

謝測定は、吸収補正に関する問題点を改善することにより、十分な精度を確保することが可能であった。今後、頭部外傷患者の脳機能測定の有効な手法となりうると考えられた。

#### F. 研究発表

1. Ibaraki M, Shimosegawa E, Miura S, Takahashi K, Ito H, Kanno I, Hatazawa J. PET Measurements of CBF, OEF, and CMRO<sub>2</sub> without Arterial Sampling in Hyperacute Ischemic Stroke: Method and Error Analysis. *Ann Nucl Med* 18: 35-44, 2004.
2. Hosoi R, Okada M, Hatazawa J, Gee A, Inoue O. The Effect of Astrocytic Energy Metabolism Depressant on <sup>14</sup>C-Acetate Uptake in Intact Rat Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 188-190, 2004.

3. Piao R, Oku N, Kitagawa K, Imaizumi M, Matsushita K, Yoshikawa T, Takasawa M, Osaki Y, Kimura Y, Kajimoto K, Hori M, Hatazawa J. Cerebral hemodynamics and metabolism in adult Moyamoya disease: Comparison of angiographic collateral circulation. *Ann Nucl Med* 18: 115-121, 2004.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1.脳ブドウ糖消費量定量値  
Hybrid PETとPETの比較

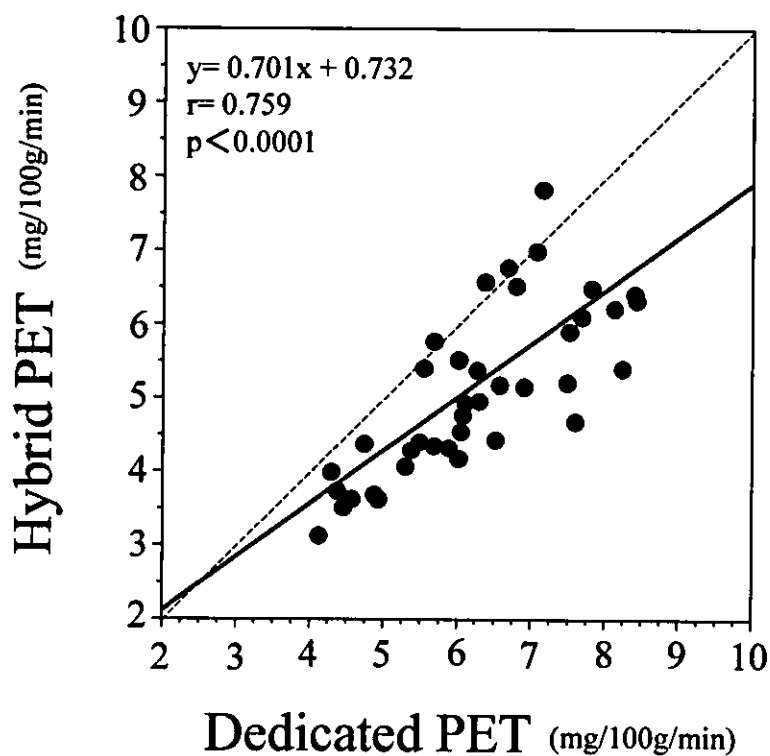


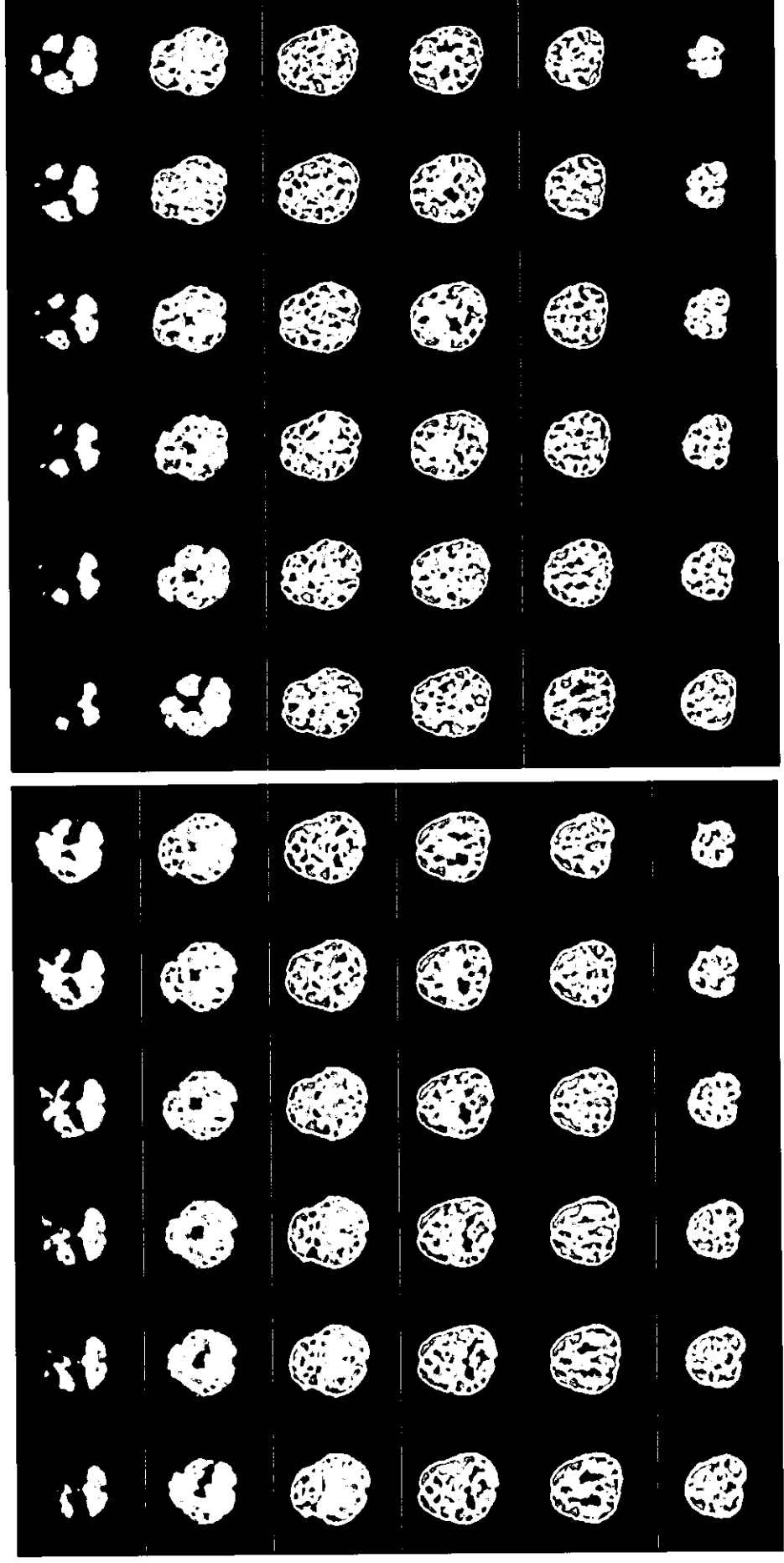
図2.脳ブドウ糖消費量定量値  
Hybrid PETとPETの比較

	Dedicated PET (mg/100g/min)	Hybrid PET (mg/100g/min)	P Value
Frontal cortex	7.18±0.67	6.41±1.05	0.221
Temporal cortex	6.74±0.68	5.72±0.90	0.074
Parietal cortex	7.00±0.95	5.74±0.78	0.103
Occipital cortex	6.89±0.64	5.35±1.13	0.076
Basal ganglia	7.32±1.21	5.65±1.01	0.054
Thalamus	6.26±0.54	4.88±0.57	0.028
Caudate nuclei	6.45±1.34	5.40±0.88	0.096
Pons	4.43±0.33	3.59±0.36	0.022
Cerebellum	5.54±0.32	4.50±0.62	0.060

図3.

Hybrid PET

Dedicated PET



R

L

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

「外傷性脳損傷後の高次神経機能の変化について」

分担研究者 池尻 義隆 大阪大学大学院医学系研究科精神医学 講師  
協力研究者 数井 裕光 大阪大学大学院医学系研究科精神医学 助手  
三好 紀子 大阪大学大学院医学系研究科精神医学

研究要旨： 外傷性脳損傷患者の高次脳機能障害の実態と回復過程を知るため、大阪大学医学部附属病院救命救急センターへ入院した頭部外傷患者のうち高次脳機能障害が疑われた患者に対して、意識障害から回復し検査可能となった時点(受傷後約1週間～1ヶ月)およびその後6ヶ月毎に、言語性記憶、視覚性記憶、遅延再生などの記憶機能と言語機能、前頭葉機能について評価を行った。対象となった39例(男28例、女11例、平均年齢34才(15～68才))において、受傷原因は交通外傷が最も多く34例、脳損傷部位は左側頭葉が最も多く、初期評価時の認知機能障害は前頭葉機能障害が最も多くみられた。追跡評価をおこなった23例の所見から、記憶機能障害は、右半球損傷、左半球損傷、両側半球損傷の順で回復しやすいが、一方、前頭葉機能障害はいずれの損傷においてもより回復しづらいことが示唆された。

### A. 研究目的

外傷性脳損傷については、低体温療法等種々の治療法の進歩により生命予後が著しく改善した。それに伴って救命された患者の生活的・社会的予後が新たな問題となっている。とりわけ、麻痺などの運動障害が軽度であるにもかかわらず、生活場面での認知や行動の障害が目立つ、いわゆる高次脳機能障害が注目されている。本研究では、外傷性脳損傷後の認知機能障害を経時的に評価し、

脳損傷部位との関連を検討することによって、その障害の実態と回復過程を明らかにすることが目的である。

### B. 対象と方法

対象は、平成13年4月1日以降に当院救命救急センターに入院した頭部外傷患者のうち、いわゆる高次脳機能障害が疑われた患者で、かつ神経心理学的検査が可能であった39例(男28例、女11例)、平均年齢34才(15～68才)であ

る。

方法は、各患者に、意識障害から回復し検査可能となった時点(受傷後約1週間~1ヶ月)(初期評価)と、その後6ヶ月毎に以下の認知機能検査をおこない(追跡評価)、MRIで同定された損傷脳部位との関連を検討した。認知機能検査は、全般性認知機能評価として Mini Mental State Examination(MMSE)、言語

機能評価として標準失語症検査(SLTA)、記憶機能評価としてWechsler Memory Scale-Revised(WMS-R)、前頭葉機能評価として Raven's colored progressive matrices(RCPM)、Trail making test(TMT)、語想起課題を用いた。なお、追跡調査を実施した症例の一部では前頭葉機能検査を実施していないので、結果の解析からは除外した。

## C. 研究結果

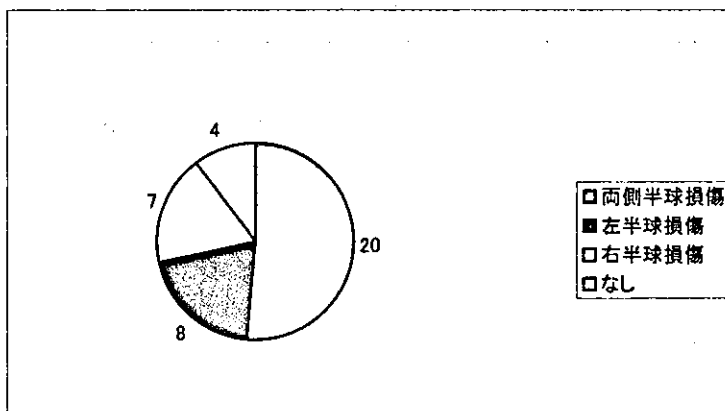
### 1. 症例の内訳

#### (1) 頭部外傷受傷原因

交通外傷が最も多く34例であった。5例では転落事故であった。

#### (2) 脳損傷部位

左右大脳半球別では、両側半球損傷が最も多く20例、一側損傷では左半球損傷が8例、右半球損傷が7例であった。また、脳損傷のない症例が4例あった。



(数字は症例数)

脳葉別では、前頭側頭葉損傷が最も多く11例、次いで側頭葉損傷が6例、前頭葉損傷例が4例、前頭後頭葉損傷3例、前頭葉脳梁損傷が2例、その他は、前頭側頭後頭葉損傷、前頭側頭脳梁損傷、前頭頭頂葉損傷、前頭葉視床脳梁損傷、側頭葉小脳損傷、脳梁中脳損傷例が各1例ずつであった。頭頂葉、後頭葉の単独損傷例は認められなかった。

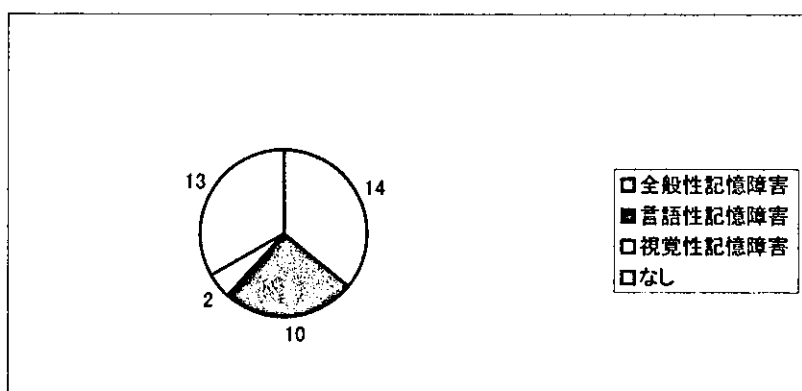
## 2. 認知機能検査の結果

### (1) 初期評価

初期評価では、39 例のうち 34 例で何らかの認知機能障害を認め、5 例では実施した検査では認知機能障害を認めなかった。

認知機能障害別にみると、39 例中 30 例で前頭葉機能障害を、26 例で記憶機能障害を、9 例で言語機能障害を認めた。

記憶機能障害では、14 例で全般性記憶障害(言語性記憶障害と視覚性記憶障害のいずれも)を、10 例で言語性記憶障害を、2 例で視覚性記憶障害を認めた。



(数字は症例数)

言語機能障害では、特に書字障害の成績低下が目立った。

前頭葉機能障害では、語想起障害での成績低下を 16 例に、TMT での成績の低下を 15 例に、RCPM での成績低下を 15 例に認めた。

### (2) 追跡評価

6 ヶ月後の追跡評価は、初期評価を受けた 39 例のうち 23 例で実施したが、それ以降の追跡評価を実施しえた症例はわずかであった。6 ヶ月後の追跡評価を受けた 23 例の全例で何らかの認知機能障害を認めた。

認知機能障害別にみると、23 例中 7 例で前頭葉機能障害を、6 例で記憶機能障害を、1 例で言語機能障害を認めた。

記憶機能障害では、1 例で全般性記憶障害を、5 例で言語性記憶障害を認めた。

言語機能障害では、特に呼称の成績低下が目立った。

### (3)回復パターン

6ヶ月後の追跡評価を受けた23例の初期評価と追跡評価を比較行った。

記憶機能障害については、追跡評価で記憶機能障害の十分な改善を認めたもの8例、記憶機能障害の一部で改善を認めたもの3例、記憶機能障害の改善を認めなかったもの2例、初期評価において記憶機能障害を認めず追跡評価でも認めなかったもの10例であった。

言語機能障害については、追跡評価で言語機能障害の十分な改善を認めたもの3例、言語機能障害の改善を認めなかったもの1例、初期評価において言語機能障害を認めず追跡調査でも認めなかったもの19例である。

## 3. 脳損傷部位と認知機能障害の関連

### (1)脳損傷部位と初期評価結果

両側半球損傷では全般性記憶障害が多く10例、左半球損傷では言語性記憶障害が多く7例、右半球損傷では前頭葉機能障害が多く4例であった。

### (2)脳損傷部位と追跡評価結果

両側半球損傷では言語性記憶障害が多く4例、左半球損傷では言語性記憶障害が多く1例、右半球損傷では前頭葉機能障害がみられた。

### (3)脳損傷部位と回復パターン

両側半球損傷では記憶機能障害の回復が乏しく、右半球損傷では記憶機能障害の改善がみられるが、前頭葉機能障害が持続することがほとんどであった。また、記憶機能障害は脳損傷部位別の回復をみると、両側半球損傷、左半球損傷、右半球損傷の順で障害が持続していた。一方、前頭葉機能障害は、検討した症例のなかには徐々に改善がみられている例があった。

## D. 考察

本研究の結果では、受傷原因は交通外傷が最も多く、脳損傷部位は左側頭葉が最も多く、初期評価時の認知機能障害は前頭葉機能障害が最も多かった。追跡評価から、記憶機能障害は、右半球損傷、左半球損傷、両側半球損傷の順で回復しやすいが、一方、前頭葉機能障害はいずれの損傷においてもより回復しがたく持続した。

脳損傷部位と認知機能障害の関連では、前頭葉機能障害は高頻度に認められ、特に脳損傷部位との関連は指摘できない。一方、記憶機能障害に関しては、左半球限局損傷例で

はほぼ全例で言語性記憶障害を認め、右半球限局損傷例では左半球限局損傷例に比較すると記憶機能障害を認めない症例が多かった。両側性の障害例では、全般性記憶障害を認める症例が多かった。

過去の報告では、頭部外傷における言語性記憶障害回復の困難な要因として、左半球前半部の挫傷や、側頭葉内側面の損傷、びまん性軸索損傷が挙げられている。本研究において追跡評価時に記憶機能障害が十分改善しなかった症例では、左前頭葉の損傷が認められ、同部位が回復しがたい記憶機能障害に関連していることが示唆された。しかし、記憶機能障害の回復が認められた症例では、明らかな脳損傷部位との関連は認められなかった。

外傷性脳損傷における認知機能障害に対する治療的アプローチは、一般に、患者に自らの障害の認識を促し、その障害をカバーする代償方法を見つけ、代償的行動を獲得させることであるとされている。しかし、実際には、患者の認知機能障害に対する自覚、いわゆる病識が低下している場合が多いことから、なかなか困難な作業である。また、この病識低下は、患者に必要なリハビリテーションを困難にするだけでなく、社会生活上の支障を生じるものとなる。本研究においても、記憶機能障害が改善した後にも他の認知機能障害や精神症状についての病識低下が持続し、社会生活上の支障が持続する症例が認められた。今後は、認知機能障害だけでなく、患者の病識を含む精神症状の評価も同時におこなっていくことが重要と考えられる。

## E. 結論

本研究の結果から、頭部外傷による脳損傷部位は左側頭葉が最も多く、認知機能障害では前頭葉機能障害が最も多くみられた。回復は、記憶機能障害は、右半球損傷、左半球損傷、両側半球損傷の順で回復しやすいが、一方、前頭葉機能障害はいずれの損傷においてもより回復しがたいことが示唆された。

## F. 研究発表

1. 論文発表      なし
2. 学会発表      なし

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得      なし
2. 実用新案登録      なし
3. その他      なし



## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

「神経細胞の樹状突起における蛋白質合成をリアルタイムに可視化する手法の確立」

分担研究者 森 泰文

大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻ポストゲノム疾患解析学講座  
プロセッシング機能形態分野 助手

研究要旨:近年、神経細胞のシナプスにおいて細胞体とは独立した翻訳が行われる可能性が示唆されている(local translation)。しかし樹状突起や成長円錐に局在する mRNA からの蛋白質合成が外部からの刺激によりどのように制御され、さらに局所での翻訳が神経細胞にどのような影響を与えるのかについては未解明な点が多い。その理由のひとつが mRNA から蛋白質への翻訳がおこなわれたということをリアルタイムに解析するための手段が存在しないからである。これまでの研究手法は翻訳の最終産物である蛋白質量に依拠している。しかし蛋白質の量は翻訳以外の様々な不確定要因による影響を受けるため、翻訳動態の指標としては不適切である。そこでわれわれは翻訳開始時に起きる翻訳開始因子どうしの分子間相互作用の変化を FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) を用いて可視化することにより、翻訳の過程そのものを指標とする手法の開発を考案した。翻訳開始因子複合体のなかで直接相互作用を起こす eIF2 $\beta$  サブユニットと eIF5 のそれぞれを CFP および YFP で標識した蛍光プローブをラット海馬神経細胞に強制発現させ、結合・解離の動態を FRET でモニタリングする方法を採った。神経細胞を BDNF や ephrinB2 で刺激すると、樹状突起において青色励起波長で得られる吸収波長が長波長側から短波長側へ、すなわち黄色から青色へ変移することがわかった。

### A. 研究の目的

これまで翻訳という現象は最終産物である蛋白質の量的な変化を指標として解析が行われてきた。例えば蛍光蛋白質をレーザーとしてその蛍光強度の変化を生

細胞で観察する手法は、一見、生細胞における翻訳レベルを評価するために有用な方法論に見える。しかしこの方法で明らかになるのは、あくまである特定の時間、特定の位置における蛋白質量であって、翻訳活性の状態ではない。つまりこれまで

の方法論は蛋白質の量的な増加が全て翻訳の促進によるものとして解析されてきたところに問題があると考えられる。現実には細胞内の局所的な蛋白質量は翻訳以外のさまざまな要因により規定されている。例えば蛋白質が移動し特定の位置に集まる、もしくはその位置から離れることで、翻訳レベルとは無関係に蛋白質量は変動する。さらに蛋白質は常に分解され更新されている。したがって分解速度の局所的な変化も蛋白質量を規定する大きな要因となる。以上のことを考え合わせると、純粹に翻訳レベルの増減という現象を評価したいのであれば、最終産物である蛋白質に依存している従来の方法論は不完全であるということになる。そこで我々はこの問題を解決する目的で蛋白質が翻訳される過程に着目し、翻訳開始因子の相互作用をリアルタイムで可視化することを考えた。この新たな方法論により神経細胞の樹状突起や軸索末端で翻訳がどのように調節されているのかを細胞の構造に影響を与えることなく、またリアルタイムに可視化することが可能になる。この手法により、局所における翻訳が神経細胞の構造的・機能的変化にどのように関与しているのかがシナプスのレベルで解析できるようになることが期待できる。

## B. 研究方法と結果

### B. 研究方法

#### 1) FRET プローブの検討

異なる吸収波長を有する蛋白質である YFP と CFP を eIF2 $\beta$  と eIF5 にそれぞれ融合させた蛋白質を発現するプラスミドを作製した。

YFP-eIF2 $\beta$ 、CFP-eIF5 を CMV プロモーターの下流から発現させるコンストラクトを作製し、NIH-3T3 細胞に強制発現させたが、十分な発現を得られず、また相互作用を確認することができなかつたので、この2種類のプローブをスパーサーを介して1分子に再構成し(YFP-eIF2 $\beta$ /eIF5-CFP)、一過性に強制発現させた。NIH-3T3 細胞は 10%ウシ血清存在下で培養し、70%コンフルエントに達したところでリポフェクション法を用いてトランスフェクトをおこなった。発現を確認した後、無血清培地で 24 時間培養し、20%v/v になるようにウシ血清を添加し 100W 水銀ランプでプローブを励起させなら Leica 社製 DM IRE2 microscope で細胞の観察をおこなった。画像の解析処理は MetaMorph software でおこなった。

#### 2) ラット海馬初代神経細胞を用いての観察

胎生 18 日目のラット胎児脳から海馬を摘出し、ポリエチレンイミンでコートしたガラスボトムディッシュ上にニューロンの初代培養系を確立した。B27 サプリメント (Invitrogen 社) を添加した DMEM で 21 日間培養すると、樹状突起上のシナプスはスパインとして観察された。

海馬培養神経細胞にはアデノウイルスを用いることにした。YFP-eIF2 $\beta$ /eIF5-CFP をアデノウイルス発現ベクターにクローニングし、HEK293A にトランスフェクトすることによりウイルス粒子を得た。ウイルス粒子は実験 2 日前に神経細胞へ感染させた。

### C. 研究結果

われわれが作製した YFP-eIF2  $\beta$  /eIF5-CFP 蛋白質が FRET プローブとして機能するかについての検討をおこなった。YFP-eIF2  $\beta$  /eIF5-CFP アデノウイルス粒子を感染させた HEK293A 細胞を 1% NP-40 で可溶化したライゼートを 433nm の青色励起波長で励起すると、475nm と 533nm に吸収波長のピークが出現した。475nm ( $Em_{475}$ ) は CFP の吸収波長であり、533nm ( $Em_{533}$ ) は YFP の吸収を示している。0.5%ウシ血清存在下で培養した、刺激非存在下で培養した細胞のライゼートからは  $Em_{533}$  のピークが現れた。すなわちプローブ内で蛍光エネルギーの CFP から YFP への転移が起こり、青色励起波長で黄色のプローブからの吸収波長が観測されたことになる。一方、細胞を 20%ウシ血清で刺激すると  $Em_{533}$  のピークが低下し、 $Em_{475}$  のピークが増大した。このことから血清刺激等の蛋白質合成を促進させる刺激の存在下では、eIF2  $\beta$  と eIF5 との分子内相互作用が減少し、FRET が起きにくくなっているものと考えられた。この反応はライゼートを RNA 分解酵素で処理しておく、 $Em_{533}$  のピークが見られなくなる、また同様の現象が eIF2  $\beta$  分子内から eIF5 との結合活性を欠失させた変異型プローブを用いても観察されることから、mRNA 上の翻訳開始点における特異的な分子間相互作用を捉えていることが証明された。

NIH-3T3 細胞に YFP-eIF2  $\beta$  /eIF5-CFP 蛋白質を発現させて、タイムラプス蛍光顕微鏡を用い 433nm 青色励起波長下で観察した。無血清培地で 24 時間培養し、20%ウシ血清で刺激すると、 $Em_{533}$  の低下が観察さ

れた。 $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値を pseudocolor として表わすと、2~3 分後かけて  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値は最大値に達するという結果が得られた。しかし、eIF2  $\beta$  分子内から eIF5 との結合活性を欠失させた変異型プローブでは  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値の上昇は見られなかった。また翻訳開始の阻害剤である tunicamycin や rapamycin で細胞をあらかじめ処理しておく  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値の変化は認められなかった。このことから YFP-eIF2  $\beta$  /eIF5-CFP は細胞内の翻訳レベルを反映して分子内相互作用を起こすことが証明できた。

そこで次にラット海馬初代培養神経細胞にプローブを発現させて、樹状突起上に形成されたスパイン内での  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値の変化を観察することにした。100ng/ml BDNF を含む培地に交換すると、樹状突起上の所々にスパイン様の突起が膨隆するのが観察できた。このような膨隆部分では  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値が平均 1.20 倍増大していた。突起の拡大が観察されなかったスパイン内では  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  の増大が認められなかった。

次にわれわれは ephrinB2 に注目した。ephrinB2 で海馬神経細胞を処理すると、スパインの数には影響を与えることなく、スパインの面積増大をともなう形態変化がおきることが報告されている。そこで 50  $\mu$ g/ml ephrinB2-Fc キメラ蛋白質 (Genzyme Techne 社) で培養海馬神経細胞を前処置した後、100ng/ml BDNF で刺激することにした。BDNF 単独での刺激では  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値が平均平均 1.15 倍の増加を認めるのみであったが、ephrinB2-Fc の前処理により膨大の観察されたスパイン部分では 1.32~1.85 倍の  $Em_{475}$  / $Em_{533}$  値の増大を見

た。このことから BDNF と ephrinB2-Fc との協調的な効果によりスパインの増大と、その部分での翻訳量の上昇が観察できた。

#### D. 考察

本研究において翻訳開始点における蛋白質の相互作用を利用した FRET プロブが、蛋白質合成の増加時においては蛍光エネルギーの転移反応の減少をおこし、 $Em_{475} / Em_{533}$  値の増大として観察できることが分かった。これは翻訳開始前の段階です。すでに翻訳開始因子は eIF2 $\beta$  や eIF5 を含む複合体を形成しており (multi-factor complex)、この複合体は mRNA に結合し開始コドンを認識すると、複合体としての分子間結合が解離するという現象と一致する。われわれはさらにこの分子プロブを用いて再生時の軸索で蛋白質の合成を観察したいと考えている。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Miyata S, Mori Y, Fujiwara T, Ikenaka K,

Matsuzaki S, Oono K, Katayama T, and Tohyama M. Local protein synthesis by BDNF is potentiated in hippocampal neurons exposed to ephrins. *Brain Res Mol. Brain Res.*, 2004 (in press).

##### 2. 学会発表

ラット海馬神経細胞の樹状突起における局所的翻訳のリアルタイムな可視化システムの構築 宮田信吾、森泰丈、藤原達司、遠山正彌 第27回日本神経科学・第47回日本神経化学会合同大会 (於大阪)

#### F 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

Src family kinase inhibitor PP1 による脊髄損傷後の二次的損傷抑制効果の検討

分担研究者 吉峰俊樹

大阪大学大学院 医学系研究科 神経機能制御外科学講座 教授

研究要旨:脊髄損傷後には損傷部周囲の血管透過性亢進を来し、その結果、浮腫の形成と炎症反応がもたらされ二次的損傷が進行すると考えられる。この血管透過性亢進にはVascular endothelial growth factor (VEGF)の関与が報告されている。また近年 VEGF のシグナル伝達系の下流に存在する Src family kinase の活性化が、これに密接に関連していることが判明し、Src family kinase を標的とした薬物による治療法が注目されている。ピラゾロピリミジン化合物である 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP1) は強力な Src family kinase inhibitor であり、最近 PP1 投与により脳虚血モデルにおいて梗塞巣の著明な縮小を認めたことが報告されている。本研究では、脊髄損傷モデルを用いて PP1 による二次損傷の抑制ならびに機能回復の可能性を明らかにした。これらの結果から、今後中枢神経損傷の新たな治療法の開発が可能であると考えられた。

### A. 研究目的

近年の救急医療の進歩により中枢神経損傷患者の救命率は向上してきたが、慢性期に至っても重篤な機能障害のために社会復帰がかなわない患者が依然多く存在する。また、重症頭部外傷や脊髄損傷などの中枢神経損傷は社会や家庭の重要な担い手である青壮年層に最も多いことから機能障害の遺存は患者本人・家族に重大な問題を提起するばかりでなく、社会的に大きな問題となっている。中枢神経損傷後の機能回復には、その病態の解明と一時損傷に引き続い

ておこる二次損傷の軽減が必要であるがその詳細は明らかではなく有用な治療法も確立されていない。以上のことから本研究では主に脊髄損傷モデルを用いてその病態の解明ならびに二次損傷の軽減、治療法の開発を行った。

### B. 研究の方法

脊髄損傷後には損傷部周囲の血管透過性亢進を来し、その結果、浮腫の形成と炎症反応がもたらされ二次的損傷が進行すると考えられる。この血管透過性亢進には Vascular endothelial growth

factor (VEGF)の関与が報告されている。また近年 VEGF のシグナル伝達系の下流に存在する Src family kinase の活性化が、これに密接に関連していることが判明し、Src family kinase を標的とした薬物による治療法が注目されている。ピラゾロピリミジン化合物である 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP1) は強力な Src family kinase inhibitor であり、最近 PP1 投与により脳虚血モデルにおいて梗塞巣の著明な縮小を認めたことが報告されている。脊髄損傷においても PP1 による Src family kinase の阻害が二次的損傷を抑制しうるであろうと推察されるが、その詳細は未だ明らかにされていない。本研究ではラットの脊髄損傷モデルを用いて PP1 による脊髄損傷後の二次的損傷の抑制効果について、浮腫の形成と炎症反応に焦点を当てて検討することを目的とした。

雌性 Wistar ラットに Sugita クリップ(把持力 70g)を用いて spinal cord compression を行い、脊髄損傷モデルを作成した。損傷 10 分後に PP1(PP1 群)または溶解液のみ(対照群)を腹腔内投与し、1、3、7 日後に脊髄を摘出し、急速凍結保存し矢状断切片を作成した。

HE 染色にて挫傷範囲の同定を行い画像解析ソフトにて面積の定量を行った。また ABC 法による免疫組織染色にて、抗 VEGF 抗体を用いて VEGF 発現を、抗 IgG 抗体を用いて浮腫の程度を、また抗 ED-1 抗体を用いてマクロファージの浸潤を評価することにより炎症の程度を、各々比較検討した。マクロファージの浸

潤範囲については画像解析ソフトにて面積の定量を行った。

浮腫を評価する別の方法として、PP1 群と対照群に対して 1、3、7 日後に脊髄を摘出し、dry-weight 法を用いて浮腫の定量を行った。また、炎症反応の強さを評価するために、炎症時に認められる TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の mRNA 発現を損傷 6 時間後に RT-PCR 法にて測定し、比較検討した。

### C. 結果

損傷 1 日後の挫傷範囲は両群で差を認めず、最初の損傷は両群とも同等であると考えられた。一方、損傷 3 日後では PP1 群において挫傷範囲の面積が対照群と比べて約 35%縮小しているのを認めた(p<0.01)。

VEGF の発現は損傷 3、7 日後に主に損傷部周囲のニューロンとグリア細胞に認められ、3 日後がピークであった。発現の程度について両群で明らかな差は認めなかった。

浮腫の程度は両群とも損傷 3 日後でピークとなり同様のパターンを示したが、損傷 1、3、7 日後のいずれも PP1 群で有意な浮腫の軽減を認めた(p<0.05)。

マクロファージの浸潤は、損傷 1 日後では両群とも損傷部に軽度認めるのみであった。一方 3 日後においては、PP1 群でマクロファージの浸潤が損傷部とその周囲に局限しているのに対して、対照群ではより広範囲に浸潤を認めた。浸潤範囲の面積を両群で比較したところ、PP1 群で約 60%の縮小を認めた(p<0.005)。7 日後では、3 日後よりも対照

群での浸潤範囲は縮小を認めたものの、依然 PP1 群と比べると広範囲であり、両群間に有意な差を認めた( $p < 0.005$ )。

損傷 6 時間後の TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の mRNA 発現はいずれも PP1 群で有意な抑制を認めた(TNF $\alpha$ :  $p < 0.005$ , IL-1 $\beta$ :  $p < 0.05$ )。

#### D. 考察

これらの結果より、VEGF の発現は両群で同様に認められたが、浮腫の形成と炎症反応の範囲、炎症性サイトカインの発現はいずれも PP1 群において有意な軽減を示すことが明らかとなった。これらの所見は VEGF のシグナル伝達系の下流に位置する Src family kinase の活性を阻害する PP1 の効果を反映したものと考えられた。

#### E. 結論

本研究により Src family kinase inhibitor である PP1 の投与が脊髄損傷後においても浮腫の形成や炎症反応を抑制することが示され、二次的損傷の軽減に寄与することが明らかとなった。投与期間や投与量、それに副作用の検討など課題は多いものの、更なる検討によって脊髄損傷の治療に応用できる可能性が考えられた。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Akiyama C, Yuguchi T, Nishio M, Tomishima T, Fujinaka T, Taniguchi M, Nakajima Y, Kohmura E, Yoshimine T:

Src family kinase inhibitor PP1 reduces secondary damage after spinal cord compression in rats. J Neurotrauma. 2004, 21: 923 - 931.

##### 学会発表

1. 秋山智洋、湯口貴導、富島隆裕、豊田真吾、藤中俊之、西尾雅実、岩月幸一、中島義和、吉峰俊樹. MCI-186 による脊髄外傷後の 2 次的損傷に対する効果の検討. 日本神経外傷学会, 2004.3.26, 東京.

#### G. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他    | なし |

## 分担研究報告書

(脳科学研究事業「外傷性中枢神経障害のリハビリテーションにおける科学的解析法と治療法の確立に関する研究」)

「脳浮腫における水選択性チャンネル蛋白(AQP)の役割に関する研究」

分担研究者 種子田 護 近畿大学医学部脳神経外科学 教授  
研究協力者 片岡 和夫 近畿大学医学部脳神経外科学 助教授

研究要旨:脳損傷では損傷組織の浸透圧上昇が指摘されている。水は浸透圧勾配により移動し浮腫を生じる。Aquaporin4 (AQP4)は脳における水チャンネルで、水はAQP4 を通って移動する。損傷部位での浸透圧上昇は周囲アストロサイトの AQP4 発現を上昇させる。増加した水チャンネル AQP4によりさらに浮腫は悪化する。低体温は AQP4 発現を抑制し浮腫を軽減する可能性が明らかとなった。

### A. 研究目的

脳損傷において脳浮腫が発生し病態を悪化させる。その制御は急性期脳損傷の治療の中心となっている。最近その存在が明らかとなった aquaporin (AQP)は生理的状态では水の出入を制御するチャンネル蛋白である。脳では AQP のサブタイプの一つである AQP4 が恒常的に発現し、脳内の水代謝に重要な役割を担っている。しかし脳損傷病態下でのすなわち脳浮腫の病態における水チャンネル AQP4 の役割については明かではない。脳浮腫病態における AQP4 の役割について検討した。

### B. 研究方法

in vitro 実験:マウス由来のアストロサイト細胞を分離し培養系を確立した。アストロサイ

ト培養細胞に高浸透圧刺激を加えた。さらに、低温度養条件下において高浸透圧刺激を加えた。培養細胞より RNA を抽出し AQP4 mRNA 発現について高感度定量的 PCR 装置を用いた quantitative RT PCR 法にて検討した。

in vivo 実験:マウス脳に stab wounds を加えた。経時的に損傷脳の脳水分含有量を乾燥重量法にて検討した。損傷脳より RNA を抽出し AQP4 mRNA 発現について高感度定量的 PCR 装置を用いた quantitative RT PCR 法にて検討した。

### C. 研究結果

in vitro 実験:アストロサイト培養細胞は AQP 4 mRNA を恒常的に発現していた。37°C の常温下高浸透圧(浸透圧 375mOsm)環境下では高浸透圧負荷 48 時



間後より AQP 4 の mRNA 発現増加を示した。29, 32, 34°C の低体温環境下では高浸透圧による AQP4 mRNA の発現上昇の抑制が認められた。

in vivo 実験: マウス stab wound モデルでは脳損傷後 24 時間では脳水分含有量の増加は認めず, また AQP4 mRNA 発現量も変化を認めなかった。脳損傷後 48 時間後より脳水分含有量の増加すなわち外傷性脳浮腫の発生と AQP4 mRNA 発現上昇を認めた。

#### D. 考察

生体にとって水分の制御は極めて重要である。最近, 生体内での水移動に関する分子レベルでの研究が進み, 水選択性チャンネル蛋白・aquaporin (AQP) が発見された。生理的条件下では細胞内のみならず細胞外腔における水移動は多くの場合浸透圧格差に伴う水拡散により行われており, その水の通路が AQP と考えられている。脳におけるアストロサイト細胞では定常状態においても, 今回負荷した培養条件が反映されるような病態下でも AQP4 が主たる水チャンネルの役割を担っている。脳組織における水の増加・脳浮腫は外傷性脳損傷でも発生し, 頭蓋内圧を亢進させ脳病態をさらに悪化させる。脳浮腫の制御は外傷性脳損傷の治療の重要な部分を占める。脳虚血・脳挫傷の脳損傷部では組織浸透圧が急速に上昇する。水は浸透圧勾配により脳損傷部位へ移動し脳浮腫が発生する。その上, 本研究が明らかにしたように損傷脳での浸透圧上昇が損傷部位内および周囲のアストロサイト細胞・AQP4 発現を増加させる。損

傷周囲脳での水チャンネル AQP4 増加は損傷部位への水移動を促進し脳浮腫病態を悪化させる。脳損傷急性期での低体温療法は脳浮腫の軽減をもたらす可能性が指摘されている。29, 32, 34°C の低温環境は高浸透圧刺激による AQP4 mRNA 発現上昇を抑制する。低体温療法における AQP4 発現抑制が脳浮腫治療につながりうると考えられる。

#### E. 結論

AQP4 は脳内での水分調節に関与する水チャンネルで, 脳由来のアストロサイトでは高浸透圧により AQP4 発現上昇が認められた。脳外傷・脳虚血においても組織浸透圧の上昇が指摘され, 水は浸透圧勾配により移動し, 脳浮腫の発生を生じる。マウス stab wound 脳損傷モデルにおいても AQP4 mRNA 発現上昇と外傷性脳浮腫の発生を同時に認めた。本研究により脳梗塞・脳挫傷における組織浸透圧上昇→脳浮腫発生→水チャンネル AQP4 発現増加→脳浮腫悪化という悪循環とも言うべき脳浮腫病態の一端をモレキュラーレベルで初めて解明することができた。低体温は高浸透圧による AQP4 発現上昇を抑制し脳浮腫治療につながると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Kitano M, Taneda M: Subdural patch graft technique for watertight closure of large dural defects in extended transsphenoidal surgery. Neurosurgery 54:653-660, 2004

2. Morita A, Okada Y, Kitano M, Hori T, Taneda M, Kirino T: Development of Hybrid Integrated Endoscope-holder System for Endoscopic Micro-neurosurgery. Neurosurgery 55: 926-932, 2004

る抑制. 第 63 回日本脳神経外科学会総会, 2004 年 10 月

#### 学会発表

1. 渡邊啓, 片岡和夫, 寺本佳史, 朝井俊治, 種子田護: 高浸透圧によるグリア細胞でのアクアポリン発現増加と低温によ

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得	なし
2. 実用新案特許	なし
3. その他	なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hayakata T, et al.	Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury.	Shock	22	102 - 107	2004
Ibaraki M, et al.	PET measurements of CBF, OEF, and CMRO2 without arterial sampling in hyperacute ischemic stroke: method and error analysis.	Ann Nucl Med	18	35 - 44	2004
Hosoi R, et al.	Effect of astrocytic energy metabolism depressant on <sup>14</sup> C-acetate uptake in intact rat brain.	J Cereb Blood Flow Metab	24	188 - 190	2004
Akiyama C, et al.	Src family kinase inhibitor PP1 reduces secondary damage after spinal cord compression in rats.	J Neurotrauma	21	923 - 931	2004
Fujinaka T, et al.	The Morphological and Neurochemical Effects of Diffuse Brain Injury on Rat Central Noradrenergic System.	Neurol Res	25	35 - 41	2003

## CHANGES IN CSF S100B AND CYTOKINE CONCENTRATIONS IN EARLY-PHASE SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY

Toshiaki Hayakata,\* Tadahiko Shiozaki,\* Osamu Tasaki,\* Hitoshi Ikegawa,\*  
Yoshiaki Inoue,\* Fujinaka Toshiyuki,<sup>†</sup> Hideo Hosotubo,\* Fujita Kieko,\*  
Testuji Yamashita,<sup>‡</sup> Hiroshi Tanaka,\* Takeshi Shimazu,\* and Hisashi Sugimoto\*

Departments of \*Traumatology and <sup>†</sup>Neurosurgery, Osaka University Graduate School of Medicine,  
Osaka, Japan; and <sup>‡</sup>Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc., Tokyo, Japan

Received 19 Feb 2004; first review completed 9 Mar 2004; accepted in final form 21 Apr 2004

**ABSTRACT**—S100B protein (S100B) has been described as a marker of brain injury. Various cytokines also increase in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with severe traumatic brain injury (TBI). Thus, we investigated early changes in the concentrations of CSF S100B and various cytokines after TBI and evaluated the relations of both S100B and cytokines to intracranial pressure (ICP) and prognosis. Twenty-three patients with severe TBI and a Glasgow Coma Scale score of 8 or less on admission were included in this study. CSF and serum samples were obtained on admission and at 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h after injury. CSF concentrations of S100B and CSF and serum concentrations of five cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and IL-10) were measured and compared. The CSF S100B concentration was increased for 6 h after injury and decreased thereafter. The CSF concentrations of IL-6 and IL-8 peaked within 6 h after injury; other cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10) were elevated for 24 h after injury and gradually decreased thereafter. Peak CSF S100B concentrations correlated significantly with ICP determined at the time CSF samples were taken ( $r^2 = 0.729$ ,  $P < 0.0001$ ). For the cytokines investigated, only the peak CSF IL-1 $\beta$  concentration correlated significantly and positively with the peak CSF S100B concentration ( $r^2 = 0.397$ ,  $P < 0.005$ ). Peak CSF concentrations of S100B ( $1649 \pm 415$   $\mu\text{g/L}$ , mean  $\pm$  SEM) and IL-1 $\beta$  ( $16.5 \pm 3.3$   $\text{pg/mL}$ ) in the 6 patients with high ICP were significantly higher than those ( $233 \pm 67$   $\mu\text{g/L}$ ,  $7.6 \pm 1.7$   $\text{pg/mL}$ , respectively) in the 17 patients with low ICP ( $P < 0.05$ ). The CSF S100B concentration ( $1231 \pm 378$   $\mu\text{g/L}$ ) in eight patients with an unfavorable outcome was significantly higher than that ( $267 \pm 108$   $\mu\text{g/L}$ ) in 15 patients with a favorable outcome ( $P < 0.05$ ). The CSF IL-1 $\beta$  concentration ( $14.8 \pm 3.4$   $\text{pg/mL}$ ) in eight patients with an unfavorable outcome tended to be higher than that ( $7.3 \pm 1.5$   $\text{pg/mL}$ ) in 15 patients with a favorable outcome ( $P = 0.057$ ). CSF concentrations of S100B and cytokines peak within 24 h after severe TBI and decrease gradually thereafter. CSF S100B and IL-1 $\beta$  may be useful as predictors of outcome in cases of severe TBI.

**KEYWORDS**—S100B, cytokine, cerebrospinal fluid, head injury, prognosis

### INTRODUCTION

S100B protein is an acidic calcium-binding protein that is present mainly in astroglial cells and Schwann cells (1). S100B is known to modulate glial fibrillary protein and the assembly of intermediate filaments in neuronal or glial cells (2). Elevated serum and cerebrospinal fluid (CSF) S100B concentrations have recently been reported in patients with neurologic disorders and are likely to reflect the degree of brain injury (3–9). Various cytokines are also elevated in the CSF of animals with experimentally induced central nervous system disorders (10, 11) and in humans with central nervous disorders (12, 13). These mediators of immune function are multifunctional and interact with each other, and they may contribute to deleterious secondary brain damage or play a neuroprotective role (14). Recently, increases in CSF S100B and cytokine concentrations have been reported in patients with traumatic brain injury (TBI) (7, 8, 15–19). However, not much is known about

changes in CSF S100B and cytokine concentrations during the early posttraumatic phase, especially during the first 24 h after injury. The relation between S100B and cytokines in TBI patients has not been well investigated. We examined changes in CSF S100B and cytokine concentrations in patients with severe TBI during the initial 96-h posttraumatic period and investigated whether the CSF S100B concentration correlates with the CSF cytokine concentrations. Because CSF concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-10 have been analyzed in severe TBI patients (16–22), we chose to examine these cytokines in the present study. We also assessed the relation of CSF S100B and cytokine concentrations to intracranial pressure (ICP), focal mass volume, and prognosis of such patients with TBI.

### MATERIALS AND METHODS

#### Patient population

Between 1997 and 2001, a total of 53 patients with a Glasgow Coma Scale (GCS) (23) score of 8 or less were admitted to the Department of Traumatology, Osaka University Graduate School of Medicine. Patients less than 10 years of age were excluded from this study. Five patients who suffered severe life-threatening injury to organs other than the brain were also excluded from this study. Serial CSF or serum samples could not be obtained from 25 of the remaining 48 patients; these 25 were, therefore, excluded. Of the 23 patients included in this study, 17 were male, and six were female. Their age averaged 40 years and ranged from 14 to 68 years. No patient had existing prior neurological disease. Informed consent for participating in the study was obtained from an appropriate member of each patient's family.

Address reprint requests to Tadahiko Shiozaki, MD, PhD, Department of Traumatology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2, Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: shiozaki@hp-emerg.med.osaka-u.ac.jp.

This study was supported by a grant from the Marine and Fire Insurance Association of Japan, Inc.; a Research on Brain Science grant from the Ministry of Health and Welfare in Japan (No. 15131001); and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology in Japan (No. 15390545).

DOI: 10.1097/01.shk.0000131193.80038.fl