

Fig.4 オリゴデンドロサイトアポトーシス率の変化

A-C: Caspase-3-a / APC 二重染色;術後 72 時間での像。矢頭は各発現細胞を示す(bar=50 μ m)。
D:術後 72 時間、1 週間で G-CSF 群で有意にオリゴデンドロサイトアポトーシス率が低下した(open column:対象群、closed column:G-CSF 群、*:p<0.05、**:p<0.01、bars: \pm S.E.)。

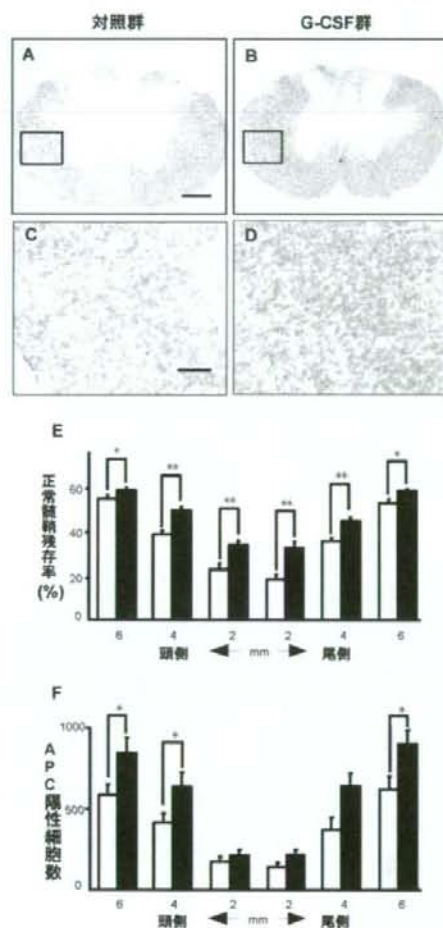


Fig.5

A-D: 髄鞘染色;術後6週間での像。対象群(A、C)に対して、G-CSF 群(B、D)では髄鞘が良好に残存している(bar=500 μ m (A、B)、100 μ m (C、D))。E: G-CSF 群では各切片で有意に正常髄鞘残存率が高かった。F: G-CSF 群では各切片で有意に APC 陽性細胞数が多かった (open column: 対象群、closed column: G-CSF 群、*:p<0.05、**:p<0.01、bars: \pm S.E.)。

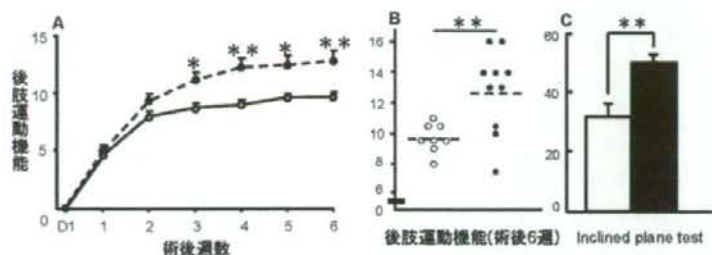


Fig. 6 後肢運動機能評価

A, B: BBB locomotor scale による評価。A: G-CSF 群の後肢運動機能は術後 6 週間の経過で対象群に比べ有意に改善した。B: 受傷後 6 週の時点で 9.7 ± 0.3 点であったのに対し、G-CSF 群 12.8 ± 0.9 点であった (A, B: open circle: 対象群、closed circle: G-CSF 群、ANOVA $p < 0.05$ 、post-hoc $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。C: 術後 10 週の Inclined plane test での評価でも対象群が 31.7 ± 4.4 点であるのに対して、G-CSF 群が 50.0 ± 2.7 点と有意な改善を示した (open column: 対象群、closed column: G-CSF 群、*: $p < 0.01$, bars: \pm S.E.)。



Fig. 7 脊髓損傷における G-CSF の効果

マウス脊髄損傷モデル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 国府田正雄 橋本将行 鎌田尊人 染谷幸男 村田淳 大河昭彦 高橋和久 山崎正志

主任研究者：山崎正志 千葉大学大学院医学研究院整形外科学准教授

分担研究者：大河昭彦 千葉大学大学院医学研究院整形外科学講師

分担研究者：村田淳 千葉大学医学部附属病院リハビリテーション部准教授

研究要旨：In Vivo 実験として、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 実験として、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。結果として、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(Schäbitz, *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髄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プ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'-CAAGATACAAGGACCCCA-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 Wortmannin 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(片側足底に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(長さ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. Schabitz WR, Kollmar R, Schwanninger M,

Juettler E, Bardutzky J, Schölzke N, Sommer C, Schwab S, Neuroprotective effect of Granulocyte Colony-Stimulating factor after focal cerebral ischemia, Stroke. 2003 34: 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. 115: 2083-98. 2005.

F. 健康危険情報

なし

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. 日脊障医誌 18: 162-163, 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「脊髄損傷研究に関する最新知
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 11-12
日

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究について、本年度は特許取得や実用新案
登録はない。

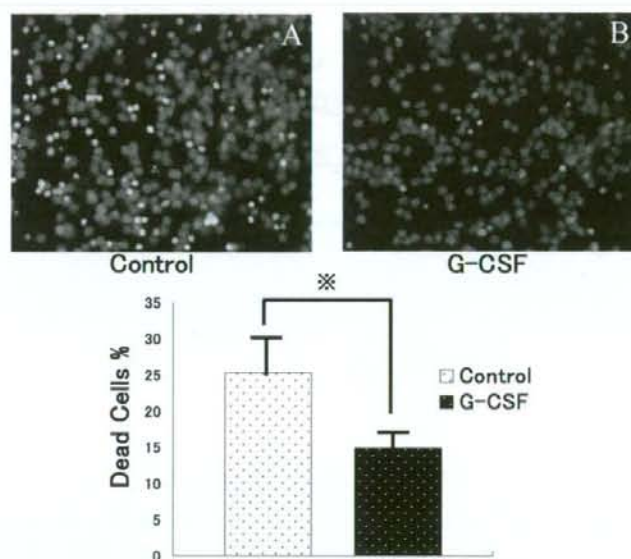


Fig.1 グルタミン酸誘導神経細胞死(アポトーシス)率

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: $\pm S. E.$)

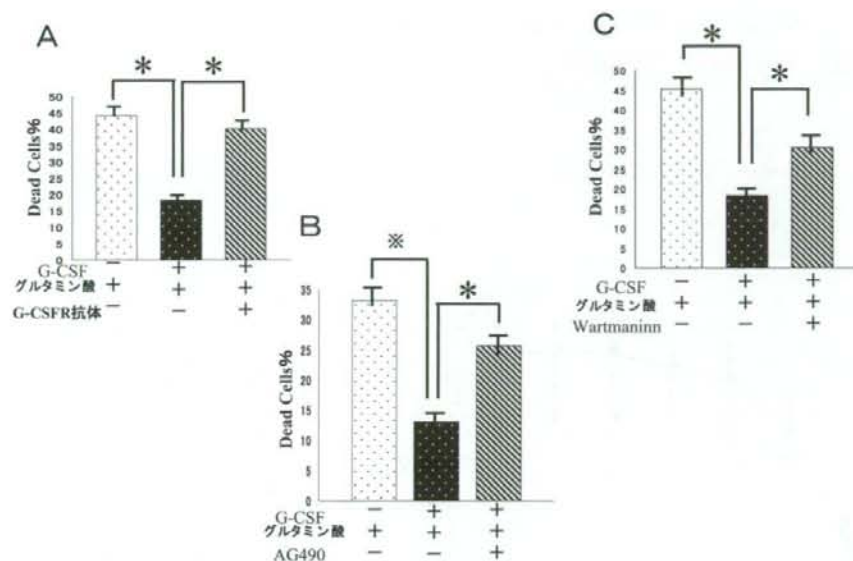


Fig.2 抗体、各阻害薬による functional block 実験

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: Wortmannin (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、Wortmannin 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.)

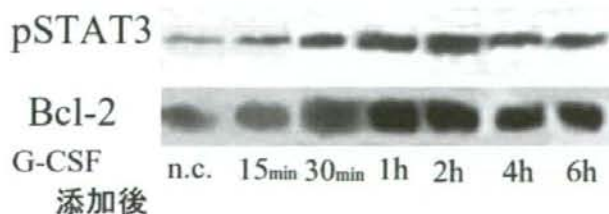


Fig.3 In vitro でのシグナルの変化 (pSTAT3, Bcl-2)

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。

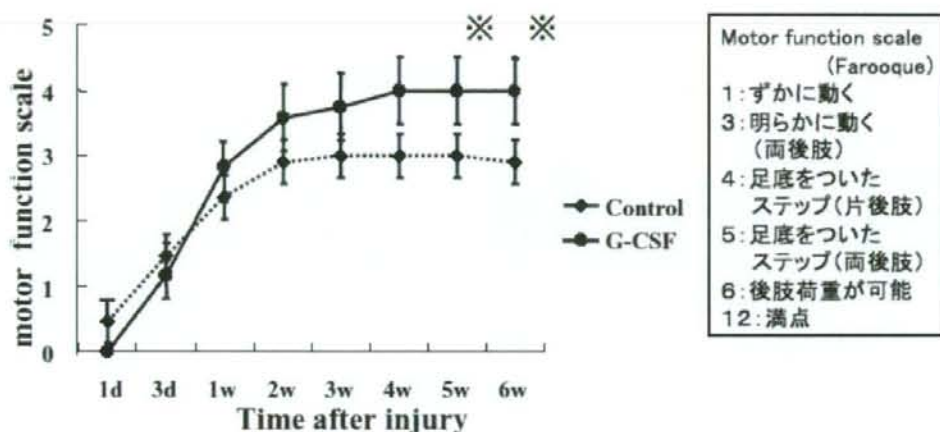


Fig.4 In vivo 実験1. 後肢運動機能評価

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プが可能、しかし荷重できない)であった。(※:p<0.05, Bars: ±S. E.)

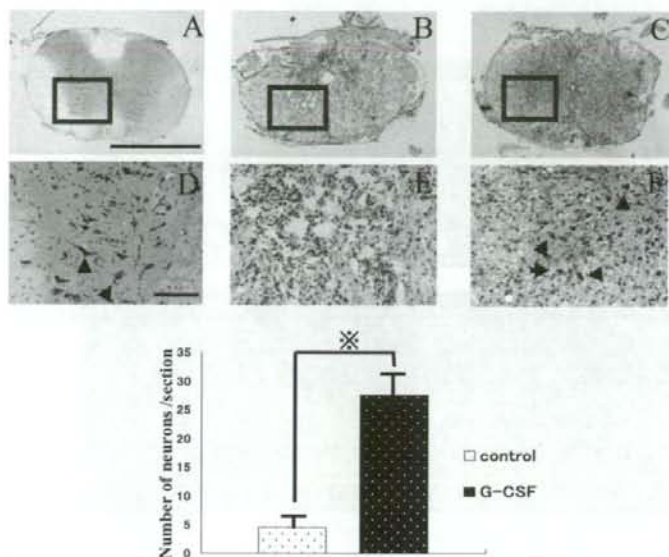


Fig.5 In vivo 実験 2. 組織学的評価:2-A.脊髄損傷6週間後に損傷部脊髄内に残存したニューロンの数
A,D:normal control, B,E: Control 群、C,F: G-CSF 群、A,B,C:×40倍、D,E,F: ×200倍、長径30μm以上の細胞をカウントした。A の矢頭は長径30μm以上あり、前角に存在する運動ニューロンと思われる。F では明らかに残存している細胞が多い。G-CSF 群は平均 27.5 個、Control 群は平均 4.6 個であり、有意に G-CSF 群ではニューロンが残存していた(グラフ)。(※:p<0.05, Bars: ±S. E.、A の bar=1000μm、Dの bar = 100 μm)

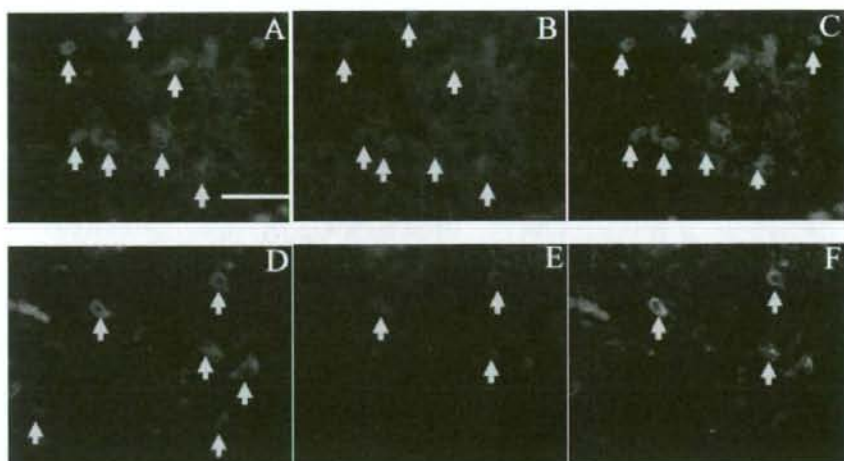


Fig.6 In vivo 実験 2. 組織学的評価: 2-B. Neu-N / caspase-3-active 2重免疫組織化学染色 (受傷後24時間) A,B,C: Control 群、D,E,F: G-CSF 群、A,D: Neu-N 染色、B,E: caspase-3-active 染色、C: A,B の merge 像、F: D,E の merge 像、G-CSF 群では2重染色陽性細胞が Control 群に比べて少ない。矢頭は各陽性細胞を示す。(bar = 50 μ m)

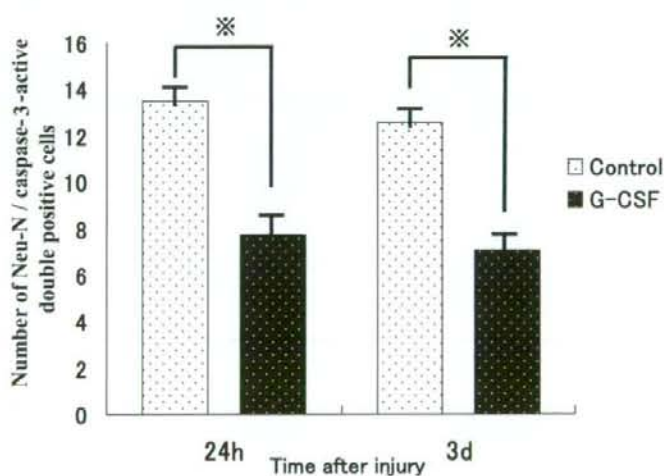


Fig.7 In vivo 実験 2. 組織学的評価:2-B. Neu-N / caspase-3-active2重陽性細胞数

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る。(※: $p < 0.05$, Bars: $\pm S. E.$)

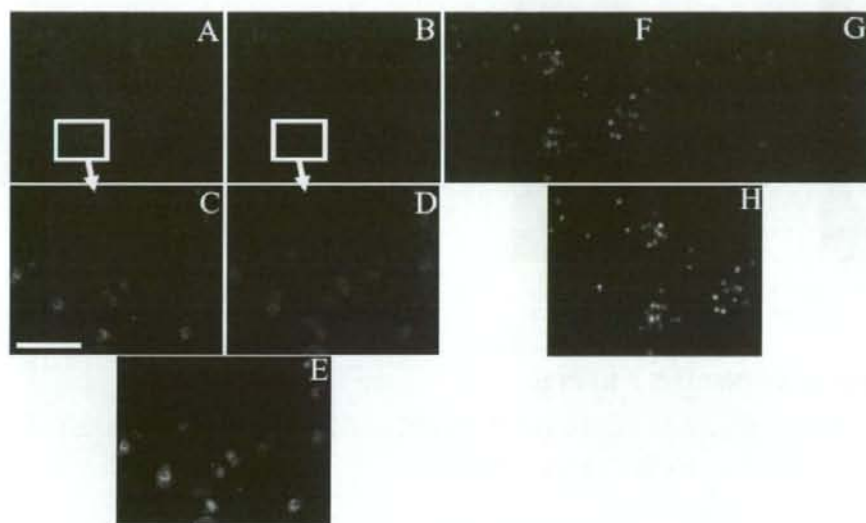


Fig.8 G-CSF 受容体 (G-CSFR)の存在 1.免疫組織化学染色

A, B, C, D, E: 正常マウス脊髄横断切片の免疫組織化学染色、F,G,H: 培養 CGN の免疫組織化学染色、
A,B: $\times 40$ 倍、C,D,E,F,G,H: $\times 400$ 倍、A,C,F: Neu-N 染色、B,D,G: caspase-3-active 染色、E: C,D の merge 像、
H: F,G の merge 像、正常脊髄、培養CGNともに Neu-N / G-CSFR 2重染色陽性細胞が存在。

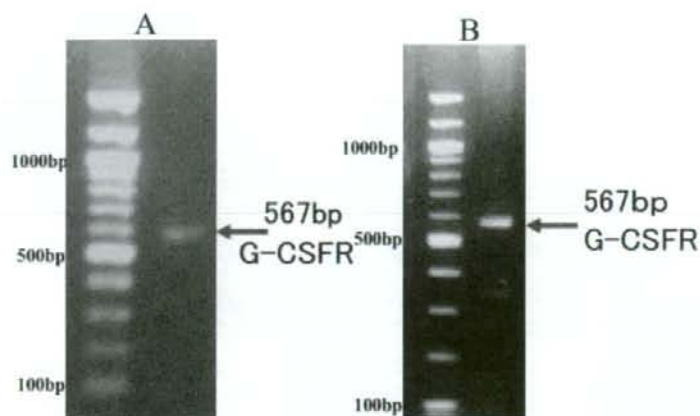


Fig.9 G-CSF 受容体 (G-CSFR)の存在 2. RT-PCR

A: 正常脊髄の RT-PCR、567bpにバンドが存在、G-CSFR mRNA と考えられる。B: 培養CGNのの RT-PCR、567bpにバンドが存在、G-CSFR mRNA と考えられる。

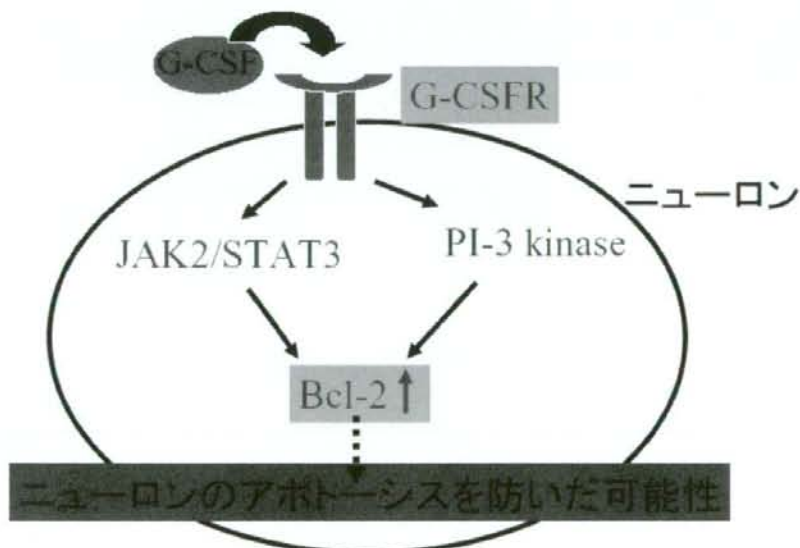


Fig.10 脊髄損傷におけるG-CSFの作用機序

研究成果の刊行に関する一覧表

【H20. 4. 1～H21. 3. 31】

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M	Transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cell reduces cystic cavity, promotes axonal regeneration/sparing and functional recovery after contusion injury of adult rat spinal cord	J Neurosurg Spine	9	600-610,	2008
Koda M, Someya Y, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Murata A, Yamazaki M	Brain-derived neurotrophic factor suppresses anoikis-induced death of Schwann cells	Neurosci Lett	444	143-147	2008
Nishio Y, Koda M, Hashimoto M, Kamada T, Koshizuka S, Yoshinaga K, Onodera S, Nishihira J, Okawa A, Yamazaki M	Deletion of macrophage migration inhibitory factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice	Acta Neuropathol	117	321-328	2009
Sakakibara R, Yamazaki M, Mannouji C, Yamaguchi C, Uchiyama T, Ito T, Liu Z, Yamamoto T, Awa Y, Yamanishi T, Hattori T	Urinary retention without tetraparesis as a sequel to spontaneous spinal epidural hematoma	Intern Med	47	655-657	2008

Mannoji C, Yamazaki M, Kamegaya M, Saisu T, Minami S, Takahashi K	Paraparesis caused by rib exostosis in a child with Down syndrome: a case report	Spine	23	E911-E913	2008
Mochizuki M, Aiba A, Hashimoto M, Fujiyoshi T, Yamazaki M	Cervical Myelopathy in Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament	J Neurosurg Spine	10	122-128	2009
Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Takeshita K, Seichi A, Nakamura K, Arimizu J, Fujibayashi S, Hirabayashi S, Hirano T, Iwasaki M, Kaneoka K, Kawaguchi Y, Ijiri K, Maeda T, Matsuyama Y, Mikami Y, Murakami H, Nagashima H, Nagata K, Nakahara S, Nohara Y, Oka S, Sakamoto K, Saruhashi Y, Sasao Y, Shimizu K, Taguchi T, Takahashi M, Tanaka Y, Tani T, Tokuhashi Y, Uchida K, Yamamoto K, Yamazaki M, Yokoyama T, Yoshida M, Nishiwaki Y	Surgical results and related factors for ossification of posterior longitudinal ligament of the thoracic spine: a multi- institutional retrospective study	Spine	33	1034-1041	2008

Aramomi M, Masaki M, Koshizuka S, Kadota R, Okawa A, Koda M, Yamazaki M	Anterior pedicle screw fixation for multilevel cervical corpectomy and spinal fusion: technical note	Acta Neurochir (Wien)	150	572-582	2008
Ogasawara A, Nakajimal A, Nakajimal F, Goto K, Yamazaki M	Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin- induced diabetic rat	Bone	43	832-839	2008
Fujiyoshi T, Yamazaki M, Kawabe J, Endo T, Furuya T, Koda M, Okawa A, Takahashi K, Konishi H	A new concept for making decisions regarding the surgical approach for cervical ossification of the posterior longitudinal ligament: the K-line	Spine	33	E990-E993	2008
Yamazaki M, Someya Y, Aramomi M, Masaki Y, Okawa A, Koda M	Infection-related atlantoaxial subluxation (Grisel syndrome) in an adult with Down syndrome	Spine	33	E156-E160	2008
Yamazaki M, Okawa A, Hashimoto M, Aiba A, Someya Y, Koda M	Abnormal course of the vertebral artery at the craniovertebral junction in patients with Down syndrome visualized by 3- dimensional CT angiography	Neuroradiolog y	50	485-490	2008
Ataka H, Tanno T, Yamazaki M	Posterior instrumented fusion without neural decompression for incomplete neurological deficits following vertebral collapse in the osteoporotic thoracolumbar spine	Euro Spine J	18	69-76	2009

Yamazaki M, Okawa A, Mannoji C, Kadota R, Miyashita T, Koda M	C1 dome-like laminotomy and posterior C1-C2 polyaxial screw-rod fixation for a patient with cervical myelopathy due to retro-odontoid pseudotumor: technical note	J Clin Neurosci	16	99-103	2009
Miyashita T, Yamazaki M, Yamashita T	Wnt-Ryk signaling mediates axon growth inhibition and limits functional recovery after spinal cord injury	J Neurotrauma	(in press)		
Yamazaki M, Okawa A, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Koda M	Surgical simulation of circumferential osteotomy and correction of cervico-thoracic kyphoscoliosis for an irreducible old C6-7 fracture dislocation.	Acta Neurochir	(in press)		
山崎正志	最新原著レビュー：胸椎後縦靱帯骨化症に対する術式別の手術成績，特に後方除圧固定術の適応について	整形外科	59	435-438,	2008
山崎正志	胸椎後縦靱帯骨化症に対する治療方針	マルホ整形外科セミナー放送内容集	188	7-10	2008
小谷俊明，長屋重幸， 園田優，山崎正志， 茂手木博之， 南昌平	脊髓neuro-imagingの進歩：シネMRIを用いた頸髄運動の解析	脊椎脊髓	21	108-114	2008
山崎正志，大河昭彦， 国府田正雄，高橋和久， 梁川範幸	上位頸椎インストゥルメンテーション手術における椎骨動脈の骨外・骨内走行の術前評価，3次元CT血管造影法の有用性	臨整外	43	875-881	2008

山崎正志, 梁川範幸	整形外科疾患に対する最新画像診断「上位頰椎インストゥルメンテーション手術における椎骨動脈走行の術前評価, 3次元CT血管造影法による解析」	関節外科	27 (10月増刊号)	44-51	2008
山崎正志	特集: 頰椎インストゥルメンテーション「環軸椎固定, Magerl法・C1外側塊スクリュー」	関節外科	27	69-80	2008
山崎正志	特集: 整形外科ナビゲーション支援手術「頰椎・胸椎手術における3次元実体模型の有用性, 術前手術シミュレーションおよび術中ナビゲーション」	J MIOS (整形外科最小侵襲手術ジャーナル)	49	25-34	2008
宮下智大, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 高橋和久	頰椎症性神経根症に対する治療	千葉医学	84	61-67	2008
榊原隆次, 山崎正志, 萬納寺誓人, 内山智之, 山口千晴, 服部孝道	四肢麻痺消失後に尿閉が残存した特発性頰髄硬膜外血腫	日脊障医誌	21	80-81	2008
古矢丈雄, 橋本将行, 国府田正雄, 大河昭彦, 山崎正志	ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける骨髄間質細胞(BMSC)移植とRhoキナーゼ阻害薬の併用による治療効果	日脊障医誌	21	106-107	2008
川辺純子, 国府田正雄, 門田領, 大河昭彦, 山崎正志	ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける顆粒球コロニー刺激因子の血管系に対する作用	日脊障医誌	21	112-113	2008
遠藤友規, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 川辺純子, 林浩一, 藤由崇之	三次元画像構築が可能であるフリーソフトの脊椎外科における有用性	日脊障医誌	21	124-125	2008

遠藤友規, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 川辺純子, 林浩一, 藤由崇之	慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) と頸椎症性脊髄症の合併例に対する手術経験	日脊障医誌	21	154-155	2008
林浩一, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 宮下智大, 遠藤友規	頸椎椎弓形成術後に局所後弯が増強し歩行不能となった1例	日脊障医誌	21	152-153	2008
藤由崇之, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 川辺純子, 林浩一	無症状の頸椎後縦靱帯骨化症例の検討	日脊障医誌	21	156-157	2008

Reduction of cystic cavity, promotion of axonal regeneration and sparing, and functional recovery with transplanted bone marrow stromal cell-derived Schwann cells after contusion injury to the adult rat spinal cord

Laboratory investigation

YUKIO SOMEYA, M.D.,¹ MASAO KODA, M.D., Ph.D.,³ MARI DEZAWA, M.D., Ph.D.,⁴
TOMOKO KADOTA, M.D., Ph.D.,² MASAYUKI HASHIMOTO, M.D., Ph.D.,³
TAKAHITO KAMADA, M.D., Ph.D.,¹ YUTAKA NISHIO, M.D., Ph.D.,¹
RYO KADOTA, M.D., Ph.D.,¹ CHIKATO MANNOJI, M.D., Ph.D.,¹
TOMOHIRO MIYASHITA, M.D., Ph.D.,¹ AKIHIKO OKAWA, M.D., Ph.D.,¹
KATSUNORI YOSHINAGA, M.D., Ph.D.,⁵ AND MASASHI YAMAZAKI, M.D., Ph.D.¹

Departments of ¹Orthopaedic Surgery and ²Bioenvironmental Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba; ³Department of Orthopaedic Surgery, Prefectural Togane Hospital, Chiba; ⁴Department of Anatomy and Neurobiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto; and ⁵Chiba Rehabilitation Center, Chiba, Japan

Object. The authors previously reported that Schwann cells (SCs) could be derived from bone marrow stromal cells (BMSCs) in vitro and that they promoted axonal regeneration of completely transected rat spinal cords in vivo. The aim of the present study is to evaluate the efficacy of transplanted BMSC-derived SCs (BMSC-SCs) in a rat model of spinal cord contusion, which is relevant to clinical spinal cord injury.

Methods. Bone marrow stromal cells were cultured as plastic-adherent cells from the bone marrow of GFP-transgenic rats. The BMSC-SCs were derived from BMSCs in vitro with sequential treatment using beta-mercaptoethanol, all-trans-retinoic acid, forskolin, basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, and heparin. Schwann cells were cultured from the sciatic nerve of neonatal, GFP-transgenic rats. Immunocytochemical analysis and the reverse transcriptase-polymerase chain reaction were performed to characterize the BMSC-SCs. For transplantation, contusions with the New York University impactor were delivered at T-9 in 10- to 11-week-old male Wistar rats. Four groups of rats received injections at the injury site 7 days postinjury: the first received BMSC-SCs and matrigel, a second received peripheral SCs and matrigel, a third group received BMSCs and matrigel, and a fourth group received matrigel alone. Histological and immunohistochemical studies, electron microscopy, and functional assessments were performed to evaluate the therapeutic effects of BMSC-SC transplantation.

Results. Immunohistochemical analysis and reverse transcriptase-polymerase chain reaction revealed that BMSC-SCs have characteristics similar to SCs not only in their morphological characteristics but also in their immunocytochemical phenotype and genotype. Histological examination revealed that the area of the cystic cavity was significantly reduced in the BMSC-SC and SC groups compared with the control rats. Immunohistochemical analysis showed that transplanted BMSCs, BMSC-SCs, and SCs all maintained their original phenotypes. The BMSC-SC and SC groups had a larger number of tyrosine hydroxylase-positive fibers than the control group, and the BMSC-SC group had more serotonin-positive fibers than the BMSC or control group. The BMSC-SC group showed significantly better hindlimb functional recovery than in the BMSC and control group. Electron microscopy revealed that transplanted BMSC-SCs existed in association with the host axons.

Conclusions. Based on their findings, the authors concluded that BMSC-SC transplantation reduces the size of the cystic cavity, promotes axonal regeneration and sparing, results in hindlimb functional recovery, and can be a useful tool for spinal cord injury as a substitute for SCs. (DOI: 10.3171/SPINE.2008.9.08135)

KEY WORDS • bone marrow stromal cell • cell transplantation •
hindlimb function • Schwann cell • spinal cord injury

It has been widely believed that a lesioned adult mammalian spinal cord cannot regenerate. Recent advances in stem cell research have enabled us to repair injured spinal cords by means of various kinds of cell therapies, including the use of embryonic stem cells,³³ fetal neural stem cells,³⁶ and adult neural stem cells.¹⁵ Major obstacles to the use of these cells in clinical trials

Abbreviations used in this paper: ANOVA = analysis of variance; BBB = Basso, Beattie, Bresnahan; BDA = biotinylated dextran amine; BMSC = bone marrow stromal cell; BMSC-SC = BMSC-derived Schwann cell; FBS = fetal bovine serum; HSC = hematopoietic stem cell; MEM = minimum essential medium; PBS = phosphate-buffered saline; RT-PCR = reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SC = Schwann cell; SCI = spinal cord injury; SEM = standard error of the mean.