

- a) 沢田利匡、古川賢一、岸谷正樹、金丸幸太、元村成、藤哲：細胞外核酸がヒト脊椎靭帯由来培養細胞に与える影響 第56回日本薬理学会北部会 2005
- b) 沢田利匡、古川賢一、岸谷正樹、元村成、藤哲：細胞外核酸の脊椎靭帯由来培養細胞に与える影響 第20回日本整形外科学会基礎学術集会 2005
- c) Sawada T, Furukawa KI, Kishiya M, Motomura S, Toh S: The effects of extracellular nucleotide to cultured human fibroblast like cell from cervical ligamentum flavum. ORS 2006

参考文献

- White AA, Panjabi MM: Clinical Biomechanics of the Spine. Second Edition. 1990; Philadelphia: Lippincott-Raven 21pp.
- Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, Harata S, Motomura S: Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. Bone 2003;33:475-484.
- Ohishi H, Furukawa KI, Iwasaki K, Ueyama K, Okada A, Motomura S, Harata S, Toh S: Role of prostaglandin I₂ in the gene expression induced by mechanical stress in spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. J Pharmacol Exp Ther 2003;305:818-824.
- Duncan RL, Akanbi KA, Farach-Carson MC: Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. Semin Nephrol 1998;18:178-90.
- van Haasteren G, Li S, Muda M, Susini S, Schlegel W: Calcium signalling and gene expression. J Recept Signal Transduct Res. 1999;19:481-92.
- Yamaguchi N, Chiba M, Mitani H: The induction of c-fos mRNA expression by mechanical stress in human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 2002;47:465-71

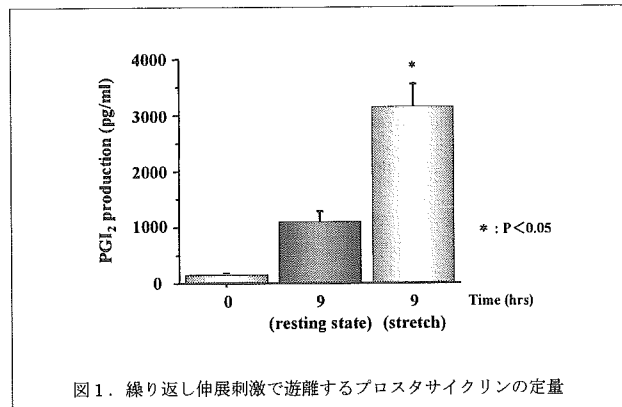


図1. 繰り返し伸展刺激で遊離するプロスタサイクリンの定量

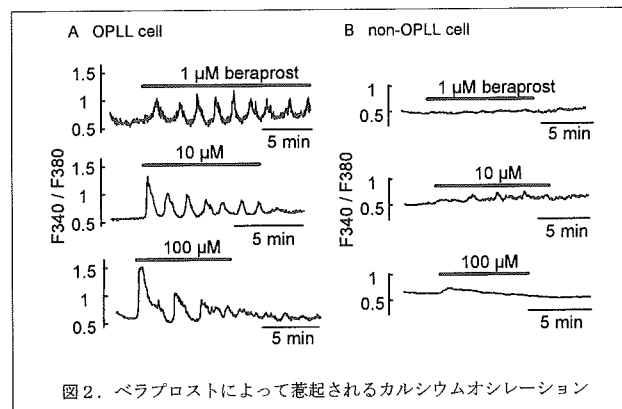


図2. ベラプロストによって惹起されるカルシウムオシレーション

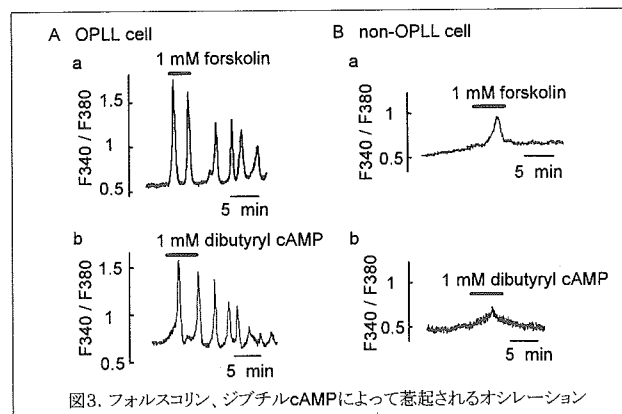


図3. フォルスコリン、ジブチルcAMPによって惹起されるオシレーション

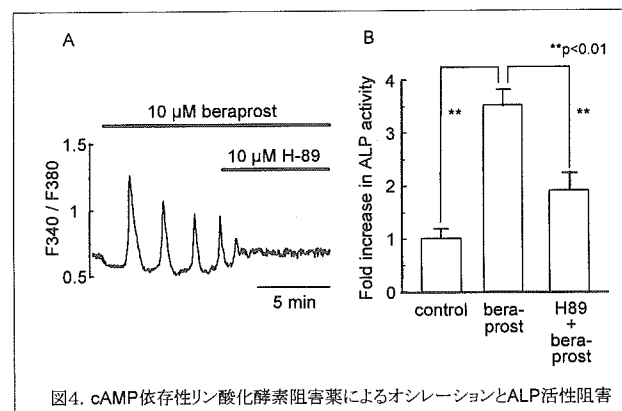


図4. cAMP依存性リン酸化酵素阻害薬によるオシレーションとALP活性阻害

靱帯細胞と骨芽細胞のメカニカルストレス応答性に関する研究
研究協力者 川島 博行 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨: マウス靱帯株細胞 PDL-L2 をモデルにして靱帯細胞と骨芽細胞のメカニカルストレス (MS) に対する応答性について検討した。骨芽細胞では、MS に応答して、FAK-MEK1/2-Runx2 転写活性-オステオカルシン産生の経路が順次活性化され、最終的に石灰化が促進される。これに対して、靱帯細胞ではMSを負荷してもFAK以下の一連の経路は活性化されず、石灰化 Runx2 も認められなかった。以上の結果から、靱帯細胞には、MS によって誘導される石灰化刺激に対する抑制機構が働いていることが明らかである。この抑制機構は、我々がすでに報告した Msx2 を介する抑制機構とは異なるもので、両者は協調的に作用していると考えられる。MS 誘導性の石灰化刺激に対する抑制機構は、靱帯細胞に特異的に存在するインテグリン $\alpha 7$ とこれに対する結合性分子が担うものと考えられる。

A. 研究目的

我々は、当研究室で樹立した歯周靱帯細胞 PDL-L2 細胞を用い、靱帯細胞には Msx2 を介する石灰化抑制機構が働いていること、また、OPLL 患者の靱帯骨化部ではこの機構が破綻していることを明らかにした。本研究では、メカニカルストレス (MS) に対しても抑制機構が作用しているか否かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

PDL-L2 および MC3T3-E1 を培養し、細胞外基質の石灰化抑制機構の詳細について、RT-PCR, Reporter assay, Western blot analysis, Double immunostaining 等を用いて検討した。さらに、Flexor cell を用い、MS の石灰化に及ぼす効果についても比較検討した。(倫理面への配慮)
培養細胞を用いた研究であるため、倫理面への配慮は不要である

C. 研究結果

MS 負荷により、MC3T3-E1 では石灰化が促進されるのに対し、PDL-L2 では石灰化が抑制されたままであった。MS のシグナルが受容され石灰化に至る機序については明らかでないが、MS を受容する分子の候補として考えられているのはインテグリンで、そのシグナルは細胞内の FAK-MEK1/2-Runx2 転写活性-オステオカルシン産生の経路へ伝えられると考えられている。骨芽細胞に MS を負荷すると、上記の過程が順次活性化され、石灰化の速度および石灰化の程度ともに亢進した。これに対して、靱帯細胞 PDL-L2 では、この経路の変化は全く認められず、石灰化も認められなかった。MS

の受容体として作用すると考えられるインテグリン分子の発現を調べたところ、インテグリン $\alpha 7$ が靱帯細胞に発現し、骨芽細胞には発現していないことがわかった。この分子の種々変異体を細胞に過剰発現して上記シグナル伝達系に対する影響を調べた結果、靱帯細胞にはインテグリン分子の細胞内ドメインに結合してMS誘導性石灰化刺激を抑制する分子が存在することが示された。

D. 考察

靱帯細胞ではMS誘導性の石灰化刺激に対して抑制的に働く機構が備わっていること、この機構においては、上記インテグリンおよびその細胞内ドメインに特異的に結合し、FAK の活性化を抑制する分子が関与している。

E. 結論

靱帯細胞には、少なくとも2種類の石灰化抑制機構が存在する。靱帯細胞が強力な MS 刺激下にあっても石灰化しないのは、これらの機構が協調的に作用するためであると考えられる。

F. 健康危険情報:なし

G. 研究発表

1. 論文発表:
Yoshizawa T et al., Mol. Cell. Biol. 24:3460-3472, 2004.
2. 学会発表:
Takizawa F et al., 27th Annual meeting of ASBBMR, Nashville, Tennessee, USA, September 24, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況:なし

ラットを用いた脊柱靭帯への反復伸張ストレス負荷モデル : 脊柱靭帯骨化症とメカニカルストレスとの関連について (第2報)

分担研究者: 岩本幸英(九州大学整形外科教授)

研究協力者: 塚本伸章, 前田 健, 三浦裕正, 神宮司誠也, 細川 哲, 播戸谷勝三
(九州大学整形外科)

日垣秀彦, 藏田耕作 (九州産業大学機械工学科)

研究要旨

脊椎脊柱靭帯骨化症の成因の一つに局所へのメカニカルストレスの関与が示唆されている。我々は、脊柱靭帯に直接メカニカルストレスを蓄積させた靭帯組織の応答を観察するために、独自の刺激装置を用い *in vivo* でラット尾椎脊柱靭帯に反復伸張ストレスを負荷する実験を行ってきた。刺激の強さは10Nとし、反復回数、実験期間によってラットを4つのグループに分けて比較した。2週間にわたり伸張刺激を多数反復させたグループでは、尾椎脊柱靭帯内の多くの部位で異所性の骨・軟骨用組織が出現し、その周囲では BMP-2 の発現が免疫染色にて観察された。一方、反復回数の少ないグループでは、靭帯内で小円形の細胞が増殖する所見が主に観察された。ラット脊柱靭帯では伸張刺激の回数に応じて組織の応答が変化してゆくという特徴が見られた。

A. 研究目的

本研究の目的は、脊柱靭帯骨化症の成因としてのメカニカルストレスの関与を明らかにするために、独自の機械的刺激装置を用い、ラット尾椎脊柱靭帯に反復伸張ストレスを負荷した際の形態変化を詳細に観察することである。

B. 研究方法

B.1 機械的刺激装置の概要

ラット尾椎脊柱靭帯に伸張ストレスを負荷するために、独自の機械的刺激装置を作成した (Figure 1)。この装置は、コンピュータによるフィードバック制御でラットを乗せた台座が前後に往復運動することによって、尾椎を固定した2つの immobilizer の間に、一定の反復伸張ストレスを1 Hz にて負荷することができる。

B.2 対象と刺激方法

対象には成体 Wistar ラット12匹を用いた。尾椎脊柱靭帯に直達的な牽引力を負荷するため、遠位側は第8番尾椎に刺入した直径1.2mmのステンレスワイヤ (Figure 2) を immobilizer に固定し、近位側は骨盤を immobilizer に直接ストラップで固定した。

ラットを3匹ずつ4つの実験グループに分け、刺激実験を行った。Group I はコントロールグループとし、Groups II~IV は刺激実験グループとした。刺激実験グループではワイヤを刺入した翌日より刺激実験を開始した。Table 1 は各グループにおける刺激プロトコルである。ワイヤの刺入処置、各回の刺激実験はペントバルビタールの腹腔内投与による全身麻酔の下で行った。

B.3 評価方法

実験期間終了後、ラットを屠殺し、尾椎を速やかに摘出した。組織固定、脱灰処理およびパラフィン包埋ののちに正中部における矢状断薄切標本を作製した。薄切切片は、Hematoxylin-Eosin 染色, Safranin O 染色を施した。また抗 BMP-2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)を用いた酵素抗体法による免疫染色を施した。

観察対象尾椎は、椎体、椎弓の構造が体幹の脊椎と類似した第 2~5 番の尾椎とした。Figure 3 のように前縦靭帯(ALL)側を6箇所、後縦靭帯(PLL)側を6箇所に、合計12箇所をそれぞれが靭帯付着部を含むように分割し、各箇所を観察された所見をラットごとに記録し、各グループ間の特徴の違いを比較した。

B.4 倫理面への配慮

この実験は九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、規定に基づいて行われた。

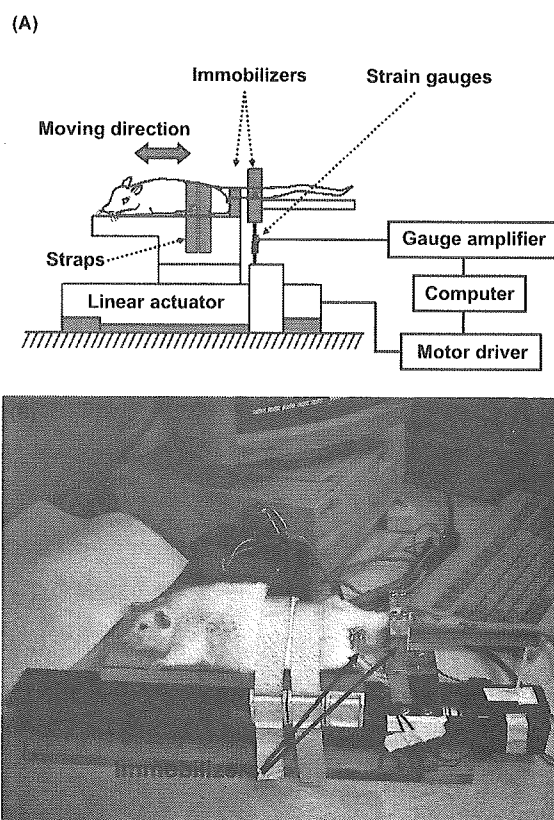


Figure 1. A schematic drawing (A), and photograph (B) of the stimulating apparatus.

Table 1. 実験グループ分けと刺激プロトコール

グループ	I	II	III	IV
	Control			
ラット匹数	3	3	3	3
伸張力 (N)	—	10	10	10
反復回数 (cycles/ day)	—	600	600	1800
実験期間 (weeks)*	—	1	2	2

*: 1 週間当たり 5 日間刺激実験をおこなった。

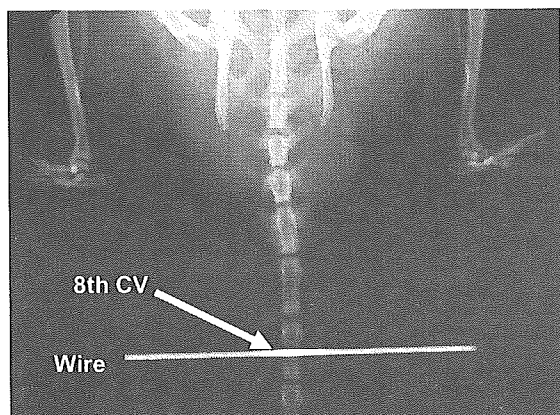


Figure 2. An antero-posterior view X-ray image of the rat caudal vertebrae (CV) after pin insertion.

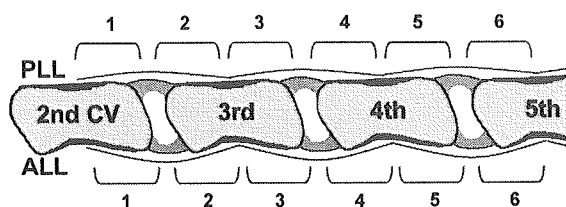


Figure 3. A schematic drawing of the target sites for a histological evaluation between the 2~5th CV. Frames: 6 target sites for PLL and 6 target sites for ALL.

C. 研究結果

刺激が負荷されたラット尾椎脊柱靭帯内では、2つの特徴的な所見が観察された。

① 軟骨様組織の増生(**Figure 4-A, 4-B**): この変化は Group IV のラットで最も多く観察された。そこでは椎間部付近から椎体中央部にかけての脊柱靭帯付着部より、成熟した軟骨様の細胞 (chondrocyte-like cells) が線維束に囲まれる形で数珠状に増生していた。一方、軟骨様細胞の

周囲では、軟骨細胞とは異なる小円形の細胞 (round-shaped cells) が増殖しているのが観察された。一部では異所性軟骨様組織と連続して woven bone の形成が認められる部位もあった (**Figure 5-B**)。

② **Round-shaped cells** のみの増生 (**Figure 4-C**): round-shaped cells のみが靭帯付着部付近で数珠状に増生しており、周囲には軟骨様組織は見られなかった (**Figure 5-A**)。これらは Group II や III のラットにおいて多く観察された。

③ 一方、コントロールグループの尾椎脊柱靭帯では、靭帯線維は平行に走行しており、扁平な核をもった線維芽細胞が疎に分布していた (**Figure 4-D**)。

Table 2 は、各ラットあたり 12 箇所の観察部位のうち、上記①、②の2つの特徴的な所見が見られた箇所の数を定量的にまとめたものである。Group II のラットでは round-shaped cells の増殖がしばしば観察される程度であったが、Group III のラットでは round-shaped cells の増殖した箇所が増え、軟骨様組織の出現所見も数箇所において観察された。一方、Group IV のラットでは、多くの箇所において軟骨様組織の出現が見られたが、round-shaped cells の増殖箇所は減少していた。軟骨様組織の一部では woven bone 形成による異所性骨化も確認された。

Group III, IV のラットで主に観察された chondrocyte-like cells の周囲はサフラニン O にて赤く陽性に染まり、軟骨基質が発生していることが確認された (**Figure 5-A**)。免疫染色では軟骨様組織周囲で増殖した round-shaped cells などの細胞内では BMP-2 の発現が認められた (**Figure 5-B**)。

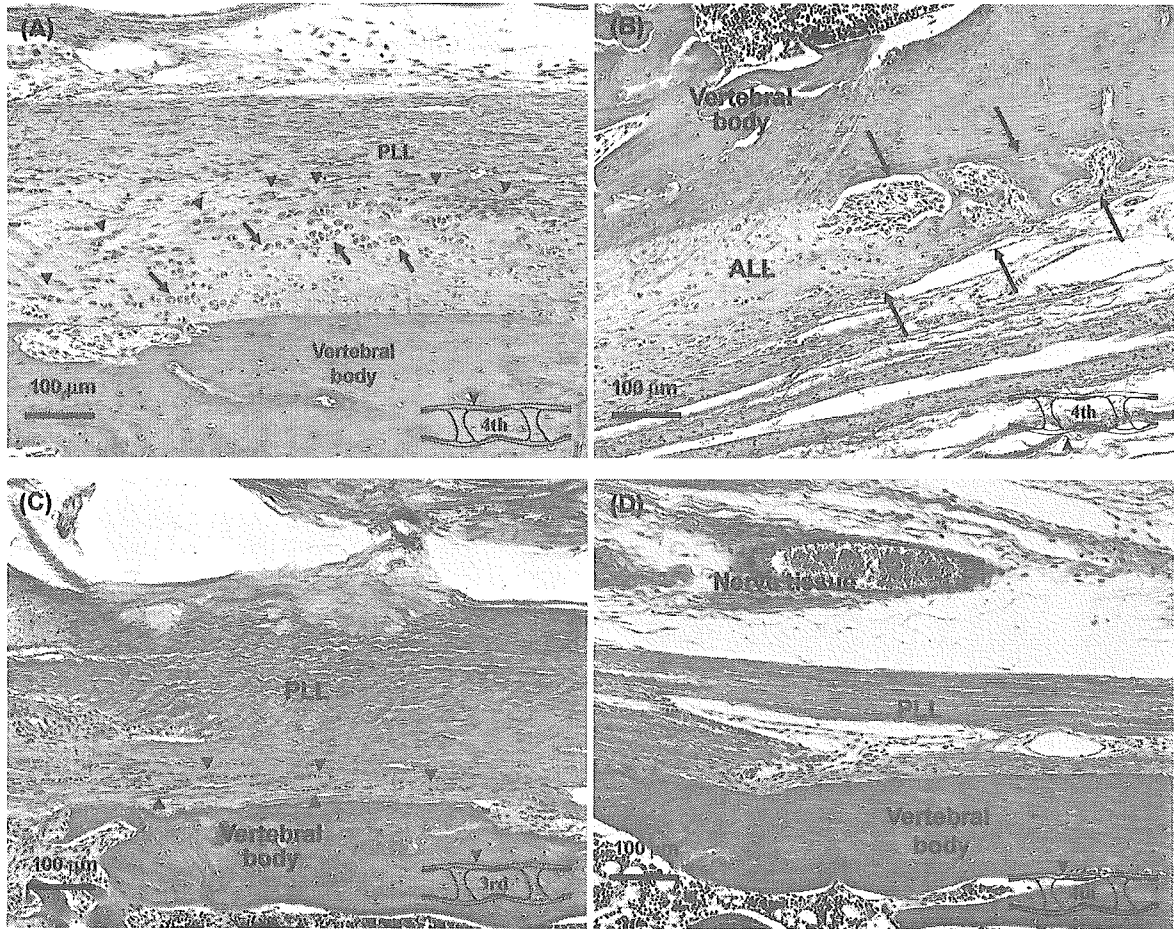


Figure 4. Representative histology of a Group IV rat (A, B), a Group III rat (C) and Group I (control) rat (D). (A): The posterior longitudinal ligament (PLL) in the 4th CV with ectopic cartilaginous tissue formation. Arrows show the chondrocyte-like cells, and arrowheads show the round-shaped cells proliferating around the chondrocyte-like cells. (B): The anterior longitudinal ligament (ALL) in the 4th CV with ectopic woven bone formation. Arrows show the ossification site which had continuity to the cartilaginous tissue. (C): The PLL in the 3rd CV with proliferation of round-shaped cells (arrowheads). (D): The PLL in the 4th CV of the control rat at higher magnification. Schematic CVs with arrowheads at the bottom of each photomicrograph indicate the number of the CVs and the locations for the observation in the photomicrographs. (Hematoxylin-eosin)

Table 2. ラット脊柱靭帯に観察された特徴的所見の定量的評価

グループ, プロトコール	観察所見	
	Round-shaped cells 増殖箇所数	軟骨様組織の出現箇所数
I Control	None	None
	None	None
	None	None
II 600cycles /day, 1week	++++	+
	None	None
	+++++	None
III 600cycles /day, 2weeks	++++	+*+*
	++++	+*
	++++	None
IV 1800cycles /day, 2weeks	+++	+++
	++	+++++ +*
	++	+++

・表内の+は観察対象靭帯 (Figure 3 のフレーム) のうち 1 箇所に対応。
 ・表の 1 行はラット 1 匹に対応。 * : Woven bone の出現が見られた箇所。

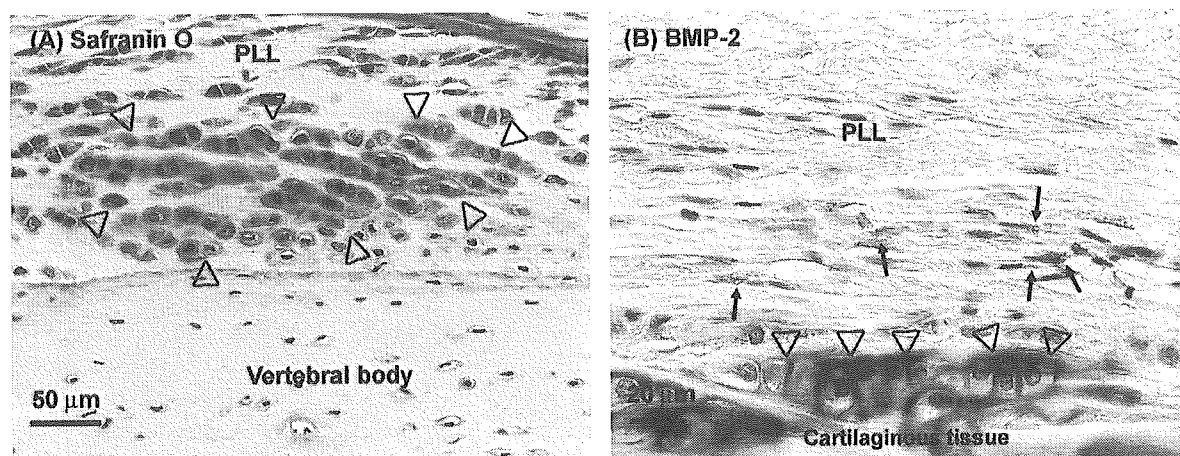


Figure 6. Representative histology of Safranin O staining (A) and immunohistochemistry by anti BMP-2 antibody (B). (A): The PLL in the 4th CV of a Group IV rat. Open arrowheads indicate positive Safranin O staining around the chondrocyte-like cells within the PLL. (B): The PLL in the 3rd CV of a Group III rat. Arrows indicate representative expressions of BMP-2 in the proliferated cells adjacent to cartilaginous tissue formation. Open arrowheads indicate the cartilaginous tissue formation.

D. 考察

ラット脊柱靭帯に反復伸張ストレスを負荷することで、靭帯内に一部骨化を伴った異所性軟

骨組織が出現することが確認された。さらに、今回の実験では、刺激回数により靭帯内での応答には変化があることがわかった。すなわち、刺激

回数が少ないグループでは靭帯内での round-shaped cells の出現・増殖が特徴的であったが、刺激回数が増加するに従って異所性軟骨組織の形成が促進され、一方 round-shaped cells のみの増殖が見られた箇所は減少するという特徴であった。したがって、ラット脊柱靭帯組織では、刺激回数に応じてまず round-shaped cells が発生し、その後に異所性軟骨組織が誘導されるという dose-dependent な性質が見られた。

Round-shaped cells や異所性軟骨細胞は主に尾椎椎間部付近の靭帯付着部(enthesis)に沿って分布していた。靭帯の付着部は硬組織と軟部組織の隣接した部位であり、メカニカルストレスが集中しやすいといわれている。したがって、今回の実験において、尾椎に負荷された伸張ストレスは、脊柱靭帯の付着部付近に集中したと考えられた。そこでは、細胞レベルの応答や、微小な損傷による治癒機転の影響により靭帯内細胞の増殖、軟骨細胞への分化が促進されたものと考えられた。さらに、異所性軟骨周囲に増殖した round-shaped cells では BMP-2 の発現も観察された。このことにより round-shape cells から成熟した軟骨細胞への分化の過程には BMP-2 が関与していることが示唆された。

我々の前年度までの報告ではラット尾椎脊柱靭帯への反復伸張刺激により、靭帯内に異所性骨・軟骨組織が誘導されることがわかったが、その変化の過程については明らかではなかった。今回、刺激回数に応じた群分けを行うことにより、脊柱靭帯組織は伸張方向の力に応答し、まず小円形の細胞が靭帯内に増殖すること、それらはやがて軟骨細胞に分化してゆくという現象が in vivo で確認された。

E. 結論

ラット脊柱靭帯では伸張ストレスが蓄積する事により、徐々に脊柱靭帯付着部付近で異所性軟骨組織が形成されてゆくことが本実験で示され

た。さらに軟骨組織への分化の過程では、骨形成因子である BMP-2 の関与が示された。

F. 研究発表

学会発表

口頭発表 2件

- Orthopaedic Research Society, 51st Annual Meeting (2005 年 2 月, Washington DC, USA), In vivo response of rat caudal vertebral ligaments to repetitive tensile stress and its role in the development of ossification of the posterior longitudinal ligaments.
- 第 4 回 KSU バイオメカニクスシンポジウム (平成 17 年 10 月, 大分), ラットを用いた脊柱靭帯への反復伸張ストレス負荷実験モデル, 脊柱靭帯骨化症とメカニカルストレスとの関連について

G. 知的財産権の出願登録状況

該当なし。

後縦靱帯骨化血清プロテオミクスからの特異的タンパク質に関する研究

分担研究者 永田 見生 久留米大学医学部整形外科教授

研究要旨

過去我々は、後縦靱帯骨化組織からの二次元電気泳動法からのプロテオミクスを行い、タンパク質の相互作用を検索し、疾患の解明を行ってきたが、後縦靱帯骨化血清のプロテオミクス Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) から、特異的タンパク質の検索をおこなった。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症の特異的発現タンパク質をプロテオミクスから見つけだし、その特異的タンパク質のアミノ酸解析と構造解析を行い、そのツーハイブリッド解析から新規タンパク質のパスウェイの解明と抗体作製から免疫組織化学染色を行い、タンパク質の疾患の関与の証明と解明を行い、その後縦靱帯骨化症の特異的タンパク質の阻害剤のデザインを作製し、創薬に関する基盤研究を遂行する。

B. 研究方法

この後縦靱帯骨化症のプロテオーム解析、ゲノム解析に関しての研究は、久留米大学倫理委員会の承認を得ている。また、それに則り、後縦靱帯骨化症の患者へのインフォームドコンセントが行われ、患者と担当医師の間で、その承諾を書面にて取り交わした。患者情報や患者組織及び血清は、久留米大学個人識別情報管理室にて匿名化・バーコード化され、保存されたものである。

後縦靱帯骨化症の術中組織は、可視化後、二次元電気泳動法により、タンパク質のゲル内展開を行い、蛍光染色を行い、バイオラド PDQUEST ソフトにて発現タンパク質を解析し、AXIMA-QIT、AXIMA-CFR 質量分析装置にて解析を行った。

後縦靱帯骨化症の血清は、プロテインチップを使用し、Surface-Enhanced Laser Desorption / Ionization (SELDI) 方法から特異的タンパク質を検索した。

C. 研究結果

プロテインチップを用いた質量分析により、二次元電気泳動法では解析不可能な低分子タンパク質に、後縦靱帯骨化症の特異的発現タンパク質を検索した。



	クーマシーブルー染色	銀染色	蛍光染色
タンパク質検出量	~100ng	~ 600ng	~ 60pg
発現タンパク質数	30~50	200~300	900~1000
質量分析の影響	良	悪	良

図1. 骨組織プロテオミクス解析の発現タンパク質の染色感度の違い

OPLL : 2例

靱帯骨化組織 / 靱帯非骨化組織

Control: 正常頸椎骨組織 / 正常頸椎靱帯組織

Control 靱帯	Control 骨
OPLL ① DM(+) 靱帯非骨化部	OPLL ① DM(+) 靱帯骨化部
OPLL ② DM(-) 靱帯非骨化部	OPLL ② DM(-) 靱帯骨化部

表1. 組織プロテオミクスの試料内容

サンプル	サンプル番号	Hb チェック
OPLL 血清	P1	○
	P2	○
	P3	× 溶血あり
健常者 血清	C1	○
	C2	○

表2. 血清プロテオミクスの試料内容

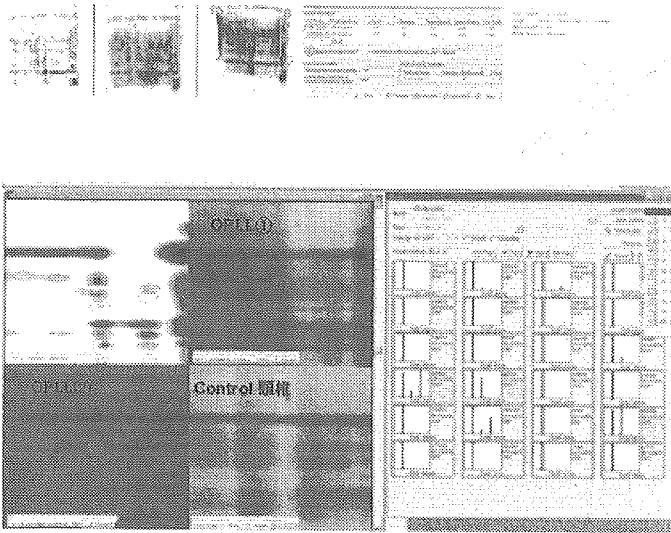


図2. 組織 OPLL①②靭帯骨化部、Control 頸椎
発現タンパク質

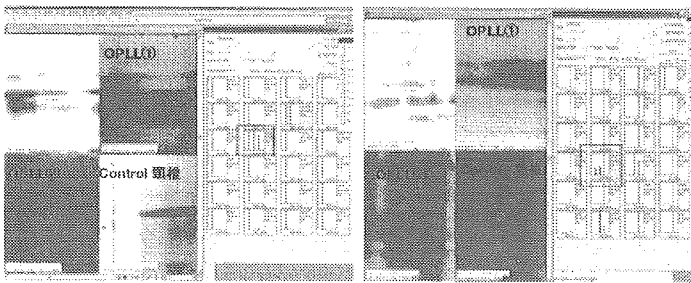


図3. 組織 OPLL①②靭帯骨化部、Control 頸椎
共通発現タンパク質

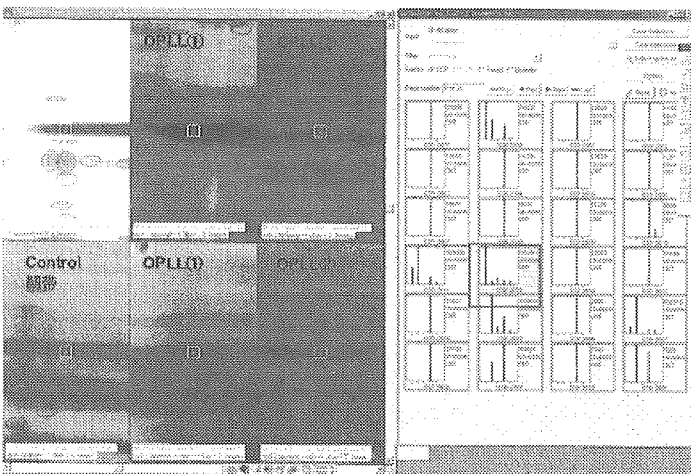
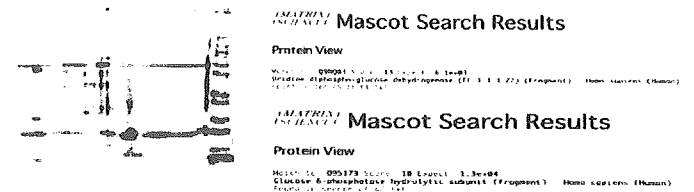


図4. 組織 OPLL①②靭帯骨化部、OPLL①②靭帯非
骨化部 Control 靭帯共通発現タンパク質

OPLL DM+ 靭帯骨化部	OPLL DM- 靭帯骨化部	OPLL DM+ 靭帯骨化部 OPLL DM- 靭帯骨化部	OPLL DM+ 靭帯骨化部 OPLL DM- 靭帯骨化部 Control 骨	OPLL DM+ 靭帯非骨化部 OPLL DM- 靭帯非骨化部 Control 靭帯	OPLL DM+ 靭帯骨化部 OPLL DM- 靭帯骨化部 OPLL DM+ 靭帯非骨化部 OPLL DM- 靭帯非骨化部 Control 靭帯
616	950	81	16	29	3

SyproRuby染色
NuPAGE Gels 4-12% Bis Tris Gel w/MES Running Buffer
PDQuest7.11

表3. 組織プロテオミクス統計学的解析結果



ProQ Emerald glycoprotein gel stain

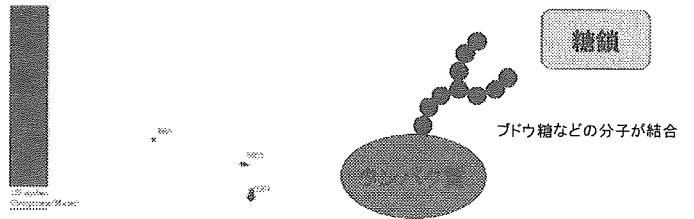


図5. 修飾作用リン酸化発現タンパク質

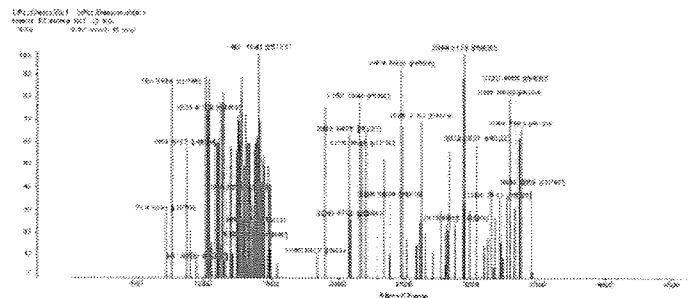


図6. 糖ペプチドのMALDI-QIT TOF MS/MS 解析

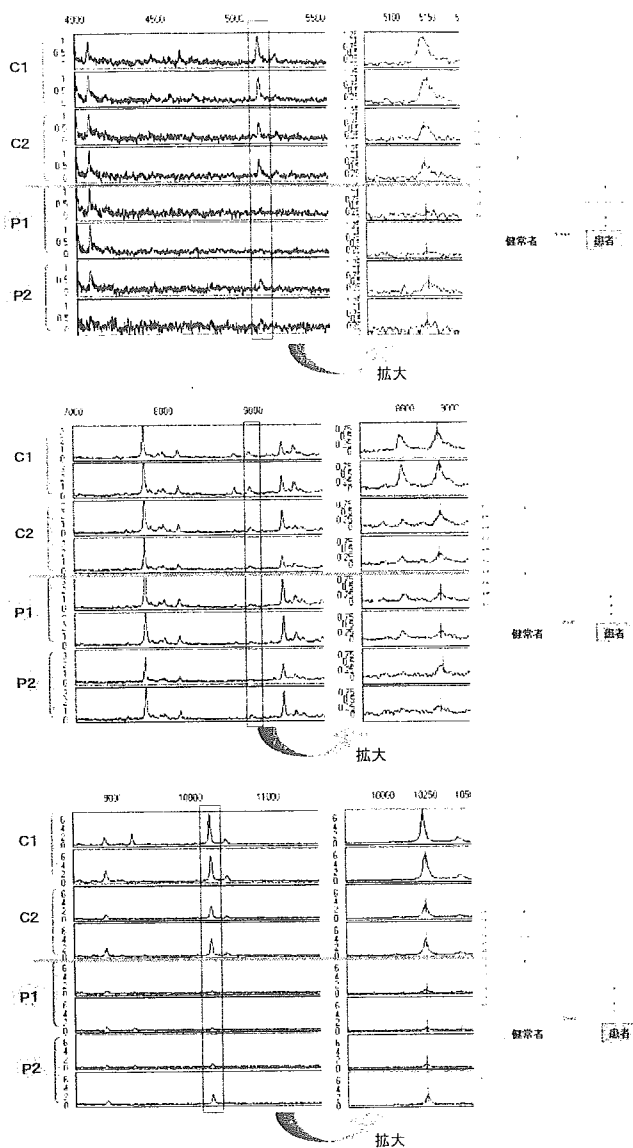


図7. 血清プロテオミクスによる患者群で減少の見られたピーク

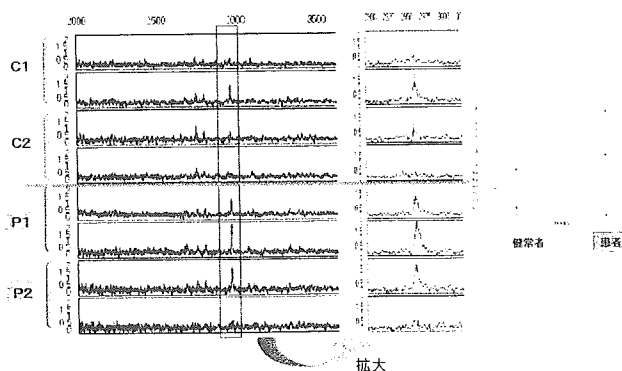


図8. 血清プロテオミクスによる患者群で増加の見られたピーク

後縦靭帯骨化症の組織(表-1)と血清のプロテオミクス(表-2)を行った結果、組織による二次元電気泳動法では、骨組織プロテインマップを作製したが、発現タンパク質の染色感度の違いにより、発現タンパク質の数に違いが見られた(図-1)。そのため、高感度である蛍光染色によるプロテオーム解析を行い、後縦靭帯骨化症と糖尿病合併症の有無、靭帯骨化部分と非骨化部分との比較解析を行ったところ、発現タンパク質に違いが見られた(図-2, 3, 4, 表-3)。糖鎖修飾作用のあるタンパク質を特定するために ProQ Emerald glycoprotein gel stain にて発色させ(図-5)、その発現タンパク質を MALDI-QIT-TOF MS/MS にて解析を行った(図-6)。

後縦靭帯骨化症の血清プロテオミクスからは、患者群での比較解析を行ったところ、患者群で減少したタンパク質と増加したタンパク質が検索できた(図-7, 8)。

D. 考察

プロテオミクスは、様々な種類があり、それを使い分けることにより、最終目的を的確にクリアすることができる。後縦靭帯骨化症の特異的タンパク質を見つけたし、詳しい解析を遂行中である。

E. 結論

我々の疾患プロテオミクスから、特異的なタンパク質を解析することにより、骨マップ、修飾作用、新規タンパク質の解明を行うことが可能であり、特異的タンパク質から、バイオマーカーや創薬への期待が可能となる。また、そのため、個人識別情報管理室の整備や倫理委員会、知的財産などの法学的な知識も必要となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
データ開示不可能
2. 学会発表
データ開示不可能

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
後縦靭帯骨化症に関する詳しい特異的タンパク質の特許出願準備中
2. 実用新案登録
3. その他

マウス脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)の治療効果とその機序

西尾 豊(千葉大学医学部整形外科), 国府田正雄(千葉県立東金病院整形外科), 鎌田尊人(習志野第一病院整形外科), 染谷幸男(千葉大学医学部整形外科), 吉永勝訓(千葉県立リハビリテーションセンター), 大河昭彦(千葉大学医学部整形外科), 山崎正志(千葉大学医学部整形外科), 守屋秀繁(千葉大学医学部整形外科)

【研究要旨】

マウス脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の治療効果およびその作用機序について検討したので報告する。**対象と方法:** *In Vivo* 実験: マウス脊髄不全損傷モデルを作成、損傷脊髄中心部の残存ニューロンの数とアポトーシスを起こしているニューロンを検出し、その数を比較検討した。また G-CSF レセプター (G-CSFR) の存在を確認した。 *In Vitro* 実験: マウス小脳顆粒球細胞を培養。グルタミン酸によりアポトーシスを誘導し、G-CSF の抗アポトーシス作用およびそのシグナルにつき検討した。**結果と考察:** G-CSF は損傷脊髄内のニューロンを多く残存させ、ニューロンのアポトーシスを減少させた。これは G-CSFR を介したシグナルによる作用と考えられた。G-CSF は脊髄損傷後の神経細胞死を抑制することで二次損傷を抑制し、機能回復を促進したと考えられた。G-CSF は急性期脊髄損傷の治療薬となる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

長い間、ヒトを含めた哺乳類の中樞神経組織は自己再生能・修復能を失っていると信じられてきた。実際に脊髄損傷では麻痺の回復は望めず、現在の治療では急性期のメチルプレドニソロン大量投与・合併する脊椎損傷に対する固定手術・リハビリテーションなどにより「脊髄障害の拡大を防ぎ、残された機能を最大限に活用する」ことがすべてといっても過言ではない。また近年になりメチルプレドニソロン投与による合併症増加の報告やメチルプレドニソロンの

効果そのものを疑問視する報告もみられ、新たな急性期脊髄損傷治療薬の開発が急務となっている。この観点より、神経保護作用・神経栄養作用をもつ種々の因子の効果が試され、多くの報告がなされている。

ところで顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は 20-kDa の糖タンパクであり、血球系の増殖因子のひとつである。近年、G-CSF の脳卒中モデルにおける神経保護作用が報告された(Schabitz, *Stroke* 2003)。また、G-CSF 投与により増殖し末梢血中に動員された造血幹細胞(HSC)が脳内に

生着し、神経系細胞に分化したという報告もなされている(Corti, *Exp Neurol* 2002)。これらの報告では脊髄に関しての検討はないが、前者の報告から脊髄損傷においてもその神経保護作用が期待でき、また後者の報告より脳と同様に脊髄にも末梢血中の HSC が生着し神経系細胞に分化することは充分ありうると思われ、G-CSF 投与にて増殖し末梢血中に動員された HSC が脊髄損傷の修復過程に寄与しうる可能性が期待される。われわれは、G-CSF により動員された骨髓由来細胞が脊髄損傷部に生着すること、また後肢機能が著明に改善することを明らかにした。

今回われわれの目的は G-CSF のマウス脊髄損傷に対する治療効果を判定し、その機序を解明することである。

B. 研究方法

a. In vitro 実験

生後 7-9 日の BALB/C マウス より 小脳顆粒球ニューロン (Cerebellar Granule Neuron, CGN) を分離し、7 日間培養する。グルタミン酸 (100 μ M, 6 時間) を培養ニューロン (CGN) に曝露させると細胞死 (アポトーシス) が起こる。これを各条件下にて、培養ニューロンがアポトーシスを起こす程度を Live/Dead Double Staining Kit (MBL) にて評価した。

b. In vitro での G-CSF の効果と functional block 培養した CGN に以下の条件にて細胞死を起こす確率を観察した。

1. G-CSF 群 (G-CSF 100ng/ml) vs Control 群 (0.9% 生食) : G-CSF 群にはグルタミン酸 (100 μ M) と同時に G-CSF 100ng/ml を添加、Control 群には 0.9% 生食を同量添加し、両群

の細胞死率を観察

2. G-CSFR 抗体前処置 : グルタミン酸、G-CSF 添加 30 分前に G-CSFR 抗体添加した群と G-CSFR 抗体抗体のかわりに 0.9% 生食を同量添加した群を比較
3. AG490 (JAK2 inhibitor) 前処置 : グルタミン酸、G-CSF 添加 30 分前に AG490 を添加した群と AG490 のかわりに 0.9% 生食を同量添加した群を比較
4. Wortmaninn (PI-3 kinase inhibitor) 前処置 : グルタミン酸、G-CSF 添加 30 分前に Wortmaninn 添加した群と Wortmaninn のかわりに 0.9% 生食を同量添加した群を比較

JAK2: janus kinase family のシグナルの 1 つ、PI-3 kinase: フォスファチジルイノシトールをリン酸化する酵素

c. In vitro でのシグナルの変化

CGN に G-CSF 100ng/ml を添加した後の次の蛋白の変化を Western blotting をもちいて観察した。

1. 活性化 STAT3 (pSTAT3) の変化 (STAT3: 代表的なシグナルの 1 つ、活性化されるとリン酸化物 (pSTAT3) になる)
2. Bcl-2 の変化 (Bcl-2: 代表的な抗アポトーシス蛋白の 1 つ)

d. In vivo 実験

BALB/C マウス (♀ 8-10w) を用いて Farooque らの方法で脊髄圧迫損傷モデル (T8 レベル、20g, 5 min, Farooque, 2001) を作成、G-CSF 群には G-CSF (200 μ g/kg/day) 5 日間連続投与し、Control 群には vehicle のみ (1% ウシ血清アルブミン) を投与した。

1. 後肢運動機能評価: Motor Function Scale (Farooque, 2001) を用いて脊髄損傷後の各グルー

ブ間の後肢運動機能を比較した。

2. 組織学的評価:受傷後 24 時間、3 日、6 週の脊髄凍結切片を作成し、2-A. Cresyl-violet 染色にて脊髄損傷6週間後に損傷部脊髄内に残存したニューロン(長径30 μ m以上)の数をカウントし、各群を比較した。2-B. 免疫組織化学染色:Neu-N (Neuronal Nuclei; ニューロンのマーカー:CHEMICON)、Caspase-3-active (アポトーシス細胞のマーカー:Genzyme / Techne)を用いて2重染色を行い、Neu-N / caspase-3-active 二重陽性細胞をカウントし、各群を比較した。

e. G-CSF 受容体 (G-CSFR)の存在

神経系における G-CSFR の存在を証明するために培養CGN,正常マウス脊髄を用いて

1.免疫組織化学染色:Neu-N、G-CSFR (G-CSF receptor のマーカー, Santa cruz)にて二重染色を行い、Neu-N / G-CSFR 2重染色陽性細胞を確認した。

2. RT-PCR にて G-CSFR mRNA の存在を確認した。Forward primer: (5'-GTACTCTTGTCCTACTACCTGT-3') reverse primer:(5'-CAAGATACAAGGACCCCAA-3')

C. 研究結果

a, b. In vitro でのG-CSFの効果と functional block

グルタミン酸 (100 μ M, 6 時間) 誘導神経細胞死 (アポトーシス) での G-CSF の効果は、同時に投与したG-CSFによってアポトーシスをおこした神経細胞の数が有意に減少した(Fig. 1)。

抗体、各阻害薬による functional block ではG-CSFR抗体によってG-CSFの抗アポトーシス作用が阻害された。また、JAK2 inhibitor である

AG490、PI-3 kinase inhibitor である Wortmaninn によって G-CSF の抗アポトーシス作用が部分的に阻害された (Fig. 2)。

c. In vitro でのシグナルの変化

CGNに G-CSF を添加した後のシグナル変化では pSTAT3 が G-CSF 添加後 15min 後より増加し、1,2h でピークとなった。抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 は 30min 後より増加し、6 時間続いた (Fig.3)。

d. In vivo 実験

1. 後肢運動機能評価: G-CSF 群の後肢運動機能は受傷後5週以降、Control 群に比べ有意に改善した ($p < 0.05$) (Fig.4)。受傷後 6 週の時点で Control 群の平均点は 2.9 点(両側後肢の有意な動き)、G-CSF 群では 4.0 点(片側足底をついてステップングが可能、しかし荷重できない)であった。

2. 組織学的評価:2-A. Cresyl-violet 染色にて脊髄損傷6週間後に損傷部脊髄内に残存したニューロン(長径30 μ m以上)の数は G-CSF 群は平均 27.5 個、Control 群は平均 4.6 個であり、有意に G-CSF 群ではニューロンが残存していた (Fig.5)。2-B. Neu-N / caspase-3-active の2重免疫組織化学染色では受傷後24時間、3日のどちらのタイムコースにおいてもG-CSF群で二重陽性細胞の数は有意に減少していた ($p < 0.05$) (Fig.6, 7)。

e. G-CSF 受容体 (G-CSFR)の存在

1.免疫組織化学染色:正常脊髄、培養CGNにおいて Neu-N / G-CSFR 2重染色陽性細胞は存在した。つまりニューロン上にG-CSFRが存在することが証明された (Fig.8)。また 2. RT-PCR にも正常脊髄内、さらには培養CGN内に G-CSFR mRNA が存在することが証明された (Fig.9)。

D. 考察

中枢神経系における G-CSF の機能に関する報告としては 2003 年に Schäbitz はグルタミン酸誘導興奮毒性に対する神経細胞保護作用、ラット脳梗塞に対する神経保護作用を報告している。さらに Schäbitz は 2005 年に G-CSF はラット大脳ニューロンにおいて STAT3 を活性化し、抗アポトーシス蛋白である Bcl-XL を増加させ、アポトーシスを防ぐこと、また G-CSF は神経分化作用を持ち、脳梗塞モデルでの神経新生作用を持つという機序についても報告している。

今回我々の実験より、*In vivo* モデルにおいて G-CSF 群では急性期ニューロンのアポトーシスが減少、*In vitro* のモデルでは G-CSF はグルタミン酸誘導神経細胞死を抑制する。さらに G-CSF 群では受傷後 6w の損傷脊髄内のニューロンが残存し、G-CSF 群では後肢機能の回復が Control 群に比べて有意に改善した。つまり G-CSF がニューロンのアポトーシスを抑制し二次損傷を軽減したと考えられた。よって G-CSF は急性期脊髄損傷の治療薬となる可能性が示唆された。その機序については G-CSF がニューロン上の G-CSFR に結合して JAK2/STAT 系、PI-3 kinase のシグナルを通して、抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 の up-regulation が起こり、ニューロンのアポトーシスを防いだ可能性が考えられた (Fig.10)。

E. 結論

1. G-CSF は脊髄損傷後に起こるニューロンのアポトーシスを抑制し、脊髄損傷における二次損傷を改善する可能性が考えられた

2. その機序は G-CSF がニューロン上の G-CSFR と結合し、JAK2・STAT3・PI-3 kinase のシグナルを介して、Bcl-2 を up-regulate し、ニュー

ロンのアポトーシスを抑制することが考えられた

3. G-CSF は急性期脊髄損傷の治療薬となる可能性がある

参考文献

1. W.-R. Schäbitz, R. Kollmar, M. Schwaninger, E. Juettler, J. Bardutzky, N. Schölzke, C. Sommer, S Schwab, Neuroprotective effect of Granulocyte Colony-Stimulating factor after focal cerebral ischemia, *Stroke*. 2003 Mar; 34(3):745-51. 2003.
2. Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schabitz, The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2083-98. 2005.

学会発表

1. 西尾豊, 国府田正雄, 鎌田 尊人, 染谷幸男, 吉永勝訓, 大河昭彦, 山崎正志, 守屋秀繁: マウス脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) の治療効果. 第 39 回日本脊髄障害医学会 東京都 平成 16 年 11 月 5-6 日
2. 西尾豊, 国府田正雄, 染谷幸男, 鎌田 尊人, 吉永勝訓, 大河昭彦, 山崎正志, 守屋秀繁: シンポジウム「脊髄損傷に関する最新知見」マウス脊髄損傷に対する 顆粒球コロニー刺激因子 colony-stimulating factor (G-CSF)

の治療効果とその作用機序. 第40回日本脊
髄障害医学会 東京都 平成17年11月11-1
2日

G. 研究発表
論文発表

1. 西尾豊, 国府田正雄, 鎌田 尊人, 染谷幸男,
吉永勝訓, 大河昭彦, 山崎正志, 守屋秀繁:
マウス脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激
因子(Granulocyte colony-stimulating
factor:G-CSF)の治療効果. 日本脊髄障害医
学雑誌 18(1): 162-163, 2005.

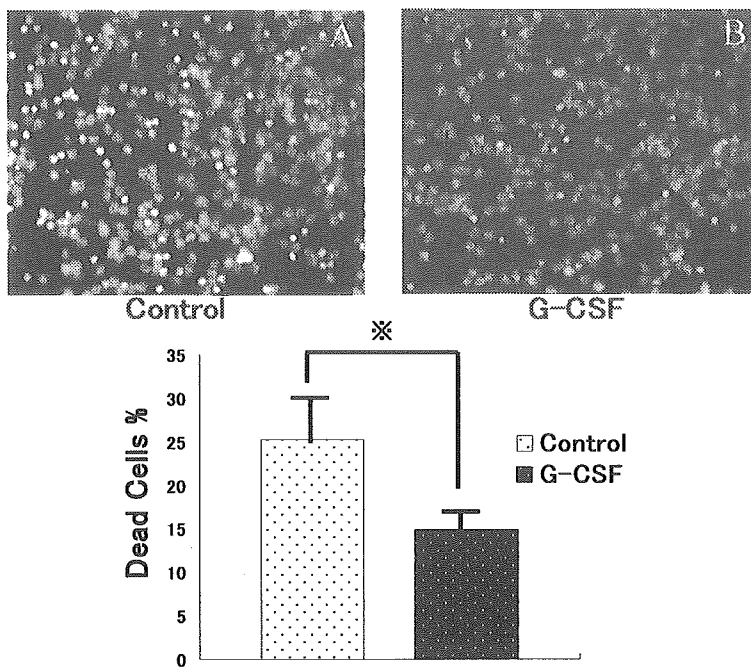


Fig.1 グルタミン酸誘導神経細胞死（アポトーシス）率

A: Control 群 B: G-CSF 群、G-CSFによってアポトーシスをおこした神経細胞の数が有意に減少した(グラフ) (*:p<0.05, Bars: ±S. E.)

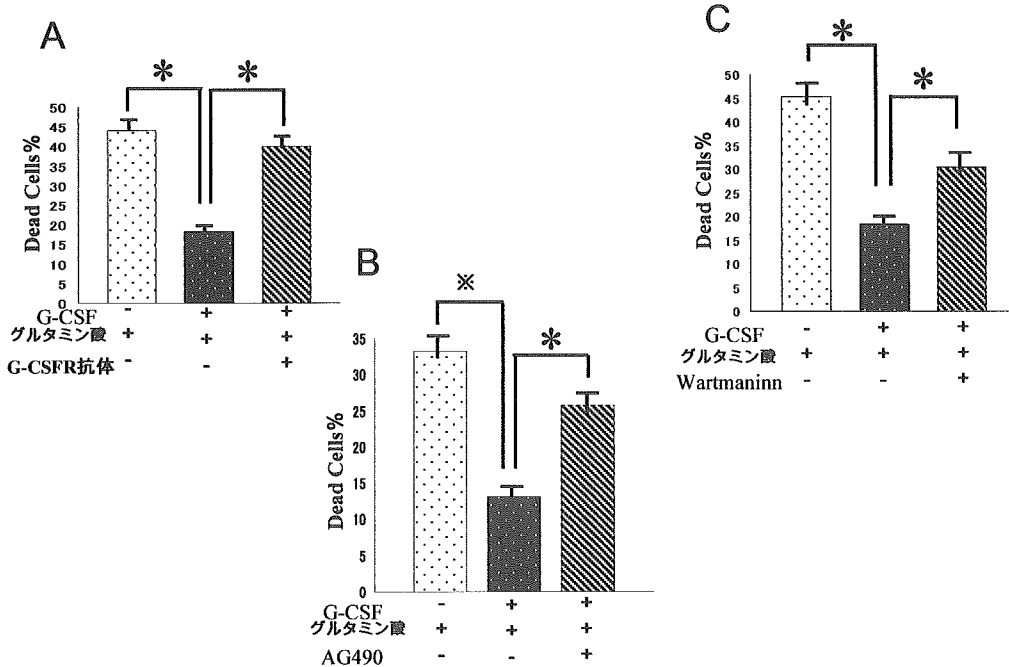


Fig.2 抗体、各阻害薬による functional block 実験

A: G-CSFRによるグルタミン酸誘導神経細胞死（アポトーシス）率の変化、G-CSFRによってG-CSF

の抗アポトーシス作用は阻害された。B: AG490 (JAK2 inhibitor)によるグルタミン酸誘導神経細胞死 (アポトーシス) 率の変化、AG490 によって G-CSF の抗アポトーシス作用が部分的に阻害。C: Wortmaninn (PI-3 kinase inhibitor) によるグルタミン酸誘導神経細胞死 (アポトーシス) 率の変化、Wortmaninn によっても G-CSF の抗アポトーシス作用が部分的に阻害。(※: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ Bars: \pm S. E.)

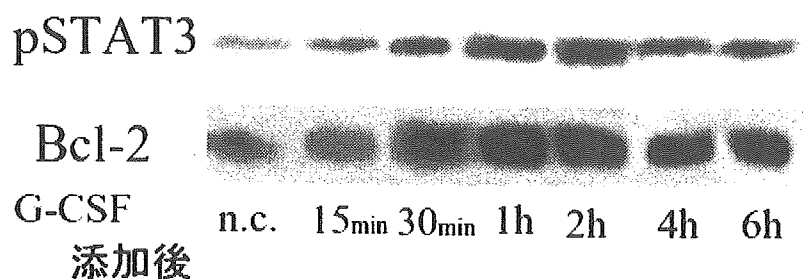


Fig.3 In vitro でのシグナルの変化 (pSTAT3, Bcl-2)

CGNに G-CSF を添加した後、pSTAT3 は添加後 15min 後より増加し、1,2h でピークとなった。抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 は 30min 後より増加し、6 時間続いた。

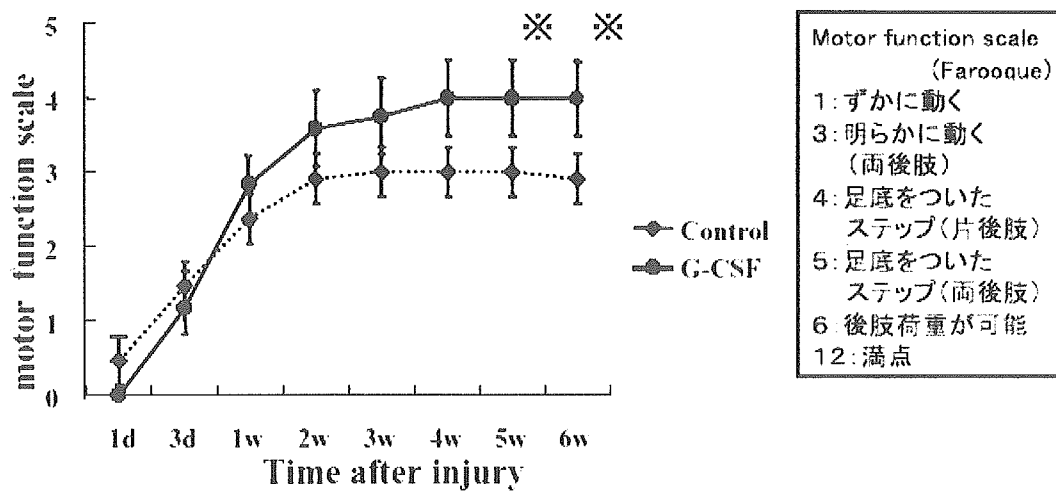


Fig.4 In vivo 実験1. 後肢運動機能評価

G-CSF 群の後肢運動機能は受傷後5週以降、Control 群に比べ有意に改善した。受傷後 6 週の時点で Control 群の平均点は 2.9 点(両側後肢の有意な動き)、G-CSF 群では 4.0 点(片側足底をついてステッピングが可能、しかし荷重できない)であった。(※:p<0.05, Bars: ±S. E.)

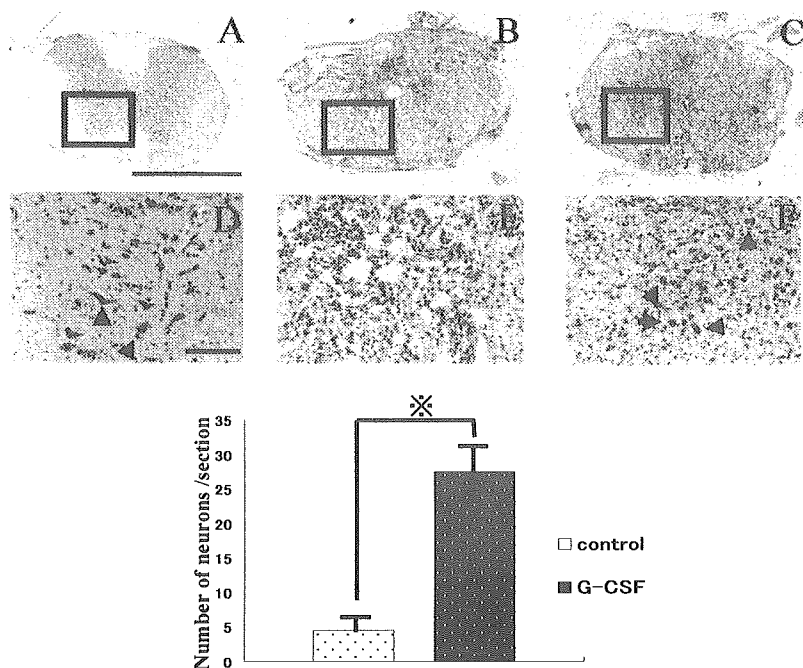


Fig.5 In vivo 実験 2. 組織学的評価:2-A.脊髄損傷6週間後に損傷部脊髄内に残存したニューロンの数
A,D:normal control, B,E: Control 群、C,F: G-CSF 群、A,B,C:×40倍、D,E,F: ×200倍、長径30 μ m以上の細胞をカウントした。Aの矢頭は長径30 μ m以上あり、前角に存在する運動ニューロンと思われる。Fでは明らかに残存している細胞が多い。G-CSF 群は平均 27.5 個、Control 群は平均 4.6 個であり、有意に G-CSF 群ではニューロンが残存していた(グラフ)。(※:p<0. 05, Bars: \pm S. E. 、Aの bar=1000 μ m、Dの bar = 100 μ m)