東北大学機関リポジトリ
TOUR
Tohoku University Repository

遺伝子導入による脊髄保護に関する研究

著者	田林　晄一
URL	http://hdl.handle.net/10097/39647

遺伝子導入による脊髄保護に関する研究

課題番号：14370400

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金 基盤研究(B)(2)
研究成果報告書

平成17年9月

研究代表者　田林　晄一

東北大学大学院医学系研究科
心臓血管外科　教授

はしがき

研究組織

研究代表者：田林　晄一　東北大学大学院医学系研究科　教授
研究分担者：宮崎　純一　大阪大学大学院医学系研究科　教授
研究分担者：井口　篤志　東北大学大学院医学系研究科　助教授
研究分担者：新田　能郎　東北大学病院　助手

交付決定額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	2,000	0	2,000
平成15年度	2,200	0	2,200
平成16年度	500	0	500
総計	4.700	0	4,700

研究発表　論文

1: Sakurai M, Takahashi G, Abe K, Horinouchi T, Itoyama Y, Tabayashi K.
Endoplasmic reticulum stress induced in motor neurons by transient spinal cord ischemia in rabbits.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2005 Sep;130(3):640-5.

2: Akasaka J, Tabayashi K, Saiki Y, Oda K, Kumagai K, Iguchi A.
Stent grafting technique using Matsui-Kitamura (MK) stent for patients with aortic arch aneurysm.
Eur J Cardiothorac Surg. 2005 Apr;27(4):649-53.

3: Tabayashi K.
Spinal cord protection during thoracoabdominal aneurysm repair.
Surg Today. 2005;35(1):1-6. Review.

4: Akasaka J, Sakurai M, Takase K, Kumagai K, Tabayashi K.
Another blood supply to Adamkiewicz's artery.
Jpn J Thorac Cardiovasc Surg. 2004 Sep;52(9):432-4.

5: Takahashi G, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y, Tabayashi K.
MCI-186 reduces oxidative cellular damage and increases DNA repair function in the rabbit spinal cord after transient ischemia.
Ann Thorac Surg. 2004 Aug;78(2):602-7.

6: Tabayashi K, Takahashi G, Motoyoshi N, Kokubo H, Sakurai M, Oda K, Saiki Y,
Iguchi A.
[Spinal cord protection during most or all of descending thoracic or thoracoabdominal aneurysm repair]
Kyobu Geka. 2004 Apr;57(4):301-6. Japanese.

7: Motoyoshi N, Takahashi G, Sakurai M, Tabayashi K.
Safety and efficacy of epidural cooling for regional spinal cord hypothermia during thoracoabdominal aneurysm repair.
Eur J Cardiothorac Surg. 2004 Jan;25(1):139-41.

8: Takahashi G, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y, Tabayashi K.
MCI-186 prevents spinal cord damage and affects enzyme levels of nitric oxide synthase and Cu/Zn superoxide dismutase after transient ischemia in rabbits.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Nov;126(5):1461-6.

9: Nitta Y, Tsuru Y, Yamaya K, Akasaka J, Oda K, Tabayashi K.
Endovascular flexible stent grafting with arch vessel bypass for a case of aortic arch aneurysm.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Oct;126(4):1186-8. No abstract available.

10: Sakurai M, Abe K, Tabayashi K.
Which cell dose supports motor neurons' survival?
J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 May;125(5):1177-8. No abstract available.

11: Motoyoshi N, Komatsu T, Moizumi Y, Tabayashi K.
Atypical paraplegia after aortic intramural hematoma.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Feb;125(2):409-10. No abstract available.

12: Sakurai M, Nagata T, Abe K, Horinouchi T, Itoyama Y, Tabayashi K.
Survival and death-promoting events after transient spinal cord ischemia in
rabbits: induction of Akt and caspase3 in motor neurons.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Feb;125(2):370-7.

13: Sakurai M, Nagata T, Abe K, Horinouchi T, Itoyama Y, Tabayashi K.
Oxidative damage and reduction of redox factor-1 expression after transient spinal cord ischemia in rabbits.
J Vasc Surg. 2003 Feb;37(2):446-52.

14: Tabayashi K, Motoyoshi N, Akimoto H, Tsuru Y, Sakurai M, Itoh T, Fukuju T,Iguchi A.
Epidural cooling for regional spinal cord hypothermia during most or all of descending thoracic or thoracoabdominal aneurysm repair.
Acta Chir Belg. 2002 Aug;102(4):224-9.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当せず

研究背景、目的

胸部大動脈瘤は、生活様式の欧米化、社会の高齢化に伴い近年増加しているが、内科的治療では制御不能で進行性に経過し、多くの例が破裂死亡の転帰をとるところから、原則として手術治療が必要な疾患である。その成績は、手術手技、補助手段の改良により、年々向上し手術死亡率は低下してきているが、術後対麻痺の発症率は手術患者数の3-15%と依然多く、この合併症は患者の生活の質に大きく影響を及ぼすだけに、その防止策の確立は急務である。

対麻痺発症には、周手術期の脊髄虚血及び虚血再潅流障害が関与していると考えられており、その対策として、肋間動脈の再建、大動脈遮断中脊髄潅流圧維持目的の脊髄ドレナージ、大動脈遮断中の末梢側血圧維持、低体温、脊髄冷却、Caチャンネルブロッカー投与、ステロイド投与等が行われているが、対麻痺の発症減少に寄与してきているものの、いずれの脊髄保護効果も確実ではない。まず第一に、脊髄虚血を回避することが重要であるが、動脈瘤の部位によっては、術中の脊髄低潅流、虚血状態は完全には回避できない以上、虚血再潅流障害を抑える、あるいは脊髄神経細胞の耐虚血性を高めることが必要と考えられる。

一方、内皮由来血管弛緩因子として同定された一酸化窒素(NO)は、平滑筋を弛緩させることで血管拡張をもたらすと同時に、NF-kBの発現を抑制し、接着因子であるICAM-1, VCAM-1の発現を抑え、好中球の遊走を抑制することが知られている。NOの合成酵素であるendothelial nitric oxide synthase (eNOS)は、内皮細胞においてNOを産生することから、血管内皮細胞に対するeNOS遺伝子導入により目的組織にNOを供給することが可能となるとの報告がある。また、oxygen-regulated protein 150kD (ORP150)は、低酸素状態の神経細胞で発現し、脳由来神経栄養因子(BDNF)等の神経保護因子の分泌を促すことが知られており、最近、培養神経細胞においてORP150を過剰発現させると、低酸素ストレスによる神経細胞死を抑えることが報告された。

本研究は、eNOS及びORP150の発現プラスミドをそれぞれ作製し、リポフェクション法あるいはアデノウィルスベクター法を用いた遺伝子導入法により、脊髄動脈内皮細胞にeNOS遺伝子を導入発現させ、脊髄動脈の血行改善を図り、かつ好中球の浸潤を抑えることで虚血再潅流障害を抑え、また脊髄神経細胞にORP150を発現させることで、耐虚血性を高め、対麻痺発生頻度を低下し得るか、明らかにすることを目的として行われた。

研究結果

ORP150 cDNAの作製

ラットの脳組織からmRNAを含むtRNAを抽出し、RT-PCR法によってORP150 cDNAを合成した。この際、primerの配列に、制限酵素配列を加えておき、後の切り出し、ライゲーションの行程が容易となるようにした。RT-PCR用のprimerは、当初設計したものではcDNAが伸張しなかったことから、再設計しcDNAの伸張を得ることができた(Fig. 1)。

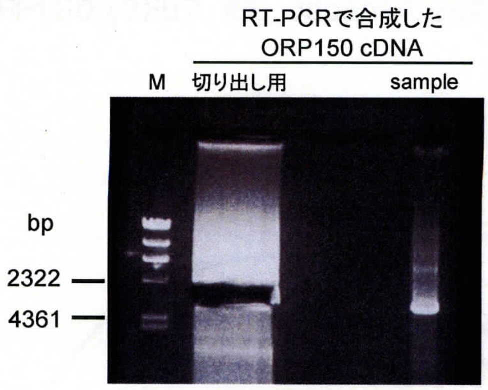


Fig.1 ラットの脳組織からmRNAを含むtRNAを抽出し、RT-PCRを行い、3kbのfragment（ORP150）をアガロースゲルから切り出す

ecNOS c DNAの作製

マウスの大動脈組織からmRNAを含むtRNAを抽出し、RT-PCR法によってecNOS cDNA合成を試みた。この際、primerの配列に、制限酵素配列を加えておき、後の切り出し、ライゲーションの行程が容易となるようにした。RT-PCR用のprimerは、当初設計したものではcDNAが伸張しなかったことから、primerを再設計したがやはりcDNAの伸張を得ることができず、cDNAが長いことが原因と考え、分割してcDNAを得るようにprimerを再度設計し、またPCR条件を変更し、PCRを何度も行ったがecNOS cDNAを得ることはできなかった。mRNAの調整の確認は、β-actinに対するRT-PCRを行い、β-actin cDNAの合成が可能であったことから、mRNAの調整は問題なく行われていると考えられた。念のため、別のマウスの大動脈組織を採取し、同様のRT-PCRを行ったが、ecNOS cDNAを得ることはできなかった。

ORP150発現プラスミドの作製、発現確認

脳神経系を含む広範な組織において強い発現活性を持つことで知られるCAG promoterをの下流にORP150のcDNAを組み込み、ORP150発現プラスミドを作製した。ORP150の下流に更にIRES配列とEGFP配列を組み込み、発現の確認が同時に行えるようにした（pCAG-ORP150-IRES-EGFP, Fig.2）。培養細胞（293細胞）を用いて、リポフェクション法にてこのpCAG-ORP150-IRES-EGFPを導入したところ、遺伝子導入細胞が蛍光を発することが確認しえた。この培養細胞を回収しWestern blottingを行い、ORP150蛋白の発現を確認した。抗体はAnti-human ORP150 (2F07, IBL, Japan)を使用した（Fig.3）。

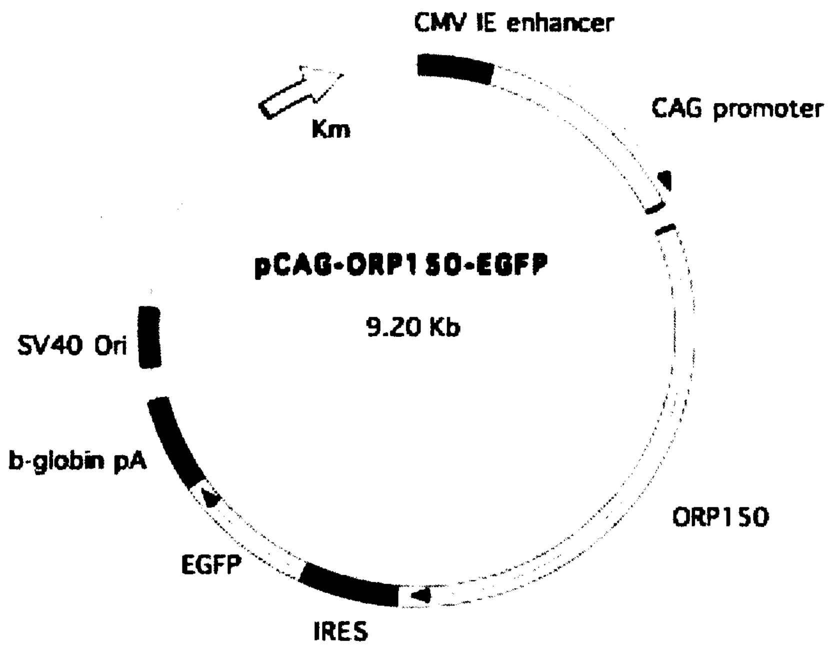
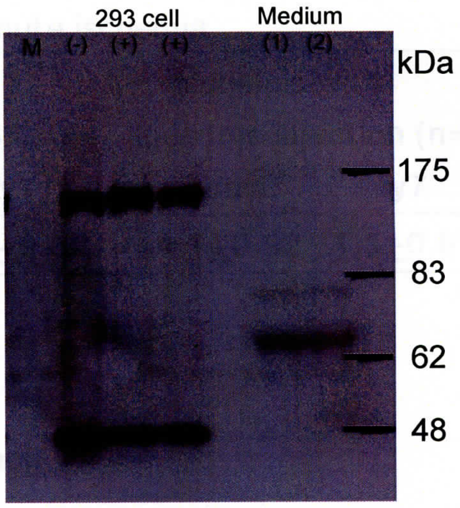


Fig.2　作製したORP150発現プラスミド（pCAG-ORP150-EGFP）

Fig.3
培養細胞（293細胞）を用いて、リポフェクション法にてpCAG-ORP150-IRES-EGFPを遺伝子導入し、この培養細胞を回収しWestern blottingを行い、ORP150蛋白の発現を確認した。抗体はAnti-human ORP150 (2F07, IBL, Japan) を使用した。
293細胞内のnative ORP150に加えて、導入遺伝子によって発現した150kDaのバンドを確認した。



ウサギ脊髄虚血モデルの作製
ウサギ（Japanese domesticated white rabbits, 体重2-3Kg）を用いて、全身麻酔下に大腿動脈から5Frのバルーンカテーテルを逆行性に挿入し、下行大動脈内でバルーンを拡張させ、常温15分間の虚血実験を行った。下記に示すJohnson's scoreを用いて、下肢の神経学的機能低下度の評価を行った（Table 1）。

２つの異なる経路（経脊髄腔、経脊髄動脈、直接脊髄穿刺）による遺伝子導入法の検討
ウサギ前脊髄動脈は、ヒトと異なり側副血行路が多く、注入した遺伝子が流出してしまうことから、効率よい遺伝子導入は困難と考えられた。経脊髄腔投与は技術的に困難かつ導入細胞も限られることから、文献的にも報告されている直接脊髄穿刺投与法を行う方針とした。
reporter geneとしてLac-Z cDNAを組み込んだ発現プラスミドpCAGGS-Lac-Zを用いて、ウサギ脊髄に対するnaked DNA法、lipofection法の遺伝子導入効率の評価を行った。３日後に屠殺し、脊髄を採取し液体窒素で凍結標本を作製し、ミクロトームで切り出した切片をX-Galで染色を行ったが、Lac-Z遺伝子の発現は確認できなかった。Johnson's scoreを用いて、下肢の神経学的機能低下度の評価を行った（Table 1）。

Table 1

Johnson's score after spinal cord 15-minute ischemia

sham control (n=6)		ischemia (n=6)		ischemia with liposome injection (n=15)	
day2	day7	day2	day7	day2	day7
5±0	5±0	4.2±0.98	2.3±0.52	4.1±0.92	1.5±0.69

0: hind-limb paralysis,
1: severe paraparesis
2: functional movement, no hop
3: ataxia, disconjugate hop
4: minimal ataxia
5: normal function

ORP150発現アデノウィルスベクターの作製

リポフェクション法の遺伝子導入効率が低いことが原因と考えられたため、アデノウィルスベクターを用いて遺伝子導入を図る方針とした。CosmidとCre-loxPを用いたアデノウィルス作製法を用いた。pAFC3のexpression cassetteに、pCAG-ORP150-IRES-EGFPから切り出したCAG-ORP150-IRES-EGFPを組み込み、Adeno-CAG-ORP150-IRES-EGFPを作製した（Fig.4）。

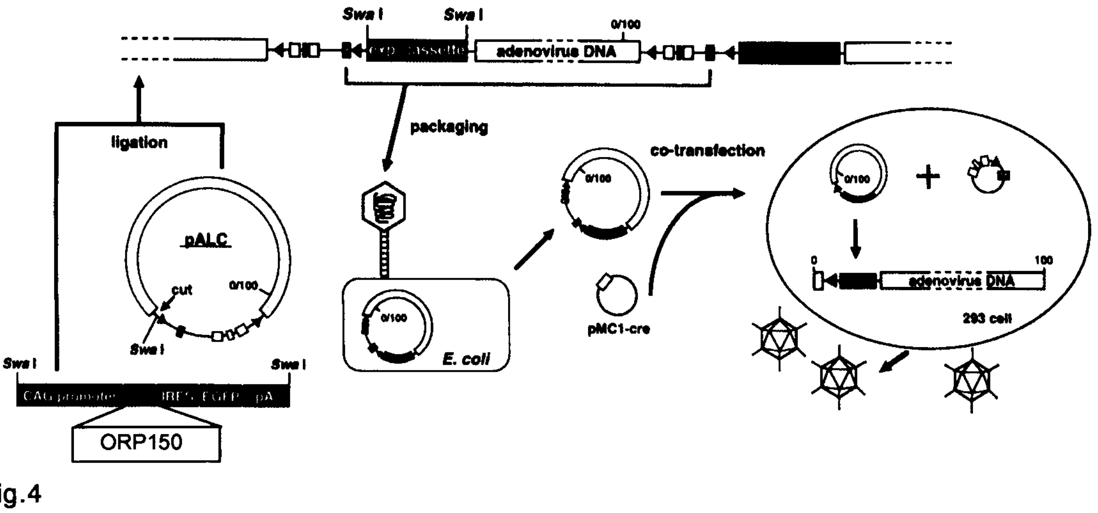


Fig.4

アデノウィルスベクターの複製
ベクターを、実験に必要な量得るため、大量精製することを試みた。
293細胞にORP150発現cassetteの組み込まれたクローンをcre, FLP発現プラスミドと共にリポフェクションし、CPE数を観察した。CPE数は多くなかったが、CPEは蛍光顕微鏡で観察すると、緑色に蛍光を発しており、アデノウィルスに感染し、遺伝子導入されていることが確認された。CPE数は少なく、大量複製を試みたが困難であった。

考察

研究代表者らは、ウサギ脊髄虚血モデルを用いて多くの知見を報告してきた。虚血による運動ニューロンの死及び遅発性選択的運動ニューロン死には、壊死よりもアポトーシスが関与すること、脊髄の冷却は虚血後の脊髄運動ニューロンにおいてheat shock proteinを発現させ、再灌流時のアポトーシス変化を抑制すること、再灌流時の運動ニューロンにおいてFas抗原が発現しており、これがアポトーシスに関与していることが示唆されること、glial cell line-delived neurotropic factor (GDNF)発現アデノウィルスベクターを用いて、脊髄においてGDNF発現させることで、虚血後の脊髄運動ニューロンのアポトーシスが軽減され、神経障害軽減されること、等を報告した。

このような知見に基づき、本研究では、eNOS及びORP150の発現プラスミドをそれぞれ作製し、リポフェクション法、アデノウィルスベクター法を用いた遺伝子導入法により、脊髄動脈内皮細胞にeNOS遺伝子を導入発現させ、脊髄動脈の血行改善を図り、かつ好中球の浸潤を抑えることで虚血再灌流障害を抑え、また脊髄神経細胞にORP150を発現させることで、耐虚血性を高め、対麻痺発生頻度を低下し得るか、明らかにすることを目的とした。

リポフェクション法は、遺伝子導入効率はアデノウィルスベクターと比較し高くないが、今回導入を試みた遺伝子は、NO、BDNF等の分泌を誘導することで周囲の組織に効果をもたらすため、すべての細胞に遺伝子導入させる必要はないこと、及び免疫反応の惹起も軽度であること等の利点があった。本研究は、将来、臨床治療に応用発展されていくことが想定されるが、非ウィルス性の遺伝子導入法であることが安全性の点で理解を得やすいことも重要である。

ORP150 cDNAの合成はラットの脳組織からのRT-PCR法によって行い、このcDNAを組み込んだORP150発現プラスミドを作製し、これをリポフェクション法を用いて培養細胞に導入し、Western blotting法でORP150遺伝子のタンパク発現を確認した。このORP150発現プラスミドをウサギ脊髄にリポフェクション法で遺伝子導入するにあたり、導入効率の確認をリポーター遺伝子（LacZ）を発現させるプラスミド（pCAGGS-LacZ）で行った。しかし、pCAGGS-LacZをリポフェクション法で脊髄に導入したところ、リポーター遺伝子の発現は確認できず、リポフェクトアミンとプラスミドの混合比率を変え、再実験を繰り返したが、神経細胞に対するin vivoでのリポフェクションは断念せざるを得なかった。同様の手法で肺に対して行ったリポフェクション法は導入効率が良く（data not shown）、また培養神経細胞に対するリポフェクション法による遺

伝子導入も可能であることが報告されているにもかかわらず、神経組織に対するin vivo遺伝子導入は困難であった。リポフェクトアミン脊髄注入後の対麻痺スコア(Johnson' s score)は、sham群と比較し低下しており、脊髄直接注入によるリポフェクション法は、脊髄に対し侵襲的と考えられた。このリポフェクション法の遺伝子導入効率向上が困難であったことから、その改善は今後の課題となった。
一方、アデノウィルス法による遺伝子導入法は、脳神経系のin vivo実験で多用されており、遺伝子導入は可能と考えられた。ORP150発現アデノウィルスを作製するにあたり、ORP150遺伝子の下流にIRES配列を用いてEGFP遺伝子を組み込み、発現確認を容易となるようにした。このORP150-IRES-EGFP遺伝子をアデノウィルスベクターに組み込む際に、CosmidとCre-loxPを用いたアデノウィルスベクター作製法を用いた。ORP150-IRES-EGFP遺伝子を発現するアデノウィルスベクターを作製することができたものの、実験に必要な数を大量複製することができなかった。これはORP150が過剰に発現すると293細胞に対して毒性が生じる可能性が示唆された。同様の手法でIL-5とEGFPの過剰発現を行った場合では293細胞に対してこのような影響は認めていないことから、EGFPの過剰発現自体は細胞に対する毒性は問題となっていないため、ORP150の過剰発現による293細胞への影響と考えられる。アデノウィルスベクターは、wild typeのアデノウィルスと異なり、293細胞以外の細胞内では複製されないため、293細胞以外の細胞での毒性は不明であるが、脊髄の虚血耐性を高めることを意図して、ORP150を過剰に脊髄で発現させた場合、神経細胞死をもたらす可能性も示唆された。今回、我々が用いたCAGプロモーターは、アクチン系のプロモーターで、多くの細胞内で非常に高いプロモーター活性を有するのが特徴であるが、この高すぎるプロモーター活性により過剰に産生されたORP150が293細胞に毒性をもたらした可能性は否定できない。今後、プロモーター活性の低いプロモーターに置き換えたORP150発現ベクターを作製することで、293細胞に対する毒性が弱まり、ORP150発現アデノウィルスベクターが大量複製可能となる可能性があり、更なる課題が残った。脳神経細胞において、適度なレベルでのORP150発現が神経細胞の虚血耐性を高めることが報告されているが、ORP150の過剰発現は293細胞のみならず神経細胞にとっても毒性がある可能性があり、外科手術に遺伝子治療を併用することで対麻痺の発症頻度を下げるという戦略を実現して行く上で、遺伝子導入方法のみならず、発現レベルの調整が重要であることが示唆された。

本研究では、リポフェクション法、アデノウィルスベクター法による脊髄へのORP150遺伝子導入を試みたが、現時点では、脊髄虚血耐性を高めるか否かの確認には至らなかった。またORP150過剰発現は293細胞に対する毒性があると考えられ、神経細胞においても高度な過剰発現は細胞死をもたらす可能性があり、適切な低いレベルでORP150を供給できるような発現のコントロールが必要であることが示唆された。

TOUR　:　Tohoku University Repository
コメント・シート

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に TOUR に登録しております。

TOUR
http://ir.library.tohoku.ac.jp/