

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390362

研究課題名（和文） 脊髄虚血障害におけるグリア細胞の役割の解明と治療への応用

研究課題名（英文） The mechanism and function of astrocytes in ischemic spinal cord injury in rabbit

研究代表者

若狭 哲 (WAKASA SATORU)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：10374365

研究成果の概要（和文）：

大動脈瘤手術における脊髄障害は非常に重篤かつ未解決の合併症である。我々は、障害予防の標的としてのグリア細胞の有用性を検討するため、脊髄虚血再灌流障害においてグリア細胞が果たす役割を分析した。ウサギ脊髄虚血再灌流モデルを用いた実験から、グリア細胞の活性化は遅発性神経細胞障害の程度に相関があることが示された。また、グリア細胞の活性化とアラキドン酸の動態が有意な相関を示すことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Spinal cord injury is one of the disastrous complications after surgical repair of thoracoabdominal aortic aneurysm and remains to be eliminated. We investigated the role of astrocytes in the spinal cord injury after transient spinal cord ischemia to elucidate whether the astrocyte would be a target for prevention of spinal cord injury. In the rabbit model, we demonstrated the significant inverse correlation between the activity of astrocytes and number of intact motor neurons. Furthermore, a concentration of arachidonic acid significantly correlated with the activity of astrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	4,100,000	1,230,000	5,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：脊髄虚血再灌流障害、活性化グリア細胞、遅延性脊髄障害、細胞膜リン脂質、質量顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤手術における脊髄障害は非常に重篤かつ未解決の合併症であり、その機序の解明あるいは予防のために数多くの研究がなされてきた。

応募者らもこれまで脊髄虚血に関する臨

床的、基礎的研究を積み重ねてきた。

(1) 臨床研究

- ① 胸腹部大動脈瘤手術例において、周術期の脳脊髄液中炎症性サイトカインの変動を報告 (Ann Thorac Surg

71:801-6, 2001)

- ② 大動脈瘤術後脊髄虚血障害例では、脳脊髄液 S100B 蛋白が上昇することを報告 (J Thorac Cardiovasc Surg 122:1019-20, 2001)
- ③ 大動脈瘤術後脊髄虚血障害例では、脳脊髄液神経興奮性アミノ酸が上昇し、脊髄保護に臨床的に用いられているナロキソンはこれらを抑制することを報告 (J Vasc Surg 40:681-90, 2004)

(2) 基礎研究

- ① ウサギ脊髄虚血モデルにおいて、血中並びに脊髄中炎症性サイトカインの変動と、これに対するラザロイドの抑制効果を報告 (Ann Thorac Surg 69:792-8, 2000)
- ② ウサギ脊髄虚血モデルにおいて、 K_{ATP} 作動薬 Nicorandil が脊髄保護作用を有することを報告 (J Thorac Cardiovasc Surg 122:728-33, 2001)
- ③ ウサギ脊髄虚血モデルにおいて、immunophilin ligands が脊髄保護作用を有することを報告 (J Thorac Cardiovasc Surg 129:123-8, 2005)
- ④ ウサギ脊髄虚血モデルにおいて、ischemic preconditioning における K_{ATP} チャンネルの役割を明らかにした (未発表データ)

近年、脳虚血再灌流障害におけるグリア細胞の役割が注目されてきた。特に星状膠細胞 (astrocyte) が虚血に伴って活性化され (astrogliosis) 神経障害あるいは神経保護に関して重要な役割を果たすことが解明されてきたが、脊髄においてはまだ詳細な検討はなされていない。我々は、脊髄虚血再灌流障害においても星状膠細胞は重要な働きをしており、脊髄障害のメカニズムを理解する上で、また臨床的に周術期脊髄障害を予防する際のターゲットとして重要と考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ウサギ脊髄虚血再灌流モデルを用いて、脊髄前角細胞 (運動神経細胞) の虚血再灌流障害における星状膠細胞の役割を明らかかにし、これをターゲットとした虚血障害予防法の開発に寄与することである。

3. 研究の方法

これまで応募者らが脊髄虚血に関する基礎研究で用いてきたボーダーライン虚血モ

デル (即時型と遅発型細胞死が混在するモデル) を使用し、脊髄障害の程度と astrocyte の活性化の程度およびその関連を評価する。

(1) 実験 1

Astrocyte の活性化の指標として、astrocyte の骨格タンパク質である GFAP (glial fibrillary acidic protein) の発現亢進の程度を評価し、神経細胞障害との関連を評価した。

① モデル動物

New Zealand white rabbit 18 匹
(体重 2.8~3.5kg)

② 手術方法

吸入麻酔、自発呼吸下に大腿動脈から観血的にバルーンカテーテルを大動脈内に挿入し、腎動脈下腹部大動脈でバルーンを拡張して脊髄虚血を作成する。虚血時の直腸温は 39 度、虚血時間は 15 分とした。

再灌流後 1 日、3 日、7 日の時点で各々 6 匹ずつ犠牲死させ脊髄を摘出、標本を作製した。

③ 神経学的評価

脊髄虚血再灌流後 24 時間毎に Johnson ら (Stroke. 1993;24:1547-53) の方法に準じて神経機能を評価しスコアリングした。

- 0 = 後脚運動麻痺
- 1 = 重度の不全対麻痺
- 2 = 筋力低下/跳躍不能
- 3 = 失調性運動/いびつな跳躍
- 4 = 軽度の運動失調
- 5 = 正常機能

④ 組織学的検討

摘出した脊髄の L4/5 レベルをホルマリン固定し 4 μ m 薄のスライス切片を作成、HE 染色を行い正常神経細胞数を計測した。また、TUNEL 染色を行い神経細胞のアポトーシスの有無を観察した。

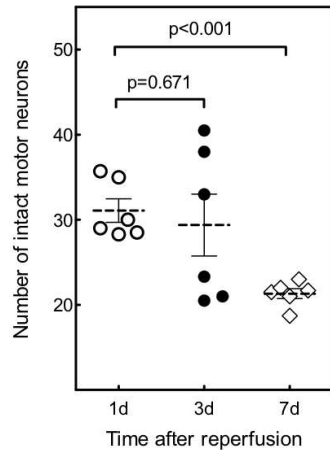
⑤ 免疫組織学的検討

摘出した L4/5 脊髄を -80°C で凍結し 4 μ m 薄スライス切片を作成、ウサギ GFAP ポリクローナル抗体を用いて室温 60°C で抗原抗体反応させ DAB で発色させた。この標本をコンピューターを用いてデジタル解析した。先ず取り込んだカラー画像を DAB の色調を基準とした白

黒画像（バイナリデータ）とし、視野全体に占める DAB 染色領域の割合を GFAP 発現領域%とした。GFAP 発現領域%は灰白質で 3 箇所、白質で 6 箇所を測定し、その平均値を各々解析に用いた。

(2) 実験 2

神経細胞障害における astrocyte 活性化の果たす役割とその機序を解明するた



めに、質量顕微鏡法を用いて虚血再灌流後各時点の脊髄における脂質の動態を観察し、神経細胞数や GFAP 発現量との関連を解析した。

摘出した L4/5 脊髄から $8\mu\text{m}$ の凍結組織切片を作成し、マトリックスを均一にスプレー塗布することで、組織上の位置情報を失わずに生体分子とマトリックスを共結晶化させた。次に微小径のレーザーを二次元走査しながら生体分子をイオン化することで特定の測定点に存在する分子群の質量/電荷比 (m/z) を反映したマススペクトルを取得した。このマススペクトル上の特定のイオンピークを抽出し、 m/z から物質を同定、シグナル強度を計測し astrocyte 活性 (GFAP 免疫活性)、正常神経細胞数との相関の有無を評価した。

4. 研究成果

(1) 実験 1

① 神経学的評価

再灌流後 1 日目では、6 匹全てが Johnson score で 4 点以上であったが（うち 5 点が 4 匹）、再灌流後 3 日目では 5 点が 1 匹、4 点が 3 匹、3 点が 1 匹、2 点が 1 匹と脊髄障害の進行を認めた。また 3 日目以降もスコアの悪化が見られ、7 日目には全動物が 3 点以下となり、3

点が 3 匹、2 点が 2 匹、1 点が 1 匹となった。

② 組織学的検討

正常神経細胞数は再灌流後 1 日目と 3 日目では有意差を認めなかったが、1 日目と比べ 7 日目では有意な低下が見られた ($p < 0.01$)。

また 3 日目では個体によって神経細胞数にばらつきが見られたが、1 日目および 7 日目ではみられなかった。TUNEL 染色ではどのスライスにおいても明らかな神経細胞のアポトーシスを示す所見は認められなかった。

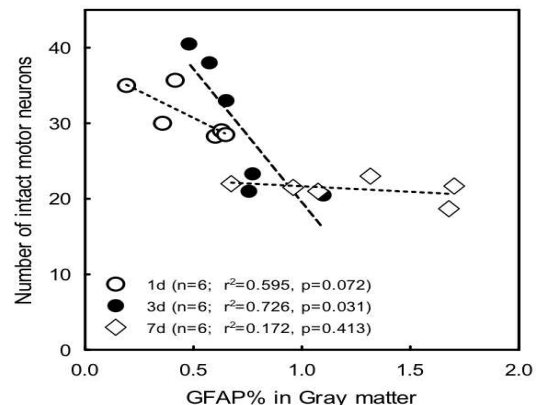
また、正常神経細胞数と Johnson score の間には有意な相関関係が認められた ($r^2 = 0.66$, $p < 0.01$)。

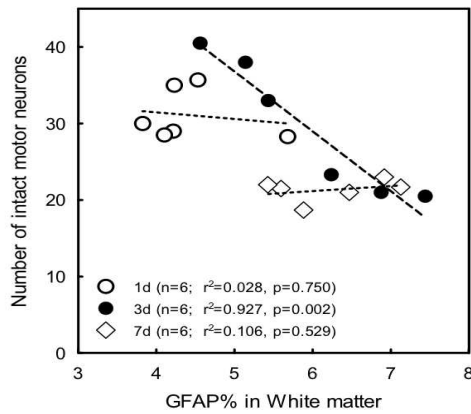
③ 免疫組織学的検討

GFAP の発現は灰白質、白質ともに 1 日目より 3 日目、3 日目より 7 日目で増大を認め、astrogliosis の進行を示した。

また、再灌流後 3 日目において、GFAP の発現量と正常神経細胞数の間に有意な負の相関関係が灰白質 ($r^2 = 0.73$, $p = 0.03$) および白質 ($r^2 = 0.93$, $p < 0.01$) の両方で認められた。一方で 1 日目あるいは 7 日目においては同様の相関関係は認められなかった。

これらの結果から、脊髄虚血再灌流後の遅発性脊髄障害の程度に活性化 astrocyte が細胞保護的あるいは細胞障害的に直接関与している、または神経細胞数、astrocyte 活性ともに初回の虚血の程度を独立に反映しているのみであるという 2 つの可能性が示唆された。





(2) 実験 2

作成した虚血再灌流後脊髄標本のマスマスペクトルから既に同定されている3種類の脂質に相当する m/z のピークが得られた。

m/z 798.5 に相当するホスファチジルコリン (PC)、m/z 804.5 に相当するアラキドン酸含有の PC、m/z 848.5 に相当するアラキドン酸含有の PC である。

① ホスファチジルコリン (PC; m/z 798.5)

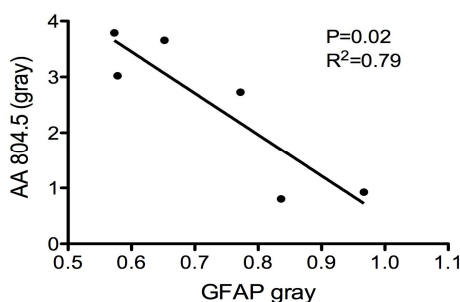
白質、灰白質とも m/z 798.5 のピーク値は1日目、3日目、7日目で差を認めなかった。また、GFAP の発現量、正常神経細胞数との間に相関を認めなかった。

② アラキドン酸含有 PC (m/z 804.5, m/z 848.5)

白質において m/z 848.5 のピーク値は1日目に比して3日目並びに7日目において有意な低下を認めた。灰白質の m/z 848.5 ならびに白質・灰白質の m/z 804.5 のピーク値は各時点の間に有意差を認めなかった。

m/z 848.5 のピーク値は再灌流後のいずれの時点においても GFAP 発現量と有意な相関を認めなかった。

m/z 804.5 のピーク値は、3日目の灰白質において GFAP 発現量と有意な負の相関を認めた ($r^2=0.79$, $p=0.02$)。一方3日目の白質並びに1日目・7日目では同様の相関は認めら



れなかった。

アラキドン酸代謝物は外傷性脊髄障害において最も早期に上昇する遊離脂肪酸であり、脊髄障害発症5分後には上昇し、発症6時間以後より減少するとされている。また astrocyte 活性化は虚血再灌流後数時間から始まり48時間~72時間でピークに達するとされる。

本研究では虚血再灌流後3日目においてのみ GFAP 発現量とアラキドン酸含有 PC の量に負の相関が見られた。一方正常神経細胞数も3日目においてのみ GFAP 発現量と負の相関がみられた。

すなわち GFAP 発現が多い個体では正常神経細胞は減少しアラキドン酸含有 PC も減少していることから、既に神経細胞障害が進行してしまった状態を示していると考えられた。一方 GFAP 発現が少ない個体では神経細胞数も多いがアラキドン酸ピークも増大しており、神経障害のごく早期の段階を観察していると考えられた。すなわち、初回虚血再灌流障害の程度は軽度であり GFAP 発現と細胞障害は軽度にとどまったが、別の機転により遅発性の細胞障害が進行しつつあることを示していると考えられた。一方で実験(1)においてアポトーシスの所見が認められないことから、この遅発性神経障害は何らかの細胞傷害因子による necrotic cell death が主体である可能性が高い。GFAP 発現量とアラキドン酸ピークは逆相関を示していることから、この時点において astrocyte が細胞障害的に作用している可能性は小さいと考えられた。

これまで脳および脊髄における GFAP 発現を検討した実験系においてその発現量を定量的に評価した報告はない。

本研究は脊髄虚血再灌流モデルにおける GFAP 発現量の簡易的で新しい半定量的測定法を提案した。

遅発性脊髄障害と astrocyte 活性化との関連を検討した報告は他になく、本研究の果たす役割は大きい。

遅発性脊髄障害における astrocyte 活性と脂質の動態を質量顕微鏡を用いて評価した報告は他にない。質量顕微鏡法は新しい実験手法であり、今後さらなる物質の同定がなされれば、神経障害の機序解明やその

予防医療の発展に大きく貢献することが期待される。

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1件)

① Wakasa S, Shiiya N, Tachibana T, Ooka T, Matsu i Y. A semiquantitative analysis of reactive astrogliosis demonstrates its correlation with the number of intact motor neurons after transient spinal cord ischemia. Journal of thoracic and cardiovascular surgery 137 983~990 2009. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若狭 哲 (WAKASA SATORU)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：10374365
(H20～H22)

椎谷 紀彦 (SHIYA NORIHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：00250449
(H20)

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし