

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590628

研究課題名（和文） 脳外傷の病変発生・拡大におけるコネクシン・カルパインの関与に関する研究

研究課題名（英文） Connexin-43 based hemi-channel contributes to the propagation of μ -calpain mediated neuronal death in rat brain cortex

研究代表者

原田 一樹 (HARADA KAZUKI)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：00253146

研究成果の概要（和文）：私達は、ラットの大脳皮質挫傷モデルを用いて、脳外傷に続発する皮質深層の神経細胞死の伝播に、反応性アストロサイト上に誘導されたコネクシン 43-ヘミチャンネルの開口を通じたグルタミン酸、ATP 等の放出の結果、神経細胞のグルタミン受容体やカルシウム・チャンネルを介したカルシウムの取込みから、カルシウム依存性蛋白質分解酵素である μ -カルパインが活性化され、神経細胞死が惹起されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We examined the contribution of GJ or HC on astrocytes or neurons to TBI spreading in a stab wound model in the rat cortex, and we demonstrated the importance of Cx43-based HC in the spread of μ -calpain-dependent neuronal death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	6,500,000	1,950,000	8,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：神経細胞死、皮質層状壊死、ヘミチャンネル、アストログリア、カルパイン、コネクシン 43

1. 研究開始当初の背景

脳外傷は、法医解剖上、最も重要な死因の一つであるが、外傷による病変の生成・拡大の機序に関する研究は、虚血やグルタミン酸

に関する研究と較べると極めて少なく、従来は、組織診断及び受傷時期推定のため、神経細胞・グリア細胞等の細胞死や病理学的変化に関する研究が多かった。

頭部外傷は、脳腫脹に伴い虚血性病変を惹起するため、外傷性・虚血性病変の鑑別が問題となることがある。急性脳外傷に伴い、反応性アストロサイトと神経細胞死シグナルが伝播することが知られている一方、Connexins から構成される gap junctions (GJs) または hemichannels (HCs) を介してアストロサイトとニューロンの相互作用によって脳外傷が伝播すると考えられている。また、神経細胞死は、神経細胞のカルシウム過負荷によって活性化したカルシウム依存性プロテアーゼである calpain が実行すると考えられている。しかし、これらの関連性を生体で示した報告はない。

本研究では、法医学分野で最も重要な、脳外傷の診断、虚血との鑑別診断に、従来、法医学領域では試みられることの稀であった動物外傷モデルを用いて挑戦する。申請者及び当該研究室では、calpain、connexin (Cx) family、そして、細胞内情報伝達系酵素が心筋・神経細胞の虚血再灌流による障害や細胞死に寄与するメカニズムについて、独自の実績が積み上げられてきた。本研究では、これらの実績を基盤として、脳外傷の進展に calpain、connexin、細胞内情報伝達系酵素がどのように関与するかを明らかにする。

2. 研究の目的

Gap junction (GJ) は細胞の物質伝達を通じて生存・協調的運動に寄与する一方、障害や細胞死を伝播しうる。GJ を構成する connexin (Cx) 蛋白質は、虚血等の病態下に脱リン酸化、分解され、その結果、GJ 機能が修飾され、病変の拡大が促進または抑制されると考えられる。グリア細胞は、神経細胞と一部、GJ に依存して、保護・障害に寄与している。

カルシウム依存性プロテアーゼ calpain は、細胞骨格蛋白である微小管結合タンパク-2 (MAP-2) やフォドリンの分解を介して、虚血再灌流時、心筋・神経細胞の障害・細胞死に寄与する。本研究では、脳の局所外傷の病変拡大に Cx、calpain の変化が寄与しているか否かを解明し、その分子機構を検討する。そして、免疫組織法を用いた脳外傷組織診断法、虚血性病変との鑑別法の開発に活かす。

3. 研究の方法

SD ラット脳の両側頭頂葉皮質にメスで一定大、深さの挫傷を作成し、HC 活性を ethidium bromide (EtBR) 蛍光で、細胞死を propidium Iodide (PI) 蛍光の拡がりで見観察した。神経細胞、アストロサイト、ミクログリアを特異的マーカーで識別し、二重蛍光法により、HC 開口細胞、細胞死を同定した。また、GFAP と活性型 μ -calpain 抗体により、western blot 法により蛋白発現を、二重蛍光法により HC 開口、細胞死との関連性を観察した。Cx43 により構成される HC の阻害剤 Gap26、及び一般的な HC 阻害剤 La^{3+} を用いて、HC 開口、アストロサイト活性化、 μ -calpain 活性化、細胞死への寄与を観察した。

4. 研究成果

急性脳外傷は、Connexin (Cx) により構成される gap junction (GJ) や hemichannels (HC) を通じてアストログリア反応と神経細胞死が伝播されると考えられているが、分子機構には未解明の部分が多かった。

そこで我々はメスを使って、ラットの皮質表層に4×4 mm大の挫傷を作成し、経時的に組

織採取凍結後、生化学的分析を行い、またホルマリン固定後組織標本を作成して検討した。

PI陽性細胞は、皮質V・VI層の神経細胞特異的マーカーneuron-specific Enolase (NSE)陽性細胞及び少数の大型parvalbumin陽性細胞に水平方向に伝播したことから、皮質深層の神経細胞が特異的に細胞死に陥ることが示された。一方、GJ・HCの伝導を示すethidium bromide (EtBR)は、皮質全般により早く拡大し、活性化アストログリア細胞に特異的なマーカーglial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性細胞に伝播したことから、活性化アストログリア間のGJ・HCの伝導が促進されることがわかった。

さらに、神経細胞死において重要な役割を果たす活性化 μ -calpainの活性化は、propidium iodide (PI) 蛍光陽性神経細胞に共発現し、時間とともに伝播した。Cx43により構成されるHCの阻害剤Gap26、及び一般的なHC阻害剤La³⁺は、PI・EtBrの伝播、及びwestern blot分析によるGFAPと活性化型 μ -calpainの増加、 μ -calpainの基質である α -fodrinの分解を抑制した。

以上より、急性脳外傷において活性化されたアストログリア間のGJ伝導促進を介してカルシウムシグナルが伝播する結果、皮質深層の神経細胞、parvalbumin陽性GABA作動性抑制神経細胞内でカルシウム依存性蛋白質分解酵素 μ -calpainが活性化され、神経細胞死が惹起されることが証明された。脳虚血に見られる層状壊死と類似した皮質細胞死伝播現象の分子機構を外傷モデルで解明した点が有意義である。なお、実験結果の一部は、平成23年度日本法医学会総会において、大学院生により発表され、優秀ポスター賞を受賞した。

実験研究の成果は、法医病理学的診断のみでなく、脳外傷の進展のメカニズムの解明、脳外傷の治療、そして外傷病変及び二次性

(虚血性)病変の鑑別、外傷後経過時間推定に利用できる可能性がある。当該研究のもととなる知見は、スライス培養等の実験より得られた。特にCxが構成するGJが病変進展に寄与することを示す研究は極めて少なく、生体外傷モデルでの知見は、極めて新規で重要である。研究代表者及び研究分担の所属する教室では、脳外傷事例の司法解剖を数多く解剖している。今後、研究が進展した段階で、再度倫理委員会に申請し、実際の脳外傷、二次性病変で研究の結果を検証しつつ、免疫組織法を用いて法医病理学への実務応用を目指したいと考えている。

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)

[学会発表] (計1件)

- ① 石井康博、新谷香、原田一樹、吉田謙一、
Gap Junction blocker reduces spreading of traumatic brain injury in rat. 第95次日本法医学会学術全国集会、平成23年6月17日、福島県福島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 一樹 (HARADA KAZUKI)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号：00253146

(2) 研究分担者

吉田 謙一 (YOSHIDA KEN-ICHI)

東京大学・医学（系）研究科（研究院）・
教授
研究者番号：40166947