

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591797

研究課題名（和文） エリスロポエチンとインスリン様成長因子1の脊髄保護効果の検討とシグナル伝達の解明

研究課題名（英文） Effects of erythropoietin and insulin-like growth factor 1 on the outcome after transient spinal cord ischemia and the mechanism in the signal transduction

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・准教授

60243664

研究成果の概要：

胸腹部大動脈瘤手術の重大な合併症の一つである下半身麻痺は、手術中の大動脈遮断に伴う脊髄虚血が原因と考えられている。しかし、脊髄虚血から脊髄を保護する方法は未だに確立されていない。多くの薬物による脊髄保護効果が動物実験で報告されているが、臨床応用するには、その薬物の安全性など詳細に検討すべき事柄が多い。本研究では、既に市販されているエリスロポエチン製剤とインスリン様成長因子1製剤の併用により、家兎一過性脊髄虚血モデルで保護効果があることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：脊髄虚血、エリスロポエチン、インスリン様成長因子1

## 1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈手術の重篤な合併症の一つである対麻痺は大動脈遮断中の脊髄虚血が原因と考えられている。脊髄虚血からいかに脊髄を守るかは、依然として麻酔科医と外科医の大きな関心事である。

エリスロポエチン（Erythropoietin: EPO）は腎臓で産生される造血因子として発見されたが、近年、腎臓以外に神経系や心血管系でも産生されていることが明らかになり、脳虚血モデルでは腹腔内投与で保護効果がみ

られている。脊髄虚血モデルでは、虚血再灌流直後に静注し、保護効果が報告されている。さらに、小規模研究ではあるが、ヒトでも脳梗塞後投与で保護効果がみられている。EPOは虚血耐性でも注目されている。低酸素によるプレコンディショニングでは、転写調節因子であるhypoxia inducible factor 1が活性化され、そのターゲットであるEPOの産生が増加する。すなわち、EPOは内因性あるいは外因性に低酸素から神経細胞を守る機構の要である可能性が高い。事実、EPOによる赤血

球増加作用も組織低酸素に対する生体の防御機構の一つと考えられる。

EPO の神経細胞保護機序は、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) - Akt (Protein kinase B) 系の活性化による生存シグナルの増強効果によると考えられている。同様の機序で神経細胞保護する可能性がある生体内物質として、インスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factor 1: IGF-1) が知られている。IGF-1 は成長ホルモン依存性に肝臓をはじめ種々の臓器で産生されるが、わが国ではすでに recombinant human IGF-1 が作製され、インスリン抵抗性糖尿病や成長ホルモン抵抗性成長障害の治療薬として市販されている。脊髄虚血モデルでは、IGF-1 の虚血前投与により保護効果がみられている。

前述のように、脊髄虚血モデルで EPO と IGF-1 はそれぞれ単独で脊髄保護効果が報告されており、両者とも市販されている薬物なので、臨床応用できる可能性があるが、その追試は報告されておらず、また、両者の併用により保護効果が増強されるか否かは検討されていない。

## 2. 研究の目的

最近、大脳皮質の培養神経細胞を用いた研究で、NMDA による神経傷害作用に対し、EPO あるいは IGF-1 単独では神経保護効果が認められない量でも、EPO と IGF-1 を併用することにより神経保護効果が認められている。そこで、本研究では、できるだけ臨床使用量に近い量の EPO と IGF-1 の併用に脊髄保護効果があるか否かを検討することを目的とする。有効性が確認されれば、臨床的に有力な脊髄保護手段になりうる可能性が高い。

## 3. 研究の方法

(1) EPO と IGF-1 の低用量併用療法の脊髄保護効果に関する研究

臨床応用可能な EPO と IGF-1 の投与量(過去の研究で脊髄保護効果が報告されている投与量の半量)の併用により脊髄保護効果があるか否かを検討した。

家兔(2~3Kg)を用い脊髄虚血は、経後腹膜の腹部大動脈一時遮断により作成し、虚血時間は 13 分間とした。具体的には、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した。少量のペントバルビタールを投与後、気管挿管を行い、以後イソフルランとフェンタニル麻酔下で人工呼吸を行った。両側大腿動脈より右は 17cm、左は 3cm カテーテルを挿入し、大動脈遮断部の中枢側の動脈圧と末梢側の動脈圧をモニターした。経後腹膜のアプローチにより腹部大動脈にテーピングを行った。分節性脊髄誘発電位(左坐骨神経刺激、L5-6 間導出)で虚血が確実に行

われたか否かを判定した。虚血再灌流後、カテーテルを抜去し、創を閉じ、麻酔から覚醒させて抜管した。再灌流後、7 日間神経学的所見(後肢運動機能)を観察した。後肢運動機能は 5 段階評価とした(4: 正常、3: 跳躍は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)。

群わけは以下の 3 群とした。(各群 n=7)

### ①対照群

虚血 30 分前に生理食塩水を静注

### ②EPO 500 群

虚血 30 分前に EPO 500U/kg を静注

### ③IGF 0.15 群

虚血 30 分前に IGF-1 を 0.15 mg/kg 静注

### ④EPO 500 + IGF-1 0.15 群

虚血 30 分前に EPO 500U/kg と IGF-1 0.15 mg/kg を静注

(2) EPO と IGF-1 の高用量併用療法の脊髄保護効果に関する研究

臨床応用可能な EPO と IGF-1 の投与量(過去の研究で脊髄保護効果が報告されている投与量の半量)の併用により十分な脊髄保護効果が確認されなかったため、EPO と IGF-1 の高用量併用療法(過去の研究で脊髄保護効果が報告されている投与量)の脊髄保護効果に関する検討を行った。

群わけは以下の 3 群とした。(各群 n=9)

### ①対照群

虚血 30 分前に生理食塩水を静注

### ②EPO 群

虚血 30 分前に EPO 800U/kg を静注

### ③IGF 群

虚血 30 分前に IGF-1 を 0.3 mg/kg を静注

### ④EPO + IGF 群

虚血 30 分前に EPO 800U/kg と IGF-1 0.3 mg/kg を静注

脊髄虚血の方法や神経学的所見の評価方法は低用量併用療法の研究と同じである。なお、再灌流 7 日後に神経学的所見の評価を行った後に、脊髄を灌流固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色により L5 レベルの脊髄横断面で、腹側脊髄の正常神経細胞数を計測した。

## 4. 研究成果

(1) EPO と IGF-1 の少量併用療法の脊髄保護効果に関する研究

生理学的諸量に群間差はなかった。

再灌流 7 日後の後肢運動機能スコアは、**対照群** 4 : 0 羽、3 : 2 羽、2 : 2 羽、1 : 0 羽、0 : 3 羽、**EPO 500 群** 4 : 4 羽、3 : 0 羽、2 : 0 羽、1 : 1 羽、0 : 2 羽、**IGF 0.15 群** 4 : 4 羽、3 : 1 羽、2 : 1 羽、1 : 1 羽、0 : 0 羽、**EPO 500 + IGF0.15 群** 4 : 1 羽、3 : 0 羽、2 : 5 羽、1 : 0 羽、0 : 1 羽で

あった。4群間でスコアに有意差はなかった。

(2) EPO と IGF-1 の高用量併用療法の脊髄保護効果に関する研究

生理学的諸量に群間差はなかった。

再灌流 7 日後の後肢運動機能スコアは、**対照群** 4 : 1 羽、3 : 2 羽、2 : 3 羽、1 : 0 羽、0 : 3 羽、**EPO 群** 4 : 3 羽、3 : 3 羽、2 : 3 羽、1 : 0 羽、0 : 0 羽、**IGF 群** 4 : 1 羽、3 : 3 羽、2 : 1 羽、1 : 0 羽、0 : 4 羽、**EPO+IGF 群** 4 : 5 羽、3 : 4 羽、2 : 0 羽、1 : 0 羽、0 : 0 羽であった。EPO+IGF 群のスコアが、対照群に比較し有意に良好であった (図 1)。

腰部脊髄腹側の正常神経細胞数 (平均値) は**対照群 21**、**EPO 群 37**、**IGF 群 19**、**EPO+IGF 群 46** であり、EPO+IGF 群が対照群に比較し有意に正常神経細胞数が多かった (図 2)。

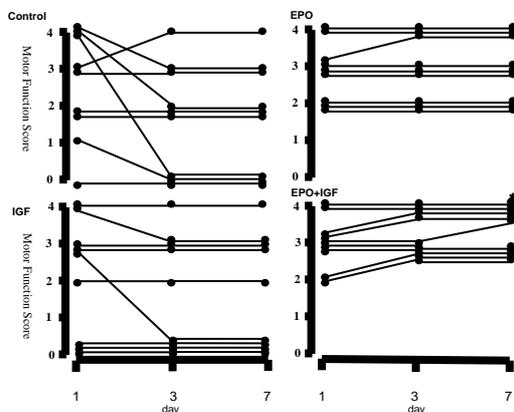


図 1 再灌流後の後肢運動機能 (高用量群) 後肢運動機能スコア、4 : 正常、3 : 跳躍はできるが正常ではない、2 : 後肢はよく動くが跳躍できない、1 : 後肢がわずかに動く、0 : 後肢の完全麻痺。再灌流 7 日後の後肢運動機能スコアは EPO+IGF-1 群が、Control (対照) 群に比較し、有意に良好であった。

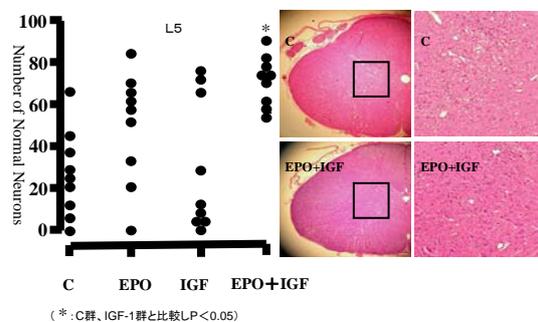


図 2 腹側脊髄 (L5 レベル) 正常神経細胞数

(高用量群)

再灌流 7 日後の正常神経細胞数 EPO+IGF-1 群が、Control (対照) 群に比較し、有意に多かった。Control 群で後肢運動機能が悪かった家兎では、L5 レベルの脊髄横断面で強い炎症細胞の浸潤を伴った灰白質構造の崩壊が観察された (右図上)。一方、EPO+IGF 群では、強い炎症細胞浸潤はみられず、灰白質構造もほぼ正常に保たれていた (右図下)。

(3) 考察

EPO と IGF-1 はそれぞれ単独で脊髄保護効果が家兎のモデルで報告されている。しかし、今回の研究では、過去に保護効果が報告されている量の EPO に保護効果の傾向がみられたものの、過去に保護効果が報告されている量の IGF-1 には全く保護効果が確認されなかった。一方、EPO と IGF-1 の併用では、低用量投与 (ともに過去に保護効果が報告されている量の半量) では効果が認められなかったが、高用量投与 (ともに過去に保護効果が報告されている量) で保護効果が認められた。

EPO と IGF-1 はともに Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) - Akt (Protein kinase B) 系を活性化し、NMDA によるアポトーシスを軽減することが培養大脳皮質神経細胞を用いた研究で報告されている。今回の研究では、強い後肢運動機能障害を生じた家兎では、再灌流 7 日後の腰部脊髄の組織学的評価で、強い炎症細胞浸潤を伴った脊髄灰白質構造の崩壊が観察された。一方、EPO+IGF 群では、9 羽中 5 羽で再灌流 7 日後の後肢運動機能が正常で、残りの 4 羽も全て跳躍可能であった。また、EPO+IGF 群では、再灌流 7 日後の腰部脊髄の組織学的評価では、強い炎症細胞浸潤はみられず、灰白質構造もほぼ正常に保たれていた。すなわち、組織学的検討の結果から、EPO と IGF-1 の併用は、本来なら一過性脊髄虚血侵襲により、強い炎症反応を伴った壊死を生じる病態を防いだと考えられる。このことは、EPO と IGF-1 の併用は、アポトーシスを軽減する作用以外にネクローシスを軽減する効果もあることを示唆する。

EPO の単独投与では、有意な脊髄保護効果が確認されなかったが、低用量に比較すると高用量では保護効果の傾向が認められた。すなわち、過去の報告にあるように、EPO の脊髄保護作用は単独では強くないが、皆無ではないと推測される。

一方、IGF-1 の脊髄保護効果は全く認められなかった。過去の報告では IGF-1 の強い脊髄保護効果が報告されている。IGF-1 の投与量と投与タイミングは今回の研究と過去の報告は同じであるが、異なる点は、虚血時の血糖値である。過去の報告では、虚血直前の血糖値は約 60 mg/dL であったと推測されるが (虚血後の血糖値しか提示されていない)、

今回の研究では約 130 mg/dL である。今回の研究では IGF-1 を投与しない群（対照群と EPO 群）に血糖値を合わせるために、IGF-1 を投与した群（IGF 群と EPO+IGF 群）ではブドウ糖投与を行った。今回の結果から考えると、IGF-1 の脊髄保護効果は、血糖値が低いレベルで発揮される可能性が考えられる。ちなみに、家兔の正常血糖値は約 120 mg/dL である。

IGF-1 単独では、全くといっていいほど脊髄保護効果は観察されなかったが、EPO と併用することで、EPO 単独の脊髄保護効果を強化したと考えられる。この機序として、両者の併用により、Akt の活性化が強化された可能性が高いが、Akt 活性の増強の程度に関しては、今後の研究で解明したい。

（4）得られた成果と国内外における位置づけとインパクト

本研究で、既に市販されているエリスロポエチンとインスリン様成長因子 1 製剤の併用により強い脊髄保護効果が確認された点は画期的成果といえる。

いままで、新規薬物や臨床使用されていない薬物、あるいは臨床使用されていても投与方法が臨床で一般的でない方法による脊髄保護の報告は数多くされているが、それらの成果を臨床応用するには、安全性や投与量の検討など、長い時間と莫大な費用がかかると考えられる。本研究では、エリスロポエチンの投与量は臨床使用量よりまだ多いが、インスリン様成長因子 1 の投与量は臨床使用量であるので、臨床応用の期待が持てる。

（5）今後の展望

今回の研究では、エリスロポエチンとインスリン様成長因子 1 の併用による脊髄保護の機序までは検討できなかった。おそらく、Akt 活性が増強されていると考えられるが、今後はその機序を検討し、さらには投与タイミングなどの検討を行っていきたい。また、最近の研究では、脊髄硬膜外電気刺激により脊髄の Akt 活性が増強されるという研究も報告されており、エリスロポエチンとインスリン様成長因子 1 の併用にさらに硬膜外電気刺激を加えた方法で、脊髄保護の研究を行う予定である。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

1 吉村学、松本美志也、山下敦生、若松弘也、福田志朗、石田和慶、坂部武史

一過性脊髄虚血後の神経障害に対する erythropoietin と insulin-like growth factor 1 の保護効果

第 13 回日本神経麻酔・集中治療研究会

2009 年 3 月 28 日 大阪

2 Mishiya Matsumoto, Manabu Yoshimura, Atsuo Yamashita, Hiroya Wakamatsu, Shiro Fukuda, kazuyoshi Ishida, Takefumi Sakabe  
Neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor 1 demonstrated in a spinal cord ischemia model in rabbits.

First congress of Asian society for neuroanesthesia and critical care

2008 年 11 月 30 日 中国 北京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号：60243664

(2) 研究分担者

山下敦生 (YAMASHITA ATSUO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50379971

若松弘也 (WAKAMATSU HIROYA)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80379966

坂部武史 (SAKABE TAKESHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40035225

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吉村 学 (YOSHIMURA MANABU)

山口大学・大学院医学系研究科・大学院生