

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17938

研究課題名(和文) 圧迫性脊髄症モデルラットへのG-CSFとSOCS7由来ペプチド投与の有効性

研究課題名(英文) Efficacy of SOCS7-Derived BC-Box Motif Peptide and G-CSF for Rats Developing Compression Myelopathy for

研究代表者

善積 哲也 (YOSHIZUMI, Tetsuya)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00837429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：圧迫性脊髄症モデルラットは、C5-6椎弓下に吸水膨張性ポリマーを留置することでラット脊髄に慢性的な圧迫を生じさせる。このモデルは、脊髄圧迫導入直後は神経症状を示さないが、ある一定の潜伏期間を経た後に脊髄症を発症し、その後緩徐進行性に運動機能低下を呈することが特徴で実際の臨床の場でみられる圧迫性脊髄症患者の経過に非常に酷似している。このモデルにコリン作動性ニューロンへの分化誘導作用を持つSOCS7のBCボックスモチーフを含む膜透過性神経分化誘導ペプチドと造血系のサイトカインであるG-CSFを投与することで、その効果を検討したが、脊髄変性変化や運動機能変化に有意な変化をもたらさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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る緩徐進行性の脊髄障害を来す疾患群で、除圧術のみが唯一の効果的な治療法である。しかし骨棘などは経年的な変化でもあり、患者は高齢者が非常に多い。したがって患者の中には重篤な併存疾患を抱えている場合もあり、この場合全身麻酔下の外科的治療は困難である。我が国の超高齢化社会を考慮すると、有効な薬物療法の開発は急務であるが、現時点では効果的な保存療法を支持するエビデンスは報告されていない。我々は圧迫性脊髄症ラットを用いて、圧迫性脊髄症に対する薬物治療をはじめとした非侵襲治療の可能性を追究している。

研究成果の概要(英文)：The experimental rat model of chronic cervical cord compression, which is induced by inserting a sheet of urethane compound polymer under the C5 and C6 laminae, is characterized by a decline in motor function after a latency period and reproduced the characteristic clinical course. In this study, the synergistic effects of G-CSF and the peptide including BC-Box Motif in SOCS7 which induces differentiation to cholinergic neurons were assessed in a rat chronic cervical cord compression model to explore the potential of those as a non-invasive therapy for chronic cervical cord compression. However, that didn't show no significant differences in motor functions and preservation of motor neurons.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：圧迫性脊髄症 ラットモデル 顆粒球コロニー刺激因子 SOCSタンパク質 BCボックスモチーフ ローターロッド持続歩行時間 ラット前肢握力測定 脊髄前角細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

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る緩徐進行性の脊髄障害が起こり、さまざまな症状発現（四肢の脱力、巧緻運動障害、歩行障害、頸部痛、四肢の痛み・しびれなど）をきたす疾患群である。時に比較的軽い外傷を契機に、または誘因なく急速な症状の増悪をみることがある。治療は脊髄の圧迫を取り除くことであるが、これには手術療法が不可欠である。

しかしながら頸椎症における骨棘などの変化は経年的なものであり高齢化が進む状況ではますます症例数が増加すると予想され、患者の中には重篤な併存疾患（心血管病、糖尿病、腎機能異常など）を抱えている場合も少なくなく、この場合周術期合併症を考慮すると、外科的治療は困難である。したがって、薬物療法などの非侵襲治療の開発は急務であるが、現時点では牽引療法、装具療法や薬物療法（消炎鎮痛薬、ステロイド、筋弛緩薬）を含めた効果的な保存療法を支持するエビデンスは報告されていない。

研究代表者は、2016年に造血性のサイトカインである G-CSF の圧迫性脊髄症モデルラットに対する運動機能改善効果および神経保護効果(Yoshizumi et al. Spine 2016)を、さらに2019年にはこのモデルに対するエリスロポエチンの有効性を報告し(Tanaka, Yoshizumi, PLOS ONE 2019)、圧迫性脊髄症に対する非侵襲治療の可能性を追究してきた。

圧迫性脊髄症は、脊髄の慢性圧迫による脊髄循環障害とそれによる前角運動ニューロンの脱落が主要な病態として考えられ、実際に圧迫性脊髄症モデルラットでも病理学的にこれらが再現されている。したがって圧迫性脊髄症の非侵襲治療を検討する場合、脊髄前角細胞（運動ニューロン）の温存・再生を第一に考慮すべきである。

一方で、研究代表者は体性幹細胞を神経細胞への分化を誘導する膜透過性神経分化誘導ペプチドの研究にも従事している。これは、BC ボックスタンパク質の中の elongin BC との結合部位のアミノ酸配列（BC ボックスモチーフ）と TAT に代表される蛋白導入ドメインのアミノ酸配列を結合したものであり、神経前駆細胞や間葉系幹細胞の培地へ 1 μM 以上の濃度で添加すると 30 分後には 90%以上のペプチドが細胞へ入り、添加 2 時間後から神経分化が誘導される(Yoshizumi T, Int J Mol 2020)。神経分化誘導ペプチドの配列は elonginBC の結合配列である BC ボックスモチーフ [(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX (A,I,L,V)]であり、この BC ボックスモチーフ由来ペプチドの神経分化誘導のメカニズムは JAK2/STAT3 のユビキチン化とそれに続くプロテアソームによる分解を通じて始まることが分かっている(Yoshizumi T, Int J Mol 2020)。特に BC ボックスタンパク質である SOCS 蛋白の一つ、SOCS7 の BC ボックスモチーフを含むペプチドはコリン作動性ニューロンへの選択的分化誘導作用を有する(Kanno H, Int J Mol 2018)。

前述のように圧迫性脊髄症の運動機能低下のメカニズムは、脊髄の慢性圧迫による脊髄循環障害による脊髄前角の運動ニューロン脱落であり、この SOCS7 由来ペプチドの持つコリン作動性ニューロンへの選択的分化誘導作用は、圧迫性脊髄症治療への応用が期待される。

2. 研究の目的

研究代表者は、G-CSF の圧迫性脊髄症モデルラットに対する運動機能改善効果および神経保護効果(Yoshizumi et al. Spine 2016)を報告した。これによると脊髄症発症前の圧迫性脊髄症モデルラットに G-CSF を投与した場合、脊髄症発症が有意に抑制され、また病理学的に有意な脊髄前角細胞温存効果が認められた。しかし脊髄症を発症し、運動機能が進行性に低下している場合では G-CSF を投与しても、運動機能改善効果は一時的であり、また病理学的に脊髄前角細胞の有意な温存もみられなかった。すなわち、我々の研究は、圧迫性脊髄症に対する G-CSF 治療は神経保護効果を示す高い可能性を示唆したが、すでに症状が進行している場合、G-CSF 単独での長期的な効果を期待するには不十分であった。したがって次に、G-CSF の神経保護効果のメカニズムを考慮し、それを強化するような併用療法を考案するべきである。

本研究では、圧迫性脊髄症モデルラットに対し G-CSF に加えて、運動ニューロン（脊髄前角細胞）への分化誘導活性を示す SOCS7 由来のペプチドを投与することで、G-CSF の運動機能改善・神経保護への相乗効果を検討し、その運動機能、組織学的な所見に与える影響やメカニズムを明らかにしたい。そして手術治療のみが唯一の有効な治療とされている圧迫性脊髄症に対する薬物治療の可能性を追究することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 圧迫性脊髄症ラットの作成 (Kim et al. Ann Neurol 2004)

12週齢、雄のWistar rat (250-290g) に対し、吸水膨張性ポリマー(3×5×0.7mm; アクアブレン C, 三洋化成工業株式会社)を C5-C6 の椎弓下に挿入・留置し、脊髄の慢性圧迫を導入することで圧迫性脊髄症モデルを作成する。そのポリマーの体積は、挿入・留置後に組織の水分を吸収することによって徐々に拡大し、最初の約 2.3 倍にまで達する。このモデルは脊髄圧迫導入後すぐには運動機能の低下を呈さず、長期の潜伏期間を経て脊髄症が徐々に進行してくるのが特徴で、これは臨床の場における圧迫性脊髄症の臨床経過に非常に類似している。申請者らの論文では脊髄圧迫導入後 5 週目よりローターロード持続歩行時間の、8 週目より前肢握力の有意な低下が生じてくる(Yoshizumi et al, Spine 2016)。

(2) 膜透過性神経分化誘導ペプチド SOCS7 の合成、G-CSF の用意

以下の BC-box motif を含む配列のペプチド(神経分化誘導ペプチド)に細胞膜透過性の機能を持つ蛋白導入ドメイン HIV-TAT (YARAAARQARA)を結合させて、ペプチド合成装置にて固相法で合成する(このペプチド合成は企業に委託する)。SOCS7 由来ペプチドのアミノ酸配列は SLQHLCRFRIRQLVR(下線は BC-box motif)である。また G-CSF については、製薬会社より購入して使用する。

(3) 実験デザイン

圧迫性脊髄症ラットモデル作成後、ラットを以下の 4 グループに振り分ける。このモデルは、前述のように脊髄圧迫導入後 8 週間目ではすでに脊髄症が発症し、運動機能が進行性に低下しているため、この時点で治療介入を開始する。

Group A: 圧迫性脊髄症ラット作成後 8 週目から毎日生理食塩水を皮下投与(n=12)

Group B: 圧迫性脊髄症ラット作成後 8 週目から毎日 G-CSF (15 µg/kg/day) 皮下投与(n=12)

Group C: 圧迫性脊髄症モデルラット作成後 8 週目に SOCS7 (濃度 3 µM) を単回経静脈投与を行い、作成後 8 週目以降毎日生理食塩水を皮下投与(n=12)

Group D: 圧迫性脊髄症モデルラット作成後 8 週目に SOCS7 (濃度 3 µM) を単回経静脈投与を行い、作成後 8 週目以降毎日 G-CSF (15 µg/kg/day) を皮下投与(n=12)

(4) 運動機能評価

圧迫性脊髄症モデル作成直前から、作成後 26 週間目まで毎週ローターロード持続歩行時間および前肢握力の測定を行い、運動機能評価を行う。

(5) 免疫組織学的評価

圧迫性脊髄症モデルラット作成後 26 週間後に還流固定を行い、免疫組織学的な評価へと移行する。C5-6 の脊髄圧迫部位を採取して、凍結切片を作成、抗 CHAT 抗体を用いた運動ニューロン(脊髄前角細胞)の評価、また抗 DCX 抗体を用いた新生ニューロンの評価を行う。先の論文で、申請者は G-CSF の圧迫性脊髄症モデルに対するアポトーシス抑制効果も示しており(Yoshizumi et al. Spine 2016)、本研究でも TUNEL 染色を行い、細胞死の評価を行う。

4. 研究成果

G-CSFは神経幹細胞の成長・分化を促進し(Schneider et al. Cell Cycle 2005)、急性脊髄損傷の際は、骨髄由来の幹細胞を損傷部位に動員し、生着させ(Koda et al. Brain Res 2007)、また脊髄には内因性の幹細胞が存在する(Stenudd et al. JAMA Neurol 2015)。すなわちG-CSFは、自らが脊髄の損傷部位に動員した骨髄由来幹細胞や内因性の神経幹細胞を神経細胞に分化させることによって神経保護効果を発揮するメカニズムが想定されており、これにSOCS7由来の膜透過性神経分化誘導ペプチドのコリン作動性神経細胞への分化誘導作用による相乗効果に期待し、運動機能低下が進行性に低下している圧迫性脊髄症モデルラットに対してG-CSFとSOCS7由来ペプチドの投与を行ったが、その運動機能改善効果は一時的であった。G-CSF単独投与と比較しても、生理学的脊髄変性変化や運動機能変化に有意な差をもたらさないことが判明した。病理学的変化も有意な変化をもたらさなかった。またSOCS7由来ペプチド単回経静脈投与群では前述2群(G-CSF+SOCS7ペプチド投与群、G-CSF単独投与群)と比較して有意に運動機能改善効果は劣っていた。SOCS7由来ペプチドの生体内への投与は初めての試みであり、その単回静脈投与により損傷部位での期待された効果を発揮できなかったのではと考えられた。現在、多能性幹細胞である脂肪組織由来幹細胞(ASCs)を、SOCS7のBCボックスモチーフを含む膜透過性神経分化誘導ペプチドによりコリン作動性ニューロンへの分化誘導を行った後に、これを圧迫性脊髄症モデルラットに静脈内投与または髄腔内投与のを行い、その運動機能改善や神経保護効果を検討する研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tadokoro Takahiro, Bravo-Hernandez Mariana, Kobayashi Yoshiomi, Platoshyn Oleksandr, Navarro Michael, Marsala Silvia, Miyahara Atsushi, Yoshizumi Tetsuya, Shigyo Michiko, Kakinohana Manabu, Marsala Martin etc	4. 巻 3;30(8)
2. 論文標題 Precision spinal gene delivery-induced functional switch in nociceptive neurons reverses neuropathic pain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 2722-2745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2022.04.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuya Yoshizumi, Atsuhiko Kubo, Hidetoshi Murata, Masamichi Shinonaga, Hiroshi Kanno	4. 巻 21(14)
2. 論文標題 BC-Box Motif in SOCS6 Induces Differentiation of Epidermal Stem Cells into GABAergic Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 4947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21144947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuya Yoshizumi	4. 巻 46
2. 論文標題 Efficacy of Supraclavicular Scalotomomy Followed by External Neurolysis without Rib Resection for Post-traumatic Neurogenic Thoracic Outlet Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SPINE	6. 最初と最後の頁 E632-E638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000003859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Kanno, Shutaro Matsumoto, Tetsuya Yoshizumi, Kimihiro Nakahara, Atsuhiko Kubo, Hidetoshi Murata, Taro Shuin, Hoi-Sang U	4. 巻 15;24(4)
2. 論文標題 Role of SOCS and VHL Proteins in Neuronal Differentiation and Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 3880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043880.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanno H, Matsumoto S, Yoshizumi T, Nakahara K, Shinonaga M, Kubo A, Fujii S, Ishizuka Y, Tanaka M, Ichihashi M, Murata H.	4. 巻 1;24(3)
2. 論文標題 SOCS7-Derived BC-Box Motif Peptide Mediated Cholinergic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 2786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032786	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菅野 洋, 中原公宏, 善積哲也, 篠永正道, 久保篤彦, 村田英俊, 藤井聡, 石塚保行, 田中勝喜, 市橋正光
2. 発表標題 脂肪組由来幹細胞のSOCS 7 ペプチドによるコリン作動性ニューロンへの分化誘導
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 善積哲也 村田英俊 波良勝裕 濱田幸一 野地雅人 篠永正道
2. 発表標題 外傷後に生じた神経性胸郭出口症候群に対する斜角筋離断術と術後成績
3. 学会等名 第37回日本脊椎外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 善積哲也 稲垣浩 遠藤聡 波良勝裕 濱田幸一 野地雅人
2. 発表標題 2椎間高度脊柱管狭窄を来した頸椎椎間板ヘルニアが自然軽快した1例
3. 学会等名 第37回日本脊椎外科学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------