

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592303

研究課題名(和文) ビタミンE誘導体ETS-GSを用いた脊髄損傷に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapeutic Strategy for Spinal Cord Injury by New Vitamin E derivative, ETS-GS

研究代表者

内納 智子(Uchino, Tomoko)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：90404368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が新規に合成したビタミンEにタウリンとグルタチオンを結合させたETS-GSというビタミンE誘導体が脊髄損傷の二次的損傷を軽減し、神経学的機能の改善に有効であるのではないかと仮定し、ラットの脊髄損傷モデルを用いて検証を行った。ETS-GS投与により術後3日目より有意な運動機能の改善が認められ、抽出した脊髄から抽出したタンパクを分析したところ、myeloperoxidase、malondialdehyde、caspase-3は減少していた。組織学的にも損傷部位の縮小、アポトーシス細胞減少が認められた。ETS-GSは抗炎症、抗酸化、抗アポトーシス作用により神経保護作用を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether ETS-GS, a novel antioxidant that is a conjugate compound of glutathione, taurine, and vitamin E can treat disabilities caused by spinal cord injury and to determine the mechanism using rat models. After introducing a contusion injury at Th11 level into rats, they were separated into 3-day ETS-GS and saline dose groups. After day 3, the spinal cords were extracted for biochemical and histological analysis. A significant improvement in the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) score was confirmed following ETS-GS dose. In addition, an ETS-GS-mediated reduction in myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), caspase-3 was observed along with a decrease in apoptotic cells as assessed by TUNEL staining. In conclusion, we observed that ETS-GS can treat disabilities caused by spinal cord injury, through suppressing inflammation, lipid peroxidation and inhibiting nerve cell apoptosis.

研究分野：敗血症・炎症性疾患

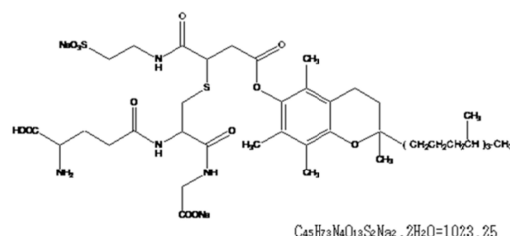
キーワード：ビタミンE 脊髄損傷 ETS-GS

## 1. 研究開始当初の背景

日本では脊髄損傷患者は10万人以上おり、さらに毎年100万人あたり約40人の新規患者が発生していると報告されている。脊髄損傷の病態は受傷からの時間によって急性期の一次的損傷、それに引き続いて起こる二次的損傷と慢性期に分けられる。一次的損傷は受傷直後から最初の2、3日に生じる神経の機械的損傷によるものであり、二次的損傷は虚血、浮腫、グルタミン酸の放出、炎症、脂質過酸化などによって生じ、脊髄損傷の進展に深く関与している。臨床的に介入が可能とされるのは二次的損傷であり、1990年代に受傷早期のメチルプレドニゾロン大量療法の有効性がNational Acute Spinal Cord Injury Studies (NASCIS)により示されて以降、今日まで治療の第一選択として行われてきた。しかしながら最近の研究ではメチルプレドニゾロン大量療法が予後には影響せず、合併症を増加させる傾向があるとの報告が多くみられるようになった。今後再生医療などにより脊髄損傷による障害は軽減されていくかもしれないが、実用化されるまでの間、メチルプレドニゾロンに代わる治療法の開発は急務であると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々はビタミンEにタウリンとグルタチオンを結合させたETS-GSという新規ビタミンE誘導体を合成し(図1)、強力な抗酸化、抗炎症作用を示すことを報告してきた。今回我々はETS-GSが脊髄損傷の二次的損傷を軽減し、神経学的機能の改善に有効ではないかと仮定し、ラットの脊髄損傷モデルを用いて検証を行った。



r-L-Glutamyl-S-[2-[[[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl]oxy]carbonyl]-3-oxo-3-[(2-sulfoethyl)amino]propyl]-L-cysteinylglycine sodium salt

図1. ETS-GSの化学構造式

## 3. 研究の方法

### (1) ラット脊髄損傷モデル

9~11週齢のSprague-Dawleyラットに全身麻酔下でTh10~12の椎弓切除術を施行し、Th11レベルに10gの錘を25mmの高さから垂直に落下させて脊髄損傷モデルを作成した。術後3日間ETS-GSを10mg/kg筋肉内投与する群(ETS-GS群)、生理食塩水を筋肉内投与する群(SCI群)、椎弓切除のみを施行した群(Sham群)とし以下の項目について比較検討した。

### (2) 運動機能の評価

Basso, Beattie and Bresnahan (BBB)スコアにより運動機能の評価を1日1回、3日間行った。

### (3) 生化学的検討

術後3日目にラットを犠死させ損傷部位を中心に脊髄を摘出、タンパクを抽出してmyeloperoxidase (MPO)、malondialdehyde (MDA)を測定した。さらにウエスタンブロット法によりcaspase-3の発現を調べた。

### (4) 組織学的検討

術後3日目に犠死させたラットから脊髄組織を摘出してホルマリン固定し、Hematoxylin-Eosin(HE)染色、TdT-mediated dUTP nick end labeling

(TUNEL)法によるアポトーシス検出を行った。

(5) 細胞内シグナルの同定

術後 1 日目に犠死させたラットから脊髄組織を摘出、抽出したタンパクから Bio-Plex™ を用いて種々のタンパクキナーゼの変化を検討した。

(6) 統計学的検討

それぞれの実験の結果は one-way ANOVA もしくは Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks を用いて群間比較を行った。Apoptosis index の比較には Chi-square test を用いた。いずれも  $p < 0.05$  を有意とした。

4. 研究成果

(1) 運動機能の回復

BBB スコアを用いて評価した結果、表 1 のように術後 3 日目で ETS-GS 群において有意な運動機能の改善が認められた。

|        | 術当日  | 術後 1 日    | 術後 3 日      |
|--------|------|-----------|-------------|
| Sham   | 21.0 | 21.0      | 21.0        |
| SCI    | 0.0  | 0.2 ± 0.1 | 0.6 ± 0.2   |
| ETS-GS | 0.0  | 1.4 ± 0.9 | 4.5 ± 1.4 * |

表 1 BBB スコア

(2) MPO

好中球の浸潤を示す MPO は SCI 群で Sham 群と比較して有意に上昇していたが ETS-GS 群で有意にその上昇が抑えられた (図 2)。

(3) MDA

脂質の過酸化を示す MDA も MPO と同様に Sham 群と比較して SCI 群で有意な上昇が認められたが ETS-GS 群で有意な抑制が認められた。

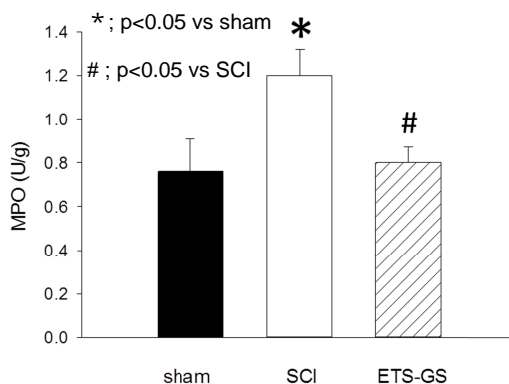


図 2 MPO の発現

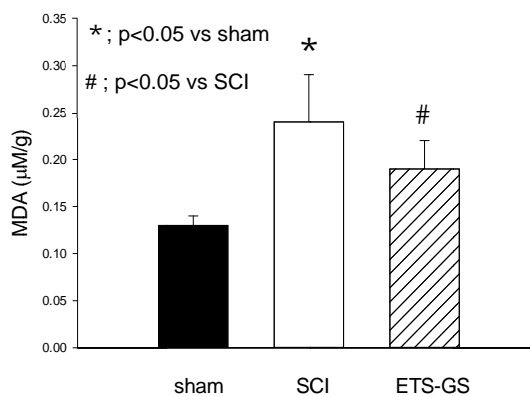


図 3 MDA の発現

(4) Caspase-3 の発現

アポトーシスの実行に関わる caspase-3 の発現は sham 群と比較して SCI 群で有意な増加が認められたが、ETS-GS 群で有意に増加抑制が認められた ( $p = 0.002$ )。

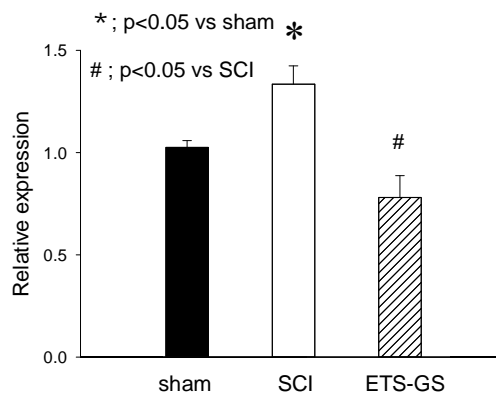


図 4 Caspase-3 の発現

(5) 組織学的変化

術後 3 日目の損傷部脊髄組織の HE 染色像を示す。図 5 に示す通り SCI 群では脊髄背側の著しい損傷が認められるが、ETS-GS 投与により損傷が軽減された。

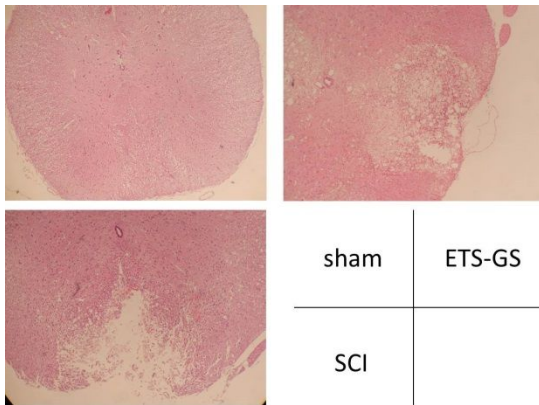


図 5 脊髄損傷部組織像 (HE 染色)

TUNEL 染色像を図 6 に示す。

茶色に染色された核を持つアポトーシス細胞 (黄色矢印) は SCI で有意に増加、ETS-GS 投与によりその増加は有意に抑制された。

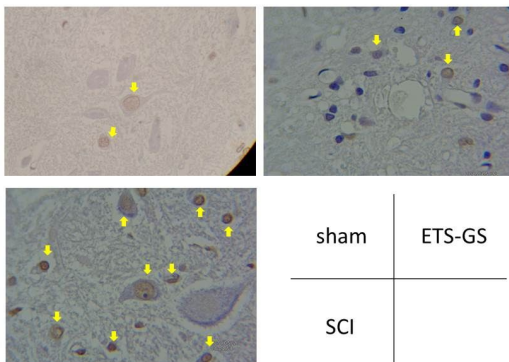


図 6 TUNEL 染色像

各標本の任意の 5 視野におけるアポトーシス細胞の割合を示す apoptosis index は SCI 群で有意に増加、ETS-GS 群で有意な増加抑制が認められた ( $P < 0.001$ )。

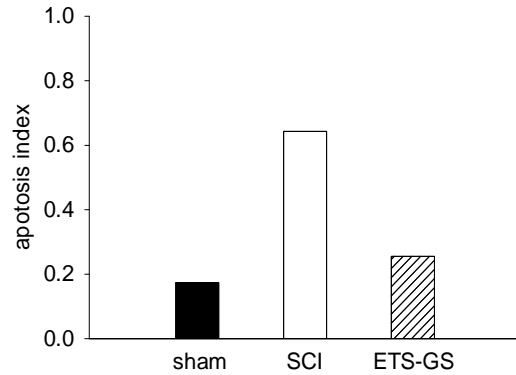


図 7 apoptosis index

(6) 細胞内シグナルの変化

脊髄損傷で変化をきたすと報告されているいくつかの細胞内シグナルを Bio-Plex™ を用いて検索したところ、Akt、mTOR において ETS-GS 投与による有意な変化が認められた (図 8)。

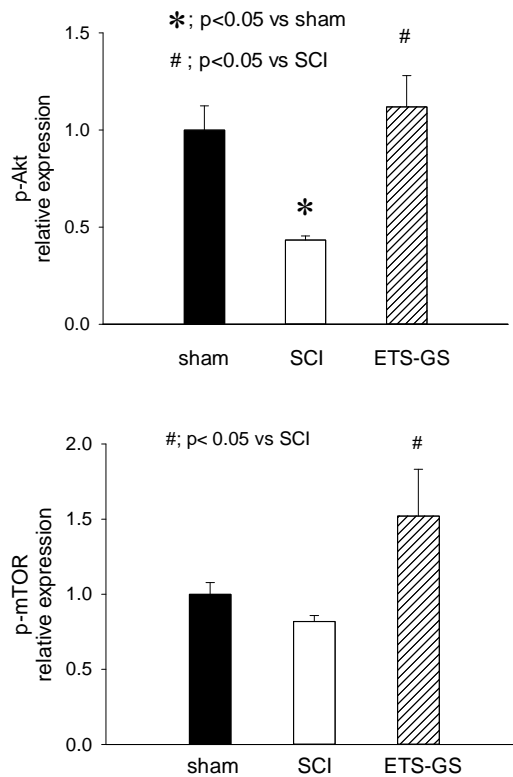


図 8 細胞内シグナルの変化

以上の結果より新規ビタミンE誘導体である ETS-GS は脊髄損傷による障害を抗炎症、抗酸化、抗アポトーシス効果により軽減することが示された。細胞内シグナルのうち Akt、mTOR に有意な変化が認められたことからその保護効果にオートファジーも関与している可能性も示唆された。

#### <引用文献>

- Shingu H et al. A nationwide epidemiological survey of spinal cord injuries in Japan from January 1990 to December 1992. *Paraplegia* (1995) 33, 183-188.
- Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in Physiology Education* (2002) 26, 238-255.
- Hall Ed. Antioxidant therapies for acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics* (2011) 8, 152-167.
- Bracken MB et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* (1997) 277, 1597-1604.
- Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Systematic Review* (2012) 1, CD001046.
- Koga H et al. The new vitamin E derivative, ETS-GS, protects against cecal ligation and puncture-induced

systemic inflammation in rats. *Inflammation* (2012) 35, 545-553.

Koga H et al. Vitamin E derivative ETS-GS reduces liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Surgical Research* (2012) 175, 118-122.

#### 5. 主な発表論文など

- [学会発表] (計2件)
- 内納智子 新規ビタミンE誘導体 ETS-GS のラット脊髄損傷モデルに対する保護効果の検討。日本麻酔科学会第60回学術集会、2013年5月24日、ホテルさっぽろ芸文館(北海道札幌市)
- Kida K、Uchino T et al. Protective Effect of New Vitamin E Derivative ETS-GS in Rat Spinal Cord Injury Models. 2012年6月10日 Euroanaesthesia 2012, Paris, France

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
内納 智子 (Tomoko Uchino)  
大分大学・医学部・医員  
研究者番号：90404368
- (2) 研究分担者  
萩原 聡 (Satoshi Hagiwara)  
大分大学・医学部・講師  
研究者番号：50527661  
(平成25年度より研究分担者から研究協力者に変更)
- 小山 淑正 (Yoshimasa Oyama)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：40468012

(平成 25 年度より研究分担者に追加)