

インスリン様成長因子 1 とエリスロポエチンの併用投与は
ウサギにおける虚血性脊髄障害に対して保護作用がある

The combination of insulin-like growth factor 1 and erythropoietin protects against
ischemic spinal cord injury in rabbits

歌田浩二

山口大学医学部附属病院麻酔科蘇生科

平成 27 年 9 月

目次

要旨	3
1. はじめに	3
2. 方法	
2. 1. 実験1	4
2. 2. 実験2	5
3. 結果	6
4. 考察	7
謝辞	9
利益相反	9
参考文献	16

要旨

はじめに：インスリン様成長因子1（IGF-1）とエリスロポエチン（EPO）はそれぞれウサギによる虚血性脊髄障害に対して保護作用があることが報告されている。今回、われわれはIGF-1とEPOの併用のウサギの虚血性脊髄障害に対する保護作用について研究を行った。方法：以下の4群（n = 6）に分け、虚血再灌流直後に各々の薬剤を静脈内投与した。対照群（生理食塩水）、IGF-1群（IGF-1 0.3 mg/kg）、EPO群（EPO 800 U/kg）、IGF-1+EPO群（IGF-1 0.3 mg/kg+EPO 800 U/kg）。腹部大動脈を15分間遮断することによって、脊髄虚血侵襲を与えた。後肢運動機能を再灌流後7日間毎日評価し、その後病理学的評価を行った。さらに、シグナル伝達物質の解析をするために4群（n = 8）に分けた。脊髄虚血と治療方法は上記と同様に行った。再灌流15分後と30分後に脊髄を取り出して、シグナル伝達物質のリン酸化を解析した。4匹は虚血前の対照とし、虚血直前に脊髄を取り出した。結果：IGF-1+EPO群では、神経学的転帰と病理学的転帰がいずれも対照群に比べて有意に改善し、Janus kinase-2（JAK2）リン酸化が有意に増加していた。結論：IGF-1とEPOの併用投与はウサギの虚血性脊髄障害に対して保護作用がある。JAK2が保護作用に関与している可能性が示唆される。

キーワード

脊髄虚血、インスリン様成長因子1、エリスロポエチン、ウサギ

1. はじめに

胸腹部大動脈手術の重篤な合併症は対麻痺であり、大動脈遮断中の脊髄虚血が原因であると考えられている。虚血性の脊髄障害に対して脊髄を保護するために、多くの薬物が動物実験で研究されてきた。しかし、広く臨床で使用されている薬物はない。

最近、脳虚血において虚血性神経細胞死のカスケードを抑制する薬物治療に関する臨床試験の相次ぐ失敗後、内因性の神経保護機構を活性化する方法がより期待できる戦略であることが明らかになってきた。内因性の神経保護を活性化すると考えられている薬物のうち、インスリン様成長因子1（IGF-1）[1]とエリスロポエチン（EPO）[2,3]はかなり期待がもてる。ウサギの脊髄虚血モデルにおいて、虚血前に投与されたIGF-1[1]と虚血後に投与されたEPO[2]は、それぞれ単独で保護効果を示している。ラットの培養大脳皮質神経細胞において、IGF-1とEPOはN-methyl-D-aspartate（NMDA）誘発アポトーシスに対して相乗的に神経保護効果があると報告されている[4]。IGF-1とEPOはともにphosphatidylinositol 3-kinase（PI3-K）とprotein kinase B（Akt）を活性化するという共通の生物活性がある[4]。しかし、IGF-1とEPOの併用がin vivoモデルにおいて、Aktの活性化を介して虚血性の脊髄障害を保護するのかどうかは知られていない。

IGF-1とEPOは、生体内で産生されるとともに臨床的に遺伝子組み換え型製剤としても

市販されている。もし、IGF-1 と EPO の虚血後併用投与の保護効果が認められれば、胸腹部大動脈瘤手術中の脊髄保護の重要な治療戦略となる。なぜなら、手術中に脊髄虚血が検出されたときにのみ、薬物投与を行うことができるからである。今回われわれは、ウサギの脊髄虚血モデルを用いて再灌流直後に投与された IGF-1 と EPO の併用が、IGF-1 あるいは EPO 単独と比較して保護効果があるかどうかを検討した。過去の研究では、IGF-1 あるいは EPO の保護効果に関して、再灌流後 48 時間のみ神経学的機能を評価している [1,2]。ウサギの脊髄虚血モデルでは、遅発性の脊髄障害を起こすことが知られているので、今回の研究では 7 日間神経学的機能を観察した。さらに、脊髄保護に関与する Akt、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、Janus kinase-2 (JAK2) を含むシグナル伝達物質の活性化について検討した。

2. 方法

研究プロトコールは山口大学大学院医学部の動物実験委員会により承認された。60 匹の New Zealand white rabbit、体重 2.7 ± 0.1 (平均±標準偏差) kg がこの研究で使用された。

2. 1. 実験 1

飲水制限なしでの 12 時間の絶食の後、ウサギを純酸素に 4%イソフルランを加えた気体で充満させたプラスチックボックス内に入れて麻酔を導入した。輸液 (乳酸リンゲル液 10 ml/kg/h) と薬物投与のために耳静脈にカテーテルを挿入し、血圧を測定するために耳動脈にカテーテルを挿入した。気管挿管直前に、ペントバルビタール (30mg) を投与した。3 mm のカフ付き気管内チューブを挿管後、40%酸素と 60%窒素に 2-3%イソフルランを加え人工呼吸を行った。その後、フェンタニルを必要に応じて投与した。体温は食道温プローベ (Model MG-Type 209; 日本光電、東京、日本) と L5 レベルで傍脊柱筋に挿入した針タイプの温度計 (Model PTC-201; ユニークメディカル、東京、日本) でモニターした。傍脊柱筋の温度は加熱ランプと加温パッドを使用して、研究中は約 38°C に制御した。1%リドカインで浸潤麻酔した後、PE-50 カテーテルを右大腿動脈から 5 cm 挿入し、その後に行われる大動脈遮断時に遮断部より末梢側の血圧を測定するために使用した。

脊髄虚血は以前に報告した方法で行った [5]。簡潔に述べると、右側臥位で、経後腹膜の左腎動脈レベルで腹部大動脈を露出した。大動脈を遮断するために、PE-50 カテーテルで左腎動脈分岐部直下の大動脈をテーピングした。PE-50 カテーテルを遮断用チューブ (16F のゴム製チューブ) に通した。手術完了後、呼吸イソフルラン濃度を 2% に維持した。

ウサギは無作為に 4 群 (各 n = 6)、すなわち、対照群、IGF-1 群、EPO 群、IGF-1+EPO 群に分けた。対照群は生理食塩水、IGF-1 群は 0.3 mg/kg の IGF-1 (アステラスファーマ株式会社、東京、日本)、EPO 群は 800 U/kg の EPO (協和発酵キリン株式会社、東京、日

本)、IGF-1+EPO 群は 0.3 mg/kg の IGF-1 と 800 U/kg の EPO をそれぞれ再灌流直後に静脈内投与した。平均動脈圧が 55 mmHg より下がった場合、血圧を維持するためにフェニレフリンを投与した。

大動脈遮断直前に 400 U のヘパリンを投与した。PE カテーテルを引き、遮断用チューブをきつく締めることによって 15 分間の虚血侵襲を加えた。末梢側動脈圧の拍動性動脈圧波の消失と血圧の 10 mmHg 未満への低下が、ただちに観察された。15 分間の虚血終了時に、遮断用チューブと PE カテーテルを除去した。その後、すべてのカテーテルを抜去し、切開部を縫合した。抗生剤（セファゾリン 30 mg/kg）を筋注した。イソフルラン投与を中止し、100%酸素で人工呼吸管理した。十分な自発呼吸と体動の出現を確認し、抜管した。十分覚醒するまでは温められたプラスチックボックス内で酸素投与を行った。排尿は必要があれば要手的に排尿させた。

神経学的評価は再灌流後 7 日間毎日、治療群を知らない観察者によって、Drummond と Moore によって提案された 5 ポイントのスコアシステム、すなわち 4 = 正常、3 = 跳躍できるが正常ではない、2 = 後肢はよく動くが跳躍できない、1 = 後肢がわずかに動く、0 = 後肢の完全対麻痺 [6] に従って行われた。

最終の神経学的評価後（再灌流 7 日後）、ウサギを再び 3%イソフルランで麻酔し、リン酸緩衝 10%ホルマリンで脊髄灌流固定した。L5 レベルの脊髄の横断切片（厚さ 8 μ m）を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。治療群を知らない観察者によって、光学顕微鏡（オプチフォト、ニコン、東京、日本）を使って脊髄腹側の正常神経細胞数を 2 切片で計測し、その平均値を算出した。以前報告されているようにニッスル小体の消失を伴う細胞質の好酸性増加と均質な核濃縮の特徴を持つものを傷害された神経細胞とした [5]。

2. 2. 実験 2

32 匹のウサギが無作為に 4 群（各 n=8）に分けられ、脊髄虚血を実験 1 と同じ方法で行った。すべての群で、再灌流後 15 分あるいは 30 分での脊髄取り出し時間によって、2 つのサブグループに分けた（各 n=4）。4 匹は虚血前の対照として、虚血直前に脊髄を取り出した。

シグナル伝達に関与する蛋白質のリン酸化を解析するために、安楽死後すぐに 1ml シリンジのプランジャーで脊髄を素早く取り出し、液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

凍結組織を細かく刻み、ビーズを含む 2 ml のマイクロチューブに入れて、Retsch MM300 ミキサー粉砕器を使い、溶解バッファ [1% Triton X-100、20mM Tris (pH 7.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、2.5mM ピロリン酸ナトリウム、1mM β -グリセロリン酸、1mM オルトバナジウム酸ナトリウム、1 μ g/ml ロイペプチン、1mM フッ化フェニルメタンスルホニル] で可溶化した。ビーズの除去後、 4°C 、20 分間 12,000 \times g で遠心分離

した。上澄み液の蛋白濃度を測定した後、すぐに Western blotting 法を行った。電気泳動と Western blotting 法は、以前に述べた方法で実行した [7]。簡潔に述べると、抽出物はドデシル硫酸ナトリウム存在下で 10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い、蛋白質のリン酸化の場合にはポリフッ化ビニリデン膜 (0.45 μ m; Millipore 社、ベッドフォード、マサチューセッツ州) に転写され、Akt と ERK の場合にはニトロセルロース膜に転写された。ブロットは、抗 Akt リン酸化抗体 (Ser473) (Cell Signaling Technology 社、ビバリー、マサチューセッツ州)、抗 ERK リン酸化抗体 (Tyr204) (Santa Cruz Biotechnology 社、サンタクルス、カリフォルニア州)、抗チロシンリン酸化抗体 (PY99) (Santa Cruz Biotechnology 社)、抗セリンリン酸化抗体 (PSR45) (Novus 社、リトルトン、コロラド州)、抗トレオニンリン酸化抗体 (18F6) (Novus 社)、抗 JAK2 リン酸化抗体 (Tyr1007 / Tyr1008) (Santa Cruz Biotechnology 社) には 10%ウシ血清アルブミンでブロッキングし、抗 Akt 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 ERK 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 JAK2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) あるいは抗 α -アクチン抗体 (Sigma-Aldrich 社、セントルイス、ミズーリ州) には 0.05% (w/v) Tween 20 を含むトリス緩衝液内の 5%非脂肪乾燥ミルクでブロッキングした。さらに 2 次抗体と一緒にインキュベートし、ブロットをその後洗浄し、化学発光検出試薬で視覚化した。

生理的な諸量は平均 \pm 標準偏差で表わし、反復測定分散分析で分析した。後肢運動機能と脊髄での正常神経細胞数は、ノンパラメトリック法 (Kruskal-Wallis 検定に続いて Bonferroni 補正した Mann-Whitney U 検定) で統計学的に分析した。Western blotting 法で測定したデータは平均 \pm 標準誤差で表し、Bonferroni の多重比較検定に続いて、1 元配置分散分析で分析した。P < 0.05 を統計学的に有意であると判断した。

3. 結果

実験 1 での生理学的な諸量は表 1 に示す。4 群間に有意差はなかった。

実験 1 で、すべてのウサギは最終の神経学的評価 (再灌流後 7 日間) まで生存していた。図 1 に各群における運動機能スコアの経時的変化を示す。対照群では、再灌流 7 日後のスコアが 0~1 であった。再灌流 2~7 日後における IGF-1 群と IGF-1+EPO 群の運動機能スコアは、対照群と比較して有意に良好であった (p < 0.008)。しかし、IGF-1 群と IGF-1+EPO 群、あるいは EPO 群と IGF-1+EPO 群の間では、運動機能スコアに有意差はなかった。

図 2 に対照群の対麻痺 (スコア = 0) ウサギと IGF-1+EPO 群の正常ウサギの腰部脊髄 (L5) の代表的な顕微鏡写真を示す。対照群、IGF-1 群、EPO 群で重度の運動機能障害 (スコア \leq 1) を生じたウサギでは、脊髄灰白質の構造が破壊され、ほとんどの運動神経細胞は消滅し、顕著な炎症細胞浸潤が観察された。白質の空胞もこれらのウサギでは観察された。対照的に、IGF-1+EPO 群の正常な運動機能のウサギでは、脊髄灰白質と白質の構造はよく

維持されており、運動神経細胞は正常に保たれていた (図 2)。図 3 に再灌流 7 日後における形態学的に正常な神経細胞数 (L5 レベル) を示す。対照群と比較して、IGF-1+EPO 群では有意に正常神経細胞数が多かった ($p = 0.0039$)。しかし、IGF-1 群と IGF-1+EPO 群、あるいは EPO 群と IGF-1+EPO 群の間では、正常神経細胞数の有意な差はなかった。

細胞内シグナル伝達物質が再灌流後の IGF-1 と EPO の存在下での神経保護に関係しているかどうかを調べるために、脊髄内の蛋白質のリン酸化レベルを Western blotting 法で測定した。Akt のリン酸化は、EPO 群で再灌流 30 分後に有意に増加した ($p = 0.0004$)。しかし、IGF-1+EPO 群では 15 分後と 30 分後のいずれも Akt のリン酸化は増加していなかった (図 4a, d)。ERK のリン酸化は、対照群の再灌流 15 分後とすべての群の再灌流 30 分後に有意に増加したが ($p < 0.005$)、IGF-1、EPO、あるいは IGF-1+EPO は、リン酸化にほとんど影響がなかった (図 4b, e)。われわれは、チロシンリン酸化、セリンリン酸化、トレオニンリン酸化に対する抗体を使うことによって、神経保護に関係している細胞内物質のリン酸化を包括的網羅的に分析した。IGF-1 と EPO の同時投与は、再灌流 15 分後に約 120 kDa の分子量を持つ蛋白質のチロシンリン酸化を増加させる傾向があったが、その差は統計学的に有意ではなかった (図 4c, f)。セリンとトレオニンのリン酸化は、今回の実験条件では増強しなかった (データは示されていない)。

120 kDa の分子量を持つチロシンリン酸化蛋白質を同定するために、分子量が約 125 kDa である JAK2 のリン酸化を免疫ブロット法で分析した。予想されるように、JAK2 のリン酸化は IGF-1+EPO 群において有意に増加しており ($p = 0.0045$) (図 5)、抗チロシンリン酸化抗体を使ったデータと一致した。

4. 考察

ウサギの一過性脊髄虚血モデルにおいて、IGF-1 と EPO の併用は、対照群と比較して神経学的転帰と病理学的転帰の両方を有意に向上させた。JAK2 のリン酸化が、IGF-1+EPO 群における保護機序に関係している可能性が示唆された。神経学的機能スコアは、すべての群で再灌流 4 日後からは変化しなかったため、今回の研究での 7 日間の観察期間は神経学的転帰を評価するのに十分であったと考えられる。

IGF-1 は、ラットにおける虚血性脳障害に対する保護効果が最初に報告された [8]。その後、IGF-1 が血液脳関門を通過することが示された [9]。ウサギの脊髄虚血モデルにおいて、Nakao ら [1] は IGF-1 の強力な保護効果を報告した。しかし、今回の研究で IGF-1 は神経学的転帰を向上させたが、その保護効果の程度は強力ではなかった。IGF-1 の投与量は、Nakao らの研究と同じである [1]。Nakao らの研究 [1] とわれわれの研究の違いは、IGF-1 投与のタイミングと虚血前後での血中グルコース濃度である。Nakao らの研究では、IGF-1 は虚血 30 分前に投与され、大動脈遮断 15 分後の平均血中グルコース濃度は 60 mg/dl であった (虚血前のデータは示されていない)。一方、今回の研究では、IGF-1 は再灌流直

後に投与され、大動脈遮断前の血中グルコース濃度は約 125 mg/dl であった。IGF-1 の虚血前投与と軽度の低血糖が IGF-1 の保護効果を増強していた可能性が考えられる。

EPO は、砂ネズミの前脳虚血で保護効果が最初に示された [10]。その後、EPO が血液脳関門を通過することが示された [11]。また、EPO 受容体が脊髄の運動神経細胞に存在することも示された [2]。Celik ら [2] は、ウサギの一過性脊髄虚血後の神経学的転帰と病理学的転帰に関して、再灌流直後に静脈内投与された EPO に保護効果があることを見出した。彼らは、EPO の保護効果を調べるために用量反応研究を行い、保護効果は基本的に釣鐘状のパターンを示すことを見出した [2]。彼らの結果に従って、今回の研究では最大保護効果を示す量 (800 U/kg) を選択した。しかし、今回の研究では EPO 単独での保護効果は統計学的に有意なレベルには到達しなかった。Celik らの研究で、800 U/kg 群での平均の神経学的機能スコアは再灌流 48 時間後で 3 (跳躍できるが正常ではない) より低かったが、病理学的観察で障害は観察されなかった [2]。Celik らの研究とほぼ同じモデルを使った以前のわれわれの研究で、神経学的機能スコア 3 以下のウサギは常に病理学的な傷害を示している [12, 13]。実際、今回の研究での EPO 群で再灌流 7 日後に神経学的スコア 3 を示した 2 匹のウサギは、軽度の病理学的傷害を示した。虚血性脊髄障害に対する EPO の保護効果は、以前に報告されていたほどは強くない可能性がある。

IGF-1 群と IGF-1+EPO 群、あるいは EPO 群と IGF-1+EPO 群の間で、神経学的転帰と病理学的転帰に差はなかった。しかし、対照群と比較したとき、IGF-1+EPO 群でのみ、神経学的転帰と病理学的転帰の両方が改善していた。実際、IGF-1+EPO 群のどのウサギも重度の神経学的転帰 (スコア < 2) を示さなかった (Fig. 1)。従って、このモデルの虚血性脊髄障害に対して、IGF-1 と EPO の併用が IGF-1 単独あるいは EPO 単独よりも保護効果が強いと結論することは妥当であると思われる。

IGF-1 と EPO の併用は、ラットの培養大脳皮質神経細胞に対する NMDA 誘発アポトーシスに神経保護効果を示すことが報告されている [4]。培養大脳皮質神経細胞内で、IGF-1 と EPO の同時曝露は PI3-K の活性化を促進し、Akt の活性化を導くことが報告されている [4]。Akt の活性化は、神経細胞の生存を促進する。今回の研究で、EPO 群では再灌流中の Akt 活性化が増強していたが、IGF-1+EPO 群では再灌流開始 15 分後と 30 分後のいずれも Akt は活性化されていなかった。われわれは、IGF-1 と EPO の併用による保護機序を調べるために、細胞内物質のリン酸化を測定した。結果的に、われわれは IGF-1 と EPO の併用が約 120 kDa の分子量を持つ蛋白質のチロシンリン酸化を増加させる傾向があることを見出した。われわれは、チロシンリン酸化蛋白質は次の理由で JAK2 の可能性があると考えた。第一に、JAK2 の分子量は約 125 kDa であり、この研究で見出された蛋白質の分子量と近似していた [14]。第二に、EPO 受容体は JAK2 に直接結合することが知られている [15]。IGF-1 もまた、JAK / シグナル伝達性転写因子 (STAT) 経路を活性化し、神経生存に導くことが知られている [16, 17]。最後に、脊髄保護効果を発現する実験状況下で JAK2 のリン酸化が有意に増加した。これらの知見から、JAK2 によって活性化された下

流の経路が IGF-1 と EPO の組み合わせによる保護効果に貢献している可能性がある。約 80 kDa の蛋白質のチロシンリン酸化が IGF-1 と EPO の両方の投与で弱く検出されていたことから、JAK2 の下流の物質である STAT3 が転写因子として神経保護因子の産生に関与している可能性も考えられる (図 4c)。JAK2 の役割を明らかにするために、どの細胞で JAK2 のリン酸化が起こるのかを見出す研究や、JAK2 の阻害物質を使用することによって IGF-1 と EPO の併用に伴う JAK2 の活性化と神経保護効果の関係を明確にする研究を今後行う必要がある。

われわれは、強力な保護効果があると報告されている IGF-1 と EPO の量を選択した [1, 2]。より多い量の IGF-1 とより少ない量の EPO、逆により多い量の EPO とより少ない量の IGF-1 のように、もっと適切な量の組み合わせがあるかもしれない。臨床では、IGF-1 の低血糖を含む副作用は避けなければならない。IGF-1 の量が増加するにつれて、血糖値のコントロールは困難になる。EPO については、ヒトで 1 日 33,000 U、3 日間の EPO 静脈内投与は安全であることが示されている [18]。しかし、承認されている EPO の 1 日最大投与量は、24,000 U (約 400 U / kg) である。また、もっと適切な薬物投与のタイミングがあるかもしれない。治療のタイミングを明らかにするために、さらなる研究が必要である。

要約すると、われわれはウサギの一過性脊髄虚血モデルで JAK2 の活性化を伴う IGF-1 と EPO の併用に神経保護効果があることを見出した。IGF-1 と EPO は臨床的に利用できる薬物なので、IGF-1 と EPO の併用は、胸腹部大動脈手術中の脊髄保護に対して将来有望な戦略になるかもしれない。

謝辞

この研究は日本学術振興会からの科学研究費 (C) (No. 21591974) の助成を受けたものである。

利益相反

著者は利益相反がないことを宣言する。

表1

生理的変数

	平均動脈圧		心拍数	体温		pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	血糖 (mg/dL)	ヘマトクリット (%)
	(mmHg)		(bpm)	(°C)						
	近位	遠位		食道	傍脊柱					
対照 (n = 6)										
虚血前	64 ± 5	65 ± 4	312 ± 19	38.5 ± 0.3	38.0 ± 0.1	7.39 ± 0.05	205 ± 5	40 ± 1	127 ± 11	35 ± 1
虚血 7.5 分	65 ± 3	7 ± 1	317 ± 19	38.4 ± 0.4	37.5 ± 0.2					
再灌流 15 分	62 ± 4	61 ± 3	299 ± 24	38.2 ± 0.2	38.1 ± 0.1	7.36 ± 0.04	204 ± 23	39 ± 2	131 ± 16	34 ± 2
IGF-1 (n = 6)										
虚血前	64 ± 5	68 ± 7	305 ± 20	38.1 ± 0.2	38.0 ± 0.1	7.38 ± 0.06	201 ± 25	39 ± 2	128 ± 7	36 ± 2
虚血 7.5 分	67 ± 5	8 ± 1	298 ± 25	38.1 ± 0.2	37.6 ± 0.2					
再灌流 15 分	63 ± 4	65 ± 4	298 ± 28	38.2 ± 0.3	38.1 ± 0.2	7.36 ± 0.06	202 ± 31	39 ± 1	106 ± 12	37 ± 2
EPO (n = 6)										
虚血前	64 ± 5	68 ± 4	315 ± 13	38.5 ± 0.3	38.0 ± 0.1	7.40 ± 0.08	199 ± 24	39 ± 2	128 ± 9	37 ± 1
虚血 7.5 分	67 ± 2	7 ± 1	308 ± 8	38.4 ± 0.2	37.5 ± 0.4					
再灌流 15 分	63 ± 5	66 ± 4	298 ± 20	38.2 ± 0.2	37.9 ± 0.2	7.39 ± 0.07	220 ± 12	39 ± 3	133 ± 13	37 ± 2
IGF-1+EPO (n = 6)										
虚血前	64 ± 3	65 ± 3	318 ± 18	38.3 ± 0.2	38.0 ± 0.1	7.36 ± 0.04	221 ± 9	39 ± 2	123 ± 12	36 ± 3
虚血 7.5 分	65 ± 4	7 ± 1	315 ± 15	38.2 ± 0.2	37.3 ± 0.2					
再灌流 15 分	64 ± 4	65 ± 4	303 ± 24	38.0 ± 0.1	37.9 ± 0.2	7.34 ± 0.04	211 ± 23	38 ± 1	111 ± 16	36 ± 2

平均 ± 標準偏差

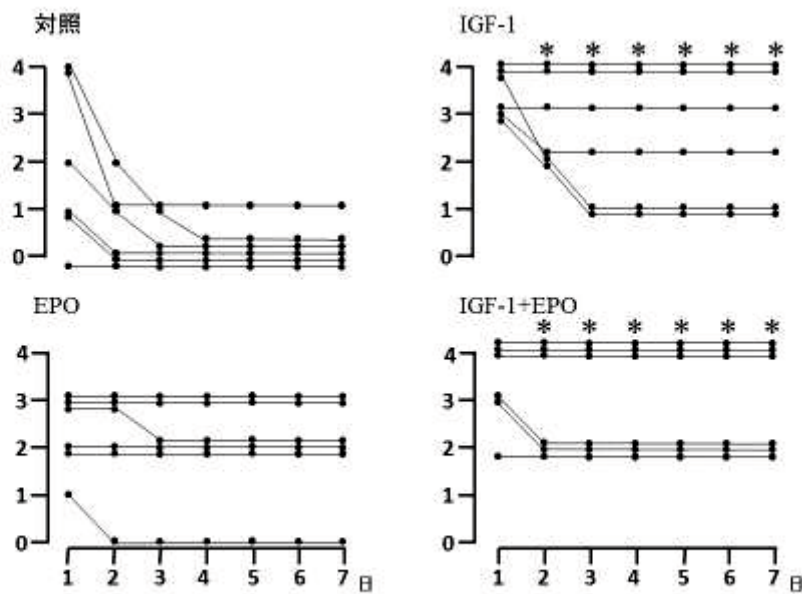


図1 再灌流1日後から7日後までの個々における運動機能スコアの変化。運動機能スコアは、4 = 正常、3 = 跳躍できるが正常ではない、2 = 後肢はよく動くが跳躍できない、1 = 後肢がわずかに動く、0 = 後肢の完全対麻痺。各シンボルは1匹のデータを示している。運動機能スコアは、再灌流2日後から7日後まで、IGF-1群とIGF-1+EPO群で対照群と比較して有意に良好であった (* $p < 0.008$)

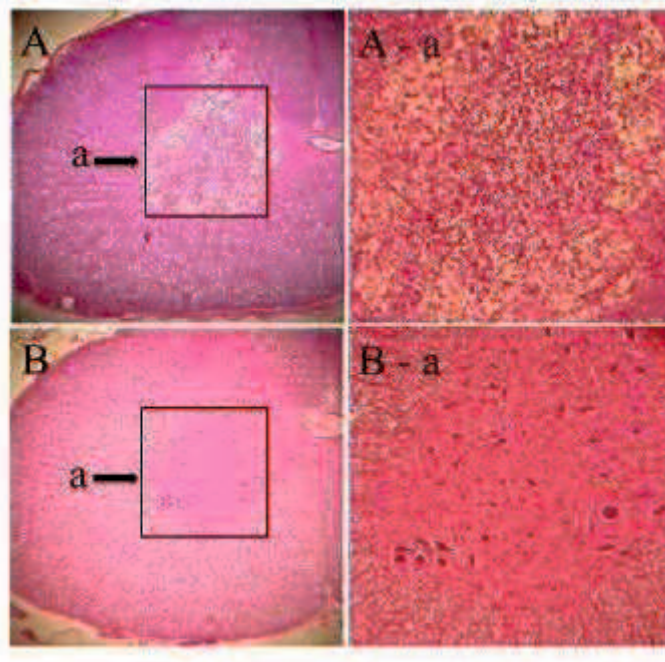


図 2 対照群での対麻痺のウサギ (A, A-a) と IGF-1+EPO 群での運動機能正常のウサギ (B, B-a) における腰部脊髄の代表的な光学顕微鏡写真 (L5 レベル、ヘマトキシリン-エオジン染色)。対照群では正常細胞はほとんどなく、炎症性変化を伴う灰白質全体の崩壊がみられる (A, A-a)。対照的に、IGF-1+EPO 群では脊髄灰白質の構造はよく保たれていて、運動神経細胞はほぼ正常に維持されている (B, B-a)。A と B : 40 倍拡大、A-a と B-a : 100 倍拡大

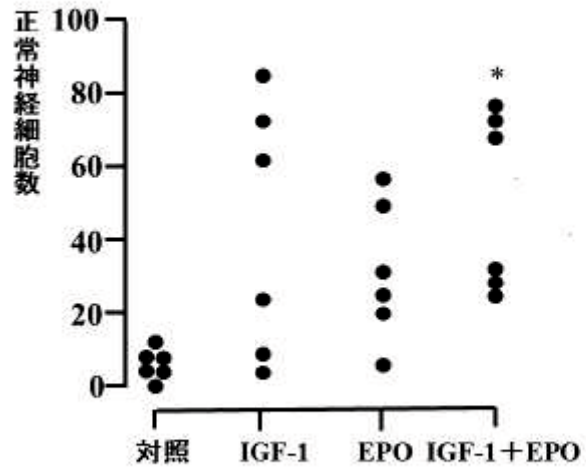


図 3 再灌流 7 日後 (L5 レベル) 脊髓腹側の正常神経細胞数。各シンボルは、1 匹のデータを示す。対照群よりも IGF-1+EPO 群で、L5 レベルの正常神経細胞数は有意に多かった (* $p = 0.0039$)。

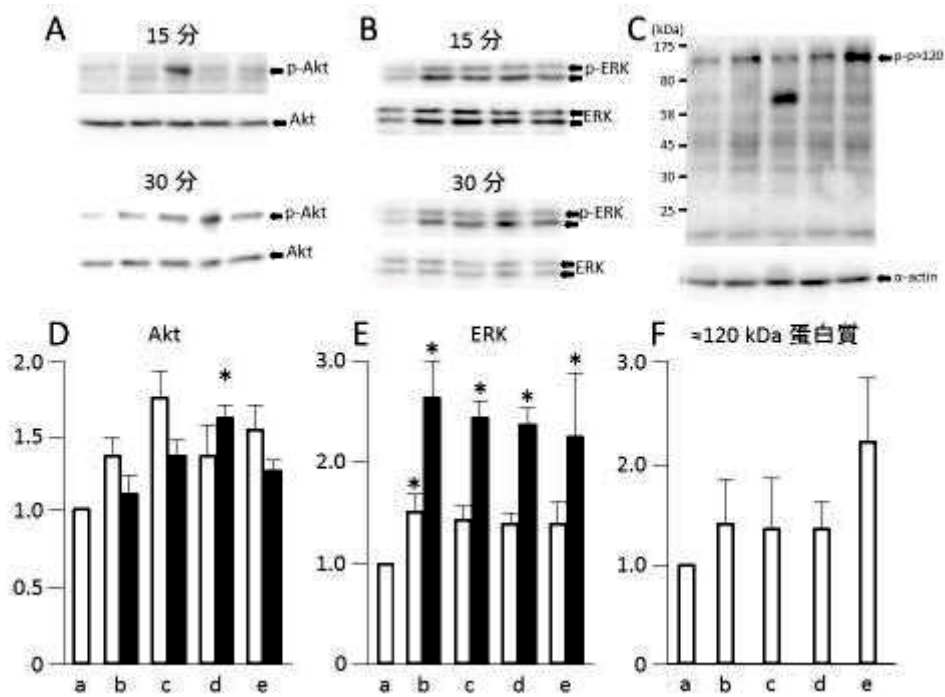


図4 IGF-1、EPO、あるいは両方の存在下で再灌流中の腰部脊髄でのAkt、ERK、チロシンのリン酸化。再灌流後の15分または30分で脊髄を取り出し、 -80°C で保存した。取り出された組織で抗Aktリン酸化あるいはAkt、抗ERKリン酸化あるいはERK、抗チロシンリン酸化抗体を使用してWestern blotting法を行った。上段は、Aktリン酸化とAkt(A)、ERKリン酸化とERK(B)、チロシンリン酸化(C)の代表的な免疫ブロットを示す。下段は、免疫ブロットからの濃度測定により決定されたAktに対するAktリン酸化の比率(D)、ERKに対するERKリン酸化の比率(E)、 α -アクチンに対するチロシンリン酸化の比率(F)を示す。(a 虚血前、b 対照群、c IGF-1群、d FPO群、e IGF-1+EPO群、白ぬきの棒：再灌流15分後、黒ぬりの棒：再灌流30分後、平均 \pm 標準誤差、各 $n=4$ 、* $p<0.005$ 虚血前と比較して)

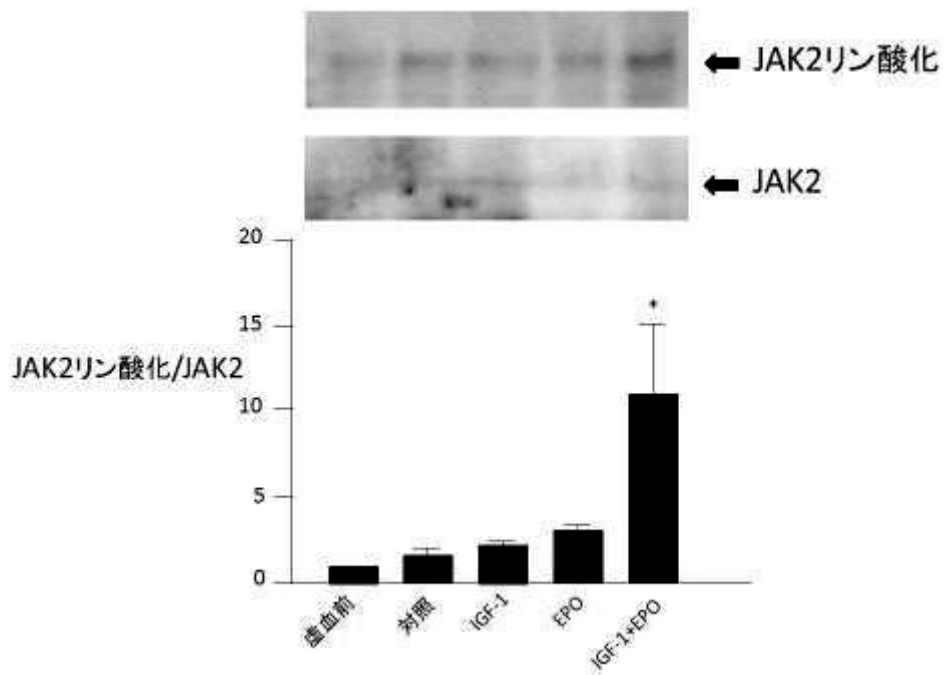


図5 IGF-1、EPO、あるいは両方の存在下で再灌流中の腰部脊髄での JAK2 のリン酸化。再灌流 15 分後に脊髄を取り出し、 -80°C で保存した。取り出された組織で抗 JAK2 リン酸化 (Tyr 1007 / Tyr 1008) あるいは JAK2 抗体を使用し Western blotting 法を行った。上段は、JAK2 リン酸化と JAK2 の代表的な免疫プロットを示す。下段は、免疫プロットからの濃度測定により決定された JAK2 に対する JAK2 リン酸化の比率を示す。(平均 \pm 標準誤差、各 $n = 4$ 、* $p = 0.0045$ 虚血前と比較して)

参考文献

1. Nakao Y, Otani H, Yamamura T, Hattori R, Osako M, Imamura H. Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death and paraplegia in the rabbit model of spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 122: 136-43.
2. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 2258-63.
3. Smith PD, Puskas F, Fullerton DA, Meng X, Cho D, Cleveland JC, Jr., Weyant MJ, Reece TB. Attenuation of spinal cord ischemia and reperfusion injury by erythropoietin. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 141: 256-60.
4. Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 9855-60.
5. Matsumoto M, Iida Y, Sakabe T, Sano T, Ishikawa T, Nakakimura K. Mild and moderate hypothermia provide better protection than a burst-suppression dose of thiopental against ischemic spinal cord injury in rabbits. *Anesthesiology.* 1997; 86: 1120-7.

6. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*. 1989; 70: 64-70.
7. Mizukami Y, Iwamatsu A, Aki T, Kimura M, Nakamura K, Nao T, Okusa T, Matsuzaki M, Yoshida K, Kobayashi S. ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 50120-31.
8. Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K. A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 182: 593-9.
9. Reinhardt RR, Bondy CA. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 1994; 135: 1753-61.
10. Sakanaka M, Wen T-C, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 4635-40.
11. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 10526-31.

12. Nagamizo D, Tsuruta S, Matsumoto M, Matayoshi H, Yamashita A, Sakabe T. Tight glycemic control by insulin, started in the preischemic, but not postischemic, period, protects against ischemic spinal cord injury in rabbits. *Anesth Analg.* 2007; 105: 1397-403.
13. Shirasawa Y, Matsumoto M, Yoshimura M, Yamashita A, Fukuda S, Ishida K, Sakabe T. Does high-dose opioid anesthesia exacerbate ischemic spinal cord injury in rabbits? *J Anesth.* 2009; 23: 242-8.
14. Kirken RA, Rui H, Malabarba MG, Farrar WL. Identification of interleukin-2 receptor-associated tyrosine kinase p116 as novel leukocyte-specific Janus kinase. *J Biol Chem.* 1994; 269: 19136-41.
15. Miura O, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN, Aoki N. Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood.* 1994; 84: 1501-7.
16. Zong CS, Chan J, Levy DE, Horvath C, Sadowski HB, Wang LH. Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275: 15099-105.
17. Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K. JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated

by suppressor of cytokine signaling-3. *J Biol Chem.* 2005; 280: 31830-40.

18. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 2002; 8: 495-505