

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20393

研究課題名(和文) 頭部外傷後脳神経細胞アポトーシスにおける小胞体カルシウムイオンチャネルの関与

研究課題名(英文) Role of endoplasmic reticulum calcium channel on apoptosis following traumatic brain injury

研究代表者

戸谷 昌樹 (TODANI, Masaki)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00585721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いた側頭部外傷モデルにおいてアポトーシスがどのように起こっているのか時系列的に調べた。また、小胞体のカルシウムイオンチャネル阻害薬によりアポトーシスが抑制されるかを調べた。アポトーシス細胞は脳梁を中心に3日目に最も多く観察され、その後細胞崩壊と共に減少した。アポトーシスの抑制は、薬剤の種類や濃度によっても異なっていたが、ダントロレンによるアポトーシス抑制効果が最も高かった。薬剤の混合投与による相乗効果は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一度損傷された脳神経細胞は再生しないため、頭部外傷においては二次損傷を防ぐことが治療戦略として重要になる。今回の頭部外傷モデルでは神経細胞切断が脳梁と皮質の間で起こっておりびまん性軸索損傷を観察したと考えられる。この研究では、脳梁部を中心としたアポトーシスとネクローシスの時系列な変化を観察することが出来た。さらに、小胞体のカルシウムイオンチャネル阻害薬を用いることでアポトーシスを薬剂的に抑制する可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were to investigate the time-dependent modification of apoptosis following traumatic brain injury induced by lateral fluid percussion, and to evaluate the roles of endoplasmic reticulum calcium channel on apoptosis. The apoptotic cells were predominantly observed in corpus callosum on the side of cortex, with increasing number until 3 days after the impact followed by the stained cell elimination in accord with the collapse of apoptotic cells. Some inhibitors of calcium channels achieved the potential of apoptosis suppression at 3 days after impact, especially with intracerebroventricular administration of dantrolene, an inhibitor of ryanodine receptor, without synergistic effect with combination of other inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor inhibitors.

研究分野：頭部外傷

キーワード：頭部外傷 アポトーシス ネクローシス 小胞体 カルシウムイオンチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷では、直接損傷によって受傷直後から起こる一次損傷と、一次損傷部分を核に周辺の浮腫や虚血が受傷後数日後に起こる二次損傷がある。一次損傷部分は早期細胞死(ネクローシス)、二次損傷部分は遅発性細胞死(アポトーシス)が起こっている。アポトーシスはプログラムされた細胞死と言われ、何らかの刺激等により自発的に細胞が死に至ることを指す。細胞死をおこした脳神経細胞は再生することがないため、頭部外傷の治療においては直接損傷部位周辺の二次損傷、いわゆるペナンプラ部にある細胞をいかに温存するかが大切となる。つまり、アポトーシスを抑制することにより脳損傷を軽減させる可能性がある。

アポトーシスの機序は様々存在するが、細胞質内カルシウムイオン濃度の上昇は、アポトーシスシグナルの開始において重要な役割を果たしているとされる。細胞内カルシウムイオンは主に細胞膜を通じて細胞外から流入するものと、小胞体を通じて細胞内貯蔵から放出されるものがある。細胞質内カルシウムイオン濃度の上昇によって、カスパーゼを含む様々な酵素が活性化し、その細胞はアポトーシスに導かれる。カルシウムイオンの細胞質内流入経路の一つである細胞膜カルシウムイオンチャネル阻害薬を用いた過去の研究では、十分な効果が得られなかった¹。

小胞体は細胞質のカルシウムイオン調節において重要な役割を果たしている。小胞体にはリアノジン受容体とイノシトール三リン酸受容体と2種類のカルシウムイオンチャネルがある。小胞体のカルシウムイオンチャネルは、ミトコンドリアとのクロストークによりアポトーシスのシグナルを出していると考えられる²。これらのことから、小胞体カルシウムイオンチャネルを阻害することにより、アポトーシスを抑制する可能性がある。

2. 研究の目的

この研究の目的は、頭部外傷後脳細胞のアポトーシスおよびネクローシスの時間的・空間的な発現様式を解明すること、小胞体カルシウムイオンチャネルがアポトーシスに関与しているかを調べることである。

3. 研究の方法

(1) 実験方法

実験対象はSDラット、頭部外傷はLateral Fluid Percussion Injury(LFPI)モデルで行った。まず、ラットにペントバルビタールを腹腔内投与した。さらにイソフロレンで吸入麻酔をかけた後、気管内挿管をした。術中はイソフロレンによる吸入麻酔下で100%酸素による人工呼吸をし、ヒートパッドを用いて37.0度でコントロールした。皮膚切開部である頭頂部をバリカンで剃毛し、1%キシロカインで局所麻酔後、頭頂部の頭蓋骨を露出させた。脳室内へ薬剤投与するために、Bregmaから0.8mm後ろ、1.5mm左側方を穿頭した。LFPIのために外套5.0mmの電動ドリルで頭蓋骨を削り、その後外套4.8mmの穿頭ドリルで硬膜を傷つけないように頭蓋骨に穴を開けた。脳室内への薬剤投与は頭蓋骨表面から4.5mmで10μl投与した。薬剤投与した孔はアンカービスを打ち込むために利用した。LFPIのためにキャップを設置し、デンタルアクリルでアンカービスと一緒に固定をした。キャップ内を生食で満たした。Fluid Percussion Injury(FPI)装置にキャップを接続し、左半球に2.0atmで頭部外傷を作成した。インパクト後、硬膜の破れや出血、挫傷がないことを確認し、直ちに吸入麻酔薬フリーの100%酸素投与下に人工呼吸器に接続した。キャップを付けていた部位に頭蓋骨を戻してデンタルアクリルで固定した。皮膚を閉創、創部にはキシロカインとゲンタマイシンを塗布した。手術終了後は自発呼吸が回復するまで人工呼吸器を用い、ヒートパッドを用いて37.0度でコントロールした。自発呼吸が回復していることを確認後抜管、ゲージに戻して動けるようになるまで保温しながら経過観察をした。

(2) 組織作成

頭部外傷後に脳組織および血液を採取した。ペントバルビタール腹腔内投与、さらにイソフロレンで吸入麻酔をした後、採血した。血液はしばらく静置したのちに遠心分離し血清を保存した。採血後、ラットをヘパリン加冷生食で灌流、その後0.1%グルタルアルデヒド加4%ホルマリンで灌流固定し脳組織を取り出した。脳組織は一晩ホルマリン液内で浸透させた。取り出した脳組織は40μmで冠状断スライスし、組織観察切片を作成した。

組織はアポトーシス、ネクローシスの評価のためTdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL)と活性化Caspase-3、神経細胞切断の評価としてAmyloid Precursor Protein (APP)で染色した。TUNEL染色の一部はメチルグリーン染色を同時に染色した。

(3) 群分け

最初に時間的観察のため、コントロール群を含めて頭部外傷後2時間、頭部外傷後1日目から5日目までの観察をした。次に治療介入群の頭部外傷後3日目の組織を観察した。治療薬として、リアノジン受容体阻害薬であるダントロレンおよび、イノシトール三リン酸受容体阻害薬としてXestspingon C (XeC)と2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB)をLFPI直前に脳室内投与した。それぞれ薬剤濃度が低濃度、中濃度、高濃度と異なる3群と、ダントロレンと2-APB、ダントロレンとXeC、2-APBとXeC、それら全て投与する群を作成した。薬剤血中濃度は、ダントロレンがそれぞれ500、5,000、50,000μM、2-APBが200、2,000、5,000μM、XeCが5、50、500μMとした。

4. 研究成果

(1) 頭部外傷後の時間経過による変化

コントロール群においては、TUNEL、活性化Caspase-3、APP共に染色されなかった。

活性化 Caspase-3 は、頭部外傷後 2 時間はほとんど認めることが出来ないか、認めたとしても非常に小さなスポットとして観察された。1 日後には核内に限局する球状の小さな染色として、損傷側帯状回外側から脳梁の皮質側を中心に少数認められ始めた(Fig.1-1 白抜き矢印)。非損傷側には染色された細胞は認めなかった。経時的に顆粒は大きく多くなり核内をより濃く染色されるようになり、2 日後には、広い範囲にやや薄い顆粒状の染色が見られるようになった。3 日後には球状の染色よりも顆粒状染色が多く認められ(Fig.1-2 黒矢印)、4 日目には顆粒状染色がほとんどを占めるようになった。5 日目には顆粒はより広い範囲に薄く染色され、周囲との区別が難しくなった。活性化 Caspase-3 が最も多く観察されたのは頭部外傷 3 日後であった。

Fig.1-1
Day1 CC x400

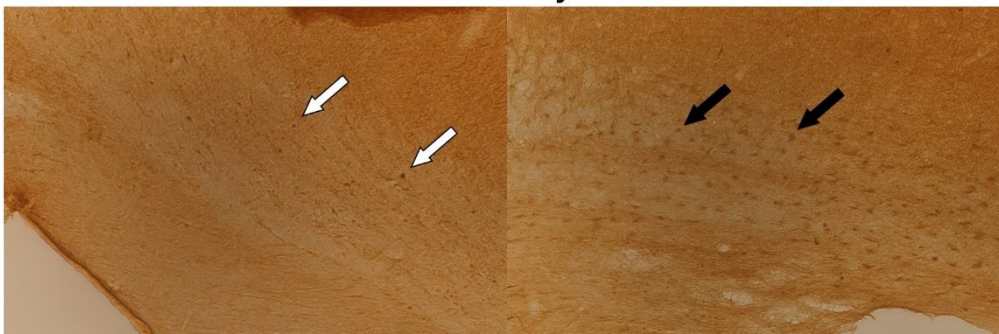
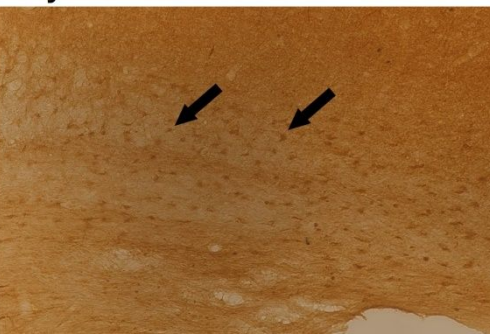


Fig.1-2
Day3 CC x400

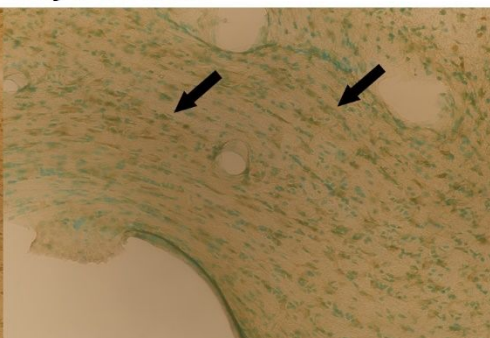


TUNEL 染色は、損傷側皮質下でやや強く染色される部分を認めていたが、損傷部位から距離が離れるとともに段階的に薄くなった。非損傷側にもいくつかの染色されている細胞を認めたが、損傷部位からの距離とは関係なく散在していた。活性化 Caspase-3 と同様に、損傷側帯状回外側から脳梁皮質側に多く観察できた。メチルグリーンを用いない場合には陽性細胞が段階的に染色されており観察が難しかった。頭部外傷 2 時間後では、帯状回から脳梁の陽性細胞は区別が難しかった。1 日後には帯状回周辺を中心にメチルグリーンで染色した核と重なった球状の染色を認めた(Fig.2-1 白抜き矢印)。皮質下は損傷部位周囲に多くの染色細胞を認め、メチルグリーンとの共染色では核内と一致していた。3 日後には脳梁の染色は範囲が広がった顆粒状染色が増加した(Fig.2-2 黒矢印)。5 日後にはほとんど染色されなくなった。TUNEL で染色される細胞は、活性化 Caspase-3 よりも多かった。

Fig.2-1
Day1 CC x400



Fig.2-2
Day3 CC x400



APP 染色は脳梁の皮質側および皮質下の脳梁に接する部位に層状となり多く認められた。損傷直後は非常に小さなスポットとして染色された(Fig.3-1 白抜き矢印)。経時的に徐々に大きくはっきりした濃染として観察され、3 日後が最もよく観察できた(Fig.3-2 黒矢印)。その後日数が経過するとともに減少した。

Fig.3-1
Day0 CC x400

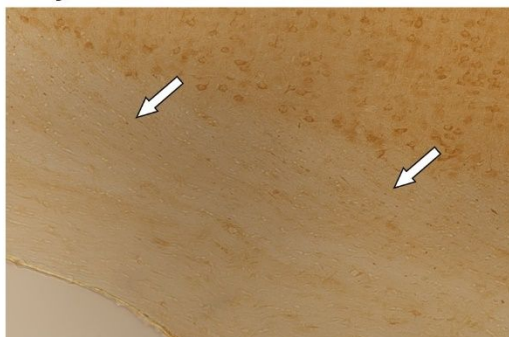


Fig.3-2
Day3 CC x400



APPは神経細胞の切断を意味しており、染色細胞が脳梁の皮質側から皮質下の脳梁の接する部位に層状となって観察されたことから、LFP1によるびまん性軸索損傷による脳神経細胞切断を見ているものと思われる。TUNEL染色においては形態学的に核の崩壊と断片化により核から分散する小顆粒染色が観察されるType I細胞と、縮小した核が球形に濃染されるType II細胞の2種類があり、Type I細胞はネクローシス、Type II細胞はアポトーシスを示唆するとされている³。今回の観察では、TUNEL染色された細胞がLFP1損傷側優位に皮質下や脳梁において、頭部外傷直後から見られていた。それらの細胞は最初Type I細胞であったが経時的にType II細胞が増加しており、一次損傷で障害を受けた細胞で時間とともにネクローシスをおこしている状態を観察していたと考えられた。活性化Caspase-3染色はLFP1損傷側の帯状回を中心に、損傷直後はType I細胞であったが、経時的にType II細胞が増加、それらの合計数は3日目に最も多く観察できた。この事象は、損傷直後からアポトーシスが始まり、最初核内にとどまっていたアポトーシスエフェクターである活性化Caspase-3が、細胞崩壊と共に散在していく経過を見ていたと考えられる。この研究による結果から、時系列的にアポトーシスが起る様子と、ネクローシスとアポトーシスの関係が観察できた。しかし、この研究ではこれらの染色がどの細胞で起こっているのかが分かっていない。解剖学的に脳梁や帯状回では神経細胞核が少ない。観察された細胞の多くはオリゴデンドログリアやアストロサイトのようなグリア細胞の可能性もある。今後は、蛍光多重免疫染色によってアポトーシスをおこしている細胞を突き止める必要がある。

(2)小胞体カルシウムイオンチャネル阻害薬による抑制効果

治療介入では活性化Caspase-3が最も多く観察できたLFP1後3日目の脳組織を用いた。アポトーシスの評価のため活性化Caspase-3陽性細胞の数をカウントした。

まず、ダントロレン、2-APB、XeCそれぞれ単剤投与濃度の違いによるアポトーシスへの影響を調べた。ダントロレンにおいては、低濃度、中濃度において活性化Caspase-3陽性細胞が抑制されており、高濃度においては増加していた。2-APBにおいては、低濃度、高濃度において染色細胞数は減少しておらず、中濃度においてやや減少しているものの明らかな抑制効果は認めなかった。XeCにおいては、低濃度では陽性細胞は減少していたがダントロレンほどではなかった。中濃度、高濃度と濃度が高いと陽性細胞は減少する傾向が認められたが、有意差は認めなかった。

続いて、3剤の中濃度を2剤ずつ混合した3群と、全てを混合した群について同様に活性化Caspase-3数をカウントした。ダントロレンと2-APB混合群では、陽性細胞の抑制効果は認めず、ダントロレンとXeC混合群では陽性細胞が減少していたが、単剤投与ほどの抑制効果は認めなかった。2-APBとXeC混合群では陽性細胞がやや減少していたが、有意差は認めなかった。3剤すべてを投与した群においては、陽性細胞の抑制効果は認めなかった。

今回の実験では、2種類ある小胞体のカルシウムイオンチャネルのうちリアノジン受容体阻害薬であるダントロレンと、イノシトール三リン酸受容体阻害薬である2-APBとXeCを脳室内投与してアポトーシスが抑制されるか調べた。単剤投与による効果は、ダントロレンがアポトーシスを抑制する効果が最も高かった。混合投与においては、それぞれの相乗効果は認められず逆に効果減弱する場合も認められた。今回観察されたアポトーシス細胞が脳神経細胞かどうかは分かっていないが、オリゴデンドログリアやアストロサイトの損傷だとしても、最終的には脳神経細胞死をおこしうる。脳神経細胞は損傷後再生機能が無いため、いかにアポトーシス等の二次損傷を防ぐかが頭部外傷における治療戦略となる。今回の研究では、アポトーシスを薬理的に抑制する可能性を示すことができた。しかし、今回の薬剤投与法は脳室内への直接投与であった。今後は経静脈的、傾向的に投与した場合に効果があるかを調べる必要がある。また、アポトーシスの発生機序については未だに解明されていない。小胞体のカルシウムイオンチャネル放出するカルシウムがカルモジュリンやミトコンドリアに影響を与えていることは分かっているが、単純にカルシウム放出量のみによってアポトーシスをおこしているわけではなくシグナルとしてクロストークしていると考えられる。これらの薬剤がどのようにアポトーシスに関与しているのか病態生理学的な解明も必要である。

引用文献

1. Savigni DL, O'Hare Doig RL, Szymanski CR, et al. Three Ca²⁺ channel inhibitors in combination limit chronic secondary degeneration following neurotrauma. *Neuropharmacology*. 2013;75:380-390.
2. Schäfer MKE, Pfeiffer A, Jaeckel M, Pouya A, Dolga AM, Methner A. Regulators of mitochondrial Ca(2+) homeostasis in cerebral ischemia. *Cell Tissue Res*. 2014;357(2):395-405.
3. Jia F, Mao Q, Liang Y-M, Jiang J-Y. Effect of Post-Traumatic Mild Hypothermia on Hippocampal Cell Death after Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma*. 2009;26(2):243-252.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----