

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591974

研究課題名（和文） Akt(protein kinase B)の活性化による脊髄保護に関する研究

研究課題名（英文） Spinal cord protection by the activation of Akt(protein kinase B)

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

研究成果の概要（和文）：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。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、脊髄虚血から脊髄を保護する臨床応用可能な方法は未だに確立されていない。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製剤を虚血再灌流直後に同時投与することで、家兎一過性脊髄虚血モデルで脊髄保護効果があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：One of the devastating complications after thoracoabdominal aortic surgery is paraplegia. Paraplegia is thought to be a result of spinal cord ischemia during aortic occlusion. To protect against ischemic spinal cord injury, many drugs have been tested in animal experiments. However, no drugs have been established as being protective in the clinical setting. In this study, we found that the combination of erythropoietin and insulin-like growth factor 1 given just after reperfusion protects against ischemic spinal cord injury in a transient spinal cord ischemia model in rabbits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、インスリン様成長因子1、エリスロポエチン

1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈瘤手術の重篤な合併症の一つである対麻痺は、脊髄虚血が原因と考えられている。手術術式等の進歩により対麻痺の頻度は減少しつつあるが、依然として5～

10%の発生率である。また、術後に脊髄障害を生じなかった場合でも、側副血行を介して脊髄血流が正常化するまでの数日間は、脊髄血流は許容限界近くまで低下している可能性が指摘されている。このような状況では、

薬物による脊髄保護が重要な役割を担うと考えられる。

われわれは、家兎一過性脊髄虚血モデルを用いて、今までいくつかの薬物（チオペンタール、テトラカイン、21-aminosteroid、一酸化窒素合成酵素阻害薬、マグネシウム、エダラボン、シクロスポリン A、インスリン）の脊髄保護作用を検討してきたが、満足いく結果は得られていなかった。しかし、平成19-20年度の科学研究費基盤研究C（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）では、エリスロポエチン（EPO）とインスリン様成長因子1（insulin-like growth factor 1：IGF-1）の併用による強い脊髄保護効果を見出した。

しかし、IGF-1とEPOの至適投与時期は不明である。また、保護機序としては、phosphatidylinositol3-kinase (PI3-K)の活性化に続く、Akt (Protein kinase B)の活性化が考えられるが、われわれのモデルでの検証はできていない。さらにAktを活性化する方法を併用することで脊髄保護効果が増強できるか否か不明である。

2. 研究の目的

第1にIGF-1とEPOの保護機序にAktの活性化が関与しているか、その機序を解明することを目的とする。もし、Akt活性化の関与が明らかになれば、臨床的にAktをさらに活性化できる可能性のある方法の一つである硬膜外電気刺激により、IGF-1とEPOの脊髄保護効果を増強できるか否かを検討する。

第2に至適投与タイミングに関する検討があげられる。以前の研究では、IGF-1の保護効果を認めた報告が虚血30分前投与であったことから、IGF-1とEPOの両者を虚血30分前に投与したが、虚血後投与でも保護効果があるか検討する必要がある。IGF-1とEPOの血液脳関門の通過性は低いと報告されており、両者は主として再灌流時に血液脳（脊髄）関門の透過性が亢進する際に脊髄に到達すると考えられる。そうであれば、再灌流直後に投与しても保護効果は認められるはずである。実際、EPOの保護効果を認めた報告ではEPOを再灌流直後に投与している。虚血後投与でも虚血前投与と同様に保護効果があれば、臨床的には大きな意味がある。すなわち、手術中に運動誘発電位等で脊髄虚血が疑われた症例のみに投与することが可能であり、医療経済的にも有意義である。具体的には、虚血再灌流直後にIGF-1とEPOを投与し、その脊髄保護効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) IGF-1とEPOによるAktの活性化の検討

家兎（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、大動脈遮断部の中核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。虚血30分前に生理食塩水、IGF-1、EPO、またはIGF-1+EPOを投与した。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、15分あるいは30分後に脊髄を取り出し、-80℃で保存した。その後、western blottingにより、Aktとextracellular signal-regulated kinase (ERK)、glycogen synthase kinase-3β (GSK3β)の活性化を測定した。

群わけは以下の4群とした。（各群n=8）

①対照群

虚血30分前に生理食塩水を静注

②IGF群

虚血30分前にIGF-1 0.3 mg/kg 静注

③EPO群

虚血30分前にEPO 800 U/kgを静注

④IGF-1+EPO群

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

各群で再灌流15分後（n=4）、30分後（n=4）にL5以下の脊髄を取り出した。

(2) IGF-1とEPOの虚血再灌流後投与による脊髄保護効果

家兎（2~3Kg）を用い、脊髄虚血の方法は研究（1）と同様とした。ただし、大動脈遮断時間は15分とした。虚血再灌流直後に生理食塩水、IGF-1、EPO、またはIGF-1+EPOを投与した。

群わけは以下の4群とした。（各群n=6）

①対照群

虚血再灌流直後に生理食塩水を静注

②IGF群

虚血再灌流直後にIGF-1 0.3 mg/kgを静注

③EPO群

虚血再灌流直後にEPO 800 U/kgを静注

④EPO + IGF群

虚血再灌流直後にIGF-1 0.3 mg/kg とEPO 800 U/kgを静注

虚血再灌流後 60 分後に最終の血糖測定を行い、その後、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）。

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 による Akt の活性化の検討

L5 以下の脊髄の Akt と ERK、glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) の活性化を測定した。

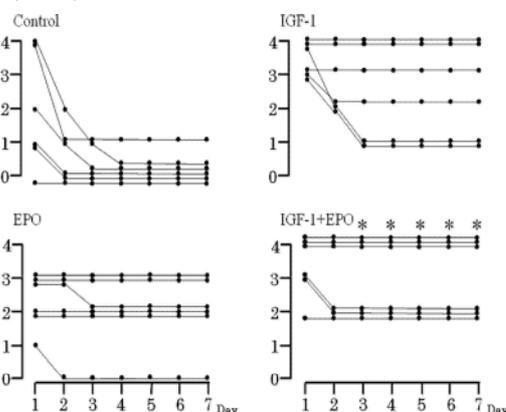
結果は、IGF-1 群、IGF-1+EPO 群で虚血前より Akt が活性化される傾向が観察され、虚血再灌流 15 分後には対照群と比較し有意に強く Akt が活性化された。EPO 群では、対照群と比較し Akt の活性化は顕著ではなかった。

IGF-1+EPO 群では IGF-1 群と比較し、Akt の活性化が増強される傾向はなかった。ERK に関しては、各群とも再灌流 30 分後で虚血前値と比較し有意な活性化が見られたが、各群間で有意な差は見られなかった。GSK3 β の活性化は Akt の活性化とほぼ同様の傾向を示したが、群間差は認められなかった。

(2) EPO と IGF-1 の虚血再灌流後投与による脊髄保護効果

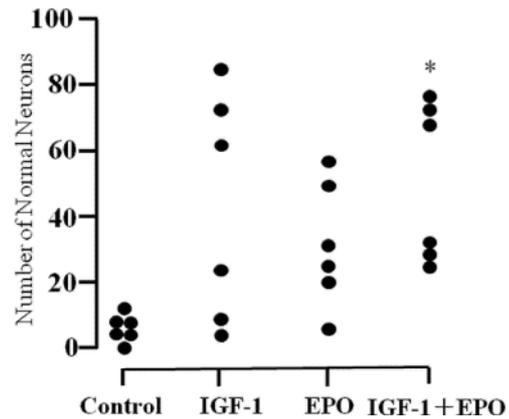
対照群で 1：1 羽、0：5 羽、IGF-1 群で 4：2 羽、3：1 羽、2：1 羽、1：2 羽、EPO 群で 3：2 羽、2：3 羽、0：1 羽、IGF-1+EPO 群で 4：3 羽、2：3 羽と、IGF-1+EPO 群が対照群と比較して有意に神経学的所見がよかった。

(下図)



第 5 腰椎レベルの腹側脊髄の正常神経細胞数は IGF-1+EPO 群が対照群と比較して有意に

正常神経細胞数が多かった（下図）。



(3) 考察

IGF-1 と EPO 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。今までの研究で IGF-1 と EPO の虚血前投与により強い脊髄保護作用を確認していたが、本研究では、その機序として想定していた Akt の活性化は証明できなかった。具体的には IGF-1 には Akt を活性化する作用はあるが、EPO を併用してもその効果が増強することはなかった。IGF-1 と EPO の脊髄保護機序として、さらなる検討が必要である。

一方、IGF-1 と EPO の虚血再灌流直後の投与による脊髄保護効果に関しては、IGF-1、EPO 単独では有意な脊髄保護効果がなかったが、両者を併用することで有意な脊髄保護効果が見られた。これは、再灌流 1 週間後の後肢運動機能の評価でも、組織学的評価でも同様の傾向であった。前回の IGF-1 と EPO の虚血前投与の実験と異なり、今回は対照群のばらつきを少なくするため、虚血時間を 13 分から 15 分に延長したため、虚血前投与に比較すると、再灌流 1 週間後の後肢運動機能スコアも腰部腹側脊髄正常神経細胞数も値は低い、それでも強い保護効果が見られた。

IGF-1 を投与した群では投与後、30 分、60 分で対照群と EPO 群と比較し有意に血糖値が低値であったが、30 分の時点での値と比較し、60 分の時点での値は回復傾向にあり、その値も低血糖により何らかの障害を与える値ではなかった。また、虚血前の軽度低血糖は神経保護効果がある可能性があるが、虚血後の軽度低血糖に脊髄保護効果がないことは、われわれの以前の実験で実証済みである。したがって、今回の IGF-1 と EPO の併用による脊髄保護効果は血糖値の変化によるも

のではないと考えられる。

EPOの単独投与では、前回の虚血前投与と同様に有意な脊髄保護効果が確認されなかったが、保護傾向は観察された。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単独の脊髄保護効果は前回の虚血前投与では全く認められなかったが、今回の虚血後投与では保護傾向が認められた。前回の虚血前投与の研究では、IGF-1を投与していない群と虚血直前の血糖値をそろえるために、IGF-1群にブドウ糖負荷を行った。そのため、血糖値が今回の研究よりやや高かったことが、保護効果が全く認められなかったことに関係している可能性がある。

当初の予定では、IGF-1とEPO投与にさらに硬膜外刺激電極を挿入して、保護効果が増強されるか検討する予定であった。しかし、IGF-1とEPOの併用によりAktの活性化が明らかではなかったことと、予備実験で硬膜外刺激電極の留置により、比較的高率に硬膜外出血を起こすことがわかり、硬膜外電気刺激による脊髄保護の研究に関しては断念した。

(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IGF-1とEPO製剤の併用により虚血再灌流後の投与でも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。

胸腹部大動脈瘤手術時の大動脈遮断による脊髄障害の頻度は5~10%である。どんな薬物でも必ず副作用があるため、必要な患者のみに限定して保護薬を投与することができれば望ましい。また、経済的でもある。その観点からすると、今回の研究で虚血再灌流後にIGF-1とEPO製剤を投与することで脊髄保護の可能性が確認されたことは、臨床的意義が大きい。すなわち、胸腹部大動脈瘤手術時に脊髄機能モニタリングを行い、脊髄虚血の可能性が濃厚な患者のみに投与することが可能であることを意味する。

(5) 今後の展望

今回の研究では、IGF-1とEPOの虚血前投与により、Aktの活性化を証明することができなかったのは残念な結果であった。しかし、IGF-1とEPOの虚血後投与により脊髄保護効果が確認できたことは大きな成果であった。今までの中枢神経保護戦略は、神経細胞死の機序を解明して、その機序をブロックすることにより神経保護効果を得ようとする考え方が主流であったが、その考え方では中枢神経保護は困難である可能性が高いことが判明しつつある。それに比較し、今回の結果の

ように、神経細胞が本来持つ自己保護作用を増強して神経保護を達成する戦略の方が有効である可能性が高いことが明らかになった意義は大きい。今後はその機序を検討し、さらには投与タイミング(therapeutic window)などの検討を行っていきたい。

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3件)

①松本美志也、白澤由美子、石田和慶、福田志朗、山下敦生、麻薬は虚血性脊髄障害を増悪させない、日本臨床麻酔学会誌、査読有、32巻、2012、359 - 365

②松本美志也、神経麻酔を考えるー基礎から臨床へー、麻酔、査読有、59巻、2010、S173-S180

③Yumiko Shirasawa, Mishiya Matsumoto, Manabu Yoshimura, Atsuo Yamashita, Shiro Fukuda, Kazuyoshi Ishida, Takefumi Sakabe, Does high-dose opioid anesthesia exacerbate ischemic spinal cord injury in rabbits? J Anesth, 査読有, vol 23, 2009, 242-248

[学会発表] (計8件)

①松本美志也 脊髄虚血 第81回獣医麻酔外科学会 招待講演 2011年1月29日 福岡国際会議場 福岡

②松本美志也 中枢神経系における一酸化窒素の役割 第14回日本医療ガス学会学術集会 2010年11月20日 金沢アートホール 金沢

③松本美志也 オピオイドは虚血性脊髄障害を増悪しない 日本臨床麻酔学会第30回大会 2010年11月4日 徳島グランヴィリオホテル 徳島

④Mishiya Matsumoto, Manabu Yoshimura, Atsuo Yamashita, Shiro Fukuda, Kazuyoshi Ishida Neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor 1 in spinal cord ischemia, American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2010 2010年10月18日 米国 San Diego

⑤松本美志也、吉村学、山下敦生、福田志朗、石田和慶 エリスロポエチンの脳・脊髄保護効果 日本心臓血管麻酔学会第15回学術大会 2010年10月10日 ザ・プリンスパークタワー東京 東京

⑥松本美志也 胸腹部大動脈瘤手術時の脊髄保護 日本麻酔科学会中国・四国支部第47

回学術集会 2010年9月11日 米子コンベンションセンタービッグシップ 米子

⑦松本美志也 神経麻酔を考える：基礎から臨床へ 日本麻酔科学会第57回学術集会 2010年6月5日 福岡国際会議場 福岡

⑧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 日本麻酔科学会第56回学術集会 2009年8月18日 神戸ポートピアホテル 神戸

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・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

福田 志朗 (FUKUDA SHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70322245