

1-4-15

ラット脊髄圧挫損傷慢性期における細胞外マトリックス分解促進によるグリア瘢痕抑制効果

川辺 純子¹ 国府田 正雄² 橋本 将行² 藤由 崇之¹
林 浩一¹ 遠藤 友規¹ 古矢 文雄¹ 大河 昭彦¹
山崎 志志¹ 高橋 和久¹

【目的】脊髄損傷慢性期では反応性アストロサイトがグリア瘢痕を形成し、軸索伸張を物理的にブロックする他、損傷後長期にわたってコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が分泌され、化学的にも軸索伸張阻害が働く。これまで脊髄損傷慢性期に対してさまざまな治療が考案されてきたが、その効果については一定の見解を得ない。

Matrix Metalloproteinase (MMP) は細胞外基質を分解し組織の構築や恒常性維持に重要な役割を果たす酵素であり、近年、脊髄損傷後の病態にも関与が報告されている。特に gelatinase 群の MMP-2,9 は脊髄損傷後の病態への関連が多く報告されており、MMP が CSPG を分解し神経再生を促進しようとの報告もある。内因性 MMP の発現を刺激し、CSPG 分解を促進できれば、慢性期脊髄損傷治療の有効な選択肢の1つになりうると考え、本研究を計画した。

【方法】(1) サイトカイン刺激し、CSPG 産生が増大した培養アストロサイトに LPS 刺激を加えることで MMP 発現を増強させ、CSPG 発現の変化を RT-PCR・Western blot にて評価。(2) ラット脊髄圧挫損傷モデル (IH spinal cord impactor, 200Kdyne, T9 level) を作成、2群に分けた。LPS 群は受傷後 4 週目より LPS 10 µg/day を連続 5 日間腹腔内投与、control 群は生食を投与した。各群で (a) 行動評価 (b) 免疫組織学的検討 (c) RT-PCR, Western blot, Gel Zymography を行った。

【結果・考察】(1) TGF-β や EGF の刺激により、培養アストロサイトの CSPG 発現は増大、さらに LPS を加えると CSPG 発現は抑制された。(2) 組織学的評価にて LPS 群では CSPG の発現が減少し、LPS 刺激により内因性 MMP 発現が増大することで CSPG 分解が促進されたと考えられた。さらに現在、より長期の行動観察および LPS 刺激による軸索再生の変化につき検討中である。

過去の報告では MMP-2 活性が脊髄損傷後 CSPG を溶解すること、MMP-2 KO マウスは損傷後 CSPG 分解能が低下したことなどが述べられている。今回の研究結果で MMP を介したグリア瘢痕への作用が脊髄慢性期治療の break through となる可能性が示唆された。

¹千葉大大学院整形 ²千葉県立東金病院整形

1-4-16

p38 mitogen activated protein kinase inhibitor は脊髄損傷後のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの産生を抑制する

森野 忠夫 尾形 直則 日野 雅之 山本 晴康

脊髄損傷後、損傷部位で reactive astrocyte によって産生される chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) は軸索の再生を阻害する。今回われわれは、脊損後 CSPG 産生に対する p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor の効果を *in vivo* で検討した。Th11 レベルの脊損ラット (MASCIS impactor, 10 g×25 mm) を作成後、L4 から硬膜内に p38 MAPK inhibitor (SB203580; 1.4 µg) を投与した群 (SB 群) と、非活性型の MAPK inhibitor (SB202474; 1.4 µg) を投与した vehicle 群にわけた。損傷後 2 週間目で行動学的検討として BBB score を、損傷脊髄内の CSPGs とそのうちの 1 つである neurocan の量を Western blot で、局在を astrocyte との免疫蛍光二重染色で検討した。BBB score は SB 群 9.75±1.18 (mean±SEM; n=10)、vehicle 群は 5.73±1.10 と有意な行動学的改善を認めた。CSPG の量は、vehicle 群を 100% として SB 群では 76%、neurocan は 39% に減少していた (n=6)。染色では、vehicle 群では形成された空洞周辺に gliosis と CSPG、neurocan が強く発現していたが、SB 群では発現が抑制されていた。われわれはこれまでにも p38 MAPK inhibitor が脊損後の oligodendrocyte の apoptosis を抑制し、後肢運動機能障害を改善することを報告してきた。今回の結果は、p38 MAPK inhibitor がこれら二次傷害を抑制するだけでなく、軸索伸張阻害因子を抑制することを示した。p38 MAPK inhibitor は脊損後の治療薬として有効である可能性が示唆された。

愛媛大整形

1-Pk-1

ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるグリア前駆細胞由来アストロサイト移植の検討

古矢 丈雄¹ 橋本 将行² 国府田 正雄² 村田 淳¹
大河 昭彦¹ 山崎 正志¹ 高橋 和久¹

【背景・目的】脊髄損傷後の glial scar は軸索再生にとって物理的障害となるといわれる一方で、炎症組織を取り囲む様子から、周囲の健康組織への炎症反応の波及を防いでいるとも言われている (Myer 2006)。また胎児由来アストロサイトは軸索再生に有効であるといわれている (Silver 1988)。今回われわれは細胞移植の目的をアストロサイトの組織保護作用、軸索伸展効果に着目して当研究を企画した。当研究には純度の高いグリア前駆細胞の分離が必須であり、Magnetic cell sorting (MACS) を用いた細胞分離方法の検討と幼若アストロサイトへの分化の検討も行った。

【方法】胎生 14 日 GFP Tg SD ラットの脊髄を採取し MACS を用い A2B5 陽性/GFAP 陰性のグリア前駆細胞 (glial-restricted precursor, GRP) を分離、これを BMP-4 存在下で 7 日間接着培養し A2B5 陰性/GFAP 陽性の 1 型 astrocyte へ分化誘導した (Glial-restricted precursor derived astrocyte, GDA)。雌性 SD ラット (9 週齢) の第 9-10 胸椎を椎弓切除後、IH Impactor (200 Kdyn) を用いて脊髄圧挫モデルを作成した。損傷から 1 週後、損傷中心部に、GDA を 1.0×10^6 個移植した。移植後 4 週間後に灌流固定し、組織切片を作成した。

【結果】MACS 回収細胞中 GRP は 90.7% の割合で存在していた。また、GRP からアストロサイトへの誘導効率率は 76.9% であった。移植後 4 週の時点で移植細胞は多く残存し、組織内で長軸方向に migration していた。移植細胞の一部は神経線維に沿って配列している様子が観察され、移植 GDA は損傷部における神経線維の伸長をガイドしている可能性が示唆された。

【結論】グリア前駆細胞から誘導した幼若アストロサイト移植は脊髄損傷に対する細胞移植治療において有用な選択肢の 1 つになりうる可能性がある。

¹千葉大大学院整形 ²千葉県立東金病院整形

1-Pk-2

体外増幅 CD133 陽性細胞移植による脊髄再生

亀井 直輔¹ 權 相模² 田中 信弘¹ 中西 一義¹
山田 清貴¹ 石川 正和¹ 越智 光夫¹ 浅原 孝之²

【目的】CD133 をマーカーとしたヒト血液中の血管内皮前駆細胞 (EPC) 移植による損傷脊髄再生効果についてこれまでも報告してきたが、CD133 陽性細胞は血液にごくわずかに存在しないため、再生効果を得るのに十分な細胞数の確保が臨床応用に向けての最大の課題となる。本研究では独自の EPC 無血清培養法で増幅させた CD133 陽性細胞移植による脊髄再生効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】EPC 培養：ヒト臍帯血から抗 CD133 抗体と自動磁気細胞分離システムを用いて CD133 陽性細胞を単離し、独自の培養プロトコールで 1 週間培養した。CFU-EPC assay: *in vitro* で CD133 陽性細胞の EPC colony 産生能を培養前後と比較した。EPC 移植：BALB/c-nu/nu マウスの胸髄圧挫損傷モデルに対する経静脈的細胞移植で以下の実験群を作製した。1) PBS 群：200 μ l の PBS を注入、2) CD133⁺ 群： 5×10^4 個の CD133⁺ 単核球を移植、3) f-CD133 群： 5×10^4 個の非培養 CD133 陽性細胞を移植、4) ex-CD133 群： 5×10^4 個の培養増幅 CD133 陽性細胞を移植、5) ex-CD133 \times 20 群： 1×10^6 個の培養増幅 CD133 陽性細胞を移植 評価：損傷後 4 週までの経時的な BBB score と損傷後 4 週における頭蓋電気刺激による後肢の運動誘発電位 (MEP) 測定で運動機能改善を評価した。

【結果】培養により細胞数が 50-100 倍に増加した。培養増幅 CD133 陽性細胞では培養前に比べ未分化型 EPC を示す small colony が有意減少して分化型 EPC を示す large colony が有意増加し、total の colony 数では有意に増加していた。CD133⁺ 群では PBS 群と比べて BBB score、MEP ともに有意な改善を認めなかった。f-CD133 群と ex-CD133 群ではいずれも PBS 群に比べて損傷後 21 日以降での BBB score と MEP amplitude に有意な改善を認め、非培養と培養との間で有意差を認めなかった。また、ex-CD133 \times 20 群では他のどの群よりも損傷後 14 日以降での BBB score と MEP amplitude に有意な改善を認めた。

【結論】脊髄再生において、EPC 無血清培養法による体外増幅 CD133 陽性細胞が質・量ともに効果的であることが証明された。

¹広島大学院整形 ²先端医療センター血管再生研究グループ

2-Pf-3

Interferon gamma (IFN γ) の脊髄損傷治療効果

藤由 崇之¹ 久保 武一² 山崎 正志¹ 大河 昭彦¹
 国府田 正雄¹ 橋本 将行¹ 川辺 純子¹ 古矢 丈雄¹
 山口 淳² 山下 俊英² 高橋 和久¹

【背景】脊髄損傷における活性化 macrophage の報告は散見するが、中枢神経修復や機能回復に良い役割があるかどうかは意見が分かっている。Schwarz らは、活性化 macrophage は神経保護作用・軸索再生に有益な役割を認めると報告した。

【目的】macrophage 活性化物質である IFN γ は、中枢神経修復に影響を及ぼすかどうかを検討する。

【方法】*in vitro* : マウス腹腔より macrophage 採取し、IFN γ を加え 24 時間培養した。その後、神経細胞を胎生 16 日マウス大脳皮質より採取し、macrophage 培養上清と 24 時間培養し神経軸索伸長を評価した。*in vivo* : 8 週齢雌マウスの T9 レベルに IH impactor (60 kdyn) を用いて脊髄損傷モデルを作成し、損傷直後より 14 日間連続で IFN γ を腹腔内投与した (IFN γ 群)。Control 群は PBS 投与を行った。BMS スコア、組織学的検討、脊髄内 mRNA 定量を行った。検定はマンホイットニー U 検定, repeated measure ANOVA を用い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】*in vitro* : IFN γ 活性化 macrophage 群は、活性化なし群と比べ有意に軸索が伸長した。*in vivo* : BMS スコアは IFN γ 群で control 群よりも改善し、損傷後 10 日、2 週、3 週目で有意差を認めた。組織学的には IFN γ 群で神経軸索伸長阻害蛋白である CSPG 発現量が有意に減少し、損傷 6 週では 5-HT 陽性線維、白質内残存ミエリン量が有意に多く存在した。また、脊髄内 mRNA を損傷 1 週目で評価したところ、IFN γ 群は神経栄養因子 (GDNF, IGF1, NT3) および CSPG 分解酵素である MMP-9, MMP-2 の発現増加を認めた。

【考察】IFN γ 投与により、macrophage が活性化され、神経栄養因子を放出し、また MMPs 増大により CSPG が分解された結果、損傷周囲に良い環境ができ機能改善につながったと考えられる。しかし、CSPG, MMP-2 は astrocyte から主に産生されるため、IFN γ の astrocyte への直接的な作用も否定できない。今後、*in vitro* で astrocyte を検討する必要があると思われる。

【まとめ】IFN γ 投与は急性期脊髄損傷治療を促進させた。今後、新しい治療の一助となると思われる。

¹千葉大大学院整形 ²千葉大大学院医学研究院神経生物学
³大阪大大学院医学系研究科分子神経科学

2-Pf-4

IFN γ 刺激による astrocyte への影響

鈴木 利直¹ 藤由 崇之² 久保 武一³ 山崎 正志²
 大河 昭彦² 国府田 正雄² 橋本 将行² 川辺 純子²
 古矢 丈雄² 山口 淳³ 高橋 和久²

【背景】われわれの前研究において、マウス脊髄損傷モデル IFN γ 腹腔内投与により、後肢運動機能の改善を認めた。また脊髄内において、軸索再生阻害蛋白である CSPG 量の減少および CSPG を分解する働きをもつ MMP-2, MMP-9 の発現増加が認められた。CSPG, MMP-2 および MMP-9 は astrocyte から産生されることが知られている (2005 Asher, 2007 Chan)。

【目的】IFN γ は一般的に macrophage を主に活性化すると知られているが、これだけでなく astrocyte へも直接的な影響を及ぼし、これらの産生に関与するのかどうか検討すること。

【方法】*in vitro* : P1 マウス大脳皮質を採取し、astrocyte を培養した。培養後、IFN γ で刺激し、24 時間後に real-time PCR を用いて mRNA を測定した。*in vivo* : 8 週齢雌マウスの T9 レベルに IH impactor (60 kdyn) を用いて脊髄圧挫損傷モデルを作成し、損傷直後から IFN γ を連日腹腔内投与した (IFN γ 群)。Control 群は PBS 投与を行った。損傷 7 日目に灌流固定し、免疫組織学的検討を行った。

【結果】*in vitro* : IFN γ 投与群において、MMP-2, MMP-9 の発現はあまりみられなかった。*in vivo* : IFN γ 群で MMP-9 の発現を多く認めた。MMP-9 と GFAP の免疫二重染色において、一部の GFAP と merge したことから MMP-9 が astrocyte からも産生されていたことが分かった。

【考察】MMP-2 の発現がみられなかったのは、IFN γ 刺激によって、MMP-2 の発現は増加するが、その増加を打ち消すほどの MMP-2 発現を抑制する物質 (TIMP-2, TIMP-3) も IFN γ 刺激によって同時に発現していた可能性がある。TIMP-3 は astrocyte から産生されるという報告 (2007 Liu) があるため、今後は IFN γ 刺激によって astrocyte から TIMP-3 の発現増加が認められるかが課題となる。また、CSPG 発現の減少を今回、*in vitro* において確認することはできなかった。しかし、IFN γ 刺激により astrocyte からの CSPG 減少を認めた報告 (2005 Smith) もあり今後も引き続き検討する予定である。

¹千葉大医学部 ²千葉大大学院整形 ³千葉大大学院神経生物

2-Pf-12

ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける bFGF 徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討

古矢 丈雄¹ 橋本 将行² 国府田 正雄³ 村田 淳¹
 大河 昭彦¹ 山崎 正志¹ 出澤 真理¹ 松瀬 大⁴
 田畑 泰彦⁴ 高橋 和久¹

【背景・目的】これまでの脊髄損傷に対する細胞移植は、残存細胞数、行動回復の面で制約を受けることが多く、細胞移植におけるスカフォールドの検討の必要性がわれている。basic fibroblast growth factor (bFGF) 徐放ゼラチンハイドロゲルは血管新生作用と細胞増殖作用を有する bFGF を徐放することができ、毛髪再生、臓器再生に有用であるといわれている。今回われわれはラット損傷脊髄モデルに対する bFGF の徐放ゼラチンハイドロゲルの効果をコントロール群と比較検討し、細胞移植のスカフォールドになりえるかどうか検討したので報告する。

【方法】雌性 SD ラット(8週齢)の第9-10胸椎を椎弓切除後、IH Impactor (200 Kdyn) を用いて脊髄圧挫モデルを作成した。損傷から1週後、損傷中心部に、bFGF を 20 μ g 含んだゼラチンハイドロゲル 0.4 mg を注入した。対照として bFGF を含まないゼラチンハイドロゲル単独群および生食投与群を作成した。運動・知覚機能を損傷から9週間測定した。9週時点で両皮質脊髄路のトレーシングを行い、損傷11週後に灌流固定を行った。注入部位における血管新生、神経保護効果を組織学的に比較検討した。

【結果】(1)組織学的評価ではほぼ全例に皮質脊髄路の染色が得られた。(2)行動学的評価では生食コントロール群に比べてゼラチンハイドロゲル+bFGF 群およびゼラチンハイドロゲル単独治療群で改善傾向を認めるも統計学的な有意差は得られなかった。損傷後7週時点において bFGF 徐放投与群は生食コントロール群と比し知覚過敏状態の改善を認めた。

【考察・結論】ゼラチンハイドロゲルからの bFGF 徐放投与は脊髄損傷に対する有用な治療法の1つになりうる可能性が示唆された。また、ゼラチンハイドロゲルは徐放キャリアとしてだけでなく細胞のスカフォールドとしての効果も期待できる。現在われわれはこの bFGF 徐放に加え、細胞移植を併用した研究を行っている。

¹千葉大学大学院整形 ²千葉県立東金病院整形 ³京都大学大学院医学研究科機能微細細胞学 ⁴京都大学再生医学研究所

2-Pf-13

Clip compression によるラット胸髄損傷の運動機能回復と組織学的評価

草野 和生 榎本 光裕 早乙女 進一 四宮 謙一

【目的】ラット脊髄圧挫モデルの作成方法として NYU device や IH インパクトが主流であるが、clip で脊髄を直接圧迫する方法も報告されている。clip を使用する利点は、損傷時のインパクト後も一定の圧を持続することが可能で時間も自由に調整できること、再現性が高いことなどである。今回、われわれは血管 clip を用いて側方圧迫型の胸髄圧挫モデルを作成したので報告する。

【方法】Fischer rat (n=10, 160-180 g) に対し、T9 椎弓切除を行い、脊髄を露出後、micro-vascular clip (closing force 15-20 g) で脊髄側方から 30 秒間挟んだ。術後1週ごとに BBB score にて運動機能を評価した。術後8週で灌流固定し、脊髄横断切片を作成した。HE 染色を行い、損傷部を含む 9 mm 領域での損傷脊髄の推定体積および空洞体積を計測した。また LFB 染色で残存するミエリンの体積を計測した。さらに、損傷脊髄遠位に fluoro-gold (FG) を注入し大脳皮質感覚運動野の FG 陽性細胞を計測した。対照群として同週齢・体重の正常ラットを用いた。

【結果】BBB score は損傷後6週で12点となり、8週まで改善を認めなかった。損傷部を含む 9 mm 領域の脊髄推定体積は平均 26.0 mm³ で、正常脊髄の約 6% であった。空洞は脊髄背側を中心に存在し、推定体積は平均 2.3 mm³ で、損傷脊髄全体の 9.2% に相当した。損傷部を中心に脱髄所見を認め、残存ミエリンは対照群の 34.6% に相当した。大脳皮質での FG 陽性細胞数は、損傷群で平均 32 個、対照群では平均 1129 個であった。

【考察】本手法は、利便性・再現性・経費面での利点に加え、脊髄露出範囲も clip をかける部位のみで済むため低侵襲・短時間の手術が可能である。最終 BBB score は 12 点前後で、短時間の手技の習熟で中等度のラット胸髄損傷モデルが作成可能であり、今後の脊髄損傷実験モデルとして有用と考えられる。

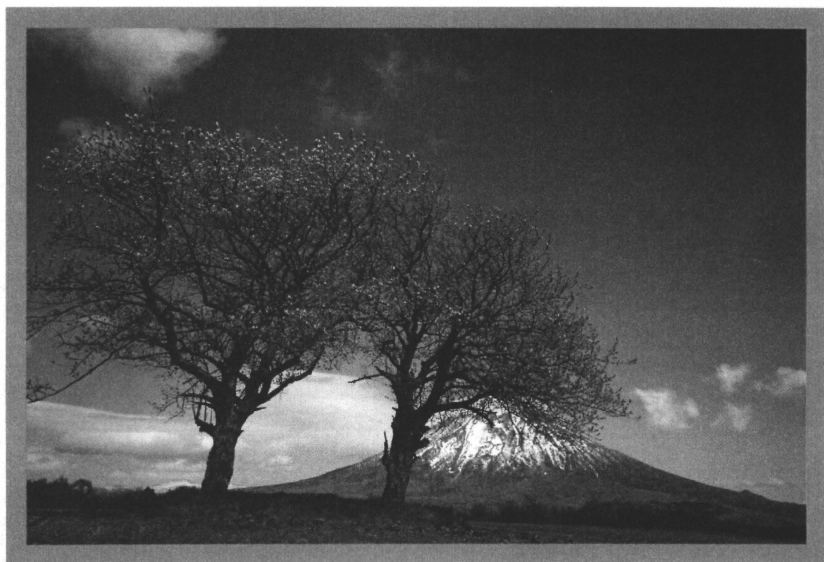
東医歯大大学院整形



第43回 日本脊髄障害医学会

The 43rd Annual Meeting of Japan Medical Society of Spinal Cord Lesion

プログラム・抄録集



会期：2008年11月6日（木）・7日（金）

会場：かでの2・7
（北海道立道民活動センター）

会長：岩崎 喜信
（北海道大学医学研究科神経外科）



C02-01 ラット脊髄損傷に対するシロスタゾール投与の有用性の検討

Effects of cilostazol on an experimental spinal cord injury in rats

千葉大学大学院医学研究院整形外科学¹、千葉市立海浜病院整形外科²、千葉市立青葉病院整形外科¹○林浩一¹、橋本将行²、国府田正雄³、大河昭彦¹、山崎正志¹

【目的】血小板凝集阻害薬シロスタゾールは、Phosphodiesterase III阻害薬であり、CREBのリン酸化を介した神経保護作用を持つ。近年脳梗塞モデルに対する有用性が報告されており、今回脊髄損傷モデルにおける有用性を検討した。【方法】(術後投与)SDラット20匹を用いSCIモデルを作製。術後よりシロスタゾールもしくは通常の飼料を与えた2群間にて、BBB score他、各種後肢運動機能評価を行った。組織学的には残存白質量や、pCREB・oligodendrocyteの計測を行った。(術前投与)術前3日より投与する実験を行った。【成績】術後投与では、行動・組織学的評価において2群間に有意差はなかった。術前投与では、シロスタゾール群においてBBB scoreが有意に低下したが、組織学的には有意差はなかった。【結論】シロスタゾールを術前より投与すると、後肢行動機能の改善が不良であった。微小出血が関与したものと推察した。現在慢性期での投与実験を行っている。

Keywords: シロスタゾール (cilostazol)、脊髄損傷 (spinal cord injury)、血小板凝集阻害薬 (platelet aggregate inhibitor)

C02-02 インターフェロンガンマの脊髄損傷治療効果

Effect of the interferon gamma for spinal cord injury in mice

千葉大学大学院医学研究院整形外科学¹、千葉大学大学院医学研究院神経生物学²○藤由崇之¹、山崎正志¹、大河昭彦¹、国府田正雄¹、橋本将行¹、久保武一²

【目的】IFN γ 投与は、損傷中枢神経に影響を及ぼすか。

【方法】In vitro: macrophageおよびastrocyteを初代培養後、IFN γ 刺激して神経栄養因子、CSPGの産生を測定。In vivo: 8週齢雌マウスT9レベルにIH impactor (60kdyn)を用いて脊髄損傷を作成。損傷直後より14日間連続でIFN γ を腹腔内投与し(IFN γ 群)、Control群はPBS投与とした。BMSスコア、組織学的検討、脊髄内mRNA測定を行った。

【結果】IFN γ 刺激によりmacrophageからは神経栄養因子の増加、astrocyteのCSPG産生が減少した。BMSスコアはIFN γ 群でControl群よりも早期に有意に改善した。組織学的にはIFN γ 群でCSPG発現が有意に減少し、損傷6週では5-HT陽性線維、白質内残存ミエリンが有意に多く存在した。また、損傷1週目の脊髄内mRNAは、IFN γ 群で神経栄養因子の増加およびCSPGの低下をみとめた。

【結論】既に他疾患で臨床使用されているIFN γ は脊髄損傷に対して有効な治療薬であると思われる。

Keywords: インターフェロンガンマ (IFN γ)、脊髄損傷 (SCI)、神経軸索伸長阻害蛋白 (CSPG)

C02-03 Interferon- γ は損傷脊髄内でグリア前駆細胞の細胞死を誘導する

Interferon-gamma induces apoptosis of glial progenitor cells in injured spinal cord

東京大学大学院整形外科¹、国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所²

○伊藤順一^{1,2}、上野高明^{1,2}、星川慎弥²、緒方徹²、中村耕三¹

【目的】脊髄治療は神経保護、軸索伸長、細胞補充に分けられ、脊髄に内在するグリア前駆細胞（GPC）は細胞補充ソースの候補である。本研究では、損傷脊髄内における炎症性サイトカインのGPCへの作用を解析した。【方法・結果】1）ラット脊髄圧挫損傷モデルを作成し組織内のGPC数を測定すると、その数は損傷4日目から時間と共に減少していた。2）GPCの株化細胞に各種炎症性サイトカインを作用させると、interferon γ -（IFN- γ ）が顕著に細胞死を誘導していた。3）IFN- γ の発現は脊損後の亜急性期以降に確認された。また、IFN- γ -受容体欠損マウスの脊損モデルではGPCの数は維持され、さらに後肢運動機能の改善がみられた。【結論】脊髄損傷においてIFN- γ はGPCの細胞死を誘導し、運動機能の改善を阻害している。IFN- γ シグナルの遮断によるGPCの保持効果は、細胞補充戦略の有望な候補である。

Keywords：脊髄損傷（spinal cord injury）、炎症（inflammation）、ノックアウトマウス（knock-out mice）

C02-04 ラット脊髄圧挫損傷慢性期における細胞外基質分解促進によるグリア瘢痕抑制効果

SUPPRESSION OF GLIAL SCAR INHIBITION BY PROMOTING DEGRADATION OF EXTRACELLULAR MATRIX AFTER CHRONIC SPINAL CORD INJURY IN RATS

千葉大学大学院医学研究院整形外科¹、千葉市立青葉病院整形外科²、千葉市立海浜病院整形外科³

○川辺純子¹、國府田正雄²、橋本将行³、大河昭彦¹、山崎正志¹、高橋和久¹

【背景】脊髄損傷慢性期ではアストサイトがグリア瘢痕を形成し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン：CSPGが分泌され、物理的・化学的に軸索伸展阻害が働く。Matrix Metalloproteinase：MMPは組織構築や恒常性維持に重要な役割を果たす分解酵素であるが、近年、脊髄損傷後の病態にも関与が報告されており、MMPがCSPGを分解し神経再生を促進しうるとの報告もある。内因性MMP発現の刺激によりCSPGが分解され、軸索進展を促進できれば、慢性期脊髄損傷治療の有効な選択肢になる可能性がある。【方法】サイトカイン刺激した反応性アストロサイトにLipopolysaccharide；LPS刺激を加え、MMP発現を増大させる。CSPG発現の変化をPCR・Western blotにて検討した。ラット脊髄損傷モデルに受傷後4週目よりLPSを5日間腹腔内投与。行動評価・組織学的検討・PCR, Western blot, Gel Zymographyを施行し対照群と比較検討した。

Keywords：脊髄損傷慢性期（chronic spinal cord injury）、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）、内性マトリックスメタロプロテアーゼ（endogenous MMP）

C02-05 ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討

Effects of bFGF incorporated gelatin hydrogel transplantation in a rat spinal cord contusion model

千葉大学大学院医学研究院整形外科¹、東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座細胞組織学分野¹

○古矢文雄¹、橋本将行¹、国府田正雄¹、村田淳¹、出澤真理²、山崎正志¹

ラット損傷脊髄モデルに対するbasic fibroblast growth factor (bFGF) 徐放ゼラチンハイドロゲル移植の治療効果を検討した。IH Impactorを用いて脊髄圧挫モデルを作成、損傷1週時点でbFGFを20 μ g含んだゼラチンハイドロゲル0.4mgを損傷中心部に注入した。対照としてbFGFを含まないゼラチンハイドロゲル単独群および生食投与群を作成した。運動・知覚機能を9週間測定した。損傷11週にて還流固定の後、組織学的検討を行った。行動学的評価において生食投与群に比べてゼラチンハイドロゲル+bFGF群およびゼラチンハイドロゲル単独治療群で改善傾向を認めた。損傷後7週時点においてbFGF徐放投与群は生食投与群と比し知覚過敏状態の改善を認めた。ゼラチンハイドロゲルからのbFGF徐放投与は脊髄損傷に対する有用な治療法の1つになりうる可能性が示唆された。

Keywords: 脊髄損傷 (spinal cord injury)、スキヤフォールド (scaffold)、bFGF (bFGF)

C02-06 脊髄損傷に対する慢性期嗅粘膜移植治療の基礎的検討

Transplantation of olfactory mucosa improves motor function in rat complete spinal cord transection model

大阪大学医学部脳神経外科

○青木正典、岩月幸一、吉峰俊樹

【目的】嗅粘膜 (OM) は神経幹細胞としての機能を有し嗅神経鞘細胞 (OEC) や、嗅感覚神経 (OSN) へ分化する基底細胞と軸索伸長作用を有するOECを含んでおり神経再生が認められる。【方法】11週齢の雌Wistar ラットを、Th10で完全離断し2週間後に再開創し同系ラットから採取した嗅粘膜を細断して移植した (n=14)。OECを含まない呼吸粘膜 (RM) の移植群 (n=13)、非移植群 (n=6) をコントロールとした。術後より下肢運動機能をBBB Scaleにて評価、移植6週後に軸索輸送マーカーのBDAを感覚運動野に注入。移植8週後に組織学的検討を行った。【結果】OM移植群ではBBB Scaleはコントロール群に比し改善傾向を示した。また、移植部を越えたBDAが観察された。組織学的検討では移植部にOECが確認され、空洞形成の抑制が運動機能の改善と相関した。【結論】嗅粘膜は中枢神経系の移植用組織として期待されるが、まだその効果は限られており、さらなる改良が望まれる。

Keywords: 嗅粘膜 (olfactory mucosa)、脊髄損傷 (spinal cord injury)、組織移植 (tissue transplantation)

C02-07 脊髄損傷モデルに対するconstraint-induced movement therapyの検討

Constraint-induced movement therapy for spinal cord injury

千葉市立青葉病院整形外科¹、千葉市立海浜病院整形外科²、千葉大学大学院整形外科³

○国府田正雄¹、橋本将行²、古矢丈雄³、林浩一³、大河昭彦³、
山崎正志³

【目的】片麻痺などに対するリハビリテーションに、健側の動作を制限して患側を強制的に使用させ神経可塑性を引き出すconstraint-induced movement therapy (CI therapy) という方法がある。CI therapyの脊髄損傷治療への応用の可能性を検討するのが本研究の主目的である。【方法】雌SD ratを全身麻酔下にT9椎弓切除、脊髄左半切断損傷モデルを作成した。損傷翌日より4週間健肢をギプス固定した。コントロール群は、体幹にのみ損傷翌日より4週間のギプス固定をした。脊髄損傷前、損傷直後、損傷後1日、損傷後8週まで後肢麻痺の回復をBBB locomotor scaleにて評価した。神経トレーサーを注入し軸索再生・可塑性を評価した。【結果・考察】行動学的には両群間に有意差を認めなかった。CI therapyの脊髄損傷への応用には期間・方法などの検討を要する。

Keywords：脊髄損傷 (spinal cord injury)、可塑性 (plasticity)、運動機能 (locomotor function)

A08-01 急性期脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子の神経保護効果：臨床試験第一報

Granulocyte colony-stimulating factor-mediated neuroprotection for acute spinal cord injury patients: first report of phase I/2a clinical trial

千葉市立青葉病院整形外科¹、千葉大学大学院整形外科²

○国府田正雄¹、川辺純子²、藤由崇之²、遠藤友規²、大河昭彦²、山崎正志²

顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor; G-CSF) は好中球減少症などに臨床使用されている。我々はG-CSFが脊髄損傷動物モデルにおいて骨髄由来細胞の脊髄内への動員、ニューロン・オリゴデンドロサイトのアポトーシス抑制、抗炎症作用、血管新生増強作用などにて神経保護的に働くことを明らかにしてきた。これらの根拠より、脊髄損傷に対するG-CSF投与の臨床試験を計画した。今回は臨床試験phase I-IIaとして安全性の確認が主目的である。受傷後8時間以内の脊髄損傷例、年齢は16-70歳などの条件を満たし、悪性疾患の既往などの除外項目に抵触しない患者を対象とした。平成20年6月27日、本臨床試験の第一例目がエントリーした。臨床経過・検査データなどを報告する。

Keywords: 脊髄損傷 (spinal cord injury)、神経保護 (neuroprotection)、臨床試験 (clinical trial)

A08-02 将来型脊髄損傷データベースシステムの構築—データバンクに向けた取り組み—

Clinical Database Of Spinal Cord Injuries

総合せき損センター

○坂井宏旭、出田良輔、植田尊善、芝啓一郎

【目的】脊髄損傷 (脊損) 治療分野において、脊損の予防、治療等の評価と標準化のためには多くのデータ集積が必要である。我々は、脊損患者における治療と機能回復の経時的変化における実態解明を目的に、将来型の脊損データベースを構築し調査を行っている。【方法】外傷性脊損患者を対象とし、受傷後の時系列 (入院時、72時間、2・4・6週間、2・3・4・5・6・8ヶ月、1年後、退院時の計13時期) に従い146項目のデータを前方視的に集積している。【結果】2008年7月現在、263症例が登録され、データ入力率=ほぼ100%である。内訳は、男:女=220:43、平均年齢=50.9歳、発生年代は20代・50代・60代に多い傾向にあった。【考察】本研究を叩き台に標準化について検討していくことで、脊損治療の臨床評価においてコンセンサスが得られると考える。全国レベルで機能させるため、関係各位のご協力をお願いしたい。

Keywords: 脊髄損傷 (spinal cord injuries)、データベース (database)、全国 (nationwide)

THIRTY-SIXTH ANNUAL MEETING
OF THE

CERVICAL SPINE RESEARCH SOCIETY



FOUNDED 1973

THE RENAISSANCE AUSTIN HOTEL
AUSTIN, TEXAS

DECEMBER 4 - 6, 2008

President: Thomas A. Zdeblick, MD

Program Chair: Michael G. Fehlings, MD, PhD

Local Arrangements Chair: Randall F. Dryer, MD & Jack Zigler, MD

<http://www.csr.org>

Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes Angiogenesis and Displays Neuroprotective Effects after Spinal Cord Injury in Rats

Junko Kawabe, MD, Chiba-shi, Japan (n); Masao Koda, MD, PhD, Chiba-shi, Japan (n);

Masayuki Hashimoto, Chiba-shi, Japan (n); Ryo Kadota, Chiba-shi, Japan (n);

Takayuki Fujiyoshi, Chiba-shi, Japan (n);

Akihiko Okawa, Chiba-shi, Japan (n);

Masashi Yamazaki, Chiba-shi, Japan (n); Kazuhisa Takahashi, Chiba-shi, Japan (n)

Introduction: G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) is a one of growth factors of hematopoietic lineage cells. Recently, the neuroprotective effects of G-CSF on central nervous system (CNS) have been reported. As we previously reported, G-CSF also exerts neuroprotective effects on experimental spinal cord injury (SCI) via anti apoptotic effects on neurons, oligodendrocytes and reducing demyelination and expression of inflammatory cytokines. However, the precise mechanisms remain to be elucidated. Because degree of angiogenesis at sub-acute phase after SCI correlates with regenerative responses, there is the possibility that G-CSF displays the neuroprotective effects after SCI via enhancement of angiogenesis. In this study, our aim was to assess the effects of G-CSF on vascular system after SCI.

Material/Method(s): We made contusive SCI model in rat and randomly divided into two groups; G-CSF treated group (15µg/kg i.v. for 5days after SCI) and control group. (1) Integrity of blood spinal cord barrier (BSB) was evaluated by measuring the degree of edema formation of the cord and volume of extravasation.(2) For histological evaluation, cryosections were immunostained with Von Willebrand Factor as a marker for vascular endothelial cells. Number of vessels was counted to assess revascularization. (3) For angiogenic cytokines' gene expression analysis, real time PCR was performed with vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-1 (Ang1), hepatocyte growth factor (HGF) and fibroblast growth factor-2 (FGF2). (4) We assessed the recovery of motor function.

Results: (1) There was no significant difference in the degree of edema of spinal cord between two groups. G-CSF treated group had tendency to reduce in extravasation. (2) In the G-CSF treated rats, the total number of vessels was larger than that in the control group ($p<0.01$). (3) Expression of VEGF, HGF and FGF-2 in the G-CSF treated group was significantly higher than that in the control group ($p<0.01$). (4) The G-CSF treated group showed significant recovery of hind limb function compared to that of the control group ($p<0.01$).

Discussion/Conclusion: In the present study, the G-CSF group had tendency to decrease extravasation after SCI, and angiogenesis was promoted with G-CSF treatment. G-CSF treatment increased the expression of angiogenic cytokines. These results suggest that G-CSF exerts neuroprotective effects via promoting angiogenesis after SCI. Together with the results of the present study and the previous ones, it was suggested that G-CSF is an attractive candidate for acute SCI drug. Based on these outcomes, we are now preparing clinical trial of G-CSF for acute spinal cord injury. Our clinical trial plan has been approved by institutional review board of Chiba University Hospital in this Feb.

- The FDA has not cleared this drug and/or medical device for the use described in this presentation (i.e., the drug or medical device is being discussed for an "off label" use). See inside back cover for full information.

第8回 日本再生医療学会総会

会 期：2009年3月5日(木)・6日(金)

会 場：東京国際フォーラム
〒100-0005 東京都千代田区丸の内3-5-1
TEL：03-5221-9000(代表)
URL：http://www.t-i-forum.co.jp/general/index.php

テーマ：「学際化を迎えた幹細胞研究
—その臨床、創薬応用をめざして—」

会 長：坪田 一男
(慶應義塾大学医学部眼科学教室)

事務局：慶應義塾大学医学部眼科学教室
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地
TEL：03-3353-1211(代表)
E-mail：8jsrm@convention.co.jp

総会ホームページ：http://www2.convention.co.jp/8jsrm/

座長：中村雅也（慶應義塾大学 医学部 整形外科）

- 1 ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるグリア前駆細胞由来アストロサイト移植の検討
古矢丈雄（千葉大学 大学院 医学研究院 整形外科学）
- 2 血管内皮前駆細胞移植によるJagged1/Notchシグナルを介した脊髄再生メカニズム
亀井直輔（先端医療センター 血管再生研究グループ）
- 3 塩酸ファスジルは脊髄損傷に対する骨髄間質細胞の移植効果を増強するか？
千葉泰弘（北海道大学 医学研究科 神経外科）
- 4 ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討
古矢丈雄（千葉大学 大学院 医学研究院 整形外科学）
- 5 rhHGFは頸長類脊髄損傷後の上肢運動機能回復を促進する：コモンマウスを用いた前臨床試験
北村和也（慶應義塾大学 医学部 整形外科、慶應義塾大学 医学部 生理学）
- 6 ALSモデルTgマウスにおける肝臓の一過性傷害とその回復過程に伴うHGFとMetの発現調節
大谷若菜（大阪大学 大学院 医学系研究科 分子再生医学）

O-20-2 血管内皮前駆細胞移植によるJagged1/Notchシグナルを介した脊髄再生メカニズム

亀井直輔¹、権 相模¹、石川正和²、越智光夫²、浅原孝之¹

¹先端医療センター 血管再生研究グループ、²広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 整形外科学

【目的】本研究ではJagged1 conditional knockout mouseを用いて、損傷脊髄に血管内皮前駆細胞（EPC）を移植した際のJagged1/Notchシグナルを介した脊髄再生メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

【方法】Jagged1 conditional knockout mouseおよびwild type mouseの骨髄細胞から単核球を分離した後、1週間培養でEPCを樹立した。マウス胸髄圧挫損傷モデルに対し、PBSもしくは 1×10^6 個のEPCを経静脈的に投与した（PBS群、Jag1+/+EPC群、Jag1-/EPC群）。

【結果】運動機能評価では、Jag1+/+EPC群のBBBスコアが損傷後2週以降で他の2群よりも有意に高く、PBS群とJag1-/EPC群との間には有意差を認めなかった。経頭蓋電気刺激による後肢からの運動誘発電位測定でも同様の結果であった。組織学的評価では、損傷後3日の血管数はJag1+/+EPC群、Jag1-/EPC群ともにPBS群よりも有意に多く、これらの2群間には有意差を認めなかった。また、Jag1+/+EPC群では反応性アストロサイトの増殖が他の2群よりも有意に促進されていた。損傷後2週の損傷部においてPBS群とJag1-/EPC群では正常骨髄組織に比べて有意に太い異常血管を認めたが、Jag1+/+EPC群では正常組織の血管径と同様であった。

【考察】EPC移植による反応性アストロサイトの誘導と血管成熟促進においてJagged1/Notchシグナルを介したメカニズムの存在が示唆された。

O-20-1 ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるグリア前駆細胞由来アストロサイト移植の検討

古矢丈雄¹、橋本将行²、国府田正雄¹、村田 淳¹、大河昭彦¹、山崎正志¹、高橋和人¹

¹千葉大学 大学院 医学研究院 整形外科学、²千葉市立海浜病院 整形外科、³千葉市立青葉病院 整形外科

【背景・目的】脊髄損傷後のglial scarは軸索再生にとって物理的障害となるといわれる一方、炎症組織を取り囲む様子から周囲健康組織への炎症波及を防いでいるともいわれている。また胎児由来アストロサイトは軸索再生に有効であるとされる。今回我々はこれらアストロサイトのbeneficialな面に着目し当研究を企画した。

【方法】胎生14日GFP Tg SDラットの脊髄を採取しMACSを用いグリア前駆細胞（glial-restricted precursor、以下GRP）を分離、これを1型アストロサイトへ分化誘導した（Glial-restricted precursor derived astrocyte、以下GDA）。9週齢雌性SDラットの第9-10胸椎を推弓切除後、IH Impact（200kdyn）を用いて脊髄圧挫損傷モデルを作成、損傷3日後または1週後の損傷中心部へGDAを 1.0×10^6 個移植した。両者を行動学的および組織学的に比較検討した。

【結果】MACS回収細胞中GRPは90.7%の割合で存在した。また、GRPからGDAへの誘導効率は76.9%であった。3日後移植群、7日後移植群とも移植後10週の時点で移植細胞の残存が確認された。移植細胞は組織内で長軸方向にmigrationしたり、損傷空洞を取り囲む様子が観察された。2群を比較すると3日後移植群は7日後移植群に比べ有意な行動回復が得られた。

【結論】脊髄損傷後早期におけるグリア前駆細胞由来アストロサイト移植は有用な治療選択肢の1つになりうる可能性が示唆された。

O-20-3 塩酸ファスジルは脊髄損傷に対する骨髄間質細胞の移植効果を増強するか？

千葉泰弘¹、黒田 敏¹、矢野俊介¹、丸一勝彦¹、長内俊也¹、穂刈正昭¹、七戸秀夫¹、飛騨一利¹、岩崎喜信¹
北海道大学 医学研究科 神経外科

【目的】われわれは損傷脊髄に移植された骨髄間質細胞(BMSC)が皮質脊髄路の修復に寄与していることを報告した。その治療効果をより向上させるために脊髄損傷モデルにBMSC移植に加えてRhoキナーゼ抑制剤である塩酸ファスジルを投与して相乗効果を検討したので報告する。【方法】Pneumatic impact deviceを用いてT10レベルでラット不完全脊髄損傷モデルを作成した。脊髄損傷直後から14日間にわたり連日、塩酸ファスジルを頸頭5mmの部位に移植した。BMSC群、ファスジル群、BMSC+ファスジル群、vehicle群を作成し、経時的に後肢運動機能を評価した。移植8週後に損傷から頭側10mmの皮質脊髄路にFluoro-ruby (FR)を微量注入したのち組織学的評価を行った。【結果】Vehicle群に比べてBMSC群、BMSC+ファスジル群で有意な神経症状の改善が認められたが、両者の間には有意差はなかった。しかし、BMSC群と比較し、BMSC+ファスジル群で損傷部尾側のFR陽性軸索数が有意に増加していた。【結語】塩酸ファスジルはBMSC移植による脊髄損傷後の皮質脊髄路再生をさらに促進させる可能性が示唆された。

O-20-4 ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討

古矢文雄¹, 橋本将行², 国府田正雄³, 村田 淳¹, 大河昭彦¹, 山崎正志¹, 出澤真理⁴, 松瀬 大⁴, 田畑泰彦⁵, 高橋和久¹

¹千葉大学 大学院 医学研究科 整形外科, ²千葉市立海浜病院 整形外科, ³千葉市立青葉病院 整形外科, ⁴東北大学大学院医学系研究科細胞組織学, ⁵京都大学再生医学研究所生体組織工学研究部門

【背景・目的】再生医療において細胞移植は主たる治療法の1つであるが、移植細胞の生着率・移植後の増殖能という点で問題となることが多い。そのため近年スキャフォールドおよび細胞栄養因子と細胞移植との併用療法が目まぐるしく行われている。ゼラチンハイドロゲルはスキャフォールドとしての役割に加え、細胞栄養因子を徐放する作用を併せ持っている。また、線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, 以下bFGF)は強力な血管新生・細胞増殖作用を有する因子の1つである。今回われわれは細胞移植前実験として、ラット脊髄損傷モデルにおけるbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討を行った。

【方法】8週齢雌性SDラットの第9-10胸椎を椎弓切除後、IH Impactor (200Kdyn)を用いて脊髄圧挫損傷モデルを作成した。損傷から1週後、損傷中心部にbFGFを20 μ g含んだゼラチンハイドロゲル0.4mgを注入した。対照としてbFGFを含まないゲル単独群および生食投与群を作成し、行動学的および組織学的に比較検討を行った。

【結果】生食群と比しbFGF徐放投与群およびゲル単独群において運動機能の増悪はなく、改善傾向を認めた。生食群と比しbFGF徐放投与群は損傷後7週においてCallosyniaの改善を認めた。

【結論】ゼラチンハイドロゲルを用いたbFGF徐放投与は脊髄損傷に対する集学的治療を考える上で有用な選択肢の1つになりうる可能性が示唆された。

O-20-6 ALSモデルTgマウスにおける肝臓の一過性傷害とその回復過程に伴うHGFとc-Metの発現調節

大谷若菜¹, 船越 洋¹, 加藤信介², 加藤雅子³, 中村敏一⁴

¹大阪大学 大学院 医学系研究科 分子再生医学, ²鳥取大学 脳神経病理, ³鳥取大学 分子病理, ⁴大阪大学 先端科学イノベーションセンター

ALSは神経変性疾患で根本的治療法のない致死性疾患である。主に運動神経が変性脱落することからこれまで神経系を標的とした原因解明、治療法に対する研究が行われてきた。一方で、加藤らによりSOD1G93A Tg-マウス (GIH: ALSモデルマウスのひとつ) においては、神経系に加えて肝臓においてもSOD1G93Aが蓄積し肝細胞の組織変化を認めるが、神経とは異なりその変化は一過性で、神経系の傷害が観察される時期までに組織像が回復すると報告された。神経と肝臓の回復機構の比較解析は、本疾患の治療法確立の鍵を握ると考えられる。私達は、この神経変性に対し内因性肝細胞増殖因子 (HGF) は肝臓においてLocalな発現上昇を認めるが、それでは不十分でexogenousなHGF供給がALSの神経細胞変性抑制効果を示すことを報告してきた。HGFはもともと肝細胞増殖活性をもとに精製され多くの肝疾患の肝臓再生過程で機能することが知られる。そこで本研究では、HGFの発現とc-Met受容体のリン酸化(活性化)調節を、GIHの肝臓と神経で比較解析した。免疫染色法とELISA法による解析結果、肝臓回復過程と脊髄変性過程で内因性HGFとphospho-c-Metが各々特徴的変動をすることが明らかとなった。両臓器の生理的回復に差が生じる分子機序解析は、ALS等神経変性疾患進行とその内因性抑制機序の理解に重要な示唆を与える。

O-20-5 rhHGFは霊長類脊髄損傷後の上肢運動機能回復を促進する：コモンマウスを用いた前臨床試験

北村和也^{1,2}, 藤吉兼浩^{1,2}, 山根淳一¹, 疋島啓吾³, 豊田史香³, 岩波明生¹, 船越 洋⁴, 中村敏一⁴, 戸山芳昭¹, 中村雅也¹, 岡野栄之²

¹慶應義塾大学 医学部 整形外科, ²慶應義塾大学 医学部 生理学, ³実験動物中央研究所, ⁴大阪大学 大学院医学系研究科 分子再生医学

【目的】霊長類脊髄損傷に対するrhHGF(肝細胞増殖因子ヒト組み換え蛋白質)の有効性と安全性を検討することである。

【方法】コモンマウス第5頸髄に圧挫損傷を作成し、直後よりrhHGF400 μ gを髄腔内に4週間持続投与し(対照群PBS投与)、術後12週間の運動機能評価(Bar grip test, Open field scoring)を行った。損傷後1・3・12週に頸髄MRI(7.0 tesla)を撮像した。12週目に脊髄を採取し腫瘍形成の有無を含めた免疫組織学的評価を行った。

【結果】rhHGF投与群で有意な運動機能回復が認められた。異常行動は認めなかった。rhHGF投与群では12週目のMRI像において異常信号領域が著明に縮小しており、組織像(H.E.染色, L.F.B.染色)を反映していた。次にrhHGF投与群では皮質脊髄路を示すCaMK2- α 陽性線維が損傷部より尾側においても有意に保たれており、さらにはCHAT陽性ニューロンの著明な神経突起伸長が確認された。また、CGRP陽性C線維の分布に両群間で有意な差を認めなかった。腫瘍形成は1例も認めなかった。

【考察・結論】サル脊髄損傷に対するHGFを用いた治療の有効性・安全性が確認できたことから、臨床応用へ結びつく可能性が大きく示唆されたと考えている。

日本脊椎脊髓病学会雑誌

第20巻 第1号

2009年3月20日発行

**The Journal of
the Japanese Society for Spine Surgery
and Related Research**

Vol. 20 No. 1

March 20, 2009

第38回日本脊椎脊髓病学会

The 38th Annual Meeting of
the Japanese Society for Spine Surgery and Related Research

会 長： 米 延 策 雄

会 期： 平成21年4月23日(木)・24日(金)・25日(土)

開催地： 神戸市

1-P19-5

脊髄損傷慢性期における細胞外マトリックス分解促進による グリア瘢痕抑制効果

川辺 純子, 国府田 正雄*, 橋本 将行**, 藤由 崇之, 古矢 文雄, 遠藤 友規, 林 浩一, 大河 昭彦,
山崎 正志, 高橋 和久

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,
**千葉市立海浜病院整形外科

【目的】 Matrix Metalloproteinase (MMP) は細胞外マトリックスを特異的に分解し組織の構築や恒常性の維持に重要な役割を果たす分解酵素であるが、腫瘍転移・浸潤や炎症など多くの疾患病態にも関与している。近年、脊髄損傷後の病態にもMMPの関与が報告されており、なかでも、gelatinase群のMMP-2, 9やマトロファージ由来のMMP-12は脊髄損傷後の病態への関連が報告されている。

脊髄損傷慢性期では反応性astrocyteがグリア瘢痕を形成し、軸索伸張を物理的にブロックするほか、損傷後長期にわたってコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG; Chondroitin Sulfate Proteoglycans) が分泌され、化学的にも軸索伸張阻害が働く。これまで脊髄損傷慢性期のグリア瘢痕に対して様々な治療戦略が考案されてきたが、その効果については一定の見解を得ない。

今回、ラット大脳皮質由来グリア細胞およびラット脊髄圧挫損傷モデルを用いて、グリア瘢痕ならびにCSPGに対するMMPの効果と、脊髄損傷慢性期治療への可能性について検討した。

【方法】 [in vitro] Cytokine刺激し、CSPG産生が増大した状態の培養グリア細胞に、さらにミクログリアの強力な活性物質であるlipopolysaccharide (LPS) 刺激を加えることでMMP発現・活性化を増大させる。MMP発現・活性化状況と、CSPG発現への影響を(1)免疫組織学的評価 (2) Real time PCR、ゼラチンザイモグラフィ、Western blotting (3) Neurite assayにて検討した。

[in vivo] ラット脊髄圧挫損傷モデル (IH spinal cord impactor, 200Kdyne, T8/9 level) を作成、2群に分けた。LPS群は受傷後4週目よりLPS 10 μ g/day を連続5日間腹腔内投与、control群は生理食塩水を投与した。各群で(1)免疫組織学的検討 (2) Real time PCR (3) 経時的後肢運動機能評価をおこなった。

【結果および考察】 [in vitro] RT PCR の結果、TGF- β やEGFなどの刺激により、培養グリア細胞のCSPG mRNA発現は増大した。免疫染色ではサイトカイン刺激でグリア細胞外マトリックス内にCSPG発現が増強し、さらにLPSを加えるとCSPG発現抑制が観察された。ゼラチンザイモグラフィでは、LPSを加えた群でMMP-2

の活性が上昇していることがわかり、内在性MMP-2の活性化がCSPGの溶解に関与していることが示唆された。

[in vivo] 免疫組織学的評価にてcontrol群と比較して、LPS群ではCSPGの発現が減少しており、LPS刺激により内因性MMP発現・活性化が増大することでCSPG分解が促進されたと考えられた。後肢運動機能は受傷後10週目までは2群間に統計学的有意差は見られなかった。さらに現在、より長期の行動学的観察およびLPS刺激による軸索再生の変化などにつき検討中である。過去の報告ではMMP-2の活性が、脊髄損傷後CSPGを溶解することや、MMP-2ノックアウトマウスは脊髄損傷後CSPG分解能が低下したことなどが述べられている。今回の研究結果でMMPを介したグリア瘢痕への作用が脊髄慢性期治療のbreak throughとなる可能性が示唆された。

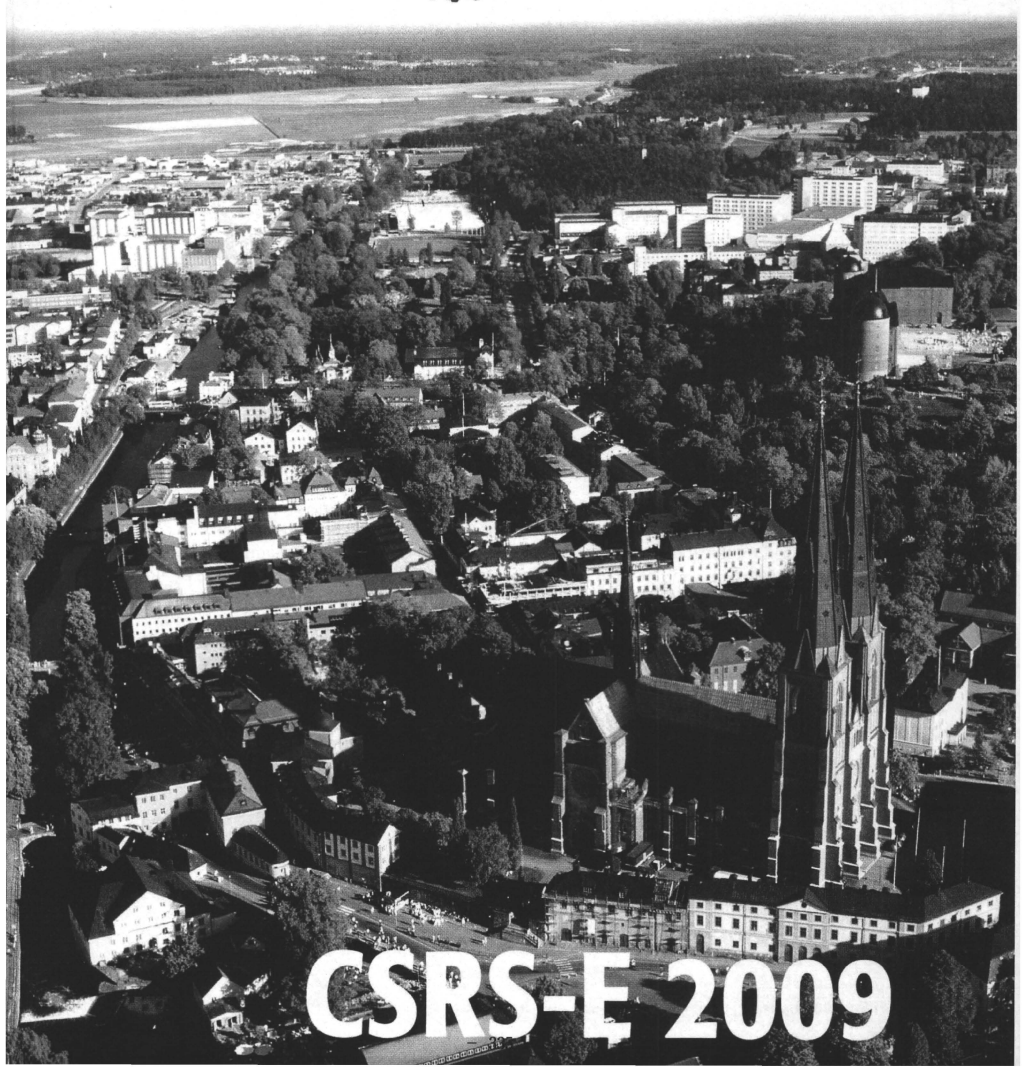
Suppression of glial scar inhibition by promoting degradation of extracellular matrix after chronic spinal cord injury

J. kawabe, et al.

Key words : Matrix Metalloproteinase (MMP), Chondroitin Sulfate Proteoglycans (CSPG), chronic spinal cord injury

The 25th Annual Meeting of the Cervical Spine Research Society
– European Section, June 10–13th, 2009, Uppsala, Sweden

Final Programme and Abstract Book



CSRS-E 2009

Neuroprotective effects of Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on acute spinal cord injury: experimental study and early clinical experience

Junko Kawabe, Masao Koda, Masayuki Hashimoto, Takayuki Fujiyoshi, Takeo Furuya, Tomonori Endo, Koichi Hayashi, Akihiko Okawa, Masashi Yamazaki
Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

Background: G-CSF is a hematopoietic growth factor. Recent reports have shown the neuroprotective effects of G-CSF on experimental spinal cord injury (SCI), though its mechanism remains to be elucidated. Because the process of angiogenesis at sub-acute phase after SCI correlates with regenerative responses, there is a possibility that G-CSF displays the neuroprotective effects after SCI via enhancement of angiogenesis. In this study, we demonstrated the detailed effects of G-CSF on vascular system after experimental SCI and started its early clinical trial.

Material/Method(s): (Study 1) We made contusive SCI model in rat; G-CSF treated group (15μg/kg i.v. for 5days after SCI) and control group. We evaluated (1) integrity of blood spinal cord barrier, (2) histology of revascularization, (3) RT-PCR for angiogenic cytokine, and (4) recovery of motor function.

(Study 2) We performed a Phase I/II clinical trial of G-CSF administration (5μg/kg i.v. for 5days after SCI) in 3 SCI patients. To address safety and feasibility concerns, we assessed general conditions and neurological condition of patients by blood data, CT, MRI, and neurological examination.

Results: (Study 1) In the G-CSF group, the number of vessels was larger than that in the control group ($p<0.01$). Expression of angiogenic cytokines in the G-CSF group was significantly higher than that in the control group ($p<0.01$), and the G-CSF group showed significant recovery of hind limb function compared to that of the control group ($p<0.01$).

(Study 2) All patients recovered motor and sensory function without any serious side effects.

Discussion: In the present study, G-CSF exerts neuroprotective effects via promoting angiogenesis after experimental SCI, suggesting that G-CSF is an attractive candidate for therapeutic drug for acute SCI. Based on these data, we planned to start the clinical trial of G-CSF administration for patients with acute SCI, and obtained an approval from our hospital ethical committee. In the early clinical trial, no serious side effect occurred. The preliminary study shows that this low-dose G-CSF administration is principally safe for patients with acute SCI. Further clinical trials with high-dose administration of G-CSF will be required to establish the G-CSF therapy for acute SCI patients.

The authors have neglected to disclose any conflict of interest

Abstract

POSTER
presentations

Effects of cilostazol on an acute or chronic experimental spinal cord injury model of rats

Koichi Hayashi, Masayuki Hashimoto, Masashi Yamazaki, Akihiko Okawa, Masao Koda, Junko Kawabe, Takayuki Fujiyoshi, Tomonori Endo, Takeo Furuya, Tsuyoshi Sakuma, Hiroshi Takahashi, Kazuhisa, Takahashi.
Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba City, Japan

Introduction: Phosphodiesterase 3 inhibitor (cilostazol) inhibits hydrolysis of cAMP and has neuroprotective effects through phosphorylating cAMP response element-binding protein (p-CREB). In cerebral infarction models, cilostazol attenuates neuronal death through above pathways. We administered cilostazol just after or 3 days before spinal cord injury (SCI) in rats, or on chronic phase of SCI rats and assessed locomotor recovery for 8-10 weeks.

Materials and methods: (Just after ad.) 8 weeks old, female SD rats were subjected to be spinal cord injury at T9/10 level with IH impactor (200 Kdyn). After operation, animals were received gavage administration of cilostazol (6 mg/day) for 1 week, and later they were provided laboratory food mixed 0.3 % cilostazol for 7 weeks (cilostazol group). The same numbers of rats were received gavage administration of vehicle as a same way (control group). We examined BBB score every week and examined other 3 behavior tests at 8 weeks. In the histological studies, we performed luxol fast blue staining and p-CREB staining.

(3days before ad.) Animals were received gavage administration of cilostazol or vehicle 3 days before SCI. After operation, they were treated with the same procedure as described above. We examined BBB score for 8 weeks, and measured cavity area in histological studies.

(Chronic ad.) After operation, all animals were provided vehicle for 5 weeks, and later they were provided laboratory food mixed 0.3 % cilostazol (cilostazol group) or vehicle (control group) for 5 weeks. We examined BBB score for 10 weeks, and compared bleeding time by Modified Duke's method at the point of 6-7 weeks.

Results: (Just after ad.) There was no statistical significant difference in BBB score and all other behaviour tests and histological examinations.

(3days before ad.) Cilostazol group showed significantly worse BBB score at 4, 7 and 8 weeks after SCI. There was no statistical significant difference in cavity area measurement.

(Chronic ad.) There was no statistical significant difference in BBB score and bleeding time.

Conclusion: Preoperative administration of cilostazol significantly exacerbated locomotor recovery after SCI. We speculated that microbleeding caused by cilostazol exacerbated locomotor recovery.

The authors have neglected to disclose any conflict of interest