

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24027

研究課題名(和文) N型電位依存性カルシウムチャンネルとリアノジン受容体を標的とした脊髄保護療法の開発

研究課題名(英文) Novel treatment for spinal cord injury targeting N-type voltage-gated calcium channel and ryanodine receptor

研究代表者

大橋 正幸 (Ohashi, Masayuki)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：70706720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：成熟ラット不全脊髄損傷モデルを作成した。N型電位依存性カルシウムチャンネル阻害薬(ジコノチド、ZIC：200pmol)を受傷後4時間で腰椎よりくも膜下投与した。運動スコアは受傷後1日目から5日目までZIC群で有意に良好であったが、受傷後7日目より有意差はなくなった。一方、受傷後14日目の脊髄標本を用いた免疫組織学的実験では、ZIC群でNeuN陽性細胞数が多く、ZICの脊髄保護効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷後の重症化(二次障害)には、活性酸素(ROS)が深く関与しており、その機序として「グルタミン酸毒性」が報告されている。我々は、脊髄横断スライスを用いた電気生理学的実験により、脊髄前角においてはROSによるN型電位依存性カルシウムチャンネル(VGCC)と小胞体のリアノジン受容体(RyR)の活性化によりグルタミン酸が過剰放出されていることを報告した。本研究では、脊髄損傷モデルラットにおけるN型VGCC阻害剤の脊髄保護効果を示した。ジコノチドは難治性疼痛治療に既に臨床応用されている薬剤であり、今後さらに投与方法の改良を加えることで、ドラッグ・リポジショニングによる早期臨床応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We used incomplete spinal cord injury model of a matured rat. An intrathecal administration of N-type voltage-gated calcium channel blocker (Ziconotide, ZIC: 200 pmol) was performed 4 hours after spinal cord injury. The motor score evaluated by BBB score was significantly higher in the ZIC group from 1 to 5 days after the injury, but there was no significant difference 7 days or longer after the injury. On the other hand, in an immuno-histological experiment using spinal cord specimens 14 days after the injury, the number of NeuN-positive cells was larger in the ZIC group than in the control group, suggesting the protective effects of ZIC for injured spinal cord.

研究分野：整形外科学

キーワード：脊髄損傷 活性酸素 脊髄保護 電位依存性カルシウムチャンネル カルシウムイオン リアノジン受容体 脊髄損傷モデル

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や虚血による運動麻痺は、患者の生活の質を著しく低下させる重篤な病態である。これらの病態における脊髄障害には活性酸素に起因する「神経興奮毒性」が深く関与している。すなわち、活性酸素により興奮性シナプス前終末からグルタミン酸（興奮性神経伝達物質）が過剰に放出され、シナプス後細胞のグルタミン酸受容体の活性化による過剰な興奮と、それに引き続く細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が細胞死を引き起こす。

グルタミン酸受容体には NMDA 型、AMPA 型、カイニン酸型、代謝型受容体がある。活性酸素による興奮毒性を標的とした治療薬として、NMDA 型受容体拮抗薬であるリルゾールが脊髄損傷に対して欧米において臨床試験中である。しかし、リルゾールは NMDA 型以外のグルタミン酸受容体に対する拮抗作用はなく、その効果は限定的である。現時点では全てのグルタミン酸受容体を同時に阻害する薬剤は存在しないことから、治療標的をシナプス前終末とし、グルタミン酸の過剰放出自体を抑制する戦略の方が効果的な脊髄保護作用を期待できる。しかし、脊髄前角運動ニューロンにおいては、活性酸素によるグルタミン酸過剰放出の機序は不明であった。

我々は、ラットの脊髄横断スライスを用いた電気生理学の実験（パッチクランプ法）により、活性酸素のひとつである過酸化水素 (H_2O_2) が脊髄前角のシナプス伝達に与える影響とその機序を検討し、 H_2O_2 は興奮性シナプス前終末の N 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (voltage-gated calcium channel: VGCC)、小胞体のリアノジン受容体 (ryanodine receptor: RyR) およびイノシトール 3 リン酸受容体 (inositol triphosphate receptor: IP₃R) の活性化を介して興奮性シナプス前終末からのグルタミン酸放出を増強させることを明らかにし、これらの受容体阻害剤は興奮毒性を抑制することで脊髄保護効果を発揮する可能性があることを報告した [1,2]。特に N 型 VGCC 阻害剤である -コノトキシン (Ziconotide, ZIC) は、欧米において麻薬抵抗性の難治性疼痛に対してくも膜下投与で既に臨床応用されている薬剤である。また RyR 阻害剤であるダントロレンは痙性麻痺緩解剤や悪性症候群治療剤として既に臨床応用されている。したがって、これらの薬剤の脊髄保護効果を示すことができれば、ドラッグ・リポジショニングによる早期の臨床応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、既に他疾患で臨床使用されている N 型 VGCC 阻害剤 (ZIC) および RyR 阻害剤 (ダントロレン) の脊髄保護効果を脊髄損傷モデルラットで解析することである。

3. 研究の方法

Wistar 系成熟ラット (雄、180-250 g) を用い、吸入麻酔薬 (イソフルレン) で全身麻酔下に皮膚切開し、第 10 胸椎の椎弓を切除した。次いで、ラットの身体を固定し、第 10 胸椎高位で専用のデバイス (Infinite Horizons Impactor) を用いて 200 kilodynes の力で脊髄に圧挫を加え、不全脊髄損傷モデルを作成した。皮膚を縫合し、麻酔から覚醒させた。ZIC 投与群では、脊髄損傷後 4 時間で全身麻酔下に第 4 腰椎椎弓切除を行い、同高位より ZIC (200pmol/10 μ l) をくも膜下投与した。

運動機能評価として、脊髄損傷後 14 日間の運動機能を Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score で評価した。運動機能評価はオープンフィールド上でのラットの行動を、ZIC 群と対照群を識別できない状態で観察、評価した。

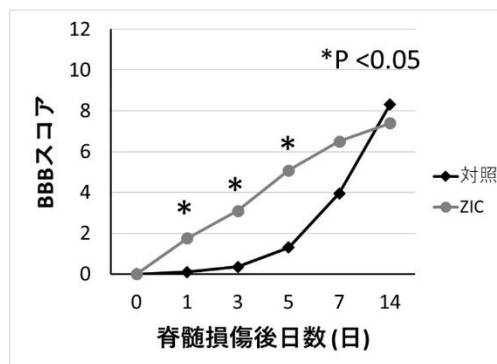
脊髄損傷後 14 日目のラットを深麻酔下で経心的に 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、脊髄を摘出した。損傷部を中心に 250 μ m 間隔、厚さ 16 μ m の凍結切片を作成し、4% パラホルムアルデヒドを用いて、4 時間で 1 時間の浸漬固定を行い、スクロースで一晩脱水を行った。16 μ m の凍結切片を作成し、ウサギ抗 NeuN 抗体を用いて 4 時間で 2 日間反応させた。二次抗体としてビオチン化抗ウサギ IgG 抗体を用いて、室温で 4 時間反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

統計学的解析には Mann-Whitney U 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

4. 研究成果

(1) 運動機能評価

ZIC 投与群 (n=6)、対照群 (n=11) とともに脊髄損傷直後は完全運動麻痺の状態であったが、経過とともに運動機能は有意に改善した ($p < 0.05$)。各評価時点での BBB score を 2 群間比較すると、脊髄損傷後 1~5 日目までは ZIC 群で BBB score が有意に高かった ($P < 0.05$)。しかし、受傷後 7 日以降は有意差を認めなかった。

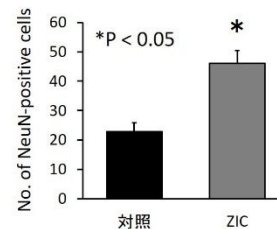
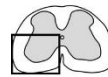
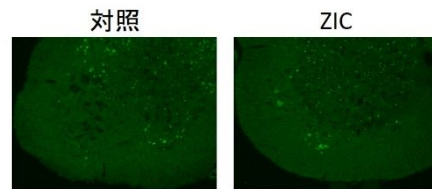


(2) 免疫組織化学実験

NeuN に対する免疫染色では、対照群と比較して ZIC 群の NeuN 陽性細胞数が多かった (ZIC 群: 46.0 ± 4.4 、対照群: 22.9 ± 3.0 、 $P = 0.02$)。

(3) 考察

運動機能評価では脊髄損傷後 5 日目までは ZIC 投与群で有意に改善が良好であった。受傷後 7 日以降では運動機能に関して ZIC 群と対照群で有意差を認めなかった。一方で、免疫組織学的実験で受傷後 14 日目の時点で NeuN 陽性細胞数は ZIC 群で有意に多く、ZIC の神経細胞保護効果を示していると考えられる。しかしながら、運動機能評価の結果から、最終的な機能回復に対する効果は不十分であった。これは、ZIC が脊髄損傷後 4 時間での単会投与であることによるとと思われる。今後は、ZIC 単会投与で有意差がなくなる前 (受傷後 3 - 5 日) に ZIC の追加投与など、複数回投与による ZIC の脊髄保護効果を検討する予定である。さらに、RyR 阻害剤であるダントロレンの併用効果についても検討していく。



< 引用文献 >

1. Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, et al. Hydrogen peroxide modulates synaptic transmission in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *J Physiol* 2016;594:115-
2. Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, et al. Hydrogen peroxide modulates neuronal excitability and membrane properties in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *Neuroscience* 2016;331:206-220.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------