

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791954

研究課題名(和文) 頭部外傷における PACAP の神経保護作用と機序の解明

研究課題名(英文) PACAP38 suppresses cortical damage in mice with traumatic brain injury by enhancing antioxidant activity.

研究代表者

宮本 和幸 (MIYAMOTO, KAZUYUKI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：80555087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：頭部外傷では受傷後に発生する活性酸素種、酸化ストレスにより神経傷害増悪することが知られている。本研究ではPACAP38が頭部外傷後の酸化ストレスを制御し神経保護を有するかについて検討をおこなった。結果、PACAP38は頭部外傷後3時間・24時間後において、頭部外傷前と比較して、抗酸化指標(BAP)/酸化ストレス指標ROMsのバランスを有意改善した。また、PACAP38投与群では受傷24時間後の、神経細胞死・酸化ストレスの有意な減少を認めた。さらに、これらの機序として、PACAP38は受傷3時間後の大脳皮質において有意に抗酸化酵素を増加させ、抗酸化力を高め神経保護をおこなっていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The production of reactive oxygen species (ROS) and the resulting oxidative stress in mice in response to a controlled cortical impact (CCI) are typical exacerbating factors associated with traumatic brain injury (TBI). The aim of the present study was to determine whether PACAP38 exerts neuroprotective effects by regulating oxidative stress in mice with TBI. PACAP38 was administered intravenously immediately following CCI, and immunostaining for the oxidative stress indicator nitrotyrosine, and for neuronal death were measured 24 hours later. Western blot experiments to determine antioxidant activity in the neocortical region were also performed three hours post-CCI. PACAP38 suppressed the extent of TBI and NT-positive regions 24 hours after CCI, and increased antioxidant enzymes in both hemispheres. Taken together, these results suggest that increasing antioxidant might activity isbe involving in one of the neuroprotective effect of PACAP38 in mice subjected to a CCI.

研究分野：頭部外傷

キーワード：頭部外傷 PACAP38 活性酸素種 酸化ストレス 二次性損傷 神経保護作用 抗酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷は未だに救命が困難な疾患の一つである。その病態には受傷直後におこる一次性脳損傷とその後に生じる二次性脳損傷が知られている。この二次性脳損傷の抑制が患者の予後決定に非常に重要であり、活性酸素種や酸化ストレスの関与が示唆されている。しかし、未だにこの二次性脳損傷を抑制する有効な治療法は確立されていない。我々は前回の研究成果として活性酸素種は頭部外傷受傷3時間後から出現し、酸化ストレス・神経細胞死は6時間後から出現し、活性酸素種出現と酸化ストレス・神経細胞死には時間的解離があることを報告した。また、この時間解離の結果から受傷3時間後のエダラボン投与(抗酸化剤)が最も有効であることを報告した。Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)は羊から分離されたペプチドで、過去の報告から、脳梗塞・頭部外傷・脊髄損傷などにおいて神経細胞死を抑制することが報告されている。また、近年PACA38が酸化ストレスを抑制すること、体内の抗酸化能の指標であるBiological antioxidative potential (BAP)が報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PACAP38がマウス頭部外傷モデルにおいて酸化ストレスを制御することで神経保護作用を認めるかについて検討をおこなった。

## 3. 研究の方法

### 頭部外傷の作成

C57/BL6J マウス(10-12週)に全身麻酔をおこない、プレグマから右に3mm、後方に2mmの位置に慎重に開頭をおこなった。インパクトを用いて脳挫傷し、人工セメントの頭蓋骨で閉頭した。(Figure1d)

### 頭部外傷後の体内の抗酸化能(Biological antioxidative potential (BAP))の測定

頭部外傷後の体内の酸化ストレス指標としてReactive oxidative metabolites (ROMs)、抗酸化指標としてBAPを用い、受傷後の酸化ストレスと抗酸化能の変化を観察した。頭部外傷前、3時間後、24時間後に採血をおこなった。ROMs、BAPの経時変化を観察した。またバランスをみる目的にBAP/ROMsの比を求めた。(Figure1a)

### PACAP38/生理食塩水投与

PACAP38は頭部外傷直後に5nmol/kgのポラス投与と、浸透圧ポンプを用いた持続投与(16pmol/μl/h)をおこなった。生理食塩水投与群(コントロール群)ではPACAP38投与群と同量の生理食塩水投与をおこなった。

### 頭部外傷 24 時間後の神経細胞死・酸化ストレスの測定

マウスに頭部外傷作成後に2群:PACP38投与群、生理食塩水投与群(コントロール群)にランダムに割り付けをおこなった。上記の方法でPACP38もしくは生理食塩水の投与をおこない受傷から24時間後に動物を犠牲にし、脳を摘出した。摘出した組織を用いて50μm毎に標本作製し、神経細胞死をFluoro JadeB染色、Nitrotyrosine(O<sub>2</sub>と一酸化窒素の代謝産物)の免疫染色をおこなった。FJB陽性、NT陽性面積を積分しその体積を2群で比較検討した(Figure1b)。

### 脳組織の抗酸化酵素活性の測定(Western Blot Analysis)

前年度の研究結果から、活性酸素種は頭部外傷3時間後から出現した。このため、PACP38投与群と生理食塩水投与群(コントロール群)の2群を新たに作成した。受傷3時間後に動物を犠牲にし、脳を摘出し、損傷側・非損傷側の脳皮質を別々にサンプルした(Figure1c)。これらを用いて、Western blotting法で組織の抗酸化酵素(Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GpX-1, Thioredoxine-1, HO-2)を半定量的に測定した。用いた1次抗体・2次抗体は以下の表1,2に示す。

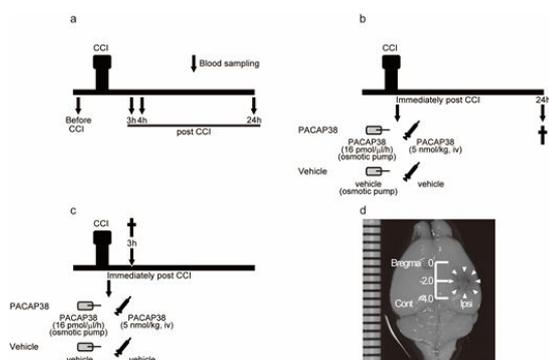


Figure 1

Table 1 List of primary antibodies used for immunoblotting (IB)

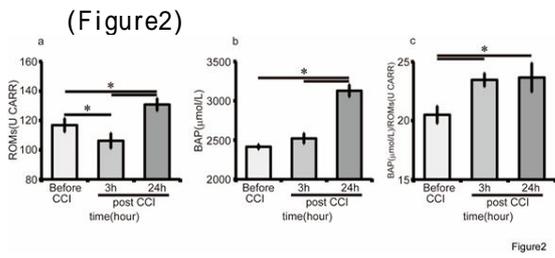
Primary antibodies	Clone #	Host	Company	Catlog #	application	Size
β-Actin	A-11	Mouse	Sigma (St Louis, MO)	6188	WB	4,000
Cu/ZnSOD	B30448	Rabbit	StressGen Biotechnologies (Victoria, BC)	SOD-100	WB	30,000
Mn-SOD	93K20	Rabbit	StressGen Biotechnologies (Victoria, BC)	SOD-100	WB	30,000
GpX-1	B32297	Rabbit	Stress (Boston, MA)	A39015	WB	40
Thioredoxine-1	EP9610	Rabbit	Abcam (Pittsburg, CA)	5127-1	WB	2,000
HO-2		Rabbit	MerckMillipore (Darmstadt, Germany)	77804	WB	1,000

Table 2 List of secondary antibodies used for immunoblotting (IB)

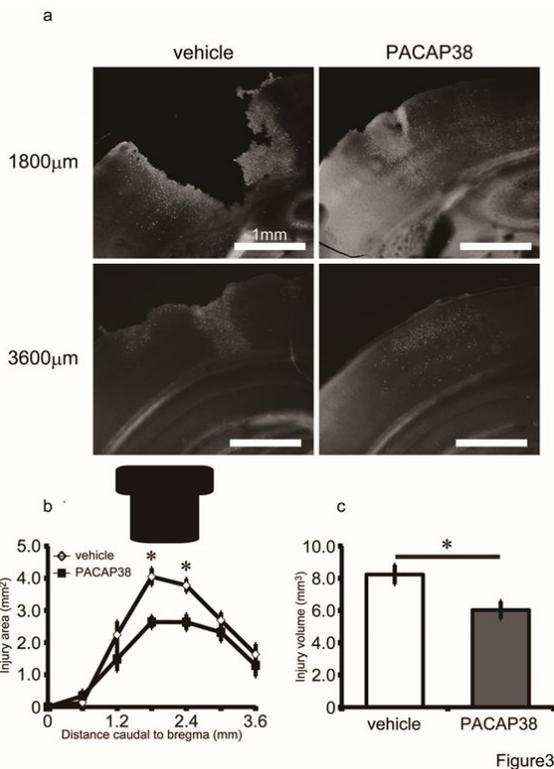
Secondary antibodies (conjugated)	Host	Company	Catlog #	application	Size
Mouse IgG (HRP)	Sheep	GE Healthcare Biosciences (Life Technologies, VA)	NA931	WB	2,000
Rabbit IgG (HRP)	Donkey	GE Healthcare Biosciences (Life Technologies, VA)	NA934	WB	4,000

## 4. 研究成果

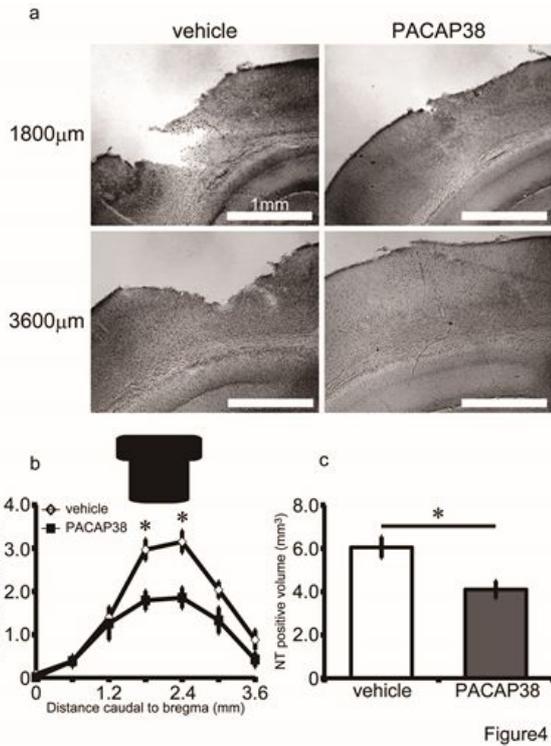
A) 頭部外傷後、ROMsは受傷前より低下し、24時間後に受傷前と比較して有意に上昇していた。BAPは受傷24時間で有意に上昇した。BAP/ROMs(抗酸化/酸化ストレスの比)では受傷前と比較して、受傷3時間、24時間後で有意に上昇を認めた。



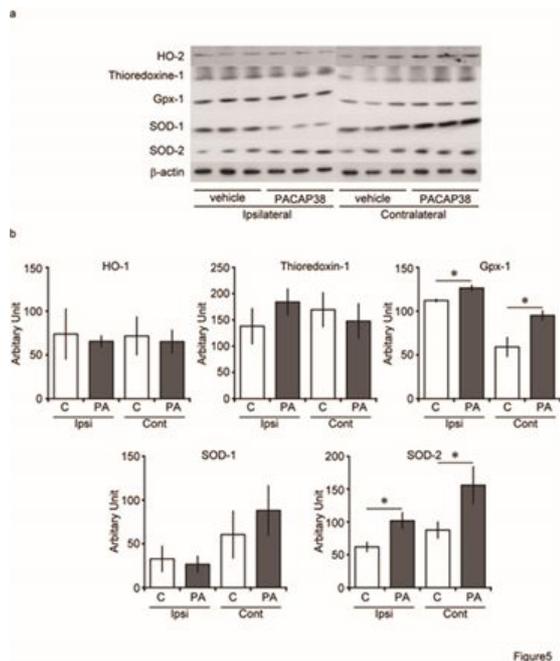
B) PACAP38 投与群では生理食塩水投与群 (コントロール群)と比較して有意に神経細胞死(FJB 染色陽性)の減少を認めた。上記から PACAP38 による神経細胞死の抑制が考えられた。(Figure3)



C) PACAP38 投与群では生理食塩水投与群 (コントロール群)と比較して、受傷 24 時間後の NT 陽性領域の減少を認めた。上記から PCAP による酸化ストレスの制御が考えられた。(Figure4)



D) PACAP38 投与群では生理食塩水投与群 (コントロール群)と比較して、大脳皮質の抗酸化酵素(SOD-2 and Gpx-1)の発現を有意に増加させた。(Figure5)



### 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 20 件)

Xu Z, Miyamoto K, Murai N, et al.

Pituitary adenylatecyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. *Sci Rep.* 2016 Feb 29;6:22373. doi:10.1038/srep22373 査読有.

Miyamoto K, Ohtaki H, Tanaka S, et al. Human recombinant thrombomodulin (rTM) improves the neurological function in a murine heatstroke model. *Crit Care Med*;43(12) Supplement 1;488, 2015 査読有.

宮本和幸, 山本大輔, 井手亮太, 他. 偽腔に気管力ニューレが迷入した重症気道熱傷の1例. *日救熱傷学会雑誌*. 査読有, 2015.41.123-7.

Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, et al. PACAP38 Suppresses Cortical Damage in Mice with Traumatic Brain Injury by Enhancing Antioxidant Activity. *J Mol Neurosci.* 2014; 54:307-9 査読有.

宮本和幸, 田中幸太郎, 田中俊生, 他. 除神経過敏へのノルアドレナリン投与で心室頻拍をきたした重症パーキンソン病の1例. *日本集中治療医学会雑誌*. 査読有, 2014.22.38-41.

Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, et al. PACAP38 Suppresses Cortical Damage in Mice with Traumatic Brain Injury by Enhancing Antioxidant Activity. *J Mol Neurosci.* 2014; 54:307-9 査読有.

宮本和幸, 阿部裕, 飯島忠, 他. ウイルス性腸炎を契機に腸重積となった1例. *日本臨床救急医学会雑誌*. 査読有, 2014.17.708-10.

宮本和幸, 田中幸太郎, 門馬秀介, 他. ピンクグレープフルーツによる上気道閉塞と下咽頭の鑑別に苦慮した気道緊急の1例. *日救急医学会関東誌*. 査読有, 2014.35.257-60.

宮本和幸, 清水真樹子, 田中幸太郎, 他. 観血的動脈圧ラインからのグルコン酸カルシウム持続動注が著効したフッ化水素酸による手指化学熱傷の1例. *中毒研究*. 査読有, 2014.27.343-7.

広瀬優, 宮本和幸, 久次米真吾, 田中幸太郎. 診断と治療方針に苦慮したショックを伴う急性肺血栓塞栓症の1例. *日救急医学会関東誌*. 査読有, 2014.35.359-62.

Ohtaki H, Miyamoto K, Nakano H, et al. Establishment and characterization of primary adult microglial culture in mice. *Acta Neurochir Suppl.* 2013;118:49-54 査読有.

Song D, Miyamoto K, Shibato J, et al. The anti-inflammatory property of human bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells is preserved in late-passage cultures. *J Neuroimmunol.* 2013 Aug 6. pii: S0165-5728(13)00207-5 査読有.

Miyamoto K, Ohtaki H, Tanaka S, et al. Oral rehydration solution (OS-1) improves

thermoregulation after experimental heatstroke of mice. *Crit Care Med.*2013;41:12 査読有.

Miyamoto K, Ohtaki H, Dohi K, et al. Therapeutic Time Window for Edaravone Treatment of Traumatic Brain Injury in Mice. *Biomed Res Int.* 2013;2013:379206 査読有.

Miyamoto K, Ohtaki H, Dohi K, et al. Edaravone Increases Regional Cerebral Blood Flow After Traumatic Brain Injury in Mice. *Acta Neurochir Suppl.* 2013;118:103-9 査読有.

Dohi K, Miyamoto K, Fukuda K, et al. Status of Systemic Oxidative Stress during Therapeutic Hypothermia in Patients with Post-Cardiac Arrest Syndrome. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:562429 査読有.

宮本和幸, 三宅康史, 渡邊真樹子, 他. 安静時代謝量を指標とした適切な熱量投与により refeeding syndrome から軽快した重症神経性食思不振症の1例. *日本集中治療医学会雑誌*. 査読有, 2012.19.215-8.

宮本和幸, 峯村純子, 渡邊真樹子, 他. 上部消化管内視鏡を用いた積極的な胃石除去が奏功した急性薬物中毒の1例. *中毒研究*. 査読有. 2012.25.113-6.

宮本和幸, 中森知毅, 御子神哲也, 他. 抗凝固・血小板療法中に右中結腸動脈解離をきたした多発腹部内臓動脈瘤の1例. *日本臨床救急医学会雑誌*. 査読有, 2012.15.550-3.

Ohtaki H, Miyamoto K, Tsumuraya T, et al. Accumulation of autofluorescent storage material in brain is accelerated by ischemia in chloride channel 3 gene-deficient mice. *J Neurosci Res.* 2012 Nov;90(11):2163-72 査読有.

[学会発表](計33件)

Miyamoto K, et al. Human recombinant thrombomodulin (rTM) improves the neurological function in a murine heatstroke model. 45rd Critical Care Congress. 2016年2月21日. Orland, Florida USA.

宮本和幸, 他. ヒト遺伝子組み換えトロンボモジュリン(rTM)の熱射病後神経障害に対する効果についての検討. 第43回日本集中治療医学会総会. 2016年2月12日. 神戸.

宮本和幸, 他. 多臓器不全を合併したスズメバチ多数刺傷の1例. 第66回日本救急医学会関東地方会. 2016年2月6日. 東京.

宮本和幸, 他. 肝機能障害・横紋筋融解症を合併したスズメバチ刺傷の1例. 第30回日本中毒学会東日本地方会. 2016年1月23日. 東京.

宮本和幸, 他. マウス熱射病モデルにおけるサイトカインの推移について. 第19回CCM輸液・栄養研究会. 2015年11月21日. 大阪.

宮本和幸, 他. マウス熱射病モデルにおけ

る脳内のサイトカインの推移について. 第43回日本救急医学会総会. 2015年10月23日. 東京.

宮本和幸, 他. 偽膜にカニューレが迷入し換気困難となった重症気道熱傷の1例. 第41回日本熱傷学会総会. 2015年6月19日. 名古屋.

宮本和幸, 他. 胸腔ドレーン挿入による外側胸動脈損傷からの持続出血で止血に難渋した1例. 第42回日本集中治療医学会. 2015年2月11日. 東京.

宮本和幸, 他. 急性膵炎を契機に発見された先天性胆道拡張症(Choledochocoele)の1例. 第65回日本救急医学会関東地方会. 2015年2月7日. 横浜.

Miyamoto K, et al. OS-1, an oral rehydration solution, improves thermoregulation in a mouse heatstroke model. 44rd Critical Care Congress. 2015年1月19日. Phenix, Alizona USA.

宮本和幸, 他. マウス熱射病モデルにおける経口補水[水・経口補水液(OS-1)]の有用性について. 第18回CCM輸液・栄養研究会. 2014年11月29日. 東京.

宮本和幸, 他. マウス熱射病モデルにおける経口補水液の検討. 第42回日本救急医学会総会. 2014年10月28日. 福岡.

宮本和幸, 他. 観血的動脈圧ラインから持続動注(グルコン酸カルシウム)が著効したフッ化水素酸による化学熱傷の1例マウス. 第36回日本中毒学会総会. 2014年7月25日. 東京.

宮本和幸, 他. マウス頭部外傷モデルにおけるPACAPの神経保護作用についての検討. 第119回日本解剖学会. 2014年3月29日. 下野市.

田中俊生, 宮本和幸, 他. 肺挫傷からの持続する気道出血に対して可動性ブロッカー付気管内チューブ(ユニベントチューブ®)を用いた選択的気管枝ブロックが奏効した1例. 第41回日本集中治療医学会. 2014年2月27日. 京都.

宮本和幸, 他. バソプレシンが著効した麻痺性イレウスから敗血症にいたった重症パーキンソン病の1例. 第41回日本集中治療医学会. 2014年2月28日. 京都.

広瀬優, 宮本和幸, 他. 診断と治療方針に苦慮した重症肺血栓塞栓症の1例. 第64回日本救急医学会関東地方会. 2014年2月1日. 横浜.

宮本和幸, 他. 下咽頭腫瘤による気道閉塞と診断し輪状甲状靱帯切開をおこなった1例. 第64回日本救急医学会関東地方会. 2014年2月1日. 横浜.

Miyamoto K, et al. Oral rehydration solution (OS-1) improves thermoregulation after experimental heatstroke of mice. 43rd Critical Care Congress. 2014年1月12日. San Francisco, California, USA.

Ohtaki H, Miyamoto K, Shibato J, et al.

Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppressed classical activation of microglial cells. SFN2013. 2013年11月10日. San Diego, CA, USA.

②宮本和幸, 他. マウス熱射病モデルにおける経口補水(水・経口補水液(OS-1))の有用性について. 第17回CCM輸液・栄養研究会. 2013年11月30日. 東京.

②Dohi K, Miyamoto K, et al. Hydrogen in drinking water reduces brain edema after traumatic brain injury in mice. 2013年10月25日. Tokyo, Japan.

③Dohi K, Miyamoto K, et al. Oxidative stress during therapeutic hypothermia in patients with post-cardiac arrest syndrome. 2013年10月24日. Tokyo, Japan.

④Miyamoto K, et al. Effect of water intake on heatstroke of mice. The 7th Asian Conference on Emergency Medicine. 2013年10月24日. Tokyo, Japan.

⑤宮本和幸, 他. 急性膵炎を契機に発見された choledochocoele の1例. 第86回日本消化器内視鏡学会. 2013年9月12日. 東京.

⑥土肥謙二, 宮本和幸, 他. PCASの病態に忠実な全身虚血再灌流動物モデルについて. 第16回日本臨床救急医学会. 2013年7月13日. 東京.

⑦田中俊生, 宮本和幸, 他. 胸部大動脈瘤破裂に伴う右血液胸に対して中心静脈カテーテルを誤留置した1例. 2013年7月13日. 東京.

⑧宮本和幸, 他. 感染性腸炎(ノロウイルス)を契機に上行結腸癌が先進部となり腸重積に至った1例. 第16回日本臨床救急医学会. 2013年7月13日. 東京.

⑨大滝博和, 宋丹丹, 宮本和幸, 他. 経静脈および動脈系を介したヒト骨髄間葉系幹細胞移植によるマウス脳梗塞抑制効果の比較. 第118回日本解剖学会. 2013年3月28日. 高松 香川県.

⑩宮本和幸, 他. マウス頭部外傷モデルにおけるエダラボンの脳血流への影響についての検討. 第118回日本解剖学会. 2013年3月28日. 高松 香川県.

⑪宮本和幸, 他. 健診を契機に発見された巨大虫垂粘液嚢腫の1例. 第74回日本臨床外科学会. 2012年11月29日. 東京.

⑫Ohtaki H, Miyamoto K, Ohara K, et al. Interleukin-1 (IL-1) may contribute to develop classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. 11th International Society of NeuroImmunology Congress, 2012年11月8日, Boston, USA.

⑬Dohi K, Miyamoto K, Satoh K, et al. Oxidant and Antioxidant Levels During Brain Hypothermia Therapy After Cardiopulmonary Resuscitation. AHA Congress, 2012年11月8日. Chicago, USA.

〔図書〕(計 4 件)

宮本和幸, 他. 羊土社, ICU における肝機能障害. ICU 合併症の予防策と発症時の戦い方, 2016, 9.

宮本和幸. へるす出版, . リフィーディング症候群 救急医学, 2015, 6.

山本大輔, 宮本和幸. へるす出版, 非外傷性腹腔内出血(急性腹症-決断のプロセス) 救急医学, 2015, 6.

宮本和幸, 他. 羊土社, ICU での t-PA の使用方法, 2013, 8.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮本 和幸 (MIYAMOTO Kazuyuki)

昭和大学 医学部 救急医学講座・助教

研究者番号 : 80555087

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

大滝 博和 (OHTAKI hirokazu)

昭和大学 医学部 顕微解剖学・講師

研究者番号 : 20349062