の一部を今までのモデル以上に再現していると考えられる。2 次性神経細胞死には多様な要因の存在が推定されるが、今回この動物モデルを用い、脳損傷の隣接領域の 2 次性神経細胞死にアストロサイトの Cx43 とその HC の関与が重要であることを明らかにした。

本研究の限界として、CxHC はグルタミン酸も放出することが知られているが、本研究ではグルタミン酸の影響は評価していないため過剰に放出されたグルタミン酸による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇とその 2 次性神経細胞死への影響についての分析は今後の課題とした。さらに本実験で  $\text{Ca}^{2+}$  wave 伝播による 2 次性神経細胞死の仮説を証明するため、 $\mu$ -calpain の活性化を評価項目としたが、隣接領域における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の直接測定は困難であった。細胞死内における  $\mu$ -calpain 活性化は免疫染色より証明できたが、この活性化の過程における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇がアストロサイトの HC の影響だけであるかについては今後の検討課題とした。

## 結論

本実験ではラットの脳挫傷モデルを独自に開発し、それを基に脳損傷隣接領域での 2 次性神経細胞死の新しいメカニズムとしてアストロサイトの活性化と Cx43HC 開口及びそれに伴う ATP 濃度上昇による神経細胞の Cx36HC 開口の関与と Cx36HC 開口に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇による活性型  $\mu$ -calpain の増加とそれに伴う fodrin 分解機序の存在を明らかにした。