

## 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25年5月14日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390299

研究課題名（和文） マウス遅発性脊髄障害への硫化水素吸入の治療効果

研究課題名（英文） The neuroprotective effect of inhaled hydrogen sulfide against delayed paraplegia after spinal cord ischemia in mice

研究代表者

垣花 学（KAKINOHANA MANABU）

琉球大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20274897

研究成果の概要（和文）：生体内ガス分子のひとつであり、かつ抗炎症効果、ラジカルスカベンジング効果、抗アポトーシス効果を有する硫化水素を用い、その吸入療法（80ppm x 5時間）による脊髄虚血後遅発性対麻痺に対する神経保護効果を検討した。その結果、脊髄虚血後72時間目の神経学的所見において、脊髄虚血後24時間目に硫化水素吸入療法を開始した吸入群で、対照群と比較し有意に改善効果が認められた（67%のマウスで遅発性対麻痺発生がなかった）。さらに、組織学的所見においても脊髄前角における正常神経細胞数が有意に多かった。また、免疫組織学的所見でも活性化型カスパーゼ3の発現が有意に抑制されていた。これらのことから、硫化水素吸入療法は抗アポトーシス効果を発揮し、マウス脊髄虚血後遅発性対麻痺の発症を抑えることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), well-known for one of endogenous gas molecules, is reported to possess potency of anti-inflammation, radical scavenging effect, and anti-apoptotic effect, etc. We have investigate the neuroprotective effect of inhaled H<sub>2</sub>S (80ppm x 5 hrs) against delayed onset paraplegia after spinal cord ischemia in mice. As a result from our experiments, mice treated with inhaled hydrogen sulfide showed significant better neurological outcome at 72 hrs of reperfusion with preserving the number of normal neurons in spinal ventral horn. Additionally, inhaled H<sub>2</sub>S suppressed the expression of cleaved caspase3 in the spinal ventral horn significantly comparing with control group. According to the present data, it is suggested that inhaled H<sub>2</sub>S potentially protect spinal ventral neurons after spinal cord ischemia, and this protective effect might be associated with its anti-apoptotic effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床系医学・麻酔・蘇生学

キーワード：硫化水素、遅発性対麻痺、脊髄虚血、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は、その特性として血流途絶（虚血）や機械的損傷（外傷）に対し脆弱であり、一旦発症するとそれに伴う神経学的機能低下により患者の身体的・精神的さらに経済的負担は莫大なものとなる。近年、さまざまな動物モデルや解析手技（病理組織学、電気生理学、分子生物学、放射線医学など）により、脳虚血や外傷などの病態生理やその治療に関する研究は想像以上に進んでいる。しかしながら、脊髄では、その特殊な血流分布や運動・感覚機能の集約という点から、いったん発生した虚血あるいは外傷からのその機能を保護する手段は非常に少ない。我々は、以前からラット脊髄虚血モデルを用い、その病態生理と治療について多くの解析手技を用い研究・報告してきた。しかし、ラットでは遺伝子改変動物を用いた実験ができず、その病態生理と治療に関する分子生物学的検討が十分ではなかった。この点を改善すべく、我々はマウスを用いた大動脈遮断脊髄虚血モデルの作成を試み、最近ついに完成に至った。上述のマウス脊髄虚血モデルを用い H<sub>2</sub>S 吸入による脊髄保護効果の有無について予備実験を行った。その結果、脊髄虚血 24 時間後に H<sub>2</sub>S(80 ppm)を 5 時間吸入させたところ、対照群（H<sub>2</sub>S 吸入無し）と比較し有意（ $p < 0.01$ ）に対麻痺発生率を低下させる（対麻痺発生率：対照群（100%）、治療群（33.3%））という予備実験結果を得た。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、この遅発性脊髄障害マウスモデルを用い H<sub>2</sub>S 吸入による脊髄神経保護効果の機序について、病理組織学的、分子生物学的アプローチならびに遺伝子改

変マウスを用いることにより解明することを目的とし、さらに臨床応用を目指している。

## 3. 研究の方法

### <マウス脊髄虚血モデル作成>

マウス：C57/BL6、iNOS KO mice（8～10 週齢 雄）

(1) 麻酔管理：酸素・イソフルラン（1.5～2.0%）、体温を 37.5°C に維持する

(2) 呼吸管理：気管挿管後に人工呼吸

(3) 手術

① 左大腿動脈より動脈ライン（PE-10）を確保

② 頸部および前胸部正中切開し左内頸動脈を指標に胸骨切開（第 2 肋骨まで）

③ 胸骨を左右に牽引し、胸腺を剥離することで左内頸動脈と弓部大動脈を露出

④ ヘパリン 20 単位を左大腿動脈より投与

⑤ 左鎖骨下動脈と左内頸動脈との間で弓部大動脈を遮断（脳動脈瘤クリップを用いる）

⑥ さらに左鎖骨下動脈を遮断（側副血行を遮断）

⑦ 大動脈遮断 5 分後に遮断を解除し再灌流する（Sham 手術は、大動脈遮断無し）

⑧ 閉創し麻酔から覚醒させる

⑨ 覚醒後、抜管し 30°C の環境温下で 2 時間観察する

⑩ 虚血後 2、4、6、24、48、72 時間目に Motor Deficit Index (Stroke 1996;27:1850) と BBB score (Cell Mol Neurobiol 2006;26:1167) を用い神経学的運動機能評価を行った

### <H<sub>2</sub>S 吸入療法>

脊髄虚血 24 時間後にアクリル製吸入ボックス (自作) にマウスを入れた

- (1) 空気 1L/分・H<sub>2</sub>S 80ppm をアクリル製吸入ボックスに流入する
- (2) マウスの入ったアクリル製吸入ボックスを環境温 33.5~34°C で維持する
- (3) 吸入開始から 5 時間後、アクリル製吸入ボックスからマウスを取り出す。その後室温下で飼育した

### <病理組織学的評価>

脊髄固定：ペントバルビタール大量投与により犠殺し、経心臓的にヘパリン生食 (4°C)、それに引き続き 4%ホルマリンで灌流固定する。なお、経時的变化を捉えるために、虚血後 2、8、24、32、48 そして 72 時間目に犠殺した

- (1) 固定 24 時間後に、腰髄膨大部を摘出し、1%PBS あるいは 30%スクロースに保存
- (2) パラフィン切片 (ニッスル染色用) あるいは凍結切片 (免疫染色用) を作成。
- (3) 免疫染色は運神経細胞(NeuN)、活性型マイクログリア(Iba-1)、活性型アストロサイト(GFAP)と活性型 Caspase(cleaved)の二重染色を行った。

### <脊髄サンプル採取>

- (1) 虚血後無治療群、虚血後 H<sub>2</sub>S 吸入群、Sham 無治療群、Sham H<sub>2</sub>S 吸入群を設定
- (2) 虚血後 2、24、32、48 そして 72 時間目に犠殺 (大量ペントバルビタール)

- (3) 犠殺後、脊柱 (中部胸椎~仙椎にかけて) を取り出し、仙骨部脊柱管から冷生理食塩水 (4°C) を注入し脊髄を圧出させる
- (4) 圧出した脊髄を氷上 1%PBS 溶液内で洗浄し、直ちに液体窒素で凍結する
- (5) その後-80°Cで保存する

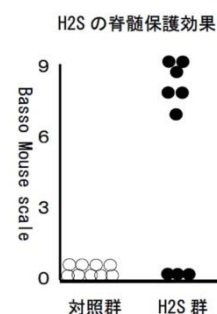
### <Q-PCR>

- (1) 凍結脊髄サンプルから RNA を抽出する
- (2) その後、プライマー-DNA、逆転写酵素により first-strand cDNA を合成 (IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  など)
- (3) この cDNA をテンプレートにして蛍光プローブを用いて PCR を行う (Q-PCR)

## 4. 研究成果

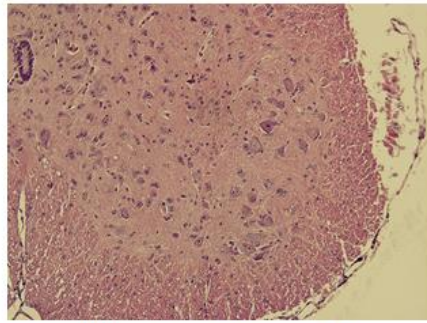
<虚血性脊髄障害 (遅発性麻痺) に対する硫化水素吸入療法の効果>

脊髄虚血後 24 時間目に硫化水素 80ppm・5 時間吸入により遅発性対麻痺の発症を有意に抑えた。

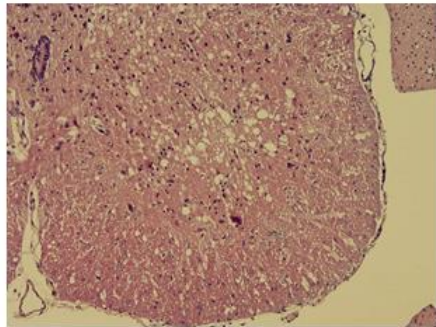


### <組織学的変化>

硫化水素吸入群では、脊髄虚血 72 時間後の脊髄所見で脊髄前角の神経細胞変性を推させる効果が見られた。



H2S inhalation (80ppm x 5 h)



Control

<免疫組織学的検討>

硫化水素吸入群において脊髄前角に NeuN 陽性細胞が有意に多く確認できた。また、脊髄虚血後 31 時間（硫化水素吸入療法終了後 2 時間）の脊髄標本における活性型カスパーゼ 3 (Cleaved caspase3) 陽性細胞について（下図）、硫化水素吸入群で有意に減少していた。

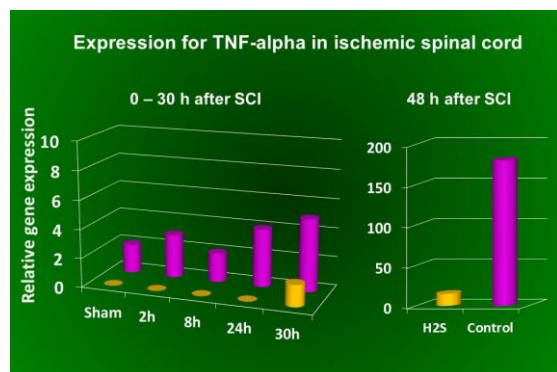
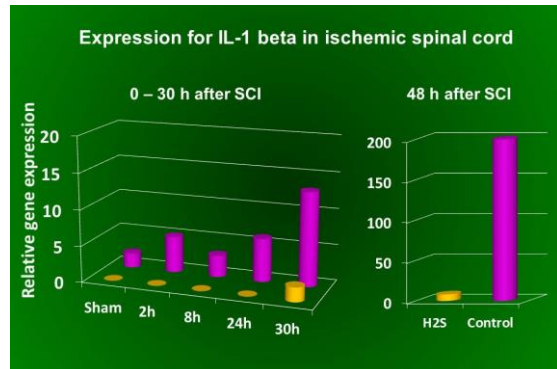


H2S inhalation (30 hrs)



Control (30 hrs)

<脊髄虚血後の炎症性サイトカイン発現>  
硫化水素吸入群における炎症性サイトカインの発現は、対照群と比較し有意に抑えられていた。



<iNOS ノックアウトマウスにおける硫化水素吸入療法の効果>

iNOS ノックアウトマウスでは、5分虚血後に遅発性の対麻痺を発症する (Wild マウスと同様)。しかしながら、iNOS ノックアウトマウスにおいて硫化水素吸入療法を行っても、遅発性対麻痺の発症を抑えることはできなかった。

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 1 件)

M Kakinohana (研究代表者), K Kida, S Minamishima, DN Atochin, PL Huang, M Kaneki, F Ichinose. Delayed paraplegia after spinal cord ischemic injuries requires

caspase-3 activation in mice. Stroke 2011 : 42 :  
2302-7 (査読あり)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 1 件)

名称 : 神経変性疾患の病態モデルマウスおよびその作成方法ならびに当該モデルマウスを用いた神経変性疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法

発明者 : 垣花 学

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特開 2012-115210

取得年月日 : 平成 24 年 6 月 21 日

国内外の別 : 国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

垣花 学 (KAKINOHANA MANABU)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 20274897

### (2) 研究分担者

大城 匡勝 (OSHIRO MASAKATSU)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 00315483

渕上 竜也 (FUCHIGAMI TATSUYA)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 10381211

照屋 孝二 (TERUYA KOJI)

琉球大学・医学部・助教

研究者番号 : 50437985

### (3) 連携研究者

なし