

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592043

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小胞体ストレス反応の関係についての検討

研究課題名(英文)Endoplasmic reticulum stress response in motor neuron after transient ischemia in rabbits

研究代表者

中島 淳博(NAKASHIMA, ATSUHIRO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10260704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000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細胞死における小胞体ストレス反応の関わりと、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。しかしながら、小胞体ストレス関連蛋白は蛋白抽出が非常に不安定で、解析に足りうる試料の作成に至らなかった。このためオートファジー関連蛋白を併せて解析を行い、脊髄虚血によりオートファジー関連細胞死が起こっている可能性があることが示唆された。また脊髄保護モデルにおいてはオートファジー抑制因子であるBcl-2の発現が有意に高く遷延していることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate the role of endoplasmic reticulum stress response in motor neuron death after transient ischemia in rabbits. However it was not possible to extract the endoplasmic reticulum stress relation protein enough for the analysis. Therefore, we investigated the role of autophagy-mediated stress response. We recognized that the prolonged induction of autophagy might be a potential factor responsible for delayed motor neuron death, and the induction of the autophagy inhibitory protein Bcl-2.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 心臓血管外科学

キーワード：脊髄虚血 小胞体ストレス

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動脈瘤手術時の大動脈遮断操作に伴う脊髄の虚血・再還流によって、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)がお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(外因性経路)と、細胞内のシグナル伝達によるもの(内因性経路)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。

小胞体はリボソームで合成された蛋白質の正常な折り畳み、すなわち糖鎖修飾や立体構造を形成させる場である。この小胞体で行われる蛋白質の折り畳みを障害するような内的・外的刺激が加わると、異常な構造を示す蛋白質が小胞体に蓄積するようになる。これが小胞体ストレスと呼ばれる状態であり虚血も小胞体ストレスの重要な誘発要因と考えられている。近年ウサギの一過性脊髄虚血モデルにおいて小胞体ストレスが強く誘発され、再灌流後比較的早期に関連蛋白が強く発現することが報告された。また、小胞体ストレスと遅延性運動神経細胞死の関係も示唆されている。

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小胞体ストレス反応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、脊髄虚血後の小胞体ストレスの誘発の程度および小胞体ストレス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。

3. 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により脊髄中の小胞体ストレス関連蛋白(eIF2, ATF4, GRP78, caspase12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、それぞれの小胞体ストレス関連蛋白の運動神経細胞内の局在を観察する。

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。

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。
- 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。

5)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。
6)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。

脊髄組織の抽出

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、L1~L7 腰髄を摘出する。

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。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判定する。8 時間、1 日目、2 日目、7 日目のそれぞれのポイントで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、免疫染色を行い小胞体ストレス関連蛋白 (eIF2, ATF4, GRP78, caspase12) 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、神経細胞内での小胞体ストレス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、小胞体ストレス関連蛋白 (eIF2, ATF4, GRP78, caspase12) 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 eIF2, ATF4, GRP78, caspase12 の発現

の程度および、経時的变化を測定する。

4. 研究成果

Johnson 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された。これには小胞体ストレス関連蛋白が関与していると考えているが、小胞体ストレス関連蛋白は蛋白抽出が非常に不安定で、解析に足りうる試料の作成に至らなかった。このためオートファジー関連蛋白を併せて解析を行い、脊髄虚血によりオートファジー関連細胞死が起こっている可能性があることが示唆された。また脊髄保護モデルにおいてはオートファジー抑制因子である Bcl-2 の発現が有意に高く遷延していることが確認できた。

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 0 件)

〔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：
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

中島 淳博 (NAKASHIMA ATSUHIRO)
九州大学 大学病院 助教
研究者番号：10260704

(2) 研究分担者

塩川 祐一 (SHIOKAWA YUICHI)

九州大学 医学部 准教授
研究者番号：70457422

(3)研究分担者

大石 恭久 (OISHI YASUHISA)
九州大学 病院 助教
研究者番号：20529870