

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09527

研究課題名（和文）脊髄損傷急性期における細胞内ATPのリアルタイムモニタリング

研究課題名（英文）Real-time monitoring of intracellular ATP concentration in acute spinal cord injury

研究代表者

大西 諭一郎 (Ohnishi, Yuichiro)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：00533811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脊髄損傷急性期の細胞内ATPのリアルタイムモニタリングを行い、細胞内ATPの時間的・空間的变化を明らかにした。そして損傷頭尾側での軸索変性の進行の違いがエネルギー代謝の違いによることを明らかにした。脊髄損傷尾側では解糖系が軸索変性を抑制し、損傷頭側では虚血再灌流障害による酸化ストレスが軸索変性を進行させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷後の軸索変性は頭尾側に徐々に広がっていく。損傷頭側での軸索変性は損傷直後から早く進行し、損傷尾側での軸索変性は遅れて進む。損傷頭尾側での軸索変性の進行の違いのメカニズムはよくわかっていない。本研究では脊髄損傷急性期の細胞内ATPのリアルタイムモニタリングを行い、細胞内ATPの時間的・空間的变化を明らかにした。そして急性期の脊髄細胞内エネルギー代謝が2次損傷の増悪に与える影響を評価した。また、脊髄損傷の病態を、エネルギー代謝という観点から探索し、脊髄損傷急性期での軸索変性の進行の違いのメカニズムを世界で初めて明らかにしている。

研究成果の概要（英文）：Spinal cord injury gradually spreads away from the epicentre of injury. The rate of degeneration on the rostral side of the injury differs from that on the caudal side. The blood flow at the rostral side of the injury showed ischaemia-reperfusion, while the caudal side presented stable perfusion. Although the low-ATP regions expanded at the rostral side of injury until 24h after spinal cord injury, the caudal-side ATP levels were preserved. The low-ATP regions on the rostral side showed mitochondrial reactive oxygen species production. Administration of 2-deoxy-D-glucose as a glycolysis inhibitor decreased the caudal ATP levels and expanded the low-ATP regions to the caudal side until 24h after spinal cord injury. These results suggest that deficits in the glycolytic pathway accelerate the caudal degeneration, while immediate rostral degeneration is exacerbated by oxidative stress in early thoracic cord injury.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脊髄損傷 代謝 解糖系 軸索変性 酸化ストレス ATP

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は急性期、亜急性期と慢性期で異なる病態を示す。急性期では脊髄は直達障害を被り、細胞は破壊され、血管が破綻する。亜急性期では炎症が数週間持続し、組織損傷が時間的・空間的に増悪する。脊髄2次損傷の増悪を防ぐことは、残存機能・組織を温存することとなり、リハビリテーションや再生治療での効果が期待できる。

脊髄損傷急性期では血管内皮の損傷、血管の破綻と、外的(脱臼骨折や肥厚靭帯)・内的(血腫や浮腫)要因による圧迫から、損傷部で血栓、血腫、浮腫と微小循環障害が生じ、脊髄への血流が低下・停止する。脊髄への血流供給の低下は細胞内ATPの低下・枯渇を引き起こす。また、脊髄損傷後の軸索変性は頭尾側に徐々に広がっていく。損傷頭側での軸索変性は損傷直後から早く進行し、損傷尾側での軸索変性は遅れて進む。これまでも脊髄損傷後の細胞外ATP濃度変化は局所的に間接的方法で調べられているが、広範囲にリアルタイムで直接観察した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では脊髄損傷急性期の細胞内ATPのリアルタイムモニタリングを行い、細胞内ATPの時間的・空間的变化を明らかにする。そして急性期の脊髄細胞内エネルギー代謝が2次損傷の増悪に与える影響を評価する。また、損傷頭尾側での軸索変性の進行の違いのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

脊髄損傷モデルマウスの作成

脊髄損傷は胸髄に幅2mm・圧挫力30g/mm²のクリップにて作成する。クリッピング時間は15秒とし、組織学的評価と下肢運動機能(BMS)を行う。

脊髄損傷後の組織血流変化の時間的・空間的解析と評価

レーザースペックルフローグラフィ(LSF)は、レーザ光を生体組織に照射して、血管内の赤血球により生じるスペックルパターンの時間変化を検出し、非侵襲的に血流量を測定する。挫滅前と挫滅後20分間、6時間後と24時間後にLSFによる脊髄血流量評価を行う(図6)。損傷中心部から1mm毎にROIをとり、血流量を算出する。

脊髄損傷後の細胞内ATP変化の時間的・空間的解析と評価

細胞内ATPのリアルタイム観察は、ATP濃度を反映する蛍光プローブであるATeam2を全身の細胞で発現させているG0-ATeam2トランスジェニック(Tg)マウスを使用し、多波長同時観察システムを用いて行う。G0-ATeam2 Tgマウスは細胞内のATPを可視化でき、個体内で細胞レベルのATP量を非侵襲的かつ定量的に計測できるようになっている。蛍光プローブATeam2は、ATP非結合型(図1左)では緑色(GFP:510nm)の蛍光を発する。ATP結合型(図3右)では赤色(OF:560nm)の蛍光を発する。ATP非結合型とATP結合型の存在比はATP濃度によって決まるため、GFPとOFの強度比からATP濃度を見積もることが可能となる。G0-ATeam2 Tgマウスの

挫滅前と挫滅後 20 分間、6 時間後と 24 時間後に G0-ATeam2 Tg マウスの脊髄の ATP 濃度を、多波長同時観察システムを用いて測定する。損傷中心部から 1mm 毎に ROI をとり、画像解析ソフトの Metamorph を用いて、OFP/GFP を算出する。ATP 量はわれわれが得ている計算式にて得て算出する。画像解析ソフトの Image J から ATP 濃度領域を解析する。

損傷脊髄の質量分析とメタボローム解析

損傷部での ATP 変化がいかなる代謝によって生じたものかを質量分析とメタボローム解析から調べる。

損傷頭尾側でのトルイジンブルー染色による軸索評価

軸索径とミエリン鞘の計測と G-ratio から軸索変性を評価する。

損傷頭尾側での酸化ストレスの評価

損傷脊髄に MitoSox を投与し、スーパーオキシドを可視化し評価する。MitoB を髄腔内カテテルから投与し、MitoP/B の質量分析比から過酸化水素を定量化する。酸化ストレスによる生成物である 4-HNE の計測によって、酸化ストレスを評価する。

4. 研究成果

レーザースペckルフローグラフィーでは、損傷頭側で虚血再灌流が生じ、損傷尾側の灌流は維持されていた(図 1)。細胞内 ATP 可視化マウスの脊髄損傷モデルと質量分析イメージングでは損傷直後から損傷頭側部で ATP は低下していた(図 2)。また頭側では虚血時に多い NADH が上昇していた。特に、ATP 低下は灰白質で優位であった。一方、損傷尾側では ATP は維持されていた。損傷 18 時間後のメタボローム解析では、プリン代謝産物は頭尾側で同様に蓄積していたが、尾側部では TCA 回路と解糖系が上昇していた。このことは、損傷頭尾側では組織分解が同様に進むものの、損傷尾側ではエネルギーを維持するメカニズムが存在することを示唆していた。損傷 24 時間後の ATP は頭側へ低下範囲が進行したが、損傷尾側では ATP 低下範囲の広がり認められなかった(図 3)。メタボローム解析では、損傷尾側で解糖系の亢進を認めたが、クエン酸回路は損傷頭尾側で有意差はなかった。メタボローム解析の結果から、解糖系の競合阻害剤である 2-DG を投与すると、損傷 24 時間後の ATP 低下範囲は尾側へ広がりを認めた(図 4)。損傷頭側の ATP 低下の広がり、MitoSox、MitoP/B、4-HNE による解析から、酸化ストレスが原因と考えられた。脊髄損傷後 24 時間でのトルイジンブルー染色による解析では、軸索変性は損傷頭側で進行し、軸索径の膨化は前・側・後索で認め、ミエリン鞘の菲薄化は後索で著名であった(図 5)。2-DG 投与下では損傷尾側で軸索変性が進行し、軸

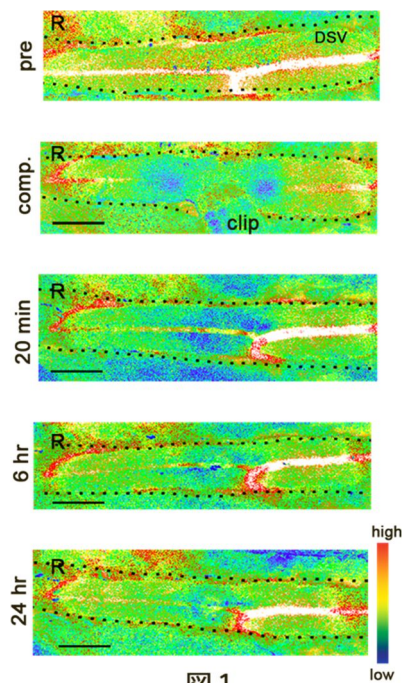


図 1

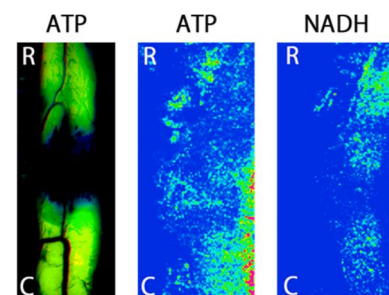


図 2

索径の膨化は側索で認め、ミエリン鞘の菲薄化は側・後索で著名であった（図5）。以上の結果から、脊髄損傷尾側では解糖系が軸索変性を抑制し、損傷頭側では虚血再灌流障害による酸化ストレスが軸索変性を進行させることが示唆された。

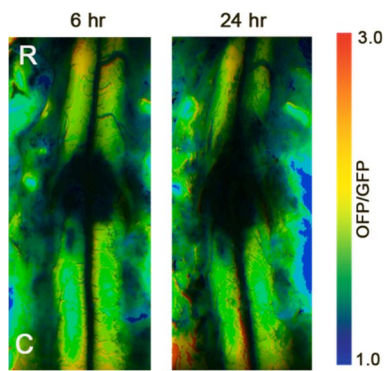


図3

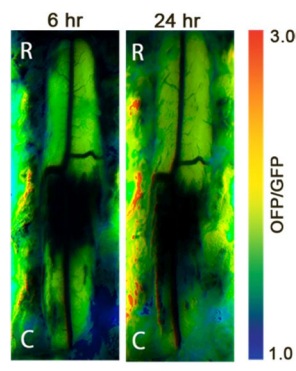


図4

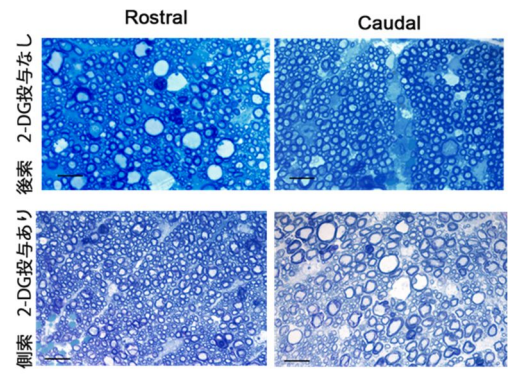


図5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yuichiro Ohnishi, Masamichi Yamamoto, Yuki Sugiura, Daiki Setoyama, Haruhiko Kishima	4. 巻 3
2. 論文標題 Rostro-caudal different energy metabolism leading to differences in degeneration in spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Communication	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcab058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yu-Ichiro Ohnishi, Nobuhiko Nakajima, Sho Fujiwara, Takashi Moriwaki, Hideyuki Arita, Haruhiko Kishima	4. 巻 17
2. 論文標題 A Sufficient Surgical Window for Deep-Seated Extracranial Schwannomas in the Craniocervical Junction by the Anterolateral Approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurispine	6. 最初と最後の頁 453-460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14245/ns.1938270.135.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohnishi YI, Nakajima N, Takenaka T, Fujiwara S, Miura S, Terada E, Yamada S, Kishima H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Conservative and Surgical Management of Spinal Cord Cavernous Malformations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurg X.	6. 最初と最後の頁 100066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wnsx.2019.100066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Aoe J, Fukuma R, Yanagisawa T, Harada T, Tanaka M, Kobayashi M, Inoue Y, Yamamoto S, Ohnishi Y, Kishima H.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Automatic diagnosis of neurological diseases using MEG signals with a deep neural network.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41500-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中島 伸彦、大西 諭一郎、藤本 康倫、前田 陽平、端山 昌樹、北口 善之、貴島 晴彦	4. 巻 48
2. 論文標題 症例 眼窩静脈奇形に対する内視鏡下経鼻手術-2例報告	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 1043 ~ 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204318	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 -

1. 著者名 OHNISHI Yu-ichiro, SUGANO Hirofumi, FUJIWARA Sho, MORIWAKI Takashi, NISHIDA Takeo, NAKAMURA Hajime, KISHIMA Haruhiko	4. 巻 48
2. 論文標題 Conservative and Surgical Management of Spinal Cord Cavernous Malformation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery for Cerebral Stroke	6. 最初と最後の頁 281 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2335/scs.48.281	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大西諭一郎、藤原 翔、西 麻哉、竹中朋文、中島伸彦、貴島晴彦
2. 発表標題 脊髄損傷急性期の病態理解に基づく治療法開発への取り組み
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 髄内腫瘍摘出術における腫瘍周囲の術中血流評価
3. 学会等名 第34回日本脊髄外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 脊髄海綿状血管腫の保存的治療と外科治療
3. 学会等名 第34回日本脊髄外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 頭蓋底陥入症に対する経口アプローチと経鼻アプローチによる到達範囲の検討
3. 学会等名 第31回日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 骨粗鬆性多発椎体骨折に対する治療経験
3. 学会等名 近畿脊髄外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 斜台部骨巨細胞腫に対して経鼻内視鏡下腫瘍摘出術を施行した1例
3. 学会等名 第一回関西経鼻内視鏡頭蓋底外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichiro Onishi
2. 発表標題 Management of spinal cord cavernous malformations
3. 学会等名 EuroSpine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 斜台部骨巨細胞腫に対して経鼻内視鏡下腫瘍摘出術を施行した1例
3. 学会等名 第26回日本神経内視鏡学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 脊髄損傷頭尾側でのエネルギー代謝と軸索変性の違い
3. 学会等名 第36回日本脊髄外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 骨粗鬆性椎体骨折の治療
3. 学会等名 第36回日本脊髄外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西諭一郎
2. 発表標題 脊髄脊椎外科の術後感染
3. 学会等名 第28回日本脊椎・脊髄神経手術手技学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------