



Title	脊髄障害を対象とした動物モデルと血液脊髄関門機能に着目した治療方法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	五月女, 慧人
Description	配架番号 : 2768
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15450号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89959
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SOTOME_Akihito_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 五月女 慧人

学 位 論 文 題 名

脊髄障害を対象とした動物モデルと血液脊髄関門機能に着目した治療方法の開発
(Research of Spinal Cord Disorders for Development of an Animal Model and a Therapeutic Strategy via Protection of Blood-Spinal Cord Function)

【背景と目的】

物理的原因による脊髄障害には、外傷による脊髄損傷と、慢性的圧迫による圧迫性脊髄症がある。どちらも、本質的な治療方法はいまだ確立されていない。

急性脊髄損傷の場合、機械的損傷である一次損傷に引き続いて、生物学的反応である二次損傷が起こり、脊髄の障害範囲が拡大する。この二次損傷には、血液脊髄関門（BSCB）の破綻が関与しており、BSCB の破綻を防げば、二次損傷は軽減することが知られているが、未だ BSCB の破綻を防ぐ臨床的手段は確立されていない。我々は先行研究において、培養脳血管内皮細胞を使用した BSCB 保護薬剤のスクリーニング方法を確立した。この方法で、既存薬 3,200 薬をスクリーニングした結果、最も高い脳血管内皮細胞保護効果を示す薬剤として、次硝酸ビスマス（Bismuth Subnitrate: BS）が同定された。そこで、本研究では、BS は脊髄損傷後の BSCB 保護効果と神経組織保護効果を持つという仮説を設定した。

圧迫性脊髄症も脊髄損傷と同様に、BSCB の破綻が病態に関与するため、BS による BSCB の保護が病態改善に有効な可能性がある。近年、圧迫性脊髄症のモデルとして、生体内で膨張する人工材料をげっ歯類の脊柱管内に留置する方法が使用されているが、人工材料の膨張速度が速いこと、げっ歯類の脊柱管径、脊髄径の成長曲線が不明で、挿入すべき週齢が不明であることから、再現性や実用性に欠ける問題点があった。そこで、本研究では、ラットの脊柱管径、脊髄径の成長曲線を明らかにすることとした。

以上より、本研究の具体的目的は以下の4つとした。1) Lewis ラットの脊柱管径、脊髄径の成長曲線を明らかにすること、2) BS が BSCB 保護効果を持つか明らかにすること、3) BS が脊髄損傷に対する治療効果を持つか明らかにすること、4) BS の薬理機序を解明すること。

【方法】

- 1) 4～40 週齢の Lewis ラットに脊髄造影 CT を撮影した。第五頸椎（C5）と第八胸椎（T8）高位の冠状断 CT 画像にて、脊柱管径、脊髄径を計測し、Space available for the spinal cord (SAC) を算出した。
- 2) 4、8、24 週齢の Lewis ラットの雌を灌流固定し、C5 頸椎の冠状断切片に脱灰組織染色を行った。
- 3) BS の脳血管内皮細胞保護効果の濃度依存性を確認するため、脳血管内皮細胞（hCMEC/D3）を BS（0～500 μ M）で刺激後、過酸化水素（ H_2O_2 ）負荷を与え、最終的な細胞活性を定量した。
- 4) ラット初代脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトで構成する、in vitro BSCB 模擬モデルに、無酸素無糖（OGD）負荷後、BS を添加し、経内皮的電気抵抗（TEER）および sodium fluorescein (Na-F) 透過性を定量した。
- 5) C57/BL6 マウスを用いて、BS または control を前日に投与してから外傷性脳損傷を作成し、24 時間後の損傷部周囲の IgG 漏出面積を組織学的に定量した。
- 6) C57/BL6 マウスを用いて、BS または control を前日に投与してから、C5 頸髄部分切断損傷を作成し、24 時間後の IgG 漏出面積を組織学的に定量した。
- 7) Lewis ラットの C5 頸髄に圧挫損傷を作成直後に BS または control を腹腔内投与し、2 週後に灌流固定し、脊髄の損傷面積と IgG 漏出面積を組織学的に定量した。
- 8) Lewis ラットの C5 頸髄に圧挫損傷を作成直後に BS または control を腹腔内投与し、4 週後、8 週後に Electric von Frey 試験とトレッドミル歩行解析試験を行った。損傷 8 週後に灌流固定し、脊髄の空洞面積とグリア瘢痕面積を定量した。
- 9) hCMEC/D3 に BS または control を投与し、24 時間後の RNA シーケンス解析を行った。
- 10) RNA シーケンスで、BS による薬理機序候補因子を特定後、その候補因子の発現量を、hCMEC/D3 とラット損傷脊髄で、酵素リサイクリング法を用いて定量した。
- 11) 特定した候補因子の阻害薬剤を hCMEC/D3 に投与し、BS の細胞保護効果が減弱するか検討した。

【結果】

- 1) ラットの脊柱管径は 12～20 週齢まで、脊髓径は 20～24 週齢まで拡大していた。圧迫性脊髓症に最も重要な縦径の SAC は 8 週齢以降で変動がなかった。
- 2) C5 頸椎の脱灰組織評価では、椎体と椎弓の一次骨化核は 4 週齢で既に消失していた。椎弓表面の骨膜は 4 週齢で最も肥厚していたが、徐々に菲薄化し、24 週齢ではほぼ消失していた。
- 3) BS は hCMEC/D3 の H₂O₂ 負荷に対して、0.25 μ M 以上で、濃度依存性の細胞保護効果を示した。
- 4) BS は *in vitro* BSCB 模擬モデルの OGD 負荷に対し、TEER を高値に、Na-F 透過性を低値に保ち、BSCB 機能を保護した。
- 5) BS は外傷性脳損傷モデルにおいて、損傷後 24 時間の組織評価で高分子タンパクである IgG の漏出を抑制し、BBB 機能を保護した。
- 6) BS は脊髓部分切断モデルにおいて、損傷後 24 時間の組織評価で高分子タンパクである IgG の漏出を抑制し、BSCB 機能を保護した。
- 7) BS は脊髓圧挫モデルにおいて、損傷後 2 週の組織評価で、損傷面積を縮小させ、高分子タンパクである IgG の漏出を抑制し、BSCB 保護効果と二次損傷抑制効果を示した。
- 8) BS は脊髓圧挫モデルにおいて、損傷後 8 週の組織評価で、空洞面積とグリア瘢痕面積を縮小させた。また、損傷後 4 週、8 週の、感覚機能、歩行機能を改善させた。
- 9) RNA シーケンス解析で、KEGG pathway enrichment analysis を行ったところ、細胞保護作用に深く関与している pathway として、Glutathione metabolism pathway を同定した。
- 10) BS 投与後の細胞内 glutathione 濃度と、C5 脊髓圧挫後 72 時間の脊髓中の glutathione 濃度を定量したところ、control と比較して有意に glutathione 濃度の上昇をみとめた。
- 11) Glutathione 産生酵素阻害薬である L-Buthionine-sulfoximine (L-BSO) と BS を hCMEC/D3 に投与したところ、細胞保護効果が濃度依存的に減弱した。L-BSO 自体には細胞障害作用を認めなかった。

【考察】

本研究では、まず、圧迫性脊髓症の動物モデルを作成するための礎となる、ラットの脊柱管径、脊髓径の詳細を明らかにした。ヒトとラットの脊椎、脊髓発達完了時期は全く異なっており、脊髓脊椎疾患の動物モデルに頻用される 8～12 週齢のラットの脊柱管や脊髓は、サイズの増大という点で、未だ発達過程にあると考えられ、これらのラット脊椎脊髓は、必ずしも成人の脊椎脊髓を模擬していないことが判明した。また、ラットの脊柱管の拡大機序には、軟骨内骨化ではなく、膜性骨化が関与し、脊髓の拡大機序には、神経前駆細胞からの分化を介した、神経細胞数、グリア細胞数の増加をその一因として想定している。圧迫性脊髓症モデルをラットで作成する場合の至適週齢は、少なくとも縦径の SAC が平衡に達する 8 週齢以降で、理想的には脊髓の増大が終了する 24 週齢以降が望ましいと考える。

また本研究により、BS はヒト脳血管内皮細胞の細胞保護効果、*in vitro* BSCB モデルの保護効果、脊髓損傷後 BSCB 保護効果、神経組織保護効果、機能回復効果を持つことが明らかになった。そして BS の脳血管内皮細胞の細胞保護効果は、細胞内 glutathione 濃度上昇を介していた。つまり、BS を脊髓損傷後早期に投与すると、脊髓血管内皮細胞内の glutathione 濃度が上昇し、血管内皮細胞が構成する BSCB 機能が維持された結果、二次損傷が抑制され、最終的な損傷範囲が縮小し、機能回復促進につながったと考える。BS は併用不能な薬剤や使用禁忌疾患がなく、外傷直後や周術期に使用しても問題ないなど、安全性への懸念が乏しい。また、既存薬であるため、新薬と比較して、早期の臨床応用が可能な利点に優れる。以上より、BS の優れた機能改善効果、安全性、既存薬としての利点を踏まえると、BS は急性期脊髓損傷に対する BSCB 保護薬、神経保護薬となる可能性を持つ。また、脊髓損傷以外の BSCB 破綻を呈する疾患に対しても有効である可能性があり、本薬剤の開発は臨床的意義が高いと考える。

【結論】

ラットの脊柱管径、脊髓径、SAC の経時的推移を明らかにした。ラットの脊柱管径は 12～20 週齢、脊髓径は 20～24 週齢まで拡大し続けるが、縦径の SAC は 8 週齢で平衡に達した。圧迫性脊髓症モデルを作成する場合、最低でも 8 週齢以降、理想的には 24 週齢以降のラットを使用するのが望ましい。また、BS の脳血管内皮細胞保護作用、*in vitro* BSCB 保護作用、脊髓損傷後 BSCB 保護作用、神経組織保護作用、機能回復促進効果を明らかにした。その薬理機序は、細胞内 glutathione 濃度上昇によることが明らかとなった。BS は脊髓障害に対する神経保護薬、BSCB 保護薬となる可能性を持つ。