

博士論文

脊髄損傷急性期における炎症制御に関する研究

早川謙太郎

# 脊髄損傷急性期における炎症制御に関する研究

所属 医学系研究科外科学専攻整形外科学

指導教員 田中栄 教授

早川 謙太郎

## 目次

	頁
<b>【緒言】</b>	4
<b>【第1章 自然免疫 preconditioning による脊髄損傷急性期の炎症制御】</b>	
序論	7
実験材料および方法	9
結果	19
考察	24
図表	29
<b>【第2章 非ウイルスベクターを用いた脊髄損傷急性期の遺伝子治療】</b>	
序論	36
実験材料および方法	39
結果	45
考察	49
図表	53

### 【第3章 血中バイオマーカーによる脊髄損傷急性期の重症度評価】

序論	60
実験材料および方法	62
結果	64
考察	66
図表	70
【総括】	77
【謝辞】	79
【引用文献】	80

## 【緒言】

脊髄損傷の病態解明および新たな治療法における、基礎研究の進歩は近年目覚ましく、世界各地では数多くの臨床試験も進行中である(1, 2)。しかし現実的には、今でも脊髄損傷は重篤な後遺症の残存する難治性疾患であり、患者自身の苦悩は言うまでもなく、現場の臨床医の頭をも悩ませ続けている。基礎研究における治療介入の多くは急性期のものだが、実際に医療現場で急性期の保存的治療法として確立したものは、ステロイド (methylpredonisolone sodium succinate) 大量静注による脊髄保護治療のみで、それすら evidence が確立されておらず賛否両論、というのが現状である(3, 4)。

脊髄損傷は、直達外力による挫滅損傷の後、数日から数週かけて周囲の細胞までがアポトーシスや壊死に陥り、損傷が拡大する事が知られている(5)。はじめの直達損傷を1次損傷、その後の拡大損傷を2次損傷として、往々にして分けて語られる(6)。性質上1次損傷は不可避なものであるため、必然的に治療標的は2次損傷に向けられる。現在世界各地で行われている基礎研究や臨床試験は、急性期に限ればほぼ全てが2次損傷の軽減を目的としたものである(1)。

2次損傷が起こるメカニズムは複雑で多岐にわたるが、「炎症」が一つのキーワードとなる。すなわち、1次損傷に伴って血液中もしくは脊髄に内在する炎症性細胞が集積・活性化し、炎症性サイトカインやケモカイン、一酸化窒素(NO)、

フリーラジカルなどが大量に産生され、浮腫の増大、ひいては周囲細胞のアポトーシスや壊死が進行し、損傷が拡大するというものである(7)。しかし一方で、炎症反応には組織修復を促す役割があることも知られている(8)。したがって、二次損傷を軽減させるためには、炎症という病態を把握した上で、ただ炎症反応を抑えるというのではなく、正しい方向へ制御する工夫が必要となる。

さらに実際的な治療戦略を考えると、脊髄損傷の急性期における炎症制御を試みる上では、病態に即した薬剤の投与が有力な手段となる。しかしながら、中枢神経自体は血液脳関門の存在によりアプローチが困難な上に、急性期の損傷脊髄内は虚血や炎症性細胞の集積などにより、薬剤のデリバリーを適切な場所に安定して達成することが非常に難しい環境となっている(9, 10)。ゆえに、安全かつ効率的なデリバリーシステムの確立は、脊髄損傷の薬剤治療において欠く事のできないものである。

また、それらと同時に考えねばならないのが、重症度評価の問題である。新たな治療介入を行う場合、その時点での正確な重症度評価が出来なければ、最終的な治療効果の判定が不正確なものとなる。ところが、脊髄損傷急性期に正確な重症度評価を行うのは、実際は非常に難しく、その事が基礎研究や臨床試験の遅れの一因となっている(11)。客観的かつ正確な重症度評価は、新たな治療法を確立するための必要条件であると言っても過言ではない。

そこで本研究は3章に分けて構成した。第1章では、自然免疫 preconditioning という手法を用いて、脊髄損傷急性期の炎症という病態を、macrophage/microglia の活性型という観点から捉えつつ、その制御を試みた。第2章では、東京大学疾患生命工学センターオリジナルの非ウイルスベクターを用いて、脊髄組織へのデリバリーを試みるとともに、脊髄損傷モデルに対する治療遺伝子の導入も合わせて行った。第3章では、脊髄損傷急性期の重症度評価を客観的に行うためのツールとして血中バイオマーカーに注目し、ヒト脊髄損傷患者における有用性を評価するパイロットスタディーを行った。

## 【第1章 自然免疫 preconditioning による脊髄損傷急性期の炎症制御】

### 【序論】

脊髄損傷では、直達外傷である一次損傷の後、macrophage/microglia をはじめとする炎症細胞が損傷部へ集積し、種々のサイトカイン放出とともに多様な炎症反応が惹起される(7, 12)。脊髄損傷の病態を考える上で、この炎症反応には、真逆の解釈が存在する。一つは、一連の炎症反応により、組織傷害が拡大増悪し、いわゆる二次損傷が起こるという考え方である(13)。これに基づいた治療戦略が大量ステロイドやミノサイクリンの全身投与で、炎症反応の鎮静化が目的となる(3, 14)。その一方で、炎症反応は逆に神経保護・修復的に働くとも言われており、これに基づいた治療戦略が活性型 macrophage 移植(8)で、局所の炎症反応を惹起もしくは補うのが目的である。このように一見矛盾した解釈が両立する背景には、炎症細胞の多様性があると考えられる。

近年の研究では、macrophage/microglia には多様な活性型があり、これらが神経系組織に共存していることが分かってきている(15)。特に、損傷脊髄においては classically activated macrophage/microglia と、alternatively activated macrophage/microglia の2種類が同定されており、簡易的に M1、M2 とも呼ばれる(16)。M1 細胞は toll like receptor (TLR) のリガンドや interferon (IFN)  $\gamma$  などによって活性化を受け、神経組織に対して傷害性を有する。M2 細胞は



interleukin (IL) -4, 10, 13 などによって活性化を受け、神経組織に対して修復作用を有する。脊髄損傷後の損傷脊髄においては、速やかに M1,M2 双方の活性化が惹起されるが、M2 活性化のみ数日で鎮静化することが知られている(16)。したがって、脊髄損傷後の M2 活性化を選択的に促進することで、神経修復効果を得ることが期待できると考えられる。

一方で、自然免疫系への介入によって保護効果を出すメカニズムとして、endotoxin tolerance (ET) が半世紀以上前より広く研究されている。ET とは、低容量のエンドトキシン曝露を受けた細胞もしくは臓器が、次のエンドトキシン刺激に対して耐性 (tolerance) を持つ現象のことを指す(17)。TLR4 の代表的なリガンドである lipopolysaccharide (LPS) は、グラム陰性桿菌の細胞壁外膜の構成成分よりなるエンドトキシンであり、LPS-TLR4 pathway を通じて ET 効果を出すことが知られている。中枢神経系(Central nervous system; CNS) においても、低容量 LPS の前投与 (LPS preconditioning) により、様々な形での ET が誘導される。この現象を応用して、脳虚血モデルにおいて、LPS preconditioning によって、虚血後に二次的に起きる炎症反応による組織損傷が軽減されることが知られており、その保護・修復効果について 1990 年代後半より広く研究されてきている(18-21)。さらに近年では、外傷性の中枢神経損傷に対しても、LPS preconditioning が有効で、macrophage/microglia の表現型を

調節することにより神経保護・修復効果がもたらされるという報告が出ている (22, 23)。しかしながら、LPS preconditioning によって macrophage/microglia の表現型がどのように変わり、神経保護・修復作用を発揮したのかというメカニズムについては不明な点が多い。

今回の研究で筆者は、LPS による preconditioning により、損傷脊髄における macrophage/microglia の M1/M2 活性型のバランスが変わり、神経修復効果が得られるのではないか、という仮説を立てた。この仮説を確かめるため、筆者は LPS preconditioning をマウス脊髄損傷モデルに対して施行し、macrophage/microglia の活性型についての解析を行った。

#### 【実験材料および方法】

##### 1. 動物

8 週齢の C57BL/6J 雌マウスをオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。飼育ケージ内の移動は自由とし、飼料および飲用水は常時摂取可能な状態で、12 時間ごとの明暗サイクルにて飼育した。全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「動物実験の飼養及び保管などに関する基準 (総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」および「国立障害者リハビリテーションセンター動物実験指針」に従って行った。

## 2. LPS による preconditioning

LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia Coli* O127:B; Sigma-Aldrich) を購入し、phosphate buffered saline (PBS) にて希釈した。8 週齢の C57BL/6J 雌マウスに対し、Preconditioning として脊髄損傷モデル作成に先立って 0.05mg/kg の濃度で 200  $\mu$ l 腹腔内に注射した。Control 群として、PBS のみを 200  $\mu$ l 腹腔内注射した。Preconditioning を行ったグループを PC 群として、control 群との比較解析を行った。

## 3. マウス脊髄圧挫損傷モデルの作成



Preconditioning の 48 時間後に、脊髄損傷モデルの作成を行った (上図)。ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg (Somno-pentyl; Kyoritsu Seiyaku) の腹腔内注射にて全身麻酔をかけた。背部を剃毛した後、皮膚切開し、皮下脂肪および傍脊柱筋を正中より分けて下位胸椎部の椎弓を露出し、第 9 胸椎の椎弓切除を行い、脊髄を露出させた。身体を固定し、専用のデバイス (Infinite Horizons Impactor; Precision Systems and Instrumentation LLC) を用いて 80 kilodynes の力で脊髄に圧挫を加えた。傍脊柱筋および皮膚を縫合し、元の

ケージに戻した。その後膀胱炎や創感染を起こしたものは解析から除外した。

#### 4. 脊髄サンプル採取

エーテルで深麻酔を施したマウスに PBS を灌流した。mRNA もしくは蛋白の解析や、フローサイトメトリーを行うためのサンプルはこの時点で、脊髄損傷部を中心に 6 mm の長さで採取した。組織学的検討を行うためのサンプルについては、PBS による灌流後さらに 4% paraformaldehyde (PFA) で灌流固定し、脊髄採取後は 4°C の環境下で 4% PFA に 4 時間、20% ショ糖液に 24 時間、さらに 30% ショ糖液に、サンプルが沈むまで保存した。

#### 5. 定量 RT-PCR

回収した脊髄サンプルから RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出精製した。mRNA を Takara RNA PCR Kit (AMV) ver. 3.0 (Takara) を用いて逆転写し、single stranded cDNA に変換した。Real-time PCR は ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて、SYBR Green I Dye アッセイもしくは Taqman probe-based アッセイにより行った。Internal control (内部標準) として GAPDH を使用した。各サンプルの測定値は 3 well での計測値の平均値とした。用いたプライマーは以下の通りである。

Arginase-1 (mouse): Forward (5'-3'); TGCACCACCAACTGCTTAGC

Reverse (5'-3'); GGATGCAGGGATGATGTTCT

CD206 (mouse): Forward (5'-3'); TCTTTGCCTTTCCCAGTCTCC

Reverse (5'-3'); TGACACCCAGCGGAATTTTC

iNOS (mouse): Forward (5'-3'); CCCTTCAATGGTTGGTACATGG

Reverse (5'-3'); ACATTGATCTCCGTGACAGCC

CD16 (mouse): Forward (5'-3'); TTTGGACACCCAGATGTTTCAG

Reverse (5'-3'); GTCTTCCTTGAGCACCTGGATC

CD86 (mouse): Forward (5'-3'); TTGTGTGTGTTCTGGAAACGGAG

Reverse (5'-3'); AACTTAGAGGCTGTGTTGCTGGG

VEGF-A (mouse): Forward (5'-3'); CGGAGGCAGAGAAAAGAGAAAGTG

Reverse (5'-3'); GGGAGAGAGAGATTGGAAACACAG

FGF-2 (mouse): Forward (5'-3'); CAAGGGAGTGTGTGCCAACC

Reverse (5'-3'); AGATTCCAGTCGTTCAAAGAAGAAA

PGF (mouse): Forward (5'-3'); GTCTGCTGGGAACAACCTCAACA

Reverse (5'-3'); CACCTCATCAGGGTATTCATCCA

IGF-1 (mouse): Forward (5'-3'); CTGGACCAGAGACCCTTTGC

Reverse (5'-3'); GGTGCCCTCCGAATGCT

TNF- $\alpha$  (mouse): Forward (5'-3'); ACGGCATGGATCTCAAAGAC

Reverse (5'-3'); GTGGGTGAGGAGCACGTAGT

IL-1 $\beta$  (mouse): Forward (5'-3'); CAGGCAGGCAGTATCACTCA

Reverse (5'-3'); ATGAGTCACAGAGGATGGGC

IL-6 (mouse): TaqMan probe (Mm00446190\_m1)

IL-4 (mouse): Forward (5'-3'); ACTCTAGTGTTCTCATGGAGCTGC

Reverse (5'-3'); AAAGCATGGTGGCTCAGTACTACG

IL-10 (mouse): Forward (5'-3'); GCTCCAAGACCAAGGTGTCTACAA

Reverse (5'-3'); CCGTTAGCTAAGATCCCTGGATCA

IL-13 (mouse): Forward (5'-3'); ATCTCAGCTGTGGACTCATTTTCC

Reverse (5'-3'); CAGTTTTCTGTAGGGATGGGATGG

MMP-2 (mouse): Forward (5'-3'); AACTACGATGATGACCGGAAGTG

Reverse (5'-3'); TGGCATGGCCGAACTCA

MMP-9 (mouse): Forward (5'-3'); CGAACTTCGACACTGACAAGAAGT

Reverse (5'-3'); GCACGCTGGAATGATCTAAGC

GAPDH (rodent): Forward (5'-3'); TGCACCACCAACTGCTTAGC

Reverse (5'-3'); GGATGCAGGGATGATGTTCT

## 6. 酵素免疫測定法 (ELISA)

回収した脊髄サンプルを T-PER Mix (protease inhibitor, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM NaF, and pH 7.4, 2 mM EDTA) (Thermo Fisher Scientific Inc.) に入れて直径 2 mm のジルコニアビーズと共にビーズ式細胞破碎機 (和研薬社) でホモジネートし、15000 rpm で 15 分遠心して蛋白を抽出した。総蛋白濃度は Protein Assay Kit II (BIO RAD 社) を用いて、Lowry 法にて定量した。ELISA kit (CUSABIO) を用いて、manufacturer's protocol に沿って arginase 1 および iNOS の蛋白濃度を定量し、総蛋白濃度で補正した。

## 7. 免疫組織染色

脊髄サンプルを凍結切片作成用包埋剤 OCT compound (SAKURA FINETEK) で包埋、試料凍結器 (東京理科器械社) を用いて 60 秒程度で急速凍結した後、凍結標本の矢状断をクライオスタット Leica CM3050S (Leica Microsystems) で 14 μm 厚にスライスし、凍結切片を作成した。切片は 2% Donkey Serum 含有 TBS/T (Tween 0.01%) で 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体を室温で 24 時間反応させた。2 次抗体は室温で 2 時間反応させた。ProLong Gold 退色防止剤 (Invitrogen) を用いてマウントした。用いた 1 次抗体および希

釈は以下の通りである。

抗 arginase1 抗体 (Goat) (Santa Cruz) 1 : 100

抗 Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) 抗体 (Rabbit) (Wako)

1 : 500

抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Mouse) (Millipore) 1 : 500

抗 Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) 抗体 (Hamster)

(Millipore) 1 : 400

染色した標本の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy, LSM5 PASCAL EXCITER; Carl Zeiss) を用いた。画像解析は WinROOF ソフトウェア (Mitani Co.) を用いて細胞数のカウントおよび血管長の測定を行った。

## 8. フローサイトメトリー

回収した脊髄サンプルより、Neural Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec) を用いて細胞懸濁液を作成した。Myelin debris は、37% Percoll による密度勾配遠心分離を行って除去した。細胞は FcR Blocking Reagent (Miltenyi



Biotec) で 4°C 10 分間ブロッキングした後、PerFix-nc Kit (Beckman Coulter) にて固定透過処理した。抗 CD45-FITC (BioLegend), 抗 Gr1-VioGreen (Miltenyi Biotec), 抗 iNOS-PE (BIOSS), 抗 Arginase1 (Santa Cruz Biotechnology) –Biotin (Biotin Labeling Kit; Dojindo) で室温にて 30 分間, 抗 Biotin-Vioblue (Miltenyi Biotec) で室温にて 15 分間反応させてラベルした。フローサイトメトリーには MACSQuant Analyzers (Miltenyi Biotec)を用いた。

#### 9. Magnetic cell sorting (MACS) による CD11b 陽性細胞の選択採取

フローサイトメトリーと同様に、損傷脊髄サンプルから細胞懸濁液を作成し、Myelin debris を除去、ブロッキングを行った。Anti-CD11b マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) で 4°C 15 分間反応させてラベルし、magnetic cell separator (Miltenyi Biotec) でソートして positive fraction (CD11b 陽性細胞) を選択採取した。

#### 10. Luxol Fast Blue (LFB) 染色

免疫組織染色と同様の手順で、凍結切片を作成した。95%エタノールで脱水、エタノール/クロロホルムで脱脂した後、再び 95%エタノールで脱水した。0.1% LFB solution (Solvent blue; MP Biomedicals) 56°C24 時間で染色した。95%エ

タノールと distilled water ですすぎ、lithium carbonate solution、70、95、100% ethanol で分別、キシレンで透徹したものを標本封入剤（ダイヤテックス；東京硝子器械）でマウントした。

染色した標本の観察には、光学顕微鏡（BX51; Olympus）を用い、脊髓矢状断中央に最も近い切片の画像を、画像取り込みソフト（In Studio; Pixera）を用いて取り込んだ。画像解析は WinROOF ソフトウェア(Mitani Co.) を用いて脱髓部の面積を測定した。

## 11. 行動学的解析

Basso Mouse Scale (BMS) による 9 点満点の scoring で脊髓損傷後のマウス後肢運動機能を評価した。原著論文に沿って、マウスの運動は open field での自由歩行とし、少なくとも 5 分間観察を行った(24)。

## 12. Western Blotting

Nuclear Extract Kit (Active Motif) を用いて脊髓サンプルより核蛋白質を抽出した。得られた可溶画分は 4x サンプルバッファ(Wako)と混和し、-30°Cで保存した。等量の蛋白質を 5-20%のSDSポリアクリルアミドゲル(e-PAGEL E-T520L; ATTO) で電気泳動し、泳動終了後のゲル上の蛋白質をPVDFメンブレ

ン(Immobilon-P, Millipore) に転写した。5%スキムミルクを加えたTBS/T溶液で1時間ブロッキングした後、目的とする蛋白の1次抗体と4°C24時間反応させた。2次抗体にはHRP-conjugated anti-goat IgGまたはanti-rabbit IgG(ともにPromega)を用い室温2時間反応させた後、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) により特異的なバンドを発光させた。Odyssey® Fc Imaging Systemを用いて化学発光を検出し、Image Studio ver. 2.0 ソフトウェアで定量を行った。内部標準としてLamin Bを用いた。用いた1次抗体および希釈は以下の通りである。

抗 pIRF-3 抗体 (Rabbit) (Cell Signaling) 1 : 500

抗 LaminB 抗体 (Goat) (Santa Cruz) 1 : 200

### 13. Interferon regulatory factor (IRF) -3 binding assay

Nuclear Extract Kit (Active Motif) を用いて脊髄サンプルより核蛋白を抽出した。IRF-3 activity ELISA キット (TransAM IRF-3; Active Motif) に10 µgの核蛋白をアプライした。IRF-3 activity ELISA キットのプレートには活性型IRF-3が特異的に結合する consensus binding site を含むオリゴヌクレオチドが打ちつけられており、manufacturer's protocol に沿ってサンドイッチ法の原理

で活性型 IRF-3 の定量を行った。

#### 14. 統計学的解析

結果は平均±標準偏差 (SD) として表記した。有意差の検定には 2 群間では Student's *t* 検定、多群間では one-way repeated ANOVA の後に Bonferroni 法あるいは Student's *t* 検定を用いた。 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 【結果】

##### (1) LPS preconditioning によって ET が誘導された

ET が起こると、炎症性サイトカインの発現が抑制されることが知られている。今回の LPS preconditioning モデルで、正しく ET が誘導されているかを確認するために、代表的な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現の評価を行った。その結果、TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現はいずれも、脊髄損傷後 12 時間以内の急性期に preconditioning を行った群 (PC 群) で有意に抑制されていた (図 1)。LPS preconditioning によって ET が誘導されたことが示された。

##### (2) LPS preconditioning によって脊髄損傷後に損傷部周囲の M2 活性化が促

## 進された

LPS preconditioning が脊髄損傷後の macrophage/microglia 活性化型に与える影響を調べるため、脊髄組織における M1 マーカー (iNOS、CD16、CD86) および M2 マーカー (arginase1、CD206) 発現の評価を行ったところ、脊髄損傷 1 日後および 3 日後の損傷脊髄において、M2 マーカーである arginase1 の mRNA 発現促進が、PC 群で有意に認められた (図 2A)。M1 マーカーに関しては、脊髄損傷 1 日後の CD86 の mRNA 発現が PC 群において有意に低い傾向を認めたが、その他は有意差を認めなかった (図 2B)。ELISA による、蛋白濃度の評価においても、脊髄損傷後 1 日後および 3 日後の損傷脊髄において、arginase1 の蛋白濃度が PC 群で有意に高く、iNOS の蛋白濃度には有意差が認められなかった (図 2C)。脊髄損傷 3 日後の免疫組織染色では、抗 Iba1 抗体および抗 arginase1 抗体を用いて観察した (図 2D)。損傷部周囲の Iba1 陽性細胞数、すなわち macrophage/microglia の総数には有意差が認められなかったが、Iba1 および arginase1 の 2 重陽性細胞、すなわち M2 細胞の数は PC 群で有意に多かった (図 2E)。以上の結果より、LPS preconditioning によって、脊髄損傷後 1 週以内の急性期において、損傷部周囲の M2 活性化が促進された事が示された。

### (3) M2 活性化は主に resident microglia で誘導されていた

Macrophage と microglia は、マーカーがほぼ共通しており、免疫染色では明確に判別することが困難であるため、フローサイトメトリーによる細胞群の分別を試みた(25)。脊髄組織から得られた細胞を抗 CD45 抗体、抗 Gr-1 抗体、抗 iNOS 抗体および抗 arginase1 抗体でラベリングし、フローサイトメーターにアプライすると、CD45 発現の高低によって resident microglia (CD45<sup>low</sup>) と infiltrating macrophage (CD45<sup>high</sup>) を判別する事が可能であった (図 3A)。さらにこれらの細胞群を同定してゲートをかけ、iNOS および arginase1 の発現の高低によってさらに M1 細胞群と M2 細胞群に分別すると、resident microglia では、脊髄損傷 1 日後および 3 日後において、M2 細胞群の M1 細胞群に対する割合が PC 群で有意に増加していた (図 3B)。一方、脊髄内の infiltrating macrophage と血中の peripheral macrophage においては、control 群と PC 群の間に M2/M1 比の有意差が認められなかった (図 3C)。以上の結果より、preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化は、resident microglia で主に誘導されている事が示された。

### (4) LPS preconditioning によって脊髄損傷後の血管形成が促進された

M2 細胞が angiogenic factor を産生することが知られているため(26, 27)、脊

髄損傷後の血管形成の評価を、血管内皮細胞のマーカーである PECAM の抗体を用いた免疫組織染色にて行った。損傷部周囲で染色された血管長を計測したところ、脊髄損傷 3 日後および 7 日後において、PC 群で血管長の合計が有意に大きかった (図 4A,B)。次に、magnetic cell sorting の手法を用いて、脊髄組織から macrophage および microglia のマーカーである CD11b 陽性細胞を選択採取した。Angiogenic factor である VEGF、IGF-1 の mRNA 発現評価を行ったところ、PC 群において脊髄損傷 3 日後において、VEGF の mRNA 発現が有意に上昇していた (図 4C)。以上の結果より、preconditioning によって脊髄損傷後の活性化が誘導された M2 細胞により、損傷部周囲の血管形成が促進された事が示された。

#### (5) LPS preconditioning によって脊髄損傷後の組織修復が促進され、良好な運動機能回復を示した

LPS preconditioning による脊髄損傷後の長期効果を、組織学的および運動機能学的に解析した。反応性アストロサイトのマーカーである GFAP と、macrophage および microglia のマーカーである Iba1 の抗体を用いて損傷部脊髄の免疫組織染色を行ったところ、損傷後 2 週の時点で、PC 群において反応性アストロサイトによるグリア瘢痕が、炎症性細胞をほぼ取り囲んでいるのに対

し、control 群では炎症性細胞はグリア瘢痕の外側にも広く散在していた(図 5A)。このことは、グリア瘢痕による炎症細胞群の packing が速やかになされている事を示唆している。また LFB 染色では、PC 群で脊髄損傷後 1 週から 2 週にかけて有意に損傷部の縮小が認められ、損傷後 6 週においても PC 群の損傷面積は control 群と比較して有意に小さい傾向にあった(図 5B,C)。次に、脊髄損傷後のマウス後肢運動機能を、標準的な評価法として世界的に広く用いられている Basso Mouse Scale (BMS) の scoring (9 点満点) を行うことで評価した。脊髄損傷後 3 週以降で、PC 群において有意に良好な後肢運動機能が認められた(図 5D)。以上の結果より、LPS preconditioning により脊髄損傷後急性期に M2 活性化が促進されたことで、亜急性期以降の長期にわたって組織学的、運動機能学的に良好な改善を認めた事が示された。

#### (6) LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化に先立って IL-10 の発現増加と IRF-3 の活性化を認めた

LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化を直接的に誘導した因子を調べるため、M2 活性化の主な誘導因子として知られている IL-4、IL-10、IL-13 の mRNA 発現の評価を行った(15)。すると、IL-4 および IL-13 の mRNA 発現は control 群と PC 群の間に差が無かったのに対し、IL-10 の mRNA 発現が、



脊髄損傷 12 時間後の急性期に PC 群で有意に上昇していることが分かった (図 6A-C)。さらに、転写因子として IL-10 発現を直接もしくは間接的に正に調節することが知られている、転写制御因子 IRF-3 の活性を調べた(17, 28)。Western Blotting でリン酸化 IRF-3 (pIRF-3) の蛋白量を、IRF-3 activity ELISA で、オリゴヌクレオチドとの結合能を持った IRF-3 (活性型 IRF-3) の蛋白量を定量評価した。IL-10 と同じく、脊髄損傷 12 時間後において pIRF-3 の蛋白量および活性型 IRF-3 の蛋白量が、PC 群で有意に上昇している事が認められた (図 6D-F)。

#### 【考察】

中枢神経損傷に対する LPS preconditioning は、主にげっ歯類の脳虚血モデルで研究が進められてきたが、2010 年を過ぎてからは脳外傷や脊髄損傷モデルの報告も出てきている(18-23)。LPS 投与のプロトコールに関しては、モデルによって大差はなく、おおよそ 0.01-1 mg/kg を損傷の 2-5 日前に投与することで、数日以内に組織反応や損傷の程度に影響が出るとされている。投与方法は腹腔内が大半であるが、皮下でも同様の効果が得られる (21)。LPS preconditioning が macrophage/microglia の表現型調節を介して神経保護・修復効果を持つことについては過去にも報告があったが、具体的な表現型については明らかにされて

いない(23, 29)。今回筆者は、LPS preconditioning によってプライミングを受けた内在性 microglia が、脊髄損傷後に M2 活性化を受け、そのことが組織修復と運動機能回復に寄与していることを示した。さらに筆者は、LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化に先立って IL-10 の発現増加と IRF-3 の活性化が促進されていることを示した。LPS preconditioning の機序として M1/M2 活性化に言及したのは本研究が初めてとなる。

LPS は単独で M2 活性化だけを誘導する事はなく、レセプターである TLR4 の下流である MyD88-NFκB pathway からの炎症性サイトカイン発現を介してむしろ M1 活性化を誘導する事が知られている(15)。また、LPS と同様に、脊髄損傷でも TLR4 が活性化する事が知られている(30-32)。TLR4 には MyD88 と TRIF という 2 つのアダプター分子が結合しており、それぞれ特異的な炎症反応を誘導する経路、すなわち MyD88-NFκB pathway と TRIF-IRF-3 pathway を有する(33)。ゆえに、今回のモデルでは LPS による先行刺激により活性化された MyD88-NFκB pathway が、続く脊髄損傷による刺激では ET 効果による抑制を受け、代わりにもうひとつの TLR4 の下流経路である TRIF-IRF-3 pathway が活性化されて IL-10 発現が促進され、その後の M2 活性化が誘導されたと考えられる。

興味深いことに、今回のフローサイトメトリーの結果では、LPS preconditioning によって M2 活性化が明らかに促進されていたのは

macrophage ではなく resident microglia であったことから、脊髄内の resident microglia が LPS によるプライミング効果を受けたことが示唆される。LPS の末梢投与によって CNS 中の microglia が広く活性化されることは既に報告されている(34, 35)が、LPS が血液脳関門を越えることはないとも言われており(36)、どのようにして CNS 中の microglia が活性化されるのか不明な点も多い。妥当な説明としては、CNS の血管内皮細胞を経由して LPS からのシグナルが血管内から中枢神経系へ伝達されるという仮説が考えられる。実際、血管内皮細胞が LPS によって活性化を受けることが mix culture では観察されている(37)。いずれにせよ、今回の LPS preconditioning には、resident microglia の M2 活性化が主要な役割を果たしている可能性が高く、脊髄損傷の病態と preconditioning の効果を知る上で意義深い発見と考えられる。

M2 活性化から組織修復、運動機能回復に至るメカニズムとして、今回の研究で血管形成の促進とグリア瘢痕の速やかな形成が寄与していることが示唆された。M2 細胞が M1 細胞より高い血管新生能を持つことは *in vitro* でも *in vivo* でも示されている(26, 27)。また、血管内皮細胞が血管新生を促進するとともに、Notch シグナルを介してグリオシスを促進することが分かっており(38, 39)、LPS preconditioning による M2 活性化の促進によって血管形成が促進されるとともにグリア瘢痕の形成が速やかになされたと解釈することは、これらの報告

とも矛盾しない。グリア瘢痕に関しては、軸索伸長の阻害などの負の側面がある一方で、瘢痕によるパッキング効果で炎症細胞の拡散を抑制するとともに瘢痕内部の貪食能を高め、脊髄損傷の軽減に寄与している(40, 41)。今回の研究でも、PC 群でグリア瘢痕が速やかに形成されたことで、その後の組織修復が進むとともに、良好な運動機能回復を示すことが明らかになった。脊髄損傷の急性期を標的とした LPS preconditioning による自然免疫機構の modulation が、長期的な効果に対しても重要な役割を果たすことが示唆された。

今回の研究では、LPS preconditioning による効果の key molecule の候補として IL-10 が同定された。IL-10 が脊髄損傷に対し神経保護・修復作用を持つ事は 2000 年頃より報告されており、リコンビナント蛋白の持続投与や、遺伝子治療、細胞移植との併用など、数多くの報告がある(42, 43)。しかし、持続投与に伴う感染や、過剰発現によるニューロパチーなど課題も多い(44, 45)。LPS preconditioning による神経保護・修復効果は、IL-10 以外の因子も寄与している可能性があるため、完全に同列で比較はできないが、少なくとも薬剤の一回投与で systemic に IL-10 発現亢進から M2 活性化を誘導することのできる preconditioning は、利便性の高い方法と言えるだろう。

M2 活性化を誘導する因子として、IL-4、IL-10、IL-13 が主に知られているが、IL-4,13 によって誘導される M2 細胞 (M2a) と IL-10 によって誘導される

M2 細胞 (M2c) は異なる phenotype を持つことが知られている(46)。一方、損傷脊髄において、M2 subtype による機能の違いについては、ほとんど明らかになっておらず、まとめて M2 として評価されている(47)。本研究でも M2 subtype には言及していないが、今後、脊髄損傷の研究においても、M2 subtype に分けて評価する必要があると出てくる可能性が高いと考えられ、今後の課題である。

本研究の結果から、自然免疫による preconditioning は、中枢神経損傷に対し、M2 活性化による組織修復を簡便かつ効果的に誘導する戦略として、有望であると考えられる。臨床応用を考える場合、前投与という性質から外傷性脊髄損傷の治療に実際に preconditioning を用いるのは難しいが、予防投与という形で、合併症としての脊髄損傷のリスクの高い脊椎難手術などに応用が期待できるだろう。理想は preconditioning の効果をもたらす因子をさらに特定し、postconditioning につなげることだが、これには網羅的解析を含めたさらなる研究が必要である。いずれにせよ、エンドトキシンを用いた preconditioning は、脊髄損傷後の神経保護・修復に有望な戦略として期待される。

【図表】

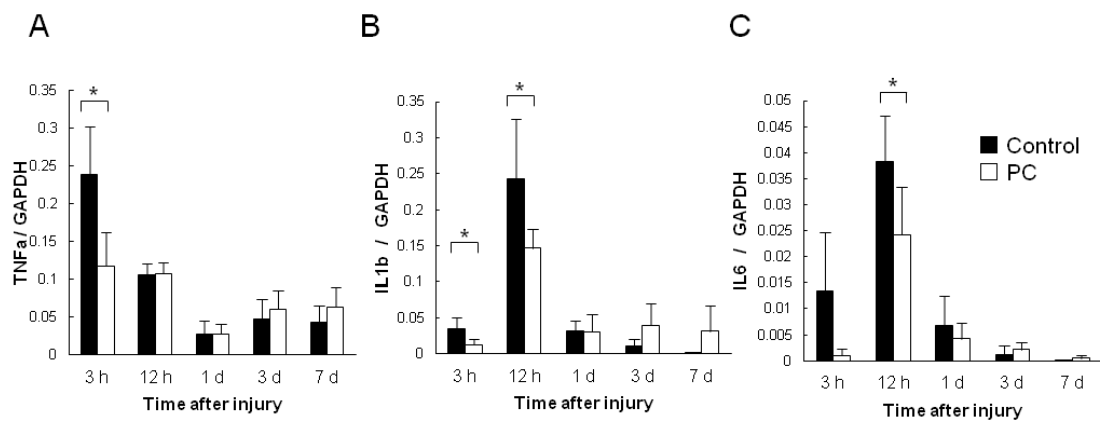


図 1 LPS preconditioning によって ET が誘導された

A-C : 損傷脊髄における抗炎症性サイトカインの mRNA 発現 (A: TNF- $\alpha$ 、B: IL-1 $\beta$ 、C: IL-6)。GAPDH の値で補正 (n = 6)、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

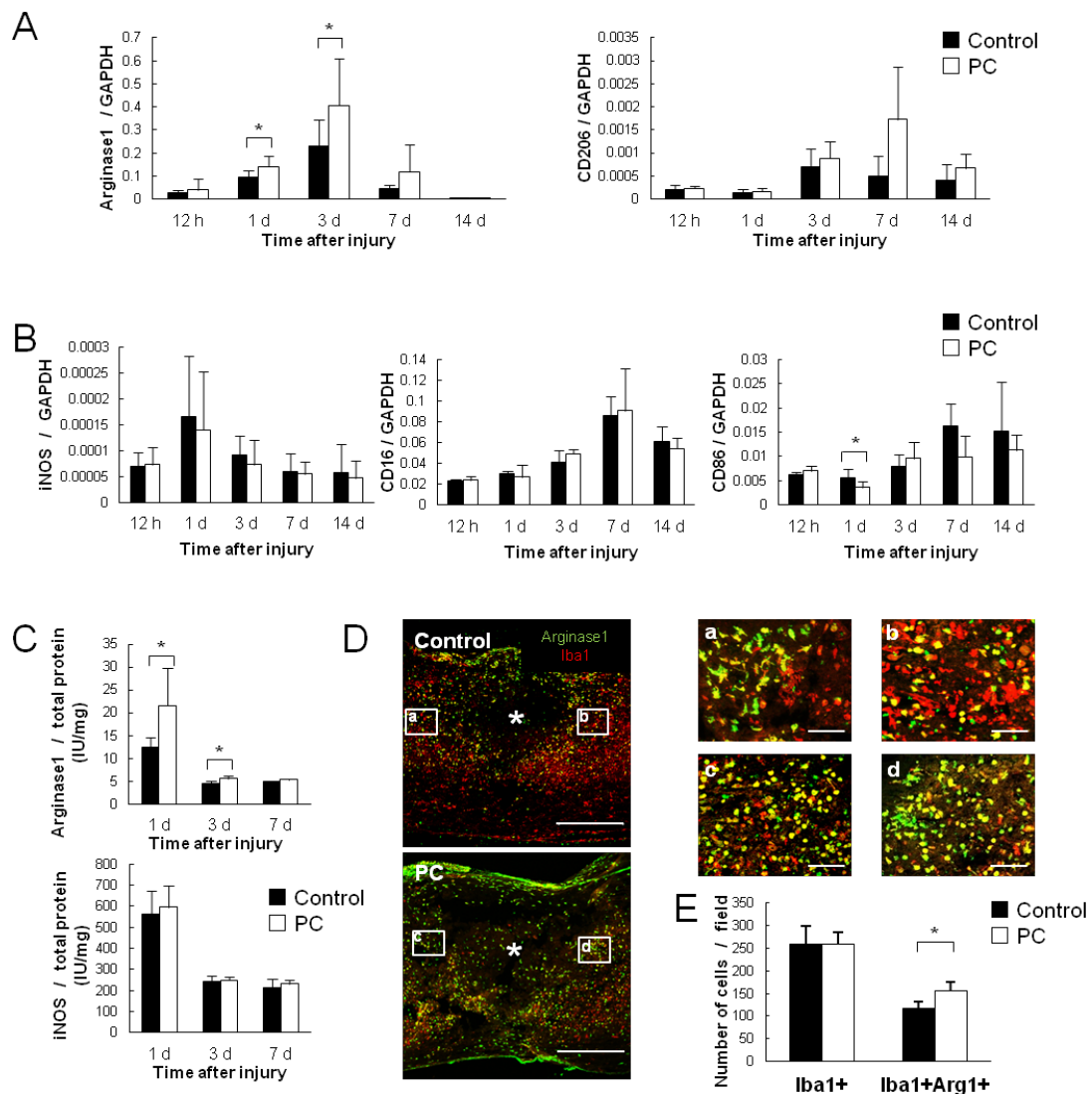


図2 LPS preconditioning によって脊髄損傷後に損傷部周囲の M2 活性化が促進された

A: 損傷脊髄における、脊髄損傷後の M2 マーカー (左より arginase1、CD206) の mRNA 発現。GAPDH の値で補正 (n = 6)、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

B: 損傷脊髄における、脊髄損傷後の M1 マーカー (左より iNOS、CD16、CD86)

の mRNA 発現。GAPDH の値で補正 (n = 6)、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

C: 損傷脊髄における、脊髄損傷後の arginase1 および iNOS の蛋白定量(ELISA)。

総蛋白質の値で補正 (n = 6)、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

D: 脊髄損傷 3 日後の免疫組織染色。脊髄中央の矢状断、\* : 損傷中心、スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

a-d: 拡大像、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。E: Iba1 陽性細胞お

よび、Iba1 + arginase1 の 2 重陽性細胞の定量。縦軸は一視野 (X20) あたりの

細胞数を表す。N = 5、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。



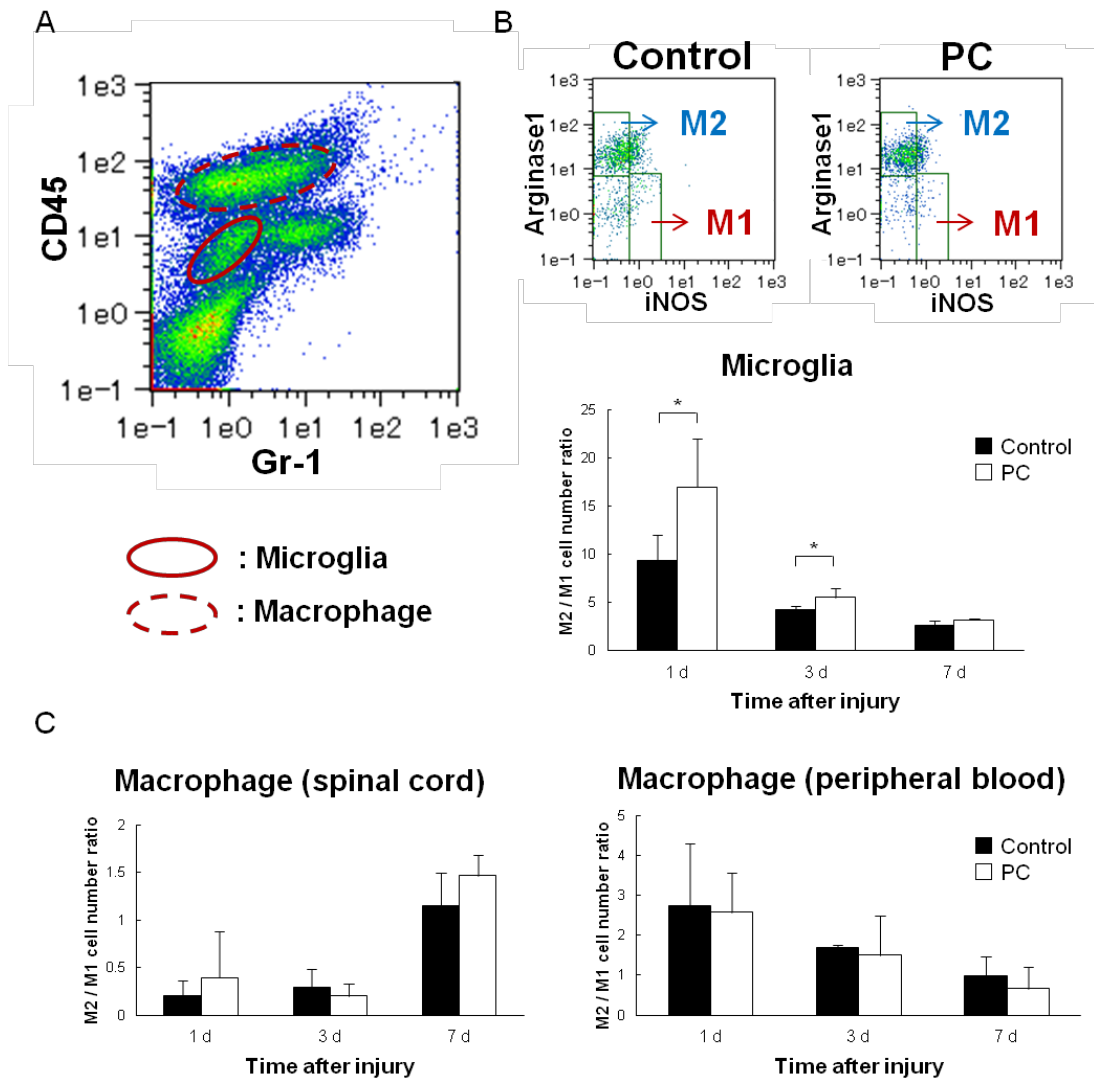


図3 M2 活性化は主に resident microglia で誘導されていた

A: 損傷後 3 日の損傷脊髄組織。CD45 low: microglia、CD45 high: macrophage とした。B: 損傷脊髄組織から microglia の細胞群でゲートをかけ、iNOS high: M1、arginase1 high: M2 として分別。M2 細胞数の M1 細胞数に対する比を定量化した。C: 脊髄内 macrophage、血中 macrophage を同様に M1、M2 に分別し、比率を定量化した。N = 4、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

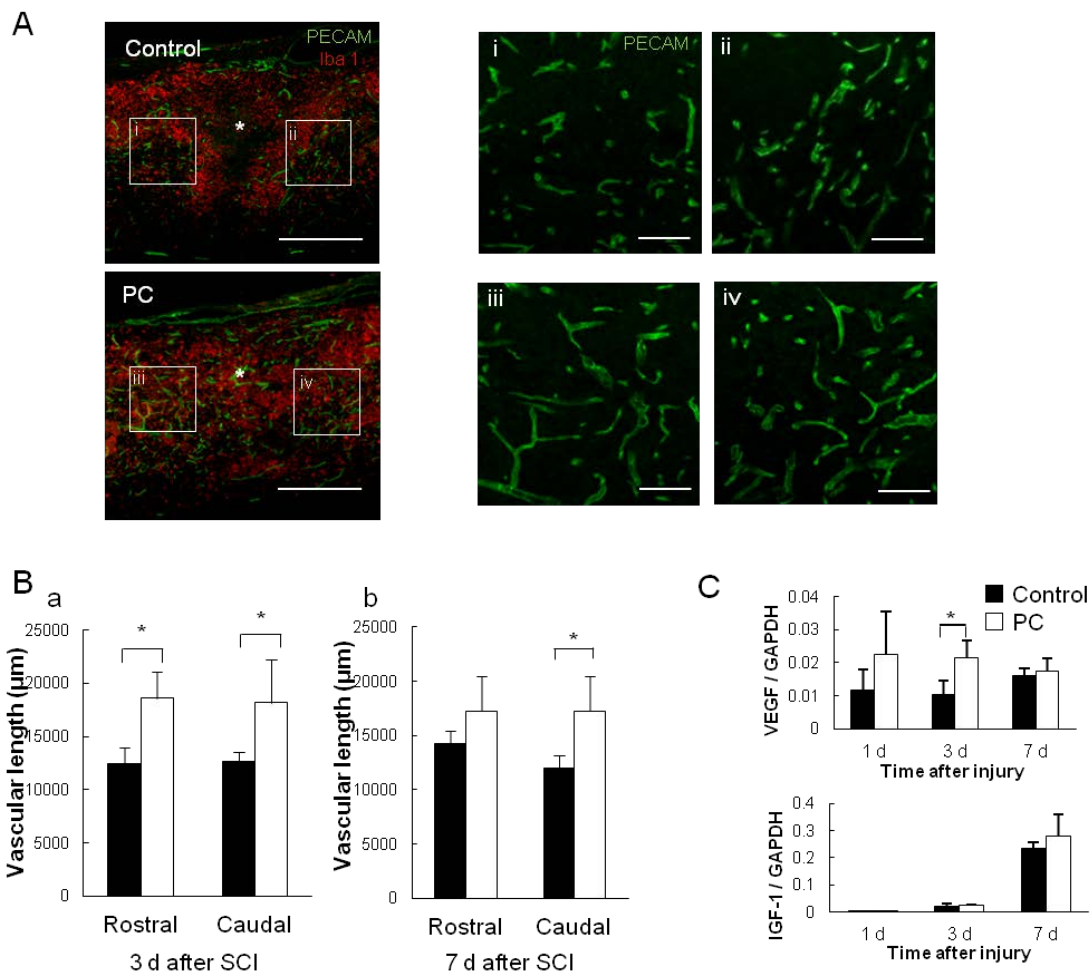


図 4 LPS preconditioning によって脊髄損傷後の血管形成が促進された

A: 脊髄損傷 3 日後の免疫組織染色。脊髄中央の矢状断、\* : 損傷中心、スケールバーは 500 µm。i-iv: 拡大像、スケールバーは 100 µm。B: 脊髄損傷 3, 7 日後における、一視野あたり (X40) の血管長の合計を定量化した。N = 5、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。C: 損傷脊髄から MACS で選択採取した CD11 b 陽性細胞における angiogenic factor (a : VEGF、b : IGF-1) の mRNA 発現。GAPDH の値で補正 (n = 5)、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

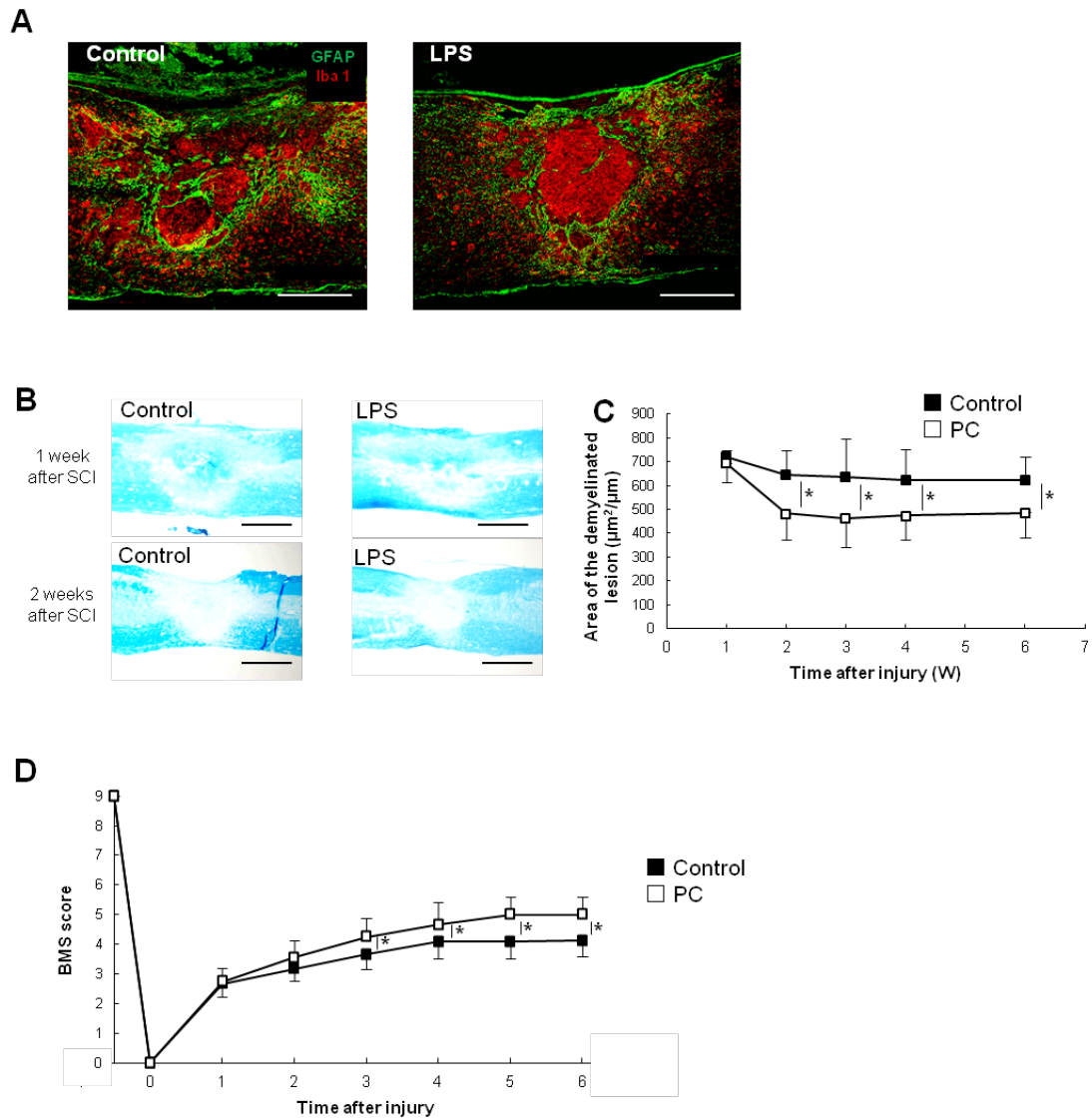


図5 LPS preconditioning によって脊髄損傷後の組織修復が促進され、良好な運動機能回復を示した

A: 脊髄損傷 2 週後の免疫組織染色。脊髄中央の矢状断、スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

B: 脊髄損傷 1, 2 週後の LFB 染色。脊髄中央の矢状断、スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

C: LFB 染色にて計測した損傷部（脱髄部）面積の経時変化。N = 5、Error bar:

SD、\* $p < 0.05$ 。D: BMS の経時変化。N = 10、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

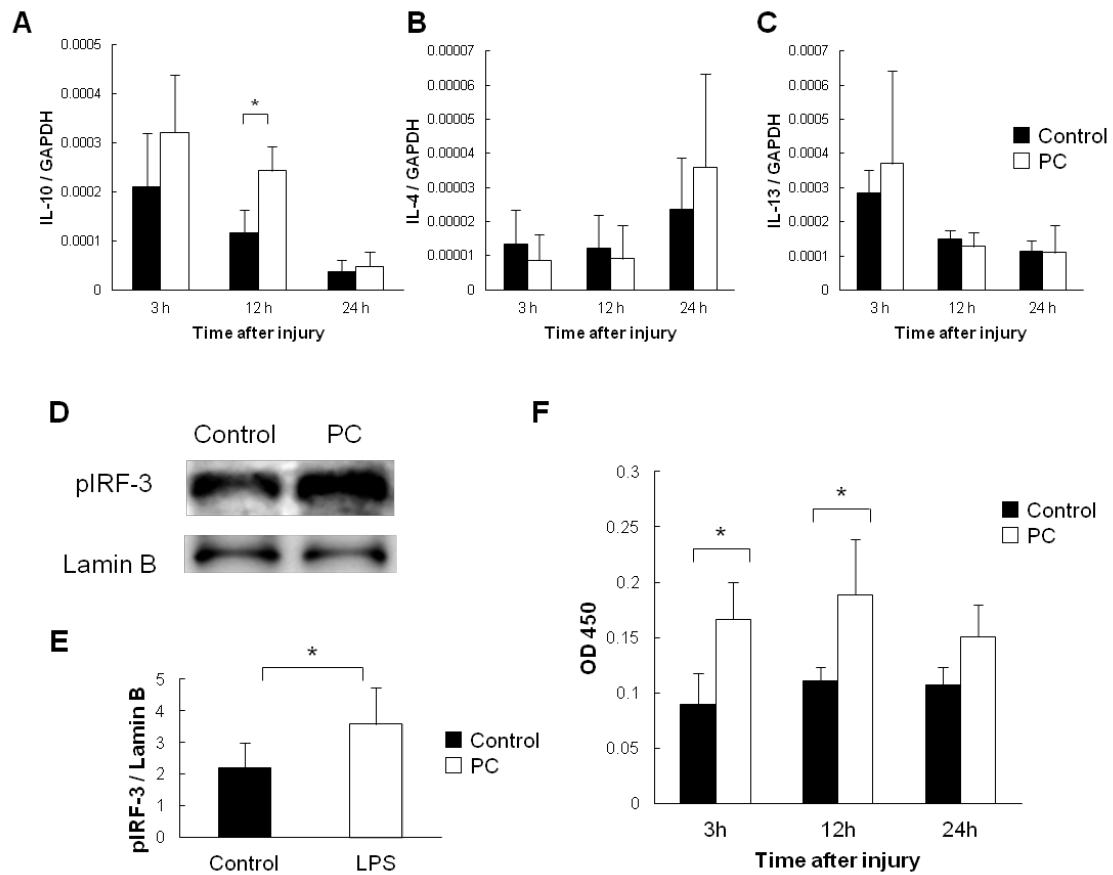


図6 LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化に先立って IL-10 の

発現増加と IRF-3 の活性化を認めた

A-C: 損傷脊髄における M2 誘導サイトカインの mRNA 発現 (A: IL-10、B: IL-4、

C: IL-13)。GAPDH の値で補正 (n = 6)、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。D、E: 脊髄

損傷 12 時間後の損傷脊髄における pIRF-3 の蛋白発現 (Western Blotting) お

よび定量評価。Lamin B の値で補正 (n = 5)、Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。F: 損

傷脊髄における IRF-3 活性 (結合能) 評価 (IRF-3 activity ELISA)。N = 5、

Error bar: SD、\* $p < 0.05$ 。

## 【第2章 非ウイルスベクターを用いた脊髄損傷急性期の遺伝子治療】

### 【序論】

急性期の損傷脊髄内は虚血や炎症性細胞の集積などによって炎症性サイトカインや蛋白分解酵素であふれており、神経系細胞も多くがアポトーシスや壊死に陥る(5, 7)。このような細胞内外の問題のため、投与した治療用物質が分解されずに安定したデリバリーを達成する事が非常に難しく、脊髄損傷急性期の治療介入に対する障壁の一因となっている。もとより中枢神経系 (Central nervous system; CNS) へのドラッグデリバリーは血管脳関門の存在により課題の多い分野であり(9)、くも膜下からのアプローチが、理論的には薬剤の濃度を有効に上げる方法で、健常脊髄に対しては臨床的にも効果を上げている(9, 48, 49)。しかし、くも膜下からの持続的な薬剤投与は、体重減少、歩行障害、カテーテル留置に伴う癒痕形成などの合併症が報告されており(50, 51)、これらを避けるには、脊髄損傷の急性期においても単回投与で効果を持続させるシステムが必要である。

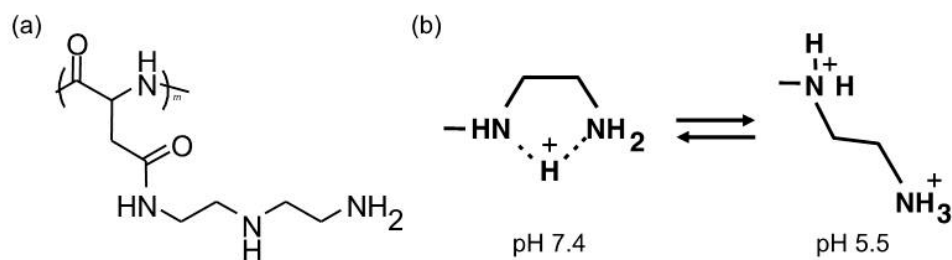
薬剤の投与形態として、ペプチドやリコンビナント蛋白などを用いる方法と、目的薬物の発現遺伝子を用いる方法が考えられる。しかし、ペプチドなどの蛋白質は半減期が短く脊髄損傷に対しては持続投与が必要なため、くも膜下アプローチによる投与には不向きとされる。一方、遺伝子治療は、発現した細胞自

身が持続ポンプの役割を果たすため、単回投与で局所への導入効率と効果の安定性が期待できる。脊髄損傷に対する治療法としても注目されており、将来性のある分野である(52-54)。

遺伝子治療におけるデリバリーシステムを構築する上では、キャリアの選択が重要になるが、従来はウイルスベクターを用いる手法が中心であった(55)。

しかし、実際に *in vivo* 投与に伴う死亡事故や白血病用の副作用の報告がなされている通り、ウイルスベクターの抗原性、毒性、腫瘍原性などの問題は解決していない(56-58)。今後、遺伝子治療の臨床応用を実現するために、安全性の高い非ウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリーシステムのニーズが高まっている。

非ウイルスベクターに共通する原理として、DNA が天然のアニオンであることを利用して、それと結合するカチオンを用いてナノサイズのコンプレックスを作り、DNA の安定化およびデリバリーに有効な諸性能を持たせるということがある。核酸と結合する共重合体のカチオン部分はベクターの機能において特に重要であり、今回筆者は、東京大学疾患生命工学センターで開発された poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide}(PAsp(DET)) ポリマーを用いることで、低毒性かつ高効率な pDNA 導入を目指した(下図 a)(59)。



PAsp(DET)の側鎖のジアミノエタン構造は、細胞外条件である pH 7.4 では主にモノプロトン化構造をとるが、エンドソーム条件である pH 5.5 では主にジプロトン化構造をとる(上図 b)。したがって、細胞外で PAsp(DET)はプロトン化率が低く膜傷害活性が弱いために毒性が低いですが、エンドソーム内ではプロトン化率の上昇に伴って膜傷害活性が強くなる。その結果エンドソーム膜が効率的に破壊され、ナノキャリアのエンドソーム脱出が促されるため、高い核酸導入効率を示す(60)。また安全性に関して市販のポリカチオン性核酸導入試薬である LPEI と比較したところ、PAsp(DET)は LPEI より細胞毒性が低いことが知られている(61)。

筆者はこの PAsp(DET)を遺伝子キャリアとして、くも膜下アプローチによりマウス健常脊髄への遺伝子導入を試み、他の代表的な非ウイルスベクターもしくは naked pDNA とのレポーター遺伝子発現の比較を行った。次に、実際の治

療用遺伝子を PAsp(DET)に内包し、マウス脊髄損傷モデルに対する治療効果を検討した。治療用遺伝子には脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) を用いた。BDNF は神経栄養因子の一つで、脊髄損傷に対し、細胞アポトーシスの抑制、軸索再生などの効果を持つことが知られている(62, 63)。今回は脊髄損傷急性期の治療として、BDNF の抗アポトーシス効果に着目した。ポリカチオン性ポリマーを遺伝子キャリアとして脊髄損傷モデルに対して用いた報告はこれまでなく、初の試みとなる。

## 【実験材料および方法】

### 1. 動物

8 週齢の C57BL/6J 雌マウスおよび 8 週齢の Sprague-Dawley 雌ラットをオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。その後の飼育は、第 1 章と同様に行った。

### 2. 試薬

ルシフェラーゼ (pGL4.13: Promega)、分泌型ルシフェラーゼ (Gaussia luciferase; GLuc) (NewEngland Biolabs) および BDNF (pUNO1-hBDNFa: InvivoGen) 遺伝子を含むプラスミド DNA (pDNA) を購入した。Competent



DH5α *Escherichia coli*. (TOYOBO) に形質導入してクローニングした後、NucleoBond Xtra EF (Nippon Genetics) にて精製した。プロモーター領域は、全て CAG プロモーターに置換した。

### 3. pDNA 内包キャリアの調整

(ポリマーは東京大学工学系研究科石井武彦助教より供与された。) PAsp(DET) ホモポリマーは過去の文献に従って合成された(59)。<sup>1</sup>H-NMR にて PAsp(DET) の重合度は 52 だった。PAsp(DET)/pDNA 複合体(ポリプレックス)はポリマーと pDNA を混ぜることで調製され、その混合比に関してはポリマー中のアミノ基(N)と pDNA 中のリン酸基(P)のモル比 (N/P 比) を 8 とした。Linear polyethyleneimine (LPEI, ExGen 500, MBIFermentas) ポリプレックスは、製造元が提示した最適条件である N/P = 6 にて調製した。リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) は製造元が示した最適混合比で混合した。pDNA の最終濃度は 200 µg/ml とした。

### 4. マウス、ラットに対するキャリアのくも膜下投与

イソフルラン (Escain; Mylan) 吸入による全身麻酔下に行った。腰部を剃毛した後、皮膚切開し、皮下脂肪および傍脊柱筋を正中より分けて、第 4/第 5 も

しくは第 5/第 6 腰椎の椎弓間を露出した。ハミルトンシリンジを用いて椎弓間に針を挿入し、前述の如く調整した pDNA 内包キャリア溶液 10  $\mu$ l (pDNA 2  $\mu$ g) を、くも膜下に注入した。注入時間には 60 秒以上かけ、溶液の漏出を防ぐために注入終了後も針先を 5 分間くも膜下に留置した。

#### 5. マウス脊髄圧挫損傷モデルの作成

キャリア投与 24 時間後に、第 1 章と同様の方法で、マウス脊髄圧挫損傷モデルを作成した。圧挫損傷の強度は 60 kilodynes に設定した。

#### 6. ルシフェラーゼ発現の評価

IVIS™ Imaging System (Xenogen) を用いて、健常マウス脊髄におけるルシフェラーゼ発光の経時的な体外モニタリングを行った。イソフルラン (Escain; Mylan) による吸入麻酔後、D-luciferin を腹腔内に注射し、5 分後に発光を超高感度 CCD カメラでイメージングした。manufacturer's protocol に従って画像を解析し、発光を定量化した。

健常ラットの脳脊髄液は後頭骨と第一頸椎の間を後方より展開し、30 G 針をくも膜下に挿入して採取した。ルシフェラーゼ発現の評価は Renilla Luciferase Assay System (Promega) を用いて、LB960 ルミノメーターにて発光を定量

した。

## 7. 脊髄サンプル採取

マウス脊髄サンプル採取は、第 1 章と同様に行った。

## 8. 定量 RT-PCR

RNA 抽出精製、逆転写を第 1 章と同様に行った。Real-time PCR は ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて、Taqman probe-based アッセイにより行った。Internal control (内部標準)として  $\beta$ -Actin を使用した。各サンプルの測定値は 3 well での計測値の平均値とした。用いたプライマーは以下の通りである。

TNF- $\alpha$ (mouse): TaqMan probe (Mm00443258\_m1)

IL-6 (mouse): TaqMan probe (Mm00446190\_m1)

IL-1 $\beta$  (mouse): TaqMan probe (Mm00434228\_m1)

$\beta$ -Actin: TaqMan probe (Mm00607939\_m1)

## 9. 行動学的解析

第1章と同様に、BMSで脊髄損傷後のマウス後肢運動機能を評価した。同時に、歩行時のステッピング、協調性、足の向きを加点方式で特異的に評価できるBMS subscoreを記録した(24)。さらに詳細な運動機能を定量評価するために、CatWalk system (CatWalk XT 10.0 software; Noldus)を用いた歩行解析を行った。CatWalkはマウス・ラット用の自然歩行解析システムで、専用スタンド上に設置されたwalkwayと、オレンジ光源を組み込んだ発光シーリング、底面に特殊ガラスを採用したグラスフロアからなり、歩行しているマウス・ラットを下から見ると「オレンジのバックグラウンド」、「ブラックのマウス・ラットのシルエット」、「圧力に応じてグリーンに発光する足跡」が同時に見えるようになる。これをwalkway下部に設置されたハイスピードHDカメラで撮影し、ソフトウェアで解析した。全てのデータは、3回の歩行記録の平均をとったものとした。パラメーターは、過去の報告により、脊髄損傷によって影響されるものを選択した(64, 65)。今回計測したパラメーターの説明を以下に示す。

CatWalk parameter	説明
<b>Print area</b>	後肢の立脚相に足底がグラスフロアに接触していた面積の合計
<b>Mean intensity</b>	後肢の足底の接地面積が最大時点での足底圧（ピクセル数）の平均
<b>Stride length</b>	後肢の足底接地位置から同側後肢の次の接地位置までの距離
<b>Base of support(BOS)</b>	左右後肢の足底接地位置の距離のうち、進行方向との垂直成分
<b>Print positions</b>	前肢の足底接地位置から同側後肢の次の接地位置までの距離

## 10. 細胞アポトーシスの評価

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) アッセイの手法を用いた。サンプルは、矢状断で 14  $\mu\text{m}$  厚にスライスされた損傷脊髄の凍結切片を使用した。切片の中から、脊髄中央に最も近いものを選択し、*In Situ Cell Death Detection Kit (Roche)* の manufacturer's protocol に従ってアポトーシス細胞を TMRed でラベルした。蛍光顕微鏡 (AxioVision; Carl Zeiss) でサンプルを観察し、損傷部周囲からランダムに 3 つ画像を取り込んだ。アポトーシス細胞 (ラベルされた細胞) の数を、WinROOF ソフトウェア (Mitani Co.) を用いて自動的に計測した。

## 11. LFB 染色

水平断で 14  $\mu\text{m}$  厚にスライスされた損傷脊髄の凍結切片を用いた。染色、標本の観察、画像の取り込みは全て第 1 章と同様に行った。

## 12. 統計学的解析

結果は平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM) として表記した。有意差の検定には 2 群間では Student's *t* 検定、多群間では one-way repeated ANOVA の後に Bonferroni

法あるいは Student's *t* 検定を用いた。  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 【結果】

### (1) PAsp(DET)投与によって、健常脊髄に対し良好な luciferase 発現を認めた

はじめに、ルシフェラーゼ発現 pDNA を用いて、健常マウス脊髄に対するレポーター遺伝子発現を評価した。キャリアは PAsp(DET)の他に、同じカチオン性ポリマー（ポリプレックス）である LPEI、カチオン性リン脂質（リポプレックス）であるリポフェクタミンを用い、加えて naked pDNA の投与も行った。pDNA の投与量は 10  $\mu$ l (2  $\mu$ g) に統一した。IVIS™ Imaging System により、同一個体におけるルシフェラーゼ発光の経時的な体外モニタリングを行ったところ、投与後 1 日後と 3 日後で、PAsp(DET)を投与したマウスにおいて、LPEI に比べてはるかに強い発光を認めた（図 7A,B）。リポフェクタミンと pDNA を投与したマウスでは、発光はさらに微弱であった。全てのマウスで、ルシフェラーゼの発光は日ごとに漸減していったが、PAsp(DET)を投与したマウスでは、投与後 14 日においても発光が検出された（3.60E+04 photons/sec; バックグラウンド値は 2.52E+04 photons/sec）。以上の結果より、マウス脊髄への遺伝子導入に用いる非ウイルスキャリアとして、PAsp(DET)は発現効率および持続性の観点から他と比べて十分優れている事が示された。さらに興味深いことに、ラ

ット脊髄で発現した分泌型ルシフェラーゼの発光は、脳脊髄液サンプルにおいて少なくとも4週間持続して検出された(図7C)。この結果により、脊髄損傷に対する治療用遺伝子として、分泌蛋白質であるBDNFを選択した妥当性が示された。

## (2) PAsp(DET)の組織毒性は、脊髄損傷に対して充分小さかった

脊髄損傷に対する臨床応用を見据えて、PAsp(DET)自体の脊髄組織に対する毒性を評価した。ナノ粒子が標的組織に毒性を及ぼす際、酸化ストレスとそれに伴う炎症反応が惹起されることから、脊髄における炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL-6)のmRNA発現を調べた。PAsp(DET)にはルシフェラーゼ発現pDNAを内包した。脊髄サンプルは健常マウス、脊髄損傷マウス、PAsp(DET)投与+脊髄損傷マウスのそれぞれから採取した。脊髄損傷単独で、24時間後の炎症性サイトカインはTNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、IL-6すべてにおいてmRNA発現が上昇したが、PAsp(DET)投与と脊髄損傷を両方加えたサンプルとの間に有意差は認められなかった(図8A-C)。以上の結果により、臨床応用の観点でも、PAsp(DET)のくも膜下投与が損傷脊髄に対して与える毒性は無視できるほど小さいということが示された。

### (3) PAsp(DET)-BDNF 投与によって、脊髄損傷後の運動機能回復が促進された

ここまでの実験にて評価した遺伝子導入システムを用いて、実際の脊髄損傷モデルに対する治療実験を行った。はじめに、治療用遺伝子を含まない PAsp(DET)自体の投与が、脊髄損傷後の運動機能回復に影響を及ぼさないことを、BMS 評価で確認した(図 9A)。次に、治療用遺伝子として BDNF 発現 pDNA をキャリアーに内包させて、くも膜下投与を行った。キャリアは PAsp(DET) (PAsp(DET)-BDNF) の他に、治療比較群として LPEI (LPEI-BDNF) を、無治療コントロールとして、ルシフェラーゼ発現 pDNA 内包 PAsp(DET) (PAsp(DET)-Luc) を用いた。

BMS および BMS subscore による、open field での運動機能評価では、脊髄損傷後 1 週以降に、PAsp(DET)-BDNF 投与群の後肢運動機能回復が、LPEI-BDNF や PAsp(DET)-Luc と比べて良好な傾向にあった(図 9B,C)。脊髄損傷後 4 週の BMS では PAsp(DET)-BDNF 投与群とその他で差がないように見えるが、BMS subscore では有意差を認めた (BMS subscore では、BMS では違いの出ない、歩行におけるステップングや協調性の小さな差が点数の差として反映されるため、このように一見矛盾するような結果となった。) (図 9C)。

次に、CatWalk system を用いて、さらに詳細な運動機能の解析評価を行った。過去の文献報告から、脊髄損傷により影響を受けるとされるパラメーターとし



て、先述した 5 項目 (Print area, Mean intensity, Stride length, BOS, Print positions) を評価項目として選択した。Print area および Mean intensity は PAsp(DET)-BDNF 投与群において、脊髄損傷後 1-4 週にかけて PAsp(DET)-Luc 投与群に比べて有意に改善していた。LPEI-BDNF 投与群では、PAsp(DET)-Luc 投与群に比べて改善傾向を認めるものの、統計学的有意差はなかった (図 10A,B)。Stride length と Print positions についても、脊髄損傷後 2-4 週にかけて同様の傾向を認めた。BOS に関しては有意差を認めなかった (図 10C-E)。以上の結果より、PAsp(DET)-BDNF 投与によって、脊髄損傷後 1 週以降の運動機能回復が促進された事が示された。

#### **(4) PAsp(DET)-BDNF 投与によって、損傷部周囲のアポトーシスが抑制され、組織修復が促進された**

PAsp(DET)-BDNF が脊髄損傷後の運動機能回復を促進したメカニズムを調べるために、TUNEL 染色によるアポトーシス評価と、LFB 染色による組織損傷の評価を行った。

TUNEL 染色では、脊髄損傷 3、7 日後において、脊髄損傷部周囲の TUNEL 陽性細胞が、PAsp(DET)-BDNF 投与群で有意に減少していた (図 11A,B)。全体の細胞数には有意差を認めなかった。

LFB 染色では、損傷を免れた LFB 陽性部分の面積を計測する事で、組織生存の評価とした。切片は水平断で、損傷中心の頭尾側 5 枚を 200  $\mu\text{m}$  間隔で解析した (図 12A)。脊髄損傷後 2、4 週の両方で、LFB 陽性部分の面積は PAsp(DET)-BDNF 投与群で有意に大きかった (図 12B-D)。

以上の結果より、PAsp(DET)-BDNF 投与により、脊髄損傷後 1 週以内の急性期において損傷部周囲の細胞アポトーシスが抑制され、その後の生存組織増加につながったことが示唆された。

#### 【考察】

本研究では 2 つの新たな知見を得た。1 つは PAsp(DET)のくも膜下投与が中枢神経系に対し、他の非ウイルスベクターと比較しても良好かつ安定した遺伝子導入効率を有したことで、もう 1 つは、PAsp(DET)に BDNF 発現 pDNA を内包し、実際に脊髄損傷モデルに対して有意な運動回復を示したことである。pDNA 内包ポリプレックスを脊髄損傷モデルに用いるのは過去に報告がないが、非ウイルスベクター全体でみても、今回の CatWalk のように詳細に運動機能を解析した報告はなかったため、今回の研究は価値が高いと考える。

脊髄損傷急性期は、遺伝子治療においては特に高い導入効率が求められる。これまで脊髄損傷モデルに対して非ウイルスベクターを用いた報告があまり多

くない大きな要因は、ウイルスベクターと比較した際の遺伝子導入効率の悪さであると考えられる。今回筆者は PAsp(DET)が他の非ウイルスベクターに比べ、脊髄組織に対して突出した遺伝子導入効率と持続性を有することを示した。これには、PAsp(DET)の細胞外における安定性と、細胞内でのエンドソーム脱出能、および低毒性が強く寄与している可能性が強い。また、PAsp(DET)の構造安定性は、発現の持続性にも寄与していると考えられた。もとより非ウイルスベクターは安全面ではウイルスに勝るものであるが、中でも PAsp(DET)は生分解性を有するため、とりわけ毒性が低いことが知られている。これは、PAsp(DET)が 37°C 条件下で自己触媒的に分解され、毒性がほとんどない Asp(DET)モノマーになるからである(66)。本研究においても、PAsp(DET)投与により脊髄損傷後の炎症反応や運動機能に与える影響はほぼ無いことが示されており、その低毒性を支持している。今回の研究による PAsp(DET)の導入効率と安全性の検証は、非ウイルスベクターとして、これまでにない有用性の高さを示したと考えている。

さらに筆者は、治療用遺伝子として BDNF 発現 pDNA を PAsp(DET)に内包させて投与し、運動機能をはじめとする治療効果を示した。特に CatWalk による解析では、PAsp(DET)が治療効果でも LPEI に勝ることが示された。BDNF は 1980 年代前半に同定され、CNS における神経細胞の機能や活性を促進する

事から広く注目されてきた(67-69)。近年は脊髄損傷モデルに対する CNS への BDNF 投与により、細胞死抑制、軸索再生、再髄鞘化など、様々な効果が報告されている(62, 70)。脊髄損傷の急性期においては、損傷後 1 週までアポトーシス細胞数が増加し続け、その後漸減することが報告されているが、BDNF 投与によって脊髄損傷後 2 週以内の neuron および oligodendrocyte のアポトーシスが抑制されている(63, 71, 72)。BDNF による抗アポトーシス効果の機序については、完全には解明されていないが、メインレセプターである Tropomyosin-related kinase B (Trk B) の下流である PI-3K/Akt 経路を介して JNK – p53 – Bax などの pro-apoptotic signaling を阻害する事が知られている(70, 73)。本研究でも、PAsp(DET)-BDNF 投与により、脊髄損傷後 1 週間以内での細胞アポトーシスが抑制されていることを示しており、これらの報告とも矛盾しない。

本研究における LFB 染色の結果は、損傷後 2, 4 週における損傷部周囲の残存ミエリンが PAsp(DET)-BDNF 投与群で多いことを表しており、これには急性期のアポトーシス抑制が寄与したものであると推察される。運動機能評価の結果と併せて考えると、CatWalk で今回改善のあった項目は、すべて下肢の筋力に関わるものであった。Print area と mean intensity は足底接地面のサイズや接地圧を示しており、これは接地する力の強さを反映している。また、stride

length と print positions は、下肢の前進駆動力と協調性を反映している。すなわち、PAsp(DET)-BDNF による抗アポトーシス効果で損傷部周囲の残存ミエリンが増えたことにより損傷部を越えた下肢への神経伝達がより温存され、下肢の筋力温存につながったというメカニズムが説明できる。損傷後 2 週から 4 週にかけてコントロール群との運動機能や LFB 陽性領域の差が広がっていないのは、治療効果があくまでも急性期に限られたものであることを示唆しており、これは単回投与という本システムの限界と考える。

本研究は脊髄損傷急性期での遺伝子治療において、PAsp(DET)が非ウイルスベクターとして安全かつ有用なツールであることを示した。ただし、損傷後 2 週から 4 週にかけては、明らかな治療効果が認められなかったことから、効果の持続性にはまだ課題が残る。今後さらなるシステムの改良や安全性の検証を積み重ねることで、近い将来の臨床応用につながることを期待される。

【図表】

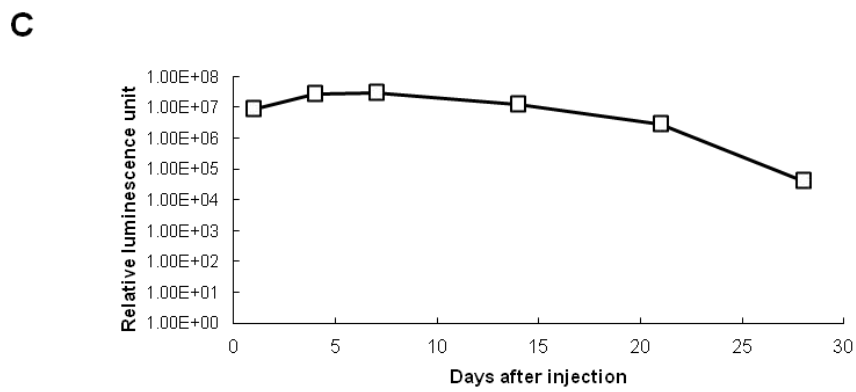
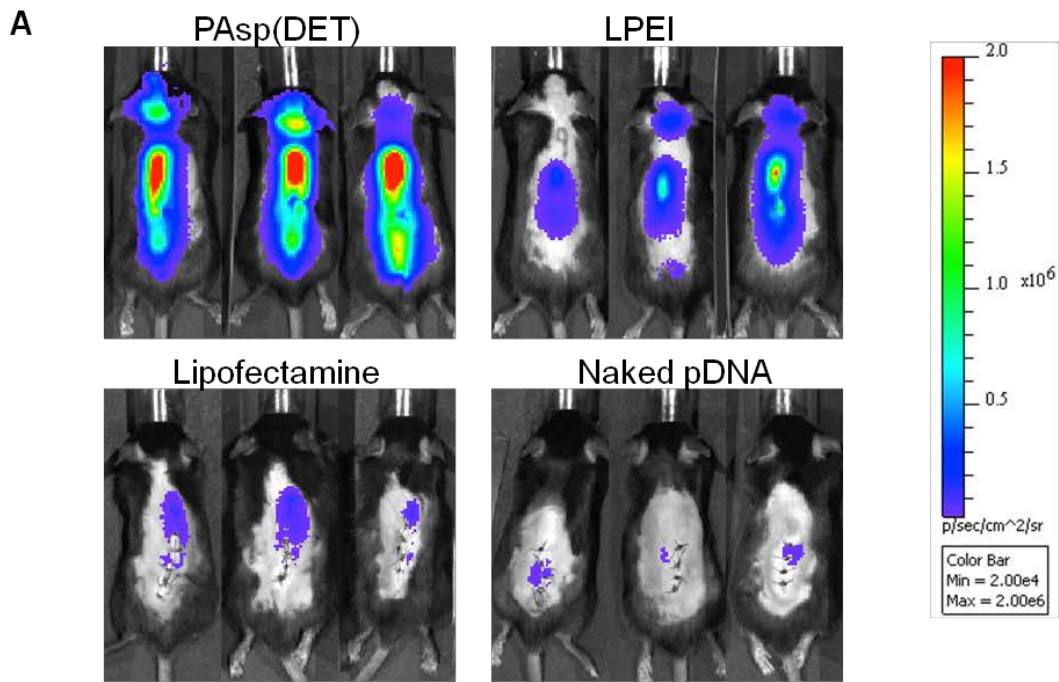


図 7 PAsp(DET)投与によって、健常脊髄に対し良好な luciferase 発現を認め  
た

A: マウス健常脊髄組織へのキャリア投与 1 日後の IVIS imaging。PAsp(DET)  
との比較には、LPEI、lipofectamine、naked pDNA を用いた。B: IVIS imaging  
における発光量の定量化と経時変化。N = 5、Error bar: SEM、\*\* $p < 0.01$ 、\* $p$   
< 0.05。C: ラット健常脊髄組織への PAsp(DET)投与後の、脳脊髄液におけるレ  
ポーター (GLuc) 発現の経時変化。N = 5、Error bar: SEM、\* $p < 0.05$ 。

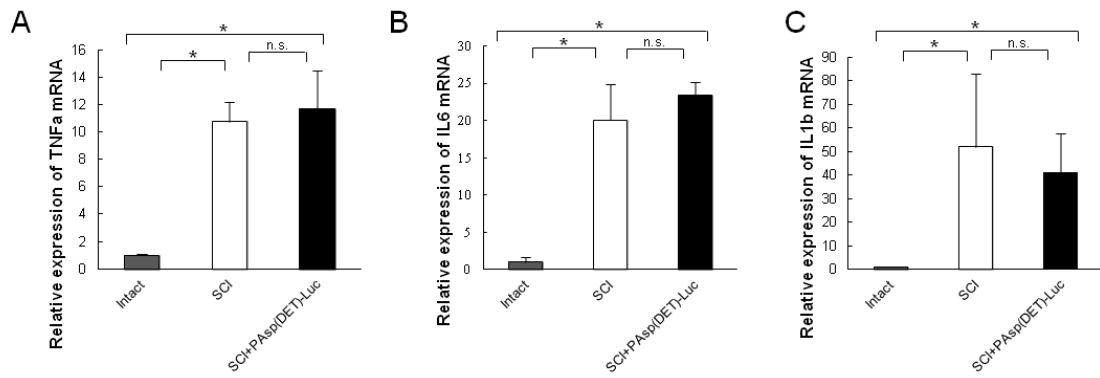


図 8 PAsp(DET)の組織毒性は、脊髄損傷に対して充分小さかった

A-C: 下位胸椎レベルの脊髄組織における、炎症性サイトカイン (A: TNF $\alpha$ 、B: IL-6、C: IL-1 $\beta$ )の mRNA 発現。 $\beta$ アクチンの値で補正 (n = 5)、Error bar: SEM、

\* $p < 0.05$ 。



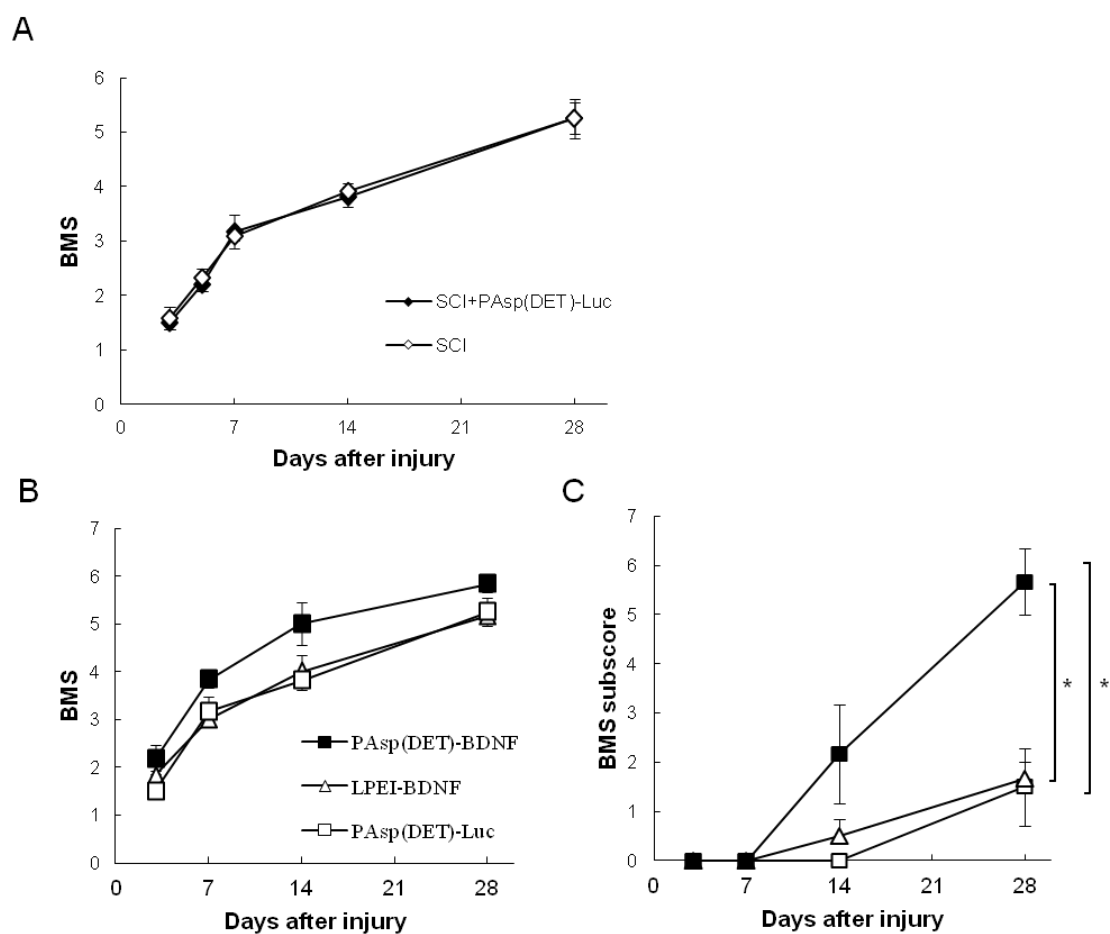


図9 PAsp(DET)-BDNF投与によって、脊髄損傷後の運動機能回復が促進された (BMS, BMS subscore)

A: 脊髄損傷 (キャリア投与なし) のみのマウスと、キャリア投与 (PAsp(DET)-Luc) +脊髄損傷のマウスの運動機能比較を損傷後 1 週間までの BMS の経時変化で評価。N= 5、Error bar: SEM、\* $p < 0.05$ 。B,C: BDNF 内包キャリアを投与した脊髄損傷マウスの運動機能の経時変化 (B: BMS、C: BMS subscore)。N= 6、Error bar: SEM、\* $p < 0.05$ 。

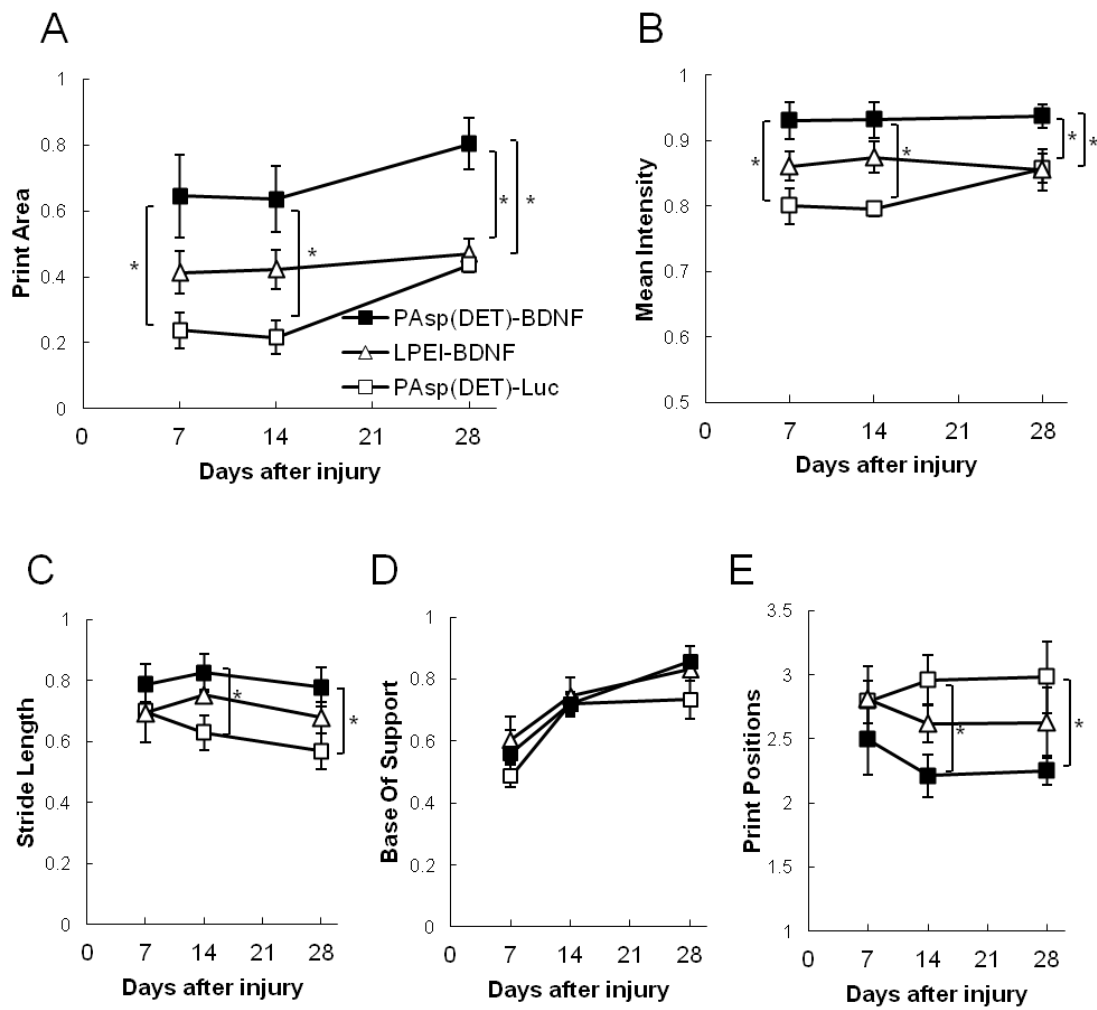
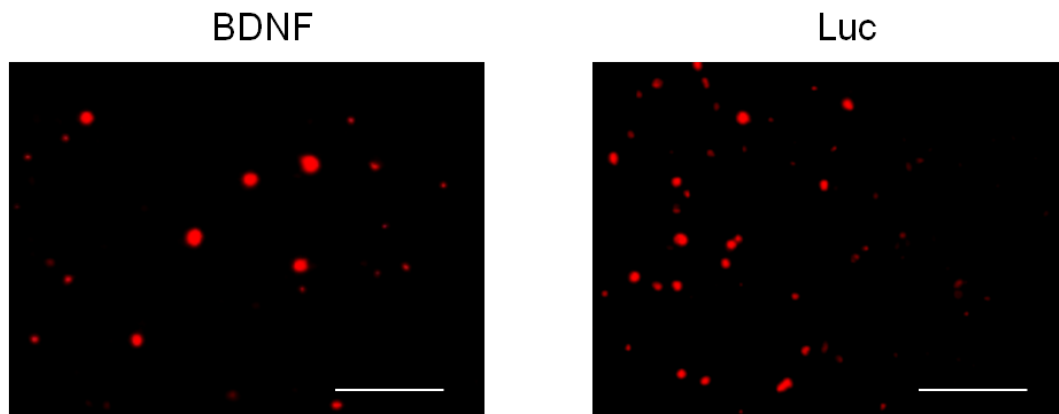


図 10 PAsp(DET)-BDNF 投与によって、脊髄損傷後の運動機能回復が促進された (CatWalk analysis)

A-E: CatWalk の各パラメーター値の経時変化。すべて健常マウスの平均値 (n=5) で補正した。A,B:左右後肢の平均値 (A: Print Area、B: Mean Intensity)。C: Stride Length。D: Base Of Support (BOS)。E: Print Positions。N= 6、Error bar: SEM、\* $p < 0.05$ 。

A



B

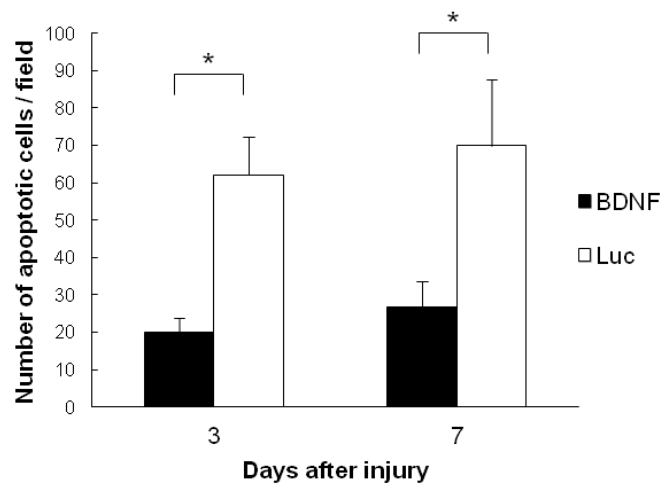


図 11 PAsp(DET)-BDNF 投与によって、損傷部周囲のアポトーシスが抑制され、組織修復が促進された (1)

A: TUNEL 染色。脊髓損傷部周囲のアポトーシス細胞を TMR red でラベルした。

スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。B: 一視野あたり (X200) の TUNEL 陽性細胞数。N=

6、Error bar: SEM、\* $p < 0.05$ 。

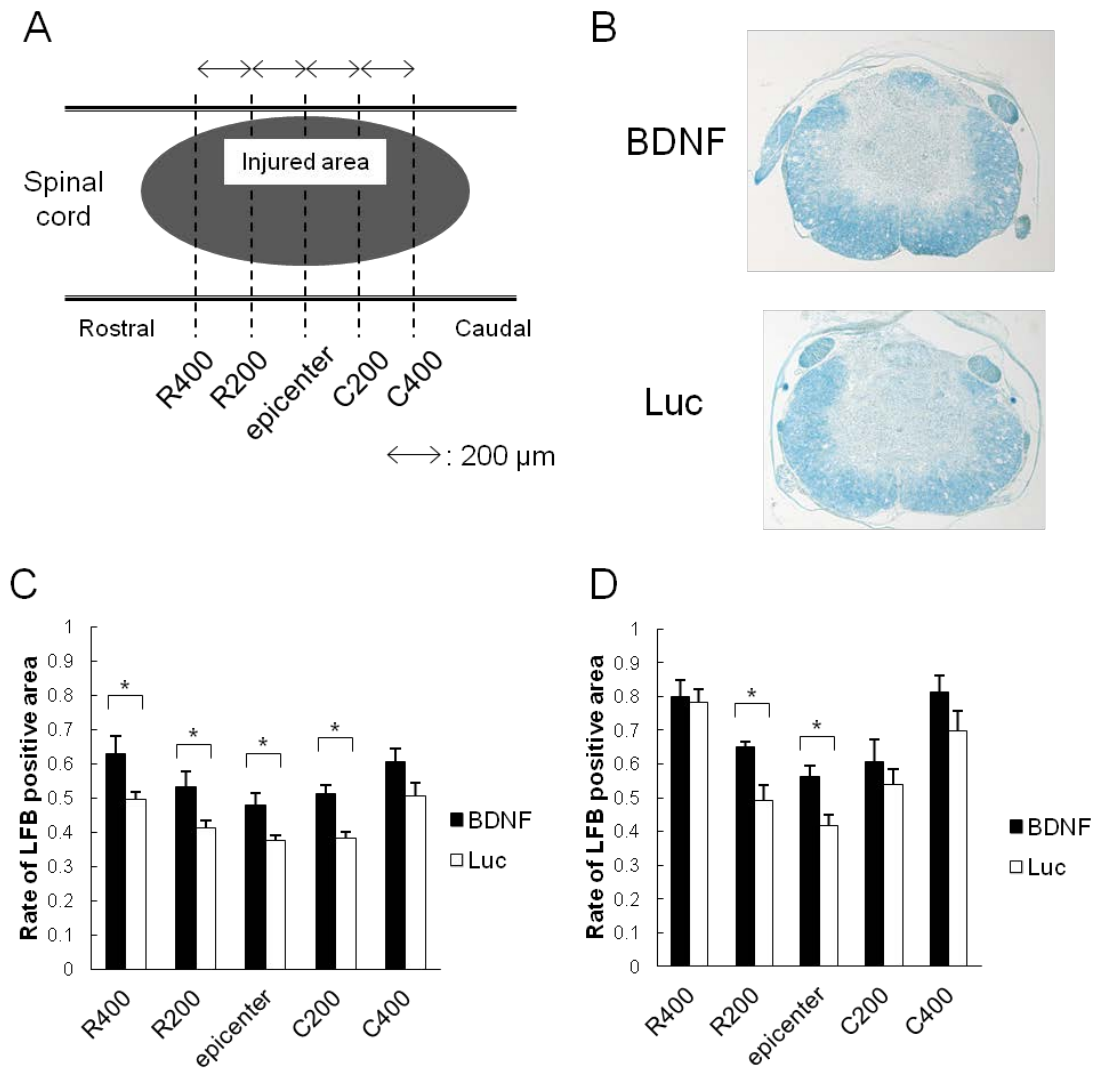


図 12 PAsp(DET)-BDNF 投与によって、損傷部周囲のアポトーシスが抑制され、組織修復が促進された (2)

A: 脊髓矢状断像のシェーマ。損傷部中心部 (epicenter) の尾側 400  $\mu\text{m}$  (C400) から頭側 400  $\mu\text{m}$  (R400)まで 200  $\mu\text{m}$  おきにサンプルを解析した。B: LFB 染色。脊髓損傷後 2 週における損傷中心部(epicenter)の脊髓水平断。C,D: 脊髓損傷後 2 週 (C)、4 週 (D) の LFB 陽性部の面積の定量評価。脊髓水平断全体の面積に対する比で算出した。N= 6、Error bar: SEM、\* $p < 0.05$ 。

### 【第3章 血中バイオマーカーによる脊髄損傷急性期の重症度評価】

#### 【序論】

脊髄損傷においては、受傷直後の spinal shock や、自然経過による神経機能の回復により、急性期から慢性期にかけての神経学的所見の経過に個人間でばらつきが出るため、急性期に正確な重症度評価を下し、予後予測を行うことが困難であることが珍しくない(11, 74)。一方で、臨床治験も含めた脊髄損傷の治療介入は、このように重症度評価の定まらない急性期がターゲットとなる場合が多い(1)。この事は、基礎研究において介入効果を判定する妨げになり、臨床現場においても、治療のタイミングを迷わせる要因となっている。脊髄損傷の急性期に正確な重症度評価を行うためには、不安定な臨床経過に左右されない、客観的な指標が必要となる。

そこで、神経学的所見とは独立したアプローチとして、血中または脳脊髄液中のバイオマーカーの利用が考えられる(75) (図 13)。バイオマーカーとは、「生体由来の物質で、それ自体が疾患の存在もしくは病勢を反映するもの」で、各種の腫瘍マーカーや、糖尿病における HbA1c などが該当する。脊髄損傷では、受傷直後より、中枢神経系組織の構成蛋白質や代謝産物が、細胞膜や脳血流関門の破綻とともに血中や脳脊髄液中に放出されるが、これらをバイオマーカーとして脊髄損傷の重症度評価を行う研究が世界各地で散見される(76)。これは、

心筋梗塞の際に心筋細胞がこわれ CK-MB が血中で上昇したり、肝機能障害において肝細胞からの逸脱酵素 (GOT,GPT) が上昇するのと同じ現象に基づいている。そこで筆者は、脊髄損傷のバイオマーカーの候補の一つであるリン酸化ニューロフィラメント重鎖 (phosphorylated neurofilament high molecular weight; pNF-H) に注目した (図 14)。

Neurofilament は、軸索を中心として神経細胞全体を構成する蛋白質であり、NF-L、NF-M、NF-H、 $\alpha$ -internexin の 4 つの subtype に分類される。中でも NF-H (117 kDa) は、lysine-serine-proline (KSP) の繰り返し配列を有しているため抗原性が高い上に、軸索特異的にセリン残基がリン酸化されており、他の subtype に比べ、protease の影響を受けにくいという特徴を有している(77)。

Shaw らは、ラット脊髄損傷モデルを用いた実験を行い、pNF-H が軸索損傷に応じて血中で上昇し、脊髄損傷の血中バイオマーカーとして、pNF-H が有効であることを報告している(78)。pNF-H は他にも、くも膜下出血、外傷性脳損傷、ALS、Leber 遺伝性視神経病、自己免疫性脳炎モデルの血中バイオマーカーとしても報告がなされており、その有用性が注目されてきている(79-81)。特記すべきなのは、脳脊髄液のみならず血液サンプルがバイオマーカーとして有効である点で、これは臨床応用を目指す上で大きな利点である。

今回筆者は、以前に報告のなかったヒト脊髄損傷患者を対象として、血中

pNF-H のバイオマーカーとしての有効性を検討するパイロットスタディーを行った。

## 【実験材料および方法】

### 1. 動物脊髄損傷モデル

マウス、ラットの購入、飼育、および脊髄損傷モデル作成は、全て第 1, 2 章と同様に行った。脊髄損傷後の運動機能は BMS で評価した。脊髄損傷後 4 週で損傷脊髄組織サンプルを取り出して、第 1, 2 章と同様の方法で 14  $\mu\text{m}$  厚の水平断凍結切片を作成し、LFB 染色を行った。損傷面積の計測は第 1,2 章と同様に行った。

### 2. ヒト脊髄損傷患者

2009 年 10 月以降、三次救命救急センターに搬送された新規脊髄損傷症例のうち、頸髄損傷症例 14 例を対象とした。脊髄以外での軸索損傷が予想される明らかな頭部外傷症例は除外した (表 1)。臨床評価は、ASIA impairment scale (AIS) (表 2) を用いた。初診は受傷後 12 時間以内、その後は 7 日後と 30 日後、さらに最終観察時点に再度評価を行った。平均観察期間は 222.9 (43-556) 日だった。AIS A の症例は sacral sparing が無い事を確認した。全ての問診、

診察は同センター医師により行われた。本研究に当たり、救命救急センターおよび当研究所双方の倫理委員会の承認を得た。

### 3. サンプル採取

マウスおよびラットの末梢血を尾静脈より採取した。ラット脳脊髄液は、第2章と同様に後頭環椎間より採取した。ヒト末梢血採取は通常の採血手技により行った。末梢血はさらに遠心分離を行って血漿を採取した。全サンプルは、測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

### 4. バイオマーカーpNF-Hの測定

市販のELISAキット (Human Phosphorylated Neurofilament H ELISA; BioVendor) を用いてサンプル中 pNF-H 濃度の測定を行った。凍結保存されたサンプルを融解し、dilution buffer で 3 倍希釈した。以後のアッセイは manufacturer's protocol に従って行った。全てのサンプルは duplicate でアプライシ、平均をとった。pNF-H 濃度がスタンダードサンプルの上限値 (12,000 pg/ml) を越えたものに関しては、9 倍希釈にして測定し直した。検出限界値は、ブランクサンプル (dilution buffer のみ) の平均 $\pm 3$  SD を参考に、70 pg/ml とした。



## 5. 統計学的解析

解析にあたり、pNF-H の測定値が検出限界値 (70 pg/ml) を下回ったものは全て 0 pg/ml とした。結果は平均±標準偏差 (SD) として表記した。F 検定による等分散の検定をまず行い、有意差の検定には 2 群間では Student's *t* 検定もしくは Mann-Whitney's U 検定を、多群間では one-way repeated ANOVA の後に Bonferroni 法あるいは Student's *t* 検定もしくは Mann-Whitney's U 検定を用いた。相関関係の評価には、スピアマンの順位相関係数を用いた。 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 【結果】

#### (1) 動物脊髄損傷モデルにおいて、損傷強度に応じて血中および脳脊髄液中の pNF-H の上昇を認めた

マウス脊髄損傷モデルを 3 段階の損傷強度 (30,60,90 kilodynes) で作成し、末梢血中の pNF-H を測定した。全てのマウスで、血中 pNF-H は脊髄損傷後 3 日で値がピークに達し、その後漸減した。また、損傷強度と血中 pNF-H 値には正の相関を認めた (図 15A)。ラットで末梢血と脳脊髄を同時に採取して pNF-H を測定したところ、どちらのサンプルでも脊髄損傷後 3 日で値はピークとなり、

その後漸減した (図 15B)。60 kilodyne の脊髄損傷マウス 6 個体について、その後の運動機能回復と損傷後 4 週における組織損傷の程度を観察すると、1 次損傷は同じでも、その後の運動機能回復や組織損傷の程度 (損傷面積) にはある程度のばらつきがあることが分かった (図 15C)。これには炎症や出血といった 2 次損傷が個体間で同一でなかった事が原因として考えられるが、脊髄損傷 3 日後の血中 pNF-H 値は、損傷後 4 週の BMS ( $r_s = -0.82$ ) と損傷面積 ( $r_s = 0.98$ ) の両方と有意な相関を認めた (図 15D)。以上の結果から、血中 pNF-H は脳脊髄中 pNF-H と同様の動態を示し、その値は 1 次損傷のみならず急性期の 2 次損傷を含めた損傷全体を反映しているため、バイオマーカーとして損傷の程度を把握するとともに、予後予測にも有用であることが示唆された。

## (2) ヒト脊髄損傷例で、血中 pNF-H は測定可能であった

ヒト脊髄損傷患者 14 例の末梢血中 pNF-H を測定した。pNF-H は、14 例中 11 例で、受傷後 96 時間以内に検出された (図 16A)。受傷後早期の pNF-H 値と最終観察時点での AIS (最終 AIS) を対応付けしたところ、pNF-H が全く検出されなかった 3 例のうち、1 例が最終 AIS C、2 例が最終 AIS D であった。最終 AIS A の 4 例に関しては、遅くとも受傷後 12 時間より pNF-H が検出され (221-825 pg/ml)、96 時間まで pNF-H 値が単調上昇を示した (1919-8023 pg/ml)

(図 16B)。以上より、ヒト脊髄損傷後 96 時間以内の急性期において、血中の pNF-H が測定可能であることが示された。

### (3) ヒト脊髄損傷例で、血中 pNF-H 値と重症度に相関を認めた

血中 pNF-H が脊髄損傷のバイオマーカーとして有用であるためには、その値が重症度と相関し、予後予測につながることを望ましい。そこで、最終 AIS の重症度ごとに pNF-H 値の平均をとると、最も重症度の高い AIS A 症例の pNF-H 値が、AIS C~E 症例と比べると、一貫して著しい高値を示し（受傷後 96 時間における pNF-H 平均値は AIS A: 5260 pg/ml, AIS C: 449 pg/ml であった）、受傷後 18 時間から 96 時間の間で、統計学的有意差を認めた（図 17A）。さらに最終 AIS C 症例と D 症例の pNF-H 値を比較すると、統計学的有意差は認めないものの、AIS C 症例において pNF-H 値が高い傾向にあった（図 17B）。以上の結果により、血中 pNF-H 値と重症度に正の相関が認められ、pNF-H はバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

#### 【考察】

今回の研究では、急性期の血中 pNF-H がヒト脊髄損傷における最終的な臨床的重症度を反映しており、特に完全麻痺である AIS A と、不全麻痺である AIS

C-E の鑑別に有用であることが分かった。バイオマーカーとしての有用性を検証する意味でも興味深かったのが Case 11 で、神経学的所見は当初 AIS A から 3 日後に AIS B となり、さらに 24 週後の最終観察時には AIS C となった。この症例は、受傷後 24 時間でも pNF-H は検出されず、その後も pNF-H は他の AIS A 症例よりも明らかに低い値をとっていた (受傷後 48 時間値は Case11: 86 pg/ml, AIS A: 1210-4935 pg/ml 、受傷後 96 時間値は Case11: 689 pg/ml, AIS A: 1919-8023 pg/ml であった)。すなわち、この症例は神経学的所見が AIS A であった時点で、血中 pNF-H の値からその後の最終 AIS 、すなわち AIS C が予測可能であったと言える。このように、急性期のバイオマーカーの値からその後の臨床経過を予測できる事で、利用価値は高まることになる。

脊髄損傷の基礎・臨床研究で用いられているバイオマーカーは、脊髄組織の構成物からなる **structural biomarker** と、損傷に伴って放出される炎症性サイトカインやケモカインである **inflammatory biomarker** に二分され、pNF-H は **structural biomarker** に分類される(11)。**Structural biomarker** には他にも、アストロサイトに局在するカルシウム結合蛋白質である S-100β や、神経細胞に局在する **Neuron-specific enolase (NSE)** を、脊髄損傷後の血中バイオマーカーとして検討した報告がある(82-84)。今回の研究で血中 pNF-H がバイオマーカーとして有用と考えられるタイミングが受傷後 24 ないし 72 時間であるのに対し、

S-100B と NSE はいずれも脊髄損傷後 6 時間でピークレベルに達し、24 時間後にはベースラインに戻るとされている。バイオマーカーとして、受傷後なるべく早期に測定できるのが理想ではあるが、実際の臨床現場で常に受傷後 6 時間で採血を行うのは難しく、現実的には、pNF-H のようにサンプル採取のタイミングに許容の幅 (18-96 時間) がある方が望ましい。また、S-100B と NSE に関してはいずれも重症度との相関が不明瞭で、かつ多発外傷で偽陽性を示すことが知られており、臨床応用への壁は高い。これらの点から考えても、pNF-H が血中バイオマーカーとして有用であることが示唆される。

脊髄損傷ラットとヒトでの大きな違いとして、ラットでは pNF-H 値のピークが受傷後 3 日前後であったのに対し、ヒトにおいては受傷後 4 日以後も上昇し続けるという点がある。その後の追跡で、少なくとも受傷後 21 日までは上昇し続けるかピークを保つ傾向があることが分かっている。同様の傾向はヒトにおけるくも膜下出血や外傷性脳損傷のモデルでも認められており (80, 81)、軸索変性や輸送障害がヒトにおいてのみ遷延しているために不要な pNF-H が持続的に CSF や血中に排出されているのが原因と推察されるが、実際のところは不明である。

最後に本研究の限界について述べる。今後臨床応用を目指すにあたって、血中 pNF-H 値によって重症度を分けるカットオフ値を設定する必要があるが、そ

のためには症例数が不足している。特に AIS C と AIS D をクリアに分けるには、ASIA motor score や、Spinal Cord Independence Measure (SCIM)、Walking Index for Spinal Cord Injury (WISCI) など、他の臨床評価項目を含めて考える必要があるかもしれない(85, 86)。場合によっては完全麻痺 (AIS A) と不全麻痺 (AIS B-E) を急性期に鑑別することに目的を特化してもよいだろう。また、今回のスタディーでは有用なデータは得られなかったが、脊髄損傷における血中バイオマーカーの上昇が脳血流関門の破綻によるものであるならば、骨傷の程度によって血中 pNF-H の値が変動する可能性も否定できない。さらに、頭部外傷などの中枢神経系の同時外傷や、頸椎後縦靭帯骨化症などの中枢神経系の既往疾患が血中 pNF-H に及ぼす影響を明らかにするのも今後の課題である。

いずれにせよ、血中 pNF-H は脊髄損傷の重症度を示すバイオマーカーとして、予後予測に有用である可能性が高く、今後のさらなる研究により有用性が確立されると期待している。

【図表】

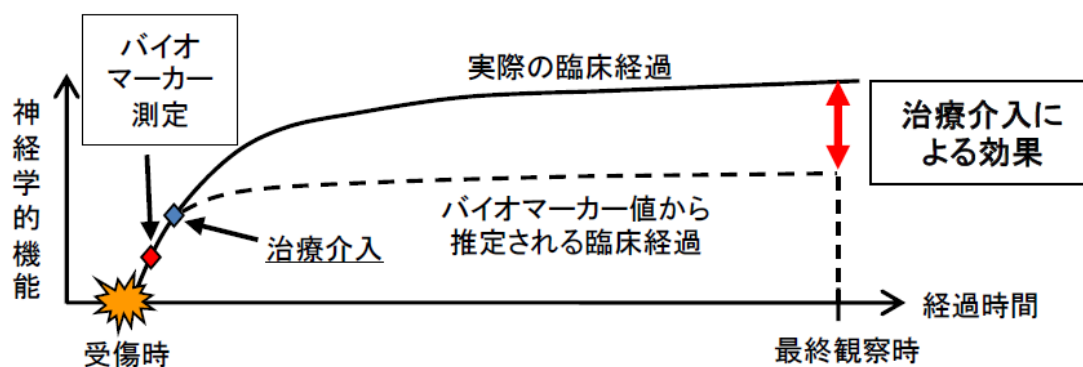


図 13 縦軸に神経学的機能、横軸に経過時間を表し、脊髄損傷後の経時的な機能回復を模式的に表した。急性期における治療介入前にバイオマーカーを測定することでその後の予後予測ができれば、実際の最終的な神経学的機能と予測された機能との差を治療介入による効果と見なすことができる

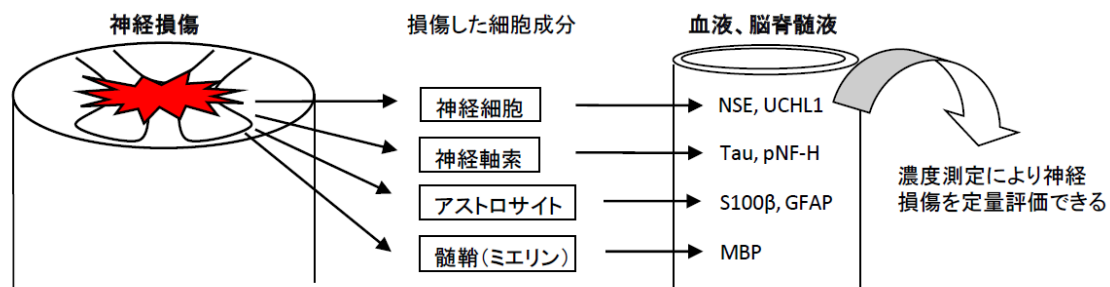


図 14 中枢神経が損傷されると、図のような物質が血中もしくは脳脊髄液中に漏出し、それぞれバイオマーカーとして報告されている



Case	Age	Mechanism of injury	Level	AIS grade at initial examination	AIS grade at final examination	Follow-up period (day post injury)	Complications	Steroid treatment	Decompression surgery
1	69	fall from standing height	C6	C	C	199	OPLL <sup>a</sup>	no	no
2	39	MVA	C5	C	D	556	none	no	no
3	69	fall	C5	D	D	435	none	yes	no
4	56	fall down stairs	C5	D	E	282	none	yes	no
5	60	fall down stairs	C6	A	A	60	none	yes	no
6	58	fall	C5	D	D	497	gastric ulcer <sup>c</sup>	yes	no
7	59	MVA	C6	D	D	43	DM <sup>a</sup>	no	no
8	88	MVA	C6	C	C	60	DM, RF <sup>a</sup>	no	no
9	30	fall	C6	A	A	60	spleen injury <sup>b</sup>	no	no
10	56	fall from standing height	C5	B	C	52	none	no	no
11	65	MVA	C6	A	C	167	OPLL <sup>a</sup>	yes	yes
12	68	fall down stairs	C5	A	A	330	Concussion <sup>b</sup>	no	yes
13	59	fall from standing height	C6	B	C	295	gastric ulcer <sup>c</sup>	no	no
14	35	sport	C5	A	A	172	none	yes	yes

表 1 患者内訳

平均年齢：57.9(30-88)歳 最終 AIS：A 4 人、B 0 人、C 5 人、D 4 人、E 1 人

平均観察期間：229.1(43-556)日

a：受傷前 b：受傷時 c：受傷後

MVA, motor vehicle accident; OPLL, ossification of the posterior longitudinal

ligament; DM, diabetes mellitus; RF, renal failure

### ASIA impairment scale (AIS)

A：知覚・運動機能の完全消失

B：知覚機能のみ残存

C：知覚・運動機能残存（主要筋群の半数以上が MMT[3]未満）

D：知覚・運動機能残存（主要筋群の半数以上が MMT[3]以上）

E：正常

表 2 AIS 分類

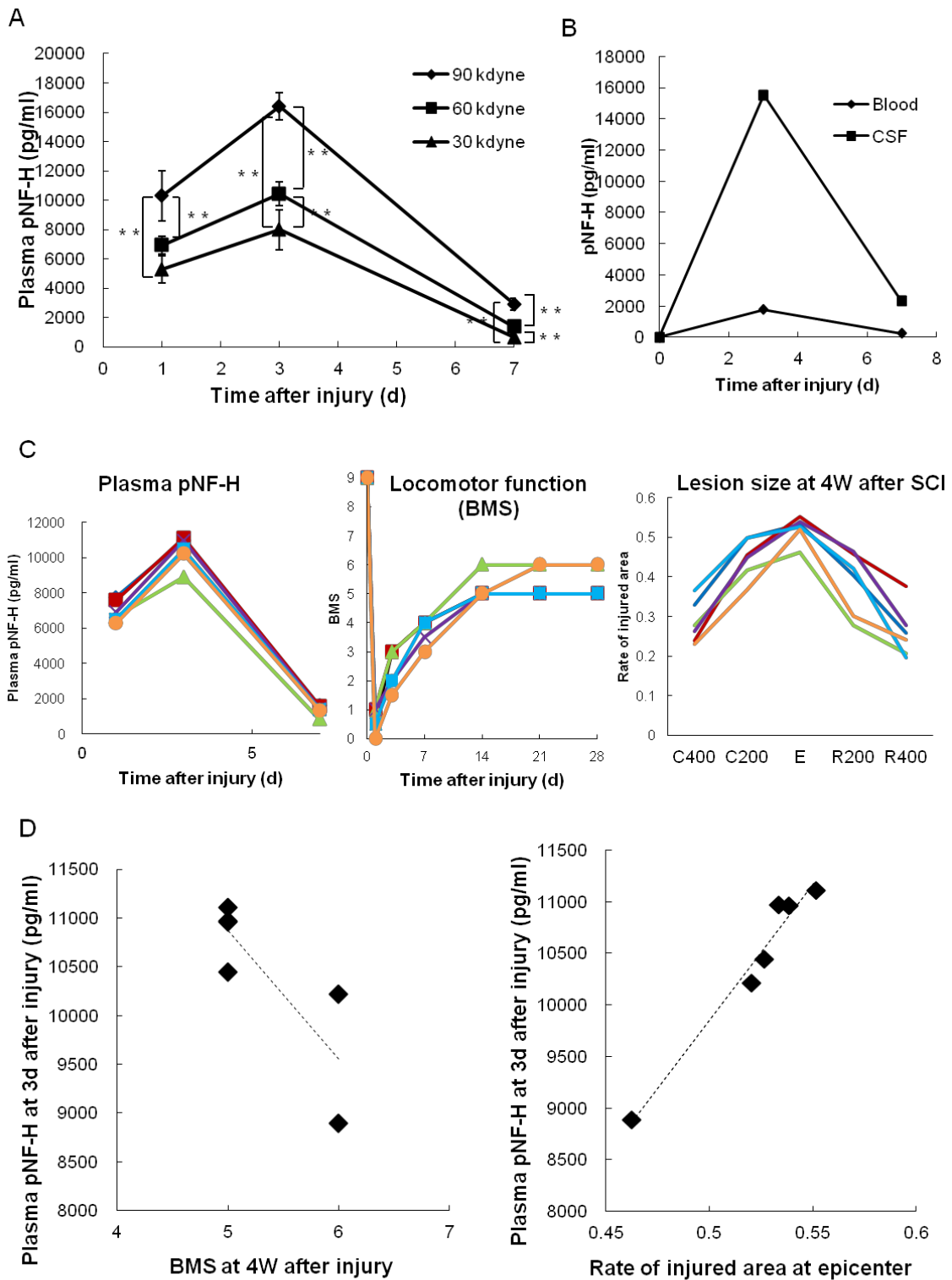
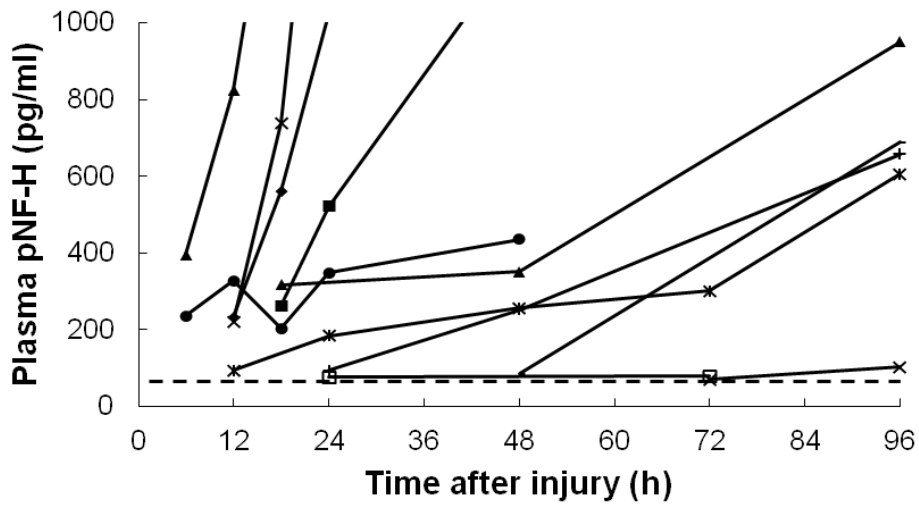


図 15 動物脊髄損傷モデルにおいて、損傷強度に応じて血中および脳脊髄液中

の pNF-H の上昇を認めた

A: マウス脊髄損傷後 (30,60,90 kilodynes) の血中 pNF-H 値の経時変化。N= 6、  
Error bar: SD、\*\* $p < 0.01$ 、\* $p < 0.05$ 。B: ラット脊髄損傷後 (50 kilodynes)  
の血中および脳脊髄液中の血中 pNF-H 値の経時変化。C: 60 kilodynes の強度  
で脊髄損傷モデルを作成したマウス 6 匹の血中 pNFH、運動機能 (BMS)、損  
傷後 4 週における損傷部 (脱髄部) 面積 (LFB 染色)。D: 60 kilodynes の強度  
で脊髄損傷モデルを作成したマウス 6 匹の、損傷後 3 日の血中 pNF-H と、損傷  
後 4 週の BMS (左) および、損傷後 4 週の損傷部 (脱髄部) 面積 (右) の相関  
関係をグラフに示した。破線: 近似直線。

A



B

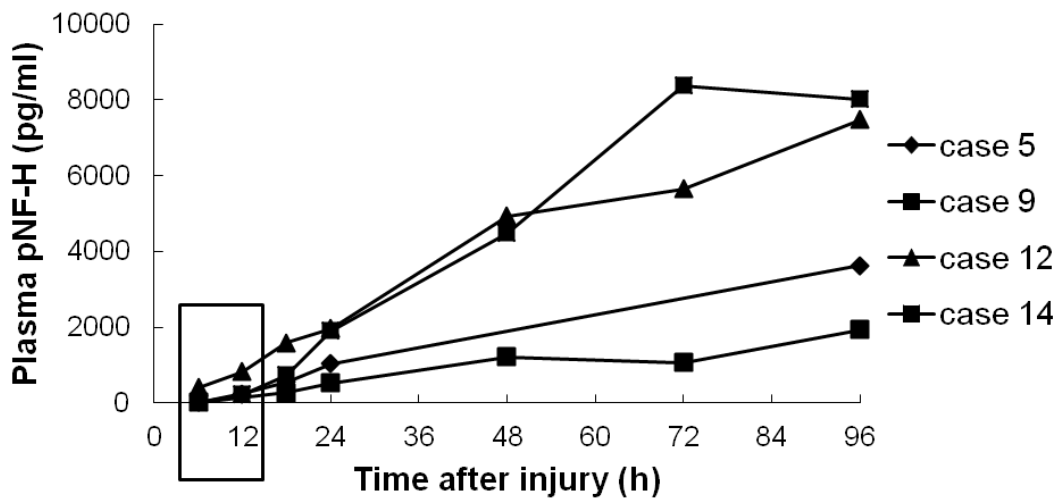


図 16 ヒト脊髄損傷例で、血中 pNF-H は測定可能であった

A: ヒト脊髄損傷患者 11 例の末梢血中 pNF-H 値の経時変化。破線：検出限界値

(70 pg/ml)。B: 最終 AIS A であったヒト脊髄損傷患者 4 例 (Case 5,9,12,14)

の末梢血中 pNF-H 値の経時変化。

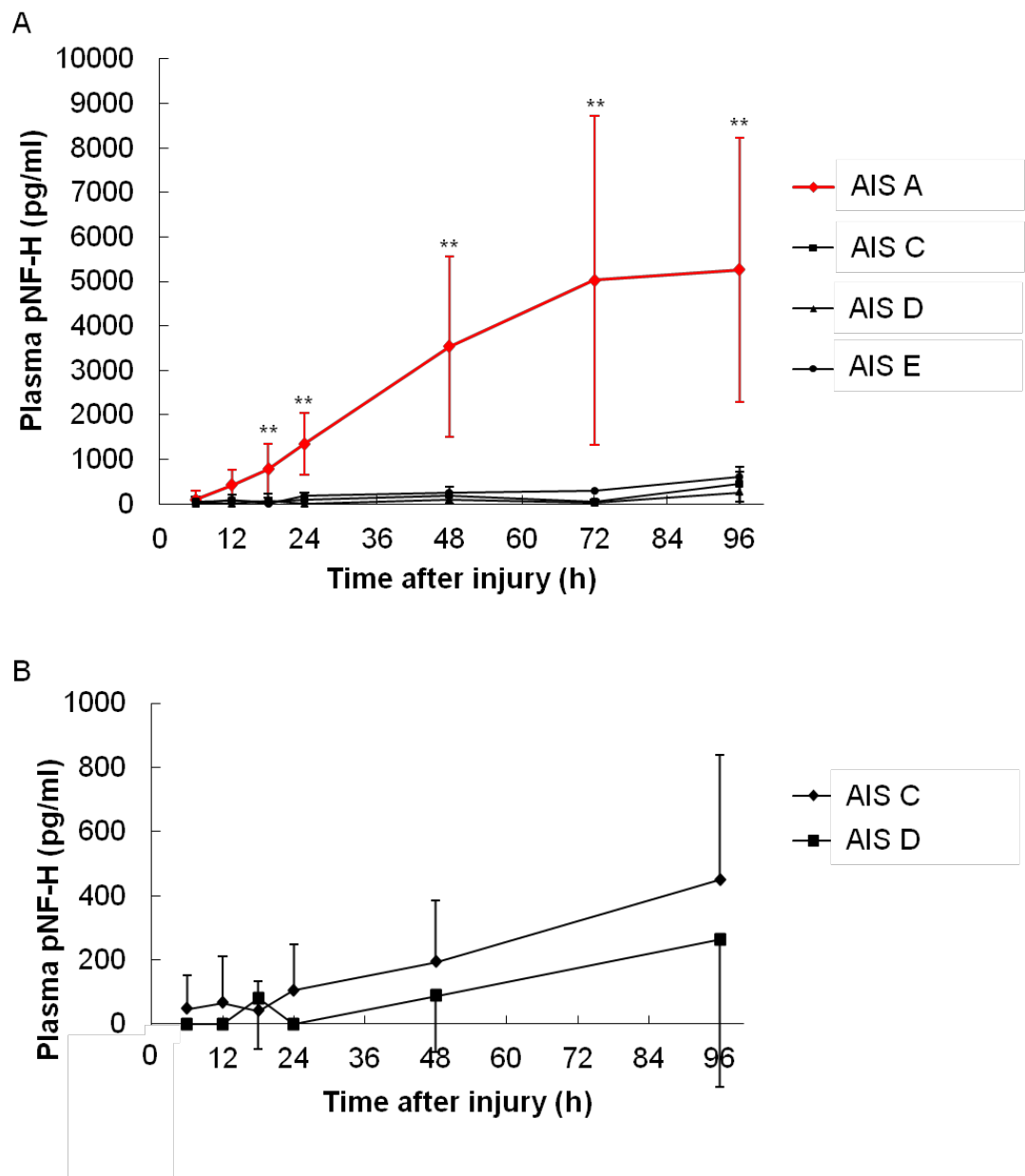


図 17 ヒト脊髄損傷例で、血中 pNF-H 値と重症度に相関を認めた

A: AIS による重症度ごとに分類したヒト脊髄損傷患者の末梢血中 pNF-H 値の経時変化。Error bar: SD、\*\* $p < 0.01$ 。B: AIS C と AIS D のヒト脊髄損傷患者の末梢血中 pNF-H 値の経時変化の比較。Error bar: SD。

## 【総括】

本研究は、脊髄損傷急性期における炎症制御というコンセプトのもと、病態解明から治療戦略に至る流れを3段階で構成した。

第1章では、LPS preconditioning によって脊髄損傷後に内在性 microglia の M2 活性化が促進され、その後の組織修復および運動機能回復につながることを示した。これにより LPS preconditioning の脊髄損傷に対する有効性が示されるとともに、脊髄損傷後の M2 活性化から組織修復に至る病態の一部が明らかとなった。

第2章では、薬剤投与に際するデリバリーの問題に着目し、PAsp(DET)を用いて脊髄損傷モデルに対する遺伝子デリバリーを行い、非ウイルスベクターとしては突出した遺伝子導入効率を達成するとともに、運動機能の有意な回復を認めた。これにより、安全性の高い非ウイルスベクターが、脊髄損傷においても実用可能であることが示された。

第3章では、血中バイオマーカー pNF-H の値が、マウスモデルにおいて脊髄組織の損傷程度に応じて上昇することを示すとともに、ヒトにおいても臨床的な重症度と正の相関を示すことを明らかにしたことで、実際の臨床現場において脊髄損傷の急性期に重症度判定を行う際に有力なツールとなりうることを示した。

脊髄損傷における急性期の炎症反応をコントロールすることが、二次損傷を軽減させるための鍵である、ということについては議論の余地がないが、炎症とは本来、多種の免疫細胞群による免疫応答と組織変化を含む、きわめて広範な症候である。本研究で着目した macrophage/microglia の M1/M2 バランスは、膨大な炎症反応を含む脊髄損傷の病態において中心的な役割を果たしており、非常に興味深い切り口であると筆者は考えるが、炎症反応全体を総合的に制御しているとまでは言い難い、というのが率直な印象である。裏を返せば、リンパ球や好中球など、介入の余地が多分に残されており、今後も新たな知見が生まれ続けるであろう。

今回の一連の研究を通じて、脊髄損傷の基礎研究における治療効果と、臨床における患者側の期待とは、依然として大きな隔たりがあることを実感させられた。冒頭にも述べたように、脊髄損傷の治療法の開発はまだまだ発展途上であり、いくつかのブレイクスルーを経る必要があると考える。また脊髄損傷を完全に克服するには、病態の一部だけに焦点を当てて介入するのではなく、リハビリや医療機器の開発をも含めた複合的なアプローチが必要であることは言うまでもない。将来、今回の研究の一部でもそのきっかけになることがあれば、この上ない喜びである。

## 【謝辞】

本論文の作成に当たり、次の先生方に感謝いたします。

まず、基礎医学に接しこれを学ぶ機会を与えて下さり、終始励ましとご指導を賜りました東京大学整形外科 中村耕三前教授、田中栄教授に深く感謝いたします。そして研究の立案および遂行に当たり、その第一歩からご指導を頂き、折に触れ数え切れないほど多くの助言と温かい励ましを頂きました国立障害者リハビリテーションセンター研究所 緒方徹部長に厚く感謝いたします。さらに研究の遂行と論文作成に当たり、数多くのご指導とご高閲を賜りました東京大学疾患生命工学センター 片岡一則教授、位高啓史准教授に謹んで感謝いたします。貴重な血液サンプルと臨床データをご提供いただいた都立墨東病院救命救急センター 石井桂輔先生をはじめとする先生方、また患者様方に深く感謝いたします。

実験手技や器械の使い方を手取り足取り教えていただいた森岡和仁先生、岡崎廉太郎先生、内田智士先生に感謝いたします。実験や動物メンテナンスをサポートしていただいた実験助手の岩間さん、久米さん、小倉さん、三好さんに感謝いたします。

最後に、家事子育てを一身に背負いながら温かく研究生活を支えてくれた妻 彩夏に心より感謝します。



## 【引用文献】

1. Hawryluk, G. W., Rowland, J., Kwon, B. K., and Fehlings, M. G. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury, *Neurosurg Focus* **25**, E14 (2008).
2. Gensel, J. C., Donnelly, D. J., and Popovich, P. G. Spinal cord injury therapies in humans: an overview of current clinical trials and their potential effects on intrinsic CNS macrophages, *Expert Opin Ther Targets* **15**, 505-518 (2011).
3. Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Holford, T. R., Young, W., Baskin, D. S., Eisenberg, H. M., Flamm, E., Leo-Summers, L., Maroon, J., Marshall, L., Perot, P., Piepmeier, J., Sonntag, V., Wagner, F., Wilberger, J., and Winn, R. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study, *N Engl J Med* **322**, 1405-1411 (1990).
4. Hurlbert, R. J. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care, *J Neurosurg* **93**, 1-7 (2000).
5. Beattie, M. S., Farooqui, A. A., and Bresnahan, J. C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury, *J Neurotrauma* **17**, 915-925 (2000).
6. Borgens, R. B., and Liu-Snyder, P. Understanding secondary injury, *Q Rev Biol* **87**, 89-127 (2012).
7. Popovich, P. G., Guan, Z., McGaughy, V., Fisher, L., Hickey, W. F., and Basso, D. M. The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation, *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 623-633 (2002).
8. Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G. J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., and Schwartz, M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats, *Nat Med* **4**, 814-821 (1998).
9. Patel, M. M., Goyal, B. R., Bhadada, S. V., Bhatt, J. S., and Amin, A. F. Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery, *CNS Drugs* **23**, 35-58 (2009).
10. Sharma, H. S. New perspectives for the treatment options in spinal cord injury, *Expert Opin Pharmacother* **9**, 2773-2800 (2008).
11. Kwon, B. K., Casha, S., Hurlbert, R. J., and Yong, V. W. Inflammatory and structural biomarkers in acute traumatic spinal cord injury, *Clin Chem Lab Med* **49**, 425-433 (2011).
12. Fleming, J. C., Norenberg, M. D., Ramsay, D. A., Dekaban, G. A., Marcillo, A. E., Saenz, A. D., Pasquale-Styles, M., Dietrich, W. D., and Weaver, L. C. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury, *Brain* **129**, 3249-3269

- (2006).
13. Bethea, J. R., and Dietrich, W. D. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury, *Curr Opin Neurol* 15, 355-360 (2002).
  14. Yong, V. W., Wells, J., Giuliani, F., Casha, S., Power, C., and Metz, L. M. The promise of minocycline in neurology, *Lancet Neurol* 3, 744-751 (2004).
  15. Mosser, D. M., and Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat Rev Immunol* 8, 958-969 (2008).
  16. Kigerl, K. A., Gensel, J. C., Ankeny, D. P., Alexander, J. K., Donnelly, D. J., and Popovich, P. G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord, *J Neurosci* 29, 13435-13444 (2009).
  17. Biswas, S. K., and Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance, *Trends Immunol* 30, 475-487 (2009).
  18. Tasaki, K., Ruetzler, C. A., Ohtsuki, T., Martin, D., Nawashiro, H., and Hallenbeck, J. M. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats, *Brain Res* 748, 267-270 (1997).
  19. Rosenzweig, H. L., Lessov, N. S., Henshall, D. C., Minami, M., Simon, R. P., and Stenzel-Poore, M. P. Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice, *Stroke* 35, 2576-2581 (2004).
  20. Dirnagl, U., Becker, K., and Meisel, A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use, *Lancet Neurol* 8, 398-412 (2009).
  21. Stevens, S. L., Leung, P. Y., Vartanian, K. B., Gopalan, B., Yang, T., Simon, R. P., and Stenzel-Poore, M. P. Multiple preconditioning paradigms converge on interferon regulatory factor-dependent signaling to promote tolerance to ischemic brain injury, *J Neurosci* 31, 8456-8463 (2011).
  22. Longhi, L., Gesuete, R., Perego, C., Ortolano, F., Sacchi, N., Villa, P., Stocchetti, N., and De Simoni, M. G. Long-lasting protection in brain trauma by endotoxin preconditioning, *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 1919-1929 (2011).
  23. Li, W. C., Jiang, D. M., Hu, N., Qi, X. T., Qiao, B., and Luo, X. J. Lipopolysaccharide preconditioning attenuates neuroapoptosis and improves functional recovery through activation of Nrf2 in traumatic spinal cord injury rats, *Int J Neurosci* 123, 240-247 (2013).
  24. Basso, D. M., Fisher, L. C., Anderson, A. J., Jakeman, L. B., McTigue, D. M., and Popovich, P. G. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains, *J Neurotrauma* 23, 635-659

- (2006).
25. Stirling, D. P., and Yong, V. W. Dynamics of the inflammatory response after murine spinal cord injury revealed by flow cytometry, *J Neurosci Res* 86, 1944-1958 (2008).
  26. Kodelja, V., Muller, C., Tenorio, S., Schebesch, C., Orfanos, C. E., and Goerdts, S. Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages, *Immunobiology* 197, 478-493 (1997).
  27. Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M. J., Post, M. J., De Winther, M. P., and Donners, M. M. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo, *Angiogenesis* 1, 109-118 (2013).
  28. Samanta, M., Iwakiri, D., and Takada, K. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling, *Oncogene* 27, 4150-4160 (2008).
  29. Lastres-Becker, I., Cartmell, T., and Molina-Holgado, F. Endotoxin preconditioning protects neurones from in vitro ischemia: role of endogenous IL-1beta and TNF-alpha, *J Neuroimmunol* 173, 108-116 (2006).
  30. Chen, K. B., Uchida, K., Nakajima, H., Yayama, T., Hirai, T., Rodriguez Guerrero, A., Kobayashi, S., Ma, W. Y., Liu, S. Y., Zhu, P., and Baba, H. High-mobility group box-1 and its receptors contribute to proinflammatory response in the acute phase of spinal cord injury in rats, *Spine (Phila Pa 1976)* 36, 2122-2129 (2011).
  31. Zhang, Y. K., Liu, J. T., Peng, Z. W., Fan, H., Yao, A. H., Cheng, P., Liu, L., Ju, G., and Kuang, F. Different TLR4 expression and microglia/macrophage activation induced by hemorrhage in the rat spinal cord after compressive injury, *J Neuroinflammation* 10, 112 (2013).
  32. Kigerl, K. A., Lai, W., Rivest, S., Hart, R. P., Satoskar, A. R., and Popovich, P. G. Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury, *J Neurochem* 102, 37-50 (2007).
  33. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway, *Science* 301, 640-643 (2003).
  34. Lin, H. Y., Huang, C. C., and Chang, K. F. Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat, *Pediatr Res* 66, 254-259 (2009).
  35. Chen, Z., Jalabi, W., Shpargel, K. B., Farabaugh, K. T., Dutta, R., Yin, X., Kidd, G. J., Bergmann, C. C., Stohlman, S. A., and Trapp, B. D. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4, *J Neurosci* 32, 11706-11715 (2012).

36. Singh, A. K., and Jiang, Y. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats?, *Toxicology* *201*, 197-207 (2004).
37. Leow-Dyke, S., Allen, C., Denes, A., Nilsson, O., Maysami, S., Bowie, A. G., Rothwell, N. J., and Pinteaux, E. Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro, *J Neuroinflammation* *9*, 230 (2012).
38. Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells, *Science* *304*, 1338-1340 (2004).
39. Kamei, N., Kwon, S. M., Kawamoto, A., Ii, M., Ishikawa, M., Ochi, M., and Asahara, T. Contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury, *J Neurosci Res* *90*, 2281-2292 (2012).
40. Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., and Okano, H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury, *Nat Med* *12*, 829-834 (2006).
41. Rolls, A., Shechter, R., and Schwartz, M. The bright side of the glial scar in CNS repair, *Nat Rev Neurosci* *10*, 235-241 (2009).
42. Brewer, K. L., Bethea, J. R., and Yeziarski, R. P. Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury, *Exp Neurol* *159*, 484-493 (1999).
43. Thompson, C. D., Zurko, J. C., Hanna, B. F., Hellenbrand, D. J., and Hanna, A. The therapeutic role of interleukin-10 after spinal cord injury, *J Neurotrauma* *30*, 1311-1324 (2013).
44. van der Poll, T., Marchant, A., Keogh, C. V., Goldman, M., and Lowry, S. F. Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia, *J Infect Dis* *174*, 994-1000 (1996).
45. Dace, D. S., Khan, A. A., Stark, J. L., Kelly, J., Cross, A. H., and Apte, R. S. Interleukin-10 overexpression promotes Fas-ligand-dependent chronic macrophage-mediated demyelinating polyneuropathy, *PLoS One* *4*, e7121 (2009).
46. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, *Trends Immunol* *23*, 549-555 (2002).
47. David, S., and Kroner, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury, *Nat Rev Neurosci* *12*, 388-399 (2011).
48. Varelas, P. N., Rehman, M., Pierce, W., Wellwood, J., Chua, T., and Revankar, S.

- Vancomycin-resistant enterococcal meningitis treated with intrathecal streptomycin, *Clin Neurol Neurosurg* 110, 376-380 (2008).
49. Winkelmuller, M., and Winkelmuller, W. Long-term effects of continuous intrathecal opioid treatment in chronic pain of nonmalignant etiology, *J Neurosurg* 85, 458-467 (1996).
  50. Dittrich, F., Ochs, G., Grosse-Wilde, A., Berweiler, U., Yan, Q., Miller, J. A., Toyka, K. V., and Sendtner, M. Pharmacokinetics of intrathecally applied BDNF and effects on spinal motoneurons, *Exp Neurol* 141, 225-239 (1996).
  51. Jones, L. L., and Tuszynski, M. H. Chronic intrathecal infusions after spinal cord injury cause scarring and compression, *Microsc Res Tech* 54, 317-324 (2001).
  52. Blesch, A., Fischer, I., and Tuszynski, M. H. Gene therapy, neurotrophic factors and spinal cord regeneration, *Handb Clin Neurol* 109, 563-574 (2012).
  53. Franz, S., Weidner, N., and Blesch, A. Gene therapy approaches to enhancing plasticity and regeneration after spinal cord injury, *Exp Neurol* 235, 62-69 (2011).
  54. Bo, X., Wu, D., Yeh, J., and Zhang, Y. Gene therapy approaches for neuroprotection and axonal regeneration after spinal cord and spinal root injury, *Curr Gene Ther* 11, 101-115 (2011).
  55. Hendriks, W. T., Ruitenber, M. J., Blits, B., Boer, G. J., and Verhaagen, J. Viral vector-mediated gene transfer of neurotrophins to promote regeneration of the injured spinal cord, *Prog Brain Res* 146, 451-476 (2004).
  56. Marshall, E. Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease, *Science* 298, 34-35 (2002).
  57. Marshall, E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector, *Science* 286, 2244-2245 (1999).
  58. Gansbacher, B. Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT), *J Gene Med* 5, 261-262 (2003).
  59. Kanayama, N., Fukushima, S., Nishiyama, N., Itaka, K., Jang, W. D., Miyata, K., Yamasaki, Y., Chung, U. I., and Kataoka, K. A PEG-based biocompatible block cationomer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells, *ChemMedChem* 1, 439-444 (2006).
  60. Miyata, K., Oba, M., Nakanishi, M., Fukushima, S., Yamasaki, Y., Koyama, H., Nishiyama, N., and Kataoka, K. Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity, *J Am Chem Soc* 130, 16287-16294 (2008).

61. Masago, K., Itaka, K., Nishiyama, N., Chung, U. I., and Kataoka, K. Gene delivery with biocompatible cationic polymer: pharmacogenomic analysis on cell bioactivity, *Biomaterials* *28*, 5169-5175 (2007).
62. Weishaupt, N., Blesch, A., and Fouad, K. BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury, *Exp Neurol* *238*, 254-264 (2012).
63. Nakajima, H., Uchida, K., Yayama, T., Kobayashi, S., Guerrero, A. R., Furukawa, S., and Baba, H. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats, *Spine (Phila Pa 1976)* *35*, 497-504 (2010).
64. Hamers, F. P., Koopmans, G. C., and Joosten, E. A. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury, *J Neurotrauma* *23*, 537-548 (2006).
65. van Gorp, S., Leerink, M., Kakinohana, O., Platoshyn, O., Santucci, C., Galik, J., Joosten, E. A., Hruska-Plochan, M., Goldberg, D., Marsala, S., Johe, K., Ciacci, J. D., and Marsala, M. Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation, *Stem Cell Res Ther* *4*, 57 (2013).
66. Itaka, K., Ishii, T., Hasegawa, Y., and Kataoka, K. Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity, *Biomaterials* *31*, 3707-3714 (2010).
67. Barde, Y. A., Edgar, D., and Thoenen, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain, *EMBO J* *1*, 549-553 (1982).
68. Johnson, J. E., Barde, Y. A., Schwab, M., and Thoenen, H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells, *J Neurosci* *6*, 3031-3038 (1986).
69. Nagahara, A. H., and Tuszynski, M. H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders, *Nat Rev Drug Discov* *10*, 209-219 (2011).
70. Kaplan, D. R., and Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system, *Curr Opin Neurobiol* *10*, 381-391 (2000).
71. Uchida, K., Nakajima, H., Hirai, T., Yayama, T., Chen, K., Guerrero, A. R., Johnson, W. E., and Baba, H. The retrograde delivery of adenovirus vector carrying the gene for brain-derived neurotrophic factor protects neurons and oligodendrocytes from apoptosis in the chronically compressed spinal cord of twy/twy mice, *Spine (Phila Pa 1976)* *37*, 2125-2135 (2012).
72. Koda, M., Murakami, M., Ino, H., Yoshinaga, K., Ikeda, O., Hashimoto, M., Yamazaki, M., Nakayama, C., and Moriya, H. Brain-derived neurotrophic factor suppresses delayed apoptosis of oligodendrocytes after spinal cord injury in rats, *J Neurotrauma* *19*, 777-785 (2002).

73. Dolcet, X., Egea, J., Soler, R. M., Martin-Zanca, D., and Comella, J. X. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival, *J Neurochem* *73*, 521-531 (1999).
74. Bach-y-Rita, P., and Illis, L. S. Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission, *Paraplegia* *31*, 82-87 (1993).
75. Kochanek, P. M., Berger, R. P., Bayir, H., Wagner, A. K., Jenkins, L. W., and Clark, R. S. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making, *Curr Opin Crit Care* *14*, 135-141 (2008).
76. Pouw, M. H., Hosman, A. J., van Middendorp, J. J., Verbeek, M. M., Vos, P. E., and van de Meent, H. Biomarkers in spinal cord injury, *Spinal Cord* *47*, 519-525 (2009).
77. Beck, R., Deek, J., Jones, J. B., and Safinya, C. R. Gel-expanded to gel-condensed transition in neurofilament networks revealed by direct force measurements, *Nat Mater* *9*, 40-46 (2009).
78. Shaw, G., Yang, C., Ellis, R., Anderson, K., Parker Mickle, J., Scheff, S., Pike, B., Anderson, D. K., and Howland, D. R. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury, *Biochem Biophys Res Commun* *336*, 1268-1277 (2005).
79. Anderson, K. J., Scheff, S. W., Miller, K. M., Roberts, K. N., Gilmer, L. K., Yang, C., and Shaw, G. The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury, *J Neurotrauma* *25*, 1079-1085 (2008).
80. Lewis, S. B., Wolper, R. A., Miralia, L., Yang, C., and Shaw, G. Detection of phosphorylated NF-H in the cerebrospinal fluid and blood of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients, *J Cereb Blood Flow Metab* *28*, 1261-1271 (2008).
81. Zurek, J., Bartlova, L., and Fedora, M. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H as a predictor of mortality after brain injury in children, *Brain Inj* *25*, 221-226 (2011).
82. Pelinka, L. E., Kroepfl, A., Leixnering, M., Buchinger, W., Raabe, A., and Redl, H. GFAP versus S100B in serum after traumatic brain injury: relationship to brain damage and outcome, *J Neurotrauma* *21*, 1553-1561 (2004).
83. Cao, F., Yang, X. F., Liu, W. G., Hu, W. W., Li, G., Zheng, X. J., Shen, F., Zhao, X. Q., and Lv, S. T. Elevation of neuron-specific enolase and S-100beta protein level in experimental acute spinal cord injury, *J Clin Neurosci* *15*, 541-544 (2008).
84. Loy, D. N., Sroufe, A. E., Pelt, J. L., Burke, D. A., Cao, Q. L., Talbott, J. F., and Whittemore, S. R. Serum biomarkers for experimental acute spinal cord injury:

- rapid elevation of neuron-specific enolase and S-100beta, *Neurosurgery* 56, 391-397; discussion 391-397 (2005).
85. Fekete, C., Eriks-Hoogland, I., Baumberger, M., Catz, A., Itzkovich, M., Luthi, H., Post, M. W., von Elm, E., Wyss, A., and Brinkhof, M. W. Development and validation of a self-report version of the Spinal Cord Independence Measure (SCIM III), *Spinal Cord* 51, 40-47 (2013).
86. Calhoun, C. L., and Mulcahey, M. J. Pilot study of reliability and validity of the Walking Index for Spinal Cord Injury II (WISCI-II) in children and adolescents with spinal cord injury, *J Pediatr Rehabil Med* 5, 275-279 (2012).