

## 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（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591548

研究課題名（和文） 虚血性脊髄障害に対するエピジェネティック的治療戦略

研究課題名（英文） The strategy of modulation for epigenetics against ischemic spinal cord injury

研究代表者

齋川 仁子（SAIKAWA SATOKO）

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20404569

研究成果の概要（和文）：マウス大動脈遮断モデルを用いヒストン脱アセチル化酵素阻害薬（HDAC）による虚血性脊髄障害への効果について、HDAC投与の時期を変化させ検討した。全身麻酔下に大動脈弓部を5分間遮断し脊髄虚血モデルを作成した。HDAC法は、虚血7日前（HDAC 7群）、3日前（HDAC 3群）、前日（HDAC 1群）にHDACを腹腔内投与した。非治療群（C群）はDMSOを腹腔内投与とした。その結果、C群では10匹中10匹が48時間後に遅発性対麻痺を発症したが、HDAC 7群およびHDAC 3群では8匹中8匹で対麻痺を認めた。HDAC 1群では8匹中7匹で対麻痺を来し、1匹は再灌流後死亡した。病理組織学的検討では、HDAC群では虚血後48時間目に脊髄前角に空泡を伴う運動神経細胞損傷が認められた。さらに、活性型カスパーゼ3に対する免疫染色では、両群で虚血後30時間目から脊髄運動神経細胞が活性型カスパーゼ3陽性となり、アポトーシスの指標であるTUNNEL染色でも陽性であった。さらに対麻痺脊髄において、グリア細胞（活性型マイクログリア、活性型アストロサイト）の集積が認められた。一連の研究結果では、HDACを腹腔内投与させたが運動機能、病理組織にその予後を改善することは認められなかった。また、活性型カスパーゼ3発現も抑制されていないことから、今回の投与方法ではHDACによる神経細胞アポトーシスを抑制する可能性は少ないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether inhibition of histon-deacetylation (HDAC) can exert neuroprotective effect against delayed paraplegia after spinal cord ischemia in mice. Treatment groups were divided into 3 groups in corresponding to duration of HDAC treatment (7 days before, 3 days before, and 1 day before spinal cord ischemia). Saline treatment was defined as control group. As a result from our experiments, any animal treated with inhibition of HDAC could not show significantly improve neurological outcome in comparison with control group. Histopathological and immunohistopathological analysis also failed to show any differences among all groups. According to our data, modulation of HDAC is unlikely to be associated with delayed neurological degeneration in spinal ventral horn in mice spinal cord ischemic model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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：外科系臨床系医学・胸部外科学

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

胸部下行大動脈遮断による脊髄虚血は、胸腹部大動脈手術後の最も悲惨な合併症である対麻痺を来しそれは患者および家族の生活に多大な損害を与える。血管外科手術で最も困難な領域であるため、現在でもその予防ならびに治療に関して世界中で様々な研究が行われている。

DNA メチル化やヒストン脱アセチル化は、内外環境の変化により多種多様に起こり、それが個体の特性として表現される。したがって、通常では起こらない低酸素・低栄養状態を引き起こす虚血侵襲は内的環境変化のなかで最も強力であり、その侵襲の中にある細胞でエピジェネティック的反応が起こることは不思議ではない。現時点で、エピジェネティックの中心的な役割を担う DNA メチル化やヒストン脱アセチル化と中枢神経系の虚血性障害に関する報告は少ない。Endress らは、マウス脳虚血モデルにおいて DNA メチル化の変化と遅発性神経細胞死における DNA メチル化の影響について報告(J Neurosci 2000)している。その中で、脳虚血により DNA メチル化が増加し、DNA メチル化を減少させた状態では遅発性神経障害が減少すると報告した。エピジェネティック制御系の中心的な役割を果たしているヒストン脱アセチル化は、脱アセチル酵素によりヒストンからアセチル基がはずれ、それにより転写が抑制される。この脱アセチル酵素を阻害し転写抑制を低下させること（転写促進）により、さまざまな腫瘍細胞でアポトーシスが起ると報告 (Curr Cancer Drug Targets 2004)

されている。また、ヒストン脱アセチル化阻害により Caspase の発現が抑制されることも報告 (Biochem Biophys Res Commun 2009) されている。つまり、先述した DNA メチル化減少とヒストン脱アセチル化阻害、いわゆる転写促進へ傾けることにより細胞死あるいはアポトーシスが減少すると考えられている。

### 2. 研究の目的

我々は、「アポトーシスが関係しているこの遅発性対麻痺にも、エピジェネティック制御系のヒストン脱アセチル化が関与し、その修飾により遅発性対麻痺を予防できる」と仮説を立てた。そこで、このマウス遅発性対麻痺モデルを用い、「遅発性対麻痺とヒストン脱アセチル化との関係」と「ヒストン脱アセチル化阻害による遅発性対麻痺予防」を主眼に置き、以下を計画した。

### 3. 研究の方法

#### <マウス脊髄虚血モデル作成>

マウス：C57/BL6、SIRT1 ヘテロ 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℃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

#### <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℃)、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 H2S 吸入群、Sham 無治療群、Sham H2S 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℃)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℃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ベを用いて PCR を行う (Q-PCR)

#### <ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬実験>

- (1) C57BL6 マウス (8-10W) に対し、Vorinostat (ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬)を腹腔内投与する(治療群)。対照群には、生理食塩水を投与する。
- (2) 上記の実験に順じ、脊髄虚血を行う。
- (3) 虚血後 2、4、8、24、48、72 時間目に Motor Deficit Index (Stroke

1996;27:1850)と BBB score (Cell Mol Neurobiol 2006;26:1167)を用い運動機能評価を行う。

- (4) 虚血後 72 時間目に犠殺し、経心的にヘパリン生食 (4°C)、それに引き続き 4%ホルマリンで灌流固定する。
- (5) 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。
- (6) パラフィン切片 (ニッスル染色用) を作成し、残存神経細胞数をカウントし比較する。

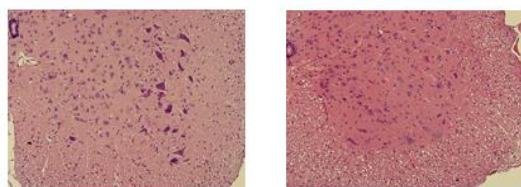
#### 4. 研究成果

<虚血性脊髄障害 (遅発性麻痺) に対すヒストン脱アセチル化酵素阻害の効果>

HDAC 法は、虚血 7 日前 (HDAC 7 群)、3 日前 (HDAC 3 群)、前日 (HDAC 1 群) に HDAC を腹腔内投与した。非治療群 (C 群) は DMSO を腹腔内投与とした。その結果、C 群では 10 匹中 10 匹が 48 時間後に遅発性対麻痺を発症したが、HDAC 7 群および HDAC 3 群では 8 匹中 8 匹で対麻痺を認めた。HDCA1 群では 8 匹中 7 匹で対麻痺を来し、1 匹は再灌流後死亡した。

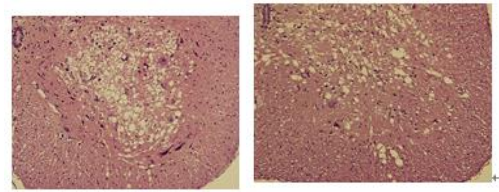
<組織学および免疫組織学的変化>

病理組織学的検討では、HDAC 群では虚血後 48 時間目に脊髄前角に空砲を伴う運動神経細胞損傷が認められた。



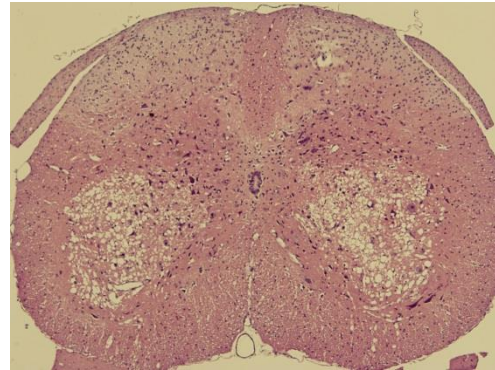
2 hrs

24 hrs



48 hrs(Control)

72 hrs(Control)



72 hrs (HDAC inhibitor)

さらに、活性型カスパーゼ 3 に対する免疫染色では、両群で虚血後 30 時間目から脊髄運動神経細胞が活性型カスパーゼ 3 陽性となり、アポトーシスの指標である TUNNEL 染色でも陽性であった。さらに対麻痺脊髄において、グリア細胞 (活性型マイクログリア、活性型アストロサイト) の集積が認められた。

#### 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 (研究分担者), 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 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋川 仁子 (SAIKAWA SATOKO)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 20404569

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

なし