

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592058

研究課題名(和文) エリスロポエチンによる虚血障害脊髄組織の再生

研究課題名(英文) Erythropoietin attenuates the sequels of ischaemic spinal cord injury with enhanced recruitment of CD34+ cells in mice

研究代表者

平野 弘嗣 (HIRANO, KOJI)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエート

研究者番号：40378394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(EPO)が脊髄虚血障害を受けた脊髄組織の再生を促進するかどうかを検証した。マウス脊髄虚血モデルに対してEPO(5000 IU、投与群)及び生食(対照群)を投与し、術後7及び28日に後肢の運動機能、脊髄の組織所見を評価した。その結果、後肢の運動機能は術後28日で投与群は改善、対照群は悪化を認めた。脊髄の組織所見では投与群で術後7及び28日に運動神経損傷の抑制を、術後28日に運動神経再生を、また術後7日に微小血管再生を認めた。以上より、EPO投与にて脊髄虚血障害が軽減し、術後早期での微小血管新生を誘導、さらには遠隔期での運動神経再生を促進させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether erythropoietin (EPO) could ameliorate ischaemic spinal cord injury in mice. EPO (5000 IU/kg) was administered before aortic cross-clamping for 7 minutes to develop spinal cord ischaemia in mice. Neurological function was assessed using the paralysis score for 7 and 28 days after the operation (POD). Spinal cords were histologically evaluated with immunohistochemistry to detect CD31, CD34, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and NeuN. Treated mice demonstrated significant improvement of neurological function at POD 28. Motor neurons in treated mice were more preserved at POD 7 and 28. Although expressions of BDNF and VEGF, also CD31+CD34 cells in treated mice were significantly increased at POD 7, NeuN+CD34 cells was significantly increased at POD 28. We conclude that EPO could induce micro-angiogenesis and promote motor nerve regeneration to preserve ischaemic spinal cord injury.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：脊髄虚血 エリスロポエチン 血管再生 神経再生

1. 研究開始当初の背景

脊髄虚血による対麻痺は胸部下行大動脈瘤や胸腹部大動脈瘤術後の深刻な合併症の一つである。近年の手術手技の改良や脊髄虚血予防のための補助手段の使用によりその発生率は 2.6%-13.2%と低く抑えられているものの(Wong et al. *J Am Coll Surg* 2011, Conrad et al. *Ann Thorac Surg* 2007)、発生すれば術後の生命予後や QOL の著しい低下を招く重大な合併症であることには変わりはない(Wong et al. *Ann Thorac Surg* 2007)。近年ステントグラフト治療(TEVER)の良好な成績が報告されているが (Bavaria et al. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007)、胸腹部大動脈瘤については解剖学的に適応が限られており、標準的な治療とはいえない。したがって胸部下行大動脈瘤や胸腹部大動脈瘤の術後の対麻痺は依然未解決な問題で、新しい予防法、治療法が必要である。エリスロポエチン(EPO)は赤血球の造血に働くホルモンであるが、近年そのレセプターが骨髄造血系のみならず、脊髄を含めた中枢神経系や心筋、血管内皮など様々な身体の組織にて発現が認められており、EPO がそれらの組織における虚血再灌流障害を抑制する働きがあることが報告されている(Maiese et al. *JAMA* 2005, Goldman et al. *Nat Med* 2002)。さらに注目すべきは、EPO は虚血や炎症、外傷などの組織損傷部位において、骨髄幹細胞を呼び込み組織再生にも関わっていることが分かっている (Klopsch et al. *J Cell Mol Med* 2009, Shingo et al. *J Neurosci* 2001)。実際脊髄虚血障害の動物モデルにおいて、EPO はその発生を抑制することが報告されている (Simon et al. *Crit Care Med* 2008, Smith et al. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011, Sönmez et al. *Surg Neurol* 2007)。しかしそのほとんどは術後短期間、長くて 48 時間後までの効果しか観察しておらず、主に EPO の抗アポトーシス作用を解析しているのみである。しかし脊髄虚血障害時の運動神経のアポトーシスは 48 時間以降も持続的に発生していることが報告されており (Stevens et al. *Crit Care Med* 2008)、この観察期間では不十分である。実際の臨床においても術後 2 日目以降にも遅発性の対麻痺の発生が問題となっており (Wong et al. *Ann Thorac Surg* 2007)、より長期の効果判定が必要である。この点に着目し、われわれは過去にマウスの脊髄虚血モデルを用いて、EPO の脊髄虚血障害抑制効果をより長期にわたり観察したところ、EPO は対麻痺を発生したマウスの下肢の運動機能を術後 2 日目以降に改善させ、7 日目において脊髄の運動細胞数の減少は生理食塩水を投与したコントロールのマウスに比べ、有意に抑制されていた。さらに虚血障害を受けた脊髄において、EPO 投与群では CD34 陽性細胞の集積と、brain-derived neurotrophic factor(BDNF)と vascular endothelial growth factor(VEGF)の発現が促進されていた。すなわち、われわれの研究において EPO は脊髄虚

血発生の抑制よりも虚血障害発生後の骨髄幹細胞の動員を介した組織の修復、再生により関与していることが判明した。

この研究では当初、脊髄虚血障害発生の抑制を目的としており虚血前の EPO 投与しか行っていないため、EPO の骨髄幹細胞の動員を介した組織の修復、再生の効果をより増幅させるためには、虚血後の継続した EPO の投与が必要と考えられ、また運動神経と微小血管の再生を確認するためには、術後 28 日以降のさらに長期の経過観察が必要と考えられた。

物理的な脊髄損傷に対する幹細胞移植や遺伝子治療を用いた再生医療は現在臨床応用も行われており、数多くの方法が考案されているが、脊髄虚血損傷に対する再生医療はほとんど行われていない。さらに薬剤を用いた脊髄虚血障害後の組織再生の研究は今までなく、今回 EPO を用いた脊髄虚血障害後の組織再生は初めての試みである。近年高齢化や動脈硬化性疾患の増加に伴い、大動脈瘤の手術症例は増加しており、大動脈瘤手術の重篤な合併症である脊髄虚血に起因した対麻痺も増加することが予想される。現在この合併症を予防するため様々な手術手技や補助手段が行われているが、依然 5-10%程度の発生率が報告されている。この重篤な障害を少しでも緩和するため、再生医療の概念を用いた本研究は術後の患者の QOL や手術成績の改善に大きく寄与すると考えられた。

2. 研究の目的

マウスの脊髄虚血モデルを使用し、最長術後 56 日目まで運動機能と組織学的所見を追跡する。特に組織学的所見については、運動神経細胞と微小血管の再生の有無に着目し、EPO が脊髄虚血障害部位において組織再生を促進したことを証明する。またそのメカニズムを解析するため、骨髄由来の CD34 陽性細胞が虚血障害を受けた脊髄に集積し、さらにそれらの細胞が神経や血管の再生に関与しているかを観察する。

3. 研究の方法

① マウス脊髄虚血モデルの作成

Adult male C57BL/6 mice(8-12 weeks old; 22-27g)を使用。Ketamin/Xylazin(75/25 mg/kg)で麻酔を施し気管内挿管、300 μ L/stroke、130 strokes/min の設定で人工呼吸を開始する。手術中は 37°C のヒーティングテーブルにて体温低下を避ける。右大腿動脈より 24G カニューラを挿入し血圧をモニターする。仰臥位で左第二肋間を切開し、下行大動脈を露出する。30 分前に heparin(400 IU/kg)を投与しておき、左鎖骨下動脈分岐後すぐの下行大動脈を脳外科用血管クリップにて遮断する。7 分後に遮断を解除する(7 分間の下行大動脈の遮断にて約 80%のマウスが対麻痺を発症することを予備実験で

確認した)。血圧を安定させるため 30 分経過観察し、閉胸する。対麻痺による水分摂取不良の恐れがあるため、術後 1 週間は生理食塩水 1.5 mL を毎日皮下投与する。

- ② 実験グループの設定
投与群は虚血前 30 分と術後 7 日まで 5000 IU の recombinant human EPO を連日経静脈投与する。対照群は同容積の生理食塩水を同じタイミングで経静脈投与する。両群を術後 28 日間にわたり観察し、生存率、後肢の運動機能、脊髄の組織所見を比較する。
- ③ 後肢の運動機能評価
過去の報告に準じ、以下のように評価する(Lang-Lazdunski et al. *Stroke*. 2000)。
(a) walking with hind limbs: 0, normal; 1, toes flat under body when walking but ataxia is present; 2, knuckle-walking; 3, movement in hind limbs but unable to walk; and 4, no movement, drags hind limbs; (b) placing/stepping reflex: 0, normal; 1, weak; and 2, no stepping. Each grade was obtained by adding the scores of (a) and (b); a grade of 0 was considered normal and 6 was considered complete paralysis. Both hind limbs were assessed separately and a final grade was expressed as an average.
- ④ 組織学的な脊髄障害の比較
組織評価は術後 7 日及び 28 日に行う。マウスを over dose of Ketamine/Xylazine (150/50 mg/kg) で安楽死させた後、胸部腰部脊髄を椎体とともに *en bloc* に取り出し、一晚 4%ホルマリンに浸漬する。2 週間 EDTA decalcification solution (pH7.4) 中に保存後、パラフィンに包埋する。4 μ m 切片を作成し、Hematoxylin/Eosin(HE)染色を行う。全体的な脊髄組織所見を観察した後、脊髄損傷の定量化のため、1 個体あたり Th6 から L5 レベルまでの脊髄より 12 枚の切片を取り出し、脊髄前角に含まれる正常な形態を持った運動神経細胞の数をカウントする。両群間で time point ごとに平均の運動細胞神経数を比較する。
- ⑤ 免疫染色による評価
術後 7 日目の切片において、goat polyclonal anti-CD34 antibody(1:20 dilution, Santa Cruz)を用いて免疫染色を行い CD34 陽性細胞の集積度を検討する。また rabbit polyclonal anti-BDNF antibody(1:50 dilution, Santa Cruz) と rabbit polyclonal anti-VEGF antibody(1:50 dilution, Santa Cruz)を用いて同じように免疫染色を行い BDNF と VEGF の発現

の度合いを検討する。

- ⑥ 血管再生の評価
術後 28 日の組織切片にて polyclonal goat anti-CD31 primary antibody(Santa Cruz)と donkey anti-goat Alexa-Fluor 568 conjugated secondary antibody(Invitrogen)を用いて血管内皮細胞を染色後、血管数をカウントしてその密度を両群間で比較する。また CD34 との二重染色を行い骨髄由来の CD34 陽性細胞が関わっているか評価する。
- ⑦ 運動神経再生の評価
術後 28 日の組織切片にて NeuN(Chemicon International)に対する抗体を用いて免疫染色を行い、神経再生の有無を評価する。また CD34 との二重染色を行い骨髄由来の CD34 陽性細胞が関わっているか評価する。

4. 研究成果

術後 28 日における生存率に群間有意差を認めなかった。後肢の運動機能は術後 7 日に両群とも同等に最低となり(有意差なし)、術後 28 日で投与群は改善、対照群は悪化し有意差を認めた。術後 7 日及び 28 日における正常運動神経細胞数はいずれも投与群で有意に多かった。また、BDNF 及び VEGF 発現、CD31+CD34 陽性細胞数は術後 7 日において投与群が有意に高値であったが、術後 28 日では群間有意差を認めなかった。また、NeuN+CD34 陽性細胞数は術後 7 日では群間有意差を認めなかったが、術後 28 日では投与群が有意に高値であった。EPO 投与にて脊髄虚血障害が軽減し、術後早期での微小血管新生を誘導、さらには遠隔期での運動神経再生を促進させることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野弘嗣 (HIRANO KOJI)
三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエ
ート
研究者番号：40378394

(2) 研究分担者

新保秀人 (SHIMPO HIDETO)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70179076

(3) 連携研究者

島本 亮 (SHIMAMOTO AKIRA)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90324524

真栄城 亮 (MAESHIRO RYO)
三重大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90647124

松尾映里 (MATSUO ERI)
三重大学・医学系研究科・特定事業技術補佐
員
研究者番号：40751665