

令和元年6月11日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10960

研究課題名(和文) シナプス内外のNMDA受容体シグナル伝達機構の違いに注目した新たな脊髄保護戦略

研究課題名(英文) A new strategy for spinal cord protection focusing on synaptic and extrasynaptic NMDA receptors

研究代表者

松本 美志也 (MATSUMOTO, Mishiya)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60243664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、中枢神経の虚血時にはシナプス外N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は細胞傷害的に、シナプス内NMDA受容体は細胞保護的に働く可能性が報告されている。今回、我々はシナプス外NMDA受容体シグナル伝達の機構においてNR2Bサブユニットとpostsynaptic density protein 95 (PSD-95) に作用する薬剤としてメマンチン、ZL006、TAT-NR2B9cの3剤に脊髄保護作用があるか、家兔一過性脊髄虚血モデルで検討した。その結果、シナプス外NMDA受容体を介した伝達機構を遮断しても十分な脊髄保護効果が得られる可能性が低いことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腹部大動脈瘤手術時に起こりうる脊髄虚血による脊髄障害は患者の社会復帰に大きな影響を与える。薬物療法により脊髄を保護する方法がどこでも簡単に行えるという点で最も臨床的価値が高いと考えられる。薬物による遮断あるいは活性化により保護効果の可能性のあるシグナル伝達経路を一つずつ検証する地道な作業が必要である。今回の研究では、シナプス外N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の遮断による脊髄保護の可能性は低いことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that the synaptic N-methyl-D aspartate (NMDA) receptors protect the central nervous system (CNS) against ischemic injury, whereas the extrasynaptic NMDA receptors exacerbate ischemic CNS injury. In this study, we sought to determine whether inhibition of the signaling pathways through extrasynaptic NMDA receptor protects against ischemic spinal cord injury. We investigated the protective effects of memantine and postsynaptic density protein 95 inhibitors (ZL006 and TAT-NR2B9c) on neurologic and histopathologic outcomes in a transient spinal cord ischemia model of rabbits. Our results suggest that inhibition of the signaling pathways through extrasynaptic NMDA receptors does not protect against ischemic spinal cord injury.

研究分野：麻酔学

キーワード：脊髄虚血 NMDA受容体 PSD-95 メマンチン 家兔

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈瘤手術中の大動脈遮断により重篤な脊髄虚血が生じると対麻痺が起こる。現在でも対麻痺の発生率は5~10%でありその脊髄保護効果は十分ではない。

1980年代に脳虚血により細胞外液中で興奮性伝達物質であるグルタミン酸の濃度が上昇し、中枢神経細胞死が起こることが明らかとなった。そして、グルタミン酸受容体のサブタイプの一つである N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体拮抗薬による脳保護効果が次々に動物実験で報告された。脊髄虚血モデルでも NMDA 受容体拮抗薬のくも膜下投与や静脈内投与による脊髄保護効果が報告された。しかし、われわれは NMDA 受容体のイオンチャネルをブロックするマグネシウムを家兎のくも膜下に投与し脊髄保護効果を検討したが、脊髄保護効果は認められず、脊髄虚血における NMDA 受容体拮抗薬の保護効果に関しては結論が得られていないままであった。

NMDA 受容体はシナプス内だけではなくシナプス外にも存在するが、最近の研究でその役割の違いが明らかになっている。すなわち、中枢神経の虚血時にはシナプス外 NMDA 受容体は細胞傷害的に、シナプス内 NMDA 受容体は細胞保護的に働く可能性が報告されている。脊髄くも膜下にマグネシウムを投与したわれわれの研究では、長時間にわたりシナプス内 NMDA 受容体が遮断され、その結果脊髄保護効果が認められなかった可能性がある。

シナプス内外の NMDA 受容体を選択的に遮断する薬物が無い現状では、シナプス外 NMDA 受容体レベルでのシグナル伝達遮断による脊髄保護は現実的には困難で、むしろ NMDA 受容体より下流のシナプス外 NMDA 受容体に特異的なシグナル伝達機構を遮断することが脊髄保護には効果的と思われる。実際、サルの大脳動脈閉塞モデルでは、シナプス外 NMDA 受容体より下流のシグナル伝達に関わる postsynaptic density protein 95 (PSD-95) の阻害薬で、強い脳保護効果が報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、家兎一過性脊髄虚血モデルにおいて、臨床応用を行いやすい静脈内投与可能な薬剤で、かつ脳または脊髄保護効果が報告されている薬物について outcome study を行う。具体的にはわれわれと同様の家兎一過性脊髄虚血モデルにおいて数日間の経口投与により背強力な脊髄保護効果が報告されているメマンチン、そして、サルの大脳動脈閉塞モデルで強力な脳保護効果が報告されている PSD-95 阻害薬 について outcome study を行う。

次に、outcome study で脊髄保護効果が確認された場合、実際に仮説通りにシグナル伝達が抑制されているかリン酸化抗体を用いた Western blotting でリン酸化が促進されたシグナル伝達物質を網羅的に検索し molecular level での機序を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物モデル

家兎(2~3 kg)を用い、イソフルランで麻酔を導入し、耳静脈より輸液ラインを確保する。気管挿管を行い、以後イソフルラン+フェンタニル麻酔下で人工呼吸を行う。耳動脈と右側大腿動脈で大動脈遮断部の中枢側と末梢側の動脈圧をモニターする。脊髄虚血は、経後腹膜の腹部大動脈一時遮断により作成する。具体的には、経後腹膜のアプローチにより左腎動脈直下の腹部大動脈にテーピングを行う。体温は食道温と傍脊椎筋温をモニターし、傍脊椎筋温を38.0°Cに保つように加温マットと加温ランプでコントロールした。虚血再灌流後、創を閉じて、全身麻酔から覚醒させた。

家兎は毎日7日間神経学的所見をモニターした。後肢運動機能は5段階評価とした(4:正常、

3：跳躍できるが正常ではない、2：後肢はよく動くが跳躍できない、1：後肢がわずかに動く、0：後肢の完全麻痺）。最終的な神経学的所見を確認後、再び全身麻酔を行い、大量のチオペンタールによる安楽死後、10 %リン酸緩衝ホルマリンを用いて脊髄灌流固定を行った。第5腰椎レベルの脊髄で厚さ 8  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。群分けを知らない者によって光学顕微鏡を用いて腰部腹側脊髄（中心管を通る線の腹側）の正常神経細胞数を各家兔2つの標本で計測し平均した。Nissl 小体の消失、細胞質の好酸性の増強、神経細胞核の均質な濃縮を虚血性障害の指標とした。

#### (2) メマンチンの脊髄保護効果

家兔を4群(各 n=6)に分けた。全身麻酔下に大動脈遮断45分前よりそれぞれメマンチン(生理食塩水に溶解)3 mg/kg、8 mg/kg、20 mg/kg を30分かけて静脈内投与しその後腹部大動脈を露出し15分間遮断した。虚血再灌流後、創を閉じて、全身麻酔から覚醒させた。

家兔は毎日7日間神経学的所見をモニターした。最終的な神経学的所見を確認後、組織学的検討を行った。

#### (3) ZL006の脊髄保護効果

家兔を3群(各 n=6)に分けた。全身麻酔下で大動脈を15分間遮断した。大動脈再灌流直後にそれぞれZL006(生理食塩水に溶解)0.75 mg/kg、1.5 mg/kg を静脈内投与した。虚血再灌流後、創を閉じて、全身麻酔から覚醒させた。

家兔は毎日7日間神経学的所見をモニターした。最終的な神経学的所見を確認後、組織学的検討を行った。

#### (4) TAT-NR2B9cの脊髄保護効果

家兔を3群(各 n=5)に分けた。実験1と同様に全身麻酔下で大動脈を15分間遮断した。大動脈再灌流後にそれぞれTAT-NR2B9c(生理食塩水に溶解)0.52 mg/kg、2.6 mg/kg を静脈内投与した。虚血再灌流後、創を閉じて、全身麻酔から覚醒させた。

家兔は毎日7日間神経学的所見をモニターした。最終的な神経学的所見を確認後、組織学的検討を行った。

#### (5) 統計分析

後肢運動機能データおよび脊髄腹側の正常神経細胞数はノンパラメトリック法(Kruskal-Wallis検定)を用いて統計分析を行った。P<0.05を有意とみなした。

### 4. 研究成果

#### (1) メマンチンの脊髄保護効果

すべての家兔が最終評価の再灌流7日後まで生存した。再灌流7日後の後肢運動機能と正常神経細胞数(中央値)を示す。3 mg/kg 群(2:1匹、0:5匹、10)、8 mg/kg 群(1:3匹、0:3匹、13)、20 mg/kg 群(4:1匹、1:4匹、0:1匹、26)、対照群(1:1匹、0:5匹、15)であった。図1はメマンチン投与7日後の第5腰椎レベルの腹側脊髄の正常神経細胞数を示す。個々の丸印が家兔1匹を示す。

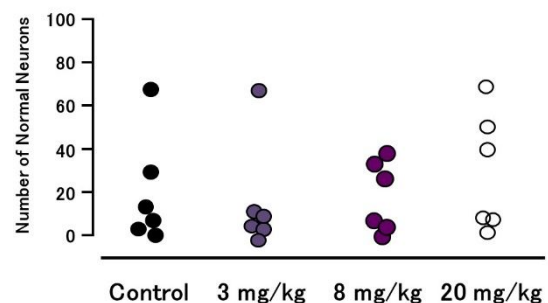


図1 メマンチン投与7日後の腰部腹側脊髄(L5レベル)の正常神経細胞数

#### (2) ZL006の脊髄保護効果

すべての家兔が最終評価の再灌流 7 日後まで生存した。再灌流 7 日後の後肢運動機能と正常神経細胞数(中央値)は、0.75 mg/kg 群(3:1 匹、2:1 匹、1:1 匹、0:3 匹・18)、1.5 mg/kg 群(1:4 匹、0:2 匹・13)、対照群(1:1 匹、0:5 匹・3)であった。図 2 は ZL006 投与 7 日後の第 5 腰椎レベルの腹側脊髄の正常神経細胞数を示す。個々の丸印が家兔 1 匹を示す。

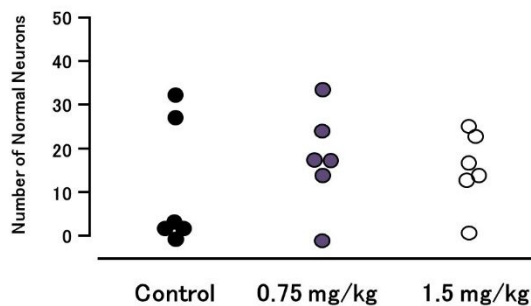


図2 ZL006投与7日後の腰部腹側脊髄(L5レベル)の正常神経細胞数

### (3) TAT-NR2B9c の脊髄保護効果

すべての家兔が最終評価の再灌流 7 日後まで生存した。再灌流 7 日後の後肢運動機能と正常神経細胞数(中央値)は、0.52 mg/kg 群(3:1 匹、1:3 匹、0:1 匹、17)、2.6 mg/kg 群(1:5 匹、12)、対照群(2:1 匹、1:3 匹、0:1 匹、9)であった。

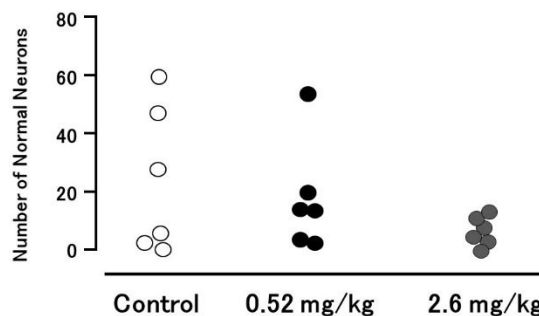


図3 TAT-NR2B9c投与7日後の腰部腹側脊髄(L5)の正常神経細胞数

図 3 は ZL006 投与 7 日後の第 5 腰椎レベルの腹側脊髄の正常神経細胞数を示す。個々の丸印が家兔 1 匹を示す。

### (4) 考察

メマンチンはシナプス内 NMDA 受容体よりシナプス外 NMDA 受容体により選択的に作用する薬剤でアルツハイマー型認知症の治療薬として臨床使用されている。われわれの家兔一過性脊髄虚血モデルと同様のモデルで、臨床使用に比較してかなりの高用量を数日間経口投与すると強い脊髄保護効果が認められたとの報告がある。また、一方で、今回の投与方法とほぼ同じで 20 mg/kg の投与で強い脊髄保護効果が報告されている。臨床使用に比較してかなりの高用量を数日間経口投与する方法は容易に臨床応用できると思われず、今回の研究では後者の研究に準じて静脈内単回投与とし、3 mg/kg、8 mg/kg、20 mg/kg の 3 つの用量で検討してみた。しかし、今回のわれわれの研究では、従来保護効果が報告されていた 20 mg/kg のメマンチン投与でも脊髄保護効果は認められなかった。用量依存性の保護傾向も見られなかった。

ZL006 と NR2B9c はシナプス外 NMDA 受容体とその下流にある一酸化窒素合成酵素のシグナル伝達を橋渡しするタンパク質である PSD-95 の機能を阻害する。PSD-95 の阻害により、虚血時に起こる一酸化窒素の過剰産生が抑制され神経細胞保護につながると考えられている。しかし、2 種類の PSD-95 阻害薬について検討してみたが、脊髄保護効果はみられなかった。特に、TAT-NR2B9c に関しては、サルの一過性中大脳動脈閉塞モデルで、2.6 mg/kg の虚血後投与に強い保護効果が認められている。われわれは 0.52 mg/kg と 2.6 mg/kg の 2 つの用量で検討したが、結果は 2.6 mg/kg の方がむしろ悪い傾向がみられた。したがって、これ以上投与量を増加しても保護効果が観察される可能性は低いと考えられた。

臨床で起こりうる脊髄虚血もわれわれの脊髄虚血モデルと同様に比較的強い虚血侵襲である。一過性中大脳動脈モデルでは保護効果が観察されたにもかかわらず、今回の研究で保護効果が全く観察されなかったのは、脊髄虚血モデルが中大脳動脈閉塞モデルに比較して虚血侵襲が強いためではないかと思われる。メマンチン、ZL006、NR2B9c のいずれかで脊髄保護効果が観察されたらその機序に関して molecular level の検討を行う予定であったが、いずれの薬剤でも保

護効果がみられなかったので、molecular level の検討は行わなかった。

#### (5) 今後の展望

以前の研究でシナプス内外の NMDA 受容体を非選択的に遮断するマグネシウムの脊髄クモ膜下投与を行ったが、脊髄保護効果は認められなかった。今回は、虚血時に傷害作用が強いことが明らかになってきたシナプス外 NMDA 受容体のシグナル伝達をより選択的に抑制する薬剤について検討したが、やはり効果は認められなかった。これまでの結果を総合的に考えて、NMDA 受容体シグナル伝達を阻害する薬剤のみでは脊髄保護効果は難しいとわれわれは判断している。今後は、NMDA 受容体のシグナル伝達のように細胞障害のシグナル伝達を阻害する薬物による脊髄保護ではなく、神経細胞に内在している保護機構を活性化する薬物による脊髄保護について検討をしてみたい。

#### < 引用文献 >

- Saeki H, Matsumoto M, Kaneko S, et al. Is intrathecal magnesium sulfate safe and protective against ischemic spinal cord injury in rabbits? *Anesth Analg*, 99, 2004, 1805-12
- Parsons MP, Raymond LA, Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, 82, 2014, 279-93
- Ehrlich M, Knolle E, Ciovcica R, et al. memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 117, 1999, 285-91
- Panthee N, Ono M, Morota T, et al. Paraplegia prevention by oral pretreatment with memantine in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 148, 2014, 1732-8
- Cook DJ, Teves L, Tymianski M. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature*, 483, 2012, 213-8

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

Takehiko Fukui, Kazuyoshi Ishida, Yoichi Mizukami, Kiyotaka Shiramoto, Hidenori Harada, Atsuo Yamashita, Satoshi Yamashita, Mishiya Matsumoto, Comparison of the protective effects of direct ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning in a rabbit model of transient spinal cord ischemia. *J Anesth* 査読あり, 32, 2018, 3-14 doi:10.1007/s00540-017-2420-5  
福井健彦、松本美志也、脊髄の虚血耐性、臨床麻酔、査読あり、42, 2018, 1249-58

##### [ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

福井健彦 他、虚血性脊髄障害における postsynaptic density protein 95 阻害薬の神経保護効果、第 66 回日本麻酔科学会、2019 年  
福井健彦 他、メマンチンによる脊髄保護、第 65 回日本麻酔科学会、2018 年  
福井健彦 他、虚血性脊髄障害における NMDA 受容体シグナル伝達の役割、第 22 回日本神経麻酔集中治療学会、2018 年

##### [ 図書 ] ( 計 0 件 )

##### [ 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：

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：石田 和慶（削除：2018年3月22日）

ローマ字氏名：ISHIDA, Kazuyoshi

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80314813

研究分担者氏名：若松 弘也

ローマ字氏名：WAKAMATSU, Hiroya

所属研究機関名：山口大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80379966

研究分担者氏名：水上 洋一

ローマ字氏名：MIZUKAMI, Yoichi

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学研究推進機構

職名：教授

研究者番号（8桁）：80274158

### (2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。