

Title	ラットを用いた虚血性脊髄障害に対する肝細胞増殖因子による再生治療
Sub Title	A hepatocyte growth factor in a spinal cord ischemia
Author	山下, 健太郎(Yamashita, Kentarō)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>虚血性脊髄障害モデルラットを用いて、損傷後の脊髄中HGFの推移並びにHGF,c-MetmRNAの定量評価を行った。脊髄障害後の脊髄中HGFおよびc-Metの動態は外傷性脊髄障害に類似しており、虚血性脊髄障害においてもHGFの髄腔内投与が下肢運動機能の回復に有用である可能性が示唆された。実際にリコンビナント型HGFを脊髄虚血モデルラットに投与する実験においては、HGF投与群において下肢運動機能の回復を認めしたが、本研究期間内では十分なn数が実施できず、今後の課題となった。</p> <p>In this study, I performed ELISA and realtime PCR using spinal cord ischemia rats. The levels of HGF in spinal cord and serum were calculated with ELISA. The levels of HGF in SCI rat spinal cord L1-2 in SCI rats were higher than that of the control group. The levels of c-MetmRNA in spinal cord Th10-13 were elevated just after injury. These findings are similar to those of traumatic spinal cord injury. Then we infused recombinant HGF intrathecally into SCI rats. Two SCI rats were recovered from paraplegia in HGF group(n=3), however in PBS group(n=5), there was no functional recovery of paraplegia.</p> <p>In conclusion, HGF treatment for SCI rats may be effective but there are limitations. The first and most important limitation is number of rats. We performed only 8 rats(HGF group; n=3, PBS group; n=5). we have to continue this study. The second limitation is this study was performed with small animal, rat. After this study, we start next study using large animal and human.</p>
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2018～2019 課題番号：18K16402 研究分野：心臓血管外科
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K16402seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K16402seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16402

研究課題名(和文) ラットを用いた虚血性脊髄障害に対する肝細胞増殖因子による再生治療

研究課題名(英文) A Hepatocyte Growth Factor In A Spinal Cord Ischemia

研究代表者

山下 健太郎 (Yamashita, Kentaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80815902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性脊髄障害モデルラットを用いて、損傷後の脊髄中HGFの推移並びにHGF, c-Met mRNAの定量評価を行った。脊髄障害後の脊髄中HGFおよびc-Metの動態は外傷性脊髄障害に類似しており、虚血性脊髄障害においてもHGFの髄腔内投与が下肢運動機能の回復に有用である可能性が示唆された。実際にリコンビナント型HGFを脊髄虚血モデルラットに投与する実験においては、HGF投与群において下肢運動機能の回復を認められたが、本研究期間内では十分なn数が実施できず、今後の課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈疾患は近年増加傾向にある。その合併症である虚血性脊髄障害(対麻痺、下半身麻痺)は、様々な予防法が開発され、施行されている現在においても完全には予防できず、その治療法も無い。本研究では外傷性脊髄損傷において有効性の示唆されている肝細胞増殖因子(HGF)に着目した。虚血性脊髄障害に発症後にHGFを投与することで下肢機能の回復を得ることが本研究の最大の目的である。今回の研究にて、HGF投与の有効性が示唆された。さらなる研究が必要とされるべきではあるが、大動脈手術後の合併症(対麻痺)に悩む患者に対する治療の一つとなることが示唆される研究となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I performed ELISA and realtime PCR using spinal cord ischemia rats. The levels of HGF in spinal cord and serum were calculated with ELISA. The levels of HGF in SCI rat spinal cord L1-2 in SCI rats were higher than that of the control group. The levels of c-Met mRNA in spinal cord Th10-13 were elevated just after injury. These findings are similar to those of traumatic spinal cord injury. Then we infused recombinant HGF intrathecally into SCI rats. Two SCI rats were recovered from paraplegia in HGF group(n=3), however in PBS group(n=5), there was no functional recovery of paraplegia. In conclusion, HGF treatment for SCI rats may be effective but there are limitations. The first and most important limitation is number of rats. We performed only 8 rats(HGF group; n=3, PBS group; n=5). we have to continue this study. The second limitation is this study was performed with small animal, rat. After this study, we start next study using large animal and human.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：虚血性脊髄障害 脊髄虚血 大動脈瘤 大動脈解離 肝細胞増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

大動脈疾患患者は近年増加傾向にあり、人口 10 万人当たり 8.5 人が大動脈疾患で死亡している。大動脈瘤に対する治療はステントグラフトなどデバイスの進歩により成績は向上しているが、脊髄虚血による対麻痺は未だに重篤な合併症となっている。

申請者の所属先では胸腹部大動脈瘤手術における脊髄保護を研究し、周術期の脊髄障害予防法を考案し、臨床応用してきた。

しかしながら急性大動脈解離による対麻痺などは予防が困難であり、また予定手術症例であっても対麻痺は完全には予防できず、治療法の確立が望まれていた。

一方、外傷性脊髄損傷は急性大動脈解離同様、予防は困難であり、そのため治療法の開発が盛んに行われていた。慶應義塾大学整形外科教室において霊長類マーモセットにおいて外傷性脊髄損傷後の対麻痺に対する HGF 投与が障害の軽減と下肢機能の回復を認めることが示された。

本研究で虚血性脊髄障害に対する HGF 投与の有効性を示し、治療法の確立につながる基盤とする。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は虚血性脊髄障害に対する HGF 投与の有効性を示し、治療法の確立につながる基盤とする事である。

大動脈疾患における虚血性脊髄障害は重篤な合併症であり、その予防法に関する研究は多く行われてきた。

現在では術前の Adamkiewicz 動脈の同定の術中再建、脳脊髄液ドレナージ、運動性脊髄誘発電位、硬膜外冷却法など予防法が開発され臨床応用されている。

一方、虚血性脊髄障害に対する治療法の研究は進んでおらず、研究者そのものが少ない。虚血性脊髄障害に対する治療法の確立は、大動脈疾患における重篤な合併症の軽減につながる重要な研究である。

#### 3. 研究の方法

##### **A) 虚血性脊髄障害後の HGF 及び c-Met の推移の実験**

実験動物として成体メス Sprague-Dawley rat (200-250g) を用い、全身麻酔下に胸骨正中開胸にて胸部大動脈弓部を 15 分間遮断し、虚血性脊髄障害モデルを作成する。

・術後、翌日、7 日、14 日、21 日、28 日後に Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Locomotor Rating Scale による後脚の運動機能評価 (J Neurotrauma 1995 Basso, et al) を行う。

・各時点で血清 HGF 及び脊髄中 HGF を ELISA 法にて測定する。

・各時点での脊髄中 HGF-mRNA および c-Met-mRNA の定量をリアルタイム PCR にて行う

・病理免疫学的評価を行う。

##### **B) HGF の髄腔内投与による虚血性脊髄障害治療の検討**

脊髄虚血モデルラットに対して、リコンビナント型 HGF を髄腔内投与し、下肢運動機能の評価並びに病理学的検討を行う。

また投与量や投与開始時期を変え、至適投与量、指摘投与開始時期の検討をおこなう。

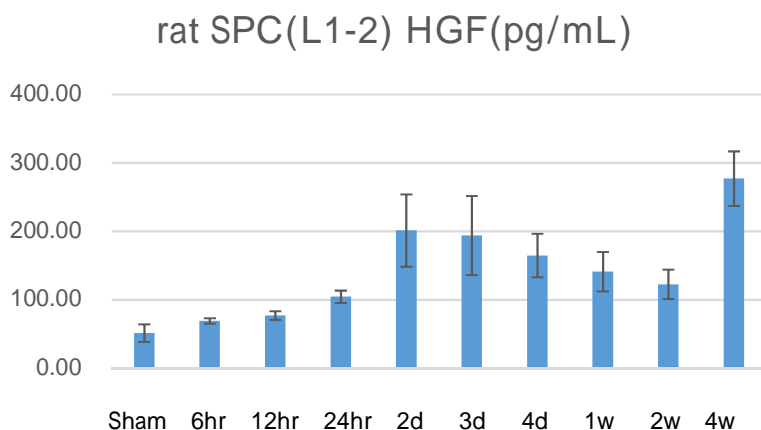
#### 4. 研究成果

##### A) 虚血後脊髄障害後の HGF および c-Met の推移

###### 1) ELISA による定量

術後 6 時間, 12 時間, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 28 日にそれぞれ n=3 匹ずつ犠牲死させ、脊髄を採取した。L1-2 脊髄を homogenize し、その上清を上清中の総タンパク量で調整したのち ELISA 法にて測定した (Human HGF Quantikine ELISA Kit, R&D systems, Inc. Minneapolis, Minnesota, USA)。脊髄中の HGF はそれぞれ 69.21, 77.09, 104.52, 201.33, 193.91, 164.67, 141.03, 122.55, 277.09 pg/ml であり、対照群 (n=3) は 51.48 pg/ml であった。、84.74、138.57、147.50、148.57、153.22、119.07、123.84、139.42 pg/ml で、血清中 HGF はそれぞれ 48.74、51.09、61.72、55.62、61.42、43.12、49.52、39.59 ng/ml であった。(図 1)

図 1



###### 2) 脊髄中の HGF-mRNA および C-Met-mRNA (リアルタイム PCR)

コントロール遺伝子には ACTB を用いた。

1) と同じ個体から採取した脊髄 (Th10-13) を用いて、RNA を抽出、リアルタイム PCR にて測定した。各サンプルをそれぞれ ACTB にて標準化し比較検討を行った。

HGF-mRNA は術後 12 時間にて HGF/ACTB 比で 1.50 まで上昇するも、術後 14 日まではコントロールと比較し、ほぼ横ばいから緩徐な上昇傾向を認め、術後 28 日で最大となった。(図 2)

一方、c-Met-mRNA は術後 24 時間以内に一過性の上昇 (術後 6 時間 ACTB 比 1.40, 術後 12 時間 1.64) を認めたのち低下し、コントロール以下で推移した。(図 3)

図 2

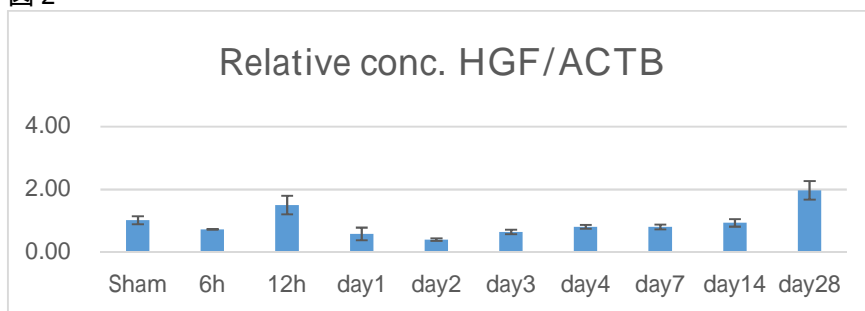
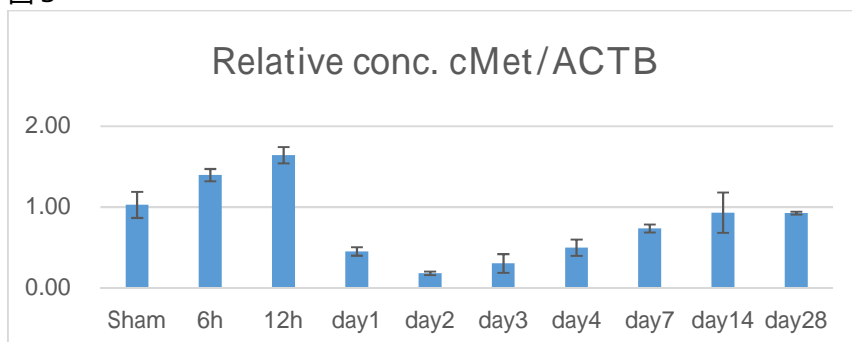


図 3



## B) HGF の髄腔内投与による虚血性脊髄障害治療の検討

投与方法 (Laminaectomy, カテーテルの挿入、固定) の検討を重ね、安定したモデルの作成を目指した。

投与量は 350  $\mu$ g/4w/匹とし、浸透圧ミニポンプ (ALZET2004) を用いた。Instruction の如く、浸透圧ポンプに HGF350  $\mu$ g/200  $\mu$ l および PBS 200  $\mu$ l を充填し、40 時間以上 37 度でインキュベートした。術中したものや、Laminaectomy 時に脊髄神経を損傷したもの、カテーテルの抜去や閉塞などが認められたものは評価対象から除外した。

脊髄虚血処置の 7 日前に Laminaectomy を行い、Intrathecal catheter を髄腔内へ挿入し、HGF または PBS を充填した浸透圧ミニポンプを背部皮下へ移植した。その際に脊髄損傷を認めたものは検討から除外した。

ポンプ移植 7 日後に、A) と同様の方法にて脊髄虚血モデルを作成し、4 週間下肢運動機能の観察を行った。4 週間以降に犠牲死させ、ミニポンプを摘出、カテーテルが髄腔内に挿入されているかと、カテーテルの閉塞の有無を確認し、さらに組織検討のため脊髄を摘出した。

カテーテルの抜けや閉塞のなかった 8 匹 (HGF 群 n=3, PBS 群 n=5) を解析対象とした。

HGF 群では 3 匹のうち 2 匹で下肢運動機能の回復を認め、術後 4 週間時点で BBBscale21 と正常な下肢運動機能を示した。一方 PBS 群では BBBscale 1 の個体が 1 匹いたのみで、その他 4 匹は下肢運動を全く認めず (BBBscale 0)、完全に回復したラットは認めなかった。

以上より HGF の有効性が示唆されたが、n 数が少なくさらなる検討が必要と考えられた。

### 結語

上記結果より、脊髄障害後の脊髄中 HGF および c-Met の動態は外傷性脊髄障害に類似しており、虚血性脊髄障害においても HGF の髄腔内投与が下肢運動機能の回復に有用である可能性が示唆された。投与実験においては、HGF 投与群において下肢運動機能の回復を認めたが、本研究期間内では十分な n 数が実施できず、今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----