

令和元年5月10日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09220

研究課題名(和文) 脳損傷による老化関連ベータガラクトシダーゼ発現の研究

研究課題名(英文) Senescence-associated-beta-galactosidase staining following traumatic brain injury

研究代表者

島田 亮 (Shimada, Ryo)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：10376725

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)：外傷性脳損傷後細胞老化すると仮説。損傷マウスの大脳皮質の損傷側に、老化関連酸性β-galは損傷後発現が有意に増加した。また、細胞周期マーカーCyclin D1とPCNAの発現は、神経細胞に損傷後4日目に有意に増加した。従って、外傷性脳損傷では脳細胞の細胞周期が一旦活性化されることが確認された。さらに、細胞周期を抑制して老化細胞で発現が増加するp16、p21とp53は脳損傷4日目以降に発現が有意に増加した。従って、外傷性脳損傷では細胞周期が一旦活性化された脳細胞の細胞周期がp16経路とp53-p21経路によって抑制されることが確認された。外傷性脳損傷では脳細胞に細胞老化が生じていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷はアポトーシスなどにより神経細胞死を生じる。一方、老化細胞が炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素などの分泌性タンパク質を発現し、生体に傷害をもたらす。老化細胞は老化細胞マーカーの発現と共に、一旦活性化された細胞周期の抑制を特徴としている。本研究では、外傷性脳損傷後に神経細胞死や炎症をきたす機序に細胞老化が関係していると分かった。細胞老化の抑制は神経細胞を保護する可能性が示唆された。また、老化関連酸性β-gal測定キットを用い、脳損傷を診断することができることと示唆され、法医学的及び病理学的診断に寄与できた。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify how the mRNA and protein expression of different markers of cell cycle and senescence are modulated and switched over time after TBI. We performed SA-β-gal staining and examined the time-dependent changes in expression levels of proteins and mRNA, related to cell cycle and cellular senescence markers, in the cerebrum during the initial 14 days after TBI using a mouse model of CCI. Within the area adjacent to the cerebral contusion after TBI, the protein and/or mRNA expression levels of cell cycle markers were increased significantly until 4 days after injury and senescence markers were significantly increased at 4, 7, and 14 days after injury. Our findings suggested that TBI initially activated the cell cycle in neurons, astrocytes, and microglia within the area adjacent to the hemispheric contusion in TBI, whereas after 4 days, such cells could undergo senescence in a cell-type-dependent manner.

研究分野：法医病理学

キーワード：細胞老化 老化関連酸性β-gal β-galactosidase Cyclin D1 PCNA p16 p21 p53

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医解剖では、脳損傷の剖検がしばしばあり、脳損傷診断では脳のマクロ、ミクロの所見に加えて、脳損傷後 β -APP タンパク発現が増加するため、抗 β -APP 抗体をバイオマーカーとして用い、免疫染色による診断を行うことがある (Yang, 2014)。しかし、ステップが多く、操作が煩雑で熟練を要する。脳損傷に関する簡便なマーカーがないかと考え、我々は老化細胞に注目した。

老化細胞は細胞周期の G1 期に DNA がダメージを受け、細胞増殖が停止することが知られている。これには細胞周期を阻害する cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16) あるいは、transformation-related protein 53 (p53) と下流の転写因子 cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) の発現が上昇し、その下流の CyclinE・CDK2、あるいは CyclinD・CDK4/6、さらに RB (retinoblastoma)、E2F、DP を阻害し、細胞増殖が G1 期に停止することが知られている。

2. 研究の目的

脳外傷による脳機能障害のメカニズムの解明は、法医学、病理学の実務上、また、脳損傷の治療上、非常に重要である。我々は予備実験で老化細胞のマーカー老化関連酸性ベータガラクトシダーゼ (senescence-associated β -galactosidase: SA- β -gal) を基質 X-gal で染色し、損傷群損傷側の脳皮質が特異的に染まることを実証した。よって SA- β -gal が脳損傷の診断マーカーとして有用と見込まれる。しかし、脳損傷がなぜ SA- β -gal を活性化するかは今までに研究報告がなく、そのメカニズムはわかっていない。我々は細胞老化経路にある遺伝子の発現を解析し、そのメカニズムを解明したい。得られたデータは法医学及び病理学診断や脳の機能回復と再生治療に寄与したい。

3. 研究の方法

全身麻酔したマウス (10~13 週齢) の左頭頂骨に直径 5mm の骨窓を開け、大脳皮質に損傷を作製した。骨窓形成だけのマウスを sham とし、未処置のマウスを control とした。受傷後 1、4、7、14 日 (各 n=5) に安楽死させ、脳の固定凍結切片を作成した。さらに、未固定試料脳から total RNA を抽出した。老化細胞のマーカーとして SA- β -gal の組織化学染色を行った。また、細胞マーカーの NeuN、GFAP 及び Iba-1、細胞周期マーカーの p16、p21、PCNA 及び cyclin D1 の免疫組織化学染色にて、タンパク発現解析を行った。さらに、細胞周期マーカーの p16、p21、p53、PCNA 及び cyclin D1 の realtime PCR 法による mRNA 発現解析を行った。

4. 研究成果

損傷マウスの大脳皮質の損傷側において、SA- β -gal は損傷後 4、7、14 日目に発現が有意に増加した (Fig 1)。

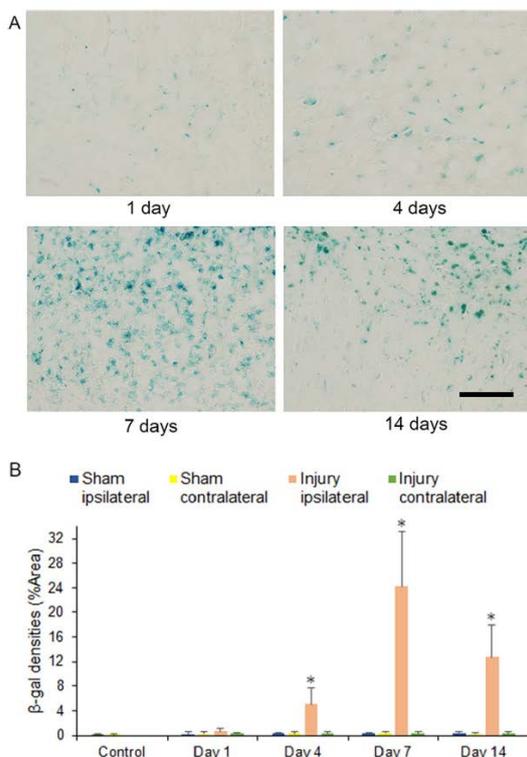


Fig 1. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining in the cerebrum 1 to 14 days after injury. (A) SA- β -gal-positive cells could be observed in the ipsilateral cerebrum at 1, 4, 7, and 14 days after injury in injury groups. Scale = 100 μ m. (B) Stained levels of SA- β -gal-positive cells, digitized for analysis by ImageJ software, in the ipsilateral side of the brain injury in the injury group at 4, 7, and 14 days after injury as compared to that in the corresponding area of the contralateral hemisphere of the injury group and the bilateral hemisphere of the sham and control groups (* $p < 0.05$, $n = 5$ for control group, $n = 5$ for the sham group, $n = 5$ for the injury group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673.g001>

また、細胞周期の G1 期から S 期に発現する CyclinD1 と PCNA は、神経細胞、アストロサイト及びマイクログリアに発現し、損傷後 4 日目に発現が有意に増加した。従って、外傷性脳損

傷では脳細胞の細胞周期が一旦活性化されることが確認された (Fig2, 3)。

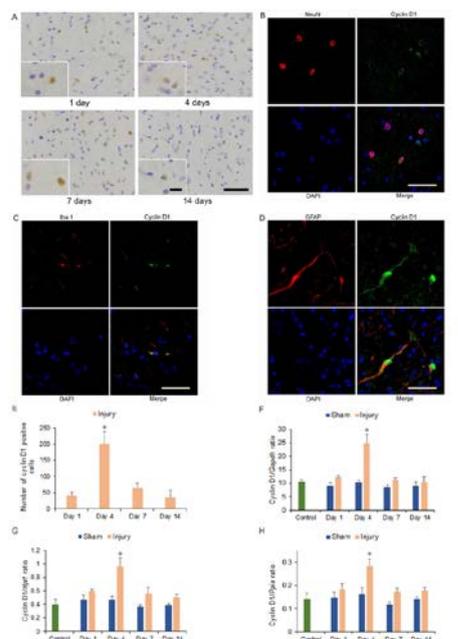


Fig. 2. Cytidine D1 immunohistochemistry and mRNA expression in the cerebral cortex 1 to 14 days after injury. (A) Cytidine D1 immunostained cells could be observed in the ipsilateral hemisphere at 1, 4, 7, and 14 days after injury in injury groups. Long scale = 50 μ m, short scale = 12.5 μ m. (B-F) Double immunohistochemistry of the ipsilateral hemisphere at 4 days after injury for co-localization of (B) CytD1, NeuN, DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), and merge; (C) CytD1, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1), DAPI, and merge; and (D) CytD1, glial fibrillary acidic protein (GFAP), DAPI, and merge. Scale = 30 μ m. (E) Graph of the numbers of CytD1 immunostained cells from (A). (F-H) CytD1 mRNA expression in the ipsilateral hemisphere 1 to 14 days after injury. Expression was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) (E), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) (G), and peptidylprolyl isomerase A (Ppia) (H) (* p < 0.05, n = 5 for control group, n = 5 for the sham group, n = 5 for the injury group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673.g002>

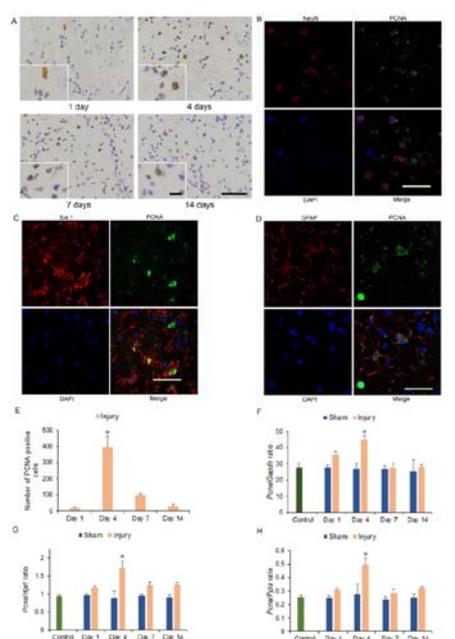


Fig. 3. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry and mRNA expression in the cerebral cortex 1 to 14 days after injury. (A) PCNA immunostained cells could be observed in the ipsilateral hemisphere at 1, 4, 7, and 14 days after injury in injury groups. Long scale = 50 μ m, short scale = 12.5 μ m. (B-D) Double immunohistochemistry of the ipsilateral hemisphere at 4 days after injury for co-localization of (B) PCNA, NeuN, DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), and merge; (C) PCNA, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1), DAPI, and merge; and (D) PCNA, glial fibrillary acidic protein (GFAP), DAPI, and merge. Scale = 30 μ m. (E) Graph of the numbers of PCNA immunostained cells in (A). (F-H) PCNA mRNA expression in the ipsilateral hemisphere 1 to 14 days after injury. Four mRNA expressions were normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) (F), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) (G), and peptidylprolyl isomerase A (Ppia) (H) (* p < 0.05, n = 5 for control group, n = 5 for the sham group, n = 5 for the injury group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673.g003>

さらに、細胞周期を抑制して老化細胞で発現が増加する p16 (Fig4)、細胞周期を抑制して細胞老化の誘導に関与する p21 (Fig 5) と p53 (Fig6)は何れも脳損傷後 4、7、14 日目に発現が有意に増加した。従って、外傷性脳損傷では細胞周期が一旦活性化された脳細胞の細胞周期が p16 経路と p53-p21 経路によって抑制されることが確認された。外傷性脳損傷では脳細胞に細胞老化が生じていると考えられ、細胞老化の抑制は神経細胞を保護する可能性が示唆された。

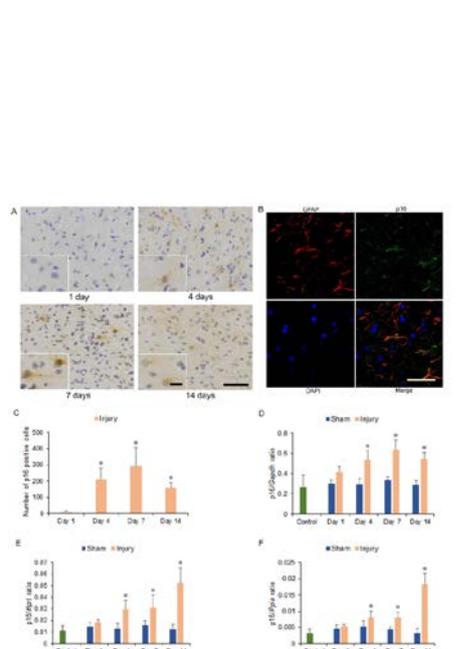


Fig. 4. Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16) immunohistochemistry and mRNA expression in the cerebral cortex 1 to 14 days after injury. (A) p16 immunostained cells could be observed in the ipsilateral hemisphere at 1, 4, 7, and 14 days after injury in injury groups. Long scale = 50 μ m, short scale = 12.5 μ m. (B-D) Double immunohistochemistry of the ipsilateral hemisphere at 7 days after injury for co-localization of (B) p16, NeuN, DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), and merge; (C) p16, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1), DAPI, and merge; and (D) p16, glial fibrillary acidic protein (GFAP), DAPI, and merge. Scale = 30 μ m. (E) Graph of the numbers of p16 immunostained cells in the ipsilateral hemisphere in (A). (F-H) p16 mRNA expression in the ipsilateral hemisphere 1 to 14 days after injury. p16 mRNA expressions were normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) (F), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) (G), and peptidylprolyl isomerase A (Ppia) (H) (* p < 0.05, n = 5 for control group, n = 5 for the sham group, n = 5 for the injury group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673.g004>

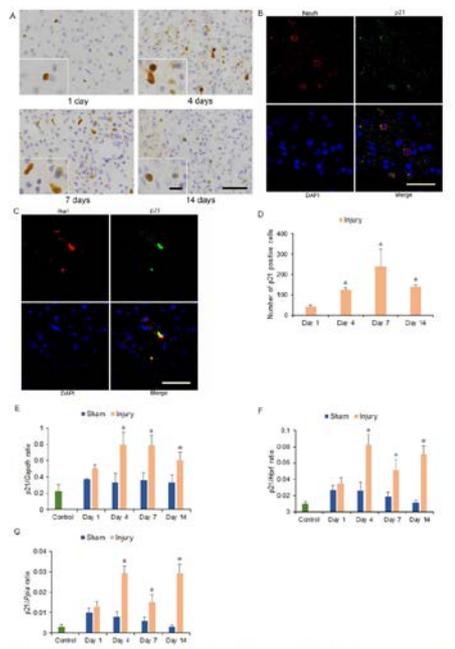


Fig. 5. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) immunohistochemistry and mRNA expression in the cerebral cortex 1 to 14 days after injury. (A) p21 immunostained cells could be observed in the ipsilateral hemisphere at 1, 4, 7, and 14 days after injury in injury groups. Long scale = 50 μ m, short scale = 12.5 μ m. (B-D) Double immunohistochemistry of the ipsilateral hemisphere at 7 days after injury for co-localization of (B) p21, NeuN, DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), and merge; (C) p21, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1), DAPI, and merge; and (D) p21, glial fibrillary acidic protein (GFAP), DAPI, and merge. Scale = 30 μ m. (E) Graph of the numbers of p21 immunostained cells in the ipsilateral hemisphere in the injury group at 1 to 14 days after injury in (A). (F-H) p21 mRNA expressions in the ipsilateral hemisphere 1 to 14 days after injury. p21 mRNA expressions were normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) (F), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) (G), and peptidylprolyl isomerase A (Ppia) (H) (* p < 0.05, n = 5 for control group, n = 5 for the sham group, n = 5 for the injury group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673.g005>

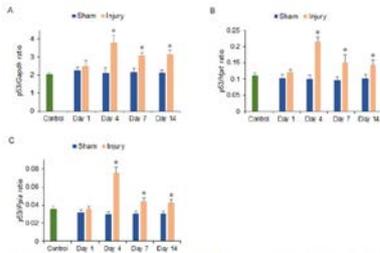


Fig. 6. mRNA expression of the transformation related protein 53 (p53) in the ipsilateral hemisphere 1 to 14 days after injury. p53 mRNA expressions were normalized to that of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) (A), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Pprt1*) (B) and p16^{INK4} (C) (**p* < 0.05, *n* = 5 for control group, *n* = 5 for the sham group, *n* = 5 for the injury group).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673.g006>

また、老化関連酸性ベータガラクトシダーゼ測定キットを用い、脳損傷を診断することができると示唆され、法医学的及び病理学的診断に寄与できた。

<引用文献>

① Tominaga T, Shimada R (corresponding author), Okada Y, Kawamata T, Kibayashi K. Senescence-associated-β-galactosidase staining following traumatic brain injury in the mouse cerebrum. PLoS ONE 14(3): e0213673, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673>, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Tominaga T, Shimada R (corresponding author), Okada Y, Kawamata T, Kibayashi K. Senescence-associated-β-galactosidase staining following traumatic brain injury in the mouse cerebrum. PLoS ONE 14(3): e0213673, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213673>, 2019. 査読あり

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 島田 亮、木林和彦。マウス外傷性脳損傷における細胞老化 Cellular senescence following traumatic brain injury in the mouse cerebrum (1P-0523) 第 41 回日本分子生物学会年会。2018/11/28 横浜。
- ② 島田 亮、木林和彦。マウスモデルを用いた外傷性脳損傷での脳内細胞老化の研究。第 87 回日本法医学会学術関東地方集会、講演要旨集 18 頁。2018/10/6 東京。
- ③ 島田 亮、多々良有紀、木林和彦。マウスモデルを用いた外傷性脳損傷での脳内細胞老化マーカーの発現解析。第 12 回臨床ストレス応答学会大会。抄録集 36 頁。2017/11/5 東京。
- ④ 島田 亮、多々良有紀、木林和彦。外傷性脳損傷における細胞老化のマーカーの発現。第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。講演プログラム・予稿集 63 頁。2017/9/23 愛媛。
- ⑤ 島田 亮、木林和彦。外傷性脳損傷が受傷後に増悪する機序の解析。第 101 次日本法医学会学術全国集会。日本法医学雑誌 71 巻 1 号 59 頁。2017/6/9 岐阜。
- ⑥ 島田 亮、多々良有紀、木林和彦。頭部外傷後の脳内 β-ガラクトシダーゼ発現の経時的変化。第 85 回日本法医学会学術関東地方集会、日本法医学雑誌 71 巻 2 号 123 頁。2016/10/26 横須賀。
- ⑦ 島田 亮、木林和彦。頭部外傷後の脳内老化関連酸性 β-ガラクトシダーゼ発現の観察。第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。講演プログラム・予稿集 71 頁。2016/9/3 東京。

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者：なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。