


2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

2002 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 趙 建武  ㊟
所属機関名 東北大学大学院医学研究科整形外科教室
指導責任者氏名 国分 正一
職 名 教授
所在地 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1
電話 717-7245 内線 7245

1. 研究テーマ 実験的慢性脊髄圧迫における神経細胞死の観察

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

apoptosisの顕著な生化学特徴はクロマチンDNAのヌクレオソーム単位の切断, すなわち, DNA断片化である. 細胞より抽出したDNAをアガロースゲル電気泳動で分離するDNA ladder検出法は, apoptosisのもう一つ確実な証明法である.

同じ実験系で第4、5、6頸椎高位の脊髄組織を分別に摘出し, 組織より断片化DNAを抽出し, アガロースゲル電気泳動を行い, apoptosis特徴的なDNA断片化を検出する.

4. 指導責任者の意見

頸髄の慢性圧迫実験における神経細胞のapoptosisを証明することに成功した本研究は、画期的である。研究者趙建武氏は次に挙げる技術的困難を解決して達成したものである。①兎の頸椎は人のそれと比べると極めて小さく、その右側に脊髄を一側性に圧迫することは至難である、②圧迫率の異なる脊髄圧迫を作る、③兎の脊髄麻痺を観察する、④繊細なTUNEL法染色の適切な条件を発見する、⑤神経細胞とグリア細胞を区別する、である。

結果は予想以上のものであった。単にapoptosisを証明するに留まらず、圧迫率の違い、経過期間の違いによってapoptosisに陥った細胞の種類の違いを明らかにした。すなわち、48%未満の圧迫率ではapoptosisが生じず、48%~55%の圧迫率、36~48時間の圧迫時間ではグリア細胞が、55%~70%の圧迫率、36~48時間の圧迫時間では神経細胞がapoptosisが生じた。加えて、上・下位椎の高さでの脊髄に同様のapoptosisを確認した。今後、脊髄圧迫に対する脊髄内のapoptosisの3次元的分布を明かにすることが可能である。

最後に、本研究遂行に払った趙氏の頑張りに敬意を表する。

指導責任者氏名

因分正一

®

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

実験的慢性脊髄圧迫における神経細胞死の観察

研究者氏名 趙 建武
中国所属機関 中日聯誼医院
日本研究機関 東北大学大学院医学研究科
外科病態学講座体性外科学分野
指導責任者 教授 国分 正一
共同研究者名 小澤 浩司 椿野 巧 庄司 克吉

要 旨 : Abstract

本実験では、JW ウサギを用い、全身麻酔下に第5頸椎椎体前方より硬膜外腔に達する孔を穿ち、直径 3mmの金属スクリーを挿入することで様々な程度に脊髄の片側を圧迫するモデルを作製した。圧迫開始後 12 時間から 72 時間まで経時的に圧迫された脊髄を摘出し、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL 法) 染色標本作製した。圧迫開始後 36 時間、圧迫率 55% ~70%の標本において、灰白質の神経細胞に necrosis, 白質の glia 細胞に多数の apoptosis 陽性細胞が認められた、第4、6頸椎椎体高位の脊髄神経細胞に apoptosis 陽性細胞がみられた。

Key Words : apoptosis; spinal cord; neuronal death; TUNEL

緒 言 : Introduction

1972 年 Kerr により提唱された apoptosis の概念は、いまや生物学から医学、さらに農学、水産学を含めた生命科学の広い領域にわたって最も注目される研究分野となっている¹⁾²⁾。Apoptosis とは、発生過程や組織細胞の交代期において役目を終えた細胞の“予定された死”で、細胞の特有な形態学的変化と生化学的変化によって特徴づけられている。電子顕微鏡で観察すると、Apoptosis 細胞では細胞表面の微繊毛が消失し、平滑になり、細胞が縮小する。核内ではクロマチンが凝縮し、核が断片化する。そして細胞自体が断片化して apoptosis body が形成され、マクロファージなどの食細胞や隣接する細胞によって貪食除去される。生化学的な特徴としては³⁾⁴⁾、形態学的変化に先立って、細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇や特定タンパク質のリン酸化、Caspase ファミリーの活性化と特定タンパク質の限定分解が見られる。そして、apoptosis の顕著な特徴であるクロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化が起こる。

近年、脊髄の神経細胞の apoptosis が注目されている。宮内ら⁵⁾は Wister Rat を用い、重錘で 2 分間胸髄を圧迫し、急性脊髄損傷後の神経細胞死に apoptosis が存在する可能性を示唆した。Katoh ら⁶⁾は、実験的急性脊髄損傷モデルにおいての DNA の断片化を認め apoptosis の存在を明らかにした。Liu 7)らは重錘落下法を用いた急性脊髄損傷モデルでの神経細胞と glia 細胞の apoptosis を調べた。しかし、慢性圧迫脊髄の apoptosis についての研究は少ない。その主な理由は、脊髄の慢性圧迫実験モデルの作製が難しいことにある。慢性圧迫実験モデルとして、骨形成因子の投与⁸⁾とスクリーを用いた脊髄の漸増圧迫法⁹⁾等が報告されている。筆者はスクリーを用いた頸髄の慢性圧迫モデルを作製し、脊髄神経の apoptosis について TUNEL 法で検討した。

対象と方法 : Materials and Methods

18 匹の JW ウサギ (生後 12~16 週, 体重 2.100~2.700kg, オス) を用いた、ネンブタール (25~30mg/kg) 全身麻酔下に頸椎前方を展開し、第 5 頸椎椎体正中右側に硬膜外腔に達する孔を穿ち、直径 3mmの金属スクリーを挿入し、3 分間で脊柱管の前後径の 50%~80%を占めるまでゆっくり

スクリューを進め、脊髄の片側圧迫モデルを作製した。(Fig. 1, Fig. 2)

手術の翌日に歩容を観察し、脊髄麻痺を記録した、手術後 12 時間後、24 時間後、36 時間後 48 時間後、72 時間後に、ネンプタール 100mg を静注し、頸椎を摘出した。第 5 頸椎横断レントゲン像より、圧迫率を脊柱管内スクリュー長/脊柱管前後径として計算した。第 4、5、6 頸椎高位の脊髄組織を 100%ホルマリン固定 3 日間、パラフィンに包埋し、5 μ m のパラフィン切片を作製した。DNA の断片化の検索は TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL 法)¹⁰⁾ に準じ、Apoptosis in situ detection kit (Wako, Japan) を用いた。切片を脱パラフィン、親水化処理し、Protein Digestion Enzyme で 37°C、5 分間タンパク分解処理し、TdT 反応液 37°C、45 分間で DNA 3' 末端を標識し、H₂O₂ 溶液で内因性 POD を不活性処理し、POD-Conjugated Antibody を標識抗体反応し、室温に 5 分間 DAB で発色させ、光学顕微鏡で観察し、digital camera で記録した。

結 果 : Results

1. 運動機能の評価

圧迫率は 48%~82%であった。圧迫率 70%以上は明らかな(立位不可能)脊髄麻痺を生じた。

2. 組織学的検討

圧迫率 48%~55%、圧迫 36 時間以上の場合、圧迫部位の脊髄白質で多数の apoptosis 陽性の glia 細胞が認められた。神経細胞の apoptosis は観察されなかった。

圧迫率 55%~70%、圧迫時間 36~48 時間の場合、圧迫部位の脊髄灰白質の神経細胞の necrosis が認められた (Fig. 3)。圧迫部位から頭側、尾側に 10mm 離れた部位を(第 4、6 頸椎レベル)中心に神経細胞の apoptosis が認められた (Fig. 4)。

圧迫率 70%以上の場合、神経細胞と glial 細胞に necrosis が認められた。

考 察 : Discussion

桐野¹¹⁾は一過性全脳虚血モデルで、海馬 CA1 錐体細胞に虚血 2 日後に細胞死が生じることを認め、DND(delayed neuronal death)と名づけた。似鳥は電子顕微鏡、免疫組織化学、TUNEL 法や DNA ladder などで、DND は apoptosis であることを報告した¹²⁾。宮内らはラットの胸髄を重錘で 2 分間圧迫し、急性脊髄損傷モデルを作製した。HE 染色と TUNEL 法で観察した結果、損傷 12 時間後から 72 時間後に損傷中心部より 12mm 頭・尾側に離れた機械的圧迫が加わっていない部位に necrosis とは異なる遅発性の神経細胞死を認めた。筆者らのウサギの頸髄をスクリューで長時間に圧迫する慢性脊髄圧迫モデルでは、圧迫 36 時間から 48 時間後、圧迫率 55%~70%の case で、圧迫された頸髄の灰白質の神経細胞に necrosis と白質の glia 細胞に多数の apoptosis 陽性細胞が認められた。圧迫部位より頭、尾側に 1 椎体離れた部位の神経細胞に apoptosis 陽性細胞がみられた。神経細胞の apoptosis は、損傷から十数時間後にみられると報告されており、十数時間は神経細胞の G1-S-G2-M 期までの時間と考え、apoptosis は G1 期に細胞死へと決定され、G2 期に執行される¹³⁾とする報告がある。

Apoptosis の誘因としては 1) death ligand と death receptor の結合、2) サイトカインの欠乏、3) ストレス応答があげられている。この数年の間に精力的に進められた Apoptosis の分子機構の研究によると、Apoptosis の誘因となる signal の多くは細胞膜上の death receptor を介して伝達される、例えば Fas (fatty acid synthase 脂肪酸合成酵素) ligand や TNF (tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子) は細胞外領域に β シートを 3 つ折りにして丸めたようなコンパクトな共通の death ligand 構造をもち、death receptor とに結合する¹⁴⁾、death receptor の細胞外領域はコンパクトな球状 domain の繰り返し構造を持ち、細胞内には特徴的なアミノ酸配列のモチーフ death domain を見出される。death ligand が death receptor に結合すると、SODD (silencer of death

domains)は速やかに death receptor から解離し, FADD と呼ばれる adapter 分子が結合する. FADD の N 端の DED (death effector domain)は Caspase-8 (cysteiny l aspartic acid-protease)と結合し DISC が形成され, Caspase-8 を切断されて活性化し, Caspase-8 が下流 Caspase-3, 6, 7 を活性化し, Caspase-3 が DFF (DNA fragmentation factor)¹⁵⁾の DFF45 を分解し, 分解された DFF45 の断片が DFF40 から離れると, DFF40 が DNase domain が活性化され, DNA を分解し, Apoptosis を引き起こす. Apoptosis の他の誘因として, 紫外線 (UV), 放射線, 浸透圧, 活性酸素, 重力などによって, 酸化ストレスが生じると, ROS (reactive oxygen species)や RNS (reactive nitrogen species)が産生され, cytochrome c ¹⁶⁾がミトコンドリアから遊離し, Caspase を活性化し, apoptosis を引き起こす. さらに, apoptosis 誘因として, サイトカイン欠乏による apoptosis 誘導も明らかになった. 神経成長因子 (NGF) など神経栄養因子は サイトカイン receptor と結合し, PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase)を活性化し, 更に apoptosis に抑制的な Bcl-2 ファミリーメンバーを活性化し, apoptosis が抑制される. このためサイトカインが欠乏にすると apoptosis が誘導される. 本実験において観察されたの神経細胞の apoptosis は脊髄外部からの物理作用ため, 酸化ストレスが生じ, 更に圧迫による脊髄虚血のため, サイトカインの欠乏によって apoptosis を起こった可能性が考えられる.

参考文献 : References

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug; 26(4): 239-57
2. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Macaskill, I. A. M. and Currie, A. R. (1973) *J Pathol.* 111, 85-94.
3. Wyllie. A. H. (1980) *Nature* 284, 555-556.
4. Arends, M. J., Morris, R. G. and Wyllie, A. H. (1990) *Am. J. Pathol.* 136, 593-601.
5. 宮内 裕史, 米 和徳など: 実験的脊髄損傷における神経細胞死の観察. *臨床整形外科* 31(4) : 361-367,
6. Kenji Katoh. : 1996 Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neuroscience Letters*, 316(1996)9-12
7. Xiao Z. Liu, Xiao M. Xu. Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neuroscience*, July 15, 1997, 17(14) : 5395-5406
8. 岸 精一ほか: 家兎の実験的脊柱靭帯骨化による脊髄障害について. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班昭和 6 2 年度研究報告書、98-100 頁、1988
9. 黒川高秀: 頸部脊椎症性脊髄症の成因に関する研究 (第 1 報) —慢性漸増圧迫動物実験. *日整会誌* 49 : 769-771, 1975
10. Yael Gavrieli, Yoav Sherman, and Shmuel A. Ben-Sasson : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, 119: 493-501, 1992
11. Krino, T, et al: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Research* 239:57-69, 1982
12. Nitatori, T. et al. : *J. Neurosci.*, 15:1001-1011, 1995
13. 吉田 功. : アポトーシスと細胞周期. *神経精神薬理* 17:373-378, 1995
14. Nagata, S. : Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365, 1997
15. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. : DFF, a heterodimeric protein that functions *Apr* 18;89

16. Liu, X. et al. : Induction of apoptotic program in cell-free extract: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157, 1996

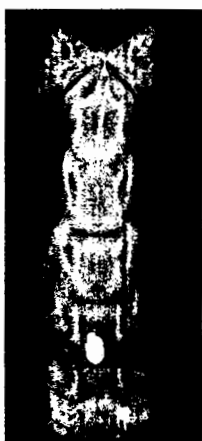


Fig.1

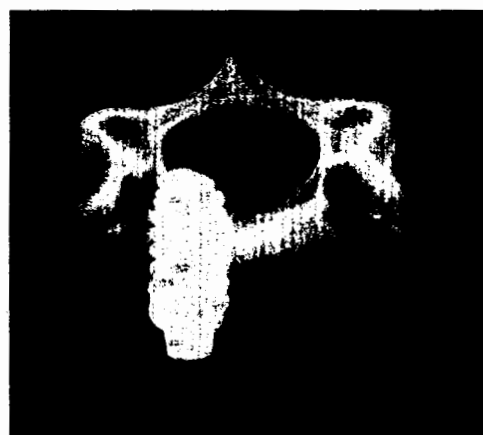


Fig.2

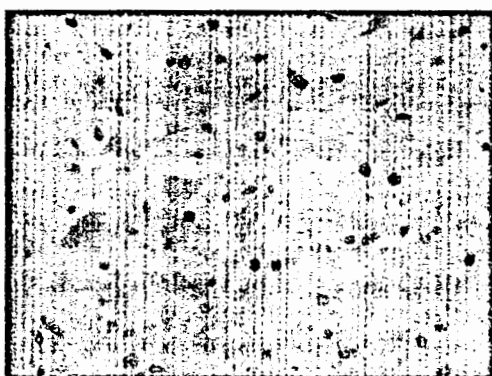


Fig.3

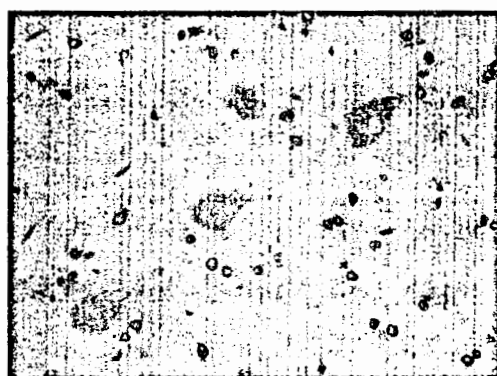


Fig.4