

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462406

研究課題名(和文) 遅発性脊髄障害とDセリン～ノックアウトマウスを用いた研究～

研究課題名(英文) Investigating whether D-serine is associated with delayed paraplegia after spinal cord ischemia in mice

研究代表者

漕上 竜也 (FUCHIGAMI, Tatsuya)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10381211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脊髄虚血後遅発性対麻痺モデルを用い、遅発性脊髄神経細胞死へのNMDA受容体のCoagonistであるDセリンの関与を検討した。脊髄虚血後遅発性対麻痺発症時に脊髄内でDセリンの発現が増加していた。さらにDセリンを合成するセリンラセマーゼ(SR)も多く発現していた。このことからDセリンがこの病態に関与している可能性が示唆された。この可能性を証明するためにSRノックアウトマウスを用い脊髄虚血侵襲を与えたところ、野生型マウスと同様に遅発性対麻痺を発症した。このことから、脊髄虚血後の遅発性対麻痺の発症にDセリンは関与していない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The investigating whether D-serine, NMDA receptor coagonist, is associated with the neuropathological mechanism of delayed paraplegia after spinal cord ischemia in mice was done. Expression of D-serine as well as serine racemase, D-serine synthesis enzyme, was increasing in the spinal cord 24hr after ischemia. However, western blotting analysis showed no increase of ERK1/2 in the spinal cord 24hr after spinal cord ischemia. Of interesting, mice deficient SR (SR knockout mice) showed delayed paraplegia, same as wild type mice, after spinal cord ischemia. Based on these results, neither D-serine or SR expression after spinal cord ischemia might be associated with delayed paraplegia after spinal cord ischemia in mice.

研究分野：脊髄神経

キーワード：Dセリン 虚血性脊髄障害 対麻痺 グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸受容体のひとつである NMDA 受容体は、生理的な神経伝達に必須である一方で、多様な病態における神経変性に関わっている。NMDA 受容体の活性化に重要である因子のひとつに、その Co-agonist である D セリンがある。この D セリンは、生体内でセリンラセマーゼ (SR) により L セリンから合成され、D アミノ酸化酵素 (DAO) で分解されるアミノ酸 (図 1) であり、D セリンを神経組織へ投与すると神経毒性を發揮する。最近では、脊髄運動神経変性の代表的な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態においても、D セリン合成促進あるいは分解抑制の関与が示されており (Sasabe J, EMBO J, 2007; 26:4149-59, PNAS 2012; 109:627-32)、神経変性と D セリンの関連および創薬的観点からの研究が国内外で注目されている。

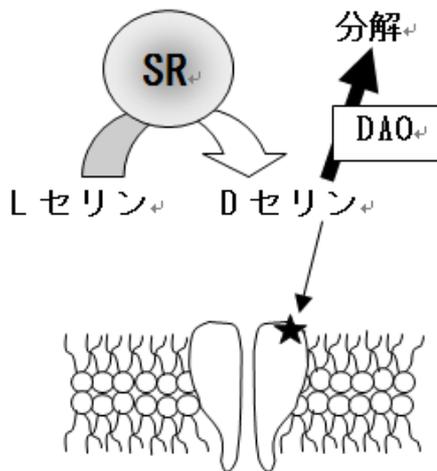


図 1 NMDA 受容体

我々は、1996年にラットの脊髄虚血モデルを開発し、その病態生理に関して多くの報告を行ってきた。しかしながら、その病態生理の解明には、従来の薬理学的手法では不十分であることを実感しており、近年の生物学分野で利用されている遺伝子工学的技術の導入が必須であると考えていた。そこで、当教室では米国ハーバード大学との共同研究により、遺伝子改変が容易であるマウスを用いた脊髄虚血モデルの開発に取り組み、2009年にマウスを用いた遅発性脊髄障害モデルの作成に成功した。このマウスモデルの病態生

理について遺伝子改変マウス (Caspase 3 ノックアウトマウス) を用いた研究 (図 2) を行い、Caspase 3 を必須とするアポトーシスがその主体たる病態であることを報告した (Kakinohana M, et al. Stroke 2011; 42:2302-7)。

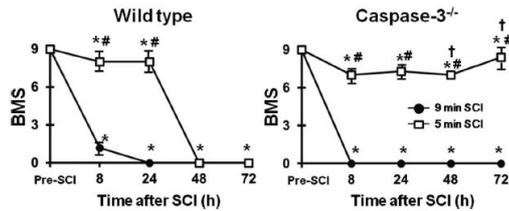


図 2 .Caspase3 ノックアウトマウスを用いた脊髄虚血モデルの神経学的変化

この病態は、多くの神経変性疾患と共通するもので、したがって神経変性疾患の病態モデルにも用いることが可能であると考えている。ところで、先述したように、多くの神経変性疾患に NMDA 受容体の Co-agonist である D セリンの関与が報告されており、このマウスモデルにおいても D セリンの関与の可能性があると考え、これに着目した。

予備実験として、マウス遅発性対麻痺モデルにおける脊髄内の D セリンの経時的変化について免疫組織学的に検討した。その結果、脊髄虚血早期 (虚血後 8 時間以内) では、脊髄前角領域に D セリンの発現はみられなかったが、虚血後 24 時間では脊髄前角の大型および中～小型の神経細胞の多くに D セリンが発現していた (図 3)。

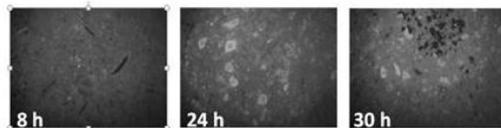


図 3. 脊髄虚血後の経時的 D セリン発現

(虚血 24 時間以降に D セリンが発現)

この経時的変化を、病理組織学的所見ならびに活性型 Caspase 3 発現と比較したところ、D セリンの発現は、病理組織学的変化ならびに活性型 Caspase 3 発現に先行していることが明らかとなった (表 1)。

表 1. 各種所見の脊髄虚血後の経時的变化

	8h	24h	30h	48h
Motor dysfunction	-	-	±	+
Histological changes	-	-	+	++
Cleaved Caspase 3	-	-	+	++
D-serine Expression	-	+	+	+

(D セリンが他と比較し最も早期に出現する)

これらのことから、D セリンならびに NMDA 受容体活性化がこの病態生理に関わっている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

当教室で開発したマウス脊髄虚血後の遅発性対麻痺モデルを用いた予備実験において、神経変性疾患の病態生理に関わっていると報告されている D セリンが脊髄に異常発現することを見出した。このマウス遅発性対麻痺モデルを用い、NMDA 受容体の Co-agonist である D セリンの病態生理への関与を検討する目的で、D セリンならびにその合成あるいは分解に関わるセリンラセマーゼ (SR) の脊髄での発現 (免疫染色、Western Blot) と活性 (EHC 法) ならびに合成酵素である SR のノックアウトマウスを用いた脊髄虚血実験を行い、遅発性脊髄障害への SR および D セリンの関与を検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス脊髄虚血モデル作成

マウス：C57/BL6、(8~10 週齢 雄) に全身麻酔 (酸素・イソフルラン (1.5~2.0%)) し、体温を 37.5 に維持した。気管挿管後に人工呼吸下に下記手術を行った。まず、左大腿動脈より動脈ライン (PE-10) を確保、動脈圧モニタリングならびにヘパリン投与ラインとした。頸部および前胸部正中切開し左内頸動脈を指標に胸骨切開 (第 2 肋骨まで) し、胸腺を大動脈弓部から丁寧に剥離した。ヘパリン投与後、左鎖骨下動脈と左内頸動脈との間で弓部大動脈を遮断 (脳動脈瘤クリップを用いる) した。大動脈遮断 5 分後に遮断を解除し再灌流した。ただし、Sham 手術は、大動脈遮断は行わなかった。その後、止血を確認し、閉創そして麻酔から覚醒させた。覚醒後、抜管し 30 の環境温下で 2 時間観察した。虚血後下肢運動機能は、虚血後 2、4、6、24、48、72 時間目に Motor Deficit Index

(Stroke 1996;27:1850) と BMS scale (Cell Mol Neurobiol 2006;26:1167) を用い評価した。

(2) 脊髄サンプル採取

脊髄虚血前ならびに虚血後 (H2S 吸入後も含む) に高用量ペントバルビタールで犠殺した。脊柱 (中部胸椎 ~ 仙椎にかけて) を取り出し、仙骨部脊柱管から冷生理食塩水 (4) を注入し脊髄を圧出させ、直ちに液体窒素で凍結し、-80 で保存した。

(3) Western blotting

凍結脊髄を Lysate バッファーとともにホモジナイズし遠心後に上清液を採取した。SDS-PAGE ゲルで電気誘導し、ニトロセルロース膜に転写後、ブロッキング。その後、一次抗体 (4 x 一晚) ならびに二次抗体 (室温 x1 時間) をインキュベートした (一次抗体：ウサギ抗 ERK1/2 抗体、ウサギ抗 p38 抗体)。その後 ALP を化学発光させ、X 線フィルムへ露光し、蛋白を検出した。

(4) D セリン、SR 免疫染色

脊髄の凍結切片を作成し、D セリン、SR の一次抗体を Over night でインキュベートし、引き続き二次抗体を 1 時間インキュベートした。その後、蛍光顕微鏡で SR 発現の局在を検討した。

4. 研究成果

(1) 脊髄虚血後の D セリン、SR 発現 (免疫組織学的検討)

脊髄虚血後の遅発性対麻痺発現過程における脊髄内の D セリン、SR 発現と局在を免疫組織染色で検討した結果、虚血後 24 時間よりも 30 時間における D セリンが脊髄運動神経をはじめとする神経細胞に発現していた (図 4)。

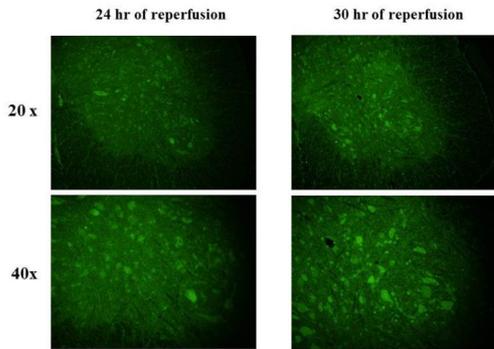


図4 . 脊髄虚血後Dセリンの免疫組織染色

さらにSRとDセリンを二重染色しその経時の変化ならびに局在を検討した結果、SRとDセリンは神経細胞ではなく、それ以外の細胞で同時局在を示した(図5)。

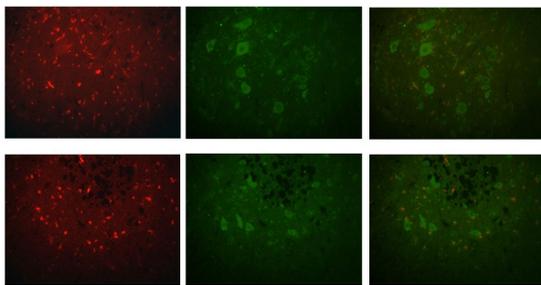


図5 . DセリンとSRの二重染色

(2) 脊髄虚血後のERK発現への影響

脊髄虚血後にNMDA受容体のリン酸化酵素のひとつであるERKをウェスタンブロッティングで検討した結果、脊髄虚血後の脊髄におけるERK発現は減少していた。

(3) SRノックアウトマウスにおける虚血性脊髄障害後の運動機能への影響

脊髄虚血後にDセリンならびにSRの発現が脊髄神経細胞やそれ以外の細胞で増加していたことから、遅発性脊髄障害にこれらが影響しているか、SRノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、SRノックアウトマウスに5分間の脊髄虚血侵襲を与えると、野生型マウスと同様に虚血後48時間目に遅発性対麻痺を発症した。

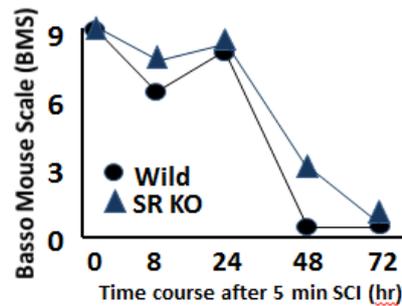


図6 . SRノックアウトマウス(SRKO)と野生型マウス(Wild)における一過性脊髄虚血後の遅発性対麻痺

総括

マウス脊髄虚血後遅発性対麻痺モデルを用い、神経細胞死に関わっているといわれているグルタミン酸受容体のひとつであるNMDA受容体のCoagonistであるDセリンならびにその合成酵素であるSRについて検討した。その結果、脊髄虚血後にはDセリンとSRは脊髄内で多く発現するが、SRノックアウトマウスで遅発性対麻痺が野生型同様発現した。これらのことから、マウス脊髄虚血後一過性対麻痺の病態生理にSRならびにDセリンが関わっている可能性は見いだせなかった。

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2件)

Fukuda T, Kakinohana M, Matsushita M, Sugahara K. Dietary supplementation with sodium nitrite can exert neuroprotective effects on global cerebral ischemia/reperfusion in mice. J Anesth 2015 ; 29 : 25 - 30 (査読有)

Kakinohana M. Protective effects of anesthetics on the spinal cord. Curr. Pharmaceu Desig 2014 ; 20 : 5744 - 50 (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

淵上 竜也 (FUCHIGAMI , Tatsuya)
琉球大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 10381211

(2)研究分担者

垣花 学 (KAKINOHANA , Manabu)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 20274897

大城 匡勝 (OSHIRO , Masakatsu)
琉球大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 00315483

中村 清哉 (NAKAMURA , Seiya)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 00363680