

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592128

研究課題名(和文) 重症脳損傷におけるNADPH酸化酵素産生フリーラジカルの機能解明と臨床応用

研究課題名(英文) The roles and the kinetics of gp91phox after traumatic brain injury in mice

研究代表者

土肥 謙二 (DOHI KENJI)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20301509

研究成果の概要(和文)：

【はじめに】脳におけるフリーラジカルの産生には、いくつかの系路が知られている。本検討ではNADPH oxidase enzymeを構成する5つのサブユニットの一つであるgp91phox (NOX2)に注目し、頭部外傷におけるsuperoxide radical産生におけるgp91phoxの役割について検討を行った。

【方法】C57blackマウスとgp91phox遺伝子欠損マウスを用いて、実験的頭部外傷モデル(CCIモデル)を作成し、外傷後におけるgp91phoxの経時的発現と発現細胞、特に活性型ミクログリアのタイプについて検討した。さらにsuperoxide radicalの産生及び産生細胞について検討した。さらには、gp91phoxKOマウスにおける脳損傷と細胞死の抑制効果についてもそれぞれ検討した。

【結果】gp91phoxは早期より外傷周囲のameboid microgliaで主に発現し、外傷2日後にもっとも強かった。superoxide radicalは外傷周囲に強く産生され、その産生細胞はgp91phox発現細胞と共在していた。外傷後2日における損傷面積とTUNEL陽性細胞数はKOマウスで有意に抑制されていた。また、gp91phox発現しているmicrogliaはclassical activatedタイプのmicrogliaであった。

【考察】脳損傷後におけるgp91phoxの発現と動態、さらにはgp91phoxを介して産生されるフリーラジカルの役割について明らかとなった。classical activated microgliaにおけるgp91phoxさらにはNADPH oxidase enzymeの制御することが脳損傷の治療として有用であると考えられた。今後、microgliaの分化誘導が頭部外傷治療、特に酸化ストレス制御において重要であることが証明された。

研究成果の概要(英文)：

INTRODUCTION:

We hypothesized that gp91phox (NOX2), a subunit of NADPH oxidase, generates superoxide anion (O_2^-) and has a major causative role in traumatic brain injury (TBI). To evaluate the functional role of gp91phox and reactive oxygen species (ROS) on TBI, we carried out controlled cortical impact in gp91phox knockout mice (gp91phox^{-/-}). We also used a microglial cell line to determine the activated cell phenotype that contributes to gp91phox generation.

METHODS:

Unilateral TBI was induced in gp91phox^{-/-} and wild-type (Wt) mice (C57/B6J) (25–30 g). The expression and roles of gp91phox after TBI were investigated using immunoblotting and staining techniques. Levels of O_2^- and peroxynitrite were determined in situ in the mouse brain. The activated phenotype in microglia that expressed gp91phox was determined in a microglial cell line, BV-2, in the presence of IFN γ or IL-4.

RESULTS:

Gp91phox expression increased mainly in amoeboid-shaped microglial cells of the ipsilateral hemisphere of Wt mice after TBI. The contusion area, number of TUNEL-positive cells, and amount of O₂⁻ and peroxynitrite metabolites produced were less in gp91phox^{-/-} mice than in Wt. In the presence of IFN γ , BV-2 cells had increased inducible nitric oxide synthase and nitric oxide levels, consistent with a classical activated phenotype, and drastically increased expression of gp91phox.

CONCLUSIONS:

Classical activated microglia promote ROS formation through gp91phox and have an important role in brain damage following TBI. Modulating gp91phox and gp91phox-derived ROS may provide a new therapeutic strategy in combating post-traumatic brain injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な疾患に活性酸素や一酸化窒素(NO)などのフリーラジカルが関与していることがわかってきた。脳卒中、心筋梗塞などの急性疾患、糖尿病やメタボリックシンドロームをはじめとする慢性疾患、さらには悪性腫瘍や加齢に関しても、その病態における中心的役割を演じていると考えられている。近年では医療従事者のみならず一般の人々も活性酸素や抗酸化作用などについて非常に注目している。脳障害においては、脳低温療法さらにはフリーラジカル消去剤が既に臨床応用されており、今後さらにフリーラジカルが治療のターゲットとしては注目されている。

重症頭部外傷の病態は複雑であり、近年の分子生物学の進歩によってかなりの病態のメ

カニズムが解明されてきた。しかし、その一方で重症頭部外傷は予後が極めて悪く、医療技術の進歩にもかかわらず、いまだ救命が困難な疾患の一つである。重症頭部外傷の病態には酸化ストレスやフリーラジカルが強く関与していると考えられている。しかし、その一方でフリーラジカルを直接的に捕らえることが非常に難しく、酸化ストレスマーカーについてもいまだその詳細な動態は不明である。そのため臨床的データのみならず基礎実験においても直接的なフリーラジカルの発生や消去能を見た研究は非常に少なかった。我々の研究グループでは世界で初めて脂質過酸化に関与するアルコキシラジカルを生体試料を用いて直接的に計測する ex Vivo ESR 法を開

発した。さらに本手法でフリーラジカルのモニタリングを行い実際に臨床応用した。その結果によって脳低温療法やフリーラジカル消去剤（エダラボン）の臨床におけるフリーラジカル抑制効果について報告してきた。その結果、これらの治療だけでは脳損傷後のフリーラジカル抑制が十分ではないことが解明された。そして、より有効なフリーラジカル消去を目的とした有効な治療法を開発することが急務と考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は脳における活性酸素産生を行う NADPH oxidase の脳損傷後における生理活性や動態について検討すること。さらに NADPH oxidase 抑制による脳損傷抑制効果について検討し、臨床応用への足掛かりとする基礎的検討を行うことである。本研究ではまず、野生型マウスを用いて実験的頭部外傷モデル【Controlled Cortical Impactor (CCI)】を作製し、脳損傷後の NADPH oxidase の発現量と発現細胞について検討する。その結果を踏まえた上で、さらに NADPH oxidase の構成サブユニットの gp91 ノックアウトマウス (gp91 KO) を用いて NADPH oxidase 抑制による脳損傷抑制効果について検討する。さらには NADPH 阻害剤を用いて同様の研究を行い、頭部外傷における NADPH oxidase 阻害によるフリーラジカル制御を用いた治療法を開発を行う。

3. 研究の方法

(1) まず野生型 C57BL マウスを用いて頭部外傷モデル【Controlled Cortical Impactor (CCI)】を作製する。まず、western blotting 法を用いて NADPH oxidase の構成サブユニットである gp91 発現量について経時的に計測する。次に蛍光免疫組織染色法を用いて脳損傷後の gp91 と p22 の発現細胞の同定を行う。次に脳損傷後のスーパーオキシドラジカル (O_2^-) の動態と発現部位の同定のため

にヒドロエッチジンを用いた蛍光染色法 (HE 法) を行う。以上の結果によって脳損傷後の NADPH oxidase と O_2^- の動態について明らかにする。

(2) gp91 KO マウスを用いて同様に頭部外傷モデルを作製する。gp91 は NADPH を介したスーパーオキシドの産生に関与する NADPH oxidase enzyme を構成する 5 つのサブユニットの一つである (図 2)。gp91 KO マウスでは gp91 を介した NADPH oxidase による O_2^- の産生がブロックされる。gp91 阻害による、脳損傷抑制効果、野生型マウスと損傷面積及び TUNEL 法を用いて検討する。さらには O_2^- 抑制効果について HE 法を用いて比較する。

4. 研究成果

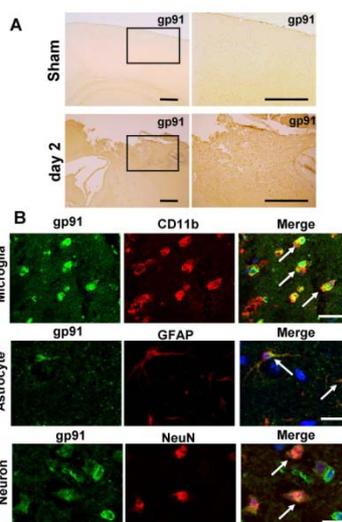


図 1

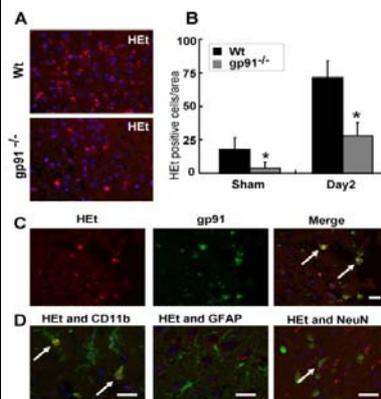


図 3

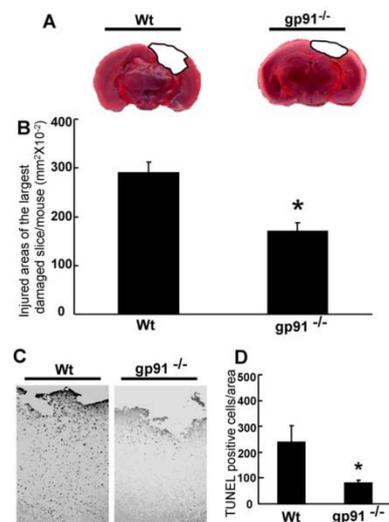


図 2

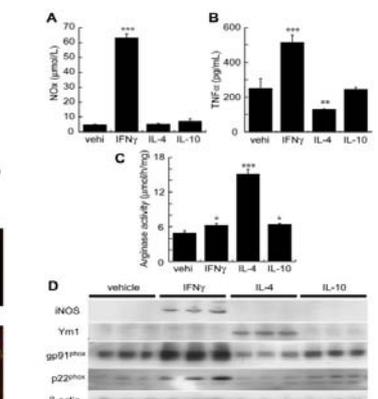


図 4

(1) 頭部外傷後 24 時間後より損傷半球で gp91 が発現し、48 時間後ではさらに増加していた。gp91 と gp22 の発現細胞は主に外傷周囲の amoeboid microglia であった (図 1)

(2) 野生型マウスと比較して gp91 ノックアウトマウスでは頭部外傷後の損傷脳の面積、損傷後の TUNEL 陽性細胞の数ともに少なく、gp91 の制御が頭部外傷による脳損傷を抑制することが証明された (図 2)。

(3) 野生型マウスと比較して gp91 ノックアウトマウスでは主に microglia における O₂ 産生、8ohDG の発現が抑制されていた。(図 3)

(4) また、BV-2 ミクログリアを刺激した検討では classical activated microglia において gp91 が発現しており、gp91 を発現している microglia の主体は classical activated タイプであると考えられた。

(1) から (4) の結果より頭部外傷後の classical activated microglia によるフリーラジカル産生が頭部外傷による脳損傷を悪化させていることが証明された。今後、頭部外傷の新たな治療法として急性期における microglia の活性化の制御 microglia の分化誘導などが有効であることが示唆された。

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 2 件)

- ① Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Nakamura S, Shioda S, Aruga T. Novel free radical monitoring in patients with neurological emergency diseases. Acta Neurochir Suppl, 106, 315-319, 2010、査読有
- ② Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, Yofu S, Satoh K, Miyamoto K, Song D, Tsunawaki S, Shioda S, Aruga T. Gp91phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury. Journal of Neuro inflammation, 7, 41-52, 2010、査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 土肥 謙二・佐藤 和恵・養父 佐知子・中町 智哉・森川 健太郎・三原 結子・塩田 清二・有賀 徹、脳損傷における gp91phox/NOX の発現とその機能、第 31 回日本神経外傷学会、2008、大阪
- ② 土肥 謙二・佐藤 和恵・中町 智哉・養父 佐知子・森川 健太郎・塩田 清二・有賀 徹、頭部外傷における gp91phox の動態と機能について、第 61 回日本酸化ストレス学会、2008、京都
- ③ 土肥謙二、実験的頭部外傷におけるスー

パーオキシドラジカル産生における gp91phox の起動と役割、第 67 回日本脳神経外科学会、2008、盛岡

- ④ 土肥謙二 (昭和大学 医学部救急医学講座)、大滝博和、佐藤和恵、中町智哉、養父佐知子、宋丹丹、村上朋恵、宮本和幸、塩田清二、有賀徹、頭部外傷後の cytotoxic microglia における gp91phox の発現と役割、第 115 回日本解剖学会総会、2010、盛岡
- ⑤ Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Nakamura S, Shioda S, Aruga T. Novel free radical monitoring in patients with neurological emergency diseases. Oxygen Club California 2010, 2010, Santa Barbara, USA
- ⑥ Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Nakamura S, Shioda S, Aruga T. Novel free radical monitoring in patients with neurological emergency diseases. 10th INTERNATIONAL CONGRESS OF NEUROIMMUNOLOGY 2010, 2010, Barcelona, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土肥謙二 (DOHI KENJI)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号：20301509

(2) 研究分担者

有賀 徹 (ARUGA TOHRU)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：40266086
塩田清二 (SHIODA SEIJI)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：80102375
森川健太郎 (MORIKAWA KENTAROU)
昭和大学・医学部・助教
研究者番号：20317720
養父佐知子 (YOFU SACHIKO)
昭和大学・医学部・普通研究性
研究者番号：00398695