

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12065

研究課題名(和文) 繰り返し脳震盪による脳損傷重症化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of severe brain injury due to repeated concussion

研究代表者

中楯 浩康 (Nakadate, Hiromichi)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：10514987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：柔道やアメリカンフットボールなどのコンタクトスポーツで多発する脳震盪は、意識障害が軽度でありほとんど後遺症を残さずに回復する病態として認識されてきた。しかし、繰り返し受傷すると重症頭部外傷後にみられるような記憶力や注意力の低下を引き起こす。本課題では、脳震盪を発症するような頭部衝突時の弱衝撃を脳神経細胞に繰り返し負荷することで軸索損傷が増大することを実験的に示し、脳震盪を繰り返すことの危険性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳震盪は、CTやMRIの画像診断では明確な異常を認めず、問診以外に有効な診察方法がないため見過ごされてしまいが、短期間に再度同様な受傷をすると脳震盪では済まず、重症化するセカンドインパクトが大きな社会問題になっている。

繰り返し弱衝撃に対する細胞耐性評価は国外でもほとんど例がなく、国内では全く報告がない。従って繰り返し脳震盪における診断や治療が難しく、重症化メカニズムの解明が急務である。そもそも、脳震盪の発症メカニズム自体が未だ解明されていないため、弱衝撃における神経細胞の耐性評価は最重要課題である。

研究成果の概要(英文)：Concussion in contact sports, such as judo and American football, has been recognized as a condition with mild loss of consciousness and recovery with few sequelae. However, repeated concussions can cause memory and attention deficits similar to those seen after severe head injury.

In this study, we experimentally demonstrated that axonal injury is increased by repeated weak impacts on brain neurons during head collision, which leads to concussion, and clarified the danger of repeated concussion.

研究分野：インパクトバイオメカニクス

キーワード：繰り返し脳震盪 軸索損傷 Tauタンパク質 衝撃ひずみ 脳神経細胞 細胞引張装置 重症化

1. 研究開始当初の背景

近年、柔道、サッカー、ラグビーなどのコンタクトスポーツにおける繰り返される軽症頭部外傷、特に脳震盪が危険視されている。脳震盪は意識障害が軽度でありほとんど後遺症を残さずに回復する病態として認識されてきた。しかし、繰り返し受傷すると脳は刺激に対して脆弱、敏感になり、追加される外傷に対する閾値が低下し、外傷が軽度であっても重症頭部外傷後にみられるような記憶力や注意力の低下を引き起こす(図1)。この慢性外傷性脳症、いわゆるボクサー脳症の概念が初めて文献で述べられたのは約80年前であるが、この10年間で米国を中心に報告が増え、社会の大きな注目を浴びるようになった。

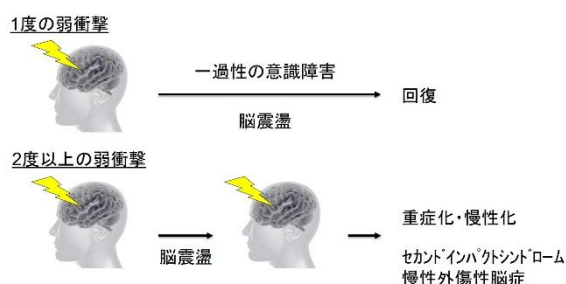


図1 繰り返し弱衝撃による重症頭部外傷の発症
脳震盪は一過性の脳機能障害であり、受傷直後に症状が改善したように見えるが、短期間に繰り返して同様な衝撃を受けると認知症を引き起こす。

2. 研究の目的

一般的に交通事故やスポーツ事故において頭部を強打すると、頭部の急激な加減速により脳組織に慣性力が働き変形する。脳組織の変形は神経細胞間の情報伝達を担う神経軸索に引張ひずみを与え、損傷や断裂を引き起こす。脳震盪においても、少なからず軸索損傷が起こっていると考えられるが、細胞生物学的な知見は少ない。本研究課題では、脳震盪における軸索損傷を想定し、1度の引張ひずみ負荷では損傷しない、もしくは一時的に損傷するが、時間経過とともに回復する弱衝撃を実験的に定義する。弱衝撃の繰り返し負荷により軸索損傷が増大するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞引張装置

本装置は、PDMS (polydimethylsiloxane) 製の細胞チャンバー、サーボアクチュエータ、コントローラ、制御PC、ポテンショメータより構成される。細胞チャンバーに引張荷重を加えることで細胞培養面上に接着させた神経細胞にひずみを与える。細胞チャンバーに接続されたステンレスプレートがワイヤーを介してサーボアクチュエータにより引っ張られ(図2A)、ストッパーに衝突するまで変位し(図2B)、スライダーに固定された磁石が鉄片と離れることで細胞チャンバーは開放され初期位置に戻る(図2C)。

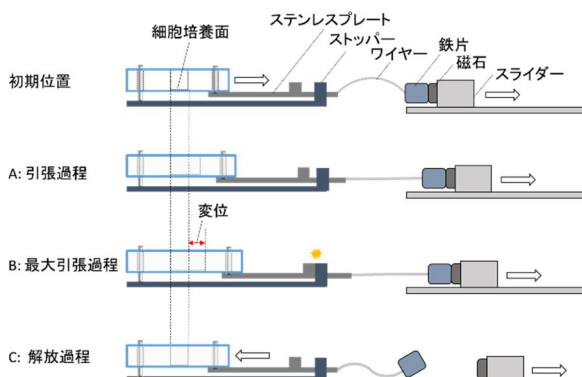


図2 細胞引張装置によるひずみ負荷過程

(2) 衝撃ひずみ負荷実験

本実験ではラット胎児海馬由来の神経細胞を初代培養した。引張ひずみを神経細胞に負荷すると、軸索が局所的に膨張し軸索損傷を引き起こす(図3)。本実験では、1度の負荷では軸索損傷を惹起しない10%の大きさのひずみを採用した(Nakadate et al., 2017)。軸索損傷評価は、ひずみ負荷24時間後に軸索損傷部位に凝集したTauタンパク質を免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。Tauタンパク質は、頭部外傷後に脳脊髄液や血液に漏出することからバイオマーカーとして注目されている。細胞チャンバーの細胞培養面に神経細胞を播種し、7~9日間培養後、引張ひずみを負荷した。チャンバー1個当たり100~200個の神経細胞を観察し、3~4回の実験を実施した。本研究課題では、3つの負荷条件について検討した。

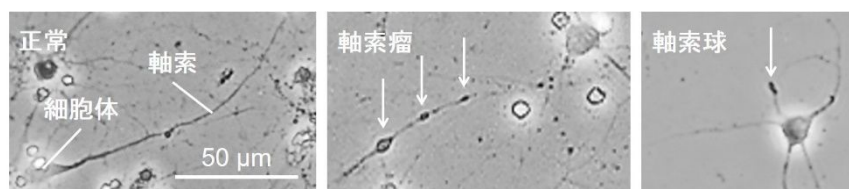


図3 引張ひずみ負荷による軸索損傷

正常な軸索は一樣な太さであるのに対し(左)ひずみを負荷した神経細胞では軸索瘤(中央矢印)や軸索球(右矢印)などの局所的な膨張が観察される。

4. 研究成果

(1) 繰り返し間隔の違いが軸索耐性に与える影響

本実験では、ひずみ 10%、ひずみ速度 5 s⁻¹ を 1 度負荷した群 (Single) と、1 度目の負荷 1 日後 (24h) もしくは 3 日後 (72h) に同様のひずみを繰り返し負荷した群 (Double) の軸索損傷を、引張を負荷しない対照群 (Sham) と比較した。引張負荷 1 日後に軸索損傷マーカーとして Tau タンパク質を免疫染色し、軸索瘤 (swellings) および軸索球 (bulb) が形成された神経細胞の割合を算出した。Single 群では swellings は形成されるが、Sham 群との有意な差は認められず、Double 群における swellings の形成は Sham 群と比べて 24h で有意に増加したが、72h では有意な差は認められなかった (図 4)。

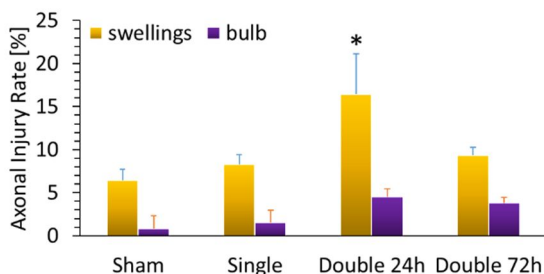


図 4 異なる繰り返し間隔による軸索損傷割合
72 時間間隔で 2 度の弱衝撃では増大しなかったが、24 時間間隔で 2 度の弱衝撃では軸索瘤が形成された神経細胞の割合が増大した。*: $p < 0.05$ vs. Sham

本実験より、1 度の弱衝撃の負荷では顕在化しない軸索損傷が、24 時間後の 2 度目の負荷により、損傷した神経細胞の割合が増大することで顕在化することを示した。

(2) 連続する頭部衝突を模した軸索耐性評価

歩行者対自動車の交通事故では、頭部は車両だけでなく路面とも衝突することがある。10% の大きさのひずみを連続して 2 度負荷し、人体ダミーを用いた衝突試験を参考に、ひずみ負荷の繰り返し間隔を 1 s 以内として実施した。また本実験では、衝撃負荷前に二つの細胞間を接続していた神経突起が、衝撃負荷後にその接続が破断することを損傷と定義した。

対照群では、どの観察時間においても神経突起は接続したままで破断は認められず、他の神経突起においては時間依存的に突起が伸長している様子が観察された。一方、単独衝撃群では、衝撃負荷前では二つの細胞が神経突起で接続されていたが、衝撃負荷 3 時間後では接続部が破断し神経突起の退縮が認められた。しかし、24 時間後には退縮した神経突起が伸長し始め、48 時間後には再び接続していることが観察された。また、連続衝撃群においても、衝撃負荷前では二つの細胞が神経突起で接続されていたが、衝撃負荷 3 時間後では接続部が破断し神経突起の退縮が認められた。さらに、24 時間後においても退縮した神経突起が認められ、48 時間後に退縮した神経突起の伸長が観察された。

単独衝撃群より連続衝撃群で退縮した神経突起が再び伸長するまでに 48 時間を要したことから、神経細胞に連続して弱衝撃が加わることで、損傷程度が重症化したと考えられる。

(3) 繰り返し弱衝撃を受ける脳神経細胞の耐性評価

本実験では、10% のひずみを 24 時間間隔で 1~5 回負荷した。引張負荷 24 時間後に Tau タンパク質を免疫染色し、軸索内での局所的な凝集を蛍光観察することで、軸索損傷を評価した。3 回の繰り返し引張後に軸索が損傷を受けた神経細胞の数は最大となり、その後は減少した。また、1, 3, 5 回の引張負荷 24 時間後に神経細胞の生死判定を行った。引張回数が増加に伴って細胞死も増加し、3 回、5 回の繰り返し引張後では、引張を負荷しない神経細胞と比較して有意な差が認められた (図 5)。本実験結果より、1 度の負荷では細胞死を惹起しない弱衝撃であっても、繰り返し負荷されることで細胞死に至る神経細胞が増大することを示した。

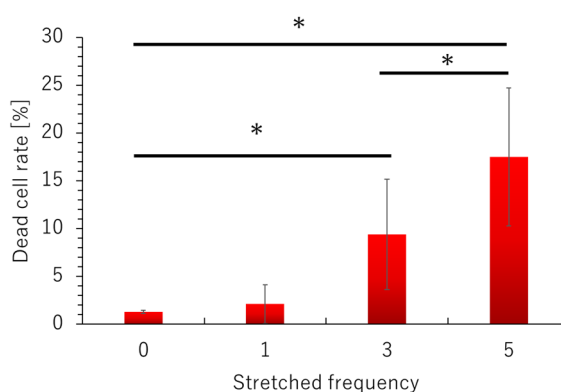


図 5 繰り返し弱衝撃による死細胞割合
24 時間間隔の繰り返し弱衝撃では 3 度目以降に有意な死細胞数の増加が認められた。*: $p < 0.05$

本課題では繰り返し脳震盪における脳損傷の重症化のメカニズムについて検討した。脳神経細胞に 10% 引張ひずみ (弱衝撃) を 24 時間以内の間隔で繰り返し負荷することで、軸索損傷や細胞死が増大することを実験的に示した。弱衝撃を負荷した回数が 2~3 回では軸索損傷が回数に依存して増大し、3~5 回では細胞死が回数に依存して増大した。これらの結果は脳震盪を繰り返すことの危険性を示唆しており、今後このような知見が増えることで、スポーツ業界や小中学校でコンタクトスポーツに関わる人々への啓蒙となることを期待する。

参考文献

Nakadate, H., Kurtoglu, E., Furukawa, H., Oikawa, S., Aomura, S., Kakuta, A. and Matsui, Y., Strain-rate dependency of axonal tolerance for uniaxial stretching, Stapp Car Crash Journal, Vol. 61 (2017), pp. 53-65.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関美月, 中楯浩康, 角田陽
2. 発表標題 培養脳神経細胞の衝撃ひずみ負荷実験
3. 学会等名 日本機械学会 北陸信越学生会 第50回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田惇之介, 中楯浩康, 角田陽
2. 発表標題 電気刺激による細胞活性化システムの構築と評価
3. 学会等名 第47回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田惇之介, 中楯浩康, 角田陽
2. 発表標題 細胞への電気刺激システムの構築と評価
3. 学会等名 日本機械学会 北陸信越学生会 第49回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中楯浩康, 服部義野, 村岡孝洸, 松井靖浩, 角田陽
2. 発表標題 連続する頭部衝突を模した神経細胞の衝撃耐性評価
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村岡孝洸, 服部義野, 中樞浩康, 角田陽, 松井 靖浩
2. 発表標題 繰り返しの頭部衝突によって引き起こされる軸索損傷を模擬した神経細胞の引張負荷実験
3. 学会等名 第46回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部義野, 村岡孝洸, 中樞浩康, 角田陽, 及川昌子, 松井靖浩
2. 発表標題 連続する頭部衝突を模した神経細胞の衝撃ひずみ負荷実験
3. 学会等名 自動車技術会2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中樞浩康, 角田陽, 松井靖浩
2. 発表標題 繰り返し衝撃を受ける神経細胞の軸索損傷評価
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中樞浩康, 青村茂, 角田陽, 張月琳, 松井靖浩
2. 発表標題 繰り返し衝撃を受ける神経細胞の軸索損傷評価
3. 学会等名 第42回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中楯浩康, 青村茂, 角田陽
2. 発表標題 繰り返し衝撃低ひずみ負荷を受ける脳神経細胞の軸索損傷評価
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部義野, 村岡孝洸, 角田陽, 青村茂, 中楯浩康
2. 発表標題 細胞引張装置における変位計測とその妥当性検証
3. 学会等名 日本機械学会 北陸信越学生会 第48回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村岡孝洸, 服部義野, 角田陽, 青村茂, 中楯浩康
2. 発表標題 単軸引張チャンバー培養面における神経軸索の伸長方向制御
3. 学会等名 日本機械学会 北陸信越学生会 第48回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------