

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591712  
 研究課題名 (和文) Bach1 ノックアウトマウスにおける脊髄損傷後の障害抑制の検討  
 研究課題名 (英文) Genetic ablation of transcription repressor Bach1 reduces neural tissue damage after spinal cord injury in mice  
 研究代表者  
 小澤 浩司 (OZAWA HIROSHI)  
 東北大学・病院・講師  
 研究者番号：10312563

## 研究成果の概要：

Heme oxygenase-1 (HO-1) は生体内で強力な抗酸化作用を有し、酸化ストレスによる組織傷害を抑制する。本研究の結果、Bach1 KO マウスでは、損傷脊髄における HO-1 の発現が増加し、また神経組織傷害、アポトーシスおよび運動機能障害が抑制されることが分かった。したがって、Bach1 のノックアウトによって HO-1 の発現が増加し、脊髄損傷後の酸化ストレスによる脊髄障害が抑制されると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷, 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷における 2 次障害の原因として、近年酸化ストレスの影響が注目されている。Heme Oxygenase (HO-1) は Heme を分解し生体内で抗酸化物質を産生し、酸化ストレスに対する防御機構の一端をなす。過去の研究から、HO-1 の抑制因子 Bach1 のノックアウト (KO) モデルでは、HO-1 遺伝子の発現が強く誘導され、その結果、動脈硬化をはじめ肺障害、心筋障害といった酸化ストレスが関与する障害を抑制することがわかっている。

## 2. 研究の目的

HO-1 遺伝子の転写抑制因子 Bach1 の KO マウスの脊髄損傷モデルを用いて、脊髄損傷後の HO-1 発現、神経組織傷害、アポトーシス、運動機能障害を解析し、Bach1 のノックアウトが生体内で抗酸化作用をもつ HO-1 の発現を増加させ、酸化ストレスによる脊髄障害を抑制するか否かを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

実験動物

Bach1 KO マウス作製用ターゲティングベクターをマウス由来 ES 細胞にエレクトロ

ポレーション法で導入して、そこから得られた相同組み換えクローンを C57BL/6J マウス由来の胚細胞に移植して、Bach1 KO マウスは作製されている。本研究には成体雌 (10~12 週齢) KO マウス 40 匹および WT マウス 40 匹を使用した。脊髄損傷を加えた KO マウスおよび WT マウス、対照群として脊髄損傷を加えない KO マウスおよび WT マウスを各 5 匹使用して、後述する運動機能評価、HO-1 および cleaved-caspase-3 の発現、脊髄白質の評価、NeuN 陽性細胞数の計測、TUNEL 陽性細胞数の計測を行った。

#### 脊髄損傷モデルの作製

フローセン、笑気、酸素による吸入麻酔下に手術を行った。マウスの胸椎部背側正中に約 1.5cm の縦切開を加えた。顕微鏡下にマイクロクロンジュールを用いて第 10 胸椎高位の椎弓を切除し、硬膜を露出した。脊髄損傷モデルの作製には NYU Impactor Device (Rutgers, USA) を用いた。第 8、12 胸椎を把持し胸椎を固定した後、重さ 10 g の impact rod を 3mm の高さより第 10 胸椎節部中央の硬膜上に落下させ、脊髄損傷を作製した。直ちに閉創し覚醒させた。対照群のマウスは同様の手術のみを施行し、脊髄損傷を作製しないものとした。

#### 運動機能評価

脊髄損傷後、12 時間、1、3、7、14、21、28、35、42 日目にマウスの運動機能を Basso mouse scale (BMS) を用いて評価した。

#### Western blot

損傷後 3 日目および対照群のマウスから第 10 胸椎節高位の脊髄を採取し、Western blot を用いて、HO-1 およびアポトーシス誘導因子 cleaved-caspase-337 の蛋白量を評価した。

#### 脊髄組織標本の作製

損傷後 3 日目、42 日目および対照群のマウスを 4% パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定した。胸椎全体を摘出し、4°C で 12 時間の浸漬固定を行った。浸漬固定後、損傷部を中心に 5 mm 長の脊髄を摘出した。その後、順次脱水、透徹、パラフィン包埋を行った。包埋した脊髄から、厚さ 7  $\mu\text{m}$  の脊髄横断面のパラフィン切片を作製した。評価のために、損傷中心部および 250  $\mu\text{m}$  間隔で頭側・尾側に各 6 箇所から採取した計 13 箇所の脊髄組織標本作製した。

#### Luxol Fast Blue 染色

損傷後 42 日目および対照群の脊髄組織標本を用いて、LFB 染色を行い、脊髄白質を評価した。評価には損傷中心部およびその頭側・尾側に 250  $\mu\text{m}$  間隔で各 6 箇所から採取した計 13 箇所の脊髄組織標本を使用した。LFB 染色後の脊髄組織標本をイメージスキャナーで読み込み、脊髄白質の面積をパーソナルコンピュータ上で計測した。

#### HO-1 免疫組織化学染色

損傷後 3 日目および対照群の脊髄組織標本を用いて、HO-1 の発現を免疫組織化学染色で評価した。

#### NeuN 免疫組織化学染色

損傷後 42 日目および対照群の脊髄組織標本を用いて、神経細胞に特異的な NeuN の免疫組織化学染色を行い、神経細胞を評価した。

#### NeuN 陽性細胞数の計測

NeuN の免疫組織化学染色後の標本をイメージスキャナーで読み込み、NeuN 陽性細胞数をパーソナルコンピュータ上で計測した。計測には、損傷中心部とその 250  $\mu\text{m}$  頭・尾側の計 3 枚の脊髄組織標本を用いた。

#### TUNEL 染色

損傷後 3 日目の脊髄組織標本を用いて、TUNEL 染色を行い、脊髄損傷後のアポトーシスを評価した。

#### TUNEL 陽性細胞数の計測

TUNEL 染色後の標本をイメージスキャナーで読み込み、TUNEL 陽性細胞数をパーソナルコンピュータ上で計測した。計測には、損傷中心部とその 250  $\mu\text{m}$  頭・尾側の計 3 枚の脊髄組織標本を用いた。

#### 統計学的解析

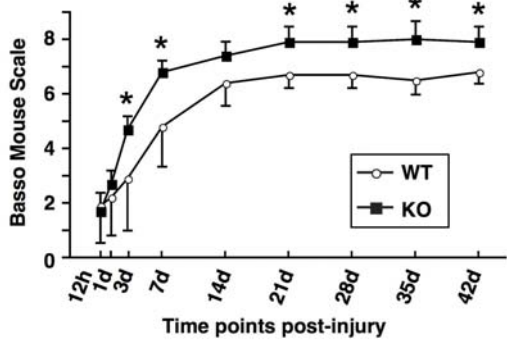
結果を平均値と標準偏差で示した。統計学的解析にはコンピューターソフト StatView version 5.0 (SAS institute Inc. USA) を用い、 $p < 0.05$  を有意と判断した。BMS、脊髄白質の面積、NeuN 陽性細胞数、TUNEL 陽性細胞数の比較には、重複測定・分散分析法 repeated-measures ANOVA を用い、多重比較検定として Scheffé's F test を用いた。衝撃荷重の分析、Western Blot のバンド濃度の比較は、unpaired t-test を用いて WT マウスと KO マウスの 2 群の差を検定した。

## 4. 研究成果

### 運動機能評価

損傷後 12 時間の運動機能は、KO、WT マウスともに、後肢関節の自動運動はみられるものの、体重支持ができない状態であった (KO:  $1.7 \pm 0.7$  点, WT:  $1.9 \pm 1.4$  点)。KO、WT マウスともに、1 日目から経時的に運動機能が改善し、21 日目以降にプラトーとなった。42 日目には、KO マウスは体幹の不安定性が無いあるいは軽度で、体重支持、ステップ、後肢の動き、前後肢の協調性にも異常はみられなかったが ( $7.9 \pm 0.6$  点)、WT マウスは体幹の不安定性が重度で、後肢の動きや前後肢の協調性にも異常がみられた ( $6.8 \pm 0.4$  点)。

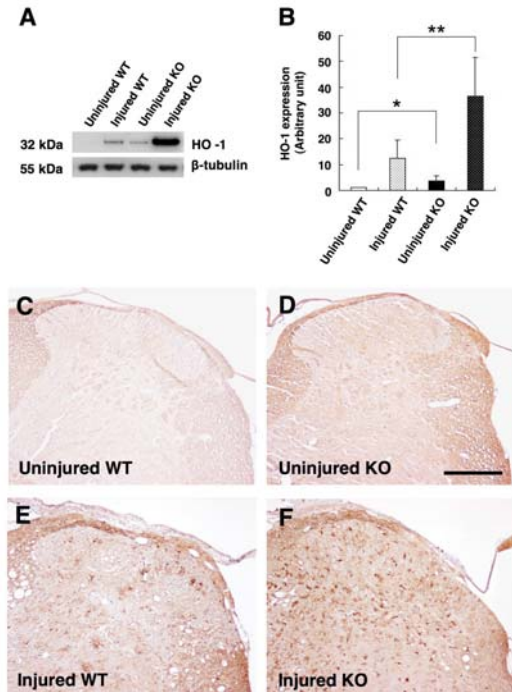
BMS の点数は 1 日目以降から 42 日目まで、WT マウスに比べて KO マウスの方が平均点が高く、また 3、7、21、28、35、42 日目で有意差がみられた (下図)。



### HO-1 の発現

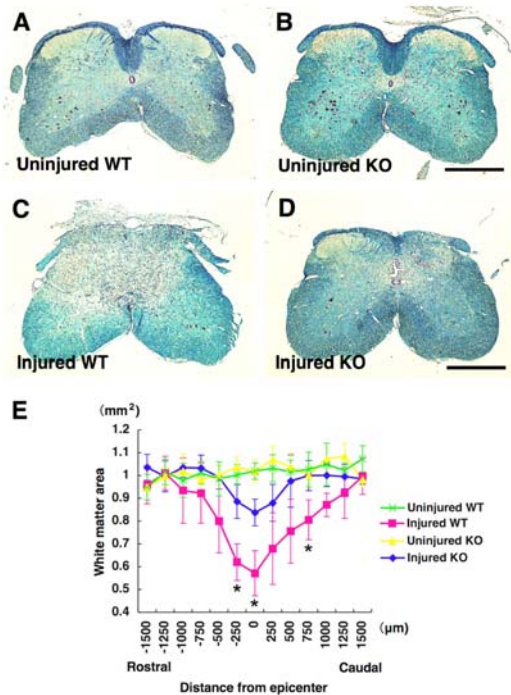
Western blot での HO-1 発現は、KO、WT マウスともに、対照群に比べて損傷後 3 日目の方が多くなっていた。対照群の HO-1 発現は、WT マウスに比べて KO マウスが有意に多かった。また、損傷後 3 日目においても、HO-1 発現は KO マウスの方が有意に多かった(下図 A, B)。

免疫組織化学染色では、HO-1 を発現している HO-1 陽性細胞が脊髄白質、灰白質の両者に観察された。KO、WT マウスともに、対照群に比べて損傷後 3 日目の方が HO-1 陽性細胞が多くみられた。また対照群および損傷後 3 日目ともに、WT マウスに比べて KO マウスの方で HO-1 陽性細胞が多かった(下図 C, D, E, F)。



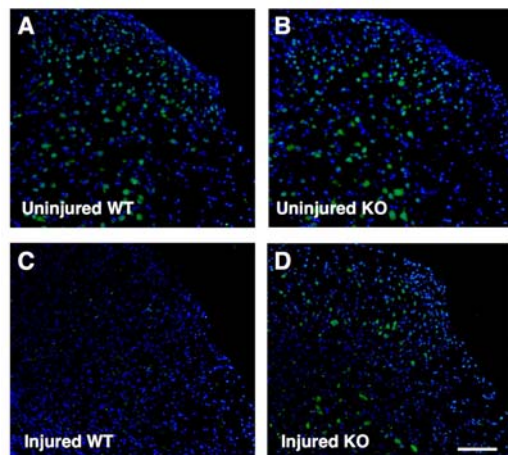
### 脊髄白質の評価

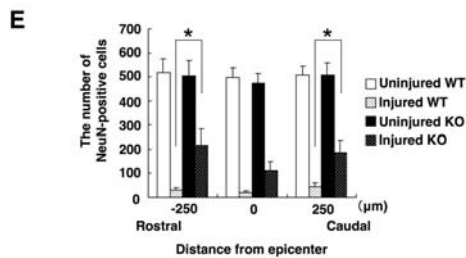
対照群における脊髄白質の面積は、KO マウスと WT マウスで有意差はなかった(下図 A, B, E)。対照群と比べて損傷後 42 日目では、WT、KO マウスともに損傷部を中心として白質の面積が小さくなっており、また、KO マウスに比べて WT マウスの方が面積がより小さかった(C, D, E)。統計学的には損傷中心部およびその 250  $\mu\text{m}$  頭側、750  $\mu\text{m}$  尾側で、WT マウスの方が有意に面積が小さかった(下図 E)。



### NeuN 陽性細胞数の計測

対照群における NeuN 陽性細胞数は KO マウスと WT マウスで有意差はなかった(下図 A, B, E)。対照群に比べて、損傷後 42 日目では WT、KO マウスともに NeuN 陽性細胞数が少なくなっており、また、KO マウスに比べて WT マウスの方が陽性細胞数がより少なかった(下図 C, D, E)。統計学的には損傷中心部の 250  $\mu\text{m}$  頭側および 250  $\mu\text{m}$  尾側で、WT マウスの方が有意に陽性細胞数が少なかった(下図 E)。

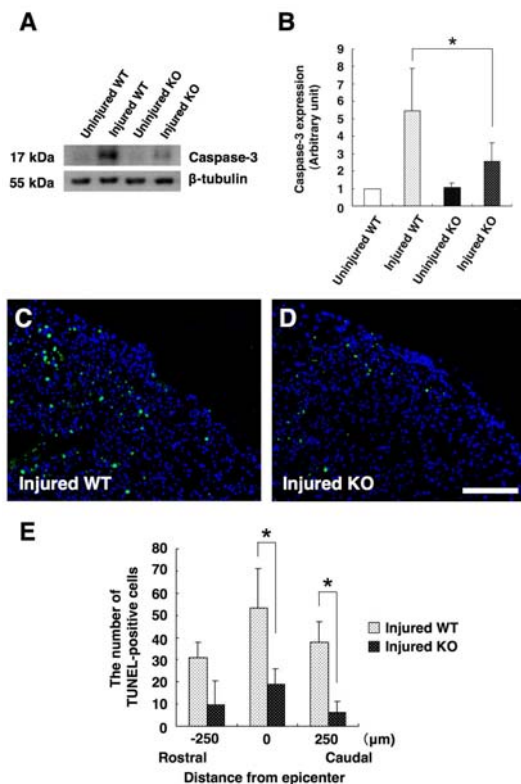




### アポトーシスの評価

Western blot での cleaved-caspase-3 の発現は KO、WT マウスともに、対照群に比べて損傷後 3 日目の方が有意に多くなっていた。損傷後 3 日目の cleaved-caspase-3 の発現は、WT マウスに比べて KO マウスの方が有意に少なかった(下図 A, B)。

損傷脊髄の TUNEL 染色では、TUNEL 陽性細胞は脊髄白質、灰白質の両者に観察された。TUNEL 陽性細胞数は、WT に比べて KO マウスの方が少なかった(下図 C, D, E)。統計学的には損傷中心部および 250 μm 尾側で、KO マウスの方が有意に陽性細胞数が少なかった(下図 E)。



本研究から、WT マウスに比べて Bach1 KO マウスでは、脊髄損傷後に HO-1 の発現が有意に多く、脊髄白質や神経細胞の傷害、アポトーシス、運動機能の障害が有意に少ないことが分かった。したがって、Bach1 KO マウスでは抗酸化作用をもつ HO-1 の発現が増加することにより、酸化ストレスによる脊髄傷害が抑制されたと考えられた。本研究の結論として、脊髄損傷においては、Bach1 のノックアウトによって損傷脊髄内の HO-1 発現が増加し、酸化ストレスによる脊髄傷害が抑制されることが証明された。

### 5. 主な発表論文等

(〔雑誌論文〕 (計 1 件))

Kanno H, Ozawa H, Dohi Y, Sekiguchi A, Igarashi K, Itoi E. Genetic Ablation of Transcription Repressor Bach1 Reduces Neural Tissue Damage and Improves Locomotor Function after Spinal Cord Injury in Mice. *J Neurotrauma*. 2009. 26:31-39. 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

菅野晴夫、小澤浩司 Transcription Repressor Bach1 Deletion Reduces Neural Tissue Damage and Locomotor Impairment after Spinal Cord Injury in Mice、54th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society、平成 20 年 3 月 2 日、サンフランシスコ、アメリカ

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

小澤 浩司 (OZAWA HIROSHI)

東北大学・病院・講師

研究者番号：10312563

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00250738

#### (4) 研究協力者

菅野 晴夫 (KANNO HARUO)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生