

機関番号：11401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591704  
 研究課題名（和文） 脊髄損傷における酸化ストレス発生を介したアポトーシス活性化機構の解明  
 研究課題名（英文） Oxidative stress-induced apoptotic cell death pathway after spinal cord injury  
 研究代表者  
 鈴木 明（SUZUKI AKIRA）  
 秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：10311573

研究成果の概要（和文）：脊髄運動ニューロンは軽度脊髄損傷後に選択的に死滅するが、その細胞死メカニズムは不明であった。SD ラットに軽度圧迫損傷を作成し、スーパーオキシドの産生とアポトーシス様 DNA 損傷を観察した。脊髄損傷後、早期にスーパーオキシド産生が運動ニューロン内で選択的に増加し、引き続いて大部分の運動ニューロン（80%）が細胞死を起こした。これらの結果により、脊髄損傷後に発生する酸化ストレスが脊髄損傷後のアポトーシス様運動ニューロン死に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ventral horn motor neurons (VMN) are selectively vulnerable to mild spinal cord injury (SCI); however, the mechanisms of cell death had not been understood. Mild compression SCI was induced in Sprague-Dawley rats, and superoxide production and apoptotic DNA injury were characterized. Increased superoxide production was observed exclusively in VMN after SCI. Subsequently, a majority of VMN (80%) selectively underwent delayed apoptotic cell death. These results suggest that the oxidative stress plays a pivotal role in apoptotic VMN death after SCI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脊髄損傷，運動ニューロン，アポトーシス，DNA 損傷，スーパーオキシド

#### 1. 研究開始当初の背景

われわれは軽度脊髄損傷モデルを用いて、これまでに Akt/Bad シグナリングが神経細胞の生存にかかわっていること、endonuclease G とアポトーシスの関与を報告した。このモデルにおける運動ニューロン死は臨床的にも

軽度脊髄損傷後に起こっていると考えられるが、そのメカニズムは解明されていなかった。

選択的運動ニューロン死を起こす軽度脊髄損傷モデルは、上述のようにわれわれが開発した新しいモデルである。われわれはこの

モデルを用いて脊髄損傷後に運動ニューロンに特異的に酸化ストレスが加わること、その後にミトコンドリア依存性アポトーシス経路の第一段階である cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出が起こることを報告した。しかし、その次の段階で起こりうるアポトーシス依存性経路の活性化に関しては十分な検討がされていなかった。

## 2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの変性疾患において選択的運動ニューロン死が起こるが、家族性ALSモデルにおいて運動ニューロンに選択的に酸化ストレスが加わり、ミトコンドリア依存性アポトーシスにより細胞死が起こる。われわれは運動ニューロンには酸化ストレス処理酵素 (superoxide dismutase, SOD) がグリア細胞に比べて少なく、脊髄損傷後には運動ニューロンに選択的に酸化ストレスが発生して細胞死が起こることを初めて報告した。しかし、酸化ストレスが脊髄運動ニューロン死を招来するメカニズムはいまだに解明されておらず、本研究の課題とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 脊髄損傷モデルの作成

Adult male Sprague-Dawley ラット (300-350g) を isoflurane 2%, 酸素 30%, 笑気 70% の吸入麻酔下にラットを腹臥位にして胸腰椎移行部に正中切開をおく。ついで第 13 胸椎、あるいは第 1 腰椎の椎弓を切除し、腰髄膨大部を露出する。腰髄膨大部を血管クリップ (把持力 15g, 5 秒間) で圧迫する。術中は homeothermic blanket を用いて直腸温を 36.5-37.5 度に調節する。

### (2) 運動ニューロン死の確認

脊髄損傷 1, 2, 3, 5 日後にラットを pentobarbital 50mg/kg で腹腔内麻酔し、3.7% formaldehyde を含む PBS で灌流する。24 時間同じ溶液で後固定を行った後、vibratome で厚さ 50 ミクロンの切片に cresyl violet 染色を行って運動ニューロンの細胞死が起こることを確認する。

(3) DNA fragmentation の in situ での評価  
脊髄損傷 1, 2, 3, 5 日後にラットを上記腹腔内麻酔下に断頭して腰髄膨大部を摘出し、cryostat で 25 ミクロンの切片を作成して terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色で DNA free 3'-OH ends を標識する。また、アポトーシスを起こした細胞に比較的特異性が高いといわれる single stranded DNA を免疫染色により標識する。

### (4) superoxide 産生の評価

hydroethidine は静注後に細胞内に移行して superoxide により特異的に酸化されて ethidium となり蛍光を発する。観察 1 時間前に hydroethidine を静注し (1mg/匹) 脊髄損傷 6, 24 時間後に蛍光を観察し、densitometer による定量を行う。

### (5) DNA gel electrophoresis

脊髄損傷 1, 2, 3, 5 日後にラットを上記腹腔内麻酔下に断頭して実体顕微鏡下に腰髄膨大部を摘出し (50mg/匹)、フェノール抽出、エタノール沈殿を行う。精製した DNA を電気泳動し、chemiluminescence 法で可視化して観察する。

## 4. 研究成果

### (1) 脊髄損傷モデルの作成

Adult male Sprague-Dawley ラットの腰髄膨大部を血管クリップで再現性のある脊髄損傷を作ること成功した。術中は homeothermic blanket を用いて直腸温の調節も可能であった。

### (2) 運動ニューロン死の確認

脊髄損傷 1, 2, 3, 5 日後にラット灌流固定し、24 時間同じ溶液で後固定を行った後、厚さ 50 ミクロンの切片を作成し、cresyl violet 染色を行って運動ニューロンの細胞死について確認した。運動ニューロンは損傷 3 日目に約 80% が細胞死を起こした。

### (3) DNA fragmentation の in situ での評価

脊髄損傷 1, 2, 3, 5 日後にラットを 25 ミクロンの切片を作成して TUNEL 染色を行った。損傷後 2 日目以降に TUNEL 陽性細胞が観察され、3 日目に増加した。

### (4) superoxide 産生の評価

観察 1 時間前に hydroethidine を静注し (1mg/匹) 脊髄損傷 6, 24 時間後に蛍光を観察すると、損傷後 6 時間後に有意に蛍光が増加していた。24 時間後でも同様に増加がみられた。

### (5) DNA gel electrophoresis

脊髄損傷 1, 2, 3, 5 日後に精製した DNA を電気泳動し、損傷後 3 日目以降で明瞭な laddering pattern が観察された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件、すべて査読あり)

1. Sugawara, T., Kokubun, K., Ishida, R., Fujiwara, K., Yamamoto, S., Kinouchi, H., Itoh, H., Mizoi, K. Angiotensin receptor blocker directly binds to HSP and stimulates its production in the brain. Recent advances in mathematics and computers in business, economics, biology & chemistry, 350-357, 2010

2. Kokubun K, Sugawara T, Ishida R, Fujiwara

K, Itoh H, Mizoi K Angiotensin receptor blocker candesartan binds to and upregulates molecular chaperone hsp90 in the hippocampal ca1 neurons—a possible mechanism of neuroprotection by angiotensin receptor blocker- Akita J Med 36 : 25-33, 2009

3. Sugawara T, Itoh Y, Hirano Y, Higashiyama N, Mizoi K Long term outcome and adjacent disc degeneration after anterior cervical disctomy and fusion with titanium cylindrical cages. Acta Neurochir 151 : 303-309, 2009

4. Sugawara T, Hirano Y, Higashiyama N, Mizoi K Limaprost alfadex improves myelopathy symptoms in patients with cervical spinal canal stenosis. Spine 34(6) : 551-555, 2009

5. Hirano Y, Sugawara T, Sato Y, Sato K, Omae T, Sasajima T, Mizoi K Negative Pressure Pulmonary Edema Following Foramen Magnum Decompression for Chiari Malformation Type 1 -case report- Neurol Med chir 48(3) : 137-139, 2008

6. 平野仁崇, 菅原 卓, 高橋和孝, 東山巨樹, 山口 卓, 柴田憲一, 西野克寛, 笹嶋寿郎, 溝井和夫. 高齢者頸椎 dumbell schwannoma の 1 手術例. Geriatric Neurosurgery20:93-97, 2008

[学会発表] (計 18 件)

1. Sugawara T Invited lecture "Angiotensin receptor blocker directly binds to HSP and stimulates its production in the brain." WSEAS (World Scientific and Engineering Academy and Society) at Cambridge University, 2010, 2.24, Cambridge (U.K.)

2. Sugawara T Invited lecture "The recent progress in the research for cerebral ischemia" Lecture at Neuroscience Center, Geneva University, 2010, 2.22, Geneva (Switzerland)

3. 菅原 卓. 頸椎前方アプローチの適応と基本手技. 第 30 回日本脳神経外科コンgres 総会, 2010.5.7-9, 横浜

4. 菅原 卓, 東山巨樹, 柴田憲一, 高橋和孝, 笹嶋寿郎, 溝井和夫 脊髄内病変の手術経験 第 25 回日本脊髄外科学会, 2010.6.10-11, 名古屋

5. 鈴木 明, 羽入紀朋, 笹嶋寿郎, 古賀 誠, 高橋和孝, 島田直也, 柴田憲一, 柳澤俊晴, 橋本 学, 溝井和夫 非機能性下垂体腺腫に対する fractionated stereotactic radiotherapy(FSRT) の長期治療成績第 19 回日本定位放射線治療学会, 2010.7.30, 大津

6. 鈴木 明, 羽入紀朋, 笹嶋寿郎, 高橋和孝, 島田直也, 柴田憲一, 溝井和夫, 古賀 眞, 橋本 学. 非機能性下垂体腺腫に対する fractionated stereotactic radiotherapy (FSRT) の長期治療成績第 69 回日本脳神経外科学会総会, 2010.10.27-29, 福岡

7. 菅原 卓, 東山巨樹, 大野秀則, 杉山久幸, 溝井和夫. スクリューガイドテンプレートシステムを用いた頸椎後方固定術第 69 回日本脳神経外科学会総会, 2010.10.27-29, 福岡

8. 菅原 卓. 特別講演「脳卒中患者における ARB の投与意義」第 50 回日本神経学会総会 イブニングセミナー, 2009.5.21, 仙台

9. 菅原 卓, 東山巨樹, 溝井和夫 単一神経根に多発した硬膜内神経鞘腫の 2 手術例第 24 回日本脊髄外科学会, 2009.5.28~29, 宮崎

10. 鈴木 明, 羽入紀朋, 佐久間郁郎, 高橋和孝, 柳澤俊晴, 溝井和夫. 頭蓋底部髄膜腫に対する stereotactic radiotherapy(SRT) の治療成績第 18 回日本定位放射線治療学会, 2009.7.17, 仙台

11. 菅原 卓, 東山巨樹, 平野仁崇, 柴田憲一, 伊藤康信, 溝井和夫 キアリ I 型奇形に対する sandwich duraplasty 第 68 回日本脳神経外科学会総会, 2009.10.14~16, 東京

12. 鈴木 明, 羽入紀朋, 佐久間郁郎, 高橋和孝, 柳澤俊晴, 溝井和夫. 頭蓋底部髄膜腫に対する stereotactic radiotherapy(SRT) の治療成績第 68 回日本脳神経外科学会総会, 2009.10.14~16, 東京

13. 菅原 卓, 東山巨樹, 平野仁崇, 柴田憲一, 伊藤康信, 溝井和夫. キアリ I 型奇形に対する sandwich duraplasty 第 44 回日本脊髄障害医学会, 2009.11.12-13, 東京

14. 鈴木 明, 柳澤俊晴, 高橋和孝, 太田 徹, 内藤雄一郎, 笹嶋寿郎, 溝井和夫, 泉 純一, 戸村則昭, 渡会二郎. 聴神経腫瘍に対する Linac による stereotactic radiotherapy (SRT) の治療成績第 17 回日本定位放射線治療学会, 2008.5.30, 奈良

15. 菅原 卓, 平野仁崇, 東山巨樹, 国分康平, 大前智也, 島田直也, 溝井和夫. 頸椎症性脊髄症に対するリマプロストの効果第 23 回日本脊髄外科学会, 2008.6.12-13, 松島

16. 菅原 卓, 東山巨樹, 平野仁崇, 溝井和夫. 頰椎前方除圧固定術におけるチタンケー  
ジ充填材料としての $\beta$ -TCPとアパセラムの比  
較第 67 回(社)日本脳神経外科学会総会,  
2008.10.1-3, 盛岡

17. 鈴木 明, 羽入紀朋, 佐久間郁郎, 高橋  
和孝, 柳澤俊晴, 溝井和夫. 聴神経腫瘍に対  
する Linac による fractionated stereotactic  
radiotherapy(FSRT)の治療成績第 67 回(社)日  
本脳神経外科学会総会, 2008.10.1-3, 盛岡

18. 菅原 卓, 平野仁崇, 東山巨樹, 溝井和  
夫. 頰椎症性脊髄症に対するリマプロストの  
効果第 43 回日本脊髄障害医学会, 2008.11.6-7,  
札幌

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 明 (SUZUKI AKIRA)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10311573

### (2)研究分担者

菅原 卓 (SUGAWARA TAKU)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号: 80241660