

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24年5月8日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790601

研究課題名（和文） 飲酒者における外傷性脳浮腫増大機構のエピジェネティクス：マイクロRNAの役割

研究課題名（英文） Epigenetics of mechanism of augmentation for traumatic brain edema under ethanol consumption: role of microRNA

研究代表者

片田 竜一（KATADA RYUICHI）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00423757

研究成果の概要（和文）：飲酒者の頭部外傷が重症化することは知られており、その機序として、アルコール摂取により脳挫傷後脳浮腫が増大することを示した。本研究では、アルコールによる脳挫傷後脳浮腫の増大に関する機序を明らかにするため、ラット脳挫傷モデルおよび細胞を使用した実験を行った。アルコール摂取による脳浮腫の増悪に、水チャンネルである脳アクアポリン4の発現上昇、低ナトリウム濃度が関与し、それらの阻害剤が新たな治療薬となる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

It has been well known that ethanol has the detrimental effect on traumatic brain injury. We previously reported that ethanol augments brain edema after brain contusion. In this study, to elucidate the mechanism of brain edema augmentation by ethanol, rat traumatic brain injury model and astrocyte culture experiments were performed. The increase of aquaporin-4, an water channel, and the decrease of sodium ion concentration had the effects on the augmentation of brain edema under ethanol consumption. These findings suggest that the inhibitor of aquaporin-4 and hyponatremia may be a new treatment of brain edema after traumatic brain injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：アルコール医学、頭部外傷、アクアポリン4

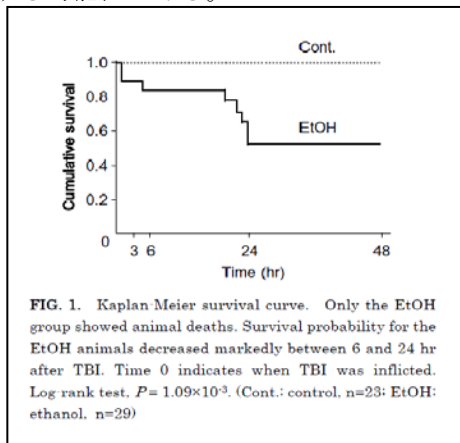
1. 研究開始当初の背景

交通事故、転倒などにより、頭部外傷を受傷する人は多く、頭部外傷は、軽い意識障害から重度の後遺症を残すもの、遷延性意識障害に及ぶもの、死に至るものまでさまざまである。それは患者の年齢、内因的疾患の有無、受傷機転などによって予後が分かれる。法医

実務において、頭部外傷を受傷した事例の約50%に中等度から高等度のアルコール摂取が認められている。また、血中のエタノール濃度が高ければ高いほど重症化することが知られている。その原因としては、酩酊による重症化、凝固系の変化による止血困難、アルコールそのものによる脳挫傷の重症化など

が考えられているが、一定の結果は得られていない。脳挫傷後に生じる脳浮腫は重大な合併症であり、神経学的な予後不良因子である。われわれは、これまで動物実験により、エタノールを前投与し、その後脳挫傷を受傷すると、脳挫傷後に生じてくる脳浮腫が増大してくるにより死亡率が増加することを示した (FIG. 1. Katada et al. J. Neurotrauma, 2009)。その機序として、炎症性サイトカインの関与は低く、酸化ストレスの関与が強く推定されたことから、脳挫傷後に抗酸化剤を投与すると脳浮腫が減弱し、死亡率も著明に改善したことも示した (Katada et al. J. Neurotrauma, 2009)。また、これまでの研究により、酸化ストレス誘導剤 (グルタチオン枯渇剤) を前投与すると脳挫傷後脳浮腫が増大し、死亡率も悪化した。そして脳挫傷受傷後、酸化ストレスの指標である glutathione peroxidase 活性を測定すると、エタノール前投与群、酸化ストレス前投与群ともに有意に上昇を示した。これらのことは、エタノールによる脳挫傷後脳浮腫の増大には酸化ストレス、特にグルタチオン系の関与が示唆される。

脳浮腫をはじめとした浮腫には、種々のイオンチャンネルが関与していることが知られており、錐体細胞において、L 型電位依存性カルシウムチャンネルの調節に miR-26a が関与しており、心筋カリウムチャンネルの調節にも miR-9 が関与することがわかってきた。これらのマイクロ RNA が脳浮腫増大にも関与する可能性が示唆され、エタノールにより変化する可能性がある。



2. 研究の目的

エタノールを前投与されていた場合、脳挫傷を受傷し、その後に生じてくる脳浮腫が増大することがこれまでの研究から明らかになったことから、その機序について、microRNA の役割、酸化ストレスの関与に着目し、さらに細胞膜イオンチャンネル、そして浮腫の際、変化を来す可能性のある血液中の電解質の関与が考えられる。また脳挫傷に限らず、

脳浮腫を来し得る疾患である脳卒中、脳腫瘍、ウイルス性脳症などに関しても、脳浮腫増大の機序は同じかもしくは類似した機序によるものと考えられる。そこで、本研究では、ラット脳挫傷モデルを使用し、エタノール投与後における脳浮腫増大に伴う死亡機序を解明するため、以下の点に関し明らかにする。

- (1) 酸化ストレスが脳挫傷後脳浮腫を増大させることにより、転写制御因子 NF- κ B, HIF-1 α 等が関与すること。
- (2) アクアポリン 4 (AQP4)をはじめとした細胞膜チャンネルが関与すること。
- (3) 脳浮腫に影響を与える因子として、血液中電解質濃度が脳挫傷後脳浮腫の増大に及ぼす影響。

3. 研究の方法

平成22年度

これまで、エタノールは脳挫傷後脳浮腫を増大させることにより死亡率を増加し、その機序として酸化ストレスが関与することを示した (Katada et al. J. Neurotrauma, 2009)。エタノールは酸化ストレスを誘発する作用を有する。そこで、エタノール以外に酸化ストレスを誘発するものとして、これまで報告されている、diethylmaleate (DEM)、DL-Buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) に着目し、これを脳挫傷前に投与した群を作成することによって、酸化ストレスが脳浮腫を増大するのかどうかの検討を行い、脳浮腫に関与する可能性のある micro RNA の発現評価を行う。酸化ストレス誘導剤投与群報に従って、脳挫傷作成 1 時間前に、DL-Buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) 100 mg/kg 体重を腹腔内投与する。脳挫傷作成後、3、6、24 時間後に脳を抽出する。

1) 脳挫傷作成方法

体重約 300 g の Wistar 系雄ラットを用いて、全身麻酔により鎮静させ、定位脳固定装置に固定する。右開頭を行い、硬膜は除去しない。脳挫傷作成は、weight-drop device (既存機器に装置) を使用し、アクリル製のシリンジ内において、30 g の重りを高さ 1 m から落下させ、脳を 1.5 mm 変形させるように調整する。

2) 酸化ストレス誘導剤投与群

既報に従って、脳挫傷作成 1 時間前に、DL-Buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) 100 mg/kg 体重を腹腔内投与する。脳挫傷作成後、3、6、24 時間後に脳を抽出する。

3) 組織学的評価

ヘマトキシリンエオジン染色、免疫染色 (AQP4) を行い、脳浮腫の程度、脳挫傷部位におけるアクアポリン 4 の発現を形態学的に

評価する。

4) 酸化ストレス評価

脳挫傷部位における酸化ストレスの指標として、glutathione peroxidase 活性を比色法により測定し、酸化ストレスの評価として検討する。

5) たんぱく発現解析

細胞膜チャンネルである AQP4 の発現を、脳から細胞質分画を抽出した後、ウェスタンブロッティングにより検出し、検討する。

6) 生化学検査

血液を採取し、遠心分離後、血清を用いて SPOTCHEM (アークレイ株式会社) (既存機器) により電解質、一般生化学検査を行う。

7) 転写因子活性の評価

脳浮腫に関与していると報告されている、NF- κ B, HIF-1 α の活性を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により測定し、脳挫傷後脳浮腫の関与につき検討する。

平成23年度

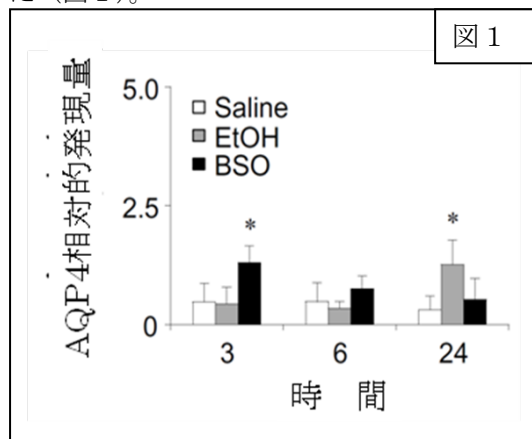
平成22年度の研究にて得られた結果を元に、以下の実験を行う。

アストロサイトを使用した細胞実験

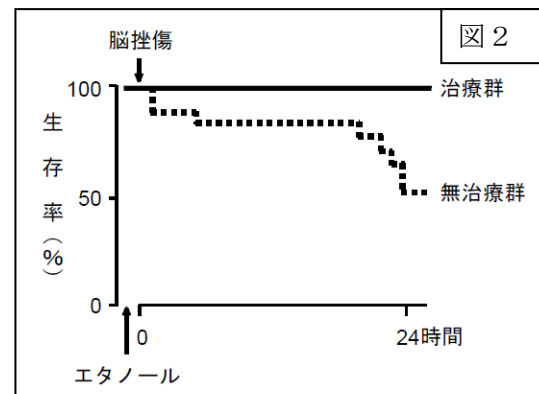
これまでの実験結果を踏まえ、脳挫傷後脳浮腫増大に関する機序のさらなる解明を目指し、アストロサイトを使用して、よりターゲットを絞りこんでいく。

4. 研究成果

酸化ストレス誘導剤である BSO を前投与すると、脳挫傷後24時間で脳浮腫が有意に増大し、死亡率が上昇した。酸化ストレスの評価としての glutathione peroxidase 活性は、BSO 群およびエタノール前投与群で増大していた。脳浮腫の形成に関与することが知られている NF- κ B, HIF-1 α 活性はエタノール投与群で上昇した。血中の電解質濃度を測定した生化学的検査では、脳挫傷後24時間でエタノール投与群でナトリウム濃度が低下した。脳における AQP4 発現は、脳挫傷後3時間で酸化ストレス誘導剤である BSO 前投与群で有意に増大した。エタノールを前投与した群では受傷後24時間で有意に上昇した (図1)。



AQP4 阻害剤である acetazolamide (AZA) を受傷後3時間で投与すると、生存率の改善が認められた (図2)。



エタノールによる脳浮腫増大に関する機序として、AQP4 とナトリウムの関与が動物実験により明らかとなり、マイクロ RNA の関与の可能性は低いと考えられたことから、その機序を明らかにするために細胞を使用した実験を計画した。アストロサイトを使用した細胞実験では、培地を生理的ナトリウム濃度 (NaCl, 6.8 g/L)、低ナトリウム濃度培地 (NaCl, 4.1 g/L)、高ナトリウム濃度培地 (NaCl, 9.5 g/L) に置き、さらにエタノールの影響を検討するため、0-100 mM のエタノールを添加して、経時的にアストロサイトにおける AQP4 発現の程度をウェスタンブロッティングにより検討したところ、低ナトリウム濃度培地で3時間培養すると AQP4 発現が有意に上昇した。エタノール濃度による有意な差はなかった。このことから、アストロサイトにおける AQP4 発現上昇については、低ナトリウム環境が関与することが明らかとなった。動物実験の結果を含めて考察すると、エタノールによる脳挫傷後脳浮腫の増大は、その機序として、エタノールにより低ナトリウムが生じ、低ナトリウムが脳 AQP4 発現を上昇させると考えられる。このことから、脳挫傷後の低ナトリウム血症を改善することで、脳浮腫増大を防ぐ可能性が示唆された。低ナトリウム環境がアストロサイトにおける AQP4 発現上昇につながる機序の解明が今後の検討課題である。

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6件)

- ① Katada R., Watanabe S, Ishizaka A, Mizuo K, Okazaki S, Watanabe S, Matsumoto H. Ethanol-induced hyponatremia augments brain edema after traumatic brain

- injury, Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence, 査読有, 47, 2012, in press
- ② 片田竜一、水尾圭祐、岡崎俊一郎、舘田健児、渡邊智、松本博志. アルコールによる脳浮腫増悪に及ぼす Na および AQP4 の影響、アルコールと医学生物学、査読無、Vol. 31, 2012, 印刷中
- ③ Katada R, Nishitani Y, Honmou O, Mizuo K, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, Matsumoto H. Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure. Am. J. Pathol, 査読有, 180, 2012, 17-23, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22051773>
- ④ 片田竜一、水尾圭祐、岡崎俊一郎、舘田健児、渡邊智、松本博志. Aquaporin-4 がアルコール摂取における脳挫傷後脳浮腫増悪に及ぼす影響、アルコールと医学生物学、査読無、Vol. 30, 2011, 57-60
- ⑤ Katada R. Effects of alcohol consumption on traumatic brain injury. Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence, 査読有, 46 (5), 2011, 424-435, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22256591>
- ⑥ 片田竜一、西谷陽子、水尾圭祐、渡邊智、松本博志. 脳挫傷後の脳浮腫増大にアルコールは glutathione 系を介して関与する、アルコールと医学生物学、査読無、Vol. 29, 2010, 55-58

[学会発表] (計 11 件)

- ① 片田竜一、水尾圭祐、岡崎俊一郎、渡邊智、松本博志. アルコールによる脳浮腫増悪に及ぼす Na および AQP4 の影響. 第 31 回アルコール医学生物学研究会学術集会. 2012 年 1 月 27 日、金沢
- ② 片田竜一、水尾圭祐、岡崎俊一郎、渡邊智、松本博志. エタノールによる脳挫傷後脳浮腫増大には低ナトリウム血症および AQP4 発現の上昇が関与する. アルコール・薬物医学合同学会総会. 2011 年 10 月 13 日、名古屋.
- ③ Katada R, Mizuo K, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, Matsumoto H. Acetazolamide decreases brain edema after traumatic brain injury under ethanol consumption. Research Society on Alcoholism, June 27, 2011, Atlanta, USA.
- ④ 片田竜一、水尾圭祐、岡崎俊一郎、渡邊智、松本博志. アセタゾラミドは AQP4 の発現を抑制することでアルコールによる脳挫傷後脳浮腫を軽減させる. 第 95 次法医学会総会. 2011 年 6 月 16 日、福島.
- ⑤ 片田竜一、西谷陽子、水尾圭祐、岡崎俊

- 一郎、舘田健児、渡邊智、松本博志. Aquaporin-4 がアルコール摂取における脳挫傷後脳浮腫増悪に及ぼす影響. 第 30 回アルコール医学生物学研究会学術集会. 2010 年 11 月 26 日、久留米.
- ⑥ 片田竜一. 頭部外傷に及ぼすアルコールの役割. 平成 22 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (第 45 回日本アルコール・薬物医学会)、2010 年 10 月 7 日、小倉.
- ⑦ 片田竜一、水尾圭祐、岡崎俊一郎、舘田健児、渡邊智、松本博志. アルコールによる脳挫傷後脳浮腫増大に及ぼす Aquaporin-4 の役割. 平成 22 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (第 45 回日本アルコール・薬物医学会)、2010 年 10 月 7 日、小倉.
- ⑧ Katada R, Mizuo K, Okazaki S, Watanabe S, Matsumoto H. The effects of AQP4 on augmentation of rat brain edema after traumatic brain injury under ethanol injection. International Society for Biomedical Research on Alcoholism 2010, September 13-16, 2010, Paris, France.
- ⑨ Katada R, Mizuo K, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, Matsumoto H. Aquaporin-4 affects brain edema after brain contusion under ethanol consumption. Neuro2010, September 2-4, 2010, Kobe.
- ⑩ 片田竜一、水尾圭祐、岡崎俊一郎、舘田健児、渡邊智、松本博志. Aquaporin-4 はアルコールによる脳挫傷後脳浮腫の増悪に関与する. 包括脳ネットワーク 2010 夏のワークショップ. 2010 年 7 月 29 日、札幌.
- ⑪ 片田竜一、西谷陽子、水尾圭祐、岡崎俊一郎、渡邊智、松本博志. アルコールによる脳挫傷後脳浮腫増大における AQP4 の役割. 第 94 次法医学会総会、2010 年 6 月 24 日、東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片田 竜一 (KATADA RYUICHI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：00423757

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：