

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03917

研究課題名(和文) 外傷性脳損傷の増悪機序としての持続的脳内DNA損傷の解析

研究課題名(英文) Analysis of persistent DNA damage in the brain as an exacerbating mechanism of traumatic brain injury.

研究代表者

木林 和彦(Kibayashi, Kazuhiko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性脳損傷が受傷後に増悪する機序の解明を目的とし、ヒト剖検例の解析では、交通事故による頭部損傷患者では胸腹部や骨盤に併存する損傷に注意が必要であり、歩道等では服薬や転倒歴のある人の転倒防止が必要と考えられた。また、頭部外傷直後に心停止を来した事例の検討では、飲酒酩酊に加え、頭頂部の打撲が受傷直後の心停止の要因であることが判明した。モデルマウスの解析では、外傷性脳損傷の増悪には細胞老化が関係することを示した。また、DN受傷後に大脳の損傷側に免疫組織化学でDNA損傷のマーカーであるH2AXのリン酸化が観察され、脳損傷の増悪機序に受傷後のDNA損傷が関係していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷は受傷後に増悪する場合があります。重症化機序の解明は患者の後遺症低減や救命につながる。ヒト剖検例の解析では、交通事故損傷の特徴を明らかにすると共に、受傷直後の急死例では、飲酒酩酊に加え、頭頂部の打撲が受傷直後の心停止の要因であることが判明し、頭部打撲によって心停止を来した人にはその場に居合わせた人による心肺蘇生が重要と考えられた。外傷性脳損傷のモデルマウスを用いた解析では、外傷性脳損傷の増悪に細胞老化が関係していることが判明し、また、脳損傷の増悪機序に受傷後のDNA損傷が関係していることが示唆され、受傷後の脳内でのDNAの持続的損傷の抑制は脳損傷の低減につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The analysis of human autopsy cases revealed that patients with head injuries from traffic accidents need to pay attention to coexisting injuries in the thorax, abdomen, and pelvis, and that it is necessary to take medication on sidewalks and to prevent people with a history of falls from falling. In addition, the study of cases of cardiac arrest immediately after head injury revealed that in addition to alcohol intoxication, bruising on the parietal area of the head was a factor in cardiac arrest immediately after injury. Analysis of model mice showed that cellular senescence is related to the exacerbation of traumatic brain injury. Moreover, phosphorylation of H2AX, a marker of DNA damage by immunohistochemistry, was observed on the injured side of the cerebrum after DN injury, suggesting that post-injury DNA damage is involved in the exacerbation mechanism of brain injury.

研究分野：法医学

キーワード：外傷性脳損傷 剖検 心停止 実験動物 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

- 1) 頭部外傷による外傷性脳損傷は、転倒・転落や交通事故等によって生じ、脳の重篤な機能障害を来すと共に、事故死の主要な死因である。外傷性脳損傷は受傷後に増悪することが知られており、受傷直後は軽症でも増悪して重度の機能障害や死亡を来す。近年は糖尿病や高血圧症等の生活習慣病を有する人が多く、糖尿病や高血圧などの疾患を有する場合、脳には加齢性変化に加え、糖尿病や高血圧による血管病変が認められる。特に、糖尿病では局所における微小環境の再生能力低下により創傷治癒の遅延が生じることが知られている。外傷性脳損傷の増悪の機序が判れば、糖尿病患者の頭部外傷の場合だけでなく、頭部外傷患者全般において外傷性脳損傷を増悪しないようにする治療につながることを期待される。
- 2) 外傷性脳損傷の損傷部位には神経細胞の DNA の断片化による細胞老化が生じる。老化細胞とは癌遺伝子の活性化や酸化的ストレスなどにより DNA 損傷が生じることで起こる不可逆的な増殖停止状態である。細胞老化を起こしても直ぐに死滅するわけではなく、生体内に細胞老化を起こした細胞が長期間存在し続けるとされている。老化細胞は炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素を産生し、慢性炎症の惹起などの生体に不利益をもたらすとされている。老化細胞は外傷性脳損傷で出現すると言われている。
- 3) 本研究では、外傷性脳損傷では受傷後に継続的に脳内の DNA が損傷され、後遺障害や死亡の機序に関係していることを証明する。重度な脳損傷を呈する糖尿病のモデルマウスに外傷性脳損傷を作成し、脳内の DNA 断片化の経時的な差異を捉えることで外傷性脳損傷では持続的な脳内 DNA 損傷があることを確認し、DNA 損傷と神経機能変化、組織変化、遺伝子発現変化の関係を捉える。DNA 損傷に基づく外傷性脳損傷の増悪の機序が判れば、脳挫傷が受傷後に増悪する機序の理解に役立ち、将来的に DNA 損傷を制御する薬剤の投与や処置の実施によって脳損傷を軽減することが可能となる。

2. 研究の目的

外傷性脳損傷が受傷後に増悪する機序を解明するため、ヒト剖検例の解析とモデル動物の解析を行うことを目的とした。すなわち、1) ヒトの剖検例の後向きの解析研究を行い、頭部外傷による脳損傷の重症度と糖尿病や高血圧などの既往歴との関係を明らかにし、外傷性脳損傷の増悪化機序を明らかにすることを目的とした。2) 外傷性脳損傷が増悪する糖尿病モデルマウスに脳損傷を作成し、コントロールの非糖尿病マウスと比較することで、脳内 DNA が受傷後に持続的に生じていることを証明し、外傷による脳内 DNA の持続的損傷が神経機能障害と致死の機序であることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) ヒト剖検例の解析

- (1) 平成 20~27 年に東京女子医科大学医学部法医学講座で当研究者が行った法医解剖から成人の頭部損傷の事例 73 症例を抽出した。頭部損傷は鈍的外力による頭蓋骨骨折または頭蓋内損傷とした。対象患者について解剖検査記録から以下の項目を抽出した。患者背景(診療情報): 年齢、性別、来院時 Glasgow Coma Scale (GCS)、受傷後生存期間、既往歴、服薬歴、過去の転倒の有無等、解剖結果: 剖検所見、組織検査所見、血液生化学検査結果、中毒検査結果、死因、死因の種類等。
- (2) 解析方法として、受傷原因別に交通事故(自動車や自転車などの輸送機関が関係した受傷)、転倒(同一平面上での転倒による受傷)、転落(高さがある所からの転落による受傷)、殴打(他者の行為による受傷)、その他に分類した。身体各部位の損傷の重症度を Abbreviated Injury Scale; AIS、Injury Severity Score; ISS を用いて定量化した。交通事故、転倒、転落、殴打の 4 群を比較し、受傷原因別の頭部損傷患者の特徴を明らかにした。
- (3) 来院時 GCS による重症度は一般に軽症 13-15、中等症 9-12、重症 3-8 に分けられており、非典型的な経過を辿った頭部外傷例として、来院時 GCS から軽症または中等症と判断された事例について脳損傷が増悪した機序と死亡の機序を検討した。
- (4) 平成 20~令和 2 年に東京女子医科大学医学部法医学講座で当研究者が行った法医解剖から頭部外傷を受傷直後に心肺停止を来した 5 例を抽出した。頭部の受傷部位、発生現場での心肺蘇生術の有無、解剖所見から心肺停止の機序を検討した。

2) 外傷性脳挫傷モデル動物の解析

- (1) 糖尿病モデルマウス KK-Ay とコントロールマウス C57BL/6 に 2.5%イソフルランを用いた吸入全身麻酔を行い、頭頂部の頭皮を小切開して頭蓋骨の一部を露出した。頭頂骨に直径 3 mm の骨窓を形成した。脳挫傷作成装置を用いて硬膜を介して大脳皮質に衝撃を与えて局所性脳損傷を形成した(controlled cortical impact model)。神経学的な異常の程度を行動解析の標準的な手法(Neurological Severity Score、Morris water maze、beam walk)を用いて評価を行った。なお、頭部の切開だけのマウス、未処理のマウスを対照とした。マ

ウスは各群・各受傷後時間で n=7 とした。

- (2) 糖尿病モデルマウス KK-Ay とコントロールマウス C57BL/6 について、外傷性脳損傷を作成後、1月、3月、6月、12月後に実験小動物用コンパクト MRI システム(学内総合研究所所有)を用いて脳損傷の MRI 画像を取得し、画像を解析して脳損傷の体積を算出した。糖尿病モデルマウス KK-Ay とコントロールマウス C57BL/6 で脳損傷の体積を比較した。
- (3) 外傷性脳挫傷の作成から1月、3月、6月、12月後にペントバルビタールの腹腔内投与で全身麻酔する。心臓右心房切損による放血を行い、緩衝液を還流し、安楽死させた。リン酸緩衝化生理食塩水とリン酸緩衝化ホルマリンで還流固定を行った。脳を摘出してマイクロスライサーで2mm厚の前額断を作成した。脳の凍結切片を作成し、組織化学法と免疫組織化学法で好中球、マクロファージ、マイクログリア、アポトーシス細胞を染色し、画像を解析し(オリンパス社製バイオイメージングナビゲータ FSX100Advanced セット使用)炎症細胞等の広がりと単位面積当たりの個数を定量化した。また、老化細胞のマーカである老化関連酸性 -ガラクトシダーゼ(SA -GAL; senescence associated -galactosidase) 活性発現を組織化学染色によって観察し、同様に定量化した。また、酸性 -ガラクトシダーゼの組織化学と GFAP、Iba-1、NeuN または F4/80 の各抗体を用いた免疫組織化学の二重染色を行い、酸性 -ガラクトシダーゼ陽性となる細胞を特定した。さらに、同じく老化細胞のマーカとされている p16、senescence-associated heterochromatin foci (SAHF)、senescence-associated DNA-damage foci (SDF) の免疫組織化学染色を行った。二本鎖 DNA 切断のマーカである -H2AX の免疫組織化学染色を行った。
- (4) 糖尿病モデルマウス KK-Ay とコントロールマウス C57BL/6 について、行動解析の結果、炎症細胞等と老化細胞の出現数を比較検討した。また、糖尿病と細胞老化が外傷性脳損傷を増悪する機序を考察した。

4. 研究成果

ヒト剖検例の解析では、交通事故と交通事故以外による頭部損傷の患者を比較した結果、交通事故による頭部損傷患者では胸腹部や骨盤に併存する損傷に注意する必要があるとあり、歩道等では服薬や転倒歴のある人の転倒防止が必要と考えられた。頭部外傷の法医解剖例から非典型的な経過を辿った事例として頭部外傷直後に心停止を来した事例を抽出して検討したところ、重症化の機序として、飲酒酩酊に加え、頭頂部の打撲が受傷直後の心停止の要因であることが判明し、頭部打撲によって心停止を来した人にはその場に居合わせた人による心肺蘇生が重要と考えられた。頭部外傷直後に心停止を来した後に死亡した患者の法医解剖では高度な脳損傷が認められないことを死因診断で考慮すべきであり、受傷時に心停止を来す頸髄損傷と既存疾患の増悪を剖検で除外する必要がある。

外傷性脳損傷のモデルマウスを用いた解析では外傷性脳損傷の損傷部位に老化細胞のマーカである SA -GAL と p16 が出現することから細胞老化が増悪機序に関与していることが判明した。また、糖尿病マウスの脳損傷の研究では、糖尿病マウスは非糖尿病マウスに比較して脳損傷が高度であり、神経機能の低下も大きく、脳内に炎症細胞が多く出現することが判り、既存疾患である糖尿病は炎症の持続により脳損傷を悪化させることが判明した。さらに、DNA 損傷のマーカとしてヒストンタンパク質の一種である H2AX のリン酸化に着目し、リン酸化 H2AX(H2AX) を検出することで外傷性脳損傷の増悪を捉える研究を進め、受傷後に大脳の損傷側に免疫組織化学で H2AX のリン酸化を観察し、脳損傷の増悪機序に受傷後の DNA 損傷が関係していることが示唆された。リン酸化 H2AX を発現している細胞の特定、糖尿病マウスでの受傷後の脳内 H2AX のリン酸化の検出、同じく DNA 損傷のマーカである BRCA1 のリン酸化の有無について解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kibayashi K, Shimada R, Nakao KI	4. 巻 81
2. 論文標題 Analysis of autopsy cases involving individuals who experienced cardiopulmonary arrest immediately after sustaining minor head injuries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Forensic and Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jflm.2021.102205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 木林和彦	4. 巻 46
2. 論文標題 新型コロナウイルス感染症拡大下における死亡者への対応と行動変容による死亡状況の変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IATSS Review (国際交通安全学会誌)	6. 最初と最後の頁 32-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24572/iatssreview.46.1_32	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tatara Y, Shimada R, Kibayashi K	4. 巻 38
2. 論文標題 Effects of Preexisting Diabetes Mellitus on the Severity of Traumatic Brain Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 886-902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2020.7118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Machida M, Kibayashi K	4. 巻 49
2. 論文標題 Effectiveness of whole genome amplification prior to short tandem repeat analysis for degraded DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Genetics	6. 最初と最後の頁 102373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsigen.2020.102373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakao K, Kibayashi K	4. 巻 63
2. 論文標題 A fatal case of diphenhydramine overdose after a suicidal ingestion of non-prescription drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research and Practice of Forensic Medicine	6. 最初と最後の頁 139-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taki T, Kibayashi K	4. 巻 63
2. 論文標題 A comparative analysis of miRNA expression in human saliva and human saliva-derived exosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research and Practice of Forensic Medicine	6. 最初と最後の頁 147-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 町田光世, 木林和彦	4. 巻 28
2. 論文標題 変性試料に対するmIPEP法の有効性の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 51-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakao KI, Tataro Y, Kibayashi K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Detection of cocaine and metabolites from mouse femur buried in soil.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2018.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kibayashi K, Shimada R, Nakao KI.	4. 巻 59
2. 論文標題 Delayed death due to traumatic dissection of the common carotid artery after attempted suicide by hanging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine, Science and the Law	6. 最初と最後の頁 17-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0025802418825390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga T, Shimada R, Okada Y, Kawamata T, Kibayashi K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Senescence-associated- β -galactosidase staining following traumatic brain injury in the mouse cerebrum.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0213673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kibayashi K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Prevention of head trauma and death in patients with head injuries: A forensic autopsy study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IATSS Research	6. 最初と最後の頁 71-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.iatssr.2019.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kibayashi K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Analysis and prevention of traffic fatalities and injuries from the perspective of forensic medicine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IATSS Research	6. 最初と最後の頁 69-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.iatssr.2019.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木林和彦、多々良有紀、中尾賢一郎
2. 発表標題 抗凝固薬ワルファリン内服時の遅発性外傷性頭蓋内出血 剖検例の報告とモデル動物での検証
3. 学会等名 第90回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田 亮、多々良有紀、木林和彦
2. 発表標題 外傷性脳損傷モデルマウスにおける髄膜リンパ管内皮細胞の遺伝子発現変化
3. 学会等名 第90回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多々良有紀、木林和彦
2. 発表標題 糖尿病マウスにおける外傷性脳損傷の悪化と炎症関連細胞の動態
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京女子医科大学医学部法医学講座 http://www.twmu.ac.jp/legal-m/index.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------