

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462174

研究課題名(和文)慢性硬膜下血腫被膜の自然退縮におけるapoptosisの役割

研究課題名(英文)Role of apoptosis in the spontaneous disappearance of chronic subdural hematoma

研究代表者

大須賀 浩二(Osuka, Koji)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40378013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回、caspaseシグナル伝達系の血腫被膜内での発現について検討したので報告する。

穿頭血腫除去術を施行した8症例を対象とした。採取した血腫被膜を用いてWestern blotを施行した結果、caspase-3, 7, 8, 9, PARP, DFF45, RIP, TRADD, FADD, Fasの発現は8症例すべてにおいて確認できた。また免疫組織染色では、PARP, caspase-3ならびにcleaved caspase-3は血管内皮とfibroblastに発現していた。慢性硬膜下血腫の治癒においてapoptosisが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are several cases of spontaneous resolution of chronic subdural hematoma (CSDH) outer membranes, including in trabecular CSDH, after trepanation surgery. In this study, we examined the expression of molecules involved in caspase signaling in CSDH outer membranes. Eight patients whose outer membranes were successfully obtained during trepanation surgery were included in this study. The expression of Fas; Fas-associated death domain (FADD); tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD); receptor-interacting protein (RIP); caspases 3, 7, 8 and 9; poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP); DNA fragmentation factor 45 (DFF45) and actin was confirmed by Western blot analysis. The expression of PARP, caspase-3 and cleaved caspase-3 were also detected in endothelial cells and fibroblasts by immunohistochemistry. These data suggest that apoptosis plays an important role in the spontaneous resolution of CSDH.

研究分野：脳神経外科

キーワード：慢性硬膜下血腫 apoptosis

1. 研究開始当初の背景

慢性硬膜下血腫は、軽微な頭部外傷後に高齢者において発生する疾患であり、徐々に進行する片麻痺や認知症状などが出現し高齢者の ADL 低下の原因の一因ともなっている。慢性硬膜下血腫は血管新生をともなう炎症性疾患である。慢性硬膜下血腫内において vascular endothelial growth factor (VEGF) が血清と比較し高値であることはすでに報告されており、私たちは今までにこの VEGF により mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt や nuclear factor κ B (NF κ B) が血管内皮において活性化され、これらが血管新生に深く関与していることを報告してきた。また、炎症性サイトカインである interleukin-6 (IL-6) も血清と比較し血腫内で高値であり、Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) シグナル伝達系を血管内皮ならびに fibroblast において活性化し、血腫の増大に関与していることを報告してきた。このように慢性硬膜下血腫の増大メカニズムの様々な報告はされているが、自然治癒に至る機序に関しては未だ報告されてきていない。

2. 研究の目的

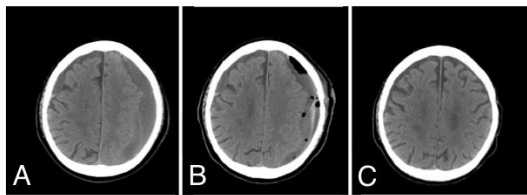


Fig. 1

(A) Computerized tomography scans demonstrating a chronic subdural hematoma (CSDH) separated by septal membranes. (B) After trepanation surgery, sufficient irrigation was performed, but the septum remained within the CSDH cavity. (C) The septum within the CSDH cavity and the CSDH itself spontaneously disappeared three months after surgery.

Fig. 1 に示すような多房性の慢性硬膜下血腫であっても術後自然と治癒に至る症例も経験するところである。また、慢性硬膜下血腫となったが自然と治癒に向かう症例も少なからず存在する。

apoptosis は個々の器官のホメオスタシスを保つためには必要なプログラム細胞死とされる。今回、apoptosis の血腫被膜内での発現について検討し、自然治癒に関与しているのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

穿頭血腫除去術にて採取した血腫 8 症例 (男性 6 名、女性 2 名、59~79 歳の平均年齢 68 歳) を対象とした。採取した血腫被膜は脱リン酸化酵素阻害剤入りの homogenizing buffer にて攪拌遠心後の上清を用いて蛋白濃度を測定した。Western blot にて poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9, DNA fragmentation factor 45 (DFF45), receptor-interacting protein (RIP), Tumor necrosis factor receptor type 1 (TNFR1)-associated death domain (TRADD), Fas-associated protein with death domain (FADD), Fas ならびに β -actin の蛋白の発現について検討した。また、血腫被膜における、caspase-3、cleaved caspase-3 ならびに PARP の発現につき免疫組織学的にも検討を加えた。

4. 研究成果

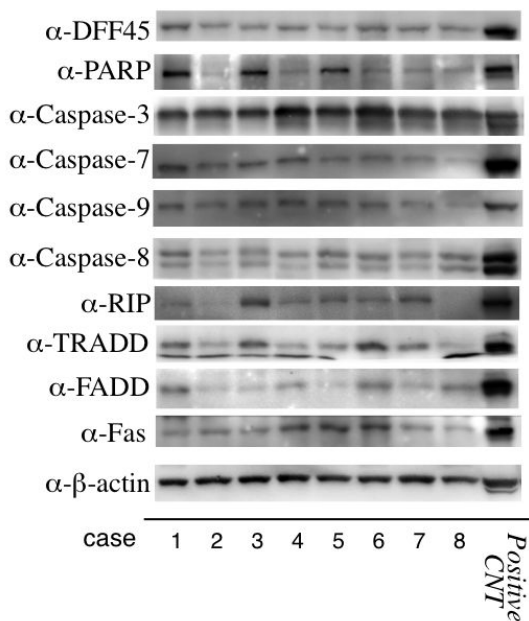
慢性硬膜下被膜を用いた Western blot の結果では、 β -actin はほぼ均一であり、ほぼ同容量の蛋白質で検討された。

また、慢性硬膜下被膜において、DFF45, PARP, caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9, RIP, TRADD, FADD, Fas の発現を 8 症例すべてにおいて確認できた (Fig. 2)。

以上のことから、慢性硬膜下血腫被膜において、caspase シグナル伝達系に係る蛋白

の発現が確認でき、自然治癒において apoptosis の関与が示唆された。

Fig. 2



Western blotting showing protein expression patterns in the outer membranes of chronic subdural hematomas from eight patients. The membranes were homogenized in homogenization buffer and subjected to Western blotting with anti-Fas (α -Fas); anti-Fas-associated death domain (α -FADD); anti-tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain (α -TRADD); anti-receptor-interacting protein (α -RIP); anti-caspase-3, 8, 9 and 7 (α -Caspase-3, 8, 9, and 7); anti-poly-(ADP-ribose) polymerase (α -PARP); anti-DNA fragmentation factor 45 (α -DFF45) and anti- β -actin (α - β -actin) antibodies. Notably, all molecules involved in the caspase signaling pathway were detected in nearly all cases. Positive CNT: positive control using Jurkat cells.

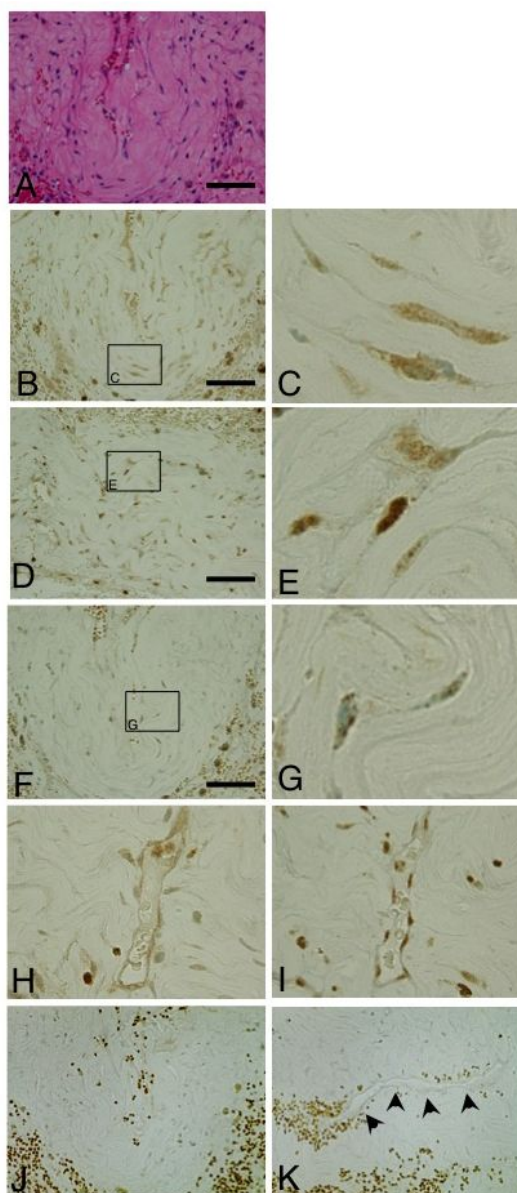
一方、慢性硬膜下血腫被膜の fibroblast において caspase-3 (Fig. 3 B and C)、PARP (Fig. 3 D and E) ならびに cleaved caspase-3 (Fig. 3 F and G) が発現していた。血管内皮においても

caspase-3 (Fig. 3H)ならびに PARP (Fig. 3I)の発現を認めた。

免疫染色の結果からは、慢性硬膜下血腫被膜の fibroblast ならびに血管内皮において血腫の自然治癒過程において apoptosis が起こっている可能性が強く示唆された。

今後の課題としては、術後のどのような要因からこの caspase シグナル伝達系が活性化してくるのか更なる検討が必要である。

Fig. 3



H&E staining demonstrating the presence of fibroblasts, collagenous fibers, inflammatory cells and vessels (A). Ten-micrometer slices were immunostained with polyclonal antibodies against

caspase-3 (B, C and H), poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP, D, E and I) and cleaved caspase-3 (F and G) using the ABC method. The areas within the rectangle, labeled in B, D and F, are shown at higher magnification in panels C, E and G, respectively. Note that caspase-3 is expressed in the cytoplasm of fibroblasts and endothelial cells (C and H, respectively), whereas PARP is expressed in the nuclei of these cells (E and I, respectively). Some fibroblasts showed especially high expression of cleaved caspase-3 in their nuclei (G). Immunostaining without primary antibodies is presented in fibroblasts and endothelial cells (J and K *arrowheads*, respectively). Scale bars = 50 μm (A, B, D, F and J).

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 1 件)

Koji Osuka, Yasuo Watanabe, Nobuteru Usuda, Masahiro Aoyama, Kenichiro Iwami, Mikinobu Takeuchi, Takeya Watabe, Masakazu Takayasu, Expression of Caspase Signaling Components in the Outer Membranes of Chronic Subdural Hematomas

J Neurotrauma 査読有 34: 3192-3197 2017

DOI : 10.1089/neu.2017.5051.

[学会発表] (計 3 件)

1. 大須賀浩二 他 慢性硬膜下血腫被膜における apoptosis の発現 第 75 回日本脳神経外科学会総会 2017

2. 大須賀浩二 他 慢性硬膜下血腫被膜における caspase シグナル伝達系の発現 第 40 回日本脳神経外傷学会 2017

3. Koji Osuka, Nobuteru Usuda, Mikinobu

Takeuchi, Masakazu Takayasu Expressions of Caspase Signaling Pathway in Chronic Subdural Hematoma Outer Membranes 85th AANS annual scientific meeting 2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大須賀 浩二 (OSUKA, Koji)

愛知医科大学・脳神経外科・教授

研究者番号 : 40378013

(2)研究分担者

高安 正和 (TAKAYASU, Masakazu)

愛知医科大学・脳神経外科・主任教授

研究者番号 : 60216794

(3) 研究分担者

渡邊 泰男 (WATANABE, Yasuo)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 10273228