

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5月31日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390141

研究課題名（和文） 脳虚血モデル神経細胞を用いた脳内病態解析の法医学的展開

研究課題名（英文） Forensic development of neuropathological analyses for cerebrovascular diseases using ischemia model neuron

研究代表者

狸々 英紀（SHOJO HIDEKI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：60284626

研究成果の概要（和文）：

本研究では脳虚血の病態解析を行うと共に、ミトコンドリアを指標とした法医診断マーカーの有用性について検討した。虚血条件下で、神経細胞の退行変性、樹状突起の萎縮及び細胞体の膨化が認められた。また、神経細胞の生存率や呼吸活性は虚血時間依存的に明らかに減少しており、虚血により神経細胞障害およびミトコンドリアの機能低下を認めた。さらに、固定条件変化によってミトコンドリアの形態が変化していた。以上の結果は、急死或いは遷延性の死亡などによりミトコンドリアの形態が変化する可能性を示唆しており、法医診断マーカーとして有用であること推察された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the neuropathological changes in cerebrovascular diseases and focused on the biomarker dynamics in order to understand a proper cause of death. Under ischemic conditions, we observed retrograde neurodegeneration, dendritic atrophy, and somatic swelling. Neuronal viability and respiration activity were significantly decreased in a dependent manner. These observations indicate that hypoxic conditions such as in ischemia, exacerbates the brain activity and the organelle function, especially in the mitochondria in which the morphology changed in the altered fixative conditions. These results demonstrate that observing the mitochondrial morphological changes in relation to the cause of death (e.g., sub- and acute death) would be a useful forensic diagnosis biomarker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

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：脳虚血

1. 研究開始当初の背景

日本において脳出血、脳梗塞およびクモ膜

下出血などの脳血管疾患による死亡は死因の約12%を占めており、3大死因の1つであ

る（厚生労働省：平成 18 年度死因統計 <http://www.mhlw.go.jp/toukei>）。また、脳卒中中の危険因子である高血圧、高脂血症および糖尿病の罹患率は、人口のそれぞれ約 30、18 及び 17%を占めている。そこで、脳血管疾患の脳内病態の詳細を検討し、診断マーカーを検討する事は法医学実務において非常に重要であると考えられている。

脳血管疾患は脳を栄養する血管に異常が発生し、出血による炎症・圧排あるいは虚血により脳組織に障害を引き起こす。一方、ミトコンドリアは細胞内においてエネルギー産生（酸素呼吸）において中軸的な役割を担と共に、アポトーシスやネクローシスなど細胞の生と死の両面に関与する細胞内小器官である。従って、虚血による脳組織でのグルコースと酸素の供給不足はミトコンドリアの形態や機能に変化を引き起こすと推察される。そこで、脳虚血の病態解析を行うと共に、ミトコンドリアを指標とした法医診断マーカーの有用性について検討する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では脳虚血の脳内病態を明らかにすると共に、法医学への展開を検討する事を目的とした。脳虚血モデル神経培養細胞を用いて虚血が、生存率、呼吸活性およびミトコンドリアの形態と機能に及ぼす影響を調べ法医診断マーカーとして有用であるか検討を行った。

3. 研究の方法

(1)脳虚血モデル神経細胞の作製: Wistar 系ラット (E17) の大脳皮質から神経細胞を単離後、初代神経培養細胞を作製した。その後、虚血処理: ODG (Oxygen-Glucose Deprivation) 処理を行った。また、対照細胞として神経芽細胞 (SH-SY5Y 細胞)、HeLa 細胞、Hek 293 細胞を用いた。

(2) 神経細胞の生存率は Live/Dead Viability/Cytotoxicity 試薬を用いて調べた。

(3) 神経細胞の形態変化は免疫蛍光染色で調べた。

(4) ミトコンドリアの機能は MTT assay 法を用い呼吸活性を調べた。

(5) ミトコンドリアの形態はミトコンドリア特異的蛍光試薬を用いて調べた。また、上記細胞に蛍光蛋白質 (GFP 及び RFP) 遺伝子を導入し、ミトコンドリア内で発現させて観察を行った。

(6) 上記の結果から、ミトコンドリアの形態変化が法医診断マーカーとして有用かを検討した。

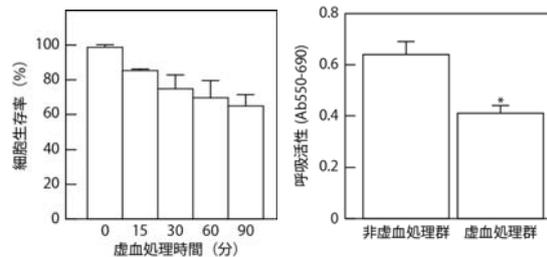
4. 研究成果

(1) 虚血時間依存的に神経細胞障害が引き起こされる。

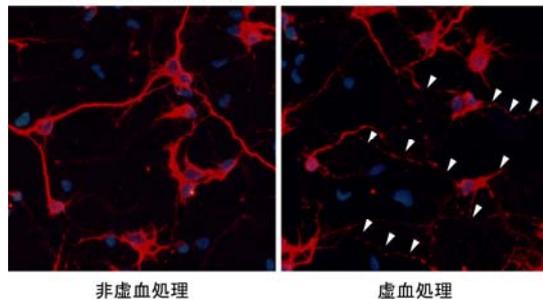
初代神経培養用いた検討において非ODG処理群の生存率は $98.8 \pm 1.1\%$ であった。一方、15、30、60及び90分間ODG処理群の生存率は、それぞれ 85.3 ± 0.7 、 74.8 ± 8.1 、 69.6 ± 10.2 及び $64.9 \pm 6.6\%$ であった。また、90分間ODG処理群では樹状突起や軸索の萎縮、細胞体の膨化が認められた。この様に、虚血時間依存的に生存率の低下及び神経細胞障害が引き起こされていた。

(2) 虚血処理に伴ってミトコンドリア機能の低下が引き起こされる。

対照群に比べODG処理群では呼吸活性が減少しており、虚血時間依存的にミトコンドリア機能が低下していた。



ラット神経培養細胞の細胞障害

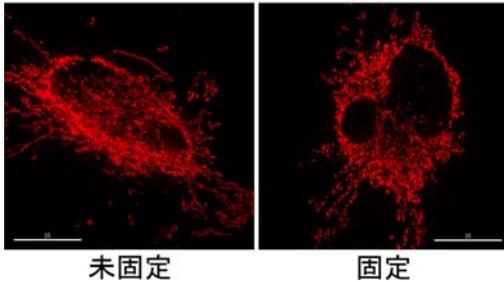


(3) 細胞固定条件によりミトコンドリアの形態が変化する。

ミトコンドリアの形態変化を観察するために、高分解能蛍光顕微鏡を用いて3次元画像解析を行った。生細胞条件下においてMitoTracker Deep Red FM、Red 580、Red CMXRos、Green FM、Mito-ID Red Detection Reagentなどの各ミトコンドリア特異的蛍光試薬において3次元現像を構築可能であった。ところが、固定条件下では、全ての蛍光試薬で著しい蛍光強度の低下が認められ、正確なミトコンドリア像を取得出来なかった。そこで、神経芽細胞 (SH-SY5Y)、HeLa細胞及びHek293細胞を用いて、蛍光蛋白質 (GFP及びRFP) 遺

伝子をミトコンドリア内で発現させて観察を行った。その結果、細胞固定後においてもミトコンドリアの3次元像を構築可能であった。また、固定条件の変化によってミトコンドリアの形態や細胞内分布が変化している可能性が示唆された。

ミトコンドリアの形態変化 (HeLa細胞)



(4) ミトコンドリアの形態変化は法医診断マーカーとして有用であると考えられた。

固定条件の変化に伴ってミトコンドリアの形態が変化したことから、急死或いは遷延性の死亡など死因によりミトコンドリアの形態が変化する可能性を示唆していることが考えられた。従って、ミトコンドリアの形態変化は法医診断マーカーとして有用であると考えられた。

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 Shojo H, Kaneko Y, Mabuchi T, Kibayashi K, Adachi N, Borlongan CV. (2010) Genetic and histologic evidence implicates role of inflammation in traumatic brain injury-induced apoptosis in the rat cerebral cortex following moderate fluid percussion injury. *Neuroscience* 171, 1273-1282. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.018>
- ② Kaneko Y, Eve DJ, Yu SJ, Shojo H, Bae EC, Park D-H, Roschek B, Alberte RS, Sanberg PR, Sanberg CD, Bickford PC, Borlongan CV. (2010) Acute treatment with herbal extracts provides neuroprotective

benefits in in vitro and in vivo stroke models, characterized by reduced ischemic cell death and maintenance of motor and neurological functions. *Cell Med.* 1, 137-142. 査読有

<http://dx.doi.org/10.3727/215517910X552818>

[学会発表] (計9件)

- ① 猩々英紀, 安達登, 馬淵正. 頭部外傷におけるシクロオキシゲナーゼの分子動態の解析. 第96次日本法医学会総会. 2012年6月9日, 浜松.
- ② 猩々英紀, 安達登, 馬淵正. 脳挫傷モデルラットを用いた頭部外傷後に引き起こされるアポトーシスの解析. 第95次日本法医学会総会. 2010年6月17日, 福島.
- ③ Tajiri N, Kaneko Y, Shojo H, Yu S, Bae E, Borlongan CV, DJ-1 ameliorates neuronal cell death in ischemic stroke via mitochondrial pathway. *Society for Neuroscience*, Nov. 13-17, 2010. San Diego. U. S. A.
- ④ Shojo H, Kaneko Y, Adachi N, Borlongan CV. Traumatic brain injury-induced apoptosis in the rat cerebral cortex following moderate fluid percussion injury: A target for therapeutic intervention. 17th Annual Conference of the American Society for Neural Therapy & Repair, *Cell Transplant.* (2010) 19, 361-362. Apr. 29-May 1, 2010. Florida. U. S. A.
- ⑤ Borlongan CV, Yu S, Kaneko Y, Shojo H, Bae E, Park DH, Eve DJ, Roschek, BJ, Alberte RS, Sanberg PR, Sanberg CD, Bickford PC. Acute treatment of herbal extracts reduces ischemic cell death

and improves motor and neurological functions in stroke models. 17th Annual Conference of the American Society for Neural Therapy & Repair, Cell Transplant. (2010) 19, 333. Apr. 29-May 1, 2010. Florida. U.S.A.

- ⑥ Kaneko Y, Shojo H, Yu S, Bae E, Borlongan CV. DJ-1, a key neuroprotective protein against Parkinson's disease, ameliorates neuronal cell death in ischemic stroke possibly via mitochondrial pathway. 20th USF Health Research Day, Feb. 19, 2010. Florida. U.S.A.
- ⑦ Borlongan CV, Yu S, Recio J, Burns J, Amatangelo S, Bae E, Shojo H, Sanberg PR, Kaneko Y, Emerich DF. National Incidence and Prevalence of Adult-Onset Brain Disorders. 20th USF Health Research Day, Feb. 19, 2010. Florida. U.S.A.
- ⑧ Kaneko Y, Shojo H, Yu S, Bae E, Borlongan CV. DJ-1, a key neuroprotective protein against oxidative stress, ameliorates ischemic cell death in vitro possibly via mitochondrial pathway. Nano-Bio Collaborative Conference 2010, March 11, 2010. Florida. U.S.A.
- ⑨ 猩々英紀, 安達登, 馬淵正. 脳挫傷モデルラットを用いた頭部外傷の脳病態解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会合同大会. 2010年12月10日, 神戸.

[その他]

ホームページ等

http://www.med.yamanashi.ac.jp/social/1egal0me/classroom_member/shohjoh.html

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DispInfo.Scholar/3_61/F8AD215DD10A64A4.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猩々 英紀 (SHOJO HIDEKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：60284626

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安達 登 (ADACHI NOBORU)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：60282125

馬淵 正 (MABUCHI TADASHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：80150308