

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861144

研究課題名(和文) 脊髄損傷における細胞性免疫反応を制御するマイクロRNA-amplifierの開発

研究課題名(英文) Development of microRNA amplifier to regulate cell-mediated immune responses

## 研究代表者

西村 由介(Nishimura, Yusuke)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20447816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ベバシズマブは、神経領域ではグリオーマや放射線壊死に用いられる血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の阻害薬である。今回われわれは、脊髄損傷急性期にベバシズマブを全身投与する動物実験を行い、損傷部位において血管からの血漿成分の漏出が減少することで二次損傷の急性期における炎症性浮腫が抑えられ、またそれにより神経機能が改善することが分かった。今後、ベバシズマブの脊髄損傷治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Bevacizumab, an anti-VEGF monoclonal antibody, has been proposed as treatment for gliomas and radiation necrosis in the neurological field. In our study using spinal cord injury (SCI) mice, bevacizumab has been shown to alleviate focal inflammation and edema due to suppressed vascular hyper-permeability in the acute phase of secondary injury, leading to improvement of neurological function. Our results indicate that bevacizumab may become a promising drug for alleviating SCI.

研究分野：脳神経外科、脊髄脊椎分野

キーワード：脊髄損傷 ベバシズマブ 血管内皮細胞増殖因子 炎症性浮腫

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷治療では、機械的損傷である primary injury 後に生じる secondary injury の明確な理解が必要である。Secondary injury は損傷直後よりはじまり、急性期は炎症反応が主体となり、亜急性期以降はグリア瘢痕が形成される。脊髄損傷後の軸索再生を妨げる障壁として、このグリア瘢痕の克服に我々は研究テーマとして取り組んできた。これまで、我々は脊髄損傷モデルにおいて、サイトカイン遺伝子導入によりグリア瘢痕を抑制し、顕著な運動機能改善を得てきた。しかし同時に、実際の臨床応用の観点からすると急性期における治療介入が現実的で、この時点での介入が将来のグリア瘢痕形成を未然に防止することができるとの考えから、急性期における自己免疫機序による炎症の拡大の抑制に着目した。最近、関節リウマチ (RA) に対する分子標的薬として CTLA4-Ig が臨床応用されている。この薬剤は regulatory T 細胞を活性化して細胞性免疫を抑制することにより抗炎症効果を発揮し、RA のみならず自己免疫性疾患に対し広く効果を有することが期待されている。また、この薬剤は T 細胞のみならず、抗原提示細胞に対する抑制効果もあるとされており、抗原提示細胞としても働くミクログリアの制御も期待できる。ここで、CTLA4-Ig を用いることで、自己免疫性炎症を抑制し、脊髄損傷機能改善が得られる可能性は高いと考えられた。また、近年注目されるマイクロ RNA を用いた病態解明が進み、マイクロ RNA の発現から脊髄損傷後の secondary injury の病態を解析した報告が散見されるようになってきた。マイクロ RNA は他の組織同様、中枢神経にも存在し、アルツハイマー、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病などの神経疾患の発症にかかわり、神経外傷においても重要な働きを示す。ここで注目すべきは、損傷後急性期において (3 日以降) 炎症を抑制するマイクロ RNA とアポトーシスを抑制するマイクロ RNA が downregulation されているということである。急性期のターゲットとして、この 2 つの病態が極めて大きなカギを握ると考えた。CTLA4-Ig による損傷脊髄機能回復を確認したのちに、細胞性免疫に焦点を当てたマイクロ RNA のレベルでの secondary injury の病態解明をすすめることが新たな治療薬開発に有用であると考えた。

## 2. 研究の目的

関節リウマチ (RA) に対する分子標的薬として臨床応用されている CTLA4-Ig を用い、regulatory T 細胞活性化を介して細胞性免疫を抑制し、損傷脊髄における自己免疫性炎症を抑制することにより、脊髄機能が改善することを証明する。我々は、これまでにマイクロ RNA amplifier の集団であるマイクロ

RNA17-90 クラスターが Th1 細胞性免疫を惹起することを明らかにしてきたが、損傷脊髄における自己免疫性炎症の病態に関わっている regulatory T cell の活性化を介する細胞性免疫の発現機序とその環境因子としてのマイクロ RNA と CTLA4 の機能を解明することを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

当初、坐骨神経引き抜き損傷モデルを用いた実験を計画したが、技術的エラーにより個体間のばらつきを生じたため、clip-compression による脊髄損傷マウスモデルを採用した。ラットの clip-compression による脊髄損傷モデルは既に確立されており、これを参考にマウスモデルを作製した。把持力 30g のマイクロクリップにて 15 秒間、Th9-10 レベルの脊髄に compression force をかけるモデルを作製した。

### (1) 実験

損傷後早期 CTLA4-Ig 投与による脊髄機能改善効果の検証

Clip-compression による脊髄損傷マウスモデルを用い、急性期 (損傷直後 ~ 1 週まで) に CTLA4-Ig 1mg/kg を腹腔内に隔日投与し、損傷後 8 週まで毎週下肢運動機能評価 (BMS scale, inclined-plane test, rotarod test) を行った。

### (2) 実験

損傷後 CTLA4-Ig 投与時期延長による脊髄機能改善効果の検証

脊髄損傷マウスにおける T 細胞性免疫の発現が亜急性期以降により強くみられるという過去の知見をもとに、急性期から亜急性期 (損傷直後 ~ 4 週まで) にかけて CTLA4-Ig を 1mg/kg 腹腔内に隔日投与し、急性期のみ投与した群、亜急性期まで投与した群とコントロール群を同様に損傷後 8 週まで下肢運動機能評価を行った。また、それぞれの群のグリア瘢痕形成を評価し、T 細胞性免疫を抑制することによりグリア瘢痕が最終的に抑制することが可能であるかも検討した。

### (3) 実験

ペバシズマブによる急性期炎症抑制効果の検証

CTLA4-Ig を用いた実験では、自己免疫性の T 細胞性免疫を抑制することによる損傷脊髄機能改善効果は十分とは言えなかった。T 細胞性免疫が急性期ではなく亜急性期に強く発現すること、また関節リウマチで生じる慢性的な炎症反応と外傷で急激に生じる急性炎症との炎症メカニズムの差に起因すると考えられた。また、臨床応用という観点から急性期に介入する治療を目標としていたこともあり、CTLA4-Ig のみでの治療計画には限界があった。亜急性期のみでの治療介入は現

実的ではなく、効果が不十分に終わる可能性が示唆されたので、急性期治療と組み合わせた治療計画が新たに必要であると考えた。そこで、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）に対するモノクローナル抗体であるベバシズマブを用いた新たな研究を計画した。ベバシズマブは血管新生や血管透過性亢進を抑える作用を持つ分子標的治療薬であり、神経領域ではグリオーマや放射線壊死の急性増悪に対し臨床応用されている。脊髄損傷後急性期に本薬剤を用いることにより、急性期炎症や浮腫を抑制し最終的にはグリア瘢痕を抑制し、二次損傷を軽減する効果が期待できる。また、炎症細胞浸潤を抑制するため、CTLA4-Ig との併用効果も期待できるため、より多層的に炎症を抑制することにより損傷脊髄機能改善のため、相乗効果が得られると考えた。

Clip-compression による脊髄損傷マウスモデルを用い、急性期（損傷直後および3日後）にベバシズマブ 10mg/kg を腹腔内に投与し、損傷後8週まで下肢運動機能評価（BMS scale、inclined-plane test、rotarod test）を行った。

損傷3日後にトマトレクチンを眼窩静脈から全身へ循環させた後に安楽死させ、損傷中心部における微小血管評価を行った。さらに、損傷7日後に安楽死させ、HE染色による組織学的評価とCD3、CD68、GFAPによる免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験の結果

CTLA4-Ig 投与した群とコントロール群では有意な下肢運動機能改善は得られなかった。我々は、臨床応用を目指すうえで可能な限り発症直後の急性期に治療開始することが現実的と考えた。このため、急性期の薬剤投与によりより早期の効果が得られる可能性があるかと判断し実験を進めたが、結果としては、損傷後早期に治療介入した結果として運動機能改善は得られなかった。この時点で、有意な改善を得るためには、治療介入時期を亜急性期まで拡大する必要があると考えた。

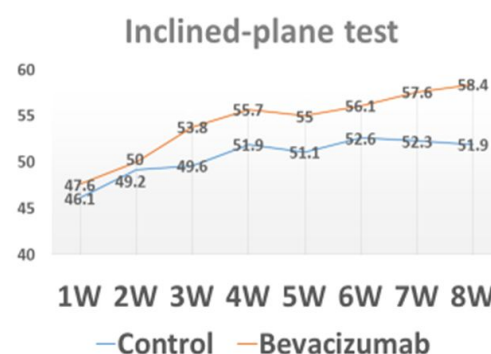
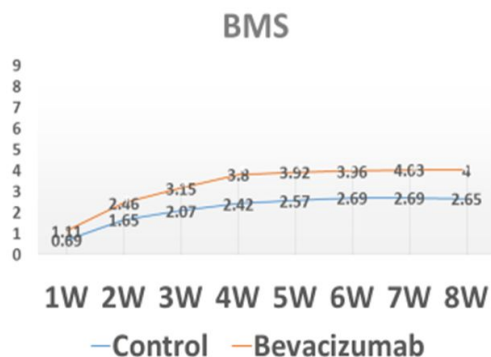
##### (2) 実験の結果

CTLA4-Ig 投与した群とコントロール群では最終的には有意な下肢運動機能改善は得られなかったが、亜急性期（損傷直後～4週）まで投与した群では、他の群と比べ下肢運動機能改善は明らかで有意差はないものの、良好な傾向がみられた。すなわち、治療介入時期により治療効果が異なることが示唆された。これは損傷脊髄におけるT細胞性免疫発現が急性期ではなく、亜急性期により強くみられるという過去の知見を支持するものであった。グリア瘢痕に関しても亜急性期まで投与した群では、グリア瘢痕の定量評価では改善傾向がみられたものの、明らかな有意差は得られなかった。T細胞性免疫を強力に抑

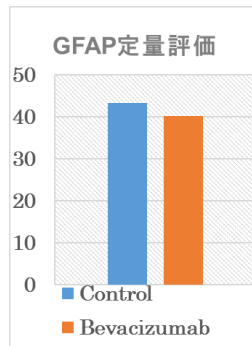
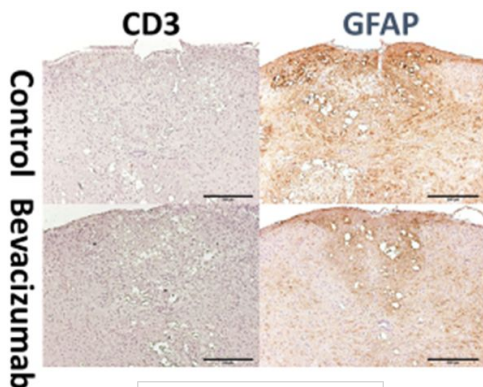
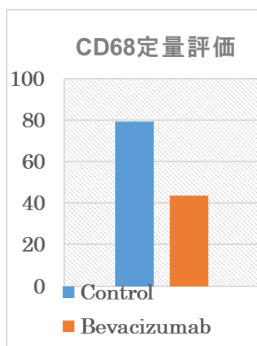
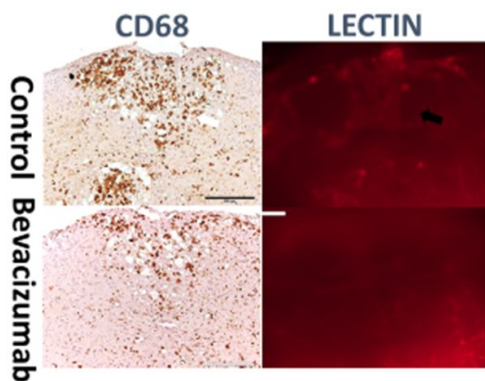
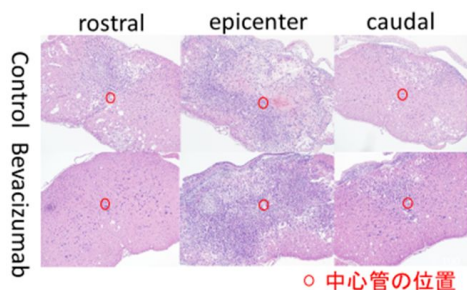
制する CTLA4-Ig での最終的なグリア瘢痕抑制効果には限界があると思われた。脊髄損傷後の自己免疫性炎症は、急性期から亜急性期にかけて multiphasic に発現するため、しかも細胞性免疫のみを抑制する治療では限界があり、それぞれの時期に複雑に生じる炎症に対して、時期と免疫応答を細かく見極めながら多層的で綿密な治療計画が必要と考えられた。このため、CTLA4-Ig のみによる炎症制御では治療効果は不十分であると考えた。

##### (3) 実験の結果

治療群ではコントロール群と比較し、BMS scale で損傷2週以降、inclined-plane test で損傷3週以降において明らかに有意な下肢運動機能改善がみられた。また、rotarod test でも有意差は見られなかったが、治療群では良好な傾向がみられた。



免疫組織学的解析では、治療群では血管透過性の亢進および新生血管の増生が抑制されていることが分かった。治療群ではコントロール群と比較し、神経細胞脱落、空洞形成が減少しており、ミクログリアや反応性アストロサイトの発現が抑制されていた。特に、ミクログリアの発現は血管透過性の亢進した部位に一致して多く認められていたため、血管透過性を抑制することにより、ミクログリアの発現や活性を効果的に抑制していることが示唆された。



結論として、ベバシズマブの投与により、血管透過性亢進を介したミクログリアを中心とする炎症細胞浸潤が抑制され、神経保護的に作用したものと考えられた。脊髄損傷急性期に VEGF は upregulate されることが報告されているが、その詳細の機能については contravertial である。本研究の結果より、脊髄損傷急性期において VEGF は血管新生や血管透過性亢進を介して炎症細胞浸潤や浮腫を惹起することで二次損傷を拡大する可能性が示唆された。

今回の結果から、急性期はベバシズマブの投与により血管透過性亢進を抑制して浮腫を軽減することにより急性期炎症を制御可能である。また亜急性期における CTLA4-Ig 投与は自己免疫性の炎症拡大を抑制して神経保護効果を発揮する。この両者を組み合わせることにより、急性期から亜急性期全般にわたり炎症を制御して脊髄機能を改善させることが可能になると考えている。この相乗効果を新たな実験により確認し、そこで発現しているマイクロ RNA を解析してその病態解明を目指すことが次に取り組むべき課題である。

#### 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 8 件)

以下全て査読有り

1.Pathophysiologic mechanisms of brain-body associations in ruptured brain aneurysms: A systematic review.

Lo BW, Fukuda H, Nishimura Y, Macdonald RL, Farrokhyar F, Thabane L, Levine MA. Surg Neurol Int. 2015 Aug 11;6:136. eCollection 2015.

2.Systematic review of clinical prediction tools and prognostic factors in aneurysmal subarachnoid hemorrhage.

Lo BW, Fukuda H, Nishimura Y, Farrokhyar F, Thabane L, Levine MA. Surg Neurol Int. 2015 Aug 11;6:135. eCollection 2015.

3.Transforaminal Lumbar Interbody Fusion for Lumbar Degenerative Disorders: Mini-open TLIF and Corrective TLIF.

Hara M, Nishimura Y, Nakajima Y, Umebayashi D, Takemoto M, Yamamoto Y, Haimoto S. Neurol Med Chir (Tokyo). 2015;55(7):547-56.

4.Outcomes and complications following

posterior long lumbar fusions exceeding three levels.

Nishimura Y, Hara M, Nakajima Y, Haimoto S, Yamamoto Y, Wakabayashi T. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014;54(9):707-15.

5.A morphologically atypical case of atlantoaxial rotatory subluxation.

Umebayashi D, Hara M, Nishimura Y, Wakabayashi T.

*J Korean Neurosurg Soc*. 2014 May;55(5):284-8.

6.Thoracic discectomy by posterior pedicle-sparing, transfacet approach with real-time intraoperative ultrasonography: Clinical article.

Nishimura Y, Thani NB, Tochigi S, Ahn H, Ginsberg HJ.

*J Neurosurg Spine*. 2014 Oct;21(4):568-76.

7.Spinal dural arteriovenous fistula associated with L-4 isthmic spondylolisthesis.

Nishimura Y, Natsume A, Ginsberg HJ.

*J Neurosurg Spine*. 2014 Jun;20(6):670-4.

8.Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitoneurotoxicity.

Umebayashi D, Natsume A, Takeuchi H, Hara M, Nishimura Y, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Wakabayashi T.

*J Neurotrauma*. 2014 Dec 15;31(24):1967-74.

〔学会発表〕(計 2 件)

1、脊髄損傷急性期におけるペバシズマブの抗浮腫効果

灰本章一、西村由介、夏目敦至、福岡俊樹、江口馨、吉川哲史、若林俊彦

第30回日本脊髄外科学会

2015年6月25日～2015年6月26日

北海道立道民活動センターかでの 2.7 (北海道札幌市中央区)

2、脊髄損傷急性期における VEGF の機能解明～ペバシズマブによる二次損傷制御～

灰本章一、西村由介、夏目敦至、福岡俊樹、江口馨、吉川哲史、若林俊彦

日本脳神経外科学会第74回学術総会

2015年10月14日～2015年10月16日

ロイトン札幌/さっぽろ芸術文化の館/札幌市教育文化会館 (北海道札幌市中央区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 由介 Nishimura, Yusuke

名古屋大学・医学部付属病院・講師

研究者番号: 20447816

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし