

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15260

研究課題名(和文)内因性・外因性脳損傷診断マーカーの検討：COXの動態解析

研究課題名(英文) Study on a differential diagnostic marker for endogenous and exogenous brain injury: Analysis of COX expression property

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシクロオキシゲナーゼ(COX)が内因性・外因性脳損傷鑑別診断分子マーカーとして有用であるか検討する事を目的とし、頭部外傷後の損傷脳において中枢神経の炎症や消炎に関与するCOX1及び2の分子動態を解明した。頭部外傷後の脳では、COX1は主に変性神経細胞に、COX2は神経細胞とマクロファージに発現していた。さらに、COXの発現様式は様々な脳疾患の病理学的特性を反映しており、COXは内因性・外因性脳損傷鑑別診断の分子マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The goal of current study was to determine whether cyclooxygenase (COX) is useful as a molecular marker for endogenous and extrinsic brain injury differential diagnosis. Here, we elucidated the molecular dynamics of COX1 and 2, which are involved in inflammation and anti-inflammation of the central nervous system in the damaged brain after trauma. In the brain after trauma, COX1 was predominantly in degenerative neurons, while COX2 was expressed in neurons and macrophages. In addition, COX expression patterns reflect the pathological characteristics of various brain diseases, suggesting that COX may be useful as a molecular marker for endogenous and exogenous brain injury differential diagnosis.

研究分野：法医学

キーワード：頭部外傷 シクロオキシゲナーゼ 内因性・外因性脳損傷診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

法医学において、損傷が内因或いは外因に起因するのかを鑑別することは重要な診断項目の一つである。従来、これらの鑑別診断は損傷の部位や機序を総合的に判断することで行われており、肉眼的所見のみでは診断に苦慮する事例も少なくなかった。実際に、本研究代表者らは外傷性脳幹出血と内因性脳出血との鑑別事例について報告した[Leg Med (2003) 4: 127-130]。即ち、研究開始当初、決定的な内因性・外因性脳損傷診断分子マーカーに関する報告はなかった。

一方、アラキドン酸からプロスタグランジン(PG)の合成を触媒するシクロオキシゲナーゼ(COX)は、細胞や組織の炎症に関与することが知られている。一般的に、肝臓などではCOX1は恒常的な発現を認め恒常性維持に、COX2は細菌やウイルス感染、臓器損傷に伴って発現量が増加し炎症に関与すると考えられている。しかし近年、脳ではCOX1及び2の両方が発現しており、COX1は炎症に、COX2は炎症と消炎の両方に関与することが明らかになってきた[Biochimie (2011) 93: 46-51]。また、神経変性疾患や脳卒中などの内因性疾患におけるCOXの発現動態や役割が検討されていた[Trends Pharmacol Sci (2009) 30: 174-181]。ところが、頭部外傷後の損傷脳におけるCOXの分子動態については一定の見解が得られておらず、不明であった。

本研究代表者はこれまで、頭部外傷[Brain Res (2006) 1078: 198-211, Neuroscience (2011) 171:1273-1283]や脳卒中[CNS Neurosci Ther (2014) 20: 275-281, Neurobiol Dis (2014) 62: 56-61]に伴う損傷脳の研究を行ってきた。その過程で、頭部外傷後の損傷脳では、COXの遺伝子発現が増加しており、PG合成系が活性化していることが示唆されていた。これらの研究背景を踏まえ、頭部外傷後の脳内COXの発現細胞の種類や細胞内局在を解明する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、頭部外傷後の脳内COX1及び2の発現細胞の種類や細胞内局在を解明し、COXが内因性・外因性脳損傷診断分子マーカーとして有用であるかについて検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 頭部外傷モデル動物

wistar系ラットの右頭頂骨正中中部に骨窓を開け、脳挫傷作成装置を用いて側方打撃を加えた。その後、受傷3、6、12及び48時間後に灌流固定し、速やかに脳を摘出した。得られた損傷脳及びsham群の脳を以下の組織学的実験に用いた。

(2) マイクロアレイ解析

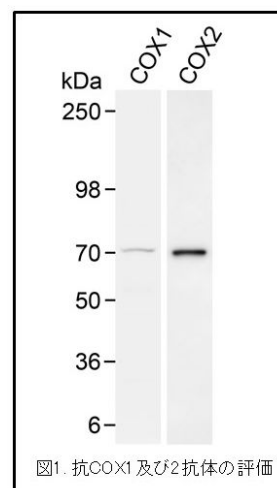
受傷3、6及び12時間後の損傷脳とsham群を経時的に比較した。打撃直下の脳皮質を分離し、QuiqPrep micro mRNA purification kit(Amersham)を用いてmRNAを単離した(A_{260}/A_{280} : 1.9-2.3)。得られたmRNAをGeneChip Rat 230 2.0 (Affymetrix)に供した。本研究では、COXの発現調節に基づきPG合成系のパスウェー解析を行った(GenMAPP 2.1: MAPPFinder 2.0)。

(3) 免疫組織化学染色

脳内COX1及び2の発現を調べるために、抗COX1及び2抗体を用いた。また、発現細胞の種類は神経細胞(NeuN)、アストロサイト(GFAP)及びミクログリア(Iba1)のマーカー分子に対する抗体を用いて、抗COX1及び2抗体との多重蛍光免疫組織化学染色を行った。さらに、ミクログリア・マクロファージマーカー分子の抗体として抗CD68抗体を用いた。

(4) 抗COX1及び2抗体の特異性

受傷12時間後の脳試料を用いて抗COX1及び2抗体の特異性をウエスタンブロット法で確認した[図1]。



(5) 3次元画像解析

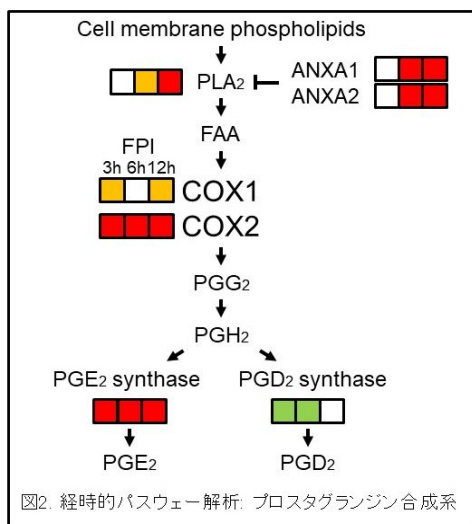
脳内COX1及び2の細胞内局在を調べるために、高分解能蛍光顕微鏡DeltaVisionを用いて画像を取得した。得られた画像をデコンボリューション処理後、3次元像を構築後して解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 頭部外傷後の損傷脳ではプロスタグランジン合成系を介して炎症が惹起する

経時的PG合成調節系パスウェー解析では、受傷3及び12時間後にCOX1の発現が、受傷3、6及び12時間後にCOX2の発現が上昇して

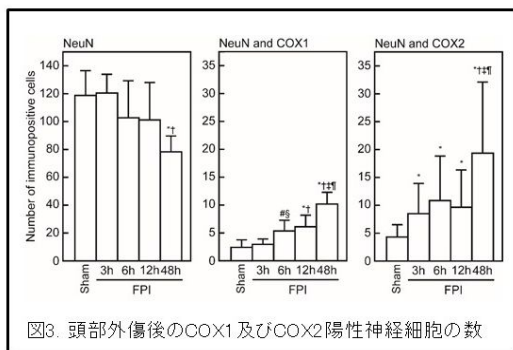
いた[図2]。さらに、受傷3、6及び12時間後に炎症性 PGE₂ 合成酵素の遺伝発現が上昇していた。一方、抗炎症性 PGD₂ 合成酵素の遺伝発現が減少していた。即ち、頭部外傷後の脳ではプロスタグランジン合成系が活性化しており、炎症が惹起していることが示唆された。



(2)頭部外傷後、COX1 陽性神経細胞が増加しており、COX1 は変性した神経細胞に局在している

頭部外傷後の損傷脳では受傷後時間依存的に、COX1 陽性神経細胞が増加していた[図3]。また、細胞内局在解析において、COX1 は神経細胞体及び樹状突起に局在していた[図4]。特に、受傷 48 時間後の損傷脳では、神経細胞体や受傷突起の周辺に斑点状の COX1 陽性像が認められ、変性した神経細胞に局在していた。

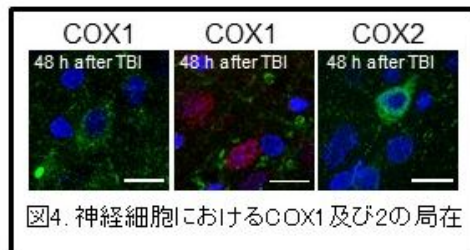
一方、GFAP 陽性アストロサイトや Iba1 陽性ミクログリア・マクローフェージでは COX1 陽性像が認められなかった。即ち、COX1 はグリア細胞には殆ど発現しないことが分かった。



(3)頭部外傷後、COX2 の発現は神経細胞及びCD68 陽性細胞で増加している

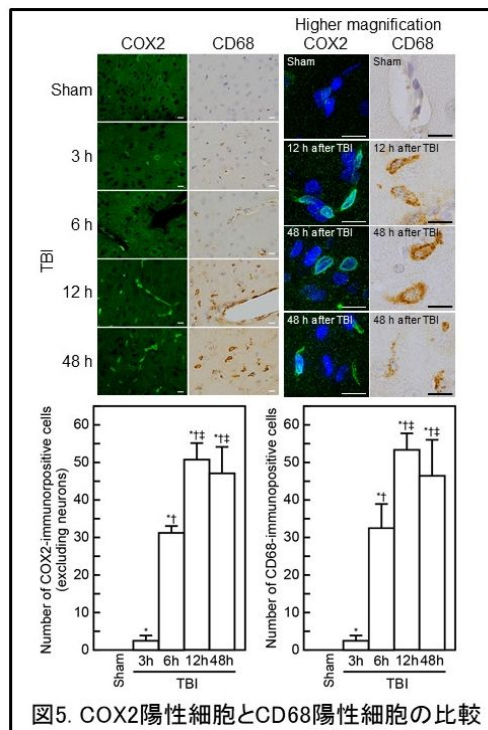
受傷後時間依存的に、COX2 陽性神経細胞が

増加していた[図3]。また、細胞内局在解析において、COX2 は COX1 と同様に神経細胞体及び樹状突起に局在していた。しかしながら、その性状は異なっており、COX2 では核膜周辺の神経細胞体内において著しい局在を認めた[図4]。



また、非神経細胞性の脳内細胞で明らかな COX2 像が認められた。その形態や受傷後の出現様式は CD68 陽性細胞に酷似していた[図5]。ところが、Iba1 陽性細胞では明らかな COX2 陽性像が認められなかった。即ち、COX2 は脳内に常在するミクログリアではなく、受傷後脳血管の破綻に伴って移入したマクローフェージ由来の細胞に発現していると考えられた。

なお、GFAP 陽性アストロサイトでは COX2 陽性像が認められなかった。



(4)COX1 と COX2 は同一細胞において共発現を認めない

頭部外傷後、COX1 及び COX2 は共に神経細胞で発現の増大を認めた。しかしながら、COX1 及び COX2 はそれぞれ異なる細胞において発現しており、同一の細胞において共局在を

示さなかった[図6]。

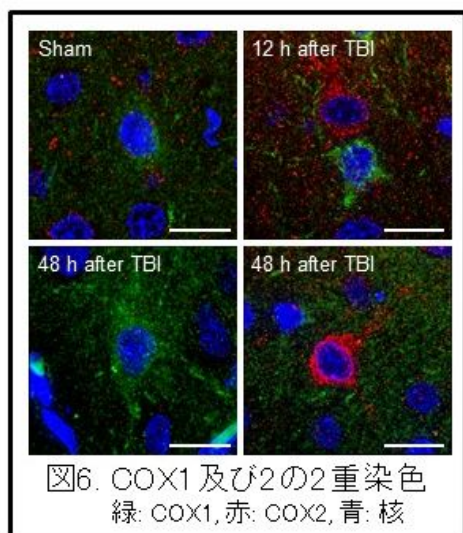


図6. COX1及び2の2重染色
緑: COX1, 赤: COX2, 青: 核

(5) COX は内因性・外因性脳損傷鑑別診断の分子マーカーとして有用である

研究成果(1)～(4)に基づき、外傷性と内因性損傷におけるCOX1及び2の分子動態について文献的考察を行った[Biochimie (2011) 93: 46-51, Trends Pharmacol Sci (2009) 30 174-181 など]。その結果、それぞれ脳疾患の特性によってCOX1及び2の発現動態は異なっており、COXは内因性・外因性脳損傷鑑別診断の分子マーカーとして有用である可能性が示唆された。

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1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

[学会発表](計3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).

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