

令和元年6月21日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10667

研究課題名(和文)肝細胞増殖因子(HGF)による胸腹部大動脈瘤術後対麻痺治療の確立

研究課題名(英文)Treatment for spinal cord ischemia by HGF

研究代表者

吉武 明弘 (Yoshitake, Akihiro)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70327550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いての脊髄障害モデルを用いて検討を始めた。われわれは全身麻酔下にて開胸を行った後大動脈を鎖骨下動脈分岐部末梢にて遮断することで脊髄障害とするモデルを作成した。神経学的所見を評価をした。また、それぞれの時点でウェスタンブロット法にてHGFおよびc-Metの発現を評価し、RT-PCRを用いてHGF mRNAおよびc-Met mRNAを定量化した。手術後、HE染色したのち光学顕微鏡で病理組織学的検索を行った。脊髄中および血清中HGFの定量はラットのTh4-L2までの脊髄を摘出し、Th4-8, Th9-12, L1-2に分けて測定した。本研究においては、脊髄損傷後の脊髄中HGFの上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラットを用いての脊髄障害モデルを用いて検討を始めた。われわれは全身麻酔下にて開胸を行った後大動脈を鎖骨下動脈分岐部末梢にて遮断することで脊髄障害とするモデルを作成することに成功した。また本研究においては、上記モデルを用いて脊髄損傷後の脊髄中のHGFの上昇を認めた。虚血性脊髄障害においてHGFの関与が認められ、HGF投与による治療効果、予防効果の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We made a rat model with ischemic spinal cord injury. After left thoracotomy, distal aortic arch is clamped for 15minutes and the rat became spinal cord injury. We evaluated neurological function after 12, 24, 48 hours, 7 and 14 days after procedure and evaluated HGF and c-Met by Westernblot method and HGF mRNA and c-Met mRNA by RT-PCR method. Estimation of HGF in the spinal cord and blood were made after resection of spinal cord between Th4 and L2 and three section were evaluated. HGF level in the spinal cord after spinal ischemia were elevated. In the rat model of the spinal cord injury, HGF was influenced by spinal cord ischemia and it was suggested that HGF would be the treatment and prevention of spinal cord injury.

研究分野：心臓外科

キーワード：胸腹部大動脈瘤 脊髄障害 HGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸部大動脈瘤および胸腹部大動脈瘤手術は心血管系手術の中でも最も困難な領域である。この領域の手術において、死亡率とともに特に発生頻度が高く深刻な合併症の1つに脊髄虚血障害がある。脊髄障害の過程として四段階が考えられている。つまり虚血によるニューロンの壊死などの一次損傷。続いて炎症細胞が浸潤し種々の神経毒性物質を放出する炎症反応。ニューロンとオリゴデンドロサイトの遅発性細胞死である二次損傷。再生に阻害的な環境である空洞形成やグリア瘢痕、ミエリン残骸である。一方外傷性脊髄損傷に対する治療として HGF は注目され、非常に重要な役割を担っている。以前より、HGF は肝臓、腎臓や心臓などの臓器で障害が起こった際の内因性修復因子として知られており、HGF が重要な役割を担っていたことは知られていたが、神経細胞に対する効果は不明であった。外傷性脊髄損傷に対する HGF のニューロンとオリゴデンドロサイトの遅発性細胞死である二次損傷を最小限に食い止める役割を担っていることが証明された。外傷性脊髄損傷と虚血性脊髄障害はその損傷範囲の違いや損傷起点の相違点は不明な点が多い。HGF の虚血性脊髄障害に対する作用機序は外傷性脊髄損傷とも同意点が多く、治療効果が期待できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では胸腹部大動脈瘤手術における深刻な合併症である虚血性対麻痺について、未だ解明されていないその脊髄障害の障害過程を解明し、さらに HGF (Hepatocyte Growth Factor) を治療薬として臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

ラットを用いての脊髄障害モデルを用いて検討を始めた。われわれは全身麻酔下にて開胸を行った後大動脈を鎖骨下動脈分岐部末梢にて遮断することで脊髄障害とするモデルを作成した。常温にてヘパリンを静注した後に大動脈を 15 分遮断することで遮断解除後死亡することなく対麻痺を起こすことを確認した。神経学的所見を手術後、12、24、48 時間、7 日、14 日後の各時点において評価をした。また、それぞれの時点でウェスタンブロット法にて HGF および c-Met の発現を評価し、RT-PCR を用いて HGF mRNA および c-Met mRNA を定量化した。手術後、HE 染色したのち光学顕微鏡で病理組織学的検索を行った。脊髄中および血清中 HGF の定量はラットの TH4-L2 までの脊髄を摘出し、Th4-8、Th9-12、L1-2 に分けて測定した。術後 1 日目 (n=2)、2 日目 (n=2)、3 日目 (n=3)、4 日目 (n=3)、7 日目 (n=2)、14 日目 (n=3)、28 日目 (n=2) を検討した。

4. 研究成果

ラットを用いての脊髄障害モデルを用いて検討を始めた。われわれは全身麻酔下にて開胸を行った後大動脈を鎖骨下動脈分岐部末梢にて遮断することで脊髄障害とするモデルを作成することに成功した。

また本研究においては、上記モデルを用いて脊髄損傷後の脊髄中の HGF の上昇を認めた。虚血性脊髄障害において HGF の関与が認められ、HGF 投与による治療効果、予防効果の可能性が示唆された。

研究成果 2016 年

ウサギを用いての虚血性脊髄障害に対しての実験を計画をした。しかし、ウサギでは個体差が大きく、また遮断時間や体温、血圧などの他の要因による影響を受けやすい。そのため前段階としてラットを用いての脊髄障害モデルを用いて検討を始めた。ラットを用いた虚血性脊髄障害モデルは様々あるが、われわれは全身麻酔下にて開胸を行った後大動脈を鎖骨下動脈分岐部末梢にて遮断することで脊髄障害とするモデルを作成した。常温にてヘパリンを静注した後に大動脈を 10 分遮断したが、手術終了後対麻痺とはならず病理学的にも脊髄への障害はほとんど見られなかった。遮断時間を 13 分、15 分と延長すると、15 分遮断することで遮断解除後死亡することなく対麻痺を起こすことを確認した。また、20 分の遮断では全身性の acidosis となり術後生存はしなかった。神経学的所見を手術後、12、24、48 時間、7 日、14 日後の各時点において評価をした。また、それぞれの時点でウェスタンブロット法にて HGF および c-Met の発現を評価し、RT-PCR を用いて HGF mRNA および c-Met mRNA を定量化した。手術後、HE 染色したのち光学顕微鏡で病理組織学的検索を行った。

研究成果 2017 年

前年度で構築した虚血性脊髄障害モデルを用いて検討を行った。大動脈の遮断時間については、体温による影響が大きく、適切な保温方法と遮断時間の模索を行い、術中だけでなく、術前後も保温を行うことで体温を一定に保ち、その上で 15 分間遮断することで、安定した虚血モデルが構築できた。さらに、モデルラットの術後 12 時間、24 時間、2 日、3 日、4 日、7 日、14 日、28 日の各時点の病理学的検討を HE 染色、LFB 染色に加えて抗 HGF 抗体及び抗 c-Met 抗体による免疫染色を行い、脊髄の各レベルの障害の程度を解析した。また ELISA 法による HGF 及び c-Met の定量を行い、傾向の分析を行っている。また、モデルラット及びコントロールラットに対して脊椎後方アプローチによる laminaectomy を行い、脊髄腔内にカテーテルを挿入、浸透圧ポンプによる薬剤投与実験を行った。

研究成果 2018 年

本研究では、ラット虚血脊髄障害モデルを用いて虚血脊髄における HGF の推移を測定し、治療への応用性の検討を行なった。

虚血性脊髄障害において HGF の関与が認められ、HGF 投与による治療効果、予防効果の可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

川合雄二郎、吉武明弘、内室智也、伊藤努、山崎真敬、高橋辰郎、木村成卓、秋山章、稲葉佑、赤松雄太、岡英俊、中川和彦、中嶋信太郎、村田哲、志水秀行。虚血性脊髄障害に対する肝細胞増殖因子(HGF)治療の可能性。第 49 回日本心臓血管外科学会学術総会。2019 年

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩波 明生

ローマ字氏名：(IWANAMI, akio)

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部(信濃町)

職名：講師

研究者番号(8桁): 40327557

研究分担者氏名：志水 秀行

ローマ字氏名：(SHIMIZU, hideyuki)

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部(信濃町)

職名：教授

研究者番号(8桁): 50226247

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。