

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591626

研究課題名（和文）脊髄損傷モデルに対する G-CSF 動員末梢血幹細胞移植の治療効果

研究課題名（英文）Therapeutic effects of transplanted peripheral blood mononuclear cells which mobilized by G-CSF on spinal cord injury in mice

研究代表者

山崎 正志 (YAMAZAKI MASASHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50281712

研究成果の概要（和文）：顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の経静脈投与によって末梢血中に動員された造血系幹細胞を回収・濃縮して損傷脊髄内に移植する G-CSF 動員末梢血幹細胞移植に関して、本法の脊髄損傷に対する治療効果を検討した。NOD Scid マウスを用いて脊髄圧挫損傷モデルを作成した。1 週間後に、M 群にはヒト由来 G-CSF 動員末梢血単核球細胞(CD34 細胞純化なし)、CD34 群にはヒト由来 G-CSF 動員 CD34+末梢血幹細胞(それぞれ 1.0×10^5 個)を損傷部に直接注入する方法で移植した。Control 群には溶媒のみを注入した。行動評価 においては、細胞移植を行った M 群、CD34 群ともに、Control 群に比し移植後 6 週以降で有意な運動麻痺の回復が得られた ($p < 0.01$)。移植後 1 週で移植細胞は損傷部より約 2mm 頭尾側まで広範に残存しており、これらは血管系の細胞へと分化していた。移植後 4 週でも移植細胞は、損傷脊髄内に残存していた。これらの結果から、損傷脊髄において移植後早期に移植細胞による血管新生促進効果が発揮され、これが脊髄損傷マウスにおける行動学的な改善をもたらしたと考えられる。脊髄損傷に対する G-CSF 動員末梢血幹細胞移植治療の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）： We analyzed that intraspinal transplantation of CD34+ peripheral blood cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) facilitates angiogenesis in injured spinal cord and promotes functional recovery after spinal cord injury (SCI). NOD-Scid mice were subjected to contusion-induced SCI. Human CD34+ peripheral blood stem cells (1.0×10^5) mobilized by G-CSF were injected into the injured spinal cords (CD34 group) one week after SCI. Human mononuclear cell fraction (1.0×10^5) mobilized by G-CSF (M group) or saline (Control group) were also administrated. Mice in CD34 and M groups showed significant locomotor recovery of hind limb motor function from six to eight weeks after the transplantation ($p < 0.01$). A certain amount of transplanted cells were detected until four weeks, and they were differentiated into vascular endothelial cells. Those results indicate that intraspinal transplantation of human peripheral blood stem cells mobilized by G-CSF facilitates the angiogenesis in injured spinal cord and promotes functional recovery in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

近年、急性脊髄損傷に対する細胞移植療法については、基礎実験の結果が多数報告されている。中でも特に注目されているのはES細胞、iPS細胞であり、これらの細胞移植においてはその有効性が報告されており、臨床応用への期待が高まっている。しかし、ES細胞においては倫理的問題、拒絶反応の問題があり、また、iPS細胞においては移植細胞の高率な腫瘍化が報告され、臨床応用はいまだ困難な状態である[1]。この面から、急性脊髄損傷に対する移植細胞としては、骨髄間質細胞や、造血幹細胞などの自己由来の細胞の方が臨床応用へ向けての検討が進めやすい。

我々は顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与が急性脊髄損傷における急性期の二次損傷を軽減させることを基礎実験において明らかにしてきた。既に臨床試験を開始している[2]が、G-CSFを投与すると末梢血中に造血幹細胞が多数動員される。この動員された造血幹細胞の中に表面にCD34抗原を持つ骨髄単核球細胞の分画がある[3]。このG-CSFにより動員されたCD34陽性末梢血幹細胞は、他の虚血性疾患に治療において有用であるという報告が散見される。下肢虚血性疾患においては、基礎実験においてCD34陽性末梢血幹細胞を下肢虚血モデルに投与することで、移植細胞が虚血部位に取り込まれ血行を改善すると報告され[4]、臨床応用も既に始まりその効果も報告されている[5]。さらに、急性心筋梗塞においても、基礎実験においてCD34陽性末梢血幹細胞を投与することにより心筋が保護され、投与した細胞の一部が心筋となり機能回復に有用であると報告され[6]、臨床応用が始まっている[7]。これらの虚血性疾患におけるCD34陽性末梢血幹細胞の作用機序としては、虚血部位における血管新生の促進によるものであると考えられている。

しかし、下肢虚血疾患、心筋梗塞等の疾患と異なり、脊髄においては血液脊髄関門(Blood Spinal Cord Barrier)が存在するため、G-CSFを投与して末梢血中に動員される造血幹細胞のうち脊髄内に生着しうる数はごく一部となる。急性脊髄損傷においてはこのBlood Spinal Cord Barrierの破綻に伴い、G-CSFを投与することにより急性期には脊髄内に末梢血幹細胞が生着しうるが、Blood Spinal Cord Barrierの修復に伴い脊髄内への末梢血幹細胞の移動・生着は期待できなくなる。ただし、G-CSFの損傷脊髄内への作用

としては、我々は他に直接的なアポトーシス抑制[8]、オリゴデンドロサイトの細胞死の抑制と髄鞘保護、炎症性サイトカイン発生の抑制[9]などの効果を有することを明らかにしており、我々はG-CSFの静脈内投与の効果は、これらの直接的に二次損傷を軽減するというものが主であると考えている。そこで今回我々は、急性脊髄損傷においてG-CSFにて末梢血中に動員された造血幹細胞を回収、濃縮して損傷脊髄内に直接移植することで、更なる治療効果が得られるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス脊髄損傷モデルを用いて、G-CSF動員末梢血幹細胞移植の脊髄損傷に対する治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

8~10週齢の成雌NOD/Scidマウス(体重25-30g)に対し、第9胸椎椎弓切除を行いInfinite Horizon Impactorを用いて(60Kdyne)脊髄圧挫損傷モデルを作成。これらをランダムにControl群、M群、CD34群の3群に分割し、1週間後に、①Control群には溶媒のみ(3.0μl)を、②M群にはヒト由来G-CSF動員末梢血単核球細胞(mPB MNC) 1.0×10^5 個(3.0μl)を、③CD34群にはヒト由来G-CSF動員末梢血CD34陽性細胞(mPB CD34+) 1.0×10^5 個(3.0μl)を、それぞれ損傷脊髄内に直接注入した。これら3群に対し、以下の比較検討を行った(図1)。

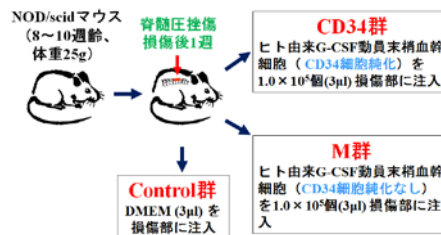


図1. G-CSF動員末梢血幹細胞移植の研究プロトコル

1) 後肢運動機能評価：受傷後1週間から8週間までの後肢運動機能回復をBasso Mouse Scale (BMS)を用いて評価し[10]、各群間で比較検討した。これに加え、移植後8週においてScanet 40 (Merquest社製)を用いて30分間歩行テストを行い、各群の運動量について比較検討した。

2) 免疫組織学的検討：移植後8週の時点で損傷脊髄を摘出し、2.5mm間隔で脊髄矢状断

切片を作成した。抗ヒトミトコンドリア抗体 (mito) を用いて免疫染色を行い、移植したヒト由来細胞が生着・残存しているか、また、残存している場合、損傷部から頭尾側にどの程度まで存在しているかを確認した。さらに血管内皮細胞の抗体である von Willebrand Factor (VWF) を用いて二重染色を行った。

統計学的検定には、3群間のBMSの経時的回復についてはRepeated-measures ANOVA, Turkey-Kramer法を、また各週における3群の比較及びScanet 40での運動量解析にはTwo-factor ANOVA, Turkey-Kramer法を用いた。

4. 研究成果

A. 研究結果

1) BMSにおいてはControl群に比しM群、CD34群の双方で損傷6週目から8週目において有意な行動の改善を認めた ($p < 0.01$)。損傷8週目におけるBMSはCONTROL群で 5.29 ± 0.49 であったのに対しM群では 6.38 ± 0.62 、CD34群では 6.50 ± 0.53 であり、移植群双方で対照群に比し有意な改善を認めていた ($p < 0.01$) (図2)。また、Scanet 40を用いた損傷後8週目での運動量の解析では、Control群、M群、CD34群の順に運動量は増加しており、Control群とCD34群の間には有意な運動量の差を認めた ($p < 0.01$)。

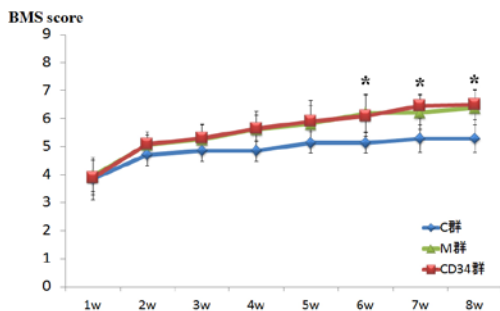


図2. 移植後の後肢運動機能の回復

*: M群、CD34群ともにControl群に比し有意に改善 ($p < 0.01$)

2) 免疫組織学的検討では、移植1週で移植細胞は損傷部頭尾側2mmに渡って残存していた。さらに、VWFの細胞は分化した移植細胞より広範に頭側まで存在していた。強拡大してみると、移植細胞はVWFで二重染色されており、血管内皮細胞への分化が示唆されたが、それ以上に内因性のVWF+の細胞が増加していた。一方、移植4週においては移植細胞の数に減少がみられたが残存しており、やはりVWFで二重染色される血管系細胞へ分化していた。一方、この時点では内因性のVWF+の細胞は見られなかった(図3-6)。移植細胞の生着数を計測すると、移植細胞は、CD34群、M群共に、4週の時点まで残存していた。一方、移植8週では一部でわずかに移植細胞の残存がみ

られたが、ほとんど移植細胞は消失していた。

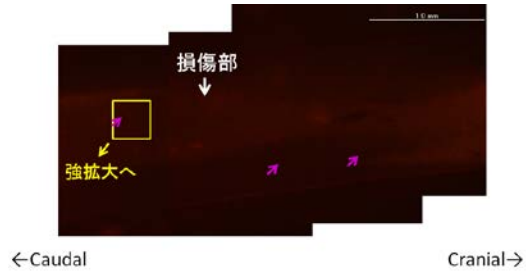


図3. CD34群移植後1週 (mito)
移植細胞は損傷部より頭尾側約2mmに存在

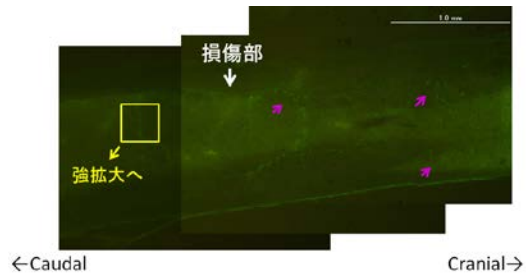


図4. CD34群移植後1週 (VWF)
VWF+細胞は分化した移植細胞より頭側まで存在

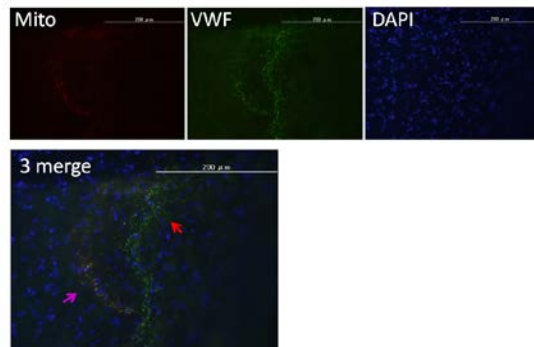


図5. CD34群移植後1週
移植細胞は血管内皮細胞へ分化

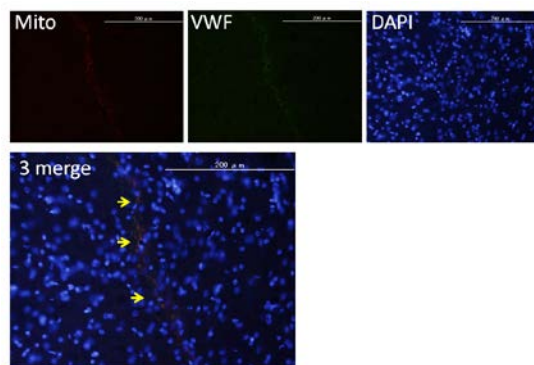


図6. CD34群移植後4週
移植細胞より分化した血管内皮細胞が管腔様構造を形成

B. 考察

中枢神経系においてはマウス脳梗塞モデルにおいてCD34陽性末梢血幹細胞の投与により梗塞周囲における血管再生が促進され、さらにCD34陽性末梢血幹細胞は内因性の神経再生に必須であると報告されている[11]。

本研究においても移植細胞は損傷脊髄内に生着し、血管系の細胞に分化していたことから、これらの知見に合致する結果となった。また、CD34 陽性末梢血幹細胞に比べ比較的臨床使用が容易な骨髄単核球細胞を脳梗塞亜急性期に投与することで、有意な神経組織の再生効果を得たとの報告もある[12]。本研究においても CD34 陽性末梢血幹細胞移植のみならず骨髄単核球細胞移植においても行動回復を認めており、CD34 陽性細胞のみを純化せずに骨髄単核球細胞の分画を抽出して直接移植することによっても治療効果があると示唆された。しかし、運動量解析の結果からその効果は CD34 陽性細胞のみを純化して移植する方が勝ると考えられた。

また、今回の結果から、行動学的改善は損傷後 6 週から 8 週の慢性期にみられており、さらに一部移植細胞は生着していたがその数は少なかった。これらより、移植後早期に血管新生が促進されている可能性が示唆される。

骨髄単核球細胞、CD34 陽性末梢血幹細胞は比較的臨床使用が容易であり、さらに自己由来の細胞であるため拒絶反応もなく、多疾患においては臨床応用が始まっている細胞治療法のソースである。このため、急性脊髄損傷に対する細胞移植治療の早期臨床応用が期待できると考えている。

[参考文献]

1. Kan EM, Ling EA, Lu J. Stem cell therapy for spinal cord injury. *Curr Med Chem* 2010; 17: 4492-4510.
2. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Yamauchi T, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Hashimoto M, Ito Y, Takahashi K, Koda M: Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. *Eur Spine J* 2012; 21: 2580-2587.
3. Henschler R, Brugger W, Luft T, Frey T, Mertelsmann R, Kanz L. Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD34(+)-selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood* 1994; 84: 2698-2703.
4. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Keamey M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3422-3427.
5. Kawamoto A, Katayama, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. Intramuscular Transplantation of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34-Positive Cells in Patients with Critical Limb Ischemia: A phase I/IIa, Multi-Center, Single-Blind and Dose-Escalation Clinical Trial. *Stem Cells* 2009; 27: 2857-2864.
6. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 2006; 113: 1311-1325.
7. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Keamey M, Chaudhry M, Burq A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; 115: 3165-72.
8. 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.
9. Kadota R, Koda M, Kawabe J, Hashimoto M, Nishio Y, Mannoji C, Miyashita T, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats. *PLoS One*

2012; 7(11): e50391.

10. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 2006; 23: 635-659.
11. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clinical Invest* 2004; 114: 330-338.
12. 田口明彦. 脳血管障害に対する新しい細胞治療の開発. *循環器病研究の進歩* 2007; 28: 53-58.

C. 結論

マウス脊髄圧挫損傷モデルにおいて、G-CSF 動員末梢血幹細胞移植により行動学的に有意な改善を認め、単核球細胞移植より CD34 陽性幹細胞を移植する方により良好な改善を認めた。さらに移植細胞は一部で損傷部を中心に生着し、血管系細胞へと分化していた。臨床応用の面からは G-CSF 投与により脊髄損傷急性期の二次損傷を軽減し、さらにその後動員される幹細胞を回収し損傷部へ移植することで更なる脊髄損傷の機能回復が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Kato K, Yamazaki M, Okawa A, Furuya T, Sakuma T, Takahashi H, Kamiya K, Inada T, Takahashi K, Koda M. Intravenous administration of granulocyte colony-stimulating factor for treating neuropathic pain associated with compression myelopathy: a phase I and IIa clinical trial. *Eur Spine J.* 22(1): 197-204, 2013. 査読有
2. Yamazaki M, Sakuma T, Kato K, Furuya T, Koda M: Granulocyte colony-stimulating factor reduced neuropathic pain associated with thoracic compression myelopathy: report of 2 cases. *J Spinal Cord Med* 36(1): 40-43, 2013. 査読有
3. Kadota R, Koda M, Kawabe J, Hashimoto M, Nishio Y, Mannoji C, Miyashita T, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats. *PLoS One.* 7(11): e50391, 2012. 査読有
4. Sakuma T, Yamazaki M, Okawa A, Takahashi H, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Someya Y, Ikeda O, Yamauchi T, Hashimoto M, Aizawa T, Ono A, Imagama S, Kanemura T, Hanaoka H, Takahashi K, Koda M: Neuroprotective therapy using granulocyte-colony stimulating factor for patients with worsening symptoms of thoracic myelopathy, a multicenter prospective controlled trial. *Spine.* 37(17): 1475-1478, 2012. 査読有
5. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Yamauchi T, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Hashimoto M, Ito Y, Takahashi K, Koda M: Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. *Eur Spine J.* 21(12): 2580-2587, 2012. 査読有
6. Sakuma T, Yamazaki M, Okawa A, Takahashi H, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Mannoji C, Kadota R, Hashimoto M, Takahashi K, Koda M: Neuroprotective therapy using granulocyte-colony stimulating factor for patients with worsening symptoms of compression myelopathy, part 1: a phase I and IIa clinical trial. *Eur Spine J.* 21(3): 482-489, 2012. 査読有
7. 国府田正雄, 西尾豊, 門田領, 川辺純子, 佐久間毅, 高橋 宏, 加藤 啓, 大河昭彦, 山崎正志: 急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を用いた神経保護療法. *日整会誌* 86: 495-498, 2012. 査読無
8. 山崎正志, 国府田正雄, 佐久間毅, 高橋宏, 加藤 啓, 橋本光宏, 林 浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田 領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 染谷幸男, 鎌田尊人, 池田 修, 橋本将行, 須田浩太, 楳野知道, 上田明希, 伊藤康夫, 植田尊善, 相澤俊峰, 小野 睦, 今釜史郎, 金村徳相, 大河昭彦, 高橋和久: 急性脊髄損傷および圧迫性脊髄症急性増悪例に対する G-CSF 神経保護療法: 医師主導型自主臨床試験. *日整会誌* 86:

[学会発表] (計 10 件)

1. 国府田正雄・他. シンポジウム「脊髄損傷に対する再生医療最先端」. 脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子療法. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012 年 10 月 26-27 日, 名古屋国際会議場, 名古屋市.
2. 山崎正志・他. 急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を用いた神経保護療法: 多施設前向き比較対照臨床試験. 第 15 回日仏整形外科学会, 2012 年 9 月 22 日, 東京ドームホテル.
3. Takahashi H, et al. Transplanted CD34+ peripheral blood cells mobilized by G-CSF promote motor recovery after spinal cord injury in mice. 51st annual scientific meetings of the international spinal cord society, 2012 年 9 月 3-5 日, Queen Elizabeth II conference centre, London, 英国.
4. Takahashi H, et al. Transplanted CD34+ peripheral blood cells mobilized by G-CSF promote motor recovery after spinal cord injury in mice. The annual meeting of the cervical spine research society (European section), 2012 年 5 月 28 日 6 月 1 日, RAI AMSTERDAM, Amsterdam, オランダ.
5. 国府田正雄・他. パネルディスカッション「脊髄再生の最先端」. 脊髄再生に対する顆粒球コロニー刺激因子療法. 第 85 回日本整形外科学会学術総会, 2012 年 5 月 17-20 日, 国立京都国際会館, 京都市.
6. 山崎正志・他. シンポジウム「脊髄再生研究の臨床応用における課題とその最先端: 基礎から臨床へ」. 急性脊髄損傷および圧迫性脊髄症急性増悪例に対する G-CSF 神経保護療法: Phase I/IIa 臨床試験. 第 85 回日本整形外科学会学術総会, 2011 年 5 月 12-15 日, パシフィコ横浜, 横浜市.
7. 高橋宏・他. マウス脊髄損傷モデルに対する G-CSF 動員末梢血幹細胞移植の治療効果 第二報. 第 41 回日本脊椎脊髄病学会, 2012 年 4 月 19-21 日, 石橋文化センター.
8. 山崎正志・他. シンポジウム「脊髄損傷における再生医療の現状と展望」. 急性脊髄損傷および圧迫性脊髄症急性増悪例に対する G-CSF 神経保護療法: 医師主導型自主臨床試験の成績. 第 46 回日本脊髄障害医学会, 2011 年 11 月 18-19 日, 第 46 回日本脊髄障害医学会, 泉佐野市.
9. 国府田正雄・他. パネルディスカッション「臨床への橋渡し研究の現状-2 脊

髄」. 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. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010 年 10 月 14-15 日, 国立京都国際会館, 京都市.

10. 山崎正志・他. シンポジウム「脊髄・神経再生の基礎と臨床の進歩」. 急性脊髄損傷および圧迫性脊髄症急性増悪例に対する G-CSF を用いた神経保護療法: phase I・IIa 臨床試験. 第 83 回日本整形外科学会学術総会, 2010 年 5 月 27-30 日, 東京国際フォーラム, 東京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 正志 (YAMAZAKI MASASHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 50281712

(2) 研究分担者

大河 昭彦 (OKAWA AKIHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 30312945
村田 淳 (MURATA ATSUSHI)
千葉大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 20344997
古矢 丈雄 (FURUYA TAKEO)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 00507337