

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590869

研究課題名(和文) 頭部外傷による呼吸及び循環中枢の神経細胞障害の解析及び法医病理学的診断への応用

研究課題名(英文) Immunohistochemical studies on neuronal injuries in the brain stem of traumatic head injury cases

研究代表者

北村 修 (KITAMURA, Osamu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70266609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、カルパイン及びカスパーゼ-3により分解された各種スペクトリン分解産物に対する抗体、他の細胞骨格蛋白質及びグリア細胞のマーカーに対する抗体を用いて、免疫組織化学的染色及び蛍光抗体法により脳幹部における神経細胞障害を解析した。この研究より、スペクトリン分解産物陽性像は神経細胞に特異的であることが明らかとなった。さらに、HE染色やKB染色で形態学的変化が出現しない神経細胞においてもスペクトリン分解産物の免疫染色陽性像が観察された。したがって、この研究の成果は、法医剖検例における頭部外傷の病態を評価する上で重要な情報を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we used four types of antibodies, which were produced from calpain and caspase-3, to spectrin breakdown products (SBDP), and antibodies to the markers of other cytoskeletal proteins and glial cells, to examine neuropathy in the brain stem by immunohistochemical staining and the fluorescent antibody technique. Our results revealed that positive findings of SBDP are neuron specific. Furthermore, positive immunostaining findings of SBDP were observed even in neurons in which morphological changes were not revealed by hematoxylin and eosin (HE) or Kluver-Barrera (KB) staining. Thus, the results of the present study is believed to provide important information that is useful in evaluating the condition of head trauma in forensic autopsy subjects.

研究分野：法医学

キーワード：頭部外傷 スペクトリン分解産物 カルパイン カスパーゼ 免疫組織化学的染色

## 1. 研究開始当初の背景

脳幹部には、呼吸及び循環中枢があり、生命の維持に重要である。特に延髄には、吻側延髄腹外側 (rostral ventrolateral medulla: RVLm)をはじめ、迷走神経核、孤束核及び外側巨細胞性傍核等があり、呼吸及び循環の調節を行っている。したがって、頭部外傷による脳幹部への直接の損傷、または脳ヘルニア等による脳幹圧迫において致命的である。しかし、脳幹部への肉眼的損傷を認めない症例では、神経細胞障害を形態学的変化の評価は容易ではなく、呼吸及び循環中枢の神経細胞障害による呼吸または循環機能不全を法医病理学的に診断することは困難である。

神経細胞障害の指標として、免疫組織化学的染色 (IHC) 等による神経細胞骨格蛋白質やグリア細胞の反応などが用いられている。例えば、頭部外傷における微小管関連蛋白質 2 (MAP2) 及び tau 等の神経細胞骨格蛋白質の分解に関する解析が行われている。このような神経細胞骨格蛋白質分解は主に、細胞内カルシウムイオン上昇により活性化するカルシウム依存性タンパク分解酵素のカルパイン (calpain) とアポトーシスに関与するカスパーゼ-3 (caspase-3) が関与していると考えられ、いずれも神経細胞死の経路として重要である。

近年、神経細胞の細胞体及び軸索にある細胞骨格蛋白質である  $\alpha$ II-spectrin は、calpain により 120kD のスペクトリン分解産物 (spectrin breakdown products 120; SBDP120) と 150kD の分解産物 (SBDP150) が生成され、caspase-3 では 145kD 及び 150kD の分解産物 (SBDP145、SBDP150i; 前記の SBDP150 とは異なった構造) が生成されることが明らかとなり (図 1)、どちらの経路による障害かを判別する指標として注目されている (Zhang Z et al., Apoptosis 14:1289-99, 2009)。臨床研究では、脳脊髄液における SBDP 測定による頭部外傷の診断が試みられているが (Mondello S et al., J. Neurotrauma. 27: 1203-13, 2010)、脳幹部を含めヒトの剖検脳を用いた

SBDP の IHC 及び蛍光抗体法 (IF) による研究は、国内・国外共に報告されていない。

## 2. 研究の目的

この研究では、SBDP を指標として、種々の頭部外傷の法医剖検例における脳幹部の呼吸及び循環中枢における神経細胞障害のメカニズムを解析する。さらに、形態学的変化に先行する細胞障害を観察することで、頭部外傷における脳幹部の神経細胞障害による呼吸及び循環機能低下を診断することで、頭部外傷における死因の法医病理学的診断の向上に寄与することを目指す。具体的な目的は以下の通りである

(1) SBDP 出現は、神経細胞障害の早期のマーカーとして有用であること。

(2) 呼吸及び循環中枢における SBDP 出現は、その他の細胞骨格蛋白質の分解及びグリア細胞の反応と関連しており、神経細胞障害のメカニズムを解析する指標となること。

(3) 頭部外傷における神経細胞障害の解析による呼吸及び循環不全の法医病理学的診断の向上。

## 3. 研究の方法

この研究では、1) calpain 及び caspase-3 による各種 II-spectrin の分解産物 (SBDP) に対する抗体を作製し、2) 上記抗体に加え、他の細胞骨格蛋白質及びグリア細胞のマーカーに対する抗体を用いて、免疫組織化学的染色、免疫蛍光抗体法により、脳幹部 (呼吸・循環中枢) を観察する。以上の研究より得られたデータより、頭部外傷における脳幹部の神経細胞障害に関与するメカニズムを解析する。さらに頭部外傷例における呼吸・循環中枢障害の法医病理学的診断への有用性について検討する。

(1) calpain による SBDP120、SBDP150、SBDP145 及び SBDP150i に対するポリクローナル抗体作製

SBDP120 及び SBDP150 の N 末端部領域の 5 個のアミノ酸 (SBDP120: NH<sub>2</sub>-SVEAL、SBDP150: NH<sub>2</sub>-GMMPR) からなるペプチドを合成し、さらに SBDP145 及び SBDP150i の N 末端部領域の 5 個のアミノ酸 (SBDP145: NH<sub>2</sub>-SAHEV、SBDP150i :

NH2-SKTES) からなるペプチドを合成し、C 末端にシステインを介した上で、Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を結合させ、それぞれを 2 匹のウサギに免疫して、3 ヶ月後に血清を採取後に、精製する。

#### (2) 頭部外傷例の分類、脳組織の採取

12 例の頭部外傷症例について、脳挫傷、頭蓋内出血、脳浮腫や脳ヘルニアの合併の有無、生存時間等により分類した。年齢及び性別がマッチさせた 15 症例を、コントロール群とする。

#### (3) 病理組織学的検査（及び免疫組織化学的染色（IHC））

ホルマリン固定された脳より、脳幹部（呼吸及び循環中枢を含んだ延髄など）さらに脳挫傷、壊死部及び出血部を切り出し、パラフィン包埋ブロックを作製する。脳幹部については、呼吸及び循環中枢である神経核が入るように切り出す。

厚さ 6 mm の組織切片を作製し、HE 染色、髄鞘染色（KB 染色）を行う。

IHC では、一次抗体として、SBDP120、SBPD150 に対する抗体を反応させ、その後二次抗体との反応及び発色を行う。また、神経細胞での局在を観察するために、それぞれの SBDP と neuron-specific enolase (NSE：神経細胞のマーカー) との二重染色を行う。染色像は、NanoZoomer Digital Pathology(浜松フォトニクス)によりデジタル画像として取り込む。

#### (4) 蛍光抗体法（IF）

IFにおいては、Vibratome（現有機器）により厚さ20mmの組織切片を作製し、SBDP120、SBPD145、NSE、MAP2及びtau、さらにアストロサイトのマーカーであるGFAP及びミクログリアのマーカーであるhGLUTに対する一次抗体を反応させる。蛍光標識された二次抗体と反応後、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 LSM710（カールツァイス）によりデジタル画像として取り込む。また、上記の抗体を組み合わせ、多重染色を行う。

#### (5) 画像解析

前記 IHC 及び IF により取り込んだ画像は、染色の強度、陽性細胞数、多重染色像等を Image-Pro Plus により解析を行う。蛍光発色を示す神経細胞数及び軸索の面積、グリア細胞数を、それぞれの神経核について計測し、ソフトウェア Image-Pro Plus により統計的解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) ポリクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体の作製については、SBDP120に対する抗体では120kDのバンド、SBPD145に対する抗体では、145kDのバンドと特異的な反応を認めた。したがって、calpain 及びcaspase-3による神経細胞障害を識別することができることが確認された。さらに、SBPD145及びSBPD150iに対するポリクローナル抗体については、それぞれ145kD及び150kDのバンドとの特異的な反応を認めた。

#### (2) 頭部外傷例の脳幹部における SBDP120 及び SBPD145 の発現

作製した SBDP120 及び SBPD145 に対するモノクローナル抗体について IHC を行ったところ、頭部外傷群では、陽性像を認める症例があった。そこで、これらの陽性像の局在について、IF による GFAP との二重染色によりアストロサイトにおける陽性像について観察したが、ほとんど認められなかった。一方、NSE との IF による二重染色では、神経細胞における陽性像が観察された。また、いずれかの SBPD について陽性像を認めた症例の HE 染色及び KB 染色像では、虚血性変化等の形態学的変化が明らかではない神経細胞が認められた。以上のことから、SBDP120 及び SBPD145 の発現は神経細胞に局限することが明らかとなり、形態学的変化に先行して発現することから、神経細胞障害を早期に検出できることが示唆された。。

#### (3) 頭部外傷例の脳幹部における SBDP145 及び SBPD150i の発現

作製した SBDP145 及び SBPD150i に対するモノクローナル抗体について IHC を行った

ところ、頭部外傷群では、神経核において陽性像を認められたが、虚血性変化等の形態学的変化が明らかではない神経細胞が認められた症例があった。そこで、これらの陽性像の局在について、IFによるGFAPまたはNSEとの二重染色を行ったが、アストロサイトにおける陽性像は、ほとんど認められなかった。しかし、神経細胞における陽性像が観察された。以上のことから、SBDP145及びSBPD150iの発現は神経細胞に限局することが明らかとなった。

#### (4) 頭部外傷例の脳挫傷、壊死部におけるSBDPの発現

作製したSBDP120、SBPD145、SBDP145及びSBPD50iに対するモノクローナル抗体についてIHCを行ったところ、脳挫傷や壊死部では、神経細胞において陽性像を認められたが、HE染色及びKB染色による形態学的変化が明らかではない神経細胞が認められた症例があった。しかし、神経細胞の形態学的変化が高度な領域では、むしろSBDP陽性像は減少していた。SBDP陽性像の局在について、IFによるGFAPまたはNSEとの二重染色を行ったが、アストロサイトにおける陽性像は、ほとんど認められなかった。しかし、神経細胞における陽性像が観察された。以上のことから、SBDP145及びSBPD150iの発現は神経細胞に限局することが明らかとなった。したがって、免疫組織化学的染色によりSBDP120、SBPD145、SBDP145及びSBPD50iを染色することは、形態学的変化は出現しないものの、すでに障害を受けていること示唆していると考えられ、早期の神経細胞障害の検出に有用であると考えられる。

以上のことから、この研究の成果は、法医学剖検例における頭部外傷の病態、特に呼吸及び循環を調節する脳幹部の障害を評価する上で重要な情報を与えるものと考えられる。

#### 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)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北村 修 (KITAMURA, Osamu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70266609

##### (2) 研究分担者

王 璐 (OH, Ro)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60555051

武市 敏明 (TAKEICHI, Toshiaki)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：90460360