

平成22年6月23日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007年度～2009年度

課題番号：19689015

研究課題名（和文）頭部外傷によって発現が変動する遺伝子の経時的解析

研究課題名（英文）Changes in genes expression following traumatic brain injury

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・講師

研究者番号：60284626

研究成果の概要（和文）：

頭部外傷6、12時間後の損傷脳において多数のアポトーシス関連遺伝子の発現が変動しており、受傷後48時間の損傷脳ではそれら遺伝子の発現変化は収束していた。頭部外傷後のアポトーシス関連遺伝子の変動は炎症関連遺伝子と協調的に変動していた。また、受傷後早期にインターロキン1や腫瘍壊死因子などの炎症系のサイトカインが急激に上昇しており、頭部外傷により引き起こされるアポトーシスは受傷後の炎症反応と関連している事が推察された。

研究成果の概要（英文）：

The ratios of most apoptosis-related gene transcripts changed primarily at 6 and 12 h following traumatic brain injury (TBI). The altered expression ratio decreased significantly at 48 h after trauma. The dynamic changes in expression of apoptosis-related genes were closely paralleled by similar alterations in inflammation-related genes after trauma. The altered genes involved in TBI-induced apoptosis included interleukin 1 and tumor necrotic factor which immediately increased and reached the maximum levels at 3 h following the injury. These results suggested that TBI induced apoptosis relate to inflammation response after trauma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

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：頭部外傷、受傷応答メカニズム、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷、脳梗塞や脳出血などの脳血管障害並びに、アルツハイマー病（Alzheimer's

Disease; AD）、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの変性疾患では、シナプスの脱落や神経細胞死を来し神経機能の低下及

び脳機構の破綻を引き起こす。また、頭部外傷は孤発性の AD などの変性疾患を招来する主要な危険因子の一つであり、頭部外傷後の受傷応答メカニズムを精査し病態や脳機能との関連を解明する事は重要である。

また、高齢社会に伴い高齢者のかかわる交通事故や不慮の事件事故が社会問題となっている (Kibayashi et al., 2007)。法医学分野において頭部外傷後の後遺障害や神経変性疾患や痴呆症に内在する頭部外傷を実証する事は非常に重要である。従って、頭部外傷後の受傷応答メカニズムの特徴を抽出し、頭部外傷が脳機能に及ぼす影響を分子レベルで解析する事は法医学実務において有用であると考えられる。

さらに近年、分子生物学並びにバイオインフォマティクス (DNA、RNA、タンパク質など生物学に関する生命情報を基盤とし、分子間の相互作用や細胞、個体レベルでのパスウェイやネットワークを解析して生命システムを構築する生命情報) 技術の進展に伴い、様々な疾患について網羅的な解析が行われている。例えば、DNA マイクロアレイ法を用いて複数の遺伝子が関与する疾患の遺伝子発現を網羅的に解析し、疾患関連遺伝子の同定が行われている (Fridde CJ et al., 2000)。これら技術を用いて頭部外傷に関する基礎研究を実施し、新たな知見を得る事は法医学への応用および進展に寄与するものであると考えられる。

2. 研究の目的

DNA マイクロアレイ法を用いて頭部外傷後に変動する遺伝子を網羅的に解析すると共に、頭部外傷により引き起こされる受傷応答メカニズムの特徴をプロファイルする。また、組織学検討を行い、脳病態と頭部外傷後に発現が変動した遺伝子との関連について精査する事を目的とする。

3. 研究の方法

頭部外傷モデル動物の作製：全身麻酔下の Wistar 系雄ラット (8 週齢、約 300g) の頭蓋骨に歯科用ドリルを用いて骨窓 (直径 0.5 cm) を開け、脳損傷作製装置 Fluid Percussion Device を装着した (図 1)。骨窓の位置は右頭頂骨正中中部とし、側方打撃を加えた。打撃強度は 3.5 atm とし、脳損傷後 3、6、12 及び 48 時間に脳を摘出した (図 2)。なお、動物実験は佐賀大学および山梨大学動物実験規程に従って、佐賀大学動物実験審査委員会および山梨大学学長の承認を受け実施した。

その後、打撃部直下の脳皮質から mRNA を精製し、米国 Affymetrix 社製 GeneChip Rat Genome 230 を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。脳損傷モデル群とコントロール群の遺伝子の発現の差異を比較検討した。

また、頭部外傷後の脳内病態は抗カスパーゼ 3 を用いた免疫組織化学および TUNEL 染色を用いた蛍光染色法で行った。さらに、神経細胞およびマクロファージの解析は抗 NeuN 抗体および抗 CD68 抗体を用いた免疫組織化学で行った。

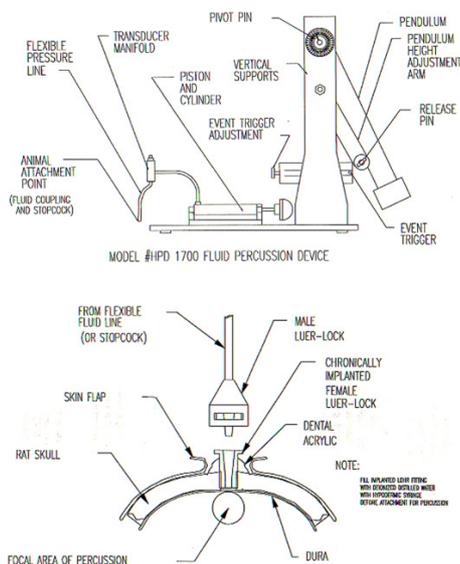


図 1 脳損傷作製装置



図 2 損傷脳 (矢頭：打撃部位)

4. 研究成果

頭部外傷後、アポトーシス関連遺伝子と炎症関連遺伝子の発現は協調的に変動する事が分かった。即ち、受傷後6、12時間後の損傷脳において多数のアポトーシス関連遺伝子及び炎症関連遺伝子の発現が変動していた。また、受傷後48時間の損傷脳においてそれら遺伝子の発現変化は収束していた。特に、受傷後3時間の損傷脳においてインターロキン1や腫瘍壊死因子などの炎症系のサイトカインが急激に上昇していた。一方、アポトーシスにおいて中軸的な役割を担っているエフェクターカスパーゼの一つであるカスパーゼ3の遺伝子発現は変動していなかった。しかし、免疫組織化学を用いた検討では受傷後6時間の損傷脳において著しいカスパーゼ3の活性化を認めた。TUNEL染色では受傷後6、12及び48時間の損傷脳においてDNAの断片化を認めた。ま

た、特に受傷後6時間の損傷脳において著しいDNAの断片化や神経細胞の委縮を認めた。即ち、カスパーゼ3の動態はTUNEL染色を用いた組織学的検討と良く一致していた。抗CD68抗体を用いた免疫組織化学では受傷後6、12及び48時間にCD68陽性細胞を認め、マクロファージが観察された。また、抗NueN抗体を用いた免疫組織化学では受傷後48時間において著しい神経細胞の減少を認め、アポトーシスの病態を反映していた。以上の結果から、頭部外傷後のアポトーシスは炎症系のサイトカインによって受傷後早期に誘導され、受傷に伴う炎症反応と関連している事が推察された。また、頭部外傷により引き起こされるアポトーシスは受傷後の経過時間に伴って一過性の増大を示している事がわかった。

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6件)

1. Kibayashi K, Sugita Y, Shojo H, Sumida T. Brain germinoma in a young adult man with suspicion of fatal neglect. American Journal of Forensic Medicine and Pathology. 2009; 30(2): p180-182. 査読有
2. Kibayashi K, Nakao KI, Shojo H. Hyperthermia combined with ethanol administration induces c-fos expression in the central amygdaloid nucleus of the mouse brain. A possible mechanism of heatstroke under the influence of ethanol intake. International Journal of Legal Medicine. 2009; 123(5): p371-379. 査読有
3. Sumida T, Kibayashi K, Shojo H, Nakao KI. Effects of Tissue Fixation on the Inhibition of Erythrocyte Pseudoperoxidase Activity in Immunoperoxidase Methods. Journal of Histotechnology. 2008; 31(4): p165-168. 査読有
4. Kibayashi K, Sumida T, Shojo H. An unusual case suspected of accidental death from head-down position. Acta Criminologicae et Medicinase Legalis Japonica. 2008; 74: p31-35. 査読有
5. Kibayashi K, Sumida T, Shojo H, Tokunaga O. Unexpected death due to intestinal obstruction by duplication cyst in an infant. Forensic Science International. (2007) 173, p175-177. 査読有
6. Kibayashi K, Sumida T, Shojo H, Hanada M. Dementing diseases among elderly persons who suffered fatal accidents: a forensic autopsy study. American Journal of Forensic Medicine and Pathology. (2007) 28, p73-79. 査読有

[学会発表] (計12件)

1. 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, April 29 (2010) Florida.
2. 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, April 29 (2010) Florida.
3. 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.
4. 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, February 19 (2010) Florida.
5. 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, February 19 (2010) Florida.
6. Shojo H, Neuropathology for traumatic brain injury. University of South Florida, August 19 (2009) Florida.
7. 猩々英紀, 安達登. 頭部外傷に伴う活性化カスパーゼ-3の経時的変化. 第93次日本法医学会学術全国集会. (2009) 5月14日, 大阪
8. 猩々英紀, 木林和彦. 頭部外傷により引き起こされるアポトーシスとマクロ

ファージや神経細胞との関係. 第 92 次
日本法医学会総会. (2008) 4 月 24 日,
長崎

9. 中尾賢一朗, 猩々英紀, 木林和彦. 脳
内異物による脳病態の解析. 第 92 次日
本法医学会総会. (2008) 4 月 24 日, 長
崎
10. 猩々英紀, 木林和彦. 脳挫傷により誘
導されるアポトーシスの経時的解析.
日本法医学九州地方会. (2007) 10 月 20
日, 福岡
11. 猩々英紀, 頭部外傷に伴う損傷脳の病
態. 佐賀大学統合実験センター講演会
(2007) 9 月 27 日, 佐賀
12. 猩々英紀, 木林和彦. 頭部外傷がアポ
トーシスに関与する遺伝子に及ぼす影
響. 第 91 次日本法医学会総会. (2007) 5
月 18 日, 秋田

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・
講師
研究者番号 : 60284626

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし