

学位論文題名

ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける
calcineurin inhibitor の神経細胞保護効果について

学位論文内容の要旨

【目的】胸腹部大動脈瘤手術における脊髄障害は重篤な合併症であり、この対策として現在まで数多くの技術的改良や薬剤投与の研究がなされている。FK506 は脳虚血再灌流時の神経保護効果が数多く報告され、臨床研究が進められているが、本剤による脊髄虚血再灌流障害に対する神経保護効果についての報告は数少ない。FK506 が神経保護効果を示す機序の詳細は不明だが、本剤が 12-kDa FK506 binding protein (FKBP12) と結合してリン酸化蛋白質 calcineurin を抑制することと関係があるという説が有力である。一方、FK506 が FKBP12 knockout mouse の hippocampus 神経細胞培養モデルにおいて細胞増殖を促進することから、本剤の神経細胞に対する働きは FKBP12 と無関係との報告もあり、また FKBP52 と steroid receptor complex が神経細胞の再生と密接な関係があるとの報告も見られる。本研究の目的は、ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける FK506 の細胞保護効果を検討するとともに、その作用機序について特に、calcineurin pathway の面から検討することである。

【方法】New Zealand White Rabbits 雄 2.6 ~3.3 kg 36 匹を以下の 6 群に分け、Balloon catheter を用いた腎動脈下腹部大動脈遮断により脊髄虚血を引き起こした。

- ① control (C) group (n=6) : vehicle を静脈内投与して 30 分後に 15 分間の脊髄虚血。
- ② FK506 (FK) group (n=6) : FK506 1mg/kg を vehicle の代わりに投与。
- ③ Cyclosporin A (CsA) group (n=6) : Cyclosporin A 30mg/kg を vehicle の代わりに投与。Cyclosporin A は Cyclophilin と結合して calcineurin を抑制する。
- ④ Rapamycin (R) group (n=6) : Rapamycin 1mg/kg を vehicle の代わりに投与。Rapamycin は FKBP12, FKBP52 と結合するが calcineurin を抑制しない。
- ⑤ R+FK group (n=6) : Rapamycin 1mg/kg を FK506 の更に 20 分前に静脈内投与、それ以外は FK group と同様。
- ⑥ Cyclosporin A 慢性投与 (CsA-C) group : Cyclosporin A 20mg/kg を 9 日間慢性静脈内投与し、手術日にも同量を静脈内投与して 30 分後に 15 分間脊髄虚血。

脊髄保護効果の評価は神経機能について Johnson の方法による客観的 5 段階評価を、病理学的には脊髄前角細胞数の比較を行った。統計学的検討は、2 群間の Johnson score の比較には Mann Whitney U test を用い、連続変数の比較は One-way analysis of variance を用いた。p-value は 0.05 未満で有意とした。

【結果】Johnson score による神経機能評価は、虚血 8 時間後は群間に有意差を認めなかったが、24 時間後、48 時間後では有意差を認め、FK group, R+FK group が C-group, CsA group, R group より有意に高く、また CsA-C group が C-group, R group より有意に高かった。病理学的評価では、脊髄前角において FK group と R+FK group, CsA-C group では多数の大きな運動神経細胞が認められ、大部分の核は核膜が平滑で核小

体を確認できた。これに対し他の group では灰白質は死んだ細胞が抜け落ちた跡と考えられる空胞が散在し、残っている運動神経細胞は萎縮し、核は消失しているか濃縮しておりその構造ははっきりしなかった。脊髄前角細胞数は、FK group は R+F group を除く全てに対して有意に細胞数が多かった。R+FK group, CsA-C group は C group より有意に細胞数が多かったが、R group, CsA group とは有意差が無かった。R group, CsA group は C group と有意差は無かった。

FK506 の脊髄虚血再灌流障害にたいする神経保護効果は、ラットモデルでの 1 報告をみるにすぎない。本実験はこの効果をウサギモデルで追試したのみならず、Cyclosporin A 慢性投与が同様に脊髄保護効果を有すること、Rapamycin の単独投与では保護効果を発揮しないことを初めて確認した。

【考察】FK506 1mg/kg 投与と Cyclosporin A 20mg/kg 慢性投与では、脊髄虚血再灌流時の神経保護効果が得られた。この結果は神経保護効果の機序に calcineurin の抑制が関わるとする以前からの多くの報告を支持している。Cyclosporin A は BBB 透過性が低いことが知られているが、20mg/kg の慢性投与では十分な脳内への薬物移行が得られると報告されている。一方本実験では Cyclosporin A 30mg/kg 一回投与では神経保護効果は発現しなかった。この投与量は、Cyclosporin A の calcineurin 抑制効果が FK506 の約 30 分の 1 とされていること、脳神経領域においては B. B. B を破壊する処置をしなくてもこの量で効果を発揮するとの報告がみられたこと、一回投与量としては極量と考えられたこと、から設定したが、結果的には中枢神経系に移行する量が少なかったと考えられた。

一方 Rapamycin 単独投与の脊髄保護効果については報告が無い。Rapamycin は FK506 以上に FKBP12 と親和性が高く、B. B. B. も通過し、また分子量は FK506 とほぼ同等である。したがって本実験では投与量として FK506 と同量の 1mg/kg を用いたが、神経保護効果は発現しなかった。この結果も FK506 の神経保護効果における calcineurin 抑制の関与を支持している。一方、本実験では FK506 の効果は Rapamycin の同時投与では、神経学的、病理学的評価とも完全には拮抗されなかった。これは 1 対 1 の投与量では拮抗させるために充分ではなかった可能性も考えられ、さらなる検討が必要である。

FK506 の神経に対する作用の機序としては、steroid receptor 複合体の一部分を成す FKBP52 の関与についての報告も散見される。今回の検討においては、神経機能評価および病理学的評価のいずれにおいても FK506 が Cyclosporin A 慢性投与より保護効果が強い傾向が見られた。これは calcineurin の抑制以外にも神経保護効果を発揮する経路が存在する可能性を示唆するとも考えられ、今後の検討が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 北 畠 顯

副 査 教 授 劔 物 修

学 位 論 文 題 名

ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける calcineurin inhibitor の神経細胞保護効果について

本研究の目的は、ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける calcineurin inhibitor (FK506 と cyclosporin A) の神経細胞保護効果を検討するとともに、FK506 の作用機序について特に、FKBP の面から検討することである。

New Zealand White Rabbits 雄 2.6 ~3.3 kg 36 匹を以下の 6 群に分け、Balloon catheter による腎動脈下腹部大動脈遮断により一過性脊髄虚血を誘発した。虚血時間は apoptosis が優位に生じるとされる 15 分間に設定した。薬剤投与は静脈内投与で遮断 30 分前に行った。C 群：vehicle 投与，FK 群：FK506 1mg/kg 投与，CsA 群：cyclosporin A 30mg/kg 投与。CsA-C 群：cyclosporin A 20mg/kg を 9 日連日投与，R 群：rapamycin 1mg/kg 投与，R+F 群：rapamycin 1mg/kg を FK506 の 20 分前に投与。cyclosporin A に関しては血液脳関門を通過しにくいことが知られており、今回は血液脳関門を通過すると報告されている 2 種類の dosage schedule を用いた。脊髄保護効果の評価は、神経機能を Johnson の方法による客観的 6 段階評価にて、病理学的には Hematoxylin-Eosin 染色による脊髄前角細胞の形態的評価と細胞数の比較を行った。

神経学的機能は、FK 群，R+F 群，CsA-C 群は C 群と比較して有意に良好であった。病理学的評価では、脊髄前角の運動神経細胞数は、FK 群，R+F 群，CsA-C 群は C 群と比較して有意に多かった。また FK 群，R+F 群，CsA-C 群では、核は核膜が平滑で核小

体を確認できたが、その他の群では核は消失しているか濃縮しておりその構造ははっきりしなかった。すなわち、FKBP12 と結合して calcineurin を抑制する FK506, cyclophilin A と結合して calcineurin を抑制する cyclosporin A の両者に脊髄神経保護効果が証明されたが、FKBP12 と結合するが calcineurin を抑制しない rapamycin には脊髄神経保護効果を認めなかった。

一方、本実験では、FK506 の効果は FKBP12 に対する拮抗剤である Rapamycin の同時投与では、神経学的、病理学的評価とも完全には拮抗されなかった。この理由としては、1対1の投与量では拮抗させるために充分ではなかった可能性と、FKBP12 を介する calcineurin の抑制以外にも神経保護効果を発揮する経路が存在する可能性との2点が考えられる。

公开发表では、副査の劔物教授から脳虚血モデルと脊髄虚血モデルの違いに関して、他の脊髄保護効果が証明されている薬剤との比較に関して、北島教授から calcineurin が神経障害を生じる機序と、FK506 の投与方法に関して、また本実験における細胞死の形態について、主査の安田教授から大動脈外科における本研究の意義に関して等、質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は自らの実験結果、臨床体験、この分野に関する文献などをもとに、誠実に、かつ妥当な回答を成しえた。

FK506 の脊髄虚血再灌流障害にたいする神経保護効果は、ラットモデルでの1報告をみるにすぎない。本実験はこの効果をウサギモデルで追試したのみならず、cyclosporin A 慢性投与が同様に脊髄保護効果を有すること、rapamycin の単独投与では保護効果を発揮しないことを初めて確認したものである。さらに、大動脈手術に伴う脊髄障害に対する FK506 の臨床応用にむけて、胸腹部大動脈瘤治療の今後の展開に重要な寄与をしようるものと評価される。

審査員一同は、申請者の学識に合わせて、この研究が関連領域研究と臨床成績の向上に果たす役割を評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。