

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：87114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861198

研究課題名(和文) 受傷後早期の高血糖が脊髄構成細胞ならびに炎症細胞に及ぼす影響の網羅的解析

研究課題名(英文) Hyperglycemia during acute spinal cord injury is a preventable risk factor for spinal cord injury - Translational research from animals to humans -

研究代表者

久保田 健介 (Kubota, Kensuke)

独立行政法人労働者健康安全機構総合せき損センター(研究部)・独立行政法人労働者健康安全機構総合せき損センター(研究部)・研究員(移行)

研究者番号：00717069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、急性高血糖が脊髄損傷後の機能予後に与える影響を調べた。脊髄損傷モデルマウスを用いた実験では、高血糖状態ではミクログリアの転写因子NF- κ Bが過度に活性化され、2次損傷の拡大・運動機能回復の悪化が引き起こされていた。総合せき損センターに入院した脊髄損傷患者528人の後ろ向きコホート研究では、入院時に高血糖を呈する患者の運動機能回復が著しく低下していた。さらに、脊髄損傷後にインスリンを用いて高血糖マウスの血糖値をコントロールすると、正常な運動機能回復が起こった。これらの結果は、脊髄損傷後の運動機能回復能を十分に引き出すには、急性期血糖の適切なコントロールが重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Under hyperglycemic conditions, both in vivo and in vitro, inflammation was enhanced through promotion of the nuclear translocation of the nuclear factor κ B (NF- κ B) transcription factor in microglial cells. During acute SCI, hyperglycemic mice exhibited progressive neural damage, with more severe motor deficits than those observed in normoglycemic mice. Consistent with the animal study findings, a Pearson χ^2 analysis of data for 528 patients with SCI indicated that hyperglycemia on admission was a significant risk predictor of poor functional outcome. Moreover, a multiple linear regression analysis showed hyperglycemia at admission to be a powerful independent risk factor for a poor motor outcome. Manipulating blood glucose during acute SCI in hyperglycemic mice rescued the exacerbation of pathophysiology and improved motor functional outcomes. These results suggest that glycemic control may be needed to improve recovery after acute spinal cord injury in human patients.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷 高血糖 機能予後 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

外傷性脊髄損傷は重度の運動・感覚障害を引き起こし、QOLの著しい低下を来し得る。中枢神経系の内在性再生能と修復能は限られているため、神経学的機能のさらなる増悪を防ぎ、脊髄損傷の予後を改善させるためには脊髄損傷の増悪因子を特定する必要がある。年齢、血圧、感染症の有無などが脊髄損傷患者の予後予測因子として考えられているが、治療介入可能な予後増悪因子は未だ明らかではない。

中枢神経系における常在性の免疫細胞であるミクログリアは病原体の侵入や組織障害への暴露によって刺激された後、防衛ラインの最前線を形成する。脊髄損傷直後に、活性化したミクログリアはTNF- α やIL-6、IL-1 β のようなサイトカインを発現することによって炎症反応を増強・伝搬する。近年我々は、ミクログリアの活性化が脊髄損傷の神経学的予後に関連する事を示した。また、ミクログリアの活性化の詳細なメカニズムは不明であるが、いくつかの基礎研究により、高血糖がミクログリアを含む常在性単球系細胞の活性化に関わっている事が報告されている。

しかしながら、高血糖が脊髄損傷の病態に与える影響は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、実験モデルと脊髄損傷患者の臨床データを用いて急性高血糖が脊髄損傷後の機能予後に与える影響を究明することである。

3. 研究の方法

マウスへの高血糖の導入

我々は膵臓のインスリン分泌細胞を破壊する事により血糖値を上昇させるストレプトゾトシン (Streptozotocin: STZ)を8週齢のC57BL/6Jマウスの雌に、180 mg/kg単回腹腔内投与した。対照群には、同容量のクエン酸バッファを投与した。血糖値は、注射後7日目に測定し、血糖値 200 mg/dl以上を高血糖とした。

別の高血糖モデルを作成するために、脊髄損傷直後に体重1gあたり0.05mlの5%グルコースを腹腔内投与した。対照群には同量の生理食塩水を注射した。

STZ誘導性高血糖マウスの血糖コントロールを行う場合は、長時間作用型インスリンアナログ グラリギン(0.025 単位/body)を損傷直後、損傷後8、20時間後か、24、48、72時間後に皮下投与した。

脊髄損傷

STZ誘導性高血糖マウスとバッファ投与対照マウスの第10胸髄高位に、注射後7日目に

70kdynの圧挫損傷を加えた。運動機能はオープンフィールド運動評価尺度のBasso Mouse Scale(BMS)、足跡解析、Grip walk 試験にて評価した。

ミクログリア細胞株の培養

高グルコース培地もしくは通常グルコース培地で培養した BV-2 マウスミクログリア細胞をLPSで刺激し、それぞれ免疫細胞化学染色 / ウェスタンブロット / ChIP法、mRNA抽出、ELISAの前に30分間 / 3時間 / 24時間培養した。

臨床研究デザイン

2005年6月から2011年5月までに総合せき損センターに入院した528人の脊髄損傷患者を対象とした。そのうち、下記基準を満たす患者206人を選抜した。(i)受傷後24時間以内の当院への入院。(ii)当院で入院リハビリを行った患者。(iii)アメリカ脊髄損傷協会 (American Spinal Injury Association: ASIA) 機能障害尺度 (ASIA Impairment Scale: AIS)での適切な評価を行えた患者。また、除外基準は次の通りとした。(i)入院リハビリを行う前に死亡もしくは転院した患者。(ii)既知の脳損傷の合併もしくは脳損傷の合併の臨床的兆候のある患者。(iii)認知症により機能評価への協力ができない患者。(iv)脊髄損傷以外の神経学的障害の既往。(v)入院時AIS score Eの患者。

退院時のAIS、ASIA運動スコア、脊髄障害自立度評価法 (spinal cord independence measure: SCIM) を予後計測として用いた。ASIA運動スコア改善率は次のように計算した。改善率 = [(退院時 ASIA 運動スコア) - (入院時 AIS 運動スコア)] / [100 - (入院時 ASIA 運動スコア)]。1段階のAIS改善は、AIS改善スコア1として定義した。

患者の血液検体は当院搬送直後(受傷後24時間以内)に採取し、それぞれの検体の血糖値を測定した。

高齢は65歳以上と定義した。

統計学的解析

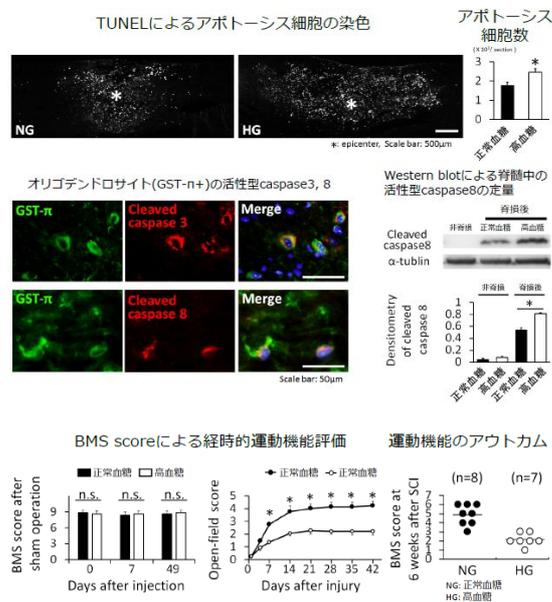
定量的PCR、細胞数、血糖値、運動機能評価のデータの中央値を比較するためにWilcoxonの順位和検定を用いた。ELISA、濃度測定、定量的PCRの多重比較にDunnett検定を適応した。カテゴリー変数の場合の群間比較に²検定を行った。グループ間の経時的なBMSスコアの変化の解析のために二元配置反復測定分散分析とTukey検定による事後

解析 (two-way repeated measures ANOVA with post hoc Tukey's test) を行った。全て両側検定を行い、有意水準は 0.05 に設定した。グループの測定値は平均 ± 標準誤差で表した。統計解析は全て JMP ソフトウェアプログラム ver.9 (SAS Institute) を用いて行った。

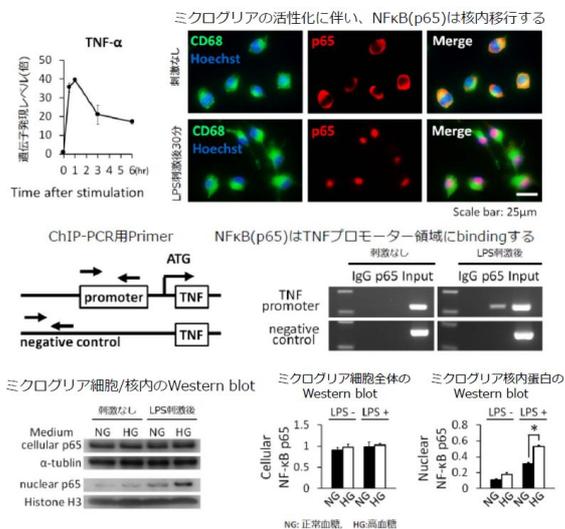
4. 研究成果

今回我々は、2種類の実験的高血糖マウスモデルの脊髄損傷急性期における病理組織学的過程と運動機能予後に対する高血糖の効果进行调查した。

高血糖マウスは正常血糖マウスより、脊髄損傷後急性期のアポトーシス細胞数がより増加し、機能回復が悪化していた。



さらに、高血糖環境下では、生体内および *in vitro* においてミクログリアの転写因子 nuclear factor B (NF- B) の核内移行促進を通して炎症が増強していた。そして、それこそが脊髄損傷後の二次損傷の増悪に繋がっていることを明らかにした。

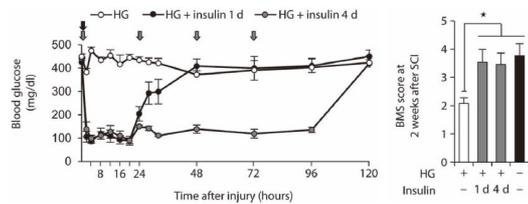


次に、我々は、528人の脊髄損傷患者から得られた臨床データの変量線形回帰分析を行い、急性期の高血糖が脊髄損傷の機能予後不良の決定的因子であるという全く新しいエビデンスを得た。

	Univariate analysis		Multiple analysis	
	β (95%)	P-value	β (95%)	P-value
年齢(per 10 years increase)	-1.08 (-4.15 to 2.00)	0.49		
性別 (女性 = 0; 男性 = 1)	-3.24 (-12.45 to 5.98)	0.49		
入院時血糖値 (per 10 mg/dl increase)	-2.70 (-4.47 to -0.92)	<0.005	-1.37 (-2.65 to -0.10)	<0.05
ステロイド投与 (無 = 0; 有 = 1)	-0.03 (-7.41 to 7.35)	0.99		
入院時麻痺 (完全麻痺 = 0; 完全麻痺 = 1)	-28.14(-32.78 to -23.50)	<0.0001	-26.31(-31.14 to -21.49)	<0.0001
脊髄手術 (無 = 0; 有 = 1)	-5.15 (-11.31 to 1.01)	0.10		
入院時収縮期血圧 (per 10 mmHg increase)	4.16 (2.03 to 6.29)	<0.001	1.08 (-0.54 to 2.70)	0.19
受傷の原因	4.53 (+4.61 to -11.76)	0.31		
交感神経	+1.53 (+9.92 to 6.85)	0.72		
高所からの転落	-2.99 (-12.52 to 6.53)	0.54		
その他				

さらに、我々は適切な血糖コントロールを行うことで、高血糖マウスの脊髄損傷後の病理学的及び機能的予後を改善させる事が可能である事を示した。

長時間作用型インスリンアナログ グラリジン投与による血糖コントロール



これらの結果は、脊髄損傷急性期の高血糖が運動機能に悪影響を与える有用な予後予測因子である可能性を示唆するとともに、中枢神経外傷後の厳密な血糖管理の重要性を強調するものである。これらの研究成果は、米国科学雑誌 Science Translational Medicine で報告するとともに、国内外の多くの学会で発表した。

また、本研究は、中枢神経外傷後に高血糖が及ぼす影響に深い洞察を与えものであり、我々は、ミクログリア以外の中枢神経構成細胞、ならびに外傷後に浸潤してくる炎症細胞についても、高血糖が与える影響を解明すべく、さらなる研究を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kobayakawa K, Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Ohkawa Y, Kishimoto J, Yokota K, Ideta R, Shiba K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S. Acute hyperglycemia impairs functional improvement after spinal cord injury in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2014 Oct 1;6 (256):256ra137. doi: 10.1126/scitranslmed.3009430.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 久保田健介. 脊髄損傷発生時のマネージメント 第27回日本臨床スポーツ医学会学術集会(2016.11.5-6, 幕張)
2. Kubota K, Kobayakawa K, Okada S, Shiba K. Hyperglycemia impairs functional

- recovery after spinal cord injury. The 55th International Spinal Cord Society Annual Scientific Meeting (2016.9. 14-16, Vienna, Austria)
3. Kubota K, Kobayakawa K, Sakai H, Okada S, Iwamoto Y, Shiba K. Hyperglycemia during acute spinal cord injury is a detrimental factor that impairs functional improvement. The 17th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology Congress (2016.6.1-3, Geneva, Switzerland)
 4. Kobayakawa K, Okada S, Kubota K, Yokota K, Shiba K, Iwamoto Y. Acute hyperglycemia is a preventable risk factor for spinal cord injury - translational research from animals to humans -The 62th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2016.3.5-8, Orland, USA)
 5. 小早川和, 岡田誠司, 横田和也, 久保田健介, 芝啓一郎, 岩本幸英. 急性期高血糖は脊髄損傷の運動機能回復を悪化させる。第 50 回日本脊髄障害医学会 (2015.11.19-20, 東京)
 6. 小早川和, 岡田誠司, 久保田健介, 横田和也, 齋藤武恭, 原正光, 芝啓一郎, 岩本幸英. 脊髄損傷後の急性期高血糖は運動機能回復を有意に阻害する-脊髄損傷急性期の血糖管理- 第30回日本整形外科学会基礎学術集会 (2015.10.22-23, 富山)
 7. 小早川和, 岡田誠司, 久保田健介, 横田和也, 齋藤武恭, 原正光, 岩本幸英. 転写因子 IRF8 は骨髄由来マクロファージの収束化を介して脊髄損傷後の機能回復を促進する -Time-Course RNA-Seqを用いた網羅的遺伝子発現解析- 第30回日本整形外科学会基礎学術集会 (2015.10.22-23, 富山)
 8. Kubota K, Kobayakawa K, Okada S, Shiba K, Iwamoto Y. Acute hyperglycemia impairs functional recovery after spinal cord injury. The 8th Asian Conference for Emergency Medicine (2015.11.7-10, Taipei, Taiwan)
 9. Kubota K, Kobayakawa K, Okada S, Shiba K, Iwamoto Y. Hyperglycemia during acute spinal cord injury is a detrimental factor that impairs functional improvement in acute C3/4 cord injury patients without any bony damages. The 28th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine (2015.9.3-7, Berlin, Germany)
 10. Kobayakawa K, Kubota K, Yokota K, Okada S, Iwamoto Y. Acute hyperglycemia is a treatable risk factor for spinal cord injury: animal experiment and Human

Cohort Study. The 61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2015.3.15-18, Las Vegas, USA)

11. 小早川和, 岡田誠司, 久保田健介, 横田和也, 齋藤武恭, 芝啓一郎, 岩本幸英. 高血糖はミクログリアのNF- Bの過度な活性化を介して脊髄損傷後の二次損傷と機能予後を増悪させる。第 49 回日本脊髄障害医学会 (2014.9.11 -12, 北海道)
12. Kobayakawa K, Saiwai H, Kumamaru H, Kubota K, Yokota K, Ohkawa Y, Kishimoto J, Ideta R, Shiba K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S. Acute hyperglycemia exacerbates functional outcomes in human and mouse spinal cord injury via NF- B pathway. EFNS-ENS Joint Congress of European Neurology (2014.5.31-6.3, Istanbul, Turkey)

〔図書〕(計 1 件)

1. 小早川和, 岡田誠司, 久保田健介, 出田良輔, 芝啓一郎, 岩本幸英. 脊髄損傷における血糖管理 臨床整形外科 50(11) :1108-1112, 2015

〔産業財産権〕

なし
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 : なし

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
久保田 健介 (KUBOTA KENSUKE)
独立行政法人労働者健康安全機構
総合せき損センター (研究部) ・ 研究員
研究者番号 : 00717069
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
小早川 和 (KOBAYAKAWA KAZU)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 40772322