

研究テーマ

中心性脊髄障害の病態解明に基づいた治療方法の開発

研究代表者

施設名 : 北海道大学大学院医学研究院

氏 名 : 櫻庭 淳志

研究テーマ：中心性脊髄障害の病態解明に基づいた治療方法の開発

所属先：北海道大学大学院医学研究院

氏名：櫻庭 淳志

【目的と方法】

中心性脊髄損傷は、高齢者に多く見られる脊髄損傷の一形態であり、慢性的な脊髄圧迫を背景に、比較的軽微な外力によって灰白質を中心とした損傷が生じることが特徴である。この損傷は、若年者における高エネルギー外傷による脊髄損傷とは異なる病態を示すと考えられるが、その詳細は未だ明らかにされていない。中心性脊髄障害の基盤にある慢性的な脊髄圧迫は、進行性に神経組織に影響を与え、損傷後は不可逆性の神経機能の低下を伴うため、外傷性脊髄損傷と同様に、早期の介入が必要とされている。しかし、従来の外傷性脊髄損傷の治療法が十分な効果を示すとは限らず、中心性脊髄障害に特化した病態メカニズムの解明と、それに基づいた治療戦略の確立が求められている。近年、分子生物学の進展により、急性および慢性の組織損傷において、制御された細胞死（Regulated Cell Death: 以下RCD）が、病態進行や損傷組織における重要な役割を担うことが明らかになってきた。代表的なRCDには、Apoptosis、Pyroptosis、Necroptosis、Ferroptosisが存在し、それぞれが異なる炎症応答や代謝経路を介して細胞死を誘導する。RCD経路は、細胞の死を制御するだけでなく、周辺の細胞や組織にも影響を及ぼし、炎症や組織損傷の進行にも関与していることから、急性外傷から慢性疾患まで多くの病態において治療標的として注目されている。しかし、中心性脊髄障害において、これらのRCDがどのように関与しているのか、また治療標的となるのかは未だ不明であり、その解明が本疾患の病態理解と治療の進展に重要と考えられる。本研究では、靱帯骨化によって慢性的な脊髄圧迫を自然発症するマウスモデルであるTiptoe Walking-Yoshimuraマウス（以下TWYマウス）を用いることで、中心性脊髄障害におけるRCDのメカニズムの解明を試みた。TWYマウスは自然発症型の慢性脊髄圧迫モデルとして、脊髄の進行性圧迫を特徴として持つため、ヒトの中心性脊髄損傷に類似した病態モデルの作成に有用である。本研究では、脊髄圧迫の程度を分類し、圧迫の程度と各RCDの発現状況を評価することで、中心性脊髄障害の各段階における細胞死の関与を明らかにすることを目的とした。また、多くの細胞死の研究で行われているように、各RCDに対して特異的な阻害薬を用いた介入実験を行うことで、中心性脊髄障害におけるRCDの治療標的としての可能性も示される。

本研究は、中心性脊髄障害におけるRCDの詳細なメカニズム解明に寄与するだけでなく、各RCDを標的とした治療アプローチの有効性を評価することで、今後の治療戦略の構築に向けた基礎的知見を提供することが期待される。また、より初期の段階で起こるRCDが明らかになることは、早期介入の有用性を検討するための貴重な情報を

もたらし、高齢者に多く見られるこの疾患に対する新しい治療法の確立に貢献するものと考えられる。

様式	特徴	生理的・病理的特徴	実行・関連因子
Apoptosis	・ クロマチンの凝集 ・ 細胞質の断片化	・ 指間膜の消失 ・ 肝炎など	カスパーゼ3,6,7
Necroptosis	・ 細胞の膨潤 ・ 核は正常	・ 脳梗塞 ・ ウイルス感染	RIPK1,RIPK3,MLKL
Pyroptosis	・ サイトカイン産生 ・ 細胞の破裂	・ 細菌、ウイルス感染	カスパーゼ1, 4/5,11 Gasdermin D
Ferroptosis	・ 鉄イオン依存 ・ 脂質の過酸化	・ 腎虚血再灌流傷害 ・ Ras高発現がん細胞の細胞死	xCT,GPx4,TFR

図1：代表的なRCDの例

方法1：TWYマウスの確保、脊髄造影CTの撮影

TWYマウスの凍結胚を入手し、仮母に胚移植を行い出産させることでTWYマウスを確保した。そうして得られた雌雄のTWYマウスから、採精、採卵を行い人工授精させることで実験に必要なTWYマウス160匹を作製した。生後5週で灌流固定を行い、当研究室にて確立した手技を用い、全マウスに対し脊髄造影CTを施行した。

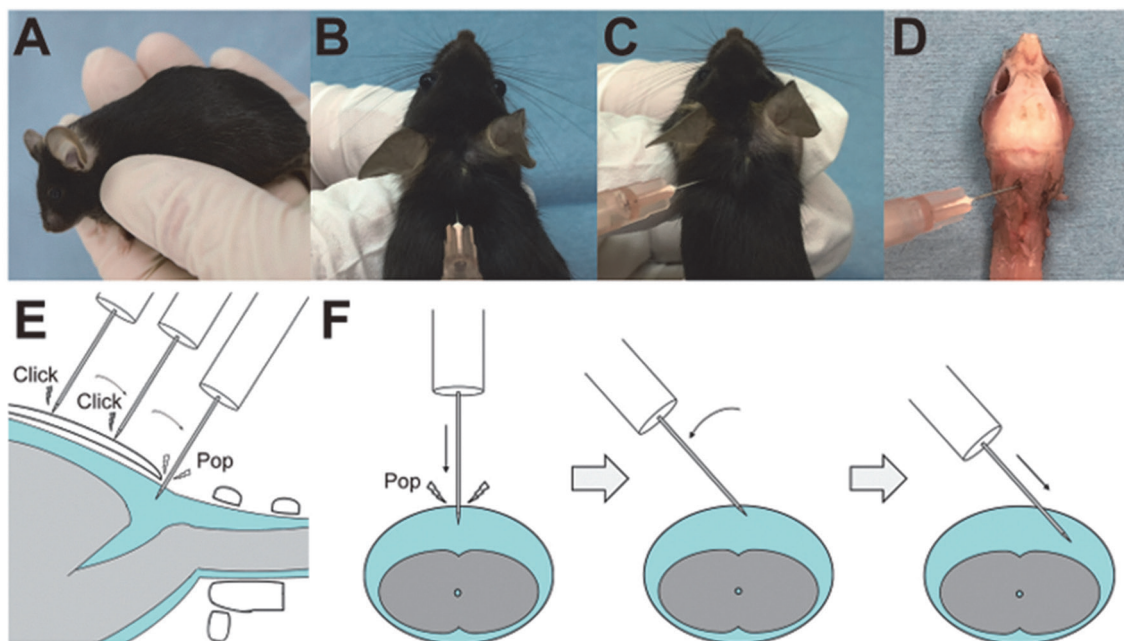


図2：マウスへの造影剤投与方法

Suzuki et al. J Neurosci Methods 2024

方法2：脊髓圧迫の定量、圧迫程度による分類

灌流固定、脊髓造影CT撮影後のTWYマウス（5週齢、160匹）の脊髓径を計測し、脊髓圧迫の内容と程度が類似した5群に分類した。

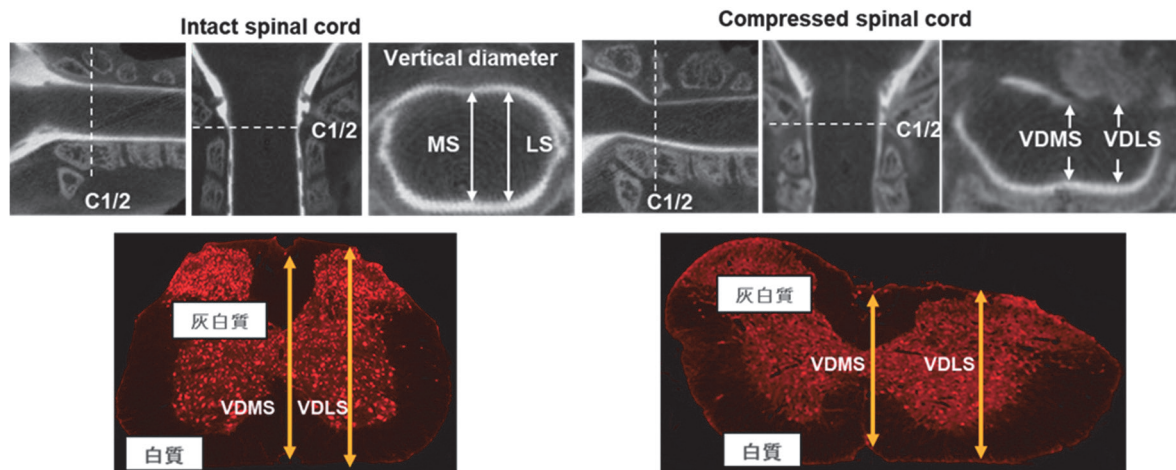


図3：脊髓径の定量

MS (middle of the spinal cord)、LS (lateral spinal cord)、VDMS (Vertical diameter of MS) は白質の圧迫を反映、VDLS (Vertical diameter of LS) は灰白質の圧迫を反映

方法3：脊髓障害の程度に応じたRCDの種類と細胞種の同定

脊髓圧迫の内容と程度から分類された5群に対し、圧迫部の脊髓の冠状断切片に多重免疫蛍光染色を施行し、4種のRCD (Apoptosis、Pyroptosis、Necroptosis、Ferroptosis) の有無と、その細胞種を確認した。

RCDのマーカーとしてそれぞれ、ApoptosisはTunel染色、PyroptosisはGSDMD、NecroptosisはRIP3、FerroptosisはTFRを使用した。

【結果】

1 脊髓造影CTの圧迫程度から分類を作製

脊髓造影CTを施行した160匹中、造影剤の髄腔外への漏出、また脊髓内に注入されてしまった9匹を除いた151匹を分類に使用した。

a. 始めに、圧迫なし群 (N=16/151) を選定した (図4)。

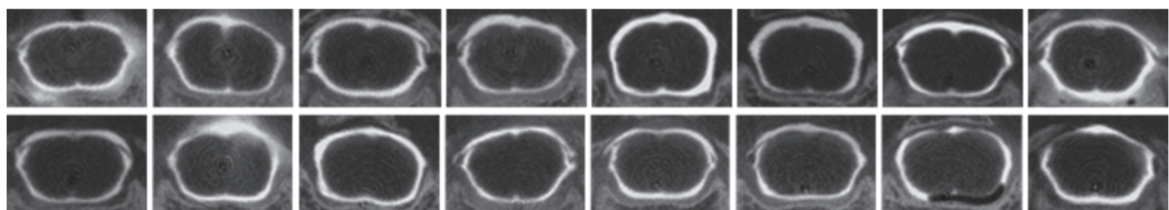


図4：圧迫なし群 (①造影剤による高吸収域の途絶像なし、②脊髓形態が左右対称)

b. 脊髓径の計測値から散布図を作製し、圧迫の程度を4群に設定した（図5）。

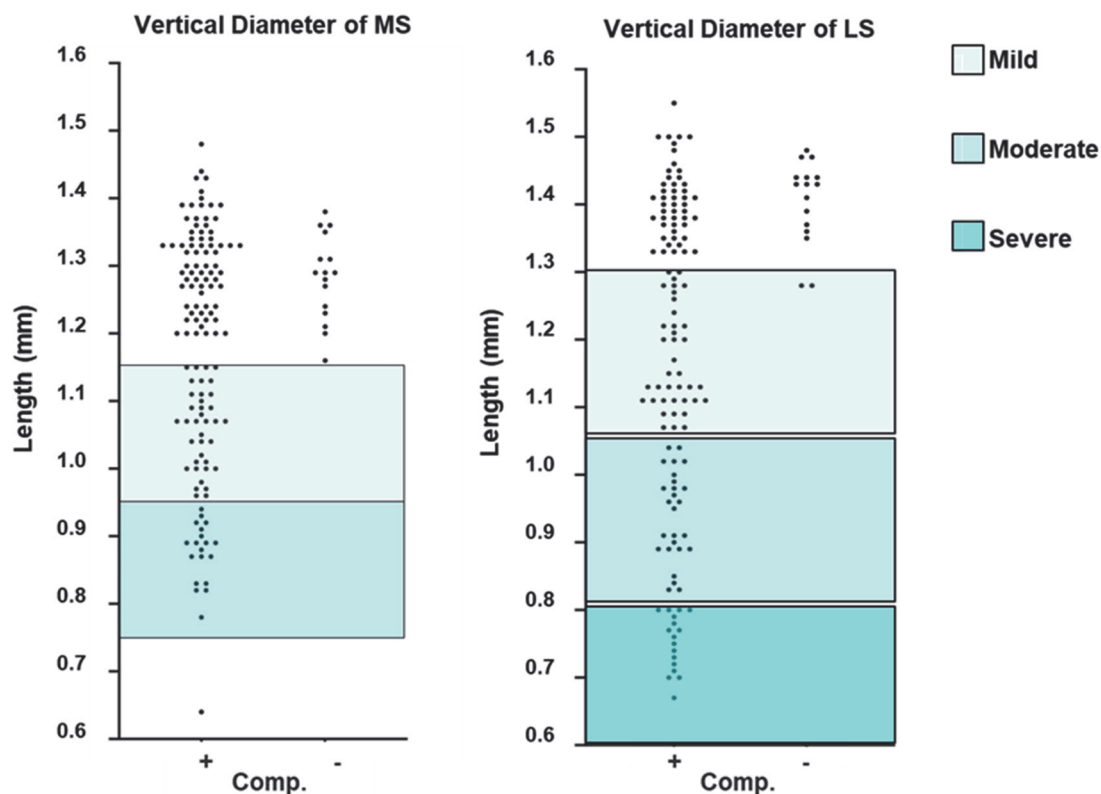


図5：計測値での散布図

None：圧迫なし、Mild：軽度圧迫、Moderate：中等度圧迫、Severe：重度圧迫

c. MSとLSの圧迫程度の組み合わせで、分布が分かれていて、N数が確保できる4群を解析に使用した（図6）。

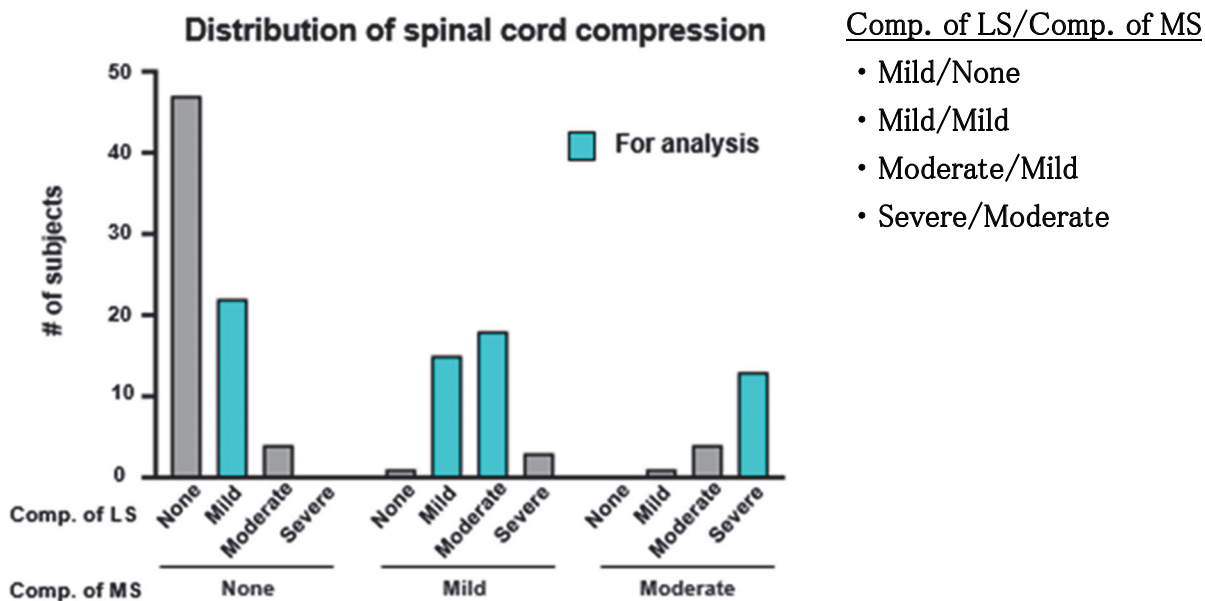


図6：各群のN数での棒グラフ

d. 各群の脊髄造影CT画像を確認し類似した6例を選出した（図7）。

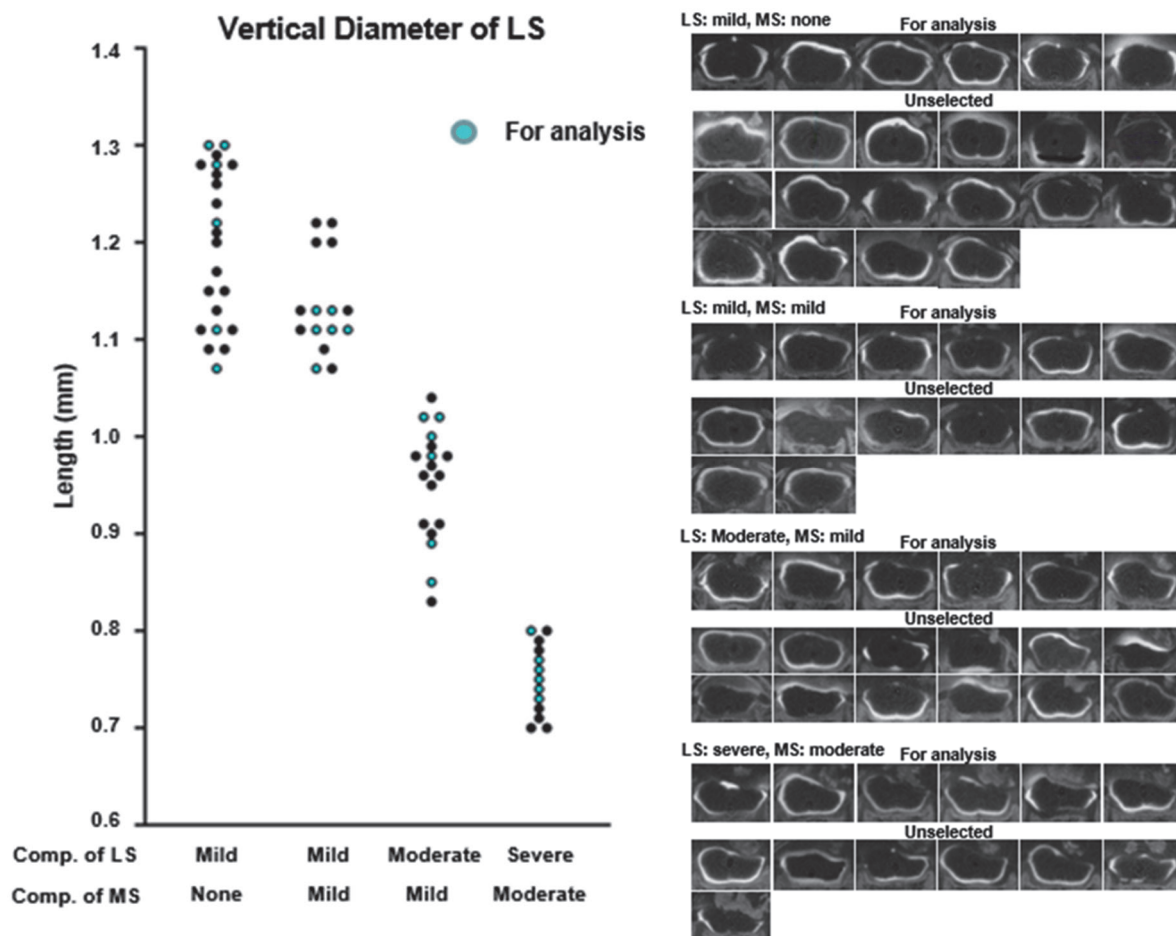


図7：LSの計測値による各群の散布図

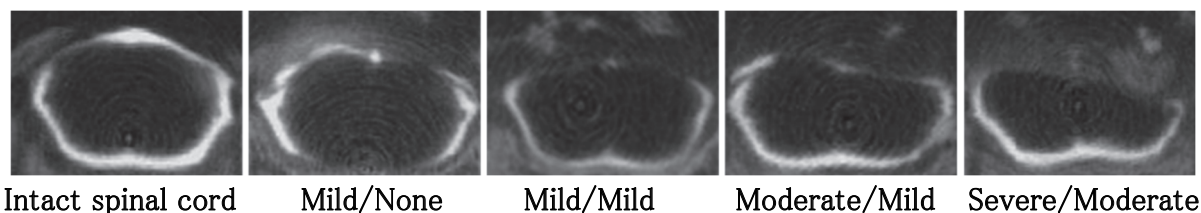


図8：各群の代表例

2 多重免疫蛍光染色

圧迫なし群も含めた5群に対し、4種のRCDのマーカを用いて免疫蛍光染色を行い、各圧迫程度におけるRCDの有無を調べた。また、RCDマーカー陽性である細胞の種類を同定した。

a. Apoptosis

Tunel陽性細胞は、Mild/Noneから出現し神経細胞（NeuN）と共陽性を示した。

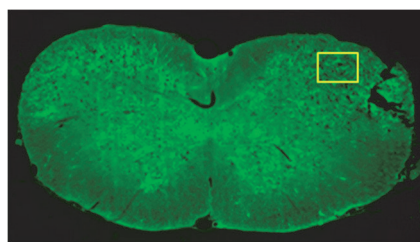


図9：Mild/NoneのTunel染色像（左）

脊髓後角のTunel染色像（下段左）、NeuN染色像（下段中）、共染色像（下段右）

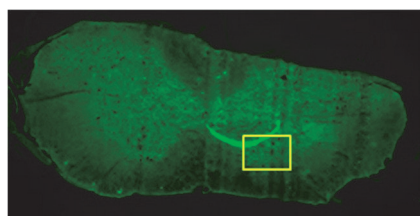
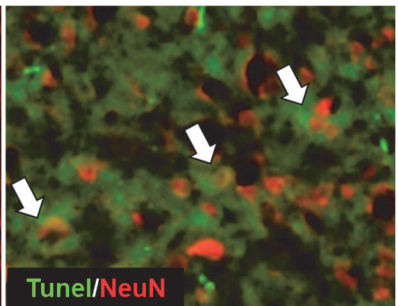
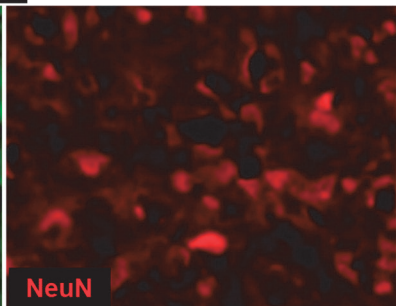
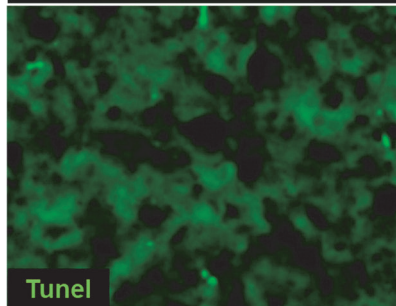
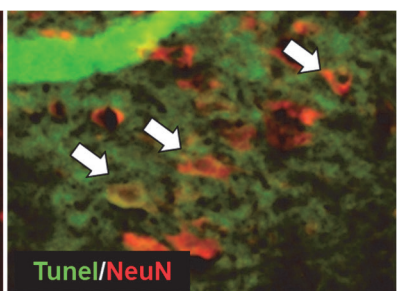
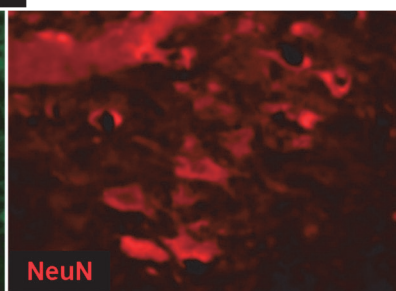
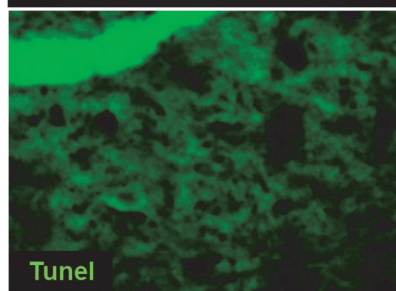


図10：Moderate/MildのTunel染色像（左）

脊髓前角のTunel染色像、下段左）、NeuN染色像（下段中）、共染色像（下段右）



b. Pyroptosis

GSDMD陽性細胞はMild/Noneから出現し神経細胞（NeuN）と共陽性を示した。

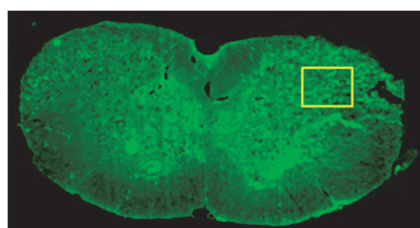
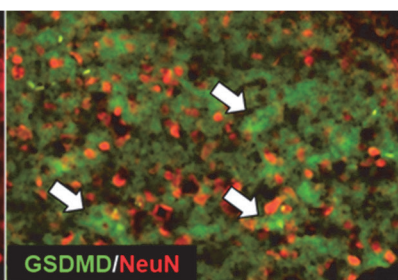
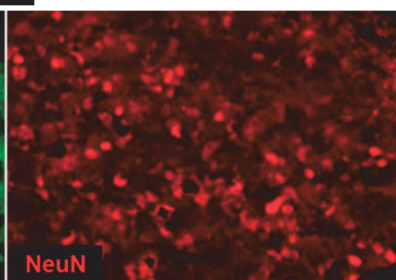
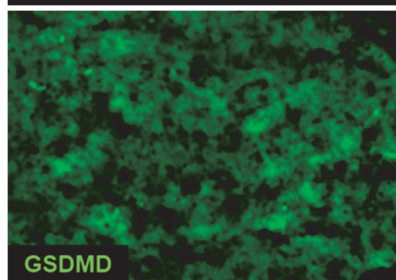


図11：Mild/NoneのGSDMD染色像（左）

脊髓後角のGSDMD染色像（下段左）、NeuN染色像（下段中）、共染色像（下段右）



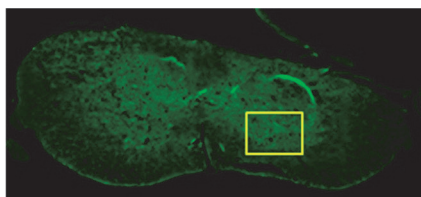
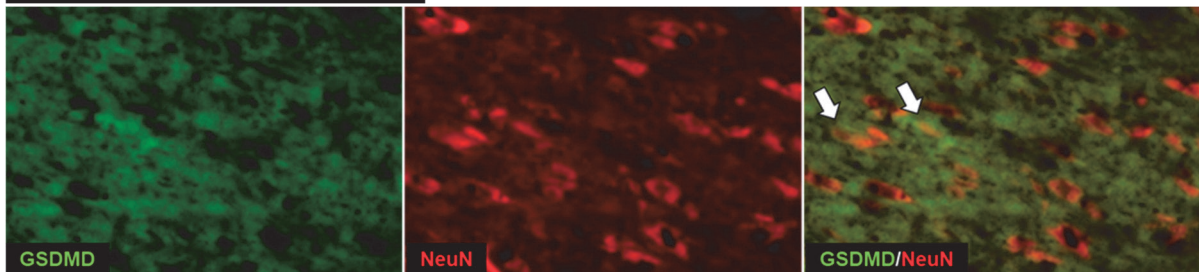


図12： Severe/ModerateのGSDMD染色像（左）
 脊髓前角のGSDMD染色像（下段左）、NeuN染色像
 （下段中）、共染色像（下段右）



c. Necroptosis

RIP3陽性細胞はSevere/Moderateで出現し神経細胞（NeuN）と共陽性を示した。

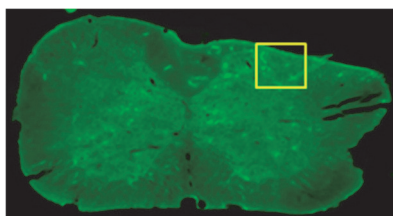
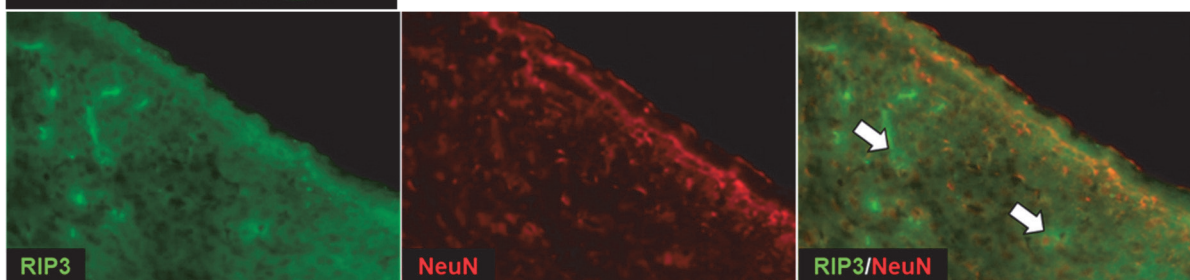


図13： Severe/ModerateのGSDMD染色像（左）
 脊髓後角のRIP3染色像（下段左）、NeuN染色像（下段
 中）、共染色像（下段右）



d. Ferroptosis

TFR陽性細胞はSevere/Moderateで出現し神経細胞（NeuN）と共陽性を示した。

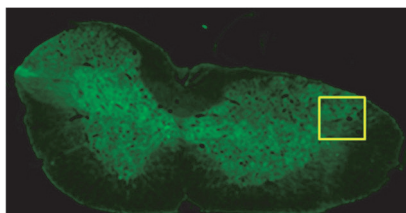
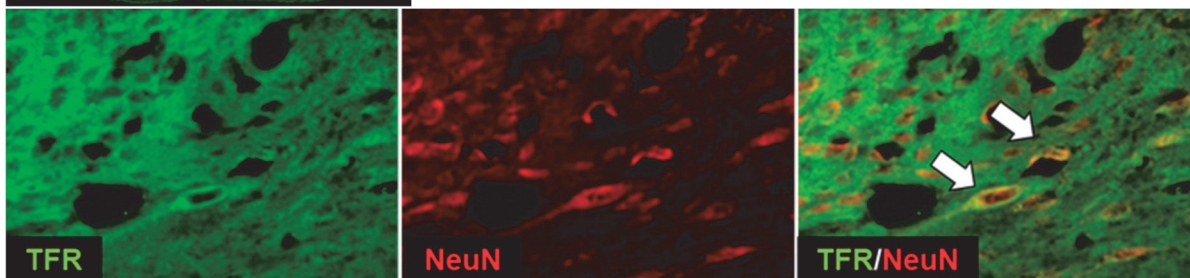


図14： Severe/ModerateのGSDMD染色像（左）
 脊髓後角のRIP3染色像（下段左）、NeuN染色像（下段
 中）、共染色像（下段右）



【考察】

軽度圧迫段階でのApoptosisとPyroptosisの出現は、中心性脊髄障害の初期反応として、不要な細胞を除去しつつも炎症性応答が同時に誘導されている可能性を示唆する。Apoptosisは比較的穏やかな細胞死であり、炎症を引き起こさずに進行するため、組織環境への影響を最小限に抑えつつダメージの拡散を防ぐ役割を果たしていると考えられる。一方、Pyroptosisは炎症性サイトカインの放出を伴い、周辺組織への炎症性シグナルの伝播を通じて、障害応答をさらに加速させる可能性がある。

今回の知見に基づき、今後は各RCDに対する特異的な阻害薬、Z-VAD (Apoptosis)、CA-074Me (Pyroptosis)、Nec-1 (Necroptosis)、Ferrostatin-1 (Ferroptosis) を生後3週から投与し、2週間後に灌流固定し、組織障害の定量を計画している。この方法により、各RCDの阻害が組織障害の軽減に及ぼす具体的な効果を評価することが可能となる。また、軽度圧迫段階でのApoptosisおよびPyroptosisの早期抑制が、二次的な脊髄損傷の進展を抑えることができるかを検証し、中等度から重度圧迫においても各RCD阻害が障害軽減にどの程度寄与するのかを明らかにすることが期待される。特に、各阻害薬の使用による細胞死の抑制が、病態進行のどの段階で有効であるかを解明することは、段階に応じた適切な治療方法の開発に役立つと考えられる。

【結論】

今回の研究で、中心性脊髄障害におけるRCDとして、Apoptosis、Pyroptosis、Necroptosis、Ferroptosisの4つが、脊髄の圧迫進行度に応じて発現することが明らかとなった。特に、圧迫が軽度の段階では、ApoptosisとPyroptosisが優位に発現していることが確認され、細胞死の形態が病態の進行に伴って変化することが示唆された。このことは、圧迫初期段階での細胞死抑制が、早期の神経保護に有効である可能性がある。最終的には、RCD阻害薬の組み合わせや投与タイミングの最適化を通じて、中心性脊髄障害の早期治療法としての可能性が期待される。

【参考文献】

1. Shi Z, et al. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy. *Cell Prolif* 2021; 54(3): e12992
2. Lees F, et al. Natural history and prognosis of cervical spondylosis. *Br Med J* 1963; 2(5373): 1607-1610
3. Wu JC, et al. Epidemiology of cervical spondylotic myelopathy and its risk of causing spinal cord injury: a national cohort study. *Neurosurg Focus* 2013; 35(1): E10.
4. Murone I. The importance of the sagittal diameters of the cervical spinal canal in relation to spondylosis and myelopathy. *J Bone Joint Surg Br* 1974; 56(1): 30-36.
5. Karadimas SK, et al. Pathophysiology and natural history of cervical spondylotic myelopathy. *Spine (Phila Pa 1976)* 2013; 38(22 Suppl 1): S21-S36.

6. Suzuki Y, et al. CT myelography by intrathecal injection of contrast medium through percutaneous administration route visualizes compressed cervical spinal cord in a mouse. *J Neurosci Methods* 2024; 409.
7. Chenyu W, et al. Betulinic acid inhibits pyroptosis in spinal cord injury by augmenting autophagy via the AMPK-mTOR-TFEB signaling pathway. *Int J. Biol. Sci.* 2021; 17(4): 1138-1152
8. Lu L, et al. Intermittent theta-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization via TLR4/NFκB/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice. *J. Neuroinflammation.* 2022; 19: 141
9. Z Dunai, et al. Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects. *Pathol. Oncol. Res.* 2011; 17: 791-800
10. Hong F, et al. Reactive astrocytes undergo M1 microglia/macrophages-induced necroptosis in spinal cord injury. *Molecular Neurodegeneration* 2016; 11: 14
11. Scott J, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell.* 2012; 149(5): 1060-1072
12. Ming-hao G, et al. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway. *CNS Neurosci Ther.* 2021; 27: 1023-1040
13. T Wang, et al. Ferroptosis mediates selective motor neuron death in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ.* 2022; 29: 1187-1198