

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462297

研究課題名(和文)急性脊髄損傷におけるStem Cell Factorの神経組織保護作用機序

研究課題名(英文)The effects of Stem cell factor on neural cells apoptosis after acute spinal cord injury.

研究代表者

米 和徳 (Yone, Kazunori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：40182844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では、急性脊髄損傷におけるSCFの神経保護作用(アポトーシス抑制)の機序を明らかにする目的である。脊髄損傷後にSCFを投与し、SCFの神経保護作用に及ぼす影響を検証した。ラットの胸髄部に重錘を用いて損傷を加え、急性脊髄損傷モデルを作成し3群に分け、組織学的観察、免疫組織学的観察を行った。SCF投与群は、コントロール群と比較し損傷範囲が小さく、Nissle染色で定量した結果、損傷上10mmでは灰白質での前角細胞数が多かった。また、タンパク定量の結果、SCF投与群は、Bcl-2の発現がコントロール群と比較し多かった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the mechanism of preventive effect of Stem cell factor (SCF) on neural cells apoptosis after acute spinal cord injury. Forty Wister male rats were randomly divided four groups as follows, sham group, SCF group, control group and HA+SCF group. After anesthesia, the spinal cord was injured by applying 120g extradural static weight-compression for two minutes using a cylindrical compressor to make permanent complete spinal cord injury. The drugs were administered by intraperitoneal injection fifteen minutes after surgery. The spinal cord were taken at twenty four and seventy two hours after surgery. The tissues were stained for Hematoxylin and Eosin, Nissle, and Luxol fast blue for histological observation after spinal cord injury. In control group, large hematomas in the dorsal horn were formed and the number of nuclei was decreased. But hematomas formation and the number of nuclei were less apparent in SCF group.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 Stem Cell factor 二次損傷

1. 研究開始当初の背景

中枢神経は再生能力が乏しく、外傷や疾患などにより一度損傷を受けると、運動機能や感覚機能の脱落症状といった生涯にわたる重篤な後遺症を残す。とりわけ、脊髄損傷は損傷レベルによっては四肢麻痺を呈し、患者や家族に与える肉体的・精神的苦痛は大きく、その社会的損失も大きい。

急性期脊髄損傷の病態生理は、直接的外力によって生じる脊髄細胞の挫滅、中枢・末梢を連絡する無数の軸索や微小血管の破綻（1次損傷）と、それに引き続き生じる生化学的、病理学的変化（2次損傷）により病変は拡大するという2段階障害説により説明されている。

2. 研究の目的

2次損傷は、直接的な脊髄の挫滅により生じる1次損傷と違い、適切なアプローチにより病変の拡大を抑えることが可能であり、2次損傷に対する治療法は、脊髄損傷治療のカギを握っている。

脊髄損傷の治療法として唯一臨床使用されている薬剤は、メチルプレドニゾロンであり、本邦でも1997年より急性脊髄損傷治療薬として使用されている。しかし、呼吸器、消化器系への副作用から、その効果を疑問視する声もあり、メチルプレドニゾロンに代わる新たな治療法への期待が高まっている。最近、造血系細胞の増殖因子として知られ、造血系細胞の分化・増殖に重要な役割を果たすStem Cell Factor(SCF)に、脊髄損傷後、脊髄細胞のアポトーシスを抑制する作用があることが報告された。脊髄損傷後、脊髄細胞のアポトーシスを抑制することは、2次損傷による組織破壊の進行を防止することになり、引いては麻痺域拡大防止、ADL向上にもつながるため、その効果機序を解明することは極めて重要である。しかしながら、脊髄損傷後、SCF投与による脊髄細胞のアポトーシス抑制機序は未だ不明である。

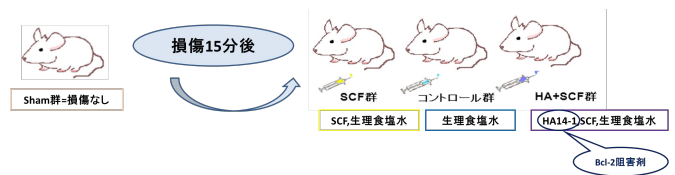
先行研究では、様々なモデルにおいてSCF投与による効果が示されている。ラット脳梗塞モデル、マウス心筋梗塞モデルではSCF投与により梗塞巣を縮小し、予後を改善した。また、ラット脳皮質ニューロン、マウス血管平滑筋細胞、マウス肝細胞ではアポトーシス刺激に対し、SCFはBcl-2を介しアポトーシスを抑制した。

以上のことから、脊髄損傷の新たな治療薬として期待されるSCFに関し、急性期脊髄損傷後の脊髄細胞のアポトーシス抑制機序を明らかにすることを目的にSCFを投与したSCF群と生理食塩水を投与したコントロール群、Bcl-2阻害剤であるHA14-1とSCF

を同時投与した群で比較検討を行った。

3. 研究の方法

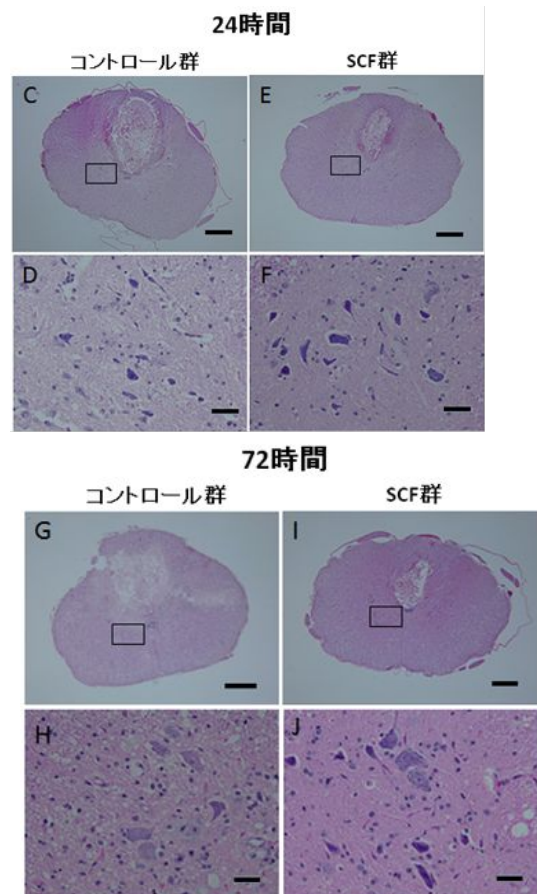
実験動物は、雌Wistar系ラットを40匹(14週齢、体重200~230g、日本エスエルシー株式会社、静岡)を使用した。これらのラットを無作為にsham群(n=3匹)、SCFを投与したSCF群(n=16匹)、生理食塩水を投与したコントロール群(n=16匹)、SCFとBcl-2阻害剤であるHA14-1投与したHA+SCF群(n=5匹)に分け、脊髄に圧迫損傷を加えた後24時間と72時間で屠殺し、標本を作製した。

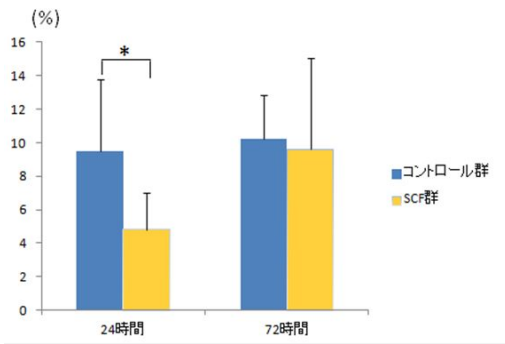


4. 研究成果

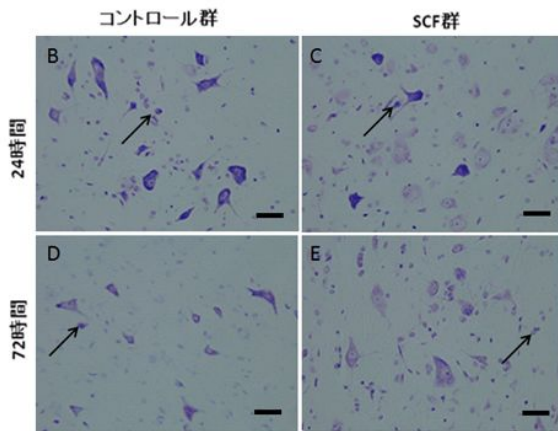
H.E染色の写真を下に示す。脊髄損傷後、脊髄横断面には後索に大きな血腫、出血、炎症性細胞浸潤が確認された。その程度は、いずれもSCF群がコントロール群に比較し軽度であった。

また、脊髄横断面に対する血腫の割合を定量した結果を下に示す。損傷24時間後、血腫の割合はSCF投与群において有意に小さく、損傷72時間後には差は無かった。

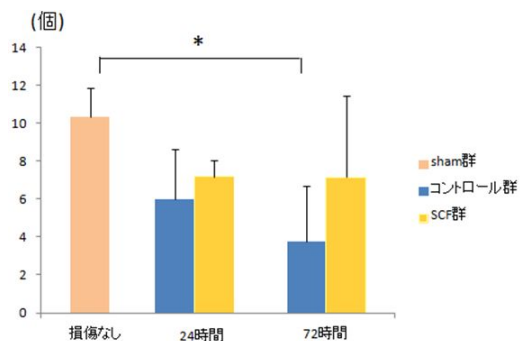




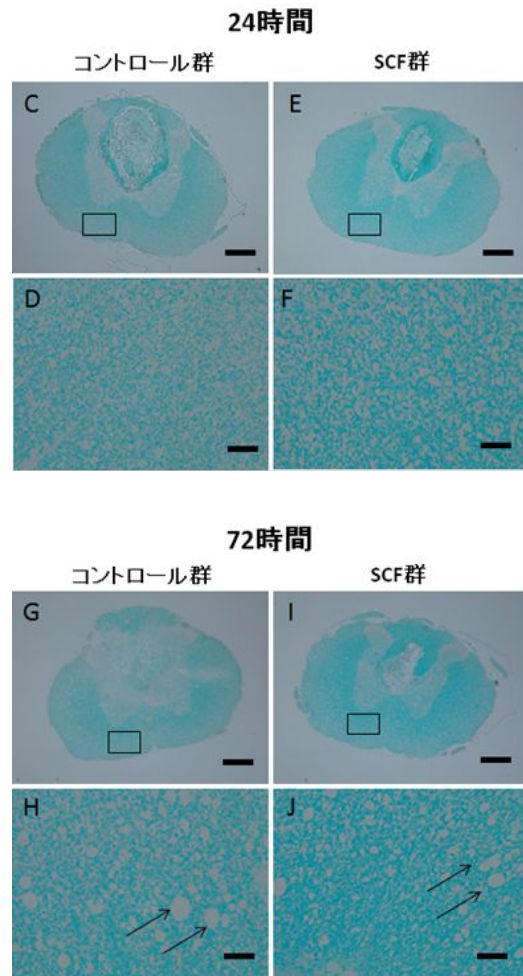
Nissl 染色の写真を示す。脊髄損傷後、染色細胞の凝縮・縮小、染色性の低下が観察された。損傷 24 時間後に比較し、72 時間後にはその傾向がより強くなった。その程度は、いずれも SCF 群がコントロール群に比較し軽度であった。



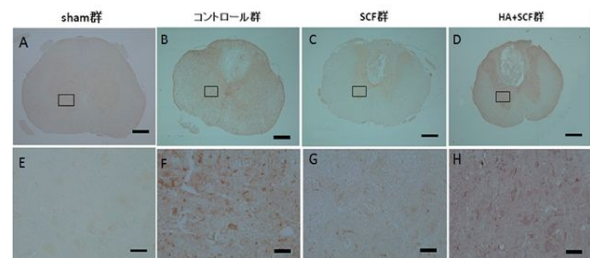
また、右脊髄前角にある染色細胞数の定量結果を下に示す。損傷 72 時間後、sham 群に比較し、コントロール群の神経細胞数が有意に低下したが、SCF 群と比較し有意差は無かった。コントロール群と SCF 群との比較では、SCF 群が多い傾向にあった($p=0.09$)。



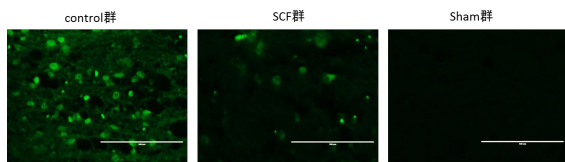
LFB 染色の写真を示す。脊髄損傷後、白質の染色性は低下し、部分的に空胞変性が確認された。損傷 24 時間後に比較し、72 時間後にはその傾向がより強くなった。その程度は、いずれも SCF 群がコントロール群に比較し軽度であった。



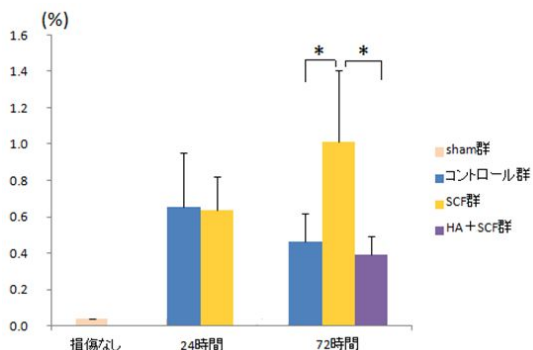
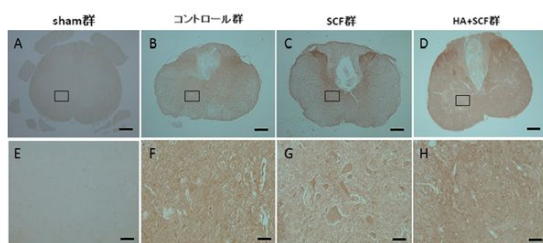
灰白質における抗 caspase3 染色写真を示す。損傷 24 時間後、SCF 群とコントロール群との間に有意差は無かったが、損傷 72 時間後、SCF 群とコントロール群、Bcl-2 阻害剤である HA14-1 と SCF の同時投与 (HA+SCF) 群では、ともに SCF 群の caspase3 発現率が有意に低かった。また、コントロール群と HA+SCF 群との間に有意差は無かった。



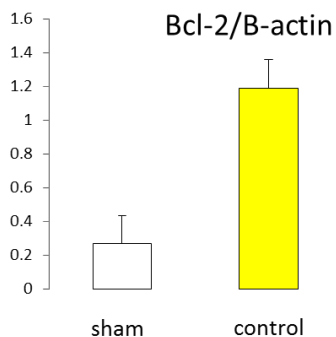
また、72 時間後の灰白質における抗 cleaved-caspase3 染色写真を示す。



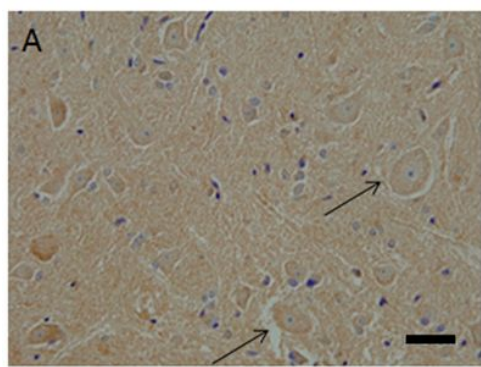
灰白質における抗 Bcl-2 染色写真を示す。損傷 24 時間後、SCF 群とコントロール群との間に有意差は無かったが、損傷 72 時間後、SCF 群とコントロール群、HA+SCF 群では、ともに SCF 群の Bcl-2 発現率が有意に高かった。また、コントロール群と HA+SCF 群との間に有意差は無かった。



損傷 72 時間後の損傷部脊髄における Bcl-2 のタンパク質発現量を測定した。Bcl-2 は、26kD のタンパク質であり、コントロール群、SCF 群ともに同部位にバンドが検出された。



灰白質における抗 Bcl-2 染色と Nissl 染色の二重染色写真では、矢印 () は二重染色された細胞を指している。神経細胞の細胞質は抗 Bcl-2 染色陽性(茶色)を示し、神経細胞の核は Nissl 染色陽性(青紫色)を示している。(Bar: 30 μm)



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)

[学会発表](計1件)

甲斐 千尋, 松田 史代, 米 和徳: 急性期脊髄損傷後の stem cell factor 投与によるアポトーシス抑制機序. 日本整形外科学会, 2014 年 10 月 9 日 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米 和徳 (Kazunori Yone)
鹿児島大学・歯学域医学系・教授
研究者番号: 40182844

(2) 研究分担者

榎間 春利 (Harutoshi Sakakima)
鹿児島大学・歯学域医学系・教授
研究者番号: 10325780

松田 史代 (Fumiyo Matsuda)
鹿児島大学・歯学域医学系・助教

研究者番号：70437953