

脊椎靭帯骨化症に対する薬物治療のターゲットの検索

沢田利匡(弘前大学・薬理学、整形外科)、古川賢一(弘前大学・薬理学)、
岸谷正樹(弘前大学・薬理学、整形外科)、金丸幸太(弘前大学・薬理学)、
岡田晶博(弘前大学・整形外科)、植山和正(弘前記念病院・整形外科)、
元村成(弘前大学・薬理学)、藤哲(弘前大学・整形外科)

研究要旨:

後縦靭帯骨化症(以下 OPLL)の病因に関して、我々は、何らかの遺伝的な背景に局所因子である機械刺激(メカニカルストレス)が重要な役割を果たしているという作業仮説をもとに研究を行ってきた。メカニカルストレスが動的因子とすると、局所静的因子としては、同一環境下での細胞応答機能発現が考えられる。非 OPLL と OPLL 由来の細胞間で、細胞膜の受容体、細胞内セカンドメッセンジャーの発現や機能に差があれば、それは治療薬のターゲットとなりうる。そこで我々は骨代謝に関与し、細胞外に恒常的に存在する生理活性物質である細胞外ヌクレオチドとその受容体に着目した。細胞外ヌクレオチドは細胞外に常時 nM から μ M 存在し、ヌクレオチド受容体(以下 P2 受容体)を介して各種組織細胞の恒常性や分化を調節している事が近年判明してきている。そこで細胞外ヌクレオチドが作用する P2 受容体の発現に、OPLL、非 OPLL 群で差が存在し、これが骨化傾向の一翼を担っていると仮説を設定し、それを検証することにした。

まず OPLL 由来培養細胞(以下 OPLL 群)と非 OPLL 由来培養細胞(以下非 OPLL 群)のヌクレオチド受容体サブタイプにおける mRNA レベルの発現を RT-PCR により網羅的に解析した。OPLL 群では、P2Y_{1,2,4,6,12}, P2X₄、非 OPLL 群で P2Y_{2,4,12}X₄ の各受容体の発現が認められた。そのなかで OPLL 群では骨芽細胞に発現が認められている P2Y₁ 受容体が、非 OPLL 群と比較して強く発現していた。P2Y₁ 受容体の両群での発現差をより詳細に解析するため real time RT-PCR 法を行ったところ、OPLL 群で約7倍高い発現が認められた。

この発現差が骨化傾向に関与しているかどうかを検索するため P2Y₁ 受容体の非特異的アゴニストである ATP を 100 μ M 添加したところ、OPLL 群では骨化マーカーである ALP の著しい活性上昇が添加後 4 時間まで認められたが、非 OPLL 群では添加後 2 時間までのわずかな上昇に留まった。

以上の結果より細胞外ヌクレオチドと P2 受容体が OPLL 由来細胞の骨化傾向に関与していることが示唆された。治療薬のターゲットとして検討の意義があると考えられる。

A. 研究目的

細胞外ヌクレオチドが作用するヌクレオチド受容体(以下 P2 受容体)の発現に、OPLL、非 OPLL 由来細胞群で差が存在し、これが骨化傾向の一翼を担っていると仮定し、P2 受容体の発現を網羅的に解析することで、OPLL の骨化傾向にこれらの差が影響しているか検討する。

B. 研究方法

1. ヒト脊柱靭帯細胞の単離と培養

弘前大学医学部倫理委員会の承認ならびに術前に患者、その家族に十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得た上で術中に摘出した OPLL 患者、非 OPLL 患者の脊柱靭帯組織から骨化部分を除き outgrowth 法にて靭帯細胞を単離し、10%FBS 添加 DMEM 培地中で 37°C、5%CO₂ 気相下にて培養した。

2. 培養細胞の総 RNA 抽出

継代 5 代目の脊柱靭帯細胞をコンフルエント到達後 1%FBS 添加 DMEM 培地にて 24 時間インキュベートした後、総 RNA を抽出した。また 0%FBS 添加 DMEM 培地に 100 μM ATP を、0, 0.5, 1, 2, 4 時間でそれぞれ添加し、総 RNA を抽出した。

3. RT-PCR

ヒトで発現が確認されている P2 受容体サブタイプの P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, P2X1, 3, 4, 5, 6, 7 の各 mRNA の発現を RT-PCR 法で定量した。また P2Y1 受容体は real time PCR 法で定量した。

4 添加実験

上記コンフルエントとなった状態で、100 μM ATP となるよう調整した 1%FBS 添加 DMEM を、0, 0.5, 1, 2, 4 時間でそれぞれ添加し、総

RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて ALP の mRNA レベルでの活性を real time PCR 法で定量した。

C. 研究結果

1. P2 受容体の網羅的解析

RT-PCR 法で OPLL 群では骨芽細胞で発現している P2Y1 受容体の発現が非 OPLL 群より高く、さらに詳細な real time RT-PCR 法を行ったところ約 7 倍の発現差が mRNA レベルで存在し、両群で有意差を認めた。他の P2 受容体サブタイプも存在したが、P2X4 は OPLL、非 OPLL 群全例で共通な発現を認めた。

2. 添加実験

OPLL 群では添加後経時的な ALP 活性増加が mRNA レベルで認められ、4 時間で最大活性となり、コントロールと比較して約 6 倍となった。一方非 OPLL 群では添加 2 時間後に約 2 倍の活性上昇が認められたが、その後経時的な活性の上昇は認められなかった。

D. 考察

OPLL と非 OPLL 細胞周囲の恒常性と、それに対する両者の細胞応答の差が存在することを仮定した。作動体と受容体の応答により、骨化傾向への関与が認められれば、薬物治療のターゲットとなりうる。そこで細胞外ヌクレオチドの存在とその受容体に着目した。細胞外ヌクレオチドは、その受容体を介して様々な細胞の分化、増殖を担っていることが近年判明してきている(5)。骨組織における役割も解明されつつあり、メカニカルストレスのヌクレオチドへの関与も研究され(4)、これまで我々が報告してきた局所動的因子(1-3)もヌクレオチドの局所作用を助長している可能性がある

受容体網羅解析の結果、P2Y1 の mRNA 発

現 OPLL 群において有意に高かった。報告では P2Y1 の発現はヒト骨肉腫細胞株と骨芽細胞で認められており(4, 6)、骨化傾向をもつ細胞の指標といえるが、今回は非 OPLL 群との相対比較であり、骨芽細胞またはヒト骨肉腫細胞といった、明らかに骨形成を行う細胞との比較検討も必要と思われる。

P2Y1 の発現に有意な差が認められたため、ヌクレオチドと P2 受容体の反応が骨化傾向に関わりうるかどうか、ALP 活性を指標に解析した。ATP 添加実験の結果では mRNA レベルでの ALP 活性が経時的に OPLL 群で上昇し、非 OPLL 群では OPLL 群に比して変化は小さかった。しかし、ATP は P2 受容体では非特異的なアゴニストとして作用し、P2Y1 では他の P2Y 受容体に比して親和性が高いとされているがまだ議論がある。細胞へのヌクレオチド添加で ALP の活性評価を行った報告は渉猟できず、今回の網羅実験では他のサブタイプの存在も確認された。上記の受容体特異性を考慮して、今後 P2Y1 の特異的アゴニストを用いて、今回の実験結果の再現性とヌクレオチド添加での ALP 活性の上昇機序も検討を要する。

E 結論

脊椎靭帯由来培養細胞ではヌクレオチド受容体が存在し、細胞外ヌクレオチドの作用により、OPLL 由来細胞の骨化傾向への関与が示唆された。

F. 学会発表

未発表

G. 参考文献

1) 古川賢一ら(2002) 脊柱後縦靭帯の骨化進展におけるメカニカルストレスの役割 THE

BONE 16:77-80.

2) Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, Harata S, Motomura S (2003) Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. Bone 33: 475-484.

3) Iwasaki K, Furukawa KI, Tanno M, Kusumi T, Ueyama K, Tanaka M, Kudo H, Toh S, Harata S, Motomura S (2004) Uni-axial Cyclic Stretch Induces Cbfa1 Expression in Spinal Ligament Cells Derived from Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Calcified Tissue International 74: 448-457

4) Bowler WB (2001) Extracellular nucleotide signaling: a mechanism for integrating local and systematic responses in the activation of bone remodeling. Bone 28: 507-512

5) Burnstock G (1993) Physiological and Pathological roles of purines. Drug Development Research 28: 195-206

6) Alex P, Milena R (2003) Extracellular ATP stimulates the early growth response protein 1 (Egr-1) via a protein kinase C-dependent pathway in the human HOBIT cell line. Biochemical Journal 373: 815-824

後縦靱帯骨化症における高分解型 18FDG-PET を用いた
頸髄グルコース代謝解析

福井大学医学部整形外科

内田 研造、馬場 久敏、中嶋 秀明、彌山 峰史、佐藤 竜一郎

研究要旨

高分解能 PET を用いて後縦靱帯骨化症の頸髄グルコース代謝の画像化と定量化を行なった。FDG-PET による頸髄グルコース代謝量は脊髄実質の代謝量を反映するものであり、後縦靱帯骨化症においては、脊髄症発症の有無、手術適応、手術時期について大きな示唆を与えるものであると考えられた。

A. 研究目的

Flouro-deoxy glucose (FDG)-Positron emission tomography (PET) は、神経組織のグルコース代謝量、活性を定性（可視化）、定量化することが可能な画像装置である。脊髄に対する PET 検査は、解像度の問題から物理学的に不可能と考えられてたが、1983 年に Di Chiro らが、解像度 7 mm の Neuro PET と 18FDG を使用し、延髄から第 3 頸髄までの頸髄グルコース代謝活性の定量化および画像表示を報告した。その後我々はこれまでに高分解能を有する positron emission tomography (PET) を用いて脊髄実質の組織代謝の側面から、圧迫性頸髄症においてその臨床意義について報告してきた 1)、2)。今回、後縦靱帯骨化症（連続型、混合型）の頸髄のグルコース代謝を測定し、他の画像所見、臨床症状と比較検討した。

B. 研究方法

後縦靱帯骨化症 8 例（男：6 例、女：2 例、平均年齢 45.6 歳）を対象とした。骨化形態は、連続型 4 例、混合型 0PLL4 例であった。8 例中 5 例は外科的手術を要した。手術症例は術前・術後に MRI を撮像し、除圧前後の脊髄形態と輝度変化を観察した。臨床症状は日整会頸髄症治療成績判定基準（JOA スコア）に基づき評価した。トレーサーには 18F-2-fluoro-deoxyglucose (FDG) を使用、吸収補正のために、Ga(ガリウム)-68 線源を用いた transmission scan を施行後、日本鋼管(NKK)製 12MeV 超小型サイクロトロンと自動合成装

置を用いて作成した放射性グルコース (18F-FDG) を、10mCi (370MBq) 被検者に投与、投与後 0-60min までの 18F の放射濃度を、GE Advance PET scanner で撮像した。空間分解能は 4.25 mm、断面内分解能、軸方向分解能は共に 4.2mm である。Hanning filter をもちいて、放射線画像を作成後、体重、投与量でグルコースの標準摂取量を補正、画像再構築を行った。経時的に採血を行った glucose 代謝率は、まず Sokoloff model を用いて brain cortex における反応速度定数と一括定数を適応して計算致した。画像解析装置 (Sun Sparc 20 Workstation) を用い、35 slice の横断像において横径 10.3 mm の関心領域 (ROI: range of interest) を設定、最大 count 数をもって各々の関心領域における metabolic tissue activity とした。頸髄循環 glucose 代謝量の簡易指標として、SUV [standerdized uptake value = ROI (KBq, cc)/Injected Dose (MBq) x Body Weight (Kg) × 60 (kg/W)] を計算し、平均値として表示した。

(倫理面への配慮)

当該臨床研究は written informed consent を得て行われた。18FDG-PET 検査は平成 10 年以降は福井医科大学高度先進医療として行われた。

C. 研究結果

PET を施行し得た OPLL8 例について図 1 に示す。OPLL を有しながらも神経症状が出現していない 3 例の SUV 値はほぼ正常であり、手術に至った 5 例は非手術群に比べ、高値 (平均グルコース代謝量 2.73mg/ml) を呈していた。2 例については術後にも評価し、両者とも SUV の正常化が得られた。

(症例供覧)

61 歳、男性。頸椎 X 線像および MRI では C3-6 高位において混合型 OPLL を求めた (図 2 a, b)。JOA スコアは 12 点と中程度の脊髓症を認めた。術前に施行した PET では脊髓のほぼすべての高位で SUV 値が増加しており、脊髓全体の SUV 値も 2.68mg/ml と高値を示していた (図 2 c)。脊柱管拡大術を行った結果、除圧後 0.5 年を経て JOA スコアは 16 点と神経症状に改善が認められ、術後 SUV 値も正常化した。

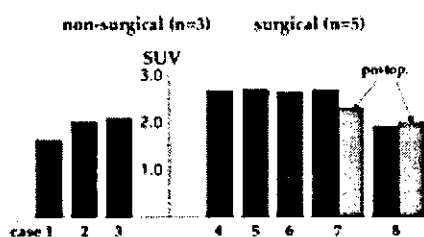
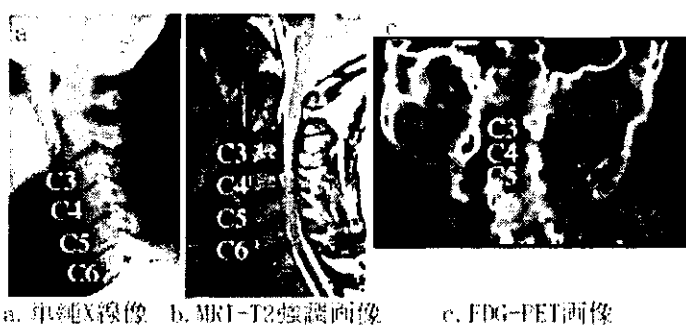


図 1. OPLL8 例の平均 SUV 値 手術群では術前 SUV 値が高値となっている。



a. 単純X線像 b. MRI-T2強調画像 c. FDG-PET画像

図 2. 手術例供覧 61 歳 男性 C3-C6 混合型 OPLL

脊髄平均 SUV 値は 2.68mg/ml. 各高位別では C2: 2.77, C3: 2.47, C4: 3.04, C5: 2.22, C6: 2.66, C7: 2.77mg/ml であった。

D、考察

脳組織において、局所ブドウ糖利用率の測定がなされてから、¹⁸F-2-fluoro- deoxyglucose (FDG) -PET により、多くの神経疾患において従来の画像診断が猫出しえなかった機能異常を検出することが可能となった。神経組織においては、神経系の主要な機能は興奮伝導であり、そのエネルギー消費の大部分は神経細胞の膜電位を維持し、興奮伝導の後に、膜電位を回復するためのイオンの能動輸送に用いられていると考えられる。神経組織の活動エネルギーはほとんどグルコースの酸化代謝によってなされ、脳のグルコース代謝は解糖系とクエン酸回路を主道としている。従って局所の神経組織が活動した場合には、それはそのままグルコース代謝と酸素代謝の増大（血流量の増減）としてあらわれるものと考えられている。また、虚血性疾患などの血管障害と異なり、変性および退行性変性の場合には

通常血流と代謝はマッチしていると考えられる。すなわち、グルコース代謝は神経組織の活動性をあらわす極めてよい指標になると考えられる。今回、18FDG-PET によって測定した圧迫状態にある脊髄の代謝量は、後縦靭帯骨化による脊髄症の有無を反映していた。一般に 18FDG-PET が測定しているグルコース代謝の低下は 1) シナプスの機能低下、2) 神経細胞の脱落、と考えられているが、圧迫部位を含めた脊髄組織にみられる病理学的変化と矛盾しない。しかし、今回、高分解能 PET を用いたとはいえ、小さな被写体（脊髄）と半値幅より生じる部分容積効果（partial volume effect）の影響もあると考えられるので、関心領域（ROI）の最大カウント数を求めたが、今後は実験モデルをもちいたリカバリー係数の補正も必要と考えられる。

圧迫性頸髄症に対するその重症度、治療効果の把握には、過去様々の試みがなされている。脊髄横断面積の測定や電気生理学的アプローチとして除圧前、術中の脊髄誘発電位による予後判定の試みがされてきた。最近では MRI において髄内輝度変化を観察し 9)、いわゆる“T2 high”が、その予後に関係しているといわれているが、現在まだ一致した意見は得られていない。今回の PET による頸髄グルコース代謝量（SUV）は後縦靭帯骨化による脊髄症の有無に関係し、脊髄症の発生機序、手術適応、手術時期について大きな示唆を与えるものであると考えられる。

E. 結論

後縦靭帯骨化症に対して高分解能 PET を用い、頸髄グルコース代謝の画像化と定量化を行なった。FDG-PET による頸髄グルコース代謝量は脊髄実質の代謝量を反映するものであり、後縦靭帯骨化症においては、脊髄症発症の有無、手術適応、手術時期について大きな示唆を与えるものであると考えられた。

参考文献

- 1) Baba H, Uchida K, Sadato N et al. Positron usefulness of 18F-2-fluorodeoxy D-glucose-positron emission tomography in cervical compression myelopathy. Spine 24: 1449-1454, 1999
- 2) Uchida K, Kobayashi S, Yayama T et al. Metabolic neuroimaging of the cervical spinal cord in patients with compression myelopathy: a high-resolution positron emission tomography study. J Neurosurg (Spine)1: 72-79, 2004.

G. 研究発表

Baba H, Uchida K, Sadato N et al. Positron usefulness of 18F-2-fluorodeoxy D-

glucose-positron emission tomography in cervical compression myelopathy. Spine 24: 1449-1454, 1999.

Uchida K, Kobayashi S, Yayama T et al. Metabolic neuroimaging of the cervical spinal cord in patients with compression myelopathy: a high-resolution positron emission tomography study. J Neurosurg (Spine)1: 72-79, 2004.

分担研究者 市原和彦、田口敏彦、金子和生
山口大学整形外科

【研究要旨】 今回、我々は脊髄力学特性データを有限要素法に導入し頸髄圧迫コンピュータ・シミュレーションを行い、バーチャル急性および慢性脊髄損傷実験を行った。外傷性急性脊髄損傷モデルでは、脊髄内応力は急激に上昇し、脊髄は高度に傷害された。長年ゆっくりと脊髄圧迫が進んでいくCSMやOPLLモデルでは脊髄内応力は常に低く保たれ、脊髄傷害は起こしにくく、症状も出にくいと考えられた。またCSMやOPLLの急性悪化モデルは、前方からの慢性圧迫状態に後方から動的圧迫が加わることで再現できた。そして脊髄内応力は脊髄の後方を中心に急上昇し、指のしびれ、Numb clumsy hand、手指巧緻運動障害や歩行障害などの臨床症状を説明できた。

A. 研究目的

私達は現在までに脊髄灰白質、白質の力学特性を求め、脊髄灰白質は白質よりも硬く脆いこと、脊髄灰白質、白質の応力緩和現象の存在を確認し報告した。

今回われわれは、これらの脊髄力学特性データを有限要素法に導入し頸髄圧迫コンピュータ・シミュレーションを行い、バーチャル急性および慢性脊髄損傷実験を行った。そして圧迫速度、圧迫方法を変化させることで、急性、慢性、および急性悪化時の脊髄内部応力状態の解析を行い、外傷性脊髄損傷、慢性脊髄圧迫障害のメカニズムの解明を行った。そして頸髄症(以下CSM)や後縦靭帯骨化症(以下OPLL)の病態解明を試みた。

B. 研究方法

ヒト頸髄横断面の白質、灰白質および軟膜を各々要素分割し、有限要素法を用いた脊髄モデルを作成した。総節点数は966、総要素数は315で、境界条件は前方中央から骨性物質で圧迫を加え、130度の椎弓で頸髄後

面を支えるとした(Fig.a)。解析は平面応力条件で非線形粘弾性計算を行い、応力にはせん断応力を採用した。構成要素、材料定数は灰白質、白質および軟膜を用いた。

Model 1(前方動的圧迫モデル):脊髄の前方から、圧迫速度 1mm/sec、変位 3mmの骨性動的圧迫が加わり、脊髄を瞬時に圧迫する。

Model 2(前方静的圧迫モデル):脊髄の前方から、圧迫速度 0mm/sec、変位 3mmの骨性静的圧迫が加わり、脊髄をゆっくりと圧迫する。

Model 3(前方静的圧迫 + 後方動的圧迫モデル):脊髄の前方から、圧迫速度 0mm/sec、変位 2mmの骨性静的圧迫が加わり、脊髄はゆっくりと圧迫されている。この状態に、黄色靭帯のたくれこみによる後方動的圧迫が加わったのもで、その後方動的圧迫速度は 1mm/sec、変位は1mmである。

C. 研究結果

【Model 1】

脊髄は急激に圧迫されるため、脊髄内応

力は急速に大きく上昇した。特に灰白質と後側索、後索の応力の上昇が著しかった (Fig. b)。

【Model 2】

脊髄はゆっくりと圧迫されるため、脊髄内応力は非常に低く、上昇しにくかった (Fig. c)。

【Model 3】

後方からの動的圧迫でまず後索外側、後角の応力が急激に上昇し、圧迫が強くなると側索の応力が急激に上昇した。さらに圧迫が進むと、今度は灰白質の応力が上昇した (Fig. d)。

D. 考察

モデル1は前方から急性の圧迫が加わるモデルで、脊髄内応力は急激に上昇し、脊髄は高度に傷害される。よって、このモデルは外傷性脊髄損傷モデルと考えられる。モデル2は前方から慢性の圧迫が加わるモデルで、脊髄内応力は常に低く保たれる。よって、脊髄傷害は起こしにくく、症状も出にくいと考えられる。これは長年ゆっくりと脊髄圧迫が進んでいくCSMやOPLLなどの状態と考えられる。モデル3は前方からの慢性圧迫状態に、後方から動的圧迫が加わった状態で、脊髄内応力は脊髄の後方を中心に急上昇する。これはCSMやOPLLの急性悪化状態と考えられる。

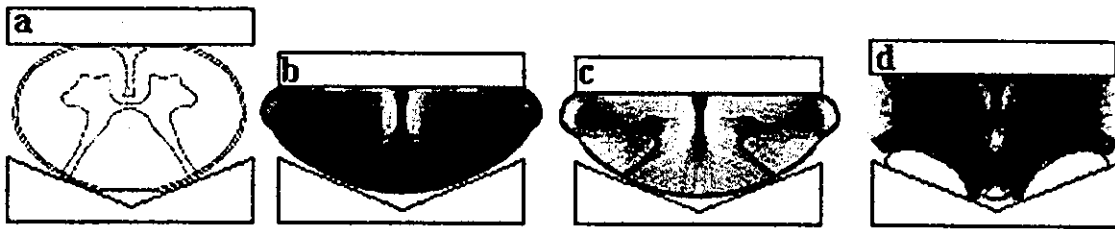
交通事故や転落などにより脊髄への大きな外力は容易に脊髄障害を来す。一方、CSMやOPLLなど、長年にわたる圧迫でも脊髄内応力は低く保たれ、よって脊髄障害は来しにくいと考えられる。これには脊髄の応力緩和が関与しており、脊髄の耐用性として Baba、

Carlson によって報告されている。この状態に後方からの動的圧迫が加わると、後索の外側線維と後角の応力が急上昇し、これが指のしびれや Numb clumsy hand を発症させると考えられる。圧迫がさらに進むと錐体路が傷害され、これが手指巧緻運動障害や歩行障害の原因となると考えられる。これはCSMやOPLL患者の急性憎悪状態と考えられる。

今回の結果から、われわれのバーチャル脊髄圧迫実験モデルは、圧迫性脊髄傷害の病態を再現できると考えられる。今後、軟膜や血管、中心管などの要素を導入することで、より正確なモデルを作成できる。これにより、脊髄が圧迫を受けたときの脊髄内応力をより正確に、ビジュアルに表現でき、脊髄傷害のメカニズムを解明できるであろう。そして予後予測や手術シミュレーションへと応用できると考えられる。

E. 結論

脊髄力学特性データを導入したコンピュータ・シミュレーション技術を用いて、バーチャル急性および慢性脊髄損傷実験を行い、CSMやOPLLによる頸髄圧迫障害のメカニズムを解析した。前方からの動的圧迫は脊髄内応力を急上昇させ、高度な脊髄障害を引き起こした。静的圧迫により脊髄内応力は低く保たれ、脊髄症状は引き起こしにくかった。黄色靭帯のたぐれ込みによる後方動的圧迫は側索、後索の障害を引き起こした。よってCSMやOPLLの治療には、静的圧迫要素だけでなく、脊髄障害を急激に悪化させる Dynamic Factor のコントロールが重要と考えられた。



- a: ヒト頸髄横断面モデル: 白質、灰白質、軟膜に要素分割されている。脊髄モデルは前方から骨性Barで圧迫され、脊髄後方は骨性椎弓で支えられている。
- b: 前方急性圧迫モデル: 脊髄全体の応力は急上昇する。
- c: 前方慢性圧迫モデル: 脊髄全体の応力は、低く保たれる。
- d: 前方慢性圧迫 + 後方動的圧迫モデル: 脊髄の後方(後索、錐体路)を中心に、応力が急上昇する。
(白色系は応力が低く、黒色系は応力の上昇を表す)

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H Yonemura et al. Nerve root distribution of deltoid and biceps brachii muscle in cervical spondylotic myelopathy: a potential risk factor for postoperative shoulder weakness after posterior

decompression. J Orthop Sci 9: 540-544: 2004.

- 2) K Kaneko et al. Distal-type cervical spondylotic amyotrophy: assessment of pathophysiology from radiological findings on magnetic resonance imaging and epidurally recorded spinal cord responses. Spine. 2004 23: E185-8. 2004

2. 学会発表

- 1) K Ichihara et al. Cervical Spine Research Society 31st Annual Meeting. (2003. 12.11-12.13 Arizona, USA)
Mechanism of the spinal cord injury and the cervical spondylotic myelopathy: Computer simulations utilizing mechanical features of the white and gray matter of the spinal cord.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)に対する
神経栄養因子発現ベクターを用いた遺伝子導入

福井大学医学部整形外科
Xu Kan、内田 研造、中嶋 秀明、馬場 久敏

研究要旨

慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)を用いて、圧迫部位に位置する前角細胞群に逆行性に神経栄養因子遺伝子導入を行い、その神経保護効果について免疫組織化学的に検討した。胸骨乳突筋内に投与された LacZ gene marker(AdV-LacZ)は C1-C3 に分布する脊髄副神経内側核に発現していた。圧迫部においてはコントロール群に比べ AdV-BDNF 群ではその染色性は強く、Nissl 染色、ChAT 免疫染色、AChE 染色いずれにおいても有意に前角部陽性細胞数は増加していた。慢性脊髄圧迫モデルに対する adenovirus vector を用いた逆行性神経栄養因子導入は、圧迫状態にある前角ニューロンに対する生存維持、再生能力の賦活化に寄与することが実験的に示唆された。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症に代表される圧迫性脊髄症では、圧迫の程度に応じて脊髄が壊死、変性に陥ると報告されている。しかしながら、高度の圧迫があっても麻痺が軽度であったり、予後不良と考えられる症例でも脊髄の除圧を行えば、予想以上の麻痺回復をしめすことがある。その背景には組織構造の破綻にもかかわらず、機能を維持する機構、すなわち脊髄の可塑性の存在が推測される。このような観点より、我々は慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy mice)を用い、形態学的、免疫組織化学的側面より、圧迫を受けた脊髄組織における生存維持、軸索再生および組織修復に関しての基礎的実験を行い、圧迫刺激を受けた際に、神経細胞およびグリア細胞自身が神経栄養因子、特に Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)を強発現し、神経細胞、特に前角ニューロンの生存維持に関与していることを報告した(1-2), 4-6)。

近年、脊髄再生の試みとして神経栄養因子、再生因子などの補充療法が散見される。しかしながらその投与方法については様々な問題点が指摘されている。今回非侵襲的な方法として adenovirus vector を筋肉内に注入することで(逆行性注入)、脊髄前角細胞内に BDNF 遺伝子を導入することを企図した。我々は慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)を用いて、圧迫部位に位置する前角細胞群に逆行性に神経栄養因子遺伝子導入を行い、その神経保護(neuroprotection)効果について免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

1) 非増殖型 adenovirus-vector(AdV)の作製

β -galactosidase、mouse BDNF をそれぞれ組み込んだ非増殖型 adenovirus vector(AdV-LacZ, AdV-BDNF)を COS-TPC 法にて作製した(3)。コスミドベクターにそれぞれのインサートを導入し、このコスミドベクターを制限酵素処理済み DNA-TPC とを 293 細胞に co-transfect により導入した。以後増殖、精製し、 5×10^{10} まで力価を調節した。

2) X-gal 染色

生後 16 週齢の twy マウス 6 匹、正常対象群には同週齢の ICR マウス 6 匹を用いた、ネン

ブタール腹腔内注射後、マウスを固定し顕微鏡視下に左胸骨乳突筋内にマイクロシリンジにて AdV-LacZ を $25\mu\text{l}$ (1.0×10^9 PFU) 注入した。注入後 1 週後に、灌流固定後、直ちに延髄から第 5 頸髄までの脊髄を摘出し、 $25\mu\text{m}$ の凍結横断連続切片を作製した。X-gal 反応液にて 24 時間 37°C で反応させた後、鏡視した。脊髄高位は便宜的に C1 前根より、C2 後根まで(圧迫吻側部)、C2 後根から C3 後根まで(最大圧迫部)、C3 後根から C4 後根まで(圧迫尾側部)の 3 つに分け、評価した。

3) 組織学的検討

生後 16 週齢の twy マウス 12 匹、正常対象群には同週齢の ICR マウス 6 匹を用いた。注入 4 週後、ネンブタール腹腔内注射後、2%パラホルムアルデヒド緩衝液 (0.1MPBS) にて灌流固定後、直ちに延髄から第 5 頸髄までの脊髄を顕微鏡視下に摘出し、同固定液による 1 時間の後固定をおこなった。30%ショ糖緩衝液で 48 時間浸潤し、 $20\mu\text{m}$ の凍結横断連続切片を作製し、0.3%Triton X-100 を含む 0.1M Tris-HCL buffer、 $\text{ph}7.6$ 、に 24 時間浮遊させた。一次抗体には抗 BDNF 抗体を用い、48 時間 4°C で反応させた後、biotinilated anti-rabbit IgG antibodies (Vecter lab .ABC elite kit) を添加、12 時間 4°C で反応させ、ABC 法に準じて免疫染色をおこなった。発色は Ni-DAB で行い、可視化した。また残存ニューロン賦活化効果については $50\mu\text{m}$ の凍結横断連続切片を作製し Nissl 染色、choline acetyl transferase (ChAT) による免疫染色、acetylcholine esterase (AChE) 染色での陽性細胞数 (前角部) の検討を行った。

(倫理面への配慮)

当該動物実験は、福井医科大学倫理委員会に実験プロトコルを提出、審議され、福井医科大学動物実験倫理規定に即して実験が行われた。実験は、福井医科大学実習機器センター、動物実験研究施設、ならびに福井医科大学医学部整形外科学講座内研究室にて行われた。

C. 研究結果

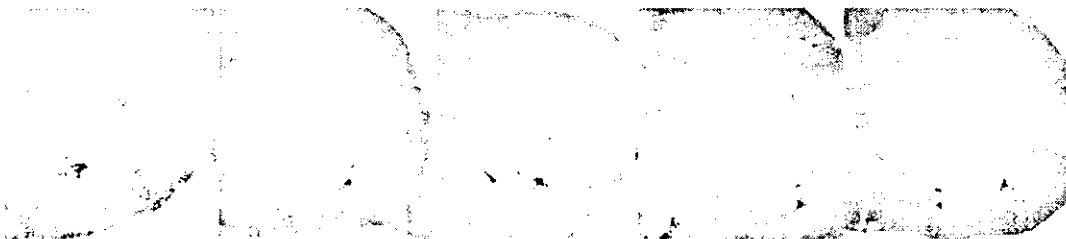
1) X-Gal 染色

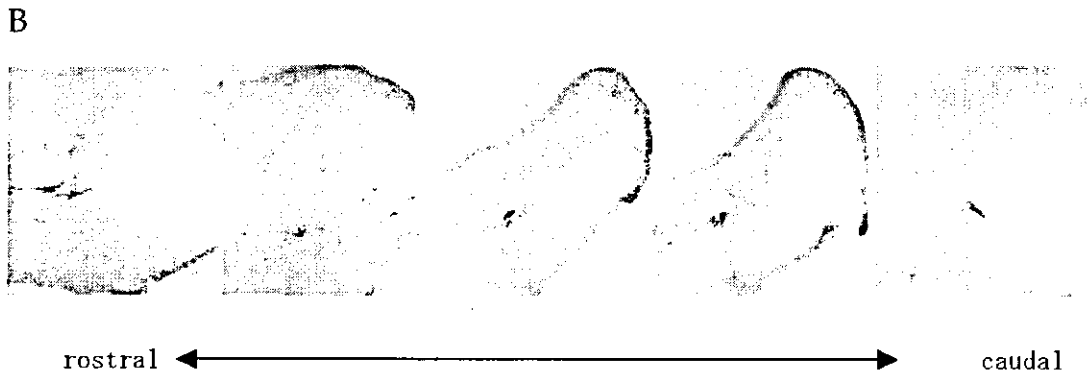
Twy マウス、ICR マウス共に、C1-C3 に分布する左脊髄副神経内側核に陽性細胞が確認された (図 1)。

2) 免疫染色、残存ニューロン細胞数

BDNF 抗体では twy マウス、ICR マウス共に灰白質、特に前角細胞、また介在ニューロンが染色された。特に最大圧迫部、尾側部の前角ニューロンの染色性は AdV-LacZ 群に比べ、AdV-BDNF 群では有意に高かった (図 2)。Nissl 染色、ChAT による免疫染色、AChE 染色においても同様の結果であり、コントロール群に比べ AdV-BDNF 群では有意にその染色性は強かった (図 3)。前角部での陽性細胞数の比較を図 4 に示す。Nissl 染色、ChAT 免疫染色、AChE 染色いずれにおいても最大圧迫部位において有意に陽性細胞数は多かった。

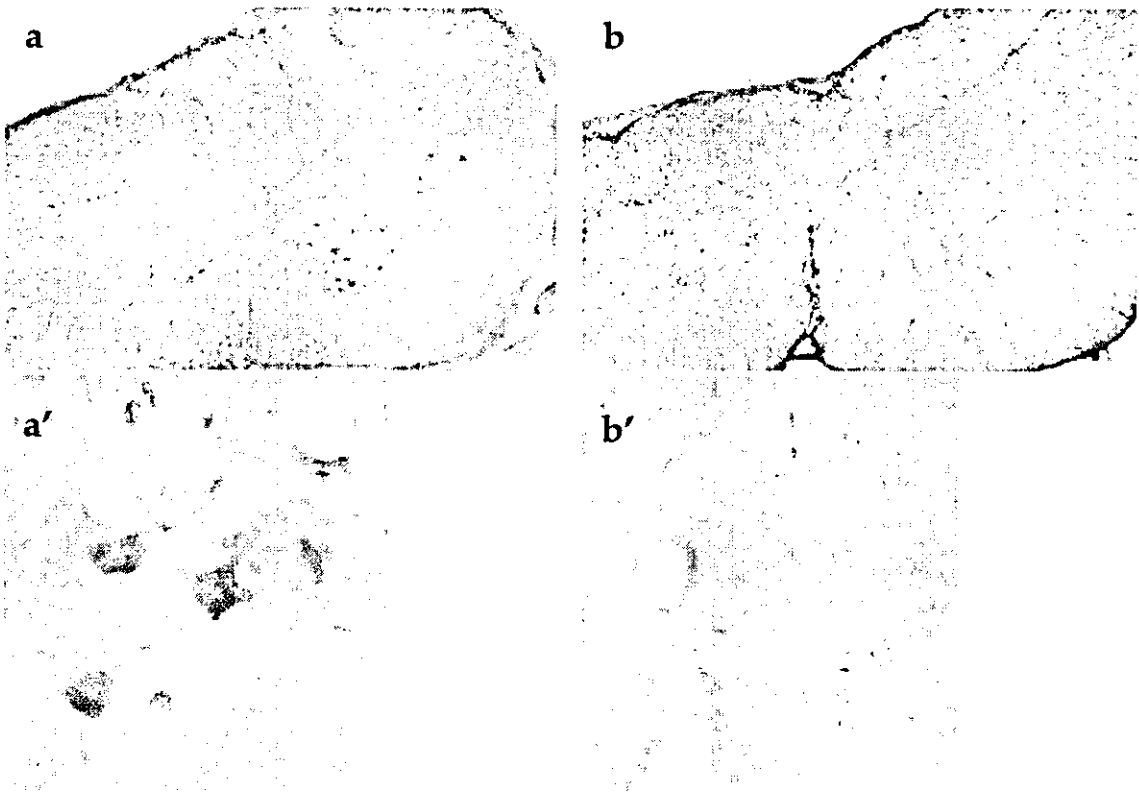
A





☒ 1. X-gal staining (X20)

A, AdV-LacZ-gene-injected ICR mouse; B, AdV-LacZ-gene-injected twy mouse



☒ 2. BDNF staining

a, a' AdV-BDNF-gene-injected twy; b, b' AdV-LacZ-gene-injected twy

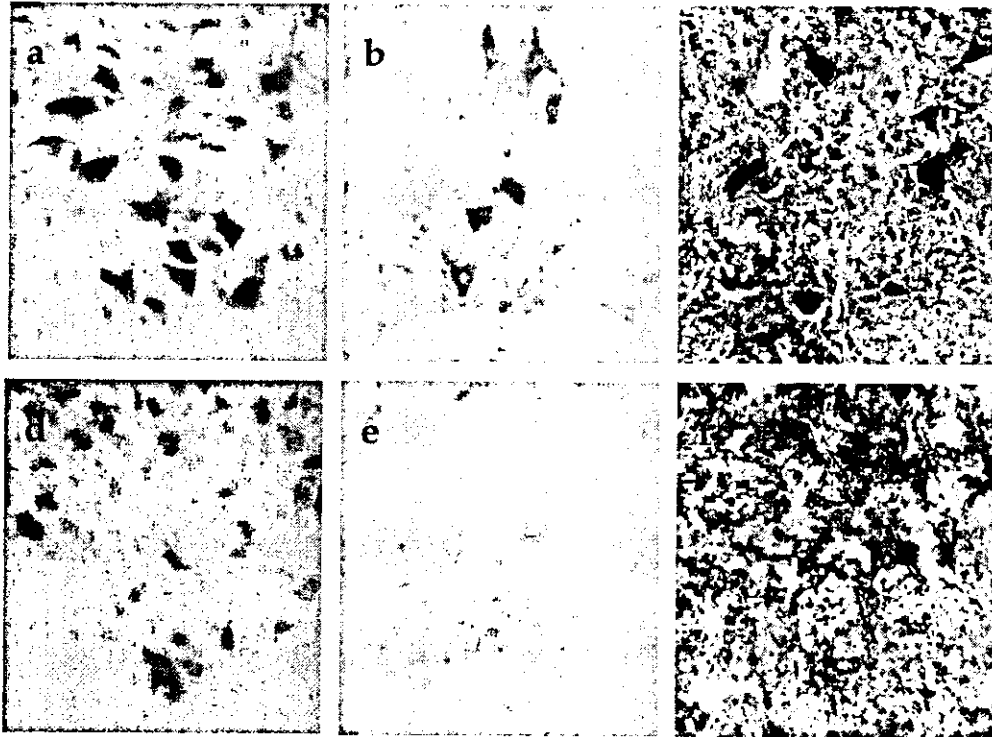
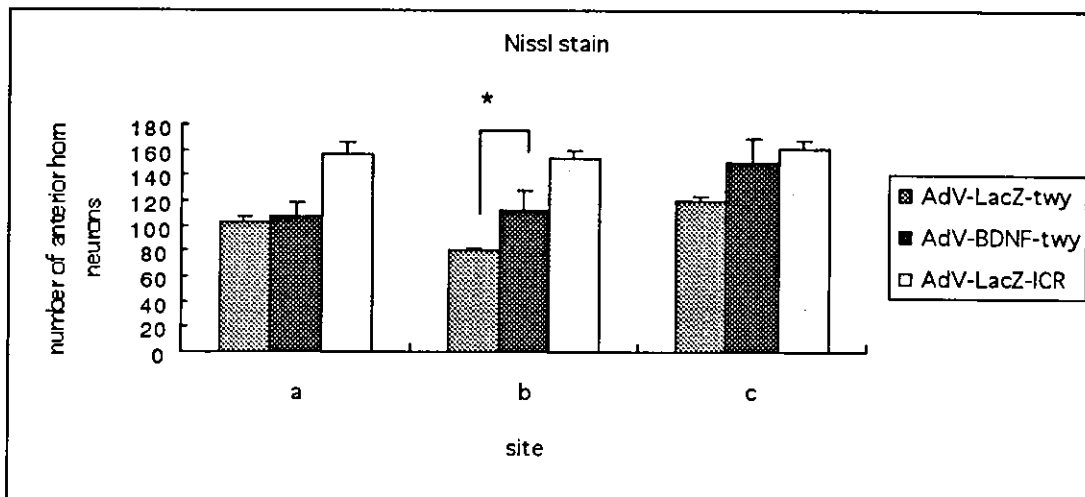


图 3. twy mouse 前角部陽性細胞
 (a-c), Adv-BDNF-gene-injected, (d-f) Adv-LacZ-gene-injected
 Nissl staining (a, d), ChAT staining (b, e), AChE staining (c, f)



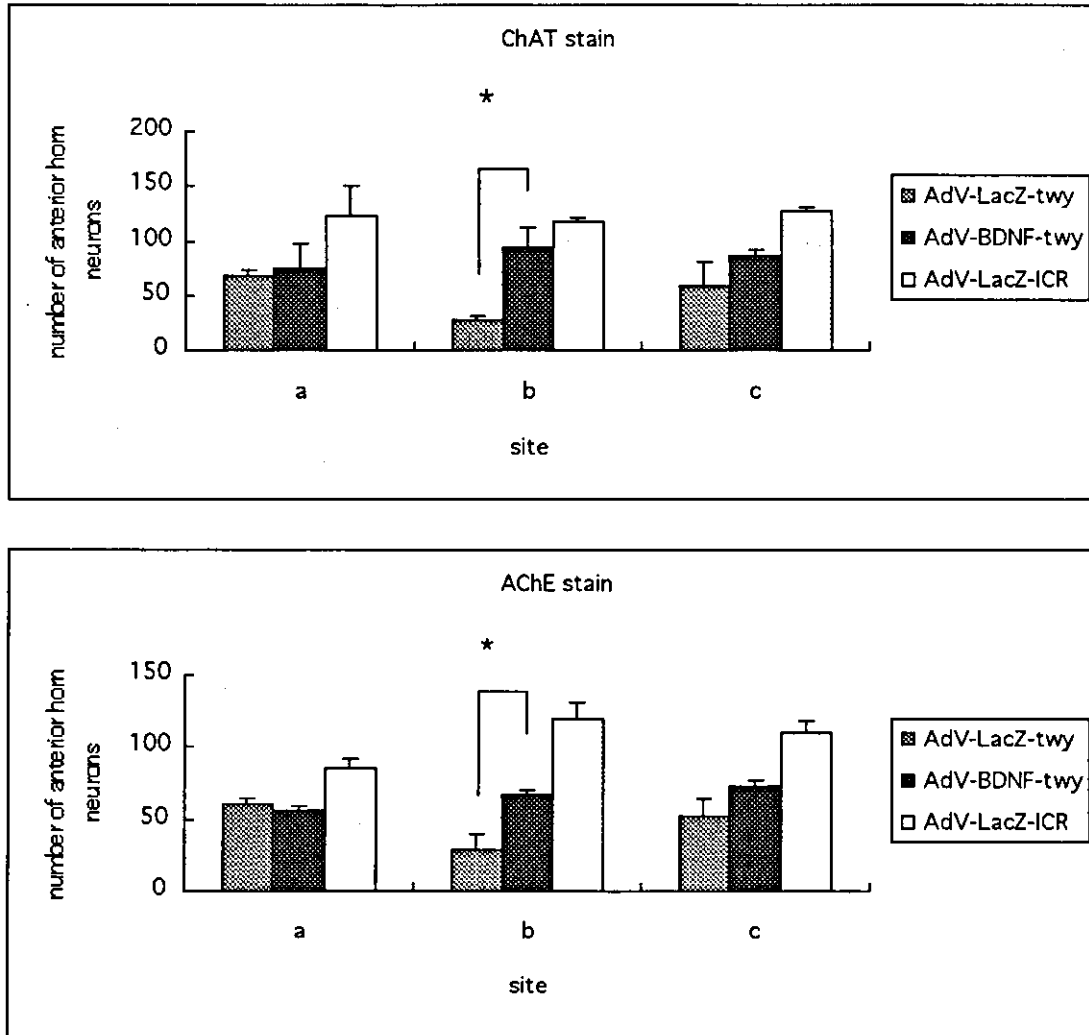


図4 高位別の Nissl, ChAT, AChE staining 陽性前角細胞数

D. 考察

BDNF を代表とする神経栄養因子は、特異的レセプターを介してニューロンに作用し、神経突起の伸展促進、生存維持、分化誘導などの活性を示す蛋白性分子群である。BDNF, NT-3 はその代表的な蛋白とされている。最近では損傷脊髄において軸索再生が生じない一つの理由として内因性の神経栄養因子の欠乏が報告されている。そのため損傷脊髄内への神経栄養因子補充療法においての、組織修復効果、軸索伸長効果については異論はないとされているが、しかしながらその投与方法についてはいまだ様々な報告がなされているのが現状である。

今回の導入方法は、筋肉内から軸索流にのり、逆行性に前角細胞へ直接輸送する方法で、損傷脊髄に非侵襲的であり、免疫反応を最大限に抑制することができることと apoptosis 助長効果がないことが報告されている。慢性圧迫に伴う軸索流の障害により、導入効率が低下することが危惧されたが、今回の我々の結果より、adenovirus が強力な retrograde tracer として働き、細胞感染を生じさせたものと推察される。本研究においては、上位頸髄前角細胞に分布する胸骨乳突筋を target organ に設定したが、損傷部

位に応じた target organ の選択も可能であることも逆行性遺伝子導入の大きな利点のひとつと考えられる。

障害脊髄周囲での cholinergic enzymes (ChAT、AChE) の活性上昇は、細胞生存の指標として重要であり、特に運動機能と相関があるとされている。Adv-BDNF 群では、細胞死の抑制、cholinergic enzymes 活性上昇、長期間の神経栄養因子補充など、頸髄前角細胞に対して非常に有益な効果をもたらしていた。

E. 結論

Adenovirus vector を用いた逆行性神経栄養因子遺伝子導入は、脊髄に非侵襲的な導入方法であり、前角細胞に選択的、効率的で、かつ長期間の神経栄養因子の神経保護効果が期待され、圧迫状態にある前角ニューロンに対する生存維持、再生能力の賦活化に寄与する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Baba, H., Maezawa, Y., Imura, S., Kawahara, N., Nakahashi, K., Tomita, K. (1996) Quantitative analysis of the spinal cord motoneuron under chronic compression: an experimental observation in the mouse. *J Neurol.* 243; 109-16.
- 2) Baba, H., Maezawa Y., Uchida K., Imura S., Kawahara N., Tomita K. Three-dimensional topographic analysis of spinal accessory motoneurons under chronic mechanical compression: an experimental study in the mouse *J Neurol* 244 (4): 222-229, 1997
- 3) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C., Saito, I. (1996) Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93; 1320-4.
- 4) Uchida, K., Baba, H., Maezawa, Y., Furukawa, S., Furusawa, N., Imura, S. (1998) Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy): morphological changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotrophic factors. *J Neurol.* 245; 781-93.
- 5) Uchida, K., Baba, H., Maezawa, Y., Furukawa, S., Omiya, M., Kokubo, Y., Kubota, C., Nakajima, H. (2003) Increased expression of neurotrophins and their receptors in the mechanically compressed spinal cord of the spinal hyperostotic mouse (twy/twy). *Acta Neuropathol.* 106; 29-36.
- 6) Uchida, K., Baba, H., Maezawa, Y., Kubota, C. (2002) Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice. *Spine.* 27; 480-6.

G. 研究発表

Xu Kan、内田研造、中嶋秀明、小林茂、小久保安朗、馬場久敏（2004.10）慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)に対する神経栄養因子発現ベクターを用いた遺伝子導入 第19回日本整形外科学会基礎学術集会

PACAP の急性脊髄損傷後のアポトーシス抑制に関する研究

片平光昭(鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学)

林 協司(鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学)

松永俊二(鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学)

小宮節郎(鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学)

研究要旨

今回の研究対象である PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)は、'89 年に共同研究者である宮田らがラット下垂体細胞のサイクリック AMP 産生刺激活性を指標としてヒツジ視床下部抽出物より単離、構造決定されたセクレチン・グルカゴンファミリーに属する神経ペプチドであり、近年その神経栄養因子としての作用が注目されている。本研究ではラット急性脊髄損傷モデルにおける PACAP の神経保護効果をアポトーシスの抑制効果を指標として検討した。ラット急性脊髄損傷モデルにおいて、PACAP 投与群では CSF 投与群に比較して損傷3日後の TUNEL および active caspase-3 陽性細胞数の出現が抑制されており、PACAP 投与による脊髄損傷後のアポトーシス抑制効果が示唆された。また、PACAP 投与群では損傷4時間後において脊髄損傷後のアポトーシスのシグナル伝達に関与していると思われる JNK の活性が抑制傾向にあり、一方、神経再構築に関与しているといわれる ERK 活性は増強傾向にあった。その作用機序はまだ明らかでなく更なる研究が必要であるが、PACAP はごく微量でその効果を発揮することや低分子であり容易に血液脳関門を通過するなどの性質から、脊髄損傷に対する治療薬としての可能性を有していると思われた。また、今回は急性脊髄損傷に対する PACAP の神経保護効果を検討したが、その作用機序や有効性が確認されれば、将来的には後縦靭帯骨化症などの慢性脊髄圧迫に対する作用も検討してゆく余地がある。

A.研究目的

PACAP はセクレチン・グルカゴンファミリーに属する神経ペプチドである。PACAP の機能としては視床下部因子・神経伝達因子としての作用があるが、近年、小脳顆粒細胞のアポトーシス抑制や脳虚血モデルにおける PACAP 投与の有効性が報告されるなど、中枢神経系における神経栄養因子としての作用が注目さ

れ盛んに研究されている。脊髄においても PACAP が損傷脊髄における TNF- α の分泌を抑制することが報告されており興味深いところである。

また、これまでに我々は脊髄損傷後のアポトーシスに MAPK を介したシグナル伝達に関与していることを免疫組織化学的に報告してきた。そこで本研究では、ラット急性脊髄損傷モデルに

おける PACAP の神経保護効果を、アポトーシスの抑制効果を指標として検討した。

B. 研究方法

14 週齢のオス Wistar rat を使用し、第 9 胸髄に 120g で 2 分間の圧迫を加えた完全脊髄損傷モデルを作製。損傷直後に、マイクロシリンジを用いて損傷部のクモ膜下腔内へ、PACAP を 10pmol/10 μ l, 100pmol/10 μ l 投与した群、およびコントロールとして人工髄液 (CSF) を 10 μ l 投与した群を作製した。

まず損傷直後から 7 日後まで経時的にラットを灌流固定の後、脊髄を摘出し厚さ 10 μ の凍結切片を作製した。切片は損傷中心より 1cm 頭側における axial 切片、および損傷部を含む 1.5cm 長の sagittal 切片を作製し TUNEL 染色および抗 active caspase-3 抗体を用いた免疫染色でアポトーシスを来した細胞の出現を免疫組織化学的に観察した。

また、損傷直後・4 時間・24 時間後に損傷中心から 1cm 頭側の脊髄を摘出。RT-PCR を行い、脊損後の PACAP およびそのレセプターの発現も観察した。

最後に損傷直後から 72 時間後まで経時的に、損傷中心から 1cm 頭側の脊髄を摘出し、Western blot を行い ERK および JNK といった MAPK family の発現を観察した。

組織学・免疫組織学用 31 例・遺伝子・タンパク発現解析用各 6 例の total 43 例について検討した。

C. 研究結果

CSF 投与群での TUNEL 陽性細胞数の時間推移をみたところ、損傷 3 日後にピークがみられた。そこで CSF 投与群・PACAP 投与群にお

ける損傷 3 日後の TUNEL 陽性細胞数を比較したところ、PACAP 投与群での TUNEL 陽性細胞数は CSF 投与群に比べ減少傾向にあり、特に PACAP100pmol 投与群では CSF 群より有意に減少していた。

抗 active caspase-3 抗体を使った免疫染色でも、PACAP 投与群では CSF 投与群に比べ白質における陽性細胞の出現が著明に抑制されていた。

脊損後の PACAP および PACAP レセプターの発現は損傷後 24 時間まではその発現量に大きな変化は認めなかった。

Western blot による MAPK family 発現は、PACAP 投与群では損傷 4 時間後における JNK/SPAK の活性は抑制されたが、逆に ERK の活性は増強している印象であった。

D. 考察

PACAP がどのような機序で抗アポトーシス効果を発揮するのかは未だ明らかではないが、冒頭でも示したようにラット全脳虚血モデルへの PACAP 投与により JNK および p38 の活性が阻害され海馬のアポトーシスを抑制したとの報告や、その他多数の神経栄養因子としての PACAP に関する報告もあり、今回の実験結果は部分的にはあるが脊髄損傷における PACAP のアポトーシス抑制効果を検証するひとつの手がかりになるかもしれないと考えられた。

E. 結論

1) ラット急性脊髄損傷モデルにおいて、PACAP 投与群では、CSF 投与群に比較して損傷 3 日後の TUNEL および active caspase-3 陽性細胞数の出現が抑制されており、PACAP