

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462437

研究課題名(和文)ニューログロビンを中心とした虚血応答システム活性化による脊髄保護に関する研究

研究課題名(英文)Spinal cord protection by the activation of neuroglobin

研究代表者

松本 美志也 (MATSUMOTO, Mishiya)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60243664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胸腹部大動脈手術の重篤な合併症の一つである対麻痺は大動脈遮断中の脊髄虚血が主な原因と考えられている。多くの薬物による脊髄保護効果が動物実験で報告されているが、脊髄虚血から脊髄を保護する臨床応用可能な方法は未だに確立されていない。近年、内因性の保護機構活性化による中枢神経保護が注目されている。本研究では、内因性の保護機構活性化による脊髄保護の一つと考えられるニューログロビンの活性化による脊髄保護について検討した。臨床応用可能と考えられるバルプロ酸によるニューログロビンの活性化による脊髄保護を検討したが、脊髄保護効果はほとんど認められないと思われる。

研究成果の概要(英文)：One of the devastating complications after thoracoabdominal aortic surgery is paraplegia. Paraplegia is thought to be a result of spinal cord ischemia during aortic occlusion. To protect against ischemic spinal cord injury, many drugs have been tested in animal experiments. However, no drugs have been established as being protective in the clinical setting. In this study, we examined neuroprotective effects of the activation of neuroglobin on the neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia in rabbits. Our results suggest that valproic acid that is thought to activate neuroglobin does not protect against ischemic spinal cord injury in rabbits.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脊髄虚血 ニューログロビン 虚血耐性

1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈手術の重篤な合併症の一つである対麻痺は大動脈遮断中の脊髄虚血が主な原因と考えられている。動脈瘤が左鎖骨下動脈から大動脈分岐部まで及ぶタイプでは、対麻痺の発生率は、7~20%と高率である。脊髄灌流圧を上げるために脳脊髄液ドレナージや部分体外循環などが行われているが、脊髄血流を維持する方法には限界があるのが現状である。脊髄虚血からいかに脊髄を守るかは、依然として麻酔科医と外科医の大きな課題である。

ニューログロビンは2000年に、マウスとヒトの脳組織から中枢神経に特異的に発現する新規グロビンタンパク質として発見された。ニューログロビンはグロビン分子とヘム鉄の複合タンパク質であるが酸素分子との結合力は弱く、神経細胞内の酸素貯蔵としての役割はほとんどないと考えられている。その後の研究で、虚血再灌流時などにニューログロビンが立体構造を変え、シグナル伝達物質と結合し、活性を調節することにより神経細胞死を防ぐ可能性が報告された。遺伝子改変によりニューログロビンを高発現させたマウスの一過性脳虚血モデルでは脳梗塞体積が減少している。したがって、何らかの方法でニューログロビンを活性化するという内因性保護機構により脊髄保護ができる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

まず、最も強いと考えられている内因性保護機構である虚血耐性により脊髄保護が可能かを検討する。具体的には、脊髄自体に短時間虚血侵襲を与える ischemic preconditioning (IPC)、腎動脈あるいは両大腿の駆血による remote IPC の脊髄保護効果を家兔一過性脊髄虚血モデルで検討する。

次にニューログロビンを活性化すると報告されているバルプロ酸の投与により脊髄保護が可能かを検討する。バルプロ酸は虚血前あるいは虚血後に約1週間連続投与することで中枢神経保護効果を認めることが多いが、最近の報告では虚血直前の1回投与でも保護効果が認められている。In vitro の実験では、バルプロ酸投与により12時間後にはニューログロビンが活性化させることが報告されている。したがって、本研究では一過性脊髄虚血の12時間前にバルプロ酸を投与することで pharmacological preconditioning を行い、さらに再灌流直後に再度バルプロ酸を投与することで脊髄保護効果が認められるかを検討する。もし、この投与方法で明らかな保護効果が認められるか、あるいは保護効果の傾向が認められればニューログロビンの活性化の状況を western blotting で確認する。

3. 研究の方法

(1) 虚血耐性による脊髄保護

家兔(2~3Kg)を用い、脊髄虚血は経後腹

膜的腹部大動脈一時遮断により作成し、虚血時間は15分間とした。具体的には、イソフルランで麻酔を導入し、耳静脈より輸液ラインを、耳動脈より大動脈遮断部より中枢側の動脈圧測定用のラインを確保した。少量のペントバルビタールを投与後、気管挿管を行い、以後イソフルランとフェンタニル麻酔下で人工呼吸を行った。右側大腿動脈より7cmカテーテルを挿入し、大動脈遮断部より末梢側の動脈圧をモニターした。経後腹膜のアプローチにより腹部大動脈にテーピングを行った。腎動脈を一時遮断する群では左腎動脈にテーピングを行った。また、大腿の駆血を行う群では両大腿に駆血帯を装着した。

家兔を4群(各n=6)に分けた。AO群は大動脈を、RA群は左腎動脈を5分間遮断15分間再灌流5分間遮断した。TH群は両大腿を10分間駆血10分間再灌流10分間駆血した。3群とも最終処置から30分後に大動脈を15分間遮断した。対照群は15分間の大動脈遮断のみを行った。閉創後、麻酔から覚醒させて7日間後肢運動機能を5段階で評価した(4:正常、3:跳躍できるが正常ではない、2:後肢はよく動くが跳躍できない、1:後肢がわずかに動く、0:後肢の完全麻痺)。その後、全身麻酔下に脊髄を取り出しHE染色により腰部脊髄(L5)腹側の正常神経細胞数を計測した。

(2) 虚血耐性による脊髄保護の機序

短時間の非侵襲的脊髄虚血によるIPC効果の発現に free radical が関与しているか否かの検討を行った。

家兔を4群(各n=6)に分けた。脊髄虚血の方法は前回と同様である。IPC群とD-IPC群はそれぞれ生食または free radical scavenger の dimethylthiourea (DMTU, 500 mg/kg)を投与し、1時間後に大動脈を5分間遮断15分間再灌流5分間遮断した。さらに最後の処置から30分後に大動脈を15分間遮断した。C群とD-C群は、生食またはDMTUを投与し、その1時間55分後に大動脈を15分間遮断した。閉創後、麻酔から覚醒させて7日間後肢運動機能を5段階で評価した。後肢運動機能と組織学的評価の方法も前回と同様である。

(3) バルプロ酸の脊髄保護作用

家兔一過性脊髄虚血モデルを用いて脊髄において、ニューログロビンの誘導作用が報告されているバルプロ酸の神経保護効果を検討した。

家兔を4群(各n=6)に分けた。自発呼吸下にイソフルラン3%を吸入させ、それぞれバルプロ酸(生理食塩水に溶解)30 mg/kg、100 mg/kg、300 mg/kg、生理食塩水(対照群)を投与し、家兔を一旦覚醒させた。その12時間後、イソフルランとフェンタニルによる全身麻酔下に、左腎動脈直下の大動脈を15分間遮断した。再灌流直後、それぞれ12時間前と同様に薬剤を投与した。再灌流後7日間、後肢運動機能を評価した。後肢運動機能と組織学的評価の方法も初回

と同様である。

4. 研究成果

(1) 虚血耐性による脊髄保護

再灌流 7 日後の後肢運動機能は、AO 群 (4:5 匹、3:1 匹) が対照群 (2:2 匹、0:4 匹) に比較し有意に良好であった。一方、RA 群 (4:1 匹、0:5 匹) と TH 群 (4:1 匹、3:1 匹、0:4 匹) は対照群と比較し、有意差はなかった。正常神経細胞数 (平均値 ± 標準偏差) は AO 群 74 ± 9 、RA 群 10 ± 13 、TH 群 25 ± 2 、対照群 8 ± 7 と AO 群が他の全ての群に比較し有意に多かった。

(2) 虚血耐性による脊髄保護の機序に関する研究

再灌流 7 日後の後肢運動機能は、IPC 群 (4:6 匹) と D-IPC 群 (4:5 匹、2:1 匹) が C 群 (1:2 匹、0:4 匹) と D-C 群 (2:1 匹、1:3 匹、0:2 匹) に比較し有意に良好であった。一方、IPC 群と D-IPC 群には有意差はなかった。正常神経細胞数 (平均値 ± 標準偏差) は IPC 群 68 ± 9 、D-IPC 群 67 ± 18 、D-C 群 10 ± 6 、C 群 17 ± 16 と後肢運動機能と同じ傾向にあった。

(3) パルプロ酸の脊髄保護作用

【結果】再灌流 48 時間では 300mg/kg 群で後肢運動機能が対照群と比較し、良好な傾向が見られたが有意差はなかった。再灌流 7 日後の後肢運動機能・正常神経細胞数 (平均値 ± 標準偏差) は、30 mg/kg 群 (2:1 匹、0:5 匹・ 18 ± 11)、100 mg/kg 群 (1:3 匹、0:3 匹・ 13 ± 9)、300 mg/kg 群 (4:1 匹、1:4 匹、0:1 匹・ 22 ± 24) となり、対照群は (1:1 匹、0:5 匹・ 22 ± 20) であった。7 日後の後肢運動機能と腰部脊髄腹側正常神経細胞数において対照群と他の 3 群で明らかな有意差を認めなかった。

(4) 考察

中枢神経保護の研究は 40 年以上の歴史があるが、最近までの考え方は、そのほとんどが神経細胞死のカスケードを明らかにし、そのカスケードを遮断することで神経細胞を保護しようとするものであった。しかし、膨大な研究にもかかわらず、世界的に認められた中枢神経保護薬は未だにない。成果が出ていない理由として、細胞死のカスケードを遮断することにより神経細胞を保護するという基本的な考え方が間違っていた可能性が指摘されている。これに対し、1980 年代後半から報告され始めた虚血耐性は神経細胞が死に至らない程度の適度なストレスを神経細胞に与え、神経細胞が本来持っている内因性の神経保護機構を活性化し自分自身を保護するというもので、近年注目されている。虚血耐性機序を利用した神経細胞保護は確かに強い保護効果が繰り返し報告されている。しかし、その多くは保護すべき臓器に神経細胞が死に至らない程度の虚血侵襲を加えるというもので、このままでは容易に臨床応用することができない。したがって、保護

すべき臓器に虚血侵襲を与えずに内因性の保護機構を活性化する方法が求められている。本研究が注目した物質であるニューログロビンはこの内因性神経保護機構に関与している可能性が指摘されており、本研究の目的はこのニューログロビンを中心とした虚血応答システム活性化による脊髄保護を目指したものであった。

ところで、脊髄虚血に対し虚血耐性を利用した脊髄保護では、近年 remote IPC が注目されている。remote IPC とは保護すべき臓器とは離れた部位の臓器にストレスを加えることにより目的臓器を保護しようというものである。脊髄の remote IPC では両大腿 10 分間駆血 - 10 分間再灌流 - 10 分間駆血を脊髄虚血侵襲 (15 分間) の 30 分前に行うことで、強い脊髄保護効果が家兎のモデルで報告されている。したがって、臨床応用可能と考えられる大腿駆血による remote IPC の脊髄保護効果をまず確認し、その保護効果とニューログロビン活性化による脊髄保護効果を比較する必要があると考えた。すなわち、大腿駆血による remote IPC による保護効果がニューログロビン活性化による脊髄保護効果よりも遥かに強ければ、ニューログロビン活性化による脊髄保護の研究は臨床的立場からはあまり興味が持てないテーマとなる。

本研究ではまず、脊髄に軽度の虚血侵襲を 2 回繰り返してその 30 分後に侵襲的脊髄虚血を加える IPC 群、remote IPC として、上記のように大腿駆血を 2 回繰り返す群と左腎動脈遮断を 2 回繰り返す群、そして preconditioning を行わずに侵襲的脊髄虚血を加える対照群の 4 群で比較検討した。その結果、remote IPC の両群には保護効果はほとんどなく、腹部大動脈を 2 回遮断することにより軽度の脊髄虚血侵襲を加える IPC に強い脊髄保護効果が観察された。したがって、大腿駆血による remote IPC の安易な臨床応用には慎重な姿勢が必要と思われた。

次に、大動脈遮断による IPC の脊髄保護効果の再現性を確認する目的とその機序にフリーラジカルの関与があるか否かを確かめる目的で大動脈遮断による IPC 群、IPC の前にフリーラジカルスカベンジャーを投与した群、IPC を行わずにフリーラジカルスカベンジャーを投与して脊髄虚血を行った群、特に処置を行わずに脊髄虚血を行った群で比較検討した。その結果、IPC の保護効果は再現できたが、その保護効果はフリーラジカルスカベンジャーでは消去できなかった。したがって、IPC の脊髄保護効果は確実に、その機序にフリーラジカルは大きな役割を果たしていないことが判明した。

最後の研究として、臨床的に唯一可能と思われるニューログロビン活性化法であるパルプロ酸投与による脊髄保護の検討を行った。パルプロ酸の投与は少量群、中等量群、大量群の 3 群で行ったがいずれにも脊髄保護

効果は全く認められなかった。同時に行った研究ではないので、正確に比較することはできないが、大動脈の短時間遮断による IPC の脊髄保護効果とは全く比較にならなかった。本研究のバルプロ酸の投与方法は in vitro の研究でニューログロビンを活性化すると報告されている投与方法であるが、効果はなかった。したがって、生化学的分析を行って、バルプロ酸によるニューログロビンの活性化が脊髄組織で証明されたとしても、臨床的には意味がないと判断し、生化学的分析は行わないこととした。

(5) 今後の展望

今回の研究で、大動脈の短時間遮断により脊髄に軽度の虚血侵襲を2回加えることで脊髄は虚血に対して強い虚血耐性を獲得することを証明できた。これは IPC から侵襲的虚血までが 30 分という短い時間であり、いわゆる early IPC に相当するものと思われる。われわれは以前の研究で短時間の脊髄虚血の 4 日後に脊髄が虚血耐性を獲得すること (delayed IPC) を報告しているが、early IPC による保護効果は delayed IPC による保護効果より強い印象である。今後、この機序を解明して行くことで、臨床応用可能な脊髄保護方法の開発につながる可能性がある。

一方、ニューログロビン活性化による脊髄保護は今のところ臨床応用可能な方法では可能性が少なく、これ以上の研究は臨床的立場からは価値が少ないと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. The combination of insulin-like growth factor 1 and erythropoietin protects against ischemic spinal cord injury in rabbits. Utada K, Ishida K, Tohyama S, Urushima Y, Mizukami Y, Yamashita A, Uchida M, Matsumoto M. J Anesth (査読有り) 2015;29:741-748.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 福井健彦, 中西俊之, 山下 理, 山下敦生, 歌田浩二, 松本美志也, バルプロ酸による脊髄保護効果日本麻酔科学会第 62 回学術集会平成 27 年 5 月 28~30 日 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
2. 松本美志也, 中枢神経保護 日本蘇生学会第 33 回大会 平成 26 年 12 月 5 日 アクトシティ-浜松(静岡県浜松市)
3. 福井健彦, 山下 理, 内田雅人, 歌田浩二, 飯田靖彦, 松本美志也 Ischemic Preconditioning による脊髄保護効果 日本麻酔科学会第 61 回学術集会 平成 26 年 5 月 15~17 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 2 件)

1. Molecular mechanisms of ischemic damage to the spinal cord and its protection. Matsumoto M & Yamashita A. Neuroanesthesia and cerebrospinal protection. Springer, 725 (53-61), 2015.
2. Anesthesia for spinal surgery. Matsumoto M & Ishida K. Neuroanesthesia and cerebrospinal protection. Springer, 725 (417-428), 2015.

〔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

松本 美志也 (MATSUMOTO, Mishiya)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 6 0 2 4 3 6 6 4

(2) 研究分担者

水上 洋一 (MIZUKAMI, Yoichi)
山口大学・大学研究推進機構・教授
研究者番号: 8 0 2 7 4 1 5 8

石田 和慶 (ISHIDA, Kazuyoshi)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 8 0 3 1 4 8 1 3

若松 弘也 (WAKAMATSU, Hiroya)
山口大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 8 0 3 7 9 9 6 6