

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10921

研究課題名(和文) 脊髄損傷の早期・客観的重症度判定を可能にする分子バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Exploration of molecular biomarker for early prognostification of spinal cord injury

研究代表者

國府田 正雄 (Koda, Masao)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50361449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：令和元年度はラット脊髄損傷モデル脳脊髄液サンプルよりプロテオミクスアプローチによりスクリーニングされELISAで二次絞り込みされた脊髄損傷バイオマーカー候補物質につき、バイオマーカーとしての妥当性を明らかにするため、脊髄損傷ラット血中濃度を測定した。Excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) and Myelin-associated glycoprotein (MAG)の2種類のタンパクがバイオマーカー候補として挙げられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた分子バイオマーカー候補物質を、さらなる妥当性検証にてヒト脊髄損傷患者さんへの応用を目指す。現在のところ有効なバイオマーカーがない急性期脊髄損傷におけるバイオマーカーを開発できれば、エビデンスに基づいた治療体系構築に非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：We explored the candidates for molecular biomarkers to determine injury severity and to predict neurological prognosis in acute phase of spinal cord injury (SCI) by proteomics approach. Excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) and Myelin-associated glycoprotein (MAG) were picked up as possible candidates for molecular biomarkers.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：分子バイオマーカー 脊髄損傷 プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は外傷により脊髄が損傷される疾患である。中枢神経系の一部である脊髄はひとたび損傷されると再生しないため、麻痺が後遺する。我が国における新規脊髄損傷受傷患者数は年間4~5000名、慢性期となり麻痺を抱えたまま生活している患者さんは10万名以上といわれている。脊髄損傷の急性期~回復期治療には多大なマンパワー/医療費を要するが、慢性期においても後遺する麻痺による脊髄損傷患者さんの社会復帰困難や介護の必要性といった医療経済的問題が小さくないため、脊髄損傷のアウトカム改善は脊椎脊髄病学の分野において大きなテーマである。

脊髄損傷は受傷高位(頸椎・胸椎・腰椎といった、損傷部位)ごとに症状の差が大きく、また損傷の程度(完全損傷か不完全損傷か、そのほかにも脊髄の中心部が主に障害されている症例も多いなど横断面における損傷の分布)により重症度が大きく異なる。完全麻痺例以外では程度の差はあるが自然回復もある程度は認められるため、脊髄損傷の受傷度、麻痺の予後は非常に多彩である。また、受傷早期には脊髄ショックといって運動・感覚・深部腱反射覚がすべて一時的に失われることが多い。脊髄ショックの時期には真の麻痺の程度によらず一見完全麻痺のような症状を呈する。すなわち、損傷急性期には脊髄ショックのため本来不全麻痺であり自然回復も期待しうる症例が完全麻痺のように見えてしまうことも稀ならずおこる。上述の脊髄損傷の高位別または損傷程度の差によるばらつきと合わせると、**急性期に脊髄損傷の重症度・麻痺の予後を正確に判定するのは実際上不可能**と言わざるを得ない。このため急性脊髄損傷治療の正確なアウトカム評価は困難である。問題解決のためには受傷後早期に重症度を判定しうるバイオマーカーの開発が必要である。

現在までに脊髄損傷の分子バイオマーカーに関する研究は国内外より過去に多数報告がある。Pouwらのreview(Pouw MH, 2009)によれば、S-100、neuron-specific enolase、neurofilament light chain、Glial fibrillary acidic proteinなどが脊髄損傷の重症度を反映しうる分子バイオマーカー候補とされている。国内でもUenoらはラット脊髄損傷モデルにおいて血清中リン酸化neurofilament heavy chain濃度が脊髄損傷重症度を反映することを(Ueno, 2011)、そして同グループのHayakawaらは血清中リン酸化neurofilament heavy chain濃度が脊髄損傷患者さんの重症度を反映することを報告した(Hayakawa, 2012)。このように脊髄損傷の分子バイオマーカーの研究は数多く行われているが、実際臨床的に用いることのできるバイオマーカーはまだ開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の全体構想として、**脊髄損傷急性期に早期・客観的重症度判定を可能にする分子バイオマーカーを開発すること**を最終目標としている。

現在までに我々は、ラット脊髄損傷モデル髄液サンプルのプロテオミクス解析により、脊髄損傷によって濃度が有意に上昇するバイオマーカー候補タンパクをスクリーニングし、15種類の候補を得た。候補物質の例を挙げると、glutamate transporter-1, cathepsin C, myelin-associated glycoproteinなど、いずれも脊髄損傷の病態との関連が過去に報告されている物質が含まれている。本研究計画では引き続いて脊髄損傷重症度判定・予後予測のための分子バイオマーカー候補の絞り込み・病態生理学的意義の解明および妥当性検証を行う計画である。

本研究期間内に脊髄損傷重症度早期判定分子バイオマーカー候補の二次スクリーニング~絞り込みをおこない、さらにさまざまな重症度の脊髄損傷モデルにおいて分子マーカー候補物質

を測定し、その後行動学的観察を行うことで当該分子バイオマーカー候補物質の妥当性を確認する。さらに、脊髄損傷モデルラットの脊髄組織切片・タンパクサンプルおよび培養神経細胞・グリア細胞等を用いた解析により、分子バイオマーカー候補物質の脊髄損傷における病態生理学的意義解明までを予定している。

3. 研究の方法

脊髄損傷の早期・客観的重症度判定を可能にする分子バイオマーカーを開発することが目的である。

本研究計画は血漿サンプルで測定可能な脊髄損傷バイオマーカーの開発を目標としている。主な理由は、実臨床では脊髄損傷患者さんから急性期に髄液採取を行うことはまれであり、髄液はサンプルとして非現実的と考えられることである。しかし脊髄損傷の際に損傷された脊髄より放出された物質はまず髄液内に流出、血中に流出するものは脊髄損傷により異常に透過性が亢進した脊髄血管関門を通過して末梢血中に達すると考えられることから、血漿サンプルにおけるスクリーニングの前に、まず髄液中でのスクリーニングを行った。本研究計画では髄液サンプルよりプロテオミクスアプローチにてスクリーニングされた脊髄損傷バイオマーカー候補物質を絞り込み、さらに脊髄損傷の病態生理における候補物質の役割の解明および妥当性の検証を行う。

(平成29年度)

脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質の絞り込み

1-1) 成SDラット雌を全身麻酔下に第9胸椎椎弓切除する。全身麻酔は吸入麻酔器による sevofluren 麻酔を用いる。手術は動物用手術顕微鏡下に行い、手術による脊髄損傷を避ける。

1-2) Infinite Horizon impactor (IH impactor: 米国 Precision Instruments 社製) を用いて脊髄圧挫損傷モデルを作成する。IH impactor は再現性良く麻痺が作成でき、脊髄組織の損傷状態も切断や圧迫等のモデルと比較するとヒト脊髄損傷と類似しているため、より正確に臨床で見られるヒト脊髄損傷の病態を反映しうることより IH impactor による脊髄圧挫損傷モデルは脊髄損傷研究の分野では世界的スタンダードとされている。

1-3) 対照群として、シャム手術(椎弓切除のみ、脊髄損傷なし)を行う一群も作成。

1-4) 脊髄損傷後急性期にはラットは尿閉となるので、用手的導尿を行う。経口鎮痛薬としてアセトアミノフェンシロップを経口投与し、尿路感染等の予防に抗生剤としてセフメタゾールを生理食塩水にて溶解し術直後から1日1回皮下注射3日連続投与する。

1-5) 軽症・重症脊髄損傷ラットを受傷6時間・24時間後にペントバルビタール過量投与にて安楽死させ、髄液・血漿を採取、素早く液体窒素にて凍結保存する。シャム手術ラットからも同様に髄液・血漿を採取、凍結保存する。同時に脊髄サンプルを損傷部を中心に約1cm摘出し、同様に液体窒素で素早く凍結、マイナス80度にて冷凍保存する。

1-6) 髄液・血漿サンプル中の脊髄損傷分子バイオマーカー候補タンパクをEnzyme-linked immunosolubent assay (ELISA)にて検出する。脊髄損傷ラットで発現上昇を示し、髄液中濃度>血漿中濃度のパターンを呈するタンパクを選択し、脊髄損傷分子バイオマーカー候補タンパクの絞り込みをおこなう。ELISA キットは、脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質をターゲットとしたものが市販されていれば市販のものを用いる。市販のものがない場合は、メーカーに作成を委託する必要がある。ELISA にて測定可能であり、重症度に相関した有意な濃度変化を示すタンパクがラットにおける真の脊髄損傷分子バイオマーカー候補と考えられる。

(平成30年度以降)

2-1)平成29年度に同定した、脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質が脊髄損傷の予後判定に有用か否かを確認する。平成29年度実験計画2)と同様に、成SD ラット雌に全身麻酔下にIH impactorを用いて損傷強度100kdyn(軽症)・150kdyn(中等症)・200kdyn(重度不全麻痺)に加え、300kdyn(完全麻痺)の各重症度の脊髄圧挫損傷モデルを作成。術後管理等は平成29年度同様に、動物愛護の観点に十分留意して行う。

2-2)脊髄損傷モデルラット尾静脈より脊髄損傷6時間後に末梢血を採取、血漿を分離し、平成29年度に同定された脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質をELISA法にて測定する。

2-3)脊髄損傷モデルラットの後肢運動機能を、BBB score・CatWalk®にて経時的に損傷後8週まで評価する。BBB scoreは1995年Bassoらにより報告された脊髄損傷の後肢運動評価法で、open fieldを自由に歩行させ、その際の両後肢の動き・荷重・前後肢の協調運動・体幹の安定性などにて麻痺の程度を評価するスコアリングシステムであり、脊髄損傷研究分野では全世界でgold standardである。CatWalk®はビデオによる歩行自動解析装置で、麻痺の程度を歩幅その他のパラメータにて客観的に評価可能である。

2-4)脊髄損傷後6時間における血漿中脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質濃度(上記2-2にてELISA法で測定)と、行動学的評価による後肢運動麻痺の回復の間の相関を統計学的に解析し、脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質の脊髄損傷予後予測における妥当性につき検討する。

2-5)脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質の脊髄損傷における病態生理学的意義を探るための*in vivo*および*in vitro*実験を行う。

2-6)脊髄損傷モデルラットの脊髄サンプルをタンパクサンプル・組織切片とも経時的に採取作成する。このサンプルを用いて脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質の発現の時間的空間的変動につきwestern blottingおよび免疫染色にて検討する。

2-7)培養神経細胞またはグリア細胞に種々の細胞障害を加え脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質の動態・役割を確認する。または脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質を培養神経細胞・グリア細胞に遺伝子導入にて過剰発現させて、細胞障害に対する影響等を観察することで、各種細胞障害における脊髄損傷分子バイオマーカー候補物質の関与をあきらかにする。

4. 研究成果

Excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) and Myelin-associated glycoprotein (MAG)の2種類のタンパクが、バイオマーカー候補として得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noguchi H, Koda M, Funayama T, Kumagai H, Abe T, Nagashima K, Miura K, Mataka K, Fujii K, Yamazaki M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Bone bonding, displacement, and absorption in cases of double-door laminoplasty with unidirectional porous hydroxyapatite spacers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2019.01.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mataka K, Koda M, Shibao Y, Kumagai H, Nagashima K, Miura K, Noguchi H, Funayama T, Abe T, Yamazaki M	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful visualization of dynamic change of lumbar nerve root compression with the patient in both upright and prone positions using dynamic digital tomosynthesis-radiculography in patients with lumbar foraminal stenosis: An initial report of three cases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2018.12.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koda M, Hara Y, Okano E, Abe T, Funayama T, Noguchi H, Miura K, Nagashima K, Kumagai H, Mataka K, Yamazaki M.	4. 巻 59
2. 論文標題 C5 pure motor spinal cord injury: A case with a rare manifestation of cervical spinal cord injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci	6. 最初と最後の頁 332-334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2018.10.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koda M
2. 発表標題 Exploration for novel biomarkers of acute spinal cord injury.
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of Cervical Spine Research Society（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	古矢 文雄 (Furuya Takeo) (00507337)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究 分担者	佐藤 守 (Sato Mamoru) (20401002)	千葉大学・医学部附属病院・特任准教授 (12501)	