

論文要旨

Preventive Effect of Erythropoietin on Spinal Cord Cell Apoptosis Following Acute Traumatic Injury in Rats.

ラット急性脊髄損傷におけるエリスロポエチンの
アポトーシス抑制効果

有島善也

【序論および目的】

急性脊髄損傷にともなう機能障害の形成には、外力による機械的損傷に引き続いて、二次的障害因子による apoptosis が生じ遅発性の神経細胞死や神経線維の変性が形成されることが明らかにされている。現在臨床的に脊髄損傷後に神経保護作用を目的として使用されている薬剤はメチルプレドニゾン大量療法のみである。ところが最近、貧血治療に用いられているエリスロポエチン (EPO) に、神経細胞の apoptosis を抑制する作用があることが報告された。しかし障害脊髄におけるその効果は未だ明らかにされていない。今回、培養神経細胞と急性脊髄損傷モデルを用いて EPO の神経保護作用を検討した。

【材料および方法】

- 1) 培養神経細胞における EPO の作用：マウス由来の cerebrocortical culture を用いて NMDA 性 apoptosis を誘導し、これに EPO 投与を行った。EPO 投与群と非投与群について抗 active-caspase3 抗体を用いて apoptosis 出現を比較した。
- 2) 急性脊髄損傷モデルにおける EPO の作用：成熟ラットの胸髄を機械的に圧迫損傷させ、脊髄完全麻痺モデルを作成した。損傷直後とその翌日に経腹膜的に EPO (5000u/kg) を投与し経時的に複数のモデルを作成した。EPO 投与群と非投与群について各々の脊髄組織を摘出し、脊髄損傷部位より 5mm 頭側レベルの切片を作成した。これに HE 染色、TUNEL 法、抗 active-caspase3 抗体及び神経細胞マーカーを用いた免疫組織学的検討を行い apoptosis 形成について比較検討した。

【結果】

- 1) 培養神経細胞における EPO の作用：抗 active-caspase3 抗体陽性率は EPO 投与群 34.7%、非投与群 4.76% であり統計学的有意に apoptosis が抑制された。
- 2) 急性脊髄損傷モデルにおける EPO の作用：HE 染色では EPO 投与群において白質、灰白質の空胞変性の形成が明らかに抑制された。TUNEL 法では EPO 非投与群では損傷後 3 日目をピークとする apoptosis 形成が確認されたが、EPO 投与群ではこれがほとんど抑制されていた。抗 active-caspase3 抗体による免疫染色の陽性細胞率は EPO

投与群 24.8%、非投与群 8.7%であり有意に apoptosis が抑制された。神経細胞マーカーによる検討では、抗 active-caspase3 抗体陽性細胞は主にオリゴデンドロサイトに発現していた。

【結論及び考察】

今回 EPO が神経培養細胞とラット脊髄損傷モデルにおける脊髄細胞の apoptosis を抑制することが確認された。また apoptosis は主にオリゴデンドロサイトで生じていることが示唆された。EPO は blood brain barrier を通過し、脳梗塞や脳外傷後の神経細胞の apoptosis を抑制することが報告されている。神経細胞の膜レセプターに EPO が結合すると細胞質内で Jak2 がチロシンリン酸化を受ける。Jak2 は I κ B のセリンリン酸化を促し、活性化された NF- κ B が核内に移行し apoptosis 抑制物質を転写して神経細胞保護作用を示すとの報告がある。しかしその作用機序の詳細は未だ明らかにされていない。今後、EPO の至適投与量、至適投与時期等の詳細な検討が必要であると思われるが、EPO は既に生体内での安全性が確認されている薬剤であり、脊髄損傷後の機能障害を軽減する薬剤としての臨床応用が期待される。

(SPINE Vol. 31 No. 21, 2432-2438, 2006 掲載)

論文審査の要旨

| | | | | | |
|------|-----|-------|---|-------|-------|
| 報告番号 | 医論第 | 1442 | 号 | 氏名 | 有島 善也 |
| 審査委員 | 主査 | 亀山 正樹 | | | |
| | 副査 | 宮田 篤郎 | | 有田 和徳 | |

Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats.

(ラット急性脊髄損傷におけるエリスロポエチンのアポトーシス抑制効果)

【目的】急性脊髄損傷では外力による機械的損傷（一次的損傷）に引き続いて、アポトーシスによる遅発性神経細胞死（二次性損傷）が生じる。現在まで急性脊髄損傷の薬物療法は急性期のメチルプレドニゾロン大量投与が唯一であるが、最近脳虚血モデルにおいてエリスロポエチン（EPO）が神経保護作用を持つことが報告された。今回急性脊髄損傷モデルを用いて EPO の神経保護作用について検討した。

【材料および方法】ICR マウス由来の培養神経細胞に N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 性アポトーシスを誘導し EPO 投与群と非投与群について抗 active caspase-3 抗体を用いてアポトーシス出現を比較した。またラット急性脊髄損傷の経時的モデル（0、6、12 時間、1、3、5、7 日後）を作成し損傷 15 分後と 24 時間後に EPO（5,000 U/kg）を腹腔内投与した。損傷部位より 5mm 頭側の脊髄横断切片を作成し組織学的検討（HE 染色、TUNEL 法・抗 active caspase-3 抗体によるアポトーシス細胞の出現、二重染色によるアポトーシス細胞の同定）を行った。

【結果】

- 1) 培養神経細胞において抗 active caspase-3 抗体陽性率は EPO 投与群 4.76%、非投与群 34.7% であり、EPO 投与群では有意にアポトーシスが抑制された。
- 2) 急性脊髄損傷モデル HE 染色では EPO 投与群において白質、灰白質における神経細胞死による空胞変性の形成が抑制された。TUNEL 法では非投与群において損傷後 3 日目をピークとするアポトーシス出現が確認されたが、EPO 投与群ではほとんど抑制されていた。抗 active caspase-3 抗体に対する免疫陽性細胞率は EPO 投与群 8.7%、非投与群 24.8% であり有意にアポトーシスが抑制された。神経細胞マーカーによる検討ではアポトーシスはニューロンだけでなくオリゴデンドロサイトにも発現していた。

【結語】今回急性脊髄損傷における EPO のアポトーシス抑制効果が証明されたが、臨床応用するためには EPO の投与量やそのタイミング、起こりうる副作用（多血、発癌、高血圧など）についての詳細な解析を行うとともに、EPO のアポトーシス制御に重要とされる HIF (hypoxia inducible factor) 1 活性や Bcl-2 family に関するシグナル伝達機構の解析が必要であると考えられる。

以上より、本論文は EPO が急性脊髄損傷後に生じる脊髄神経細胞のアポトーシスを抑制することを初めて明らかにした論文であり、今後脊髄損傷の新たな治療薬の研究につながる点において意義深い。従って、本論文は学位論文として価値のあるものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

| | | | |
|---|------------|-------|-------|
| 報告番号 | 医論第 1442 号 | 氏名 | 有島 善也 |
| 審査委員 | 主査 | 亀山 正樹 | |
| | 副査 | 宮田 篤郎 | 有田 和徳 |
| <p>主査および副査の3名は、平成19年4月2日、学位請求者 有島善也君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 出血部位が後角から中心灰白質にかけて起こっており、前角が損傷を免れているのはなぜか。 (回答) 脊髄損傷の作成方法が椎弓を切除して脊髄の後方から圧迫を加える手法であるため、より直接的に圧迫を受けた後方部分に存在する後角、中心灰白質が主に障害されたと考えられる。</p> <p>質問2) 脊髄組織に見る空洞形成とアポトーシスの関係について、どのように考えられるか。 (回答) 空洞形成は脊髄細胞死を反映しておりネクローシス、アポトーシスがともに関与していると考えられる。</p> <p>質問3) 脊髄損傷部位より5mm上方でアポトーシスが起きている理由としてNMDA受容体を介した機序を推察しているがその直接的な引き金になるのは何か。 (回答) 神経細胞の血流量減少に伴いグルコースや酸素供給量の低下を招く。これが神経細胞内のATP濃度を低下させ、Na^+-K^+ポンプの働きを低下させ、神経細胞膜の脱分極を引き起こす。その結果シナプス前ニューロンの軸索末端からグルタミン酸が放出される。グルタミン酸によるNMDA受容体刺激によりCa^{2+}流入とK^+の流出が起こり、それによるフリーラジカルの発生やミトコンドリアの障害が起こり、アポトーシスのシグナル系が活性化されると考えられている。</p> <p>質問4) アポトーシスのピークが損傷3日後となるのは物理的損傷の場合に特異的な時間経過なのか、虚血によるアポトーシスでも同様の経過をたどるのか。 (回答) 脊髄虚血によるアポトーシスの時間的変動について検討していないため比較検討ができず不明である。</p> <p>質問5) EPO投与群と非投与群間で運動麻痺の程度に差はあったのか。 (回答) 両群とも少なくとも損傷7日後までにおいては運動麻痺の改善は認められず、両者間に差異は認められなかった。これは本モデルが完全脊損モデルであることが関係している。不完全麻痺モデルは麻痺レベルを統一することが難しく実験で結果にバラつきを出しうる。そのため我々の一連の実験では完全麻痺モデルを使用している。今後不完全損傷モデルの作成がうまくいけば運動麻痺に差異を見出せる可能性はある。</p> <p>質問6) EPOの投与時間が損傷15分後であるのは臨床では実際的ではないと考える。24時間後の単回投与での効果は期待できないのか。また投与量の問題についてはどうか。 (回答) 今回の研究では脊髄損傷後超早期の観察も重要と考え15分後に1回目の投与を行った。実際の臨床では脊髄損傷後15分以内にEPOを投与することは不可能であるため、24時間後に単回投与での研究も行われるべきである。実際には24時間後の単回投与でアポトーシスが抑制されたとする報告がある。投与量については、脳梗塞患者への臨床試験に使用された量が3日間で約10万単位であったが、今回の研究では50kgの成人では50万単位のEPOが必要との計算になるため、臨床応用の面では多血や血栓形成などの副作用が危惧される。</p> <p>質問7) 脊髄損傷モデルでネクローシスの面積についてはEPO投与群と非投与群で差が見られないのか。 (回答) 今回の研究では損傷部位そのものの検討は行っていないため、両群におけるネクローシスの面積の差については不明である。脊髄損傷部位より5mm上方での損傷直後の血腫形成の程度に</p> | | | |

については両群ともほぼ同様であった。

質問8) 脊髄損傷部位の頭側、尾側での組織学的な違いはないのか、またこれらを解析するための縦断面組織での検討はしなかったのか。

(回答) 損傷部の尾側では両群とも広範にわたって神経細胞死が生じており両群における違いはないと考える。これらを詳細に解析するための縦断面切片を用いた解析は非常に重要と思われるが今回は手技的な理由により行わなかった。臨床的には脊損後、実際の脊損レベルより頭側のレベルに麻痺が上行するので、その麻痺進展を防止することに臨床的意義がある。従って損傷より頭側の領域の研究を行っている。

質問9) 脳虚血においては虚血そのものがEPO産生を増加させる刺激となっていると考えられている。脊髄の損傷自体はEPO産生を増加させる刺激とはならないのか。

(回答) 損傷そのものがEPO産生の刺激となるかは不明である。

質問10) EPOを脊髄へ直接投与方法は考えられないのか。また投与ルートが何であれEPOの持続投与が有効ではないのか。

(回答) 脊髄への直接投与は手技的には可能であるが、腹腔内投与でも血液脳関門を通過することがわかり、腹腔内投与が望ましいと考えた。持続投与についてはEPOは臨床的に週に数回の皮下や筋肉内注射でも比較的長く血中濃度を維持できるため静脈内持続投与による検討は行わなかった。

質問11) EPOはどんな細胞で産生されるのか、またEPO receptor (EPOR)を発現している細胞の分布とその意味付けは。

(回答) EPOの産生場所は主には腎臓であるが肝臓でも生後2週までは強い発現が認められている。その他、脳、網膜などでも産生が確認されている。EPORも赤血球系以外に血管内皮細胞、胃粘膜、心筋細胞、ある種の腫瘍細胞に発現していると報告されている。細胞分布の意味付けについては、赤血球に対する造血作用以外の面では、虚血に対する応答として発現量に変化しており、またEPORも同様に変化しているとの報告がある。

質問12) EPOがアポトーシスを抑制する細胞内伝達経路について caspase-3 を介する伝達経路が示されたが、ストレス応答等の他の因子関与は考えられるか。

(回答) STAT5、MAPK、PI3Kなどの伝達経路を介して caspase-3 に働く経路が有力である。HIFの関与やJAK2とNF κ Bのクロストークが重要との報告もある。ストレスやサイトカインなどの関与も十分考えられる。

質問13) 一酸化窒素(NO)やフリーラジカルを介した細胞障害に対してEPOはどのように作用するのか。

(回答) EPOの作用はNOのフリーラジカルによる毒性の解除がその主体と考えられる。

質問14) EPOの β -common receptorを介したアポトーシス抑制機序はどのようなものか。

(回答) EPOの神経保護作用は β -common receptorを介したシグナル伝達によりなされ、血液系とは機序が異なる。このことから β -common receptorに親和性の強いカルバミルEPOは神経保護により選択的に作用する可能性がある。

質問15) EPOの将来の臨床的応用についてどのように考えるか。

(回答) 安全性は確認されており、脳梗塞においては臨床試験も行われている薬剤であることから、十分臨床応用への可能性を持っている。しかし多量の投与が必要という点では副作用の問題も無視できず、また神経保護メカニズムもまだ不明な点が多いため、十分な検討が必要であると考えられる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。