

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17935

研究課題名(和文)大動脈手術における脊髄保護戦略：遅発性対麻痺に対するネクロプトーシスの検討

研究課題名(英文)Strategy for spinal cord protection in aortic surgery: a consideration of necroptosis for delayed paraplegia

研究代表者

元松 祐馬 (Motomatsu, Yuma)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20746870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で用いてきたウサギー過性脊髄虚血モデルを用いてネクロプトーシス阻害薬(Necrostatin-1)を投与し運動機能評価・運動神経細胞の組織学的評価で保護効果を明らかにする事を目的に実験を行った。Necrostatin-1の量は多すぎると心停止または衰弱死したが適量では副作用なく脊髄虚血後の遅発性対麻痺の予防になると確認出来た。HE染色で薬剤投与群において虚血後に脊髄前角での運動神経細胞の生存数が多い事やWestern blot法にてネクロプトーシス関連蛋白質の発現が減少した事を確認した。これよりNecrostatin-1は遅発性対麻痺のネクロプトーシスを阻害する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄虚血による対麻痺(下半身麻痺)は大動脈手術後の重篤な合併症であり患者QOLを著しく損なうものである。術直後は神経合併症なく覚醒するも時間経過と共に発症する遅発性対麻痺というものもあるが、その機序はいまだ不明な点が多く、そのメカニズム解明は予防法、治療法確立のために重要である。本研究によりNecrostatin-1の有効性を確認できれば大動脈手術を受ける患者の遅発性対麻痺の予防、治療の一助になり術後QOLに寄与することが出来ると考えている。

研究成果の概要(英文)：There were significant differences in physiological function between the control and necrostatin-1-injected groups. In the control group, most motor neurons were selectively lost at 7 days after reperfusion, but they were preserved in the Necrostatin-1 group. Western blot analysis revealed the upregulation of RIP1, RIP3 and cIAP1/2 at 8 hours in the control group, and the expression of RIP3 was prolonged for 2 days. In the Necrostatin-1 group, the expression of these proteins was not observed. The double-label fluorescent immunocytochemical study revealed the induction of RIP3 and cIAP1/2 in the same motor neurons. These data suggest that transient ischemia induces necroptosis, a potential factor in delayed motor neuron death, and that Necrostatin-1 may inhibit necroptosis.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：ネクロプトーシス 脊髄虚血 遅発対麻痺

1. 研究開始当初の背景

胸部下行・胸腹部大動脈手術後の対麻痺は重篤な合併症であり発生頻度は2.9%から23%と報告されている。その機序として大動脈遮断時の虚血再灌流により脊髄神経細胞内で大量のフリーラジカルが産生され酸化ストレスによって神経細胞が障害され急性運動神経細胞死が起こると報告されている。一方、このような酸化ストレスによって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などによる遅発性運動神経細胞死が起こり梗塞領域を拡大し遅発性対麻痺を発症すると報告されている。細胞死としてアポトーシス、オートファジー、ネクローシスの3つの形態が知られているがTNF 刺激によりネクローシスが誘導される「プログラムされたネクローシス」が報告され新たな細胞死の形態の一つとしてネクロプトーシスが定義された。ネクロプトーシスの実行因子であるRIPK1に結合しネクロプトーシスを阻害するNecrostatin-1(Nec-1)という化合物が多岐にわたる分野で研究が進められており、その有効性が実証されてきている。

2. 研究の目的

脊髄虚血による対麻痺(下半身麻痺)は大動脈手術後の重篤な合併症であり患者QOLを著しく損なうものである。術直後は神経合併症なく覚醒するも時間経過と共に発症する遅発性対麻痺というものもあるが、その機序はいまだ不明な点が多く、そのメカニズム解明は予防法、治療法確立のために重要である。近年、Death signalによってネクローシス様の細胞死が誘導される、ネクロプトーシスという細胞死が脳梗塞や心筋梗塞などの虚血再灌流障害、薬剤性膵炎、炎症性腸疾患、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、外傷性脊髄損傷などに関与していることが明らかになってきた。我々の研究室でもウサギ一過性脊髄虚血モデルを用いて単純虚血ではオートファジー実行蛋白質であるLC-3、GABARAP、Beclin-1の発現の亢進、脊髄冷却ではBeclin-1を阻害するBcl-2の発現の亢進を発見し遅発性の運動神経細胞死にオートファジーシグナルが関与し脊髄冷却によりオートファジーが抑制されることを解明した。今回、ウサギ一過性脊髄虚血モデルに対してネクロプトーシス阻害剤であるNec-1を投与し、脊髄でのネクロプトーシス関連蛋白質の発現を免疫組織学的、生化学的に測定する。本研究によりNec-1の有効性を確認できれば大動脈手術を受ける患者の遅発性対麻痺の予防、治療の一助になり術後QOLに寄与することが出来ると考えている。連蛋白質の発現を免疫組織学的、生化学的に測定する。本研究によりNec-1の有効性を確認できれば大動脈手術を受ける患者の遅発性対麻痺の予防、治療の一助になり術後QOLに寄与することが出来ると考えている。

2. 研究の方法

動物実験では、Sakurai (NeurosciLett1999;276:123-6)、Motoyoshi (JThorac CardiovascSurg 2001;122:351-7)らの報告に基づきモデルを製作する(動物種:ウサギ、系統:日本白色家兔、性別:雄、試験時体重:2.5-3.0 kg)。ウサギの一過性脊髄虚血モデルを用いて、コントロール群、単純虚血群、脊髄冷却群、Nec-1投与群に分別し、各群での後肢運動機能を経時的に評価す

る。サンプル取得後、Hematoxylineosin (HE) 染色を初めとした組織学的検査を開始し、Western blot 法にて蛋白質の発現を検討する。さらに免疫組織染色、蛍光二重染色といった組織学的検査を追加する。本研究で使用する薬剤投与モデルにおいて Nec-1 の投与量を 100  $\mu$ g/kg と設定している。しかしながら、これは作用副作用の点から適宜変更することが必要と思われる。一方、当研究室でのウサギの一過性脊髄虚血モデルおよび脊髄冷却モデルは確立している。実験系も当研究室でのオートファジーの研究で確立されたものである。すでに我々は脊髄冷却による後肢運動機能保護効果を確認し現在 Nec-1 投与群の予備実験を開始しており、研究の準備は整っている。

#### 4 . 研究成果

当研究室で用いてきたウサギ一過性脊髄虚血モデルを用いてネクロプトーシス阻害薬 (Necrostatin-1) を投与し運動機能評価・運動神経細胞の組織学的評価で保護効果を明らかにする事を目的に実験を行った。Necrostatin-1 の量は多すぎると心停止または衰弱死したが適量では副作用なく脊髄虚血後の遅発性対麻痺の予防になると確認出来た。HE 染色で薬剤投与群において虚血後に脊髄前角での運動神経細胞の生存数が多い事や Western blot 法にてネクロプトーシス関連蛋白質の発現が減少した事を確認した。これより Necrostatin-1 は遅発性対麻痺のネクロプトーシスを阻害する事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuma Motomatsu	4. 巻 59(5)
2. 論文標題 Hypothermia Inhibits the Expression of Receptor Interacting Protein Kinases 1 and 3 After Transient Spinal Cord Ischaemia in Rabbits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Vasc Endovasc Surg	6. 最初と最後の頁 824-833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejvs.2019.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 元松 祐馬
2. 発表標題 大動脈手術における脊髄保護戦略：遅発性対麻痺に対するNecroptosisの検討
3. 学会等名 日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----