

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再建科学領域脊椎脊髄病態修復学教育研究分野 氏名 猿田 賢也
<p>(論文題目)</p> <p>Intraperitoneal administration of etizolam improves locomotor function in mice after spinal cord injury</p> <p>(脊髄損傷モデルマウスに対する Etizolam 投与による運動感覚機能改善効果の検討)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景】</p> <p>脊髄損傷 (spinal cord injury : SCI) 後の不安障害は 15%～32%の患者に出現し、リハビリテーションの阻害因子となるため、その予防と対策が重要である。また SCI 後の神経炎症は、損傷後に急性に起こり、組織損傷の悪化する要因となる。不安と神経炎症は、SCI 後の動物モデルにおいて関連することが報告されており、不安障害の治療は、SCI の治療において重要な役割を果たす。γ-aminobutyric acid (GABA) は中枢神経系においてニューロンの興奮性を調節する主要な抑制性神経伝達物質である。GABA_A 受容体刺激薬である etizolam (ETZ) は、GABA_A 受容体を介して神経細胞の GABA 作動性活性を増強する作用を持ち抗不安薬として使用される。しかしながら、GABA_A 受容体刺激薬の投与が SCI に与える効果は不明な点が多い。本研究の目的は、SCI 後の急性期の ETZ 投与が、脊髄損傷後の神経炎症および不安評価を含めた行動機能に及ぼす影響について検討することである。</p> <p>【対象と方法】</p> <p>対象は 8 週齢の雄 C57BL/6 マウスとした。第 10 胸椎高位脊髄に中等度圧挫損傷を加え、SCI モデルを作成した。椎弓切除のみを行った Sham 群、SCI 後に生理食塩水を投与した Saline 群、SCI 後に ETZ を投与した ETZ 群の 3 群に分けた。ETZ (0.5mg/kg/日) と生理食塩水 (1ml/日) は、損傷後 7 日間、腹腔内に投与された。</p> <p>実験 1 では ETZ の抗炎症効果を評価するため、Saline 群 (n=5) と ETZ 群 (n=5) の SCI 後 7 日目に、損傷中心部を含めた脊髄を 1cm 採取し、ELISA 法でサイトカイン (TNF-α、IL1-β、IL-10) の濃度を測定した。実験 2 では損傷 1 週前、2、4、6 週後に行動評価を行い、行動評価終了後にマウス (Sham 群 : n=11, Saline 群 : n=9, ETZ 群 : n=11) を灌流固定し脊髄の組織学的評価を行った。行動評価は、不安評価として open field test (OFT) における中心 25%歩行割合 (IC-25) を用い、運動機能評価として basso mouse scale (BMS)、rota-rod test のロッド上滞在時間、OFT の総移動距離を用い、感覚機能評価として heat test (HT)、mechanical test (MT) を用いた。組織学的評価は、Saline 群と ETZ 群の損傷中心部のミクログリア抗体である Iba1 陽性細胞数、アストロサイト抗体である GFAP 陽性面積を計測した。統計学的検討は、サイトカイン濃度、組織学的評価には、対応のない t-検定を用い、損傷前後の行動評価は群内および群間の比較に Tukey - Kramer 検定に続く二元配置分散分析 (two-way ANOVA) の反復測定を用いた。p<0.05 を統計学的に有意とした。</p> <p>【結果】</p> <p>実験 1 において、炎症性サイトカインの濃度は、Saline 群に比べ、ETZ 群で有意に低かった (TNF-α: 24.2 ± 0.9 vs. 20.3 ± 0.9, p=0.014; IL1-β: 23.7 ± 1.3 vs. 19.6 ± 0.7, p=0.022)。抗炎症サイトカイン (IL-10) のタンパク質濃度は、Saline 群と ETZ 群に有意差を認めなかった。</p>	

実験 2 では IC-25 は、ETZ 群、Saline 群は損傷後に 2 群間で有意差を認めなかった。BMS は、損傷 2 週後以降 Saline 群にくらべ、ETZ 群で有意に改善した (Saline vs. ETZ: 2 週: 2.9 ± 0.4 vs. 4.5 ± 0.4 , $p < 0.01$; 4 週: 3.7 ± 0.5 vs. 5.4 ± 0.3 , $p = 0.04$; 6 週: 3.9 ± 0.6 vs. 5.5 ± 0.3 , $p < 0.01$)。Rota-rod test のロッド上滞在時間、OFT の総移動距離は Saline 群と ETZ 群に有意差を認めなかった。感覚機能評価では損傷後 3 群間で有意差を認めなかった。また組織学的評価では病変中心部の Iba1 陽性細胞数および GFAP 陽性面積は Saline 群と比較して、ETZ 群では細胞数、面積ともに有意に低かった (Iba1: 108.3 ± 10.3 vs. 70.6 ± 7.9 , $p < 0.01$; GFAP: $68.3 \pm 8.7 \times 10^3$ vs. $54.3 \pm 2.6 \times 10^3$, $p = 0.022$)。

【考察】

本研究では SCI 後の急性期に ETZ を投与すると、脊髄の急性期における炎症性サイトカイン濃度が低下し、慢性期における炎症性細胞の浸潤とグリア瘢痕が減少した。行動評価では、ETZ を投与したマウスでは、不安行動に影響は与えなかったが、運動機能の改善が得られた。

本研究において、ETZ 投与後の SCI マウスの運動機能改善が得られた機序は、GABA_A 受容体の活性化を介した抗炎症効果による可能性がある。自己免疫脳脊髄炎マウスに GABA_A 作動薬を投与すると中枢神経における炎症性サイトカインの産生が抑制されることが報告されており、本研究でも同様の機序が働いたと考えられる。また SCI 後の TNF- α などの炎症性サイトカインの減少による抗炎症作用が、脊髄損傷後のグリア瘢痕形成を抑制すると報告されている。本研究でも、ETZ の抗炎症作用がグリア瘢痕形成を抑制することで、運動機能改善効果に寄与したと考えられる。

本研究では、これまでの報告と同様に SCI 後の IC-25 は ETZ 群、Saline 群ともに有意に低下した。GABA 作動性の欠陥は、不安障害に関連し、GABA 受容体を介した抑制が SCI 後に低下することが報告されており、同様の結果となった。しかしながら、抗不安薬である ETZ 投与による不安行動の改善効果は認められなかった。その理由としては、先行研究と比べ、ETZ の投与量が少なく、投与期間が短かったことが考えられた。

本研究の限界は、不安の評価に運動機能の影響を受ける OFT の IC-25 を用いたことや、ETZ の長期投与を行っていないことがあげられる。そのため今後は運動機能の影響を受けない不安の評価方法や、ETZ 長期投与実験を検討する必要がある。

【結論】

SCI 後の急性期における GABA_A 受容体刺激薬の ETZ 投与は、脊髄の神経炎症およびグリア瘢痕の形成を抑制し、その結果、SCI 後の運動機能を改善させた。ETZ は、SCI 後の急性期における有効な治療法となる可能性が示唆された。