

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：87114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670662

研究課題名(和文) 生体内での関節液・髄液・血流のバイオイメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging for joint, blood, and cerebrospinal fluid

研究代表者

芝 啓一郎 (SHIBA, KEIICHIRO)

独立行政法人労働者健康福祉機構総合せき損センター(研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：90574137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：整形外科疾患の多くはその病態に血流や髄液、関節液などの流体が関与しているが、これまで生体内での流体計測研究は殆どなされていなかった。我々は発光酵素によるバイオイメージング技術と人工アルブミンを用いて生体内での流体や液体をリアルタイムに可視化する方法の確立を試みた。その結果、持続的な発光酵素の産生が可能な細胞動態のイメージングは実現性が高く、脊髄損傷後に浸潤する炎症細胞のバイオイメージングによって麻痺の予後予測法などを確立した。その一方で、一過性の化学反応で終わってしまう溶媒自体のイメージングは困難であった。

研究成果の概要(英文)：The fluid biology including blood, cerebrospinal and joint fluid, is closely related with the pathophysiology of most disease in the field of orthopedic surgery. However, the evaluating method for it is relatively difficult due to a lack of basic researches using animal model. We attempted to establish in vivo imaging of fluid biology by using firefly luciferase and artificial albumin. We demonstrated that in vivo imaging of accumulated inflammatory cells can predict the prognosis in the hyperacute phase of spinal cord injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

整形外科疾患の殆ど全ては、その病態発生・治癒過程に血流動態が深く関与する。関節炎や骨髄炎などの慢性炎症疾患、変性やヘルニアなどの圧迫病変による脊柱管狭窄症や脊髄症、骨折や外傷後の軟部組織治癒過程など、血流動態の詳細な把握は病態治療研究に重要である。さらに、薬剤投与研究に於いて効率的な drug delivery system (DDS) の開発には、血流、髄液流、関節液中での薬剤の組織浸透性把握や時空間的動態把握は必要不可欠である。しかし、臨床現場においては動静脈奇形などの特殊な疾患を除いては血流動態に注目する機会は少なく、基礎研究に於いても *in vivo* での血流や髄液流動態を可視化するツールが存在しないため、殆ど研究が行われていない。実際、これまでの生体内での流れの研究は、動脈硬化などの血管内での細胞動態が中心であるが、*in vivo* での流体計測研究は困難であるためそのほとんどは画像情報からシミュレーションに作成した *in vitro* を流体工学的に解析する研究であった。特に、関節液中での薬物動態把握は殆ど未研究の分野であった。

2. 研究の目的

実際の生体の血液動態・髄液流の解析には、イメージングに用いる担体比重が生体体液の比重と同一でなければその動態は正確に反映されないことも *in vivo* での流体計測研究を困難にしている要因の一つであった。そのため本研究では、血液や髄液に豊富に含まれるアルブミンを担体とし、小分子である発光酵素と蛍光タンパク質同時に付加してイメージングを試みた。本研究の目的は、バイオイメージング技術と人工アルブミンを用いて生体内での流体や液体をリアルタイムに可視化する方法を確立し、非侵襲的に血流、髄液流、関節液などの体液の動態を評価可能な研究ツールを開発することである。

3. 研究の方法

当センター研究部にてヒト型化修飾分泌蛋白発現システム (LEXSY Eukaryotic Protein Expression system) を用いた luciferase-GFP 融合蛋白付加アルブミンの作成を試みた。これまでは十分な酵素活性を持った分泌型タンパク質の作成は困難であったが、近年開発された本システムはヒト型の翻訳後修飾 (糖鎖修飾) や立体構造を有した強力な酵素活性を有する組み替えタンパク質を分泌型として大量に得ることが可能である。げっ歯類を用いた動物実験に於いては研究連携者である九州大学医学研究院准教授岡田誠司の研究室で行う。脊髄損傷急性期における麻痺の予後予測実験は B6 マウス 8 週齢を用い、第 9 胸髄にコンピューター制御下に定量的圧挫損傷を作成した。FACS を用いた浸潤炎症細胞数の定量化も同時に行った。発光イメージングシステムは Xenogen 社製

IVIS システムを用い、作成した融合蛋白で希釈系列を作り、発光基質である D-luciferin を同様に希釈系列で添加する。なお、動物実験に関しては九州大学動物実験規則に則り、動物実験委員会の承認を得た上で行った。

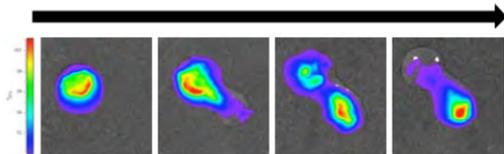
4. 研究成果

まず、発行酵素と蛍光タンパク質を付加した人工アルブミンの作成を LEXSY Expression system を活用し試みた。目的とする人工アルブミンの条件としては、付加した発光酵素 luciferase がネイティブのフォールディングを有し、高い酵素活性を保っていること、可溶性であり分子量が生体アルブミンと同程度であること、分泌型タンパク質として大量に精製できること、が考えられた。この LEXSY システムは従来の大腸菌により機能蛋白質を発現させるシステムと異なり、分泌型タンパク質として正常なフォールディングを発現させかつ哺乳類型の翻訳後修飾が残せるため、*in vivo* で高い酵素活性を有するタンパク質を大量精製することが期待された。まず発光酵素 firefly luciferase と GFP の融合タンパク質発現ベクターのコンストラクトと albumin 発現ベクターを用いて発現ベクターを構築し、細胞培養上清より分泌可溶性タンパク質として回収し、イオン交換ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。しかし、得られた人工アルブミンは GFP 活性は有するものの、発光基質である D-luciferin と反応させても IVIS システムでの検出感度以下の発光しか得られなかった。数種類の luciferase コンストラクトを用いたが有意な結果は得られなかったため、人工アルブミンの作成は引き続き継続することとし、代替として ffLuc-cp156 トランスジェニックマウス細胞を用いた実験に切り替えた。この ffLuc-cp156 は通常の luciferase と比して数百倍高い発光活性を有すると考えられている。実際、本マウスを用いた膝関節腔のバイオイメージングは下図の如く可能であり、今後は軟骨吸収性担体を用いることで、関節液中での薬物動態把握に繋がる可能性があると考えられた。



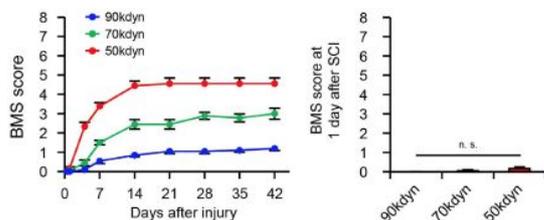
次に、*in vitro* での実験ではあるが流体のイメージングは可能であるかを検討した。ffLuc-cp156 トランスジェニックマウスの血液を採取し、培養皿上での液滴流を 0.1sec 毎の画像として撮影した。その結果、流体の形態として認識はされるものの、発光原理が細胞由来の ATP との化学反応であるため、細

胞の局在濃度に応じた発光になってしまう問題点が認められた。つまり、溶媒自体の発光ではなく、あくまで細胞集団としての発光であるため、液流のイメージング方法としては大きな欠陥があると言わざるをえない結果であった。そのため、関節液あるいは関節腔のイメージングではなく結果的には滑膜細胞の可視化、あるいは血流ではなく血液細胞のイメージングとなってしまうことが明らかとなった。



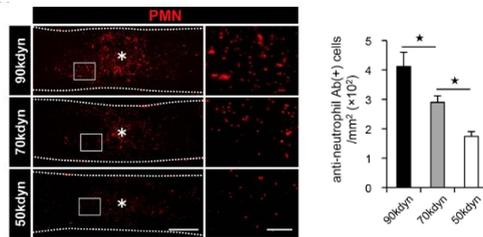
上記の人工アルブミンの結果も同様の原因が考えられ、すなわち luciferin 基質が luciferase を触媒とし酸素と ATP と反応した発光反応を検知する方法が原則である限り、luciferase が産生し続けられる細胞のバイオイメージングと一過性の科学反応で終わってしまう溶媒のイメージングは決定的に異なる結果が反映されたものと結論付けた。

以上の知見をふまえ、バイオイメージングの活用としては、細胞の集積を非侵襲的に検知することが最も実用性が高いと考えた。そこで、脊髄圧挫損傷後に浸潤する炎症細胞浸潤のバイオイメージングを行い、麻痺の予後予測に応用できないかと考えた。現在、損傷急性期に麻痺の予後を予測することは MRI 等の詳細な検査によっても不可能である。受傷後間もない時期からの予後予測が可能となれば、残存機能にあわせたりハビリテーションの早期開始や目標設定が可能となり、臨床的な意義も大きい。また、急性期での治療介入の効果判定は現在では麻痺の自然回復によってその効果が希釈されるため非常に困難であり、正確な効果判定のためには膨大な患者数が必要となるという問題が存在している。損傷早期からの予後予測判定が可能となれば、急性期治療介入の効果判定もより正確に行えることは間違いない。そこで我々はマウス胸髄に対して軽度、中等度、重度の圧挫損傷を作成した。損傷後 6 週間ではこの 3 群の下肢運動機能は大きく異なるが、損傷後 12 時間の時点ではいずれの群もほぼ完全麻痺であり、最終的な麻痺の予後予測は不可能であった。

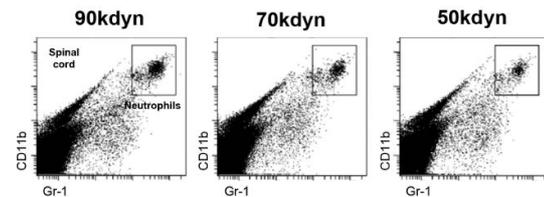


しかし、損傷 12 時間の時点での損傷部への浸潤末梢循環血は免疫組織学的検討においても、FACS を用いた浸潤細胞定量においても

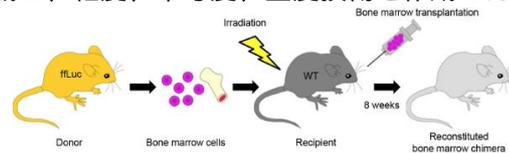
有意に差を認め、損傷程度に応じた細胞浸潤量が明らかとなった。



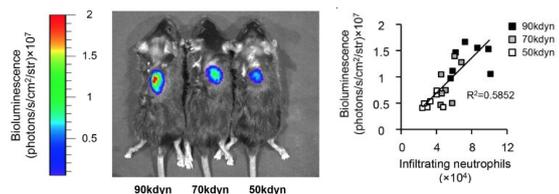
すなわち、非侵襲的にこの浸潤細胞量を定量出来れば損傷早期で予後予測が可能となる。



そこで下図の如く、上記 ffLuc トランスジェニックマウスの骨髄を irradiation をあてたレシピエントマウスに移植し、末梢循環血のみ luciferase を発現するキメラマウスを作成し、軽度、中等度、重度損傷を作成した。



その結果、予想通り損傷強度に応じた発光を定量的に測定することが可能であった。すなわち、受傷後 12 時間という早期から最終的な脊髄損傷後の麻痺を予測することに成功した。



この結果はバイオイメージングの応用が、非侵襲的な脊髄損傷後の予後予測として実用可能性があることを示している。実際、ルミノールを用いることで末梢白血球の自家発光が増強されることも知られており、超高感度 CCD カメラの検知精度によっては早期に臨床へ応用される可能性も考えられる。このように、バイオイメージングの応用は様々な整形外科疾患の病態把握や治療応用に繋がる可能性を有していると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- Hayashi T, Maeda T, Masuda M, Ueta T, Shiba K. Morphology of the injured posterior wall causing spinal canal encroachment in osteoporotic vertebral fractures. Spine J. 2016

- Mar 21. pii: S1529-9430(16)00478-2. doi: 10.1016/j.spinee.2016.03.021.
2. Hayashi T, Lord EL, Suzuki A, Takahashi S, Scott TP, Phan K, Tian H, Daubs MD, Shiba K, Wang JC. A comparison of commercially available demineralized bone matrices with and without human mesenchymal stem cells in a rodent spinal fusion model. *J Neurosurg Spine*. 2016 Mar 11:1-5.
 3. Tanaka J, Yague I, Shiba K, Maeyama A, Naito M. A Study of Risk Factors for Tracheostomy in Patients With a Cervical Spinal Cord Injury. *Spine*. 2016 May;41(9):764-71. doi: 10.1097/BRS.0000000000001317.
 4. Yuge I, Okada S, Masuda M, Ueta T, Maeda T, Shiba K. Risk factors for adjacent segment pathology requiring additional surgery after single-level spinal fusion: impact of pre-existing spinal stenosis demonstrated by preoperative myelography. *Eur Spine J*. 2016 May;25(5):1542-9. doi: 10.1007/s00586-015-4185-6.
 5. Masuda M, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. D-dimer screening for deep venous thrombosis in traumatic cervical spinal injuries. *Spine J*. 2015 Nov 1;15(11):2338-44. doi: 10.1016/j.spinee.2015.06.060.
 6. Vu TT, Morishita Y, Yague I, Hayashi T, Maeda T, Shiba K. Radiological Outcome of Short Segment Posterior Instrumentation and Fusion for Thoracolumbar Burst Fractures. *Asian Spine J*. 2015 Jun;9(3):427-32. doi: 10.4184/asj.2015.9.3.427.
 7. Bekki H, Morishita Y, Kawano O, Shiba K, Iwamoto Y. Diastematomyelia: a surgical case with long-term follow-up. *Asian Spine J*. 2015 Feb;9(1):99-102. doi: 10.4184/asj.2015.9.1.99.
 8. Hayashi T, Daubs MD, Suzuki A, Scott TP, Phan KH, Ruangchainikom M, Takahashi S, Shiba K, Wang JC. Motion characteristics and related factors of Modic changes in the lumbar spine. *J Neurosurg Spine*. 2015 May;22(5):511-7. doi: 10.3171/2014.10.SPINE14496.
 9. Kobayakawa K, Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Ohkawa Y, Kishimoto J, Yokota K, Ideta R, Shiba K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S. Acute hyperglycemia impairs functional improvement after spinal cord injury in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2014 Oct 1;6(256):256ra137. doi: 10.1126/scitranslmed.3009430.
 10. Mori E, Ueta T, Maeda T, Yague I, Kawano O, Shiba K. Effect of preservation of the C-6 spinous process and its paraspinal muscular attachment on the prevention of postoperative axial neck pain in C3-6 laminoplasty. *J Neurosurg Spine*. 2015 Mar;22(3):221-9. doi: 10.3171/2014.11.SPINE131153.
 11. Morishita Y, Maeda T, Ueta T, Naito M, Shiba K. Pathophysiological effects of lumbar instrumentation surgery on lumbosacral nerve roots in the vertebral foramen: measurement of local pressure of intervertebral foramen. *Spine*. 2014 Oct 1;39(21):E1256-60. doi: 10.1097/BRS.0000000000000520.
 12. Kawano O, Maeda T, Mori E, Yague I, Takao T, Sakai H, Ueta T, Shiba K. Influence of spinal cord compression and traumatic force on the severity of cervical spinal cord injury associated with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine*. 2014 Jun 15;39(14):1108-12. doi: 10.1097/BRS.0000000000000361.
 13. Morishita Y, Maeda T, Ueta T, Naito M, Shiba K. Dynamic somatosensory evoked potentials to determine electrophysiological effects on the spinal cord during cervical spine extension: clinical article. *J Neurosurg Spine*. 2013 Sep;19(3):288-92. doi: 10.3171/2013.5.SPINE12933.
 14. Takao T, Morishita Y, Okada S, Maeda T, Katoh F, Ueta T, Mori E, Yague I, Kawano O, Shiba K. Clinical relationship between cervical spinal canal stenosis and traumatic cervical spinal cord injury without major fracture or dislocation. *Eur Spine J*. 2013 Oct;22(10):2228-31. doi: 10.1007/s00586-013-2865-7.
 15. Hayashi T, Ueta T, Kubo M, Maeda T, Shiba K. Subarachnoid-subarachnoid bypass: a new surgical technique for posttraumatic syringomyelia. *J Neurosurg Spine*. 2013 Apr;18(4):382-7. doi: 10.3171/2013.1.SPINE12828.
 16. Kubota K, Doi T, Murata M, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Harimaya K, Shiba K, Hashizume M, Iwamoto Y, Okada S. Disturbance of rib cage development causes progressive thoracic

scoliosis: the creation of a nonsurgical structural scoliosis model in mice. J Bone Joint Surg Am. 2013 Sep 18;95(18):e130. doi: 10.2106/JBJS.L.01381.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 芝 啓一郎、Facet joint angle が非骨傷性頸髄損傷の麻痺重症度に与える影響、第 42 回日本脊椎脊髄病学会、2013.4.25、沖縄コンベクションセンター（沖縄県宜野湾市）
2. 芝 啓一郎、受傷後 72 時間以内に診断された重篤麻痺を伴う非骨傷性頸髄損傷に対する保存的治療経過、第 49 回日本脊髄障害医学会、2014.9.11、旭川グランドホテル（北海道旭川市）
3. 芝 啓一郎、頸髄損傷患者における嚥下障害の危険因子、第 50 回日本脊髄障害医学会、2015.11.19、グランドプリンスホテル高輪（東京都）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sekisonh.johas.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝 啓一郎 (SHIBA KEIICHIRO)
独立行政法人労働者健康安全機構総合せき損センター (研究部)・研究員
研究者番号 : 90574137

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

岡田 誠司 (OKADA SEIJI)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号 : 30448435