

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04797

研究課題名(和文) 脳虚血モデル細胞を用いた脳血管疾患の脳内病態解析：法医脳機能新法の開発

研究課題名(英文) Neuropathological analyses of cerebrovascular diseases using the brain ischemia model neurons: Development of novel forensic brain function biomarker

研究代表者

狸々 英紀 (SHOJO, Hideki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：60284626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳虚血に伴うミトコンドリアの生活反応を解明し、その生活反応を指標とした新規法医脳機能バイオマーカーを開発する事を目的とした。そこで、脳虚血モデル神経細胞を用いて、ミトコンドリアの形態と機能との関係について検討した。正常状態に比べ、虚血条件下では、呼吸及びミトコンドリア活性が有意に減少していた。これら細胞機能の低下に伴ってミトコンドリアの形態は、複雑な繊維構造から単純な糸状及び粒状のパターンに変化した。さらに、ミトコンドリアの形態変化は、固定標本においても生活反応として保持されていた。以上の結果は、ミトコンドリアの形態が脳虚血の法医バイオマーカーとして有用であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The goal of current study was to elucidate the mitochondrial vital response with brain ischemia, and to develop a novel forensic brain function biomarker using its vital response. Here, we examined the relationship between mitochondrial function and morphology using the brain ischemia model neurons. Under ischemic conditions, cell respiratory and mitochondrial activities significantly decreased in comparison with normoxic conditions. With their decrease in cellular functions, mitochondria were altered to simple filamentous and granular patterns from its complex fibrous structures. In addition, mitochondrial morphological changes were also retained in fixative specimens as a vital reaction. These results indicated that mitochondrial morphology would be a useful forensic biomarker of brain ischemia.

研究分野：法医学

キーワード：脳虚血 ミトコンドリア形態 ミトコンドリア機能 生活反応

1. 研究開始当初の背景

我国において脳出血、脳梗塞およびクモ膜下出血などの脳血管疾患は死因の約 12% を占めており、4 大死因の 1 つである。脳血管疾患では、出血による炎症・圧排あるいは虚血によって脳組織に障害が引き起される。従って、脳血管疾患に伴う脳虚血の病態を解明する事は法医学において非常に重要である。

脳虚血ではグルコースや酸素の不足に伴い、ミトコンドリアの機能と形態が変化すると考えられる。また、研究開始当初、本研究代表者は脳虚血モデル細胞を用いた研究で、抗酸化ストレス能を有する DJ1 が、ミトコンドリアに輸送・局在することを明らかにしていた [Neurobiol Dis (2014) 62: 56-61, CNS Neurosci Ther (2014) 20: 275-281]。この様に、ミトコンドリアの形態はその機能を通して脳機能の変化と相関していると考えられるが、ミトコンドリアを構成するタンパク質の多くはその遺伝子が核ゲノムにあり、転写・翻訳後にミトコンドリアへ輸送されている。そこで、細胞に急激な死がもたらされた場合、直前の構造がミトコンドリア内に維持されたまま保持される事が予想される。この事から、本研究代表者は「ミトコンドリアの形態変化はミトコンドリアの機能を通して脳機能の変化と相関しており、死後の脳においても脳損傷の痕跡がミトコンドリアの形態変化として保存されている」と考えた。

一方、これまでの法医診断ではミトコンドリアなど細胞内小器官の生活反応に着目した解析は殆どない。ミトコンドリアは、エネルギー生産を通して生命に必須であると共に、アポトーシスやネクローシスなど細胞の死をも司る細胞内小器官である。生体内において、ミトコンドリアの形態はその機能を反映しており、細胞や生体のおかれた状態を理解する上で重要である。そこで、ミトコンドリアの生活反応を指標とした新規法脳機能診断マーカーを開発するために、脳虚血モデル細胞を用いて虚血がミトコンドリアの機能及び形態に及ぼす影響について検討本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、脳虚血に伴うミトコンドリアの機能と形態変化との関係を明らかにし、ミトコンドリアの生活反応を指標とした法医脳機能診断法を開発する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳虚血モデル細胞の作製

神経芽細胞種 SH-SY5Y を用いて、0、0.5、1、2 および 6 時間 OGD: Oxygen-glucose deprivation 処理を実施し、脳虚血モデル細胞を作製した。即ち、神経芽細胞種 SH-SY5Y

を播種後、37 °C、5% CO₂ で培養した。3 日毎に 10 μM レチオニン酸で処理し、樹状突起が伸長するまで 7 ~ 10 日間培養した。その後、得られた神経細胞の培養液を Glucose free DMEM で 3 回洗浄・置換した。続いて、5% CO₂、5% O₂ になるまで 37°C で 30 分間プレインキュベート後、OGD 処理を行った。

なお、神経細胞への分化は MAP2 免疫細胞化学で確認した。

(2) 細胞及びミトコンドリア機能の解析

細胞の生存・死亡率は、LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit を用いて調べた [図 1]。細胞及びミトコンドリア機能は Cell Counting kit-8 (細胞呼吸活性) 及び MTT assay (ミトコンドリア活性) を用いて調べた [図 1]。

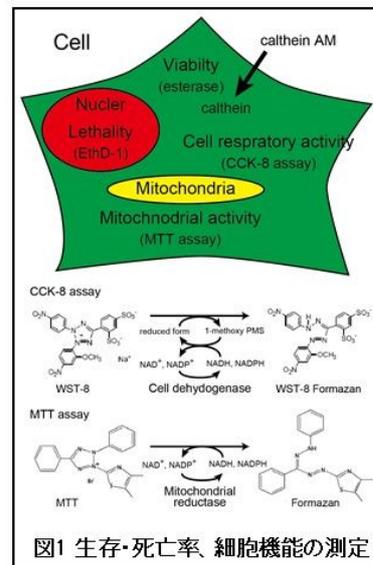


図1 生存・死亡率、細胞機能の測定

(3) 細胞及びミトコンドリア形態の解析

ミトコンドリアの形態は、特異的蛍光試薬 MitoTracker Green FM および CM-XRos を用いて染色後、培養液を Glucose free DMEM に置換し、OGD 条件下 (5% CO₂、5% O₂)、37°C で経時的に観察した。

本研究では、高分解能蛍光顕微鏡 DeltaVision を用いて画像を取得した。得られた画像をデコンボリューション処理後、3次元像を構築して解析に用いた。

(4) 死後のミトコンドリア形態の解析

死後のミトコンドリアの形態が、死の直前 (生前) のミトコンドリアの形態を反映しているかについて調べた。即ち、4%パラホルムアルデヒド緩衝液を用いて 37°C で 20 分間固定後、ミトコンドリアの形態を観察した。その後、(3)と(4)の結果を比較した。

なお、本研究では細胞の固定条件を決定するために、ミトコンドリア内で蛍光タンパク

質遺伝子(GFAP)を発現させた細胞を作製した。また、蛍光蛋白質発現細胞を用いて、固定後のミトコンドリア蛍光試薬の特異性及び染色性を評価・確認した。

4. 研究成果

(1) 虚血後の神経細胞では、呼吸活性やミトコンドリア活性が残存している

虚血条件下の神経細胞では、虚血処理2及び6時間で生理的条件下の細胞と比較して有意に死亡率が上昇していた[図2]。一方、生存率(エステラーゼ活性)は、虚血処理0.5時間で急速に低下していた。また、細胞呼吸活性やミトコンドリア活性は虚血処理時間依存的に低下していた。これらの活性は間接的な細胞の生存率の指標として用いられており、死亡率との相関が認められた。即ち、これらの残存活性は、死戦期における細胞の生活反応に起因している事が示唆された。

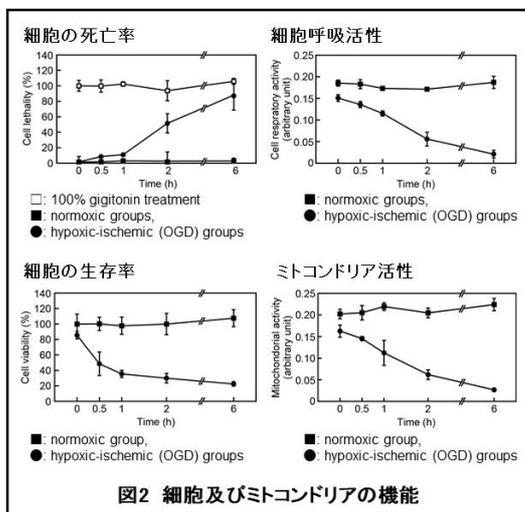


図2 細胞及びミトコンドリアの機能

(2) 虚血後の神経細胞では、細胞及びミトコンドリアの形態が変化する

生理的条件下の神経細胞において、ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返しダイナミックに変化しており、全体的には複雑な繊維状の形態を示していた[図3]。一方、虚血条件下の神経細胞では、細胞体、樹状突起、核の委縮を認めた。また、ミトコンドリアの形態は虚血処理時間依存的に単純な糸状及び斑点状の構造へと変化した。

(3) 虚血に伴うミトコンドリアの形態変化はその機能や細胞機能を反映している

虚血後の神経細胞において、ミトコンドリアの形態は死戦期のミトコンドリアや細胞の機能を反映していた[図2及び3]。また、これらの形態変化はネクローシスやオートファジーなどの細胞死の過程と関連していると推察され、ミトコンドリアの形態は細胞や生体のおかれた状態を反映することを支

持した。

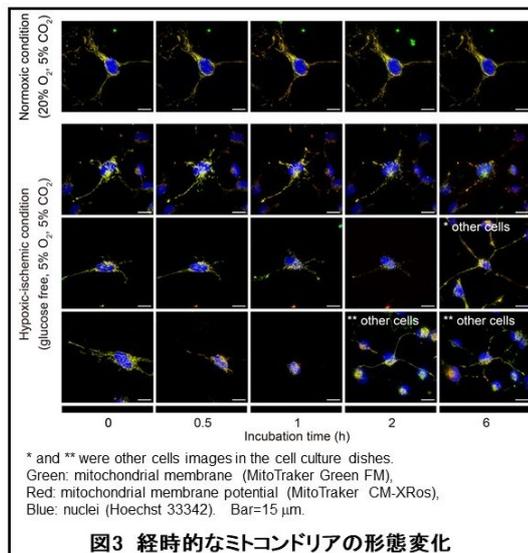


図3 経時的なミトコンドリアの形態変化

(5) 死後の神経細胞においても脳虚血の痕跡がミトコンドリアの形態変化として保持されている

固定後の神経細胞においても、脳虚血に伴うミトコンドリアの形態変化は保持されていた[図4]。即ち、死後の脳においても脳損傷の痕跡がミトコンドリアの形態変化として保存されている可能性が示唆された。以上の結果から、ミトコンドリアの形態は法医脳機能マーカーとして有用である可能性が示唆された。

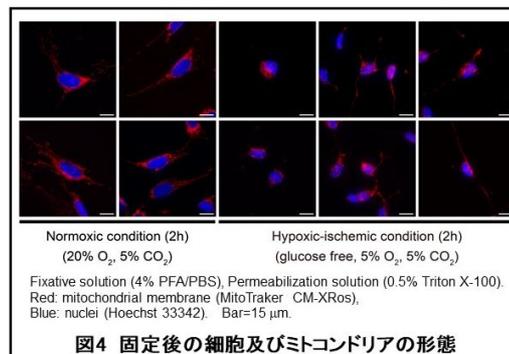


図4 固定後の細胞及びミトコンドリアの形態

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Shojo H, Borlongan CV, Mabuchi T. Genetic and histological alterations reveal key role of prostaglandin synthase and cyclooxygenase 1 and 2 in traumatic brain injury-induced neuroinflammation in the cerebral cortex of rats exposed to moderate fluid percussion injury. Cell

Transplant. (2017) 26:1301-1311. DOI: 10.1177/0963689717715169. 査読有
Masuyama K, Shojo H, Nakanishi H, Inokuchi S, Adachi N. Sex determination from fragmented and degenerated DNA by amplified product-length polymorphism bidirectional SNP analysis of amelogenin and SRY Genes. PLoS One. (2017) 12(1):e0169348. DOI: 10.1371/journal.pone.0169348. eCollection 2017. 査読有

Kakuda T, Shojo H, Tanaka M, Nambiar P, Minaguchi K, Umetsu K, Adachi N. Multiplex APLP system for high-resolution haplogrouping of extremely degraded East-Asian mitochondrial DNAs. PLoS One. (2016) 11(6):e0158463. DOI: 10.1371/journal.pone.0158463. eCollection 2016. 査読有

Shojo H, Tanaka M, Takahashi R, Kakuda T, Adachi N. A unique primer with an inosine chain at the 5'-terminus improves the reliability of SNP analysis using the PCR-amplified product length polymorphism method. PLoS One. (2015) 10(9):e0136995. DOI: 10.1371/journal.pone.0136995. eCollection 2015. 査読有

[学会発表](計6件)

Shojo H, Adachi N. Development of forensic biomarker for brain ischemia: Analyses of mitochondrial function and morphology in the brain ischemia model neurons. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine, Jun 5-8, 2018 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

猩々英紀, 安達登. 脳虚血モデル神経培養細胞を用いたミトコンドリアの形態解析. 第101次日本法医学会学術全国集会, 2017年6月7日~9日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市).

田中真由美, 猩々英紀, 増山琴香, 井口蘭, 坪井奈美, 角田恒雄, 高橋遼平, 安達登. PCR-APLP法を用いた一塩基多型解析において5'末端イノシン付加プライマーはアレルへの特異性を向上させる. 第99次日本法医学会学術全国集会, 2015年6月10日~12日, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県・高知市).

角田恒雄, 猩々英紀, 高橋遼平, 井口蘭, 増山琴香, 坪井奈美, 田中真由美, 安達登. ミトコンドリア DNA-APLP

(mtDNA-amplified product length polymorphism)を用いた法医学的出自判別システム. 第99次日本法医学会学術全国集会, 2015年6月10日~12日, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県・高知市).

Masuyama K, Nakanishi H, Inokuchi S, Shojo H, Kakuda T, Takahashi R, Iguchi R, Tanaka M, Tsuboi N, Adachi N. Sex determination by APLP method using the Amelogenin and SRY genes. 第99次日本法医学会学術全国集会, 2015年6月10日~12日, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県・高知市).

猩々英紀, 馬淵正. 頭部外傷によるシクロオキシゲナーゼの発現変化. 第38回分子生物学会年会 2015年12月1日~4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市).

[その他]

ホームページ等

https://www.med.yamanashi.ac.jp/social/legal0me/classroom_member/shohjoh.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

猩々英紀 (SHOJO, Hideki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号: 60284626

(2)研究分担者

馬淵正 (MABUCHI, Tadashi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号: 80150308

(3)連携研究者

安達登 (ADACHI, Noboru)

山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号: 60282125