

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592166

研究課題名(和文)慢性障害脊髄に対する薬物治療の検討 - 血液脊髄関門の通過性に注目して

研究課題名(英文)Pharmacological treatment for chronic spinal cord damage with special reference to blood-spinal barrier

研究代表者

加藤 真介(KATOH, Shinsuke)

徳島大学・大学病院・教授

研究者番号：30243687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者の圧迫性脊髄障害患者が増加しているが、手術時期を逃すと高度の麻痺を遺残する。高齢者では併存症が障害因子となることが多く薬物療法の開発が望まれる。本研究では慢性脊髄圧迫動物を作成し、血液脊髄関門の通過性に注目した薬物療法の効果を検討する事を目的とした。特に中枢神経系に対する薬物療法で問題となる、分子量の異なる薬剤の動態に着目した。慢性脊髄障害の発生にアポトーシスが関与していることが示され、血液脊髄関門の破綻も明らかとなった。ただ、安定した慢性脊髄障害動物の作成に失敗した為、投与薬剤の効果の運動学的な評価まで進むことができなかった。

研究成果の概要(英文)：Compression myelopathy is increasing as the aging of society increases. Complications sometimes make the aged patients unable to undertake decompression surgery. Therefore, development of novel pharmacological strategy for chronic spinal cord damage is needed. We planned to develop new chronically spinal cord compression animals which show stable neurological deficits. We showed apoptosis in the neuron and glial cells in chronically compressed spinal cord. Blood-spinal cord barrier was disrupted using horse raddish peroxidase injection study. However, we failed to develop the animals with stable neurological deficit animals. We failed to demonstrate the effect of drugs on neurological function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄障害 薬物療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 人口の高齢化が進むにつれ、正確な有病率の疫学統計はないが、高齢者の圧迫性脊髄障害患者が増加している。圧迫性脊髄症は適切な時期に除圧術が行われれば良好な回復が期待できる一方、それを逃すと高度の麻痺を遺残し、本人のみならず社会的にも大きな負担となる。高齢者では併存症の為に手術が遅れたり、不可能であることも少なくない。

比較的軽微な外傷により、明らかな脊椎損傷が認められない、いわゆる非骨傷性頸髄損傷が激増している。我々の統計によると高齢化率が12%程度であった20年前には人口100万人あたり約40人の新規脊髄損傷が発生し、その3/4が頸髄損傷であった。ところが現在、高齢率が27%である徳島県での脊髄損傷の年間発生数は人口100万人あたり120人で、特に70歳代では、人口100万人あたり300人を超える事態となっている。これらのうち頸髄損傷は9割以上を占めている。多くの場合は比較的軽症の麻痺ではあるが、高齢者であること、上肢機能が障害される中心性脊髄損傷が多いことから、麻痺の重症度以上にQOL障害が強く、要介護となる場合が多い。

非骨傷性脊髄損傷に対する除圧術の有効性は示されておらず、保存的に治療されることが多い。しかし、このような症例は受傷前から脊柱管狭窄状態であることから、脊髄障害のさらなる悪化の危険性にさらされている。

(2) 我々は急性脊髄損傷に対する薬物療法の開発にたずさわってきたが、神経機能の改善効果は動物実験でも限定的であり、臨床的に使用できる薬剤は未だにされていない。従って、慢性脊髄障害に対する薬物療法には現時点では根本的な治療効果は期待できないが、症状の進行を予防するなどの効果が期待できると考えた。中枢神経系には薬剤の到達を妨げる血液-脳・脊髄関門が存在する。急性脊髄損傷では広範な破綻がみられるが、慢性脊髄圧迫性障害でもある程度破綻していることが予測されるからである。

我々は脊髄損傷後の二次的障害の進行にアポトーシスが関与していることを1995年に報告したが、慢性期の脊髄障害において徐々に進行する脊髄障害においても、アポトーシスが関与している可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は日本人に多い圧迫性脊髄症に対する慢性期の薬物治療の可能性を探ることを目的とした。今回は、比較的障害の軽度な状態で脊髄-血液関門破綻が著明でないと考えられる慢性脊髄障害動物を作成し、オリゴデンドロサイト(OL)でのアポトーシス(Apo)発生の脊髄障害への関与を、ラットモデルを用いて検討することを最初の課題とした。

(2) さらに、これに対する薬物療法の可能性を、現時点で臨床応用可能な安全性の高い薬剤である erythropoietin (Epo)、minocycline (Mino)、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)などの薬剤を用い、後肢運動に対する効果を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 慢性脊髄圧迫動物の作成

当初は遺伝子改変動物が使用しやすいマウスを用いたが、軽症の脊髄麻痺の作成が困難であったため、ラットに変更した。ラットの胸椎を部分椎弓切除し、脊柱管内に挿入したバルーンカテーテル(血管内治療用マイクロカテーテルから作成)を約1週間かけて徐々に拡張し、脊髄障害動物を作成した。目標とする障害は、後肢運動機能の標準的評価方法であるBasso Beattie Bresnahan (BBB) スコアで21点満点中、15点程度とし、それに足りない場合はさらにバルーンを膨らませて対応した。

(2) 慢性圧迫モデルにおける Apo の検証

カテーテルの拡張終了1週間後に動物を屠殺し、脊髄を摘出した。Apoの発生を直接証明するDNA fragmentationはDNAゲル電気泳動でのDNAラダーの形成で確認した。さらにApoを起こしている細胞の同定には、同じくカテーテル拡張終了1週間後に、ホルマリンで全身還流固定を行い、パラフィン包埋し、薄切した隣接切片を用いた。各細胞種のマーカー(oligodendrocyte precursor cells (OPCs): NG2+, OLs: (APC+), neurons: NeuN+、astrocytes: GFAP+)とApo検出のためのTUNEL染色を行い、対応する細胞を検索した。さらに、小胞体ストレス応答タンパクのうち、Apoを促進させるGADD153 (CHOP)と抑制的に作用する小胞体シャペロンの一つであるGRP78の発現を免疫組織学的に組織学的に検討した。

(3) 薬物の脊髄内移行の検討

投与経路は脳脊髄液中投与と血管内投与の2経路とした。脳脊髄液中の投与は、horse radish peroxidase (HRP: 分子量43kD)と低分子量のランタニウム(La)を、硬膜外チューブを抜去しないままとバルーンを抜去したものの二種類の動物のくも膜下腔へ単回投与し、投与後24時間の時点で動物を屠殺し、全身環流固定の後、脊髄内への深達度を電顕で評価した。Laは電顕で直接観察し、HRPは還流固定後ピプラトームで薄切したのちDABで発色し、包埋し電顕で観察した。

血管内はHRPのみとし、HRPを投与後2時間で屠殺し、脊髄を摘出した。最圧迫部位、圧迫の頭側端、尾側側端に分けて浸漬固定を行った。ピプラトームで薄切したのちDABで発色し、光顕で観察した。

4. 研究成果

(1) 動物モデルの作成

軽度の脊髄障害動物の作成には成功した。しかし、その後肢運動機能は BBB スコアで 21 点満点中、7 - 17 点とばらつきが大きく、薬剤投与の効果運動学的に評価できるほどの安定した麻痺動物の作成に成功しなかった。組織学的には脊髄は著明に扁平化し、前角の運動神経細胞の脱落、白質の脱髄が認められた。

(2) 慢性圧迫モデルにおける Apo の検証

Apo の発生していることは、DNA の fragmentation が起こっていることから確認できた。組織学的には、脊髄損傷で認められる明らかな OPCs の出現は認められなかった。Apo は、遺残している脊髄前角の運動神経細胞のほか、アストロサイト、OLs のいずれも Apo が発生していた。後肢運動障害の重症度とある程度の相関が伺われたが、重症度が高くなると遺残している細胞数の減少傾向があるため統計学的には有意なものではなかった。

小胞体ストレスの発現は、glucose-regulated protein 78 (GRP78) と C/EBP homologous transcription factor protein (CHOP) に対する免疫染色を行い、陽性細胞数の出現比を検討した。アストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞では、GRP78 の陽性率が高い傾向を示したが、OLG 陽性細胞においては一定の傾向を示さなかった。

(3) 薬物の脊髄内移行の検討

脳脊髄液内投与

バルーンを留置したままの場合は、脳脊髄液中投与した La はバルーンで圧迫された部位の頭尾端近くの脊髄内への細胞外マトリックス移行は認められたが、圧迫のもっとも強い部位では脊髄内への移行は認められなかった。HRP ではバルーン圧迫の頭尾端近くでわずかな脊髄内侵入が観察されたのみであった。

バルーンを抜去すると、後肢運動機能は回復が認められた。その程度は、麻痺の重症度が軽いほど良好であった。脊髄内移行は、バルーンを抜去しないものよりは頭尾側端の侵入は La、HRP とともに良好となっていたが、圧迫の最も強い部位ではほとんど侵入が認められなかった。圧迫の強い部分ではくも膜と軟膜の癒着が強く、脳脊髄液の還流が再開されなかった事が理由と考えられた。

血管内投与

バルーンを留置したままの場合は、HRP の血管外への漏出は認められた。特に圧迫の強かった部位で、組織学的変化の強い部位が強い傾向にあった。バルーンを抜去すると、この傾向はさらに強かった。

(5) 研究成果のまとめ

今回の研究では臨床に近い形で再現性の高い

慢性脊髄圧迫動物の作成を目指したが、期待される結果は得られなかった。ある程度の点を越えると後肢運動が急速に悪化する傾向があった。圧迫が一定の状態を越えると脊髄内の血行動態に大きな変化が起こっていたと推測した。大きな変化が起こらない程度の圧迫であると、組織学的な変化はほとんど起こっておらず、実験の所期の目的を満たさない程度であった。また、圧迫期間がある程度を越えると、くも膜の癒着が生じ、くも膜下腔が閉塞していた。このため、脳脊髄液からの物質の脊髄内移行はわずかなものにとどまっていた。臨床の圧迫性脊髄症症例で脳脊髄液の状態を超音波エコーで観察すると、くも膜の癒着は発生していないが、起こっても局所にとどまっている。臨床の圧迫性脊髄症は、脊髄への圧迫という静的因子に加え、動的因子が発症に大きく関与している。また、圧迫も連続型後縦靭帯骨化症を除けば広範囲のものは少ないのに対し、今回使用したバルーンは頭尾方向 1 髄節程度の広がりを持っていた。従って、必ずしも臨床でみられる圧迫性脊髄症を反映したものにはなっていなかったと考える。

慢性圧迫性脊髄障害の発症機序に Apo が関与していることは示されたが、小胞体ストレスの関与についてははっきりとした結果が得られなかった。脊髄損傷のような劇的な変化が与えられた研究においても、明確な変化はとらえられているとは言えず、今後さらなる検討を行っていく。

血液脊髄関門の破綻は、血管内投与を行った HRP の血管外漏出が認められることから明らかであった。HRP は分子量の大きなタンパクであり、他の物質でも同様なことが考えられる。しかし、血管内での失活、多臓器への影響などを考えると、薬効を調査するには今後も血管内と脳脊髄液内という両系統の研究は進めるべきであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Katoh S, Enishi T, Sato N, Sairyo K. High incidence of acute traumatic spinal cord injury in a rural population in Japan in 2011 and 2012: An epidemiological study. *Spinal Cord* 2014; 52: 264-7

Chhabra H S, Harvey L A, Muldoon S, Chaudhary S, Arora M, Brown D, Biering-Sorensen F, Wyndaele JJ, Charlifue S, Horsewell J, Ducharme S, Green D, Simpson D, Glinsky J, Weerts E, Upadhyay N, Aito S, Wing P, Katoh S, Kovindha A, Krassioukov A, Weeks C, Srikumar V, Reeves R, Siriwardane C,

Hasnan N, Kalke YB, Lanig I.
www.elearnSCI.org - a global
educational initiative of ISCoS.
Spinal Cord 2013; 51 (3): 176-182

〔学会発表〕(計 1件)

Katoh, S, Enishi T, Sato N. High
incidence of cervical spinal cord
injury in a rural area in Japan in 2011:
An epidemiological study. 52nd Annual
Meeting, International Spinal Cord
Society, Haliq Congress Center,
Istanbul, Turkey Oct 28 - 30, 2013

〔図書〕(計 1件)

Katoh S, Hamada Y, Chikawa T.
Oxidative stress as secondary injury
mechanism. In: Neuroprotection and
regeneration of the spinal cord.
Uchida K, Nakamura M, Ozawa H, Katoh
S, Toyama Y(Eds). Springer Japan 2014,
pp 419 (213-226)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 真介 (KATOH, Shinsuke)
徳島大学・大学病院・教授
研究者番号: 30243687

(2) 研究分担者

東野 恒作 (HIGASHINO, Kosaku)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・助教
研究者番号: 80380129

江西 哲也 (ENISHI, Tetsuya)
徳島大学・大学病院・特任助教
研究者番号: 20467806