

ラット脳挫傷モデルにおける Lipocalin-2 の意義
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

大滝遼

修了年 2021 年

指導教員 吉野篤緒

1 要約

頭部外傷による脳損傷は一次性脳損傷と二次性脳損傷に分けられる。一次性脳損傷は防ぐ術がないため、頭部外傷において治療の中心となるのは二次性脳損傷である。脳出血の拡大、進行性脳浮腫などによって状態が悪化すること **talk and deteriorate** [1-5]という概念がある。これは、来院時には意識レベルがよく会話 (**talk**) が可能であったにも関わらず、短時間で脳出血の拡大、脳腫脹の悪化などによって全身状態の悪化 (**deteriorate**) が急速に進行する臨床的に極めて重篤な病態である。実際の臨床現場において **talk and deteriorate** を予測することは難しく、患者の意識レベルやバイタルサイン、神経学的所見などの変化を観察し、画像検査を行って外科的治療介入の必要性を検討しているというのが現状である。しかしバイタルサインや神経学的所見の少しの変化を判断するのは容易ではなく、画像検査時にはすでに脳ヘルニアを起こしているケースも少なくない。そこで簡易的に **talk and deteriorate** を予測できるバイオマーカーがあれば、病態把握の一助になる可能性がある。過去に頭部外傷に関連するバイオマーカーはいくつか報告されているが、現在までに臨床において実用には至っていない[6, 7]。

そこで **Lipocalin-2** に注目した。**Lipocalin-2** は疎水性物質の輸送体として機能するリポカリンスーパーファミリーに属する 25kDa の分泌型糖タンパク質であり[8, 9]、炎症[10-12]、急性臓器障害（急性腎損傷や冠動脈性心疾患）[13, 14]、脂質異常[15, 16]、耐糖能異常[17, 18]、悪性腫瘍（特に肺癌、卵巣癌、乳癌など[19-25]）などに関連が報告されている。中枢神経系ではラットの **fluid percussion injury** (FPI) モデルにおいて外傷 1 日後に脳組織内で **Lipocalin-2** の有意な上昇を認めた報告[26]やマウスの脳虚血モデルにおいて脳虚血発症 24 時間後に **Lipocalin-2** が血液中や脳組織内で上昇した報告[27]があり、これらの報告では **Lipocalin-2** は脳組織内で活性化したアストロサイトから放出されている。頭部外傷による脳挫傷においてもアストロサイトの活性化が起きるため、活性化したアストロサイトから **Lipocalin-2** の放出が起きることが予想される。これまでの **Lipocalin-2** の動向及びアストロサイトの機能を踏まえた上で、研究仮説を立てた。頭部外傷による脳挫傷においてもアストロサイトの活性化が起り、**Lipocalin-2** が放出されることが予想され

る。また、脳挫傷後に脳組織中及び血液中の Lipocalin-2 濃度が上昇する可能性があるという二点である。

本研究はラット脳挫傷モデルを用いて、Lipocalin-2 の脳組織中、血液中の経時的変化について観察し、頭部外傷におけるバイオマーカーとして有用性について検討した。

脳挫傷モデルとして、定位的に等強度の脳挫傷を作製できる cortical contusion injury (CCI) を用いた[28]。Compression は軽症群で 1.0 mm、重症群で 2.0 mm に設定した[29, 30]。軽症群、重症群、無処置の Naïve 群を作製した。決められた時間（外傷 1 時間後、3 時間後、24 時間後）に脳組織検体を採取した。また、血液検体も決められた時間（外傷前、外傷直後、1 時間後、3 時間後、6 時間後、24 時間後）に採取した。Naïve 群は皮膚切開や骨窓形成は行わずに、深麻酔後に断頭し脳を摘出した。また重症度に関しては、挫傷後に硬膜が破れていないもの、もしくは破れているが脳が膨隆していないものを軽症群、硬膜が破れてかつ脳が膨隆しているものを重症群と判定した。

免疫組織染色では、抗 Lipocalin-2 抗体、アストロサイトを標識する抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、マイクログリアを標識する抗 Iba-1 抗体を用いて感作させ、共染するか確認した。PCR では脳組織中の Lipocalin-2 の発現の有無を確認した。Western blotting では脳組織中の各時間の Lipocalin-2 を測定した。また、アストロサイトの発現定量のために GFAP を、マイクログリアの発現定量のために CD11b を測定した。ELISA では脳組織中の各時間の Lipocalin-2 濃度及び血液検体中の各時間の Lipocalin-2 濃度を測定した。

統計解析には SPSS Statistics (version 21: IBM, USA) を使用した。2 群間の比較には t 検定また 3 群間以上の比較には one way analysis of variance (ANOVA) を使用した。連続測定データには repeated measure of ANOVA を使用した。その後の検定には Tukey の方法を用いた。P 値が 0.05 未満を有意とした。全てのデータは平均±標準偏差で表示した。

免疫組織染色では、脳挫傷周囲大脳皮質には Lipocalin-2 陽性細胞が存在し、これはアストロサイト及び一部のマイクログリアと考えられた。

PCRにてNaïve群、軽症群と重症群の挫傷側及び健常側の大脳皮質をサンプルとしてLipocalin-2の定性を行い、全てのサンプルでLipocalin-2 mRNAの発現を認め、群間の違いは認めなかった。

Naïve群、軽症群と重症群の挫傷側及び健常側の大脳皮質をサンプルとしてLipocalin-2の定量を目的としてWestern blottingを行った。Naïve群では 39.80 ± 3.94 であった。軽症群の脳挫傷周囲の大脳皮質では、外傷後1時間で 73.12 ± 15.46 、3時間で 107.84 ± 22.84 、24時間後で 136.10 ± 36.82 と上昇し高値を示した。Naïve群と軽症群の脳挫傷周囲の大脳皮質を比較すると外傷後1時間、3時間、24時間で有意な差を認めた ($p < 0.05$)。また、重症群の脳挫傷周囲の大脳皮質では、外傷後1時間で 76.42 ± 9.05 、3時間で 87.58 ± 7.80 、24時間後で 94.93 ± 22.56 と上昇し高値を示した。Naïve群と重症群の脳挫傷周囲の大脳皮質を比較すると外傷後1時間、3時間、24時間で有意な差を認めた ($p < 0.05$)。

Naïve群、軽症群と重症群の挫傷側及び健常側の大脳皮質をサンプルとしてLipocalin-2の定量を目的としてELISAを行った。Naïve群では 1079.89 ± 514.44 pg/mLであった。軽症群の脳挫傷周囲の大脳皮質では、外傷後1時間で 4072.55 ± 1636.50 pg/mL、3時間で 4800.94 ± 1409.51 pg/mL、24時間後で 10889.68 ± 1551.38 pg/mLと上昇し高値を示した。Naïve群と比較すると外傷後1時間、3時間、24時間で有意な差を認めた ($p < 0.05$)。また重症群の挫傷周囲の大脳皮質では、外傷後1時間で 3814.32 ± 903.68 pg/mL、3時間で 5444.82 ± 2574.16 pg/mL、24時間後で 10007.64 ± 874.49 pg/mLと上昇し高値を示した。Naïve群と比較すると外傷後1時間、3時間、24時間で有意な差を認めた ($p < 0.05$)。これらの結果から、Lipocalin-2の発現は外傷後1時間、3時間、24時間において挫傷側がNaïve群と比較し有意に高い値を示した。

軽症群と重症群の外傷前、外傷直後、1時間後、3時間後、6時間後、24時間後の計6回の血液サンプルのLipocalin-2濃度をELISAを用いて解析した。Naïve群は軽症群、重症群と同じ時間の6回の血液サンプルを解析した。各群の外傷前、外傷直後、1時間後、3時間後、6時間後、24時間後のLipocalin-2濃度は 138.06 ± 17.35 pg/mL、 120.97 ± 18.62 pg/mL、 146.45 ± 24.30 pg/mL、

134.21±26.79 pg/mL、118.28±10.50 pg/mL、129.51±15.08 pg/mL (Naïve 群)、138.06±32.18 pg/mL、146.78±27.01 pg/mL、156.02±40.40 pg/mL、165.09±30.61 pg/mL、189.37±28.59 pg/mL、185.73±27.33 pg/mL (軽症群)、138.06±20.71 pg/mL、155.23±10.05 pg/mL、151.99±8.52 pg/mL、169.80±12.34 pg/mL、211.05±20.84 pg/mL、194.88±22.94 pg/mL (重症群) であった。軽症群では外傷後 3 時間、6 時間、24 時間で、重症群は外傷直後、外傷後 3 時間、6 時間、24 時間で Naïve 群と比較して高い値を示した ($p<0.05$)。軽症群と重症群ではどの時間においても有意な差を認めなかった。

Naïve 群、軽症群と重症群の挫傷側及び健常側の脳皮質サンプルを用いて Western blotting で GFAP の定量を行った。Naïve 群では 39.33 ± 10.87 であった。軽症群の挫傷周囲の脳皮質では、外傷後 1 時間で 76.12 ± 16.77 、3 時間で 73.14 ± 26.07 、24 時間後で 95.46 ± 25.63 と上昇した。重症群の挫傷周囲の脳皮質では、外傷後 1 時間で 76.95 ± 16.28 、3 時間で 89.47 ± 22.49 、24 時間後で 97.52 ± 8.74 と上昇した。挫傷側と Naïve 群を比較し、GFAP の発現量は軽症群では外傷 1 時間、3 時間、24 時間で有意に高い値を示した ($p<0.05$)。また重症群でも外傷後 1 時間、3 時間、24 時間で有意に高い値を示した ($p<0.05$)。

Naïve 群、軽症群と重症群の挫傷側及び健常側の脳皮質サンプルを用いて Western blotting で CD11b の定量を行った。Naïve 群では 25.62 ± 2.19 であった。軽症群の挫傷周囲の脳皮質では、外傷後 1 時間で 53.78 ± 4.94 、3 時間で 68.10 ± 10.79 、24 時間後で 103.37 ± 12.87 と上昇した。重症群の挫傷周囲の脳皮質では、外傷後 1 時間で 47.76 ± 4.90 、3 時間で 67.81 ± 8.56 、24 時間後で 130.51 ± 23.97 と上昇した。挫傷側と Naïve 群を比較し、CD11b の発現量は軽症群では外傷後 1 時間、3 時間、24 時間、また重症群でも外傷後 1 時間、3 時間、24 時間に有意に挫傷側で高い値を示した ($p<0.05$)。

本研究の結果から Lipocalin-2 は脳挫傷後に挫傷側の脳内で上昇することが解明された。その病態として過去の報告[27, 31]で示唆されていることは、脳挫傷の刺激により活性化されたアストロサイトが Lipocalin-2 を挫傷脳周囲に放出するというものである。GFAP はアストロサイトの細胞

骨格内に存在し、頭部外傷や脳梗塞など脳損傷のバイオマーカーとしての有効性を報告する論文は過去に散見される[32, 33]。Ranjbar らはラット虚血性脳卒中後にアストロサイトが発現増加することを示し、その多くが免疫組織染色で Lipocalin-2 陽性であることを示している[31]。本研究でも GFAP の定量を行ったが、Naïve 群と比較し外傷後 1 時間、3 時間で軽症群、重症群の挫傷側大脳皮質で有意に高い値を示した。免疫組織染色では Lipocalin-2 陽性細胞はアストロサイトおよびマイクログリアに認められた。マイクログリアは好中球と紀元を同じくする細胞である。本研究でマイクログリアにも Lipocalin-2 の発現が認められたことは興味深く、今後どの細胞が Lipocalin-2 を放出し様々な反応を引き起こすのかの解明が必要である。いずれにせよ脳挫傷により活性化されたアストロサイトが主に Lipocalin-2 を放出しているものと考えられた。

また、Lipocalin-2 が脳挫傷後に血液中で上昇することも解明された。Lipocalin-2 が血液中に放出される経路としては血液脳関門の破綻が考えられる。脳挫傷により活性化されたアストロサイトから放出された Lipocalin-2 が血液脳関門の破綻により末梢血へ流出されたものと考えられた。

本研究の結果では、脳内における挫傷側の Lipocalin-2 は外傷後 1 時間から 24 時間まで経時的に増加していた。外傷後 1 時間、3 時間、24 時間において挫傷側大脳皮質の Lipocalin-2 は Naïve 群と比較し軽症群及び重症群で有意な上昇を認めた。血液中の Lipocalin-2 は軽症群でも重症群でも外傷直後から上昇した。軽症群では Naïve 群と比較し外傷後 3 時間、6 時間、24 時間で有意な上昇を認め、重症群では外傷直後、外傷後 3 時間、6 時間、24 時間で有意な上昇を認めた。挫傷側の脳組織中では外傷後 1 時間、血液中では外傷直後から Lipocalin-2 が上昇していた。外傷直後から血液中で上昇し、少なくとも観察を行った外傷後 6 時間までは経時的に上昇していることから急性期のバイオマーカーとして有用と考えられた。また、血液中では重症群の Lipocalin-2 濃度は外傷直後、3 時間、6 時間、24 時間において軽症群より高かったが、統計学的な有意差は認めなかった。このことから本研究では重症度の鑑別に適しているという結果は得られなかった。しかし重症群のみが外傷直後から血中 Lipocalin-2 濃度の有意な上昇を認めたことは、極めて早期から重症脳挫傷を検知することを示している。重症度を判断する指標として、血液中 Lipocalin-2 濃

度と脳体積や頭蓋内圧の関連など、今後さらなる検討が必要であると考え。本研究は脳挫傷におけるバイオマーカーが確立していない現状において、**Lipocalin-2** がバイオマーカーになり得るとするものであり、医学的意義と新規性に富むものである。

2 引用文献

1. Lauritzen, M. and U. Dirnagl, *The Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism clinical, inaugural issue*. J Cereb Blood Flow Metab, 2016. **36**(1): 3.
2. Freytag, E. and R. Lindenberg, *Morphology of cortical contusions*. AMA Arch Pathol, 1957. **63**(1): 23-42.
3. Lindenberg, R. and E. Freytag, *The mechanism of cerebral contusions. A pathologic-anatomic study*. Arch Pathol, 1960. **69**: 440-469.
4. Lindenberg, R. and E. Freytag, *Morphology of brain lesions from blunt trauma in early infancy*. Arch Pathol, 1969. **87**(3): 298-305.
5. Gurdjian, E.S., *Cerebral contusions: re-evaluation of the mechanism of their development*. J Trauma, 1976. **16**(1): 35-51.
6. Halford, J., S. Shen, K. Itamura, et al., *New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment*. J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(10): 3278-3299.
7. Agoston, D.V. and M. Elsayed, *Serum-based protein biomarkers in blast-induced traumatic brain injury spectrum disorder*. Front Neurol, 2012. **3**: 107.
8. Bolignano, D., V. Donato, A. Lacquaniti, et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene*. Cancer Lett, 2010. **288**(1): 10-16.
9. Kjeldsen, L., A.H. Johnsen, H. Sengelov, et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): 10425-10432.
10. Moschen, A.R., T.E. Adolph, R.R. Gerner, et al., *Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation*. Trends Endocrinol Metab, 2017. **28**(5): 388-397.
11. Singer, E., L. Marko, N. Paragas, et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications*. Acta Physiol (Oxf), 2013. **207**(4): 663-672.
12. Sunil, V.R., K.J. Patel, M. Nilsen-Hamilton, et al., *Acute endotoxemia is associated with upregulation of*

- lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. Exp Mol Pathol, 2007. 83(2): 177-187.*
13. Mishra, J., C. Dent, R. Tarabishi, et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. Lancet, 2005. 365(9466): 1231-1238.*
 14. Wagener, G., M. Jan, M. Kim, et al., *Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. Anesthesiology, 2006. 105(3): 485-491.*
 15. Catalan, V., J. Gomez-Ambrosi, A. Rodriguez, et al., *Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. J Mol Med (Berl), 2009. 87(8): 803-813.*
 16. Zhang, J., Y. Wu, Y. Zhang, et al., *The role of lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages. Mol Endocrinol, 2008. 22(6): 1416-1426.*
 17. Wang, Y., K.S. Lam, E.W. Kraegen, et al., *Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. Clin Chem, 2007. 53(1): 34-41.*
 18. Yan, Q.W., Q. Yang, N. Mody, et al., *The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. Diabetes, 2007. 56(10): 2533-2540.*
 19. Birkenkamp-Demtroder, K., L.L. Christensen, S.H. Olesen, et al., *Gene expression in colorectal cancer. Cancer Res, 2002. 62(15): 4352-4363.*
 20. Cho, H. and J.H. Kim, *Lipocalin2 expressions correlate significantly with tumor differentiation in epithelial ovarian cancer. J Histochem Cytochem, 2009. 57(5): 513-521.*
 21. Iannetti, A., F. Pacifico, R. Acquaviva, et al., *The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(37): 14058-14063.*
 22. Shi, H., Y. Gu, J. Yang, et al., *Lipocalin 2 promotes lung metastasis of murine breast cancer cells. J Exp Clin Cancer Res, 2008. 27: 83.*

23. Tong, Z., A.B. Kunnumakkara, H. Wang, et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(15): 6100-6108.
24. Tong, Z., X. Wu, D. Ovcharenko, et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor*. *Biochem J*, 2005. **391**(Pt 2): 441-448.
25. Yang, J. and M.A. Moses, *Lipocalin 2: a multifaceted modulator of human cancer*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(15): 2347-2352.
26. Russell, N.H., R.T. Black, N.N. Lee, et al., *Time-dependent hemoxygenase-1, lipocalin-2 and ferritin induction after non-contusion traumatic brain injury*. *Brain Res*, 2019. **1725**: 146466.
27. Wang, G., Y.C. Weng, X. Han, et al., *Lipocalin-2 released in response to cerebral ischaemia mediates reperfusion injury in mice*. *J Cell Mol Med*, 2015. **19**(7): 1637-1645.
28. Osier, N.D., J.R. Korpon, and C.E. Dixon, *Controlled Cortical Impact Model*, in *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*, F.H. Kobeissy, Editor. 2015: Boca Raton (FL).
29. Bajwa, N.M., J.B. Lee, S. Halavi, et al., *Repeated isoflurane in adult male mice leads to acute and persistent motor decrements with long-term modifications in corpus callosum microstructural integrity*. *J Neurosci Res*, 2019. **97**(3): 332-345.
30. Badaut, J., A. Adami, L. Huang, et al., *Noninvasive magnetic resonance imaging stratifies injury severity in a rodent model of male juvenile traumatic brain injury*. *J Neurosci Res*, 2020. **98**(1): 129-140.
31. Ranjbar Taklimie, F., N. Gasterich, M. Scheld, et al., *Hypoxia Induces Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in Ischemic Stroke*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(6).
32. Pelinka, L.E., A. Kroepfl, R. Schmidhammer, et al., *Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury and multiple trauma*. *J Trauma*, 2004. **57**(5): 1006-1012.
33. Vos, P.E., K.J. Lamers, J.C. Hendriks, et al., *Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury*. *Neurology*, 2004. **62**(8): 1303-1310.