

〔症例〕 脊柱靱帯骨化症に伴う脊髄障害性疼痛に対し 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) が著効した 2 例

佐久間 毅 山崎 正志 国府田 正雄 高橋 宏
加藤 啓 林 浩一 橋本 将行 橋本 光宏
大河 昭彦 高橋 和久

(2010年6月15日受付, 2010年7月1日受理)

要 旨

我々は、圧迫性脊髄症急性増悪例に対して顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF) を用いた神経保護療法 Phase I/IIa 臨床試験を進めている。本試験を施行中に、G-CSF 投与後に脊髄障害性疼痛が軽減した 2 例を経験した。症例 1 は 32 歳男性。T7-10 後縦靱帯骨化が脊髄を圧迫し、障害髄節に一致した側胸部痛と索路症状としての歩行障害が出現した。G-CSF 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を連続 5 日間点滴静注したところ、投与開始翌日から側胸部痛が軽減した。投与 1 ヶ月後に T4-12 後方除圧固定術を施行した。投与後 6 ヶ月経過した時点で側胸部痛の再燃はなく、運動麻痺の改善も良好である。症例 2 は 68 歳男性。T11-12 黄色靱帯骨化に起因する歩行障害と両大腿内側の疼痛を訴えていた。G-CSF 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を連続 5 日間点滴静注したところ、運動麻痺の改善とともに投与開始翌日から疼痛の軽減を認めた。投与 1 ヶ月後に T10-12 椎弓切除術を施行した。大腿内側部痛は投与後 3 ヶ月頃から再燃傾向にあるが、投与後 6 ヶ月の時点においても投与前に比べて軽減した状態にある。本経験から、G-CSF が運動麻痺を改善させる作用以外に、脊髄障害性疼痛を軽減させる効力を有する可能性が示唆された。

Key words: 脊髄障害性疼痛, 異痛症, 顆粒球コロニー刺激因子

I. 諸 言

顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF, 一般名: フィルグラスタム) は血球系に作用する増殖因子であり、顆粒球系細胞の分化・増殖・生存促進などの作用を有する [1]。本邦では、白血球減少症に対する治

療薬として、また末梢血幹細胞移植ドナーに対して、造血幹細胞の末梢血への動員を目的として、すでに臨床使用されている。白血球数を増加させる作用とは別に、G-CSF が損傷脊髄に対して神経保護作用を有することが、基礎研究で明らかにされている [2-4]。

我々は、圧迫性脊髄症急性増悪患者の運動麻痺

千葉大学大学院医学研究院整形外科

Tsuyoshi Sakuma, Masashi Yamazaki, Masao Koda, Hiroshi Takahashi, Kei Kato, Koichi Hayashi, Masayuki Hashimoto, Mitsuhiro Hashimoto, Akihiko Okawa and Kazuhisa Takahashi: Granulocyte-colony stimulating factor reduced neuropathic pain caused by ossified spinal ligaments: report of 2 cases.

Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

Tel. 043-226-2117. Fax. 043-226-2116. E-mail: masashiy@faculty.chiba-u.jp

Received June 15, 2010, Accepted July 1, 2010.

改善を最終的な目標とするG-CSF神経保護療法について、Phase I/IIa臨床試験を計画し、2008年3月に千葉大学医学部附属病院治験審査委員会の承認を得た（承認番号G19040）。第1段階としてG-CSF 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を5日間投与した5例[5]、2段階としてG-CSF 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を5日間投与した12例（投稿中）の解析を行い、全例で運動麻痺の改善が得られ、有害事象の発生もなかった。

本試験を施行中、G-CSF投与後に運動麻痺の改善とともに、脊髄障害性疼痛が軽減した2例を経験した。G-CSF投与による疼痛の軽減は、本試験の評価項目には含まれていない。しかし、G-CSFの今後の臨床使用を検討する上で大きな意味を持つことから、今回、症例提示する。

II. 症 例

症例 1

【患者】32歳男性

【主訴】歩行障害、腹部から両下肢の痺れ、右背部から側胸部にかけての疼痛

【現症】胸椎後縦靭帯骨化（Ossification of posterior longitudinal ligament: OPLL）に伴う脊髄症に対して、4年前に当科でT7-10前方除圧固定術が施行された。術後に脊髄症の改善を認めたが、右背部から側胸部にかけての疼痛が出現した。残存骨化の増大に伴い、1年前ころから歩行障害が再度出現した。症状増悪傾向を認めたため、精査加療目的に当科入院となった。

【合併症、既往歴】特記事項なし。

【入院時現症】T8 髄節高位以下の感覚鈍麻を認めた。両下肢腱反射は亢進しBabinski反射も陽性であった。下肢の筋力は両側膝屈曲がMMT4と低下を認めた。歩行に支持を要し、頻尿を認めた。日本整形外科学会頸髄症治療判定基準（JOAスコア）は、上肢のスコアを除く11点中4点であった。

【画像所見】入院時X線所見ではT7-8、T9-10高位にOPLLを認めた。MRIのT2強調画像では、T7-8、T9-10で脊髄前方からの圧迫を認めた。CTミエログラムでは、T7-8およびT9-10高位で残存したOPLLの増大により脊髄は左前方からの圧迫を受けていた。T9-10高位では、新たに発生した

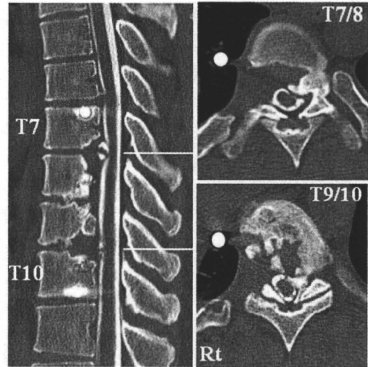


図1 症例1の術前CTミエログラム像

正中矢状断像（左）、T7-8 高位水平断像（右上）、T9-10 高位水平断像（右下）。

T7-8 およびT9-10高位では、前回の手術で残存した後縦靭帯骨化の増大により、脊髄は左前方からの圧迫を受けている。T9-10高位では、新たに発生した黄色靭帯骨化により、後方からの脊髄圧迫も加わっている。

黄色靭帯骨化（Ossification of yellow ligament: OYL）により、後方からの脊髄圧迫も加わっていた（図1）。

【経過】入院当日よりG-CSF 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を連続5日間点滴静注した。投与開始翌日から右側胸部痛はVisual Analog Scale（VAS）で投与前80 mmから、投与後50mmと軽減し、投与終了1週目には、0mmとなり疼痛はほぼ消失した。運動・感覚麻痺、膀胱直腸障害ともに改善を認め、投与終了1ヵ月の時点でJOAスコアは6/11点に改善した。

投与終了後1ヵ月の時点で手術を行った。T4-12後方固定術、T7-10椎弓切除術を行い、T7-8、T9-10については左後方進入により脊髄前方の骨化巣の切除を行った。

術後X線所見では良好な固定位が確認できた。投与終了6ヵ月の時点で右側胸部痛の再燃はなく、JOAスコアは6/11点と運動麻痺の改善も良好である。G-CSF投与期間中および投与後に有害事象の発生はなかった。

症例2

【患者】68歳男性

【主訴】歩行障害、腹部から両下肢の痺れ、両大腿内側部の疼痛

【現症】15年前から階段昇降時に両下肢のつぱり感を自覚、10年前から平地歩行でも転倒しやすくなり、1ヵ月前から独歩困難となった。近医で胸椎OYLに伴う脊髄症の診断を受け、精査加療目的で当科に入院した。

【既往歴】急性心筋梗塞（15年前）

【入院時現症】下肢筋力は、股関節および膝関節屈曲がMMT4と低下していた。T12髄節高位以下に感覚鈍麻と両鼠径部から大腿内側にかけての激しい疼痛を認めた。歩行に支持を要し、頻尿を認めた。JOAスコアは4/11点であった。

【画像所見】入院時X線所見でT11-12高位にOYLを認めた。CTではT9-10高位に小さなOYLとT11-12高位に脊柱管占拠率71.5%の巨大なOYLを認めた（図2）。MRIのT2強調画像では、T11-12で脊髄後方からの著しい圧迫を認め、髄内に高輝度領域が存在した。

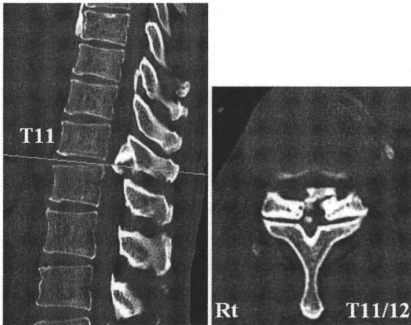


図2 症例2の術前CT像

正中矢状断像（左）、T11-12高位水平断像（右）。

T9-10高位の小さな黄色靱帯骨化とT11-12高位の脊柱管占拠率71.5%の巨大な黄色靱帯骨化を認める。

【経過】入院当日よりG-CSF 10 μ g/kg/日を連続5日間点滴静注した。投与翌日より両大腿内側部痛はVASで投与前90mmに比し、40mmと改善した。運動・感覚麻痺、膀胱直腸障害とも改善を認め、投与終了1ヵ月目のJOAスコアは6.5/11点で

あった。

投与終了1ヵ月の時点で、T10-12椎弓切除術を行った。骨化巣と硬膜の癒着はなく、硬膜を切除することなく骨化を全摘出できた。

術後CTおよびMRIでは、良好な脊髄の除圧が確認できた。両大腿内側部の疼痛は投与終了3ヵ月目頃からVASが60mmと再燃した。しかし、その後は更なる悪化は認めず、投与終了6ヵ月の時点でもVASは60mmを維持しており、投与前に比べて疼痛は軽減した状態にある。JOAスコアは6.5/11点であり、運動麻痺の改善も良好である。G-CSF投与期間中および投与後に有害事象の発生はなかった。

III. 考 察

脊髄障害性疼痛症候群では脊髄障害に起因すると考えられる多彩な痛みが生じる。痛みの種類としては、通常では痛みを起こさない程度の触覚刺激が痛みを引き起こすアロデニアや障害脊髄高位以下の締め付けられるような自発痛など様々である[6]。本症候群は、後縦韧带骨化症などの圧迫性脊髄障害、脊髄空洞症などの脊髄疾患、あるいは脊髄損傷などの外傷に伴って発症し、脊髄障害が疼痛発生の原因と考えられている。しかし、その神経生理学的あるいは薬理学的なメカニズムについては未だ不明な部分が多い。一部の薬剤が奏功する症例も存在するが、ほとんどの場合は治療抵抗性であり、患者の日常生活を極めて悪化させる要因となっている。現在、脊髄障害性疼痛の実態の把握と病態の解明を目的として、厚生労働省の脊髄障害性疼痛症候群研究班が組織されている。

現在我々は、急性脊髄損傷患者、圧迫性脊髄症急性増悪患者の運動麻痺改善を最終的な目標としてG-CSF神経保護療法の臨床試験を進めている。今回我々は、圧迫性脊髄症急性増悪例に対するG-CSF神経保護療法の臨床試験を進めている過程で、運動麻痺の改善とともに脊髄障害性疼痛が軽減した2例を経験した。本経験から、G-CSFが運動麻痺を改善させる作用以外に、脊髄障害性疼痛を軽減させる効力を有する可能性が示唆された。しかしながら、今回の結果だけでは、プラセ

ボ効果の関与も否定できないため、G-CSF投与が有意に脊髄障害性疼痛の改善をもたらしたか否かの評価は容易ではない。今回の経験から、我々は脊髄障害性疼痛症候群の疼痛軽減を目的とするG-CSF療法について、試験デザインをランダム化二重盲検プラセボ対照比較試験とする自主臨床試験を計画したいと考えている。この臨床試験を完遂することにより、G-CSFが脊髄障害性疼痛症候群に対する治療薬としての評価に耐えうるものであるかを明らかにしたい。

また、G-CSF投与後の疼痛軽減の機序についても不明である。現時点では、G-CSFが①炎症性サイトカインの発現を抑制する[7]、②オピオイドを含有する多型核白血球を動員し疼痛を抑制する[7,8]、③G-CSF受容体を介して直接的に障害神経細胞に作用する[7,9,10]、などが推測されるが、今後の研究課題である。

現在、脊髄障害性疼痛症候群に対する有効な治療薬はない。したがって、脊髄障害性疼痛に対するG-CSF療法の安全性、有効性が証明され、臨床の現場での使用が可能となれば、患者にとって大きな福音となると信じている。

SUMMARY

We have undertaken phase I and IIa clinical trials that evaluate the safety of neuroprotective therapy using granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) for patients with rapidly aggravating compression myelopathy. During these trials, we found that neuropathic pain caused by ossified spinal ligaments was reduced after G-CSF administration in two cases. In Case 1 (32-year-old man), ossified posterior longitudinal ligaments compressed the spinal cord at T7-T10 levels, and he complained of intercostal neuralgia and spastic gait. G-CSF at 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ was administered for five consecutive days, and his intercostal neuralgia was reduced one day after the initial G-CSF administration. One month after the administration, he underwent a surgery for T4-T12 posterior decompression with spinal fusion. At six months after the administration, he showed an excellent recovery from myelopathy and no recurrence of intercostal neuralgia. In Case 2 (68-year-old man), bilateral thigh pain and spastic gait developed due to ossified yellow ligaments at T11-T12. He was treated with G-CSF administration at 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ for five consecutive days, and his bilateral thigh

pain reduced one day after the initial administration. One month after the administration, he underwent a T10-T12 laminectomy. From three months after the administration, his thigh pain began to attenuate. However, at six months after the administration, his pain was still improved compared with that before administration. The findings in these present two cases indicate that G-CSF has a therapeutic effect for neuralgic pain in patients with compression myelopathy.

文 献

- 1) Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's no all! Growth Factors 2005; 23, 33-41.
- 2) Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, Yoshinaga K, Okada S, Moriya H, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. Brain Res 2007; 1149: 223-31.
- 3) Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okada S, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. J Neuropathol Exp Neurol 2007; 66: 724-31.
- 4) 国府田正雄, 西尾 豊, 門田 領, 川辺純子, 山崎正志. 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メカニズムの解析. 整形外科 2007; 58: 1464.
- 5) 佐久間 毅, 山崎正志, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋 宏, 林 浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢文雄, 山内友規, 門田 領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾 豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 喜多恒次, 安宅洋美, 吉永勝訓, 村田 淳, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久. 圧迫性脊髄症の急性増悪期に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与による神経保護療法を施行した5症例. 千葉医学 2010; 86: 11-8.
- 6) 柴田政彦. 臨床痛の要因分析: 神経障害性疼痛の発生機序. 理学療法 2009; 26: 890-4.
- 7) Ro LS, Chen SR, Chao PK, Lee YL, Lu KT. The potential application of granulocyte colony stimulating factor therapy on neuropathic pain. Chang Gung Med J 2009; 32: 235-46.
- 8) Brack A, Rittner HL, Machelska H, Beschmann K, Sitte N, Schäfer M, Stein C. Mobilization of opioid-containing polymorphonuclear cells by hematopoietic growth factors and influence on inflammatory pain. Anesthesiology 2004; 100: 149-57.

- 9) Schneider A, Krüger 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, Schäbitz WR. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 2083-98.
- 10) Zhao LR, Navalitloha Y, Singhal S, Mehta J, Piao CS, Guo WP, Kessler JA, Groothuis DR. Hematopoietic growth factors pass through the blood-brain barrier in intact rats. *Exp Neurol* 2007; 204: 569-73.
-

急性脊髄損傷に対して顆粒球コロニー刺激因子投与を施行した 臨床試験例の検討

高橋 宏, 佐久間 毅, 林 浩一, 橋本 光宏, 大河 昭彦, 国府田 正雄, 山崎 正志
千葉大学医学部整形外科

【目的】メチルプレドニゾロンは急性脊髄損傷に対し、現在唯一臨床使用されている薬剤である。しかし近年、その効果を疑問視する報告が散見され、呼吸器、循環器系への副作用も無視しがたいため、代替薬の必要性が急務となっている。顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF) は分子量19.6kDの糖タンパクで造血系細胞の栄養因子の一つであるが、本邦においては既に好中球減少症などの疾患に対し一般に臨床使用されている薬剤である。近年脳梗塞に対する神経保護効果の報告がなされ、我々は急性脊髄損傷に対してもG-CSF投与による神経保護効果が期待できると考え、脊髄損傷モデルにおいてその作用機序を検討してきた。損傷脊髄へのG-CSFの作用としては、投与により動員される骨髄由来細胞が損傷脊髄部に生着する¹⁾、直接的にアポトーシスを抑制する²⁾、オリゴデンドロサイトの細胞死を抑制し、髄鞘を保護する³⁾、炎症性サイトカインの発生を抑制する、血管新生を促進する⁴⁾、と考えられている。これらの根拠から、我々は急性脊髄損傷に対するG-CSF投与臨床試験を院内治験審査委員会に申請し、2008年度よりPhase I、IIa臨床試験を開始した。今回我々はその初期臨床経過例5例について検討した。

【対象】平成20年6月より平成21年6月までに当院で経験しえた急性脊髄損傷患者5例である。本人の自由意思による同意を得た後、G-CSF、一日5μg/kgを連続5日間点滴静注した。本剤過敏症をもつ患者等は除外基準とした。対象の平均年齢は55.8歳、平均経過観察期間は6.6カ月であった。神経学的評価は、American Spinal Injury Association Score (ASIA score)、ASIA Impairment scale (AIS) で評価した。有害事象の評価については、投与後連日、自覚症状の有無を確認し、投与前及び投与後7日目までは連日、それ以降は定期的に採血を施行し、副作用を確認した。

【結果】ASIA Motor Scoreは投与翌日より連日改善を認め、Sensoryも投与翌日より1髄節以上の改善を認めた(表1)。AISは5例中3例で1段階の改善を認めた。採血検査では白血球数(WBC)においてG-CSF投与翌日より、投与前に比し上昇し、投与5日目まで高値を維持した。そして投与6日目すなわち投与終了翌日には減少し、投与前の値に戻った(表2)。CRPは投与により上昇することはなく、その他の採血検査では異常を認めなかった。

Clinical trial of granulocyte colony-stimulating factor on patients with acute spinal cord injury
H. Takahashi, et al.

Key words : spinal cord injury(脊髄損傷), G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子), neuroprotective therapy(神経保護療法)

症例 No.	motor					sensory light touch					sensory pin prick				
	投与前	1日目	7日目	1カ月	最終観察時	投与前	1日目	7日目	1カ月	最終観察時	投与前	1日目	7日目	1カ月	最終観察時
1	53	58	72	78	80	64	64	100	103	104	54	60	82	94	100
2	50	50	50	50	72	94	96	95	93	96	76	80	78	76	88
3	77	83	86	59	60	62	82	112	86	86	62	65	79	86	86
4	59	65	68	71	71	50	50	51	55	55	50	50	51	55	55
5	80	80	82	83	97	77	76	82	87	94	77	76	82	87	94

表1: ASIA scoreの変遷

症例 No.	投与開始後								
	投与前	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	1ヵ月
1	8.6	25.2	21.2	25	26.2	25	11.2	9.7	7.2
2	14.1	27.6	26.4	27.1	24.9	27.3	NA	10.9	5.8
3	12.5	32.4	30.6	27.4	26	21.6	14	NA	5.8
4	10.6	31.5	30.6	35.4	35.8	29.8	16.2	16.2	9.1
5	7.2	38.4	41.6	38.5	33.1	18.7	13.6	10.7	5.6

NA: 記録なし

表2: WBC数 (×10³/μl) の変遷

【考察】G-CSF投与に伴う副作用は軽度なものとして、骨髄造血能亢進に伴う腰部、骨盤部の骨痛、全身倦怠感、発熱、頭痛、不眠、食欲不振、悪心、嘔吐などが報告されているが⁵⁾、いずれも一過性のものであり、休業により2、3日で消失するものである。また、重篤なものとして、稀に脳梗塞、心筋梗塞などの血管病変の悪化や、脾臓破裂などをきたすことがあるという報告があるが⁶⁾、今回我々の経験した症例においては、いずれの副作用も認めなかった。G-CSFは近年、他の様々な疾患に対して使用されている。心筋梗塞においては、動員される末梢血幹細胞により心筋が保護され、また細胞の一部が心筋となり治療効果を有する、また、脳梗塞においては、神経細胞のアポトーシスを抑制する、炎症性サイトカインの発生を抑制す

る、さらに、ALSにおいては動員される末梢血幹細胞により症状の進行を遅らせる可能性がある、との報告があり、いずれの疾患においても臨床試験が開始されている⁷⁻⁹⁾。諸家の臨床試験におけるG-CSFの投与量は報告により異なるが、おおむね一日投与量は5~10 μ g/kg、投与期間は5日前後であった。今回の我々の臨床試験では、次の段階として、一日10 μ g/kg、5日間投与についての検討を計画し、現在一日10 μ g/kg、5日間投与まで臨床試験は進んでおり、今後は、一日10 μ g/kg、10日間投与までの安全性を確認し、Phase IIb臨床試験へと進み、急性脊髄損傷に対するG-CSF投与の有用性を実証したい。

【結語】急性脊髄損傷に対して、G-CSF投与Phase I、IIa臨床試験を開始した。全例で投与後に神経症状の改善を認め、投与期間中及び投与後に有害事象の発生を認めなかった。

【文献】

- 1) Koda M, Nishio Y, Kamada T, et al: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res* 2007; 1149: 223-231
- 2) Nishio Y, Koda M, Kamada T, et al: Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 724-31
- 3) 門田領, 国府田正雄, 西尾豊, 大河昭彦, 山崎正志: 脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子の神経保護作用. *日脊障医誌* 2007; 20: 180-181
- 4) 川辺純子, 国府田正雄, 橋本将行, 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(Granulocyte colony-stimulating Factor: G-CSF)の血管系に対する効果. *日整会誌*2007; 81: S944
- 5) Anderlini P, Przepiorcka D, Seong D, et al: Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) mobilization and blood stem cell apheresis from normal donors and analysis of charge for procedures. *Transfusion* 1996; 36: 590-595
- 6) Becker PS, Wagle M, Matous S, et al: Spontaneous splenic rupture following administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) occurrence in an allogeneic donor of peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997; 3: 45-49
- 7) Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, et al: Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J* 2005; 26: 1838-1845
- 8) Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, et al: Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ* 2006; 174: 927-933
- 9) Martinez HR, Gonzalez-Garza MT, Moreno-Cuevas JE, et al: Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytotherapy* 2009; 11: 26-34

圧迫性脊髄症の急性増悪期に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与による神経保護療法

佐久間 毅, 高橋 宏, 林 浩一, 橋本 光宏, 大河 昭彦, 国府田 正雄*, 山崎 正志
千葉大学大学院医学研究院整形外科, *千葉市立青葉病院整形外科

【緒言】

圧迫性脊髄症はヘルニア、骨棘、靭帯骨化などによる慢性的な脊髄圧迫により緩徐進行性の脊髄障害を来す疾患群である。その病態形成の詳細なメカニズムは現在のところ不明であるが、慢性的な圧迫によっても急性脊髄損傷と同様に神経細胞・グリア細胞の細胞死が惹起され、これによって脊髄の機能障害が起こると考えられている。

圧迫性脊髄症の患者において、時に比較的軽い外傷を契機に、または誘因無く急速な症状の増悪をみる事がある。こうした脊髄症の急性増悪は脊髄内部での神経細胞・グリア細胞の細胞死が関与していると考えられており、放置すると難治性となりうる。圧迫性脊髄症のおよそ5%に急速な症状の増悪を認め、早期に手術を行う事で良好な改善を認めるのに対し、保存療法群では悪化傾向を認める。

顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF、一般名: フィルグラスチム)は血球系に作用する増殖因子であり、顆粒球系細胞の分化・増殖・生存促進などの作用を有する。白血球減少症に対して、また末梢血幹細胞移植ドナーに対して、造血幹細胞の末梢血への動員のための投与が保険適当となっている。中枢神経系においては、骨髄細胞を脳・脊髄中へ動員する作用や、脳卒中モデルに対する神経保護作用などが報告されており、海外では脳梗塞に対する臨床研究が報告されている。これらの報告から、脊髄損傷に対してもG-CSFが治療効果を発揮しうる可能性が想定されたため、われわれはG-CSFの脊髄損傷に対する有効性およびその作用メカニズムについて検討を進めてきた。現在までに得られたデータから、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、直接的に神経細胞死を抑制する、Oligodendrocyteの細胞死を抑制し髄鞘を保護する、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)発現を抑制する、血管新生を促進する、などがG-CSFの脊髄損傷に対する作用機序として想定される[1-5]。これらのデータから、G-CSFが圧迫性脊髄症の急性増悪期においても神経保護作用を持つ可能性が示唆される。

以上より、圧迫性脊髄症の急性増悪例に対する治療薬としてのG-CSFの安全性・有効性を証明するため臨床研究を計画するに至った。われわれはG-CSF神経保護療法の安全性確認を主目的とするphase I・IIa臨床試

験を計画し、2008年3月に千葉大学医学部附属病院治療審査委員会の承認を得た。本試験は2008年6月に開始となったが、今回は、第1段階のG-CSF 5 μ g/kg/日の投与例5例について、その臨床経過を報告する。尚、本試験は安全性の確認が主目的のためコントロールは設定しなかった。

【方法】

対象は20歳から75歳の圧迫性脊髄症急性増悪患者(直近の1ヵ月間に日本整形外科学会頸髄症治療判定基準にて2点以上の悪化を認めたもの)とした。但し安全性の配慮のため、本剤の成分に過敏症の患者、白血病などの造血系悪性疾患の既往をもつ患者、過去5年以内の悪性疾患の既往をもつ患者、心筋梗塞・狭心症の既往をもつ患者、血栓・塞栓症の既往またはその傾向をもつ患者、脾腫のある患者、意識障害を有する患者、妊婦、脳梗塞などの神経症状評価に影響を及ぼしうる神経疾患を併発している・既往をもつ患者については除外した。以上の条件を満たす患者に十分な説明を行った後に、本人の自由意志による文書同意が得られた患者を試験の対象とした。

G-CSFは5 μ g/kg/日を連続5日間点滴静注とした。試験デザインはオープンラベル用量漸増試験とし、コントロールは設定しなかった。有害事象の程度は副作用評価基準グレード1~4にて評価した。運動・感覚麻痺の推移を理学所見にて確認、American Spinal Injury Association (ASIA) score (運動: 0~100点、触覚: 0~112点、痛覚: 0~112点)、ASIA impairment scale (AIS) (A: 完全麻痺、B: 感覚のみ残存、C: 運動不全麻痺 MMT3未滿、D: 運動不全麻痺 MMT3以上、E: 正常)、日本整形外科学会頸髄症治療判定基準 (JOA score) (0~17点、胸髄症では0~11点)で評価した。加えて、血液所見の評価を行った。

【結果】

5例に対してG-CSFの投与が行われた。全例が脊柱靭帯骨化症に伴う脊髄症患者であった(表1)。神経所見については、G-CSF投与後に、程度の差はあるものの全例で運動・感覚麻痺の改善が得られた(表2)。末梢血中の白血球数は投与開始後1日目(投与翌日)には15200以上に上昇し、投与期間中は15200~43200の値が維持され、投与開始後7日目(最終投与の3日後)には、ほぼ投与前の値に戻った(表3)。白血球数が最高値に達したのは、症例2および4で投与開始後1日目、症例3で2日目、症例1で3日目、症例5で4日目であった(表3)。白血球分画では顆粒球の選択的な増加であり、単核球やリンパ球の増加は認めなかった(表4)。赤血球および血小板数の増加は認めず、その他の血液検査項目でも、明らかな異常所見は認めなかった。G-CSF投与期間中および投与後に、G-CSF投与に伴う有害事象の発生はなかった。

Neuroprotective therapy using granulocyte-colony stimulating factor for five patients with rapidly aggravating compression myelopathy

T. Sakuma, et al.

Key words: 脊髄症, 顆粒球コロニー刺激因子, 神経保護療法

【考察】

今回施行した臨床試験はphase I・IIaであり、圧迫性脊髄症の急性増悪例に対するG-CSF神経保護療法についての安全性確認を主目的としたものである。その第1段階として、圧迫性脊髄症の急性増悪患者5例に対してG-CSF 5 μ g/kg/日を5日間点滴静注投与した。投与期間中および投与後に有害事象の発生はなく、今回の結果からはG-CSF神経保護療法の安全性に問題はないと考えられた。今後は第2段階としてG-CSF投与量を10 μ g/kg/日 \times 5日間と増量した臨床試験を行い、これらのデータと比較検討する予定である。

神経所見については、G-CSF投与後に、程度の差はあるものの全例で運動および感覚麻痺の改善が得られた。今回はコントロールを設定していないため結論できないが、G-CSFが圧迫性脊髄症の急性増悪期においても神経保護作用を持つ可能性が十分に期待される。現在、圧迫性頸髄症急性増悪例に対する有効な治療薬はない。したがって、G-CSF神経保護療法の有効性、安全性が証明され、臨床の現場での使用が可能となれば、患者にとって大きな福音となる。

臨床試験phase I・IIaでG-CSF投与の安全性が確認できれば、次の段階として、G-CSFの治療効果の評価を主目的とする臨床試験phase IIbに進む計画である。phase IIbでは試験デザインをランダム化二重盲検プラセボ対照比較試験とし、G-CSF 10 μ g/kg/日を連続5日間点滴静注する治療群と、生理食塩水を同一条件で点滴静注するコントロール群を無作為に設定する計画を立てている。今回の試験では、G-CSF投与後に全例で何らかの神経症状の改善が得られたが、G-CSF投与が有意に神経症状の改善をもたらしたか否かの評価は容易ではない。臨床試験phase IIbを完遂することにより、G-CSFが圧迫性脊髄症の急性増悪例に対する治療薬としての評価に耐えうるものであるかを明らかにしたい。

【文献】

1. Koda M, Okawa A, Yamazaki M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res* 2007; 1149: 223-31.
2. 門田領, 国府田正雄, 山崎正志, 他. 脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子の神経保護作用. *日脊障医誌*2007; 20: 180-1.
3. 川辺純子, 国府田正雄, 山崎正志, 他. ラット脊髄圧挫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*2008; 21: 112-3.
4. 国府田正雄, 西尾豊, 山崎正志, 他. 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メカニズムの解析. *整形外科*2007; 58: 1464.
5. Nishio Y, Koda M, Yamazaki M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 724-31.

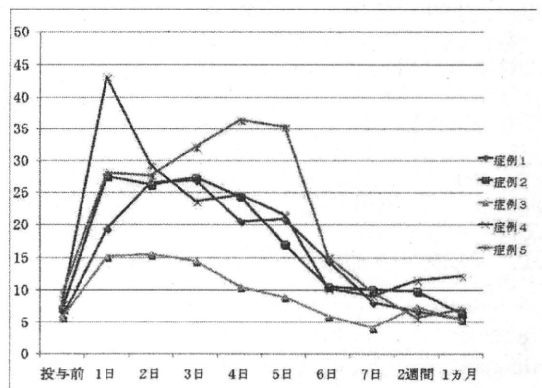
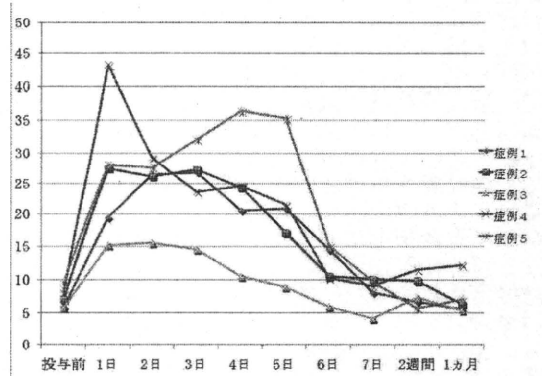
表1. 顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与症例

症例No	年齢(歳)	性別	原疾患	脊髄最大圧迫高位	身長(cm)	体重(kg)	G-CSF投与後観察期間
1	61	男	胸椎黄色靭帯骨化症	T10/11	168	85.5	6ヵ月
2	68	男	胸椎後縦靭帯骨化症	T4/5	166	60.8	6ヵ月
3	51	男	胸椎後縦靭帯骨化症	T1/2	161	86	3ヵ月
4	37	男	胸椎後縦靭帯骨化症	T3/4	195	150	3ヵ月
5	35	男	頸胸椎後縦靭帯骨化症	C6/7	173	110	3ヵ月

表2. G-CSF投与後の神経症状の変化

症例No	JOA score		AIS		ASIA score								
	投与前	最終観察時	投与前	最終観察時	運動			感覚			痛覚		
1	1/11	4/11	C	C	70	80	80	66	78	78	66	78	78
2	3/11	8/11	C	E	94	98	100	83	64	108	63	64	102
3	3.5/11	11/11	C	E	91	98	100	78	86	112	78	96	112
4	2/11	6.5/11	C	C	76	87	92	86	86	100	86	86	100
5	2.5/17	4.5/17	C	C	64	74	75	68	72	72	68	72	72

JOA score: 日本整形外科学会頸髄症治療判定基準
 AIS: American Spinal Injury Association (ASIA) impairment scale
 ASIA score: American Spinal Injury Association score



Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) exerts neuroprotective effects via promoting angiogenesis after spinal cord injury in rats

Junko Kawabe¹, MD, PhD, Masao Koda², MD, PhD, Masayuki Hashimoto¹, MD, PhD, Takayuki Fujiyoshi¹, MD, PhD, Takeo Furuya¹, MD, PhD, Tomonori Endo¹, MD, PhD, Akihiko Okawa¹, MD, PhD, Masashi Yamazaki¹, MD, PhD,

¹Department of Orthopaedic Surgery, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana-Cho, Chuo-Ku, Chiba 260-8677, Japan

²Department of Orthopaedic Surgery, Chiba Aoba Municipal Hospital, 1273-2, Aoba-Cho, Chuo-Ku, Chiba 260-0852, Japan

Correspondence: Masao Koda, Department of Orthopaedic Surgery, Chiba Aoba Municipal Hospital, 1273-2, Aoba-Cho, Chuo-Ku, Chiba 260-0852, Japan

Tel: 81-43-227-1131, Fax: 81-43-227-1961

e-mail: masaomst@yahoo.co.jp

ABSTRACT

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has neuroprotective effects on the central nervous system. We previously demonstrated that G-CSF also exerts neuroprotective effects in experimental spinal cord injury (SCI) by enhancing migration of bone marrow-derived cells into the damaged spinal cord, increasing glial differentiation of bone marrow-derived cells, enhancing anti-apoptotic effects on both neurons and oligodendrocytes, and by reducing demyelination and expression of inflammatory cytokines. Because the degree of angiogenesis in the sub-acute phase after SCI correlates with regenerative responses, it is possible that G-CSF's neuroprotective effects after SCI are due to enhancement of angiogenesis. Our aim was to assess the effects of G-CSF on the vascular system after SCI. We utilized the contusive SCI rat model and randomly divided subjects between a G-CSF-treated group and a control group. Integrity of the blood spinal cord barrier was evaluated by measuring the degree of edema of the cord and the volume of extravasation. For histological evaluation, cryosections were immunostained with anti-von Willebrand factor and the number of vessels was counted to assess revascularization. Real time PCR was performed to assess expression of angiogenic cytokines, and recovery of motor function was assessed with function tests.

In the G-CSF treated rats, the total number of vessels was significantly larger and expression of angiogenic cytokines was significantly higher than those in the control group. The G-CSF-treated group showed significant recovery of hind limb function compared to that of the control group. These results suggest that G-CSF exerts neuroprotective effects via promotion of angiogenesis after SCI.

INTRODUCTION

There are two mechanisms of damage to the spinal cord after acute SCI: the initial mechanical injury followed by secondary injury. Various factors trigger the secondary damage that exacerbates neurologic deficit. Those factors include altered ion balance, lipid peroxidation, glutamate release, inflammatory processes, disturbance of pulsatile hydrodynamics and ischemia³³. Acute SCI causes immediate mechanical damage to the microvasculature of the cord followed by a secondary injury to the vessels; this combination produces spinal cord ischemia which can be progressive^{17, 29}. Thus, angiogenesis is critically important to reduce secondary damage to the spinal cord vasculature^{4, 17}.

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a 19.6 kDa glycoprotein that was identified initially as a serum activity that induced differentiation of a murine myelomonocytic leukemic cell line³¹. It is widely known as a growth factor for hematopoietic cells that promotes survival, proliferation and differentiation of cells of the

neutrophil lineage²³. It is used clinically in the treatment of neutropenia following anticancer therapy, and in the mobilization of peripheral blood-derived hematopoietic stem cells for transplantation¹¹.

Recently, the neuroprotective effects of G-CSF on the central nervous system (CNS) was reported^{18, 24, 25, 34}. As we previously documented, G-CSF also exerts neuroprotective effects on experimental SCI (SCI). G-CSF promotes the migration of bone marrow-derived cells into the damaged spinal cord and glial differentiation of bone marrow-derived cells¹³. G-CSF has neuroprotective activity via anti-apoptotic effects on both neurons²⁰ and oligodendrocytes, and it attenuates inflammatory cytokine expression and demyelination.

In addition, G-CSF possesses angiogenic effects in various pathological models. Administration of G-CSF has been shown to accelerate angiogenesis in animal models of limb and myocardial ischemia¹⁹. As for the CNS, several studies have documented angiogenic effects of G-CSF in cerebral ischemia^{16, 18, 21}. Lee *et al.* reported that the

vascular surface area, vascular branch points, vascular length, the number of BrdU⁺ endothelial cells, and eNOS/angiopoietin-2 expression were all significantly increased in G-CSF-treated rats in the focal cerebral ischemia model¹⁶. Ohki *et al.* found that concomitant with an increase in circulating neutrophils, G-CSF increased plasma VEGF from neutrophils *in vivo*. Furthermore, blockade of the VEGF pathway abrogated G-CSF-induced angiogenesis, suggesting that G-CSF-induced angiogenesis is VEGF-dependent in the murine ischemic hindlimb model²¹. We speculated that G-CSF might possess angiogenic potential in SCI. The degree of angiogenesis during the sub-acute phase after SCI correlates with regenerative responses¹⁷ and the newly formed vascular bridge might provide scaffolding to hasten axonal regeneration across the injury site⁴. Thus, angiogenesis might contribute to the regenerative response of neural tissue and enhance recovery of locomotor function after injury. Thus, we hypothesized that the neuroprotective effects of G-CSF after SCI were due to its enhancement of angiogenesis.

In this study, our aim was to assess the effects of G-CSF on both the vascular system and injury-induced edema, as well as maintenance of the integrity of the blood spinal cord barrier (BSB) and angiogenesis after SCI and its possible contribution to functional

recovery.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

All animals were treated and cared for in accordance with the Chiba University School of Medicine guidelines pertaining to the treatment of experimental animals. Sixty-three adult female Sprague-Dawley rats (10-12 weeks old; weight 200 – 240 g; Japan SLC, Inc. Hamamatsu, Japan) were used for the current experiments. Anesthesia was induced with inhalation of 5% halothane in 0.5 L/min oxygen and maintained with 1.2 - 1.4% halothane in 0.5 L/min oxygen. Laminectomy was carried out at the Th8/9 level and the dural tube was exposed without scratching the dura mater. Animals were positioned on the stereotaxic apparatus, vertebral bodies of Th7 and Th10 were grasped by two adjustable forceps to fix the spine. We induced moderate contusive SCI using the model IH-0400 impactor (Precision Systems and Instrumentation, Lexington, KY, 200Kdyne). Rats were left in the cages, warmed under a heat lamp, until they were awake. Upon awakening, rats were evaluated neurologically and were monitored for food and water uptake and urine output. Antibiotic was added prophylactically to drinking water. Rats were randomly divided into two groups, the G-CSF-treated group and the control group. We

administered recombinant human G-CSF (15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$; kindly provided by Kirin Brewery Co., Ltd, Pharmaceutical Division, Tokyo, Japan) to the treated group and the same volume of normal saline to the control group via tail vein one hour after injury, and successively for five days. The dose of G-CSF was determined by the basis of our preliminary experimental data. We performed preliminary experiments in other dose regimen (5, 15 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ for 5 days after injury) for contusive SCI. Those preliminary data suggested that 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ G-CSF exerts most strong effects. Thus we employed 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ dose regimen.

Integrity of Blood Spinal cord Barrier (BSB)

Integrity of the BSB after injury was evaluated by measuring the extent of edema of the cord after injury and volume of extravasation. In general, edema after SCI peaks at 3-5 days after injury. Thus we evaluated the G-CSF's effect on edema and BSB 3 days after SCI.

To assess the effect of G-CSF on edema following SCI, the water content of the spinal cord was measured using the wet-dry method (n=4 in each group). A ten mm segment of spinal cord including the lesion epicenter was removed three days after injury. We gently removed the hematoma or cerebrospinal fluid adherent to the spinal cord with tissue paper,

and weighed the fragment with a precision scale (accurate to 0.1mg) immediately to obtain the wet weight. Then, the samples were freeze-dried (FDU-810, Tokyo Rikakikai Co., LTD.) for 24 hours and weighed again, giving the dry weight. The water content of the spinal cord after injury was calculated by the following formula: percent spinal cord water content (%) = (wet weight - dry weight)/ wet weight $\times 100$ ^{8,32}.

To evaluate the effects of G-CSF on BSB damage after SCI, we carried out quantitative detection of extravasated fluorescent dye (n=4 in each group)²⁶. We used sodium fluorescein (Sigma, Taufkirchen, Germany) at a concentration of six mg/mL in PBS. Sodium fluorescein (MW 376.3) is not able to permeate normal BSB. Two-hundred μL of sodium fluorescein solution was injected via the tail vein three days after injury and allowed to circulate for 1.5 hr. Then, rats were perfused with saline to remove the sodium fluorescein from the vascular bed. Five mm segments of spinal cord including the lesion epicenter were removed and frozen quickly in liquid nitrogen. After homogenization in 100 μL of 0.5 M borate buffer, the sample was centrifuged at 3000 r/min for 15 min at 4°C. Ethanol (1.2 mL) was added to the supernatant to precipitate the protein. The solution was centrifuged at 13000 r/min for 20 min at 4°C and then 100 μL of the supernatant was applied to the pellet and the

fluorescence was measured in a fluorescent plate reader at a wavelength of 485 nm.

Assessment of revascularization

For histological evaluation, animals were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in PBS under deep pentobarbital anesthesia one and two weeks after surgery. The spinal cord, including the lesion epicenter, was removed and fixed in 4% paraformaldehyde overnight. After dehydration in 20% sucrose in PBS for 48 hrs, the samples were embedded in O.C.T. compound (Tissue-Tek; Sakura Finetech, Tokyo, Japan) and frozen on ice. Axial sections (16 μ m) were made on a cryostat at the lesion epicenter and two, four and six mm rostral and caudal from the epicenter and mounted on poly-L-lysine-coated glass slides (Matsunami, Tokyo, Japan) and dried for 48 hr in room air.

To evaluate angiogenesis after SCI, cryosections were immunostained with anti-von Willebrand Factor (VWF, 1:400, polyclonal rabbit anti-human, DakoCytomation, Denmark) as a marker for vascular endothelial cells (n=5 in each group). In the paper of Casella et al⁴, angiogenesis was evaluated by basal lamina marker Laminin at various time points after SCI, and they described that the angiogenetic response after contusive SCI peaks 1 week after the injury and diminishes thereafter. Kitamura et al¹² evaluated the

angiogenesis by immunohistochemistry for endothelial marker RECA-1 one week after contusive SCI. According to those previous papers, we employed one week after injury as the time point to evaluate the angiogenesis by immunohistochemistry for endothelial marker VWF. The sections were reacted with primary antibody overnight at 4 °C, and after three washes with PBS, reacted with Alexa 488-labeled anti-rabbit IgG antibody for 30 min at room temperature. The stained sections were then washed and covered with mounting medium. The positive signals were observed with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope. The number of vessels (diameter > 20 μ m) was counted in the lateral white matter (LWM), the ventral gray matter (VGM) and the cortico spinal tract (CST) to compare revascularization between two groups. All the quantitative histological evaluations were conducted by testers blinded to experimental groups.

Expression of angiogenic cytokines

Gene expression analysis of angiogenic cytokines was performed 12 hr after injury (n=4 in each group). In the preliminary experiments, there is no significant difference in expression of several angiogenic cytokines between the G-CSF and control rats at the other time points. Thus we chose the time point 12h after SCI for angiogenic cytokine expression

analysis. Animals were anesthetized deeply by intra-peritoneal injection of pentobarbital. Two segments of spinal cord were removed, including the lesion epicenter, and quickly frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C until use. Total RNA was extracted from the lesion segment of the spinal cord tissue using TRIzol reagent (Gibco Life Technologies, Rockville, MD) according to the manufacturer's protocol. Starting with 2.5 μg of total RNA, the samples underwent reverse transcription using the Superscript II RT preamplification System (Gibco Life Technologies) with an oligo (dT) primer. Real time PCR was used to assess expression of the following angiogenic cytokines: vascular endothelial growth factor (*VEGF*), angiopoietin-1 (*Ang1*), hepatocyte growth factor (*HGF*) and fibroblast growth factor 2 (*FGF2*). PCR was performed with 2.5 μL of cDNA in a 50 μL reaction mixture containing 25 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix and PCR primers set (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, *VEGF*: Rn00582935, *Ang1*: Rn585552, *HGF*: Rn566673, *FGF2*:Rn00570809). The PCR analysis was performed using an ABI prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems, Warrington, U.K.). All samples were run in duplicate, and the average values of the threshold cycle (Ct) were used for quantification. Ct values of the target genes were normalized to Ct values of endogenous

18S ribosomal RNA, and compared with a calibrator using the $\bullet\bullet$ Ct method and converted to logarithmic values.

Assessment of locomotor function

We assessed the recovery of motor function weekly according to the 21-point Basso, Beattie, Bresnahan locomotor scale² from one to six weeks after injury in both groups ($n = 11$ in the G-CSF treated group, and $n = 8$ in the control group). In another subset of rats treated the same as above ($n = 5$ in the G-CSF treated group, and $n = 5$ in the control group), the inclined plane test was performed six and ten weeks after injury as previously described²². For the inclined plane test, the highest degree of inclination was defined as being that at which the animal could maintain its position for five sec on two separate trials. All behavioral evaluations were conducted by testers blinded to experimental groups.

Statistical analysis

The water content, extravasation study, the number of neovasculatures, expression of angiogenic cytokines and inclined plane test were subjected to the Student's t-test. Motor function scores were subjected to Repeated Measures ANOVA followed by post hoc test using Student's t-test. Data are presented as mean values \pm S.E. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

G-CSF does not aggravate edema formation and permeability of vessels after SCI

The water contents of injured spinal cords were measured in order to estimate the effects of G-CSF on the extent of damage to the blood-spinal cord barrier (BSB), which leads to edema formation and results in aggravation of secondary injury. Water content in the G-CSF-treated rats was $74.5 \pm 0.5\%$ and did not significantly differ from the control group $76.7 \pm 6.1\%$ ($p = 0.75$) (Fig. 1A). We also injected sodium fluorescein solution via the tail vein and measured absorbance of extravasated fluorescein. In the G-CSF-treated rats, extravasation was $5.74 \pm 1.73 (\times 10^{-4})$ absorbance/mg and that in control rats was $9.34 \pm 2.55 (\times 10^{-4})$ absorbance/mg. There was no significant difference between the two groups ($p = 0.29$) (Fig. 1B).

G-CSF enhances angiogenesis after SCI

Spinal cord vessels were immunostained for the endothelial marker von Willebrand Factor (vWF) one week after injury. We defined those vessels with diameters $> 20 \mu\text{m}$ as meaningful neovasculature^{4, 12} and counted the number of vessels in three different areas of the spinal cord (lateral white matter (LWM), ventral gray matter (VGM) and cortico spinal tract (CST)) in axial cryosections at two,

four and six mm caudal and rostral to the epicenter. In both groups, angiogenesis occurred more vigorously in VGM and CST than that in LWM (Fig. 2J). In the G-CSF-treated rats, the total number of vessels in the three parts was larger than that in the control group. In LWM, the number of vessels in the G-CSF group was significantly larger than that in the control group at four mm rostral and six mm caudal to the epicenter ($p < 0.05$) (Fig. 2. A, B, C) and in VGM there were significant differences between the number of vessels in the G-CSF group and that in the control group at four mm and six mm rostral and caudal to the epicenter ($p < 0.01$) (Fig 2. D, E, F). In CST, there was no significant difference between the groups in any of the sections (Fig. 2 I). However, the total number of each areas' vessels in the G-CSF group were larger than that in the control group (Fig. 2 J).

G-CSF boosts mRNA expression of angiogenic cytokines after SCI

Real time PCR was performed to detect expression of angiogenic cytokine genes, including vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin1 (*Ang1*), hepatocyte growth factor (*HGF*) and fibroblast growth factor2 (*FGF2*). The samples of cDNA were generated by reverse transcription from 10 mm segments from the injury site (12 hr after injury). Expression of cytokines' mRNAs was

compared to sham or control group and assessed by relative quantitative analysis. Expression of each angiogenic cytokines' mRNA increased in the G-CSF group. Especially, expression of *VEGF*, *HGF* and *FGF2* was significantly higher in the G-CSF group compared to the sham group ($p < 0.01$) (Fig. 3).

G-CSF promotes functional recovery after SCI

The recovery of motor function was assessed by using the Basso, Beattie, Bresnahan locomotor test² which ranges in values from zero to 21. All rats had a score of 21 prior to surgery, and the score dropped to 0 immediately after SCI. The G-CSF-treated group exhibited significantly higher locomotor scores four weeks after injury compared with the control group. The average score six weeks after injury was 12 ± 0.8 in the G-CSF group, which indicates frequent to consistent plantar weight support and occasional forelimb-hindlimb coordination, whereas the score was 8.6 ± 0.8 in the control group, which indicates plantar placement of the paw with weight support in stance only or occasional, frequent, or consistent weight supported dorsal stepping and no plantar stepping ($p < 0.01$) (Fig. 4 A). In addition, we assessed motor function of hindlimbs by using the inclined plane. The inclined plane test revealed that rats from the G-CSF group could stand on the plane at a

significantly steeper angle than the control group ten weeks after SCI. The average maximum angles ten weeks after injury were 50 ± 2.7 degrees in the G-CSF group and 31.7 ± 4.4 degrees in the control group ($p < 0.01$) (Fig4-B). There was no significant difference in results of inclined plane test between both groups six weeks after injury (not shown).

DISCUSSION

The data presented here show the beneficial effects of G-CSF on vascular systems after SCI. G-CSF significantly promoted angiogenesis in both the white and gray matter of the cord after injury. These results agree with other papers which reported the effects of G-CSF on the vascular system after cerebral ischemia^{16, 18}.

In our preliminary experiments, immunohistochemistry revealed that G-CSF receptors were rarely expressed by endothelial cells (not shown). Ohki *et al.* demonstrated that the angiogenesis-promoting effect of G-CSF is partly mediated by enhancement of mobilization of mature hematopoietic cells, specifically neutrophils and immature/mature endothelial cells and they showed that G-CSF stimulation significantly augments VEGF secretion from neutrophils *in vitro* and promoted angiogenesis in murine ischemic hindlimb models²¹. Thus, G-CSF might exert

its angiogenic effect indirectly via the up-regulation of angiogenic cytokines. To elucidate the effect of G-CSF on angiogenic cytokines, we carried out real time PCR to assess the expression of angiogenic cytokine genes, *VEGF*, *ANG1*, *HGF* and *FGF2*. Expression of *VEGF*, *HGF* and *FGF2* was significantly higher in the G-CSF-treated group than that in the sham-operated group.

VEGF is a potent stimulator of angiogenesis and affects blood vessel permeability¹. It was reported that topical application of VEGF after transient cerebral artery occlusion significantly reduced ischemic brain damage, which was considered a protective effect involving angiogenesis of ischemic areas¹⁰. In addition, recent studies reported that VEGF might exert a direct neuroprotective effect in hypoxic ischemic injury. Ding Xin-min *et al.* documented that VEGF has direct neuroprotective effects on rat spinal cord neurons in hypoxia *in vitro*⁷. On the other hand, there are some reports which found negative effects of VEGF on the CNS. Benton reported that intraparenchymal application of VEGF might exacerbate SCI, likely through its effect on vessel permeability³. This discrepancy might be caused by general differences between the experimental models and / or unique microenvironments within the organs. Originally, VEGF was described as a vascular permeability factor²⁶. Therefore, Benton's

report does not contradict our conclusion. In the present study, we measured water content of the spinal cord and the degree of extravasation. There were no significant differences between the two groups. In other words, G-CSF promoted angiogenesis after SCI without aggravation of neovasculature hyper-permeability. One can ask why vessel permeability and edema were not aggravated despite the increase of VEGF mRNA expression in the G-CSF-treated group? One possible explanation is the effects of other angiogenic cytokines.

As for HGF, recent studies have revealed that HGF administration enhances angiogenesis, improves microcirculation and inhibits the destruction of the blood-brain barrier (BBB)⁵. Kitamura *et al.* documented that administration of HGF using a replication-incompetent herpes simplex virus-1 (HSV-1) vector significantly promoted survival of neurons and oligodendrocytes, angiogenesis, axonal regrowth, and functional recovery after SCI¹². FGF2, produced primarily by astrocytes, has been implicated in a multitude of physiological and pathological processes, including limb development, angiogenesis, wound healing, and tumor growth. In addition, FGF2 has also been found to decrease the permeability of the BBB *in vitro*⁹. Langford *et al.* documented that FGF2 is a prominent candidate to preserve BBB integrity¹⁵. Because

real time PCR showed that expression of *HGF* and *FGF2* after injury was significantly up-regulated in the G-CSF group, it is possible that VEGF-induced hyper-permeability of vessels might be negated by up-regulated *HGF* and *FGF2*.

Following trauma, angiogenesis is essential for the healing process and tissue regeneration outside the CNS. Angiogenic and anti-angiogenic therapies have each demonstrated functional efficacy in animal models after CNS insult, raising the question of whether angiogenesis is beneficial or detrimental to neurologic outcomes after SCI³⁰.³⁵ Loy *et al.* reported that three to seven days after SCI, angiogenesis diminished cystic cavity formation and that fiber outgrowth was associated with new blood vessels by day 14¹⁷. Widenfalk *et al.* asserted the importance of angiogenesis for functional recovery and wound healing in SCI³³. Angiogenesis might play an important role in reducing secondary damage. Furthermore, in future trials of combination therapy with cell transplantation, angiogenesis will be a critical factor for forming a scaffold within the spinal cord.

There are several possible limitations of the present study. The precise link between angiogenesis and functional recovery is still unclear. As described above, it is widely accepted that angiogenesis is necessary for wound healing process. How

angiogenesis itself promotes tissue restoration of damaged spinal cord remains to be clarified. How angiogenic cytokine up-regulation involves to spinal cord restoration and functional recovery is also unknown. There is a possibility that some kinds of angiogenic cytokine directly exert neurotrophic effects in addition to the promotion of angiogenesis. Further exploration is needed to answer those inquiries.

In conclusion, G-CSF promotes up-regulation of expression of several angiogenic cytokines and angiogenesis, resulting in promotion of hindlimb functional recovery.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by cervical spine research society research grant and 21st century development grants (regenerative therapies).

REFERENCES

- [1] Augustin HG: Antiangiogenic tumour therapy: will it work? **Trends Pharmacol Sci** **19**:216-22, 1998
- [2] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J. Neurotrauma** **12**:1-21, 1995
- [3] Benton RL, Whittemore SR: VEGF165 therapy exacerbates secondary damage

following spinal cord injury. **Neurochem Res** **28**:1693-703, 2003

[4] Casella GT, Marcillo A, Bunge MB, Wood PM: New vascular tissue rapidly replaces neural parenchyma and vessels destroyed by a contusion injury to the rat spinal cord. **Exp Neurol** **173**:63-76, 2002

[5] Date I, Takagi N, Takagi K, Kago T, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S: Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced learning dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun** **319**:1152-8, 2004

[6] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell** **87**:1161-9, 1996

[7] Ding XM, Mao BY, Jiang S, Li SF, Deng YL: Neuroprotective effect of exogenous vascular endothelial growth factor on rat spinal cord neurons *in vitro* hypoxia. **Chin Med J (Engl)** **118**:1644-50, 2005

[8] Gibson CL, Jones NC, Prior MJW, Bath PMW, Murphy SP: G-CSF suppresses edema formation and reduces interleukin-1 α expression after cerebral ischemia in mice. **J Neuropathol Exp Neurol** **64**:763-769, 2005

[9] el Hafny B, Bourre JM, Roux F: Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic

acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. **J Cell Physiol** **167**:451-60, 1996

[10] Hayashi T, Abe K, Itoyama Y: Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab** **18**:887-95. (1998)

[11] Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP: Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. **J Cell Mol Med** **9**:37-50, 2005

[12] Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H: Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. **J Neurosci Res** **85**:2332-42, 2007

[13] Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, Yoshinaga K, Okada S, Moriya H, Yamazaki M: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. **Brain Res** **1149**:223-31, 2007

[14] Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A, Mochizuki H, Mizuno Y, Urabe T: Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal