

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 6 月 17 日現在

機関番号：11401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591603
 研究課題名（和文） 脊髄損傷後の神経細胞障害におけるグリシンの役割
 研究課題名（英文） The role of glycine in neuronal injury after spinal cord injury
 研究代表者
 菅原 卓（SUGAWARA TAKU）
 秋田大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：80241660

研究成果の概要（和文）：脊髄運動ニューロンは軽度脊髄損傷後に選択的に死滅するが、その細胞死メカニズムは不明であった。神経細胞損傷におけるグリシンの役割を解明するため、正常 C57BL/6 マウス、細胞外低グリシン濃度を示すトランスジェニックマウス、細胞外高グリシン濃度を示す機能的ノックアウトマウスを用いて実験を行った。マウスに軽度圧迫損傷を作成し、神経細胞死、アポトーシス関連蛋白、DNA 損傷などにつき検討した。脊髄損傷後、大部分の運動ニューロン（80%）がアポトーシス様細胞死を起こしたが、3 群間に明らかな違いはみられなかった。脊髄損傷後に発生するアポトーシス様運動ニューロン死におけるグリシンの役割を検討するにはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Ventral horn motor neurons (VMN) are selectively vulnerable to mild spinal cord injury (SCI); however, the mechanisms of cell death had not been understood. To clarify the role of glycine in SCI, mild compression SCI was induced in normal C57BL/6 mice, extracellular low glycine concentration mice and high glycine concentration mice. A majority of VMN (80%) selectively underwent delayed apoptotic cell death. However, there were no difference in the extent of cell injury and apoptotic changes in those three groups. Further studies are needed to clarify the role of glycine in apoptotic motor neuronal death after mild SCI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・脳神経外科学

キーワード：脊髄損傷，運動ニューロン，アポトーシス，DNA 損傷，グリシン

1. 研究開始当初の背景

われわれは軽度脊髄損傷モデルを用いて、これまでに Akt/Bad シグナリングが脊髄運動ニューロンの生存にかかわっているこ

と、endonuclease G とアポトーシスが細胞死に関与していることを報告した。脊髄運動ニューロン死は臨床的にも軽度脊髄損傷後に起こっていると考えられるが、そのメカニズムは解明されていない。

選択的運動ニューロン死を起こす軽度脊髄損傷モデルは、上述のようにわれわれが開発した新しいモデルである。このモデルを用いて脊髄損傷後に運動ニューロンに特異的に酸化ストレスが加わり、その後ミトコンドリア依存性アポトーシスが起ることを報告した。一方、最近の研究で細胞外グリシンが脳脊髄損傷において重要な役割を担っていることが明らかとなった。虚血、脳損傷などの後には細胞外のグルタミン酸が増加し、グルタミン酸受容体（特にNMDA受容体）を豊富に持つ神経細胞に選択的な細胞死が起こることが知られている。グリシンは脊髄・脳幹部にあるストリキニン感受性リセプターに働く抑制性神経伝達物質と考えられてきたが、近年、NMDA受容体に結合し、受容体調節因子として働いていることが明らかとなった。

われわれは glycine cleavage multi-enzyme system (GCS)が細胞外グリシン濃度の維持に根本的な役割を担っていることに着目し、GCSの主役である glycine decarboxylase (GLDC)を高発現して細胞外低グリシン濃度を示すトランスジェニックマウス (high-GCS)と細胞外高グリシン濃度を示すドミナント・ネガティブ変異過剰発現による機能的ノックアウトマウス (low-GCS)を作成した。

2. 研究の目的

われわれは脊髄損傷モデルを用いた研究で、これまでに運動ニューロンが選択的・遅発的に細胞死を起こす軽度脊髄損傷モデルを開発し、運動ニューロン死の原因として酸化ストレス発生とその後のアポトーシス様変化を報告してきた。

脳脊髄損傷後に過剰に放出されたグルタミン酸は N-methyl-D-aspartate(NMDA)型グルタミン酸受容体を活性化し、神経細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させて細胞障害を起こすことが知られている。一方、興奮性伝達物質であるグリシンは抑制性の神経伝達物質として作動しているが、海馬や大脳皮質では NMDA 受容体に結合し、その活性調節因子として働いていると考えられている。最近われわれは脳内の高グリシン環境、特に虚血などの損傷負荷後の細胞外グリシンの増加は、NMDA 受容体の活性化を促し、興奮性神経細胞障害を増大させることを示した。今回、脊髄損傷におけるグリシンの役割についての検討を計画した。

3. 研究の方法

(1) 正常マウス、高・低グリシンマウスの脊髄組織でのグリシン量の測定

遺伝子組み換えマウスのバックグラウンドは C57BL/6 であり、マウス組織内でのグリシン量を正常 C57BL/6 マウス、高・低グリシンマウスの 3 群で比較する (n = 6-8)。マウスの選定は血液より抽出した DNA をテンプレートとし、PCR 法で遺伝子組み換え部分を増幅した後、PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動して決定する。

(2) 脊髄損傷モデルの作成と損傷の評価

脊髄損傷モデル

上記 3 群のマウス (27-30g)を isoflurane 2%, 酸素 30%, 笑気 70%の吸入麻酔下に腹臥位にして胸腰椎移行部に正中切開をおく。ついで第 13 胸椎椎弓を切除し、腰髄膨大部を露出する。腰髄膨大部を血管クリップ (把持力 15g, 5 秒間) で圧迫する。術中は homeothermic blanket を用いて直腸温を 36.5-37.5 度に調節する。

脊髄損傷の評価

脊髄損傷 1, 2, 3, 5 日後にマウスを pentobarbital 50mg/kg で腹腔内麻酔し、3.7% formaldehyde を含む PBS で灌流する。24 時間同じ溶液で後固定を行った後、厚さ 5 ミクロンの脊髄矢状断・横断パラフィン切片を作成し、cresyl violet 染色と hematoxylin-eosin 染色を行う。また、各細胞群の変化を調べるために同様に処理した脊髄組織を vibratome で厚さ 50 ミクロンの矢状断・横断切片を作成する。神経細胞死の確認のため神経細胞マーカー Neu-N, アストロサイトの損傷を評価するため GFAP 免疫染色を行う。さらに脊髄内アポトーシスの評価を行うため、cryostat で 25 ミクロンの切片を作成し、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated unidine 5'-triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL)染色で DNA free 3'-OH ends を標識する。また、アポトーシスを起こした細胞に比較的特異性が高いといわれる single stranded DNA を行う。

(3) NMDA 受容体グリシン結合部位阻害薬 SM-31900 投与実験

高グリシン群マウスに SM-31900(10mg/kg/day)を損傷1時間前、損傷翌日より連日、静脈内投与する。その後上述の脊髄損傷評価法と同様に cresyl violet 染色と hematoxylin-eosin 染色, Neu-N 染色, GFAP 染色, TUNEL と ssDNA 染色を行う。

(4) 細胞外アミノ酸濃度のリアルタイム測定

脊髄損傷1時間前から3時間後までのアミノ酸神経伝達物質の細胞外濃度の推移を *in vivo* 脊髄マイクロダイアリス法を用いて検討する。アミノ酸伝達物質としてグリシン, グルタミン酸, アラニン, タウリン, GABA を測定する。脊髄損傷の24時間前にガイドカニューレを挿入する。各群マウスを上述の全身麻酔下に第12胸椎椎弓を露出し, 硬膜を正中切開して脊髄を露出し, 後正中裂付近でガイドカニューレを挿入する。損傷当日に透析プローブを挿入し, リンゲル液(147mM NaCl, 2.3mM CaCl₂, 4.0mM KCl, pH7.0)を流速 2 μ l/min で灌流し, 10分毎に灌流液を採取する。サンプルは高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器(HPLC/ECD)システム(ATC-300, ECD-300, Eicom, Kyoto)で分析する。

また同方法(HPLC)で技術的困難が生じた場合には細胞外アミノ酸のリアルタイム測定ではなく, 上記1.と同様に組織内アミノ酸濃度を脊髄損傷前後に経時的に測定する。

4. 研究成果

(1) 正常マウス, 高・低グリシンマウスの脊髄組織でのグリシン量の測定

遺伝子組み換えマウスのバックグラウンドは C57BL/6 であり, マウス組織内でのグリシン量を正常 C57BL/6 マウス, 高・低グリシンマウスの3群で比較した(n = 6)。マウスの選定は血液より抽出したDNAをテンプレートとし, PCR法で遺伝子組み換え部分を増幅した後, PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動して決定した。組織内グリシン濃度は3群間で有意に異なっていた。

(2) 脊髄損傷モデルの評価

脊髄損傷モデル

上記3群のマウス(27-30g)を isoflurane 2%, 酸素 30%, 笑気 70%の吸入麻酔下に腹臥位にして胸腰椎移行部に正中切開をおいた。ついで第13胸椎椎弓を切除し, 腰髄膨大部を露出した。腰髄膨大部を血管クリップ(把持力 15g, 5秒間)で圧迫した。術中は homeothermic blanket を用いて直腸温を 36.5-37.5度 に調節した。手術による直接死亡はなく, 安定した損傷作成が可能であった。脊髄損傷の評価

血管クリップにより脊髄損傷を作成し, 1, 2, 3, 5日後にマウスを pentobarbital 50mg/kgで腹腔内麻酔し, 3.7% formaldehyde を含むPBSで灌流した。24時間同じ溶液で後固定を行った後, 厚さ5ミクロンの脊髄矢状断・横断パラフィン切片を作成し, cresyl violet 染色と hematoxylin-eosin 染色を行った。また, 各細胞群の変化を調べるために同様に処理した脊髄組織をvibratomeで厚さ50ミクロンの矢状断・横断切片を作成した。脊髄前角運動ニューロンは脊髄損傷後2-3日で細胞死を起こした。これらの細胞には核クロマチンの凝縮, TUNEL陽性といったアポトーシス特有の所見がみられた。

(3) NMDA 受容体グリシン結合部位阻害薬 SM-31900 投与実験

高グリシン群マウスに SM-31900(10mg/kg/day)を損傷1時間前、損傷翌日より連日、静脈内投与した。その後上述の脊髄損傷評価法と同様に cresyl violet 染色と hematoxylin-eosin 染色, Neu-N 染色, GFAP 染色, TUNEL と ssDNA 染色を行った。SM-31900 投与により明らかな組織学的変化はみられなかった。

(4) 細胞外アミノ酸濃度のリアルタイム測定

脊髄損傷1時間前から3時間後までのアミノ酸神経伝達物質の細胞外濃度の推移を *in vivo* 脊髄マイクロダイアリス法を用いて検討する予定であった。アミノ酸伝達物質としてグリシン, グルタミン酸, アラニン, タウリン, GABA を測定したが, 各群の細胞外アミノ酸濃度に有意差がみられず, プローブ先端の設置部位などの検討を

行った。

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9件)

Sugawara T, Kokubun K, Ishida R, Fujiwara K, Yamamoto S, Kinouchi H, Itoh H, Mizoi K. Angiotensin receptor blocker directly binds to HSP and stimulates its production in the brain. Recent advances in mathematics and computers in business, economics, biology & chemistry, 350-357, 2010

斉藤公男, 宮腰尚久, 本郷道生, 粕川雄司, 三澤晶子, 石川慶紀, 菅原卓, 島田洋一: 硬膜外層を温存して全摘出し得た高度石灰化脊髄髄膜腫の1例. 日本脊髄障害医学会雑誌 23:96-97, 2010

菅原卓: 「Beyond BP は存在するか?」脳保護の観点から. 血圧, 17:619-622, 2010

Sugawara T, Itoh Y, Hirano Y, Higashiyama N, and Mizoi K. Beta-tricalcium phosphate promotes bony fusion after anterior cervical discectomy and fusion using titanium cages. Spine (Phila Pa 1976), 36:1509-1514, 2011

菅原卓: 脊髄研究の nomade となって. 脊椎脊髄ジャーナル, 24 :1057-1058, 2011

高橋聡, 大谷隆浩, 浅野友之, 橋本学, 菅原卓, 東山巨樹, 溝井和夫: NBCA で塞栓した spinal epidural AVF の1例. Interventional Radiology 27:219, 2012

鈴木晋介, 乾敏彦, 下川宣幸, 菅原卓, 金彪: 上位頸椎の事故外傷. 脊髄外科, 26:30-38, 2012

井上辰志, 菅原卓他: 頭蓋頸椎移行部・上位頸椎の AVF, AVM. 脊髄外科, 27:30-38, 2012

Sugawara T, Higashiyama N, Kaneyama S, Takabatake M, Watanabe N, Uchida F, Sumi M, Mizoi K Multi-step pedicle screw insertion procedure with patient-specific lamina fit-and-lock templates for the thoracic spine. J Neurosurg Spine, 2013 in press

[学会発表] (計19件)

菅原卓: ARB による脳保護メカニズムと脳卒中急性期投与の意義. 脳神経外科 Expert Meeting, 2010年, 福島

菅原卓, 東山巨樹, 大野秀則, 杉山久幸: スクリューガイドテンプレートシステムを用いた頸椎後方固定術. 第69回日本脳神経外科学会総会, 2010年, 福岡

菅原卓, 東山巨樹, 柴田憲一, 笹嶋寿郎, 溝井和夫: Sacral perineural cyst の1例. 第46回(社)日本脳神経外科学会東北支部会, 2010年, 山形

菅原卓: 頸椎前方アプローチの適応と基本手技. 第30回日本脳神経外科コンgresモーニングセミナー. 2010年, 横浜

菅原卓, 東山巨樹, 溝井和夫 スクリューガイドテンプレートシステムを用いた脊椎後方固定術. 第26回日本脊髄外科学会, 2011年, 沼津

菅原卓: 3D コンピューターテクノロジーを利用した脊椎後方固定術. 第8回山梨脳神経外科ビデオカンファレンス, 2011年, 甲府

菅原卓, 東山巨樹, 溝井和夫: スクリューガイドテンプレートシステムを用いた脊椎後方固定術. 第70回日本脳神経外科学会総会, 2011年, 横浜

菅原卓, 東山巨樹, 溝井和夫: スクリューガイドテンプレートシステムを用いた脊椎後方固定術. 第18回日本脊椎・脊髄神経手術手技学会学術集会, 2011年, 浦安

菅原卓, 東山巨樹, 溝井和夫 スクリューガイドテンプレートシステムを用いた C1-C2 後方固定術. 第47回日本脳神経外科学会東北支部会, 2011.9.17, 盛岡

Sugawara T, Higashiyama N, Mizoi K: Posterior fixation of cervical spine using screw-guide template system.

Asia Spine 2011 (2nd Annual Meeting of Asia Spine), 2011, Fukuoka

Sugawara T. Invited lecture "Angiotensin receptor blocker directly binds to HSP and stimulates its production in the brain."

WSEAS (World Scientific and Engineering Academy and Society) at Cambridge University, 2010, Cambridge, UK.

Sugawara T. Invited lecture "The recent progress in the research for cerebral ischemia". Neuroscience Center, Geneva University, 2010, Geneva, Switzerland.

Sugawara T. Invited lecture "New intraoperative navigation methods for spinal and brain surgery". Uppsala University Hospital, 2011, Uppsala, Sweden.

Sugawara T., Higashiyama N, Mizoi K: Novel patient-specific screw guide template system for posterior cervical fixation.

Euro Spine 2011, 2011.10.19-20, Milan, Italy

菅原卓, 東山巨樹, 溝井和夫: スクリューガイドテンプレートシステムを用いた脊椎後方固定術.

第 46 回日本脊椎障害医学会, 2011 年, 泉佐野

菅原卓, 東山巨樹, 小林慎弥, 齋藤浩史, 引地堅太郎, 石川達哉, 溝井和夫: 頸椎前方固定術における術中 CT の有用性.

第 12 回東北脊椎外科研究会, 2012 年, 仙台

菅原卓, 東山巨樹, 柴田憲一, 小田正哉, 溝井和夫: 頸椎前方固定術の術後イベントに関する危険因子の検討.

第 27 回日本脊椎外科学会総会, 2012 年, 浦安

菅原卓, 東山巨樹, 近藤類, 佐々木絵里奈, 柳澤俊晴, 溝井和夫: SAH で発症した頸髄 AVF の 1 例.

Summer Forum for Practical Spinal Surgery 2012, 2012 年, 札幌

菅原卓, 東山巨樹, 金山修一, 高畑正人, 鷺見正敏, 溝井和夫: オーダーメイドテンプレートを用いた胸椎椎弓根スクリュー誘

導法.

第 19 回日本脊椎・脊髄手術手技学会, 2012 年, 八戸

[図書] (計 1 件)

菅原卓: 頸椎前方固定術 cage, box cage. 脊椎脊髄外科サージカルテクニック, 東京, 2012, 22-35 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: スクリューガイドテンプレート, スクリューガイドテンプレートシステム, および穿孔方法

発明者: 菅原卓, 他 4 名

権利者: 秋田大学

種類: 特許権

番号: 2010-123001

出願年月日: 2010 年 5 月 28 日

国内外の別: 国内・国外

名称: 脊椎制動具

発明者: 菅原卓

権利者: 秋田大学

種類: 特許権

番号: 2011-136665

出願年月日: 2011 年 6 月 2 日

国内外の別: 国内・国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 卓 (SUGAWARA TAKU)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号: 80241660