

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791465

研究課題名(和文) ウサギの脊髄局所冷却による脊髄保護効果とオートファジーの関連についての検討

研究課題名(英文) Autophagy-mediated stress response in motor neurons after transient ischemia in rabbits

研究代表者

藤田 智 (FUJITA, SATOSHI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：80621383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウサギの脊髄虚血モデルおよび脊髄冷却モデルを用い、脊髄虚血後の運動神経再装備におけるオートファジーの関わりと、冷却による脊髄保護のメカニズムの一部を解明することを目指した。最終的に細胞死をきたす運動神経細胞内において、オートファジー関連タンパク質(Bcl-2、Beclin-1、GABARAP)が誘導されていることが証明された。また、一過性脊髄虚血により運動ニューロン内で誘導される遅発性運動神経細胞死において、オートファジーが関与していることが示唆された。生存する運動神経細胞内においては、オートファジーを抑制的に制御するBcl-2の発現増強が遷延することが証明された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate the role of autophagy mediated stress response in motor neuron death after transient ischemia in rabbits. We recognized that autophagy might be a potential factor responsible for delayed motor neuron death, and the prolonged induction of the autophagy inhibitory protein Bcl-2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脊髄虚血 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

脊髄虚血による対麻痺は、下行大動脈瘤や胸腹部大動脈瘤手術時の合併症として最大20%の頻度で認められ、術後の患者のQOLを考える上で非常に大きな問題となっている。これまでも脊髄保護目的に様々な薬物療法や低温療法、脊髄ドレナージ法が臨床応用されてきたが、いまだ確立された脊髄保護法はない。一方で診断技術の進歩、高齢化の進行、生活様式の欧米化等により大動脈瘤の患者は確実に増加しており、手術成績向上のために脊髄虚血による対麻痺の進展に関するメカニズムの解明やその予防法の確立に対する重要性は増している。

下行大動脈瘤手術や胸腹部大動脈瘤手術時の大動脈遮断操作に伴う脊髄の虚血・再灌流によって、脊髄神経細胞内ではアラキドン酸代謝系や nNOS などのフリーラジカル産生系が活性化し、その結果大量のフリーラジカルが産生される。このような酸化ストレスによって直接的にも神経細胞は障害を受ける（急性運動神経細胞死）が、この酸化ストレスによって好中球やマクロファージなどの炎症細胞が活性化しサイトカインが放出される結果、神経細胞のアポトーシス（遅延性運動神経細胞死）が起こり梗塞領域が拡大すると考えられている。

このアポトーシスには細胞外からのシグナル伝達によるもの（外因系経路）と、細胞内のシグナル伝達によるもの（内因系経路）が良く知られており、遅延性運動神経細胞死は内因性経路によるアポトーシスが強く関与していることが報告されている。さらにこの内因性経路によるアポトーシスにはミトコンドリアや小胞体といった細胞内器官が強く関与していることも報告されている。

加えて近年では酸化ストレスや小胞体ストレスにより賦活されるオートファジーもアポトーシスと相互的に作用し遅延性運動神経細胞死の機序の一部を担うことが明らかにされてきた。オートファジーは細胞の基礎代謝に関わる基礎的オートファジーと、様々な刺激・ストレスに反応して生じる誘導性オートファジーに大別される。健常な細胞内では細胞質内の不要な構造物を隔離膜で包み込み、オートファゴソームと呼ばれる構造物を形成し輸送小胞もしくはリソソームと融合して一度に多量の基質を分解（bulk proteolysis）する。誘導性オートファジーは細胞の飢餓や炎症、虚血などのストレスにより誘導され、細胞内の基質を分解する事で代謝に必要なアミノ酸を供給したり、変性した蛋白質を処理する事で細胞の破綻を防いでいる。しかしながら神経系の一過性虚血においては酸化ストレスや小胞体ストレスにより誘導される誘導性オートファジーにより遅延性運動神経細胞死が起こる事が知られている。

2. 研究の目的

研究の目的はウサギの脊髄虚血モデルを用い、脊髄虚血後の運動神経細胞死におけるオートファジーの関わりと冷却による脊髄保護のメカニズムの一部を解明することである。

臨床的にも胸部大動脈および胸腹部大動脈瘤手術時の低体温法は広く行われているが、ウサギにおいても脊髄虚血モデルおよび脊髄の局所冷却による脊髄保護モデルは確立している。これら2つのモデルを用いて、脊髄虚血後のオートファジーの誘発の程度およびオートファジー関連蛋白の経時的变化について観察・検討・解析し、胸腹部大動脈瘤手術後の対麻痺の合併および冷却による脊髄保護のメカニズムの一部を明らかにする。

2. 研究の方法

本研究は、2.5kg～3kg の日本白ウサギの一過性脊髄虚血モデルを用いて行う。モデルを3群（Group1：sham 群、Group2：単純虚血群、Group3：脊髄局所冷却群）に分け、それぞれの群で再灌流後のウサギ後脚の運動機能、生化学的検査、病理学的所見等を比較検討する。ウサギ後脚運動機能に関しては Johnson's score を用いて詳細に評価する。安楽死させた後に L1-7 腰髄組織を採取し、HE 染色での脊髄前角細胞の生存の有無、炎症細胞浸潤の程度を観察し、Western blotting により脊髄中のオートファジー関連蛋白（LC3-II、Beclin-1、GABARAP、Bcl-2 等）の発現を測定する。更に免疫染色および蛍光二重染色にて、それぞれのオートファジー関連蛋白の運動神経細胞内の局在を観察する。

①脊髄単純虚血モデル作成

- 1)麻酔導入：ケタラール (50mg/kg) を筋注する。
- 2)麻酔維持：2%ハロセンを吸入させ麻酔を維持する。
- 3)深部温を直腸温でモニターする。
- 4)右大腿動脈より 5F カテーテル (model 405 ; Braun, Melsungen, Germany) を腹部大動脈に向けて 15cm 挿入し、バルーンを膨らませ、15 分間大動脈を遮断する。
- 5)15 分後バルーンを脱気し、カテーテルを抜去する。
- 6)右大腿部を縫合閉鎖する。

②脊髄局所冷却による脊髄保護モデル作成

- 1)麻酔導入：ケタラール (50mg/kg) を筋注する。
- 2)麻酔維持：2%ハロセンを吸入させ麻酔を維持する。
- 3)深部温を直腸温でモニターする。

- 4)ウサギの脊髄 L1～L5 領域の体毛を剃り、皮膚を露出する。
5)右大腿動脈より 5F カテーテル (model 405 ; Braun, Melsungen, Germany) を腹部大動脈に向けて 15cm 挿入し、バルーンを膨らますのと同時に露出した皮膚 (L1～L5 領域) にアイスパッドをあて、15 分間大動脈を遮断する。
6)15 分後バルーンを脱気すると同時に、アイスパッドを除去し、カテーテルを抜去する。
7)右大腿部を縫合閉鎖する。

上記方法により、カテーテル先端は左腎動脈下 0.5cm～1cm に先端となり、ウサギの一過性脊髄虚血モデルおよび、脊髄局所冷却による脊髄保護モデルは確立している。

③脊髄組織の抽出

実験中は、心拍数、心電図、血圧は連続的にアナログ-デジタル変換機 (PowerLab System, AD Instrument, Ltd, Dunedin North, New Zealand) で変換し、Windows コンピューターに記録保管する。

それぞれの群で、大動脈遮断解除後 8 時間、1 日目、2 日目、7 日目に後脚の運動機能を Johnson's score にて 6 段階に評価する。その間注意深く観察し、8 時間、1 日目、2 日目、7 日目にそれぞれペントバルビタール Na の過麻酔にて安楽死させ、組織学的評価、生化学的評価のために L1～L7 腰髄を摘出する。

I)後脚運動機能

再還流後、8 時間、1 日目、2 日目、7 日目の時点でウサギ後脚の運動機能を Johnson's score (0: Hind-limb paralysis; 1: Severe paraparesis; 2: Functional movement, no hop; 3: Ataxia, disconjugate hop; 4: Minimal ataxia; 5: Normal function.) にて判定する。

II)病理組織学的検査

再灌流後 8 時間、1 日目、2 日目、7 日目に摘出した組織標本は H&E 染色を行い、脊髄前角の運動神経細胞の生存の有無、炎症細胞/貪食細胞浸潤の程度を観察する。また、免疫染色を行いオートファジー関連蛋白 (LC3-II, Beclin-1, GABARAP, Bcl-2) の神経細胞内での発現の程度および局在の観察を行う。さらに、蛍光二重染色を行い、神経細胞内でのオートファジー関連蛋白の局在および共存を観察する。

III)生化学的評価

再灌流後 8 時間、1 日目、2 日目、7 日目それぞれのポイントの、オートファジー関連蛋白 (LC3-II, Beclin-1, GABARAP, Bcl-2) の測定を行う。各ポイントで摘出した脊髄か

ら蛋白を抽出後、Western blotting を行い、脊髄内の LC3-II, Beclin-1, GABARAP, Bcl-2 の発現の程度および、経時的变化を測定する。

3. 研究成果

Johnson's score による後脚機能評価によれば脊髄冷却により対麻痺は良好に回避されていることが確認できた。最終的に細胞死をきたす運動神経細胞内において、オートファジー関連タンパク質 (Bcl-2, Beclin-1, GABARAP) が誘導されていることが証明された。また、一過性脊髄虚血により運動ニューロン内で誘導される遅発性運動神経細胞死において、オートファジーが関与していることが示唆された。生存する運動神経細胞内においては、オートファジーを抑制的に制御する Bcl-2 の発現増強が遷延することが証明された。

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)

Satoshi Fujita, Autophagy-mediated stress response in motor neurons after hypothermic spinal cord ischemia in rabbits, Journal of Vascular Surgery [in press] (DOI: 10.1016/j.jvs.2014.03.297)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 智 (FUJITA SATOSHI)

九州大学 医学研究院 共同研究員

研究者番号：80621383