

## 論文の内容の要旨

論文題目 脊髄損傷急性期における炎症制御に関する研究

氏名 早川 謙太郎

脊髄損傷は、直達外力による挫滅損傷（1次損傷）の後、数日から数週かけて損傷が拡大する事（2次損傷）が知られている。1次損傷は不可避であるため、急性期の治療標的は2次損傷に向けられる。

2次損傷が起こるメカニズムは、「炎症」がキーワードとなる。1次損傷に伴って、血中や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などが大量に産生され、損傷が拡大する。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る。したがって、2次損傷を軽減させるためには、炎症の病態を把握した上で、ただ炎症反応を抑えるのではなく、正しい方向へ制御する工夫が必要となる。→第1章

実際的な治療戦略を考えると、脊髄損傷の炎症制御を試みる上で、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、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。ゆえに、安全かつ効率的なデリバリーシステムの確立は、欠く事のできないものである。→第2章

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、実際は非常に難しい。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。→第3章

本研究は3章に分けてこれらの課題に取り組んだ。

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

Macrophage/microglia には多様な活性型があり、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 と呼ばれる。M1 は神経組織に対して傷害性を、M2 は修復作用を有する。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。

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。Lipopolysaccharide (LPS) は、ET 効果を出すことが知られ、この現象を応用して、脳虚血モデルにおいて、LPS 前投与 (preconditioning) によって、虚血後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いる。しかし、LPS preconditioning によって炎症性細胞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については不明な点が多い。

筆者は、LPS 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保護・修復効果が得られる、という仮説を立て、LPS preconditioning をマウス脊髄損傷モデルに対して施行し、macrophage/microglia の活性型の解析を行った。

### 【結果】

#### (1) 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

脊髄組織における M1 および M2 マーカー発現の評価を行ったところ、脊髄損傷 1、3 日後に、M2 マーカーである arginase1 の mRNA 発現上昇が、PC 群で有意に認められた。ELISA でも、脊髄損傷後 1、3 日後に、arginase1 の蛋白濃度が PC 群で高かった。脊髄損傷 3 日後の免疫組織染色では、Iba1 および arginase1 の 2 重陽性細胞、

すなわち M2 細胞の数が PC 群で多かった。

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

フローサイトメトリーの手法で、CD45 発現の高低から resident microglia と infiltrating macrophage を判別し、さらに iNOS および arginase1 発現の高低によって M1 と M2 細胞群に分別すると、resident microglia では、M2/M1 比が PC 群で有意に増加していた。一方、脊髄内と血中の macrophage においては、M2/M1 比の有意差が認められなかった。

## (3) 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

LFB 染色では、PC 群で脊髄損傷後 1 週から 2 週にかけて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 群と比較して小さい傾向にあった。脊髄損傷後 3 週以降で、PC 群において良好な後肢運動機能が認められた。

## (4) 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

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 発現を調べた。すると、IL-4、IL-13 の mRNA 発現は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 群で上昇していることが分かった。さらに、転写因子として IL-10 発現を調節するとされる IRF-3 について、Western Blotting でリン酸化 IRF-3 の蛋白量を、IRF-3 activity ELISA で、活性型 IRF-3 の蛋白量を定量評価した。脊髄損傷 12 時間後において pIRF-3 および活性型 IRF-3 の蛋白量が、PC 群で有意に上昇していた。

今回筆者は、LPS preconditioning を受けた内在性 microglia が脊髄損傷後に M2 活性化を起こし、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、LPS preconditioning による脊髄損傷後の M2 活性化を誘導する因子として、IL-10 の発現と IRF-3 の活性化が促進されていることを示した。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。臨床応用を考えると、前投与という性質から外傷性脊髄損傷の治療に用いるのは難しいが、予防投与という形で、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。

## 【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】

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。従来はウイルスベクターを用いる手法が中心であったが、抗原性、腫瘍原性などの問題は解決していない。今回筆者は、東大疾患生命工学センターで開発された PAsp(DET)ポリマーを非ウイルスベクターとして用い、低毒性かつ高効率な pDNA 導入を目指した。PAsp(DET)の側鎖は、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。したがって、細胞外では膜傷害活性が弱く毒性が低い、エンドソーム内では膜傷害活性が強くなる。その結果ナノキャリアのエンドソーム脱出が促され、高い核酸導入効率を示す。

PAsp(DET)を遺伝子キャリアとして、マウス脊髄への遺伝子導入を試み、他の非ウイルスベクターとのレポーター発現の比較を行った。次に、治療用遺伝子を PAsp(DET)に内包し、マウス脊髄損傷モデル急性期に対する効果を検討した。治療用遺伝子には脳由来神経栄養因子 (BDNF) を用いた。

### 【結果】

#### (1) PAsp(DET)投与によって、健常脊髄に対し良好なルシフェラーゼ発現を認めた

ルシフェラーゼ発現 pDNA を用いて、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である LPEI、カチオン性リン脂質であるリポフェクタミン、naked pDNA の投与も行った。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、3 日後で、PAsp(DET)を投与したマウスにおいて、LPEI 他に比べてはるかに強い発光を認めた。

### **(2) 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**

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。キャリアーは 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。CatWalk system を用いて、運動機能の解析評価を行ったところ、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 に比べて有意な改善を認めた。

### **(3) 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ところ、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。LFB 染色では、脊髄損傷後 2、4 週の両方で、LFB 陽性面積は PAsp(DET)-BDNF 投与群で有意に大きかった。

本研究では臨床応用に向け 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、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。

## **【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】**

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、血中バイオマーカーの利用が考えられる。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 (pNF-H) に注目し、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。

### **【結果】**

#### **(1) 動物脊髄損傷モデルで、損傷強度に応じて血中 pNF-H の上昇を認めた**

マウス脊髄損傷モデルでは、損傷強度と血中 pNF-H 値には正の相関を認めた。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。

#### **(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。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、96 時間まで pNF-H 値が単調上昇を示した。

#### **(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**

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、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。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。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。

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。