The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Src Family Kinase Inhibitor PP1 Reduces Secondary Damage after Spinal Cord Compression in Rats
Author(s)	秋山, 智洋
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45528
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	秋山智洋（あきやまちひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　19335　号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Src Family Kinase Inhibitor PP1 Reduces Secondary Damage after Spinal Cord Compression in Rats （Src family kinase inhibitor PP1による脊髄損傷後の二次的損傷抑制効果の検討）
論文審査委員	（主査） 教　授　吉峰　俊樹 （副査） 教　授　吉川　秀樹　　教　授　遠山　正弥

論文内容の要旨

【目的】

脊髄損傷後には損傷部周囲の血管透過性亢進を来たし、その結果、浮腫の形成と炎症反応がもたらされ二次的損傷が進行すると考えられる。この血管透過性亢進にはVascular endothelial growth factor（VEGF）の関与が報告されている。また近年VEGFのシグナル伝達系の下流に存在するSrc family kinaseの活性化が、これに密接に関連していることが判明し、Src family kinaseを標的とした薬物による治療法が注目されている。ピラゾロピリミジン化合物である 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine（PP1）は強力な Src family kinase inhibitor であり、最近 PP1 投与により脳虚血モデルにおいて梗塞巣の著明な縮小を認めたことが報告されている。脊髄損傷においてもPP1によるSrc family kinaseの阻害が二次的損傷を抑制しうるであろうと推察されるが、その詳細は未だ明らかにされていない。本研究ではラットの脊髄損傷モデルを用いてPP1による脊髄損傷後の二次的損傷の抑制効果について、浮腫の形成と炎症反応に焦点を当てて検討することを目的とした。

【方法】

雌性Wistarラットに Sugita クリップ（把持力 70 g）を用いて spinal cord compression を行い、脊髄損傷モデルを作成した。損傷10分後にPP1（PP1群）または溶解液のみ（対照群）を腹腔内投与し、1、3、7日後に脊髄を摘出し、急速凍結保存し矢状断切片を作成した。

HE 染色にて挫傷範囲の同定を行い画像解析ソフトにて面積の定量を行った。また ABC 法による免疫組織染色にて、抗VEGF抗体を用いてVEGF発現を、抗IgG抗体を用いて浮腫の程度を、また抗ED-1抗体を用いてマクロファージの浸潤を評価することにより炎症の程度を、各々比較検討した。マクロファージの浸潤範囲については画像解析ソフトにて面積の定量を行った。

浮腫を評価する別の方法として、PP1群と対照群に対して1、3、7日後に脊髄を摘出し、dry-weight 法を用いて浮腫の定量を行った。また、炎症反応の強さを評価するために、炎症時に認められる TNFα と IL-1β の mRNA 発現を損傷6時間後に RT-PCR 法にて測定し、比較検討した。

【成績】

損傷１日後の挫傷範囲は両群で差を認めず、最初の損傷は両群とも同等であると考えられた。一方、損傷３日後では PP1 群において挫傷範囲の面積が対照群と比べて約 35%縮小しているのを認めた（$p<0.01$）。

VEGF の発現は損傷３、７日後に主に損傷部周囲のニューロンとグリア細胞に認められ、３日後がピークであった。発現の程度について両群で明らかな差は認めなかった。

浮腫の程度は両群とも損傷３日後でピークとなり同様のパターンを示したが、損傷１、３、７日後のいずれも PP1 群で有意な浮腫の軽減を認めた（$p<0.05$）。

マクロファージの浸潤は、損傷１日後では両群とも損傷部に軽度認めるのみであった。一方３日後においては、PP1 群でマクロファージの浸潤が損傷部とその周囲に限局しているのに対して、対照群ではより広範囲に浸潤を認めた。浸潤範囲の面積を両群で比較したところ、PP1 群で約 60%の縮小を認めた（$p<0.005$）。７日後では、３日後よりも対照群での浸潤範囲は縮小を認めたものの、依然 PP1 群と比べると広範囲であり、両群間に有意な差を認めた（$p<0.005$）。

損傷６時間後の TNFα と IL-1β の mRNA 発現はいずれも PP1 群で有意な抑制を認めた（TNFα : $p<0.005$, IL-1β : $p<0.05$）。

これらの結果より、VEGF の発現は両群で同様に認められたが、浮腫の形成と炎症反応の範囲、炎症性サイトカインの発現はいずれも PP1 群において有意な軽減を示すことが明らかとなった。これらの所見は VEGF のシグナル伝達系の下流に位置する Src family kinase 活性を阻害する PP1 の効果を反映したものと考えられた。

【総括】

本研究により Src family kinase inhibitor である PP1 の投与が脊髄損傷後においても浮腫の形成や炎症反応を抑制することが示され、二次的損傷の軽減に寄与することが明らかとなった。投与期間や投与量、それに副作用の検討など課題は多いものの、更なる検討によって脊髄損傷の治療に応用できる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究で脊髄損傷モデルを用いて Src family kinase inhibitor PP1 による脊髄損傷後の二次的損傷の抑制効果を検討した結果、PP1 の投与が脊髄損傷後の二次的損傷についても有意に抑制しうることを初めて明らかにした。特に PP1 が VEGF を介する経路ばかりでなく macrophage の活性をより強く抑制することを、in vivo において初めて明らかにした。更にその活性化に先立ち損傷早期の TNFα、IL-1β などの炎症性サイトカインの発現をも抑制することを見出した。これらの結果は Src を標的にした治療法を探求する上で注目に値するものと考えられる。

以上より、本研究の成果は、脊髄損傷の基礎的病態解明はもとより、新たな治療法の開発につながるものであり、学位の授与に値するものと考える。