

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462215

研究課題名(和文)非骨傷性頸髄損傷に対する新規治療：顆粒球コロニー刺激因子の有効性の検討

研究課題名(英文)Granulocyte colony-stimulating factor improves motor function in rats developing compression myelopathy and cervical cord injury without bony disorders

研究代表者

村田 英俊(MURATA, Hidetoshi)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：40398524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨傷を伴わない非骨傷性頸髄損傷は高齢者に頻発するが、最善の治療は未だに確立されていない。近年、急性脊髄損傷において顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の効果が注目されている。一方で私たちはラット慢性脊髄圧迫モデルにおいてG-CSFにより遅発性脊髄症が改善できることを見いだした。これらの知見から「圧迫性脊髄症」と「頸椎外傷」の病態を併せ持つ非骨傷性頸髄損傷に対してG-CSFは奏功する。

研究成果の概要(英文)：Spinal cord injury without bony disorders is common, and elderly people get affected because they sometimes have chronic spinal cord compression such as cervical spondylosis and ossification of posterior longitudinal ligament. Dynamic neck movement including hyperextension induces this indirect spinal cord injury, which doesn't often cause bony fracture and dislocation. G-CSF is a hematopoietic cytokine used clinically to treat neutropenia. Recently, neuroprotective effects of G-CSF have been reported in spinal cord disorders. We created the rat model with spinal cord injury without bony disorders, which was induced by cervical hyperextension under the chronic spinal cord compression model. We found that G-CSF improves motor function in the rat model of chronic compression and spinal cord injury without bony disorders, and preserves anterior horn motor neurons in chronic compression model. We are analyzing optimal treatment for spinal cord injury without bony disorders.

研究分野：外科系臨床医学・脳神経外科学

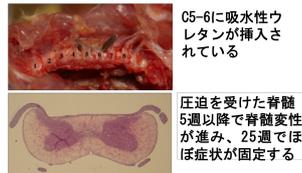
キーワード：脊髄障害 顆粒球コロニー刺激因子 神経再生 治療

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は重篤な後遺症をきたすものとして、年間人口 100 万人あたり約 50 人が発生しているとされる。この多くは生涯肢体不自由で生活しなければならない。従来は交通事故や労働災害など脊椎骨折や脱臼を引き起こす高エネルギー外傷によるものと認識されてきた。しかし、最近では、路上での転倒や家庭階段からの転落など軽微な外傷で重度の脊髄損傷を引き起こす例が増加している。すなわち、骨折、脱臼などの骨傷を伴わない「非骨傷性脊髄損傷」とよばれるものである。その原因は、加齢に伴う頸椎症や靭帯骨化などによる慢性圧迫脊髄症が潜在し、頸椎過進展などの動的因子が加わることにより、脊髄損傷をきたしたものである。「圧迫性脊髄症」を基にした頸髄損傷と言え、高齢化社会を迎えた現在、非骨傷性脊髄損傷は無視できない存在となっている。頻度は高いが、骨傷のない間接外傷であるがために、至適治療のエビデンスも乏しい。その大きな理由の一つとして適切な動物モデルがなかったことがあげられる。ラットやマウスといった多くの脊椎動物はヒトと違って極めて頸椎の可動域が大きい。例えばラット頸部を 180°後屈したところで生理的可動範囲内であり、何ら症状を引き起こさない。非骨傷性頸髄損傷はヒトでは容易に生じて、動物では生じがたいのである。

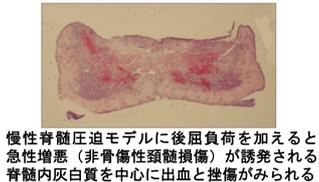
一方、申請者の村田英俊は、2005 年以降、連携研究者である金らが開発したラット慢性脊髄圧迫モデル (遅発性頸髄症モデル) (Kim, Ann Neurol, 2004) の研究に携わっていた(図 1)。

図1 ラット慢性脊髄圧迫モデル(遅発性頸髄症モデル)



その際、運動等で頸部が後屈された際に前肢優位に運動障害を示すラットが出現することに気づいた。これは私たちが臨床でしばしば経験する「中心性脊髄損傷」とよばれるものとよく似た症状であった。「中心性損傷」とは、脊髄中心部(灰白質および白質内側)の損傷で、非骨傷性頸髄損傷で多くみられる。そこで、この圧迫モデルに対して頸部後屈負荷の至適実験を行うと、臨床とほぼ同様の非骨傷性頸髄損傷を誘発できることが判明した(村田英俊、脊椎障害医学会雑誌 2008、脊椎脊髄 2008)(図 2)。

図2 急性増悪(非骨傷性頸髄損傷)モデル



その後の研究から、損傷の程度と範囲は潜在する脊髄圧迫の期間、すなわち頸髄症性変化に大きく依存することが判明した(村田英俊

脊椎外科 2008, 脊髄障害医学会雑誌 2009)。これは、非骨傷性頸髄損傷が「圧迫性脊髄症」をふまえた「頸椎外傷」を再認識させるものであった。こうした「圧迫性脊髄症」と「頸椎外傷」の両者の側面をもつ病態において、最適な治療は未だ明らかではなく、議論の余地が多い。手術の是非をとってみても、受傷後すぐに圧迫を解除すべきという意見(Anzai, 2003, 須田 2008)や保存的治療後悪化する場合にのみ手術すべきという意見(Hayashi, 1995, 川本 2008)、そして保存的治療のみ(手術の有効性は少ない)を推奨する意見(Guest J, 2002, 植田 2006)と論議は続いている。

一方、脊髄損傷の薬物療法として、メチルプレドニゾロン(MPSS)大量療法がエビデンスのある治療法とされてきた。しかし、近年、ランダム化臨床試験にて MPSS 大量療法の有効性を疑問視する報告が相次ぎ(Pointillart V 2000)、呼吸器・消化器合併症などの副作用の報告も多い(Matsumoto T 2001)。従って以前に比べて MPSS 療法は消極的になりつつある。その中で、急性脊髄損傷の治療として顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte Colony-Stimulating Factor, G-CSF) が注目を集めている。(Kawabe 2011, Kadota 2012, Sakuma 2012) G-CSF は、好中球の分化、増殖、生存に関与する造血系サイトカインとして知られ、日常臨床では化学療法後の好中球減少症の患者や造血幹細胞移植前のドナーに対して頻用されている。安全性も高い。G-CSF は 19.4kd の小さな糖タンパクであり、血液脳関門を通過するとされ(2007 Zhao, 2008 Pitzer)、急性脊髄損傷において、血管新生、神経細胞死の抑制、炎症性サイトカイン放出の抑制、脱髄の抑制の効果が報告されている(Nishio 2007, Koda 2007)。

私たちは、最近、ラット慢性脊髄圧迫モデルに対し、G-CSF 投与により脊髄症が阻止できる可能性を見いだした。

これらの知見をふまえ、「圧迫性脊髄症」と「頸椎外傷」の病態を併せ持つ非骨傷性頸髄損傷に対して、G-CSF が有用な治療法となる可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

「圧迫性脊髄症」と「頸椎外傷」の病態を併せ持つ非骨傷性頸髄損傷に対して、G-CSF が奏功する可能性は高い。私たちグループが開発した慢性脊髄圧迫モデルおよび非骨傷性頸髄損傷ラットモデルを用いて、同損傷に対する G-CSF の効果を明らかにし、最善の治療の基盤を作ることとを目的とした。

### 3. 研究の方法

【慢性脊髄圧迫ラットモデルの作成】(Kim(連携研究者), Ann Neurol, 2004) まず非骨傷性頸髄損傷モデルに先だって、ラ

ット頸髄慢性圧迫モデルを作成する。  
Wister rat (250-300g)を用い、全身麻酔の下、第 5,6 頸椎椎弓下に 0.7mm 厚の吸水膨張性ポリマー (アクアプレン-C<sup>R</sup>) を挿入して局所脊髄圧迫を作成する。このポリマーは徐々に体内の水分を吸収し約 9 6 時間で最大膨張率 2.5 倍の体積に増加する。徐々に膨張することにより脊髄圧迫状態にあっても脊髄損傷は生じず、はじめの数週は運動機能は全く正常である。5 週以降で運動機能が低下してくる。20 週以降で下肢痙性が生じ、いわゆる頸髄症モデルが完成する。時間経過とともに脊髄の慢性圧迫により、脊髄灰白質と白質の空胞変性と運動細胞 (前角細胞) の脱落を生じてくるのがわかっている(図 1)。

【非骨傷性頸髄損傷ラットモデルの作成】  
非骨傷性頸髄損傷モデルは、上記の慢性脊髄圧迫モデルを作成した後、後屈負荷を加えることによって作成される。アクアプレン挿入後 5 週のもの (運動機能が低下し始め、脊髄変性が起こり始めているもの) を用いる。これまでの予備実験の結果から脱臼等の骨傷をおこさず、かつ効果的に同損傷を引き起こす方負荷が決定されている。すなわち、ラットを全身麻酔後、下顎歯にその先に体重の 1/2 の錘をつなげ、それを 30cm 落下させることで、骨傷を与えることなく、モデルを作成できるのがわかっている。約 40% で非骨傷性脊髄損傷モデルが誘発できる(図 2)。損傷の程度と範囲は潜在する脊髄圧迫の期間、すなわち頸髄症性変化に大きく依存することが判明している。(村田英俊 脊髄外科 2008, 脊髄障害医学会雑誌 2009)。

【運動機能評価】  
アクアプレン挿入後から 1 週毎に行う。すなわち、強制運動能力として、前・後脚脚力、ローターロッド歩行時間を計測する。自発運動は、回転式運動量測定ケージと歩行運動センサーで計測する。前・後脚脚力は牽引式測定器を取り付け、ラットの習性である、「ものを掴み、前方へと進む」特性を利用し、前脚 (通常 300-400gw) と前後脚全体の筋力 (1000-1200gw) を測定する。  
非骨傷性頸髄損傷モデルの場合は、後屈負荷前、後屈負荷後 3 日後、1 週後、以後 1 週毎に運動機能評価を繰り返す。

【病理学的評価】  
4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、C5-6(アクアプレン挿入部)と Th3-4(正常部)の脊髄を切り出す。約 5 μm の切片を作成し、HE 染色で細胞および髄鞘の状態を病理学的に観察する。

さらに  
1)慢性脊髄圧迫モデルについては、吸水性ポリマー挿入後 10 週と 25 週で 3mm 幅 (5 μm 切片一枚おきに 300 枚分) の連続切片から前角細胞数の変化、TUNEL 法によるアポトーシスの変化を評価する。  
2)非骨傷性頸髄損傷モデルについては、負荷後 3 日、1 週、4 週、12 週でラットを上記と

同様に切片を作成し、上記の評価を行う。さらに損傷部分の領域、位置を正確にマッピングし、IMAGE J により脊髄全体に占める挫傷部分の面積、灰白質と白質における挫傷部分の面積を算出し分布を定量化する。  
前角部分では上記のように 3mm 幅の連続切片から前角細胞数の変化、軸索の伸長の変化を評価する。

【慢性脊髄圧迫モデルに対する G-CSF の治療効果の検討】

1) 予防実験  
ラット慢性圧迫モデルを作成と同時に G-CSF を与しておきし、脊髄症発症の予防効果の有無を確認する。各群 n=15 で行う。週 5 回 (月~金) 26 週間、以下の皮下注射を行う。

)脊髄圧迫治療群: G-CSF15μg/kg/1mL、  
)脊髄圧迫コントロール群: 生理食塩水 1mL、  
)sham コントロール群 (非圧迫): 生理食塩水 1mL  
各群対して、前述の運動機能評価 (1 週毎)、病理学的評価 (10 週、25 週) 及び TUNEL 法によるアポトーシスの変化を検討する。

2) 治療実験  
予防実験から、ローターロッド持続時間において G-CSF 群と生食群 (コントロール) とで有意差が生じるのは吸水性ポリマー挿入後、5 週からであり、前肢握力で有意差が生じるのは 8 週目からであった。そのため 8 週を G-CSF 治療の開始点とする。  
慢性脊髄圧迫モデルを作成し、第 8 週から週 5 回 (月~金) 26 週間、以下の皮下注射を行う。各群 n=15 で行う。

)脊髄圧迫治療群 G-CSF15μg/kg/1mL、  
)脊髄圧迫コントロール群: 生理食塩水 1mL、  
)sham コントロール群 (非圧迫): 生理食塩水 1mL  
各群対して、前述の運動機能評価 (1 週毎)、病理学的評価 (10 週、25 週) 及び、電気生理学的評価を行い、G-CSF による治療効果の有無を検討する。

【非骨傷性頸髄損傷モデルに対する G-CSF の治療効果の検討】

慢性脊髄圧迫モデルを作成し、5 週後に後屈負荷を加え、非骨傷性頸髄損傷を誘発する。運動機能が低下したことが確認できたものについて、皮下注射を 20 週間 (週 5 回) 継続する。

)脊髄圧迫治療群: G-CSF15μg/kg/1mL、  
)脊髄圧迫コントロール群: 生理食塩水 1mL、  
)sham コントロール群 (非圧迫): 生理食塩水 1mL  
各群に対して運動機能評価 (1 日後、1 週後、以後 1 週毎)、病理学的評価 (HE 染色、挫傷部のマッピング、前角細胞数のカウント) (損傷後 3 日目、1,4,12 週) を行う。

#### 4. 研究成果

【慢性脊髄圧迫モデルに対する G-CSF の治療効果】(Yoshizumi T, Murata H et al, Spine 2016)

##### 1) 予防効果

G-CSF を予め投与しておく、脊髄圧迫を来しても運動機能(ロータロッド、前肢筋力)はほぼ正常レベルに保たれ(図 3)、前角細胞数も有意に維持された(図 4)。アポトーシスも圧迫群に比べて少なかった(図 5)。

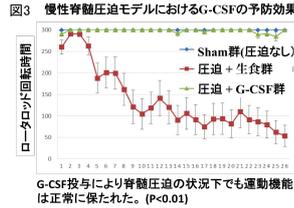


図4 前角細胞数の比較

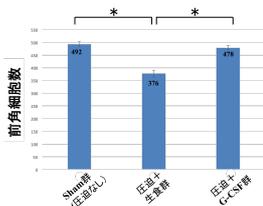
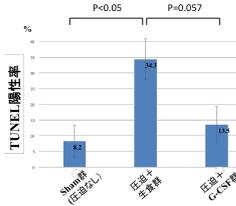
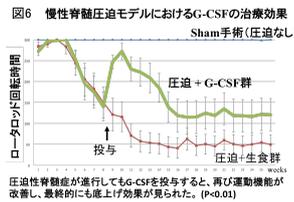


図5 アポトーシスの比較



##### 2) 治療効果

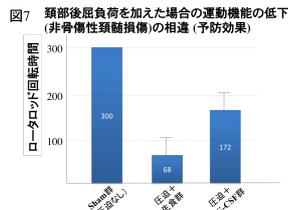
脊髄圧迫により脊髄症を来した場合でも、G-CSF の投与により、一定期間の運動機能の改善がみられ、最終的にもコントロール群にくらべて運動機能が良かった。



【非骨傷性頸髄損傷モデルに対する G-CSF の治療効果】

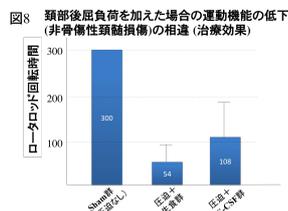
##### 予防効果

G-CSF を投与した状態で頸部後屈負荷(非骨傷性頸髄損傷)を加え 24 時間後に運動機能評価を行うと、G-CSF 群では sham 群よりは運動機能は低下したが、コントロール群に比べて有意に運動機能が保たれた(図 7)。



##### 治療効果

頸部後屈負荷(非骨傷性頸髄損傷)を加え、その直後にG-CSFを投与した場合、24 時間後での運動機能は、予防投与ほどではないが G-CSF 群で有意に運動機能は保たれた(図 8)。損傷後の経時的運動機能変化、前角細胞数および損傷部マッピングについては現在進行中



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshizumi T, Murata H, Yamamoto S, Kurokawa R, Kim P, Kawahara N. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Improves Motor Function in Rats Developing Compression Myelopathy. Spine (Phila Pa 1976). 2016 Dec 1;41(23):E1380-E1387. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1) The surgery of intramedullary spinal cord tumors focusing on the procedure of tumor dissection

Hidetoshi M, Takahiro Tanaka, Mitsuru Sato, Ryohei Miyazaki, Takahiro Hayashi ASIA Spine 2016 in K-Hotel (Seoul, Korea), Sep 23, 2016

2) ラット頸椎症性脊髄症モデルに対する顆粒球コロニー刺激因子の効果  
善積哲也, 村田英俊, 高瀬 創, 黒川 龍, 金 彪, 川原信隆  
第 29 回日本脊髄外科学会 虎ノ門ヒルズフォーラム (東京)2014/6/13

3) Granulocyte colony-stimulating factor prevents deterioration of motor function in rats with chronic compression of the spinal cord  
Tetsuya Yoshizumi, Hidetoshi Murata, Hajime Takase, Ryu Kurokawa, Phyoo Kim, Nobutaka Kawahara  
5<sup>th</sup> Asia Spine, Toranomon Hills Forum (Tokyo, Japan) 2014/6/14

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

村田英俊 (MURATA, Hidetoshi)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号：40398524

(2)研究分担者

菅野 洋 (KANNO Hiroshi )  
横浜市立大学・医学研究科・客員准教授  
研究者番号：40244496

(2016 年は施設移管のため分担削除)

川原信隆(KAWAHARA, Nobutaka)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：60214673

(2016 年は逝去のため分担削除)

(3)連携研究者

金 彪 (KIM, Pyo )  
獨協医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90231290

黒川 龍 (KUROKAWA, Ryu )  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10296600

(4)研究協力者

善積哲也(YOSHIZUMI, Tetsuya)  
小田原市立病院 脳神経外科 医員