

学位論文題名

The Role of Bcl-2 Gene
In the Contusive Mouse Spinal Cord Injury

(マウス脊髄損傷における Bcl-2 遺伝子の役割)

学位論文内容の要旨

〔研究目的〕脊髄損傷は一次損傷に加えて、それに続発する二次損傷が機能予後に大きく影響すると考えられている。損傷された脊髄ではネクローシスに加えて早期からアポトーシスが認められ、二次性損傷はこのアポトーシスが大きく関与していると考えられている。アポトーシスの重要な制御遺伝子として、Bcl-2 ファミリーと呼ばれる蛋白群が知られており、アポトーシスに対して抑制作用を有する蛋白と促進作用を有する蛋白に大きく分けられる。本研究では再現性のある安定した脊髄損傷を作製することができるニューマチックインパクトデバイスを用いたマウスの慢性期脊髄損傷モデルを用いて、アポトーシスに対して抑制的に働く Bcl-2 遺伝子を強発現させた Bcl-2 トランスジェニックマウス (Bcl-2 TG マウス) による脊髄損傷における Bcl-2 遺伝子の役割について検討することを目的とした。ニューマチックインパクトデバイスを用いた Bcl-2 TG マウス慢性期脊髄損傷実験は本研究が初めてである。

〔実験方法〕週齢 5-10 週の C57BL6 系統マウス 11 匹 (体重 15-20 g) を本研究に用いた。内訳は Bcl-2 遺伝子を強発現させた Bcl-2 TG マウスの雌雄を交配して得られた第 2 世代の Bcl-2 TG マウス 6 匹とコントロールマウス 5 匹である。

〔脊髄損傷の作製〕イソフルレンによる吸入麻酔を行い十分な麻酔深度に達したことを確認した後、第 10 胸椎椎弓切除を行なった。不完全脊髄損傷を作製するため、ニューマチックインパクトデバイスの設定を、インパクトの速度を 2 m/s、衝撃時のインパクトの硬膜からの深さを 0.25 mm に固定して脊髄損傷を作製した。脊髄損傷作製中、直腸温は生理的範囲内に保った。

〔後肢運動機能評価〕7 項目の後肢運動機能評価を損傷直後、24 時間後、1 週間後、2 週間後、3 週間後、そして 4 週間後に行い、各測定時期で Bcl-2 TG マウスとコントロールマウスとの間で Mann-Whitney U test を行い統計学的に比較した。

〔病理組織学的検討および損傷脊髄の体積〕脊髄損傷後 28 日目に全身麻酔下に開胸し 23 ゲージ針を左心室より上行大動脈に挿入してヘパリン入り生理食塩水を約 20 ml 点滴した。次に右心房を切開して脱血した後、10 %フォルマリンを約 60 ml 点滴し灌流固定を行った。灌流固定後、第 10 胸椎レベルの脊髄損傷部位を含めて上下に長く脊髄を採取した。採取した脊髄はパラフィン包埋し、矢状面で 5 μ m の厚さで切片を作製しヘマトキシリンエオシン染色、ルクソールファストブルー染色、さらに Bcl-2 抗体による免疫染色を行なった。損

傷脊髄の体積は Two cone theory [損傷脊髄の体積 = $\pi D^2 (H1+H2)$] を用いて測定し、Bcl-2 TG マウスとコントロールマウスの間で unpaired t-test を行い統計学的に比較検討した。

〔RT-PCR による Bcl-2 遺伝子の確認〕脊髄損傷慢性期における Bcl-2 TG マウスおよびコントロールマウスにおいてメッセンジャー RNA レベルでの Bcl-2 遺伝子発現の有無を RT-PCR 法を用いて確認した。脊髄損傷後 28 日目に灌流固定を行なう前に全身麻酔下で脾臓を摘出し、それを液体窒素にて凍結保存した。次にその脾臓から RNA を抽出して RT プロダクトを作製し、G3PDH ハウスキーピングプライマーと Bcl-2 プライマーを用いて 35 サイクルで RT-PCR を行なった。

〔結果〕全例で不完全脊髄損傷を認めた。後肢運動機能の評価では、脊髄損傷 28 日後においても Bcl-2 TG マウスおよびコントロールマウスともに 7 項目の後肢運動機能評価全てに後肢運動機能が完全に回復したマウスは認められなかった。Bcl-2 TG マウスではコントロールマウスと比較して、すべての項目でより機能が回復する傾向が認められたが、2 群間で統計学的に有意差は認められなかった。損傷脊髄の体積は、コントロールマウスで平均 $5.1 \pm 0.8 \times 10^2 \text{ mm}^3$ (mean \pm SD), Bcl-2 TG マウスで平均 $2.9 \pm 1.1 \times 10^2 \text{ mm}^3$ (mean \pm SD) で Bcl-2 TG マウスで損傷脊髄の体積の縮小を認めた。この結果は p 値 0.0101 で統計学的に明らかな有意差を認めた。RT-PCR の結果、脊髄損傷 28 日目におけるメッセンジャー RNA レベルでの Bcl-2 遺伝子の発現は Bcl-2 TG マウスで全例 Bcl-2 遺伝子の発現が認められたが、コントロールマウスでは Bcl-2 遺伝子の発現は認められなかった。また Bcl-2 抗体による免疫染色でも、Bcl-2 TG マウスでは脊髄損傷部位を含めて著明に Bcl-2 遺伝子が発現されていることが確認できたが、コントロールマウスでは Bcl-2 遺伝子を発現する細胞は認められなかった。

〔考察〕脊髄損傷における二次損傷を解明する目的で、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 遺伝子を強発現させた Bcl-2 TG マウスと同系統のコントロールマウスを用いて慢性期脊髄損傷実験を行なった。ラットを用いた脊髄損傷モデルでは脊髄損傷 1 時間後から神経細胞およびグリア細胞でアポトーシスが起きているとの報告がある。脊髄損傷後に見られるアポトーシス細胞は二相性で、まず損傷 8 時間後に神経細胞において初めのピークを認める。次に損傷 7 日目に主に希突起神経膠細胞にアポトーシス細胞の出現が認められると報告されている。脊髄損傷後に認められるアポトーシスは神経機能の回復に悪影響を与えていると考えられている。本研究の結果で脊髄損傷後の後肢運動機能の回復では、コントロールマウスと Bcl-2 TG マウスでは統計学的に明らかな有意差は認められなかったが、各測定時期で Bcl-2 TG マウスでより機能回復の傾向が認められた。さらに長期に経過観察を行なった場合は、2 群間で後肢運動機能の回復に明らかな差が生じた可能性も考えられる。また損傷脊髄の体積の比較ではコントロールマウスと Bcl-2 TG マウスで、統計学的に明らかな有意差をもって Bcl-2 TG マウスで損傷脊髄の体積は縮小していた。脊髄損傷 28 日目における RT-PCR におけるメッセンジャー RNA レベルでの Bcl-2 遺伝子発現の検索でコントロールマウスでは Bcl-2 遺伝子の発現は認められなかったが Bcl-2 TG マウスでは慢性期においても Bcl-2 遺伝子の発現が認められた。さらに免疫組織学的検討においてもコントロールマウスでは認められなかった Bcl-2 遺伝子が、Bcl-2 TG マウスでは脊髄損傷部位だけではなく、それよりも頭尾側においても Bcl-2 遺伝子が発現していたことから、この Bcl-2 遺伝子が脊髄損傷後の一次損傷に続発する二次損傷の抑制に関与していることが示唆された。本研究はマウス慢性期脊髄損傷モデルにおける Bcl-2 遺伝子の神経保護作用について検討した最初の報告であり、急性期脊髄損傷における遺伝子治療の可能性を示唆し、さらに脊髄損傷における二次損傷の解明に対して有意義な研究であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

The Role of Bcl-2 Gene In the Contusive Mouse Spinal Cord Injury

(マウス脊髄損傷における Bcl-2 遺伝子の役割)

脊髄損傷は一次損傷に続発する二次損傷が機能予後に大きく影響すると考えられている。損傷された脊髄では早期からアポトーシスが認められ、二次性損傷はこのアポトーシスが大きく関与していると考えられている。本研究では再現性のある安定した脊髄損傷を作製することができるニューマチックインパクトデバイスによる慢性期マウス脊髄損傷モデルを用いて、アポトーシスに対して抑制的に働く Bcl-2 遺伝子を強発現させた Bcl-2 トランスジェニックマウス (Bcl-2 TG マウス) による脊髄損傷における Bcl-2 遺伝子の役割について検討した。

対象および方法は 5-10 週齢の C57BL6 系統マウス 11 匹を本研究に用いた。内訳は Bcl-2 TG マウス雌雄を交配して得られた第 2 世代の Bcl-2 TG マウス 6 匹とコントロールマウス 5 匹である。脊髄損傷の作製は吸入麻酔を行った後、T10 椎弓切除を行なった。ニューマチックインパクトデバイスの設定をインパクトの速度を 2 m/s、衝撃時のインパクトの硬膜からの深さを 0.25 mm に固定して不完全脊髄損傷を作製した。7 項目の後肢運動機能評価を脊髄損傷直後、24 時間後、以後 1 週間ごとに 28 日目まで行い Bcl-2 TG マウスとコントロールマウスとの間で Mann-Whitney U test を行い統計学的に比較した。脊髄損傷後 28 日目に全身麻酔下に開胸後、10 %ホルマリン液にて灌流固定を行った。灌流固定後 T10 レベルの損傷部位を含めて上下に長く脊髄を採取した。採取した脊髄はパラフィン包埋し、矢状面で 5 μ m の厚さで切片を作製し H-E 染色、ルクソールファストブルー染色、さらに Bcl-2 抗体による免疫染色を行なった。損傷脊髄の体積は Two cone theory を用いて測定し 2 群間で unpaired t-test を行い統計学的に比較検討した。脊髄損傷慢性期において Bcl-2 TG マウスおよびコントロールマウスにおいて、メッセンジャー RNA レベルで Bcl-2 遺伝子が発現されているか否かを RT-PCR 法を用いて確認した。脊髄損傷後 28 日目で、灌流固定を行なう前に全身麻酔下で脾臓を摘出した。その脾臓から RNA を抽出して RT プロダクトを作製し G3PDH ハウスキーピングプライマーと Bcl-2 プライマーを用いて 35 サイクルで RT-PCR を行なった。

結果は、後肢運動機能の評価では脊髄損傷 28 日後においても Bcl-2 TG マウスおよびコントロールマウス、ともに 7 項目全てに後肢運動機能が完全に回復したマウスは認められなかった。しかし Bcl-2 TG マウスではコントロールマウスと比較してすべての項目でより回復する傾向が認められたが、2 群間で統計学的に有意差は

認められなかった。損傷脊髄の体積は Bcl-2 TG マウスで縮小を認めた。この結果は p 値 0.0101 で統計学的に明らかな有意差を認めた。RT-PCR の結果、脊髄損傷 28 日目におけるメッセンジャーRNA レベルでの Bcl-2 遺伝子の発現は Bcl-2 TG マウスで全例 Bcl-2 遺伝子の発現が認められたが、コントロールマウスでは認められなかった。また Bcl-2 抗体による免疫染色でも、Bcl-2 TG マウスでは脊髄損傷部位を含めて著明に Bcl-2 遺伝子が発現されていることが確認できたが、コントロールマウスでは Bcl-2 遺伝子を発現する細胞は認められなかった。

以上、本研究の結果からこの Bcl-2 遺伝子が脊髄損傷後の一次損傷に続発する二次損傷の抑制に関与していることが示唆された。

公開発表において三浪明男教授から椎弓切除後の不安定性とアポトーシスについての関連・コントロールマウスと Bcl-2 TG マウスでの脊髄損傷高位の相違について・ヒトにおける脊髄損傷時の Bcl-2 遺伝子発現の有無について質問があった。次いで岩崎喜信教授からコントロールマウスと比較して Bcl-2 TG マウスで明らかに損傷脊髄が縮小していたにもかかわらず神経機能の回復では有意差が認められなかったことに関しての考察・脊髄再生における本研究の意義に関しての質問があった。さらに長嶋和郎教授から急性期脊髄損傷におけるアポトーシスについての検討・脊髄損傷において長軸方向だけではなく水平方向への損傷と神経機能回復に関する質問があった。いずれの質問に関しても申請者は自らの研究に基づき経験や過去の論文の結果を引用し明確に回答した。

本研究は慢性期マウス脊髄損傷モデルにおいて Bcl-2 遺伝子の神経保護作用について検討した最初の報告であり、急性期脊髄損傷における遺伝子治療の可能性を示唆し、さらに脊髄損傷における二次損傷の解明に対して有意義な研究であると考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、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。