

博士論文

Neuroleukin による脊髄損傷改善作用の研究

Study of Neuroleukin for improving spinal cord injury

2020 年度

富山大学

和漢医薬学総合研究所

病態制御分野

神経機能学領域

谷江良崇

目次

序論	2
第1章 細胞外 NLK のアストロサイトへの作用、及び急性期脊髄損傷改善作用の検討	
1.1. 緒言	4
1.2. 実験材料及び実験方法	6
1.3. 実験結果	19
1.4. 考察	38
1.5. 小括	41
第2章 NLK の軸索伸展メカニズムの検討	
2.1. 緒言	43
2.2. 実験材料及び実験方法	44
2.3. 実験結果	49
2.4. 考察	62
2.5. 小括	64
総括	65
参考文献	68
謝辞	82

序論

脊髄損傷 (SCI : Spinal Cord Injury) では、交通事故や高所からの転落などにより脊髄組織に強い外力が加わることで、脊髄の神経伝導路の断裂や、細胞の脱落が起きる。それにより損傷部より下位の神経支配領域では、運動・感覚機能障害や膀胱・直腸機能障害、横隔膜機能の障害に起因する呼吸機能障害等、様々な生体機能に障害が生じる。これらの機能障害には、損傷の程度によっては自発的な回復が認められることがあるものの、その回復は限定的であり、障害が永続することも多くある。

脊髄損傷は外傷により引き起こされる一次損傷と、その一次損傷が要因となって生じる二次損傷に分類され、その病態は慢性期に至るまで経時的に変化する。一次損傷では、その物理的な衝撃による細胞の脱落が生じる。また血管損傷による出血とその後の血管閉塞が原因で、損傷部は虚血状態となり、細胞死が誘導される。二次損傷では損傷部において、末梢血より浸潤した単球由来マクロファージや活性化したマイクログリア等による炎症反応が誘導され、それに伴った神経軸索の脱髄、細胞死が引き起こり損傷部が拡大する。一方、損傷数日後からアストロサイトでは vimentin、Glial fibrillary acidic protein (GFAP) といった中間径フィラメントタンパク質の発現が上昇し (Pekny and Nilsson, 2005)、それに伴った細胞増殖や肥大化が誘導され、損傷部へ向かって遊走する。そして損傷 1 週間程度で、アストロサイトは炎症領域や線維性瘢痕を形成する線維芽細胞を囲い込むように集積し、グリア性瘢痕の形成が進行する。この時、損傷部に存在するアストロサイト、マイクログリアや neuro-glia antigen 2 (NG2) 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞は、軸索伸展阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Chondroitin Sulfate Proteoglycan: CSPG) を分泌する。他にも損傷部及び周辺には、脱落したミエリン断片上に発現している Nogo、myelin associated glycoprotein (MAG)、Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) 分子が軸索伸展阻害因子として存在し、これらの因子により、軸索再生に対して阻害的な環境が構成される (Yiu and He, 2006; Bradbury and Burnside, 2019)。

World Health Organization (WHO) の推定では、現在年間 25 - 50 万人が脊髄損傷を罹患している (Courtine and Sofroniew, 2019)。我が国においても年間 5000 人が脊髄損傷を罹患しており、その難治性により現在の患者総数は 10 - 20 万人以上とされている (医学のあゆみ, No. 271, 2019)。現在、脊髄損傷に対する十分な治療方法は存在しない。これまでに保険適応されている脊髄損傷治療薬として、抗炎症薬であるメチルプレドニゾロンがあり、炎症による損傷領域の拡大を抑制する作用があるとされ、二次損傷を軽減する目的で使用される。その用法は、損傷 8 時間以内に本剤を大量投与し、その後 23 時間点滴静注すると定められている (ソル・メドロール®静注用の添付文書より)。しかし、近年その効果を疑問視する報告が散見され (Hurlbert, 2000; Polland and Apple, 2003)、さらに感染症や消化管出血等の副作用が発生するため (Matsumoto *et al.*, 2001)、脊髄損傷に対する使用が避けられる傾向にあり、近年の治療ガイ

ドラインではその使用が推奨されていない (Walters *et al.*, 2013)。その他に損傷椎骨による圧迫除去のための外科的手術、リハビリテーションがあるが、これらの対症療法には、損傷後の運動機能や感覚機能を改善する積極的な役割は期待されていないため、より本質的な観点から損傷した軸索の回復を促す治療法が求められている。

現在この分野で研究が進んでいる脊髄損傷治療戦略としては、

- ①ミエリンが脱落した軸索を再髄鞘化することによって軸索の伝導能を改善させる。
- ②脊髄の二次損傷を抑制することによって、自発的な機能回復が起こりやすい環境を保持する。
- ③損傷部の断裂した軸索を再伸展させることで、脳-脊髄伝達路を再構築させる。
- ④損傷部に細胞を移植することで、空洞化した組織を充填し、かつ移植細胞由来の何らかの因子の関与により、神経細胞間のつながりを回復させる。

などがある。近年国内においても、急性期や亜急性期患者に対していくつかの臨床研究が実施されており、① - ④の作用を有すると考えられる成長因子や細胞移植の有効性が検討されている。成長因子については、顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor; Inada *et al.*, 2014) や肝細胞増殖因子 (HGF: Hepatocyte Growth Factor; Nagoshi *et al.*, 2020) が検討されており、第II相試験において一定の有効性を示している。細胞移植においては iPS 細胞由来神経前駆細胞 (Nakamura and Okano, 2013) について臨床試験中である。また 2018 年 12 月から、自家骨髄間葉系幹細胞の移植療法 (Osaka *et al.*, 2010; Oshigiri *et al.*, 2019) が、厚生労働省から「条件及び期限付承認」を取得し、翌年からステミラック注として製造され臨床で使用されている。この様に、新たな治療法の確立に向けて研究は進んでいるものの、十分な運動機能の回復を見込める治療法が確立されたとはまだ言えない現状である。上記① - ④の治療戦略の内、当研究室では、脊髄損傷治療には損傷部での軸索伸展が重要であり、断裂した神経伝導路の再建が運動機能障害からの回復には必要であると考えている。これまでにいくつか有望な薬物を見出しているが (Teshigawara *et al.*, 2013; Tanabe *et al.*, 2016; Kodani *et al.*, 2019)、筆者はさらに有効な治療戦略の開発を進めたいと考えた。

そこで、損傷部に豊富に存在するアストロサイトに着目した。積極的に軸索伸展作用を増強するようにアストロサイトの機能を誘導し、かつ神経細胞にも直接働きかけ軸索伸展に寄与する共通した因子を見いだせれば、より効果的な治療戦略の発見につながるのではないかと考えた。本研究では、アストロサイトから分泌されるタンパク質であり、その機能的意義が検討されていなかった neuroleukin (NLK) に着目した。第 1 章では、アストロサイトからの NLK 分泌による軸索伸展への寄与、及びその分泌メカニズムを検討し、細胞外 NLK の急性期脊髄損傷マウスへの有効性を検証した。第 2 章では、NLK の軸索伸展メカニズムを解明するために、そのメカニズムに関与する受容体や下流分子の特定を試みた。

第1章 細胞外NLKのアストロサイトへの作用、及び急性期脊髄損傷改善作用の検討

(Tanie *et al.*, 2018)

1.1. 緒言

通常の生理条件下の中樞神経系において、アストロサイトは細胞外イオン環境の調節や、血液脳関門の形成、グルタミン酸等の神経伝達物質の分泌・再取り込みによるシナプス間隙の環境維持、シナプス可塑性への関与によって、神経回路網の恒常性制御に重要な役割を担っている (Sofroniew and Vinters., 2010)。一方脊髄損傷では、その病態の進行に伴ってアストロサイトは異なった phenotype を示す。急性期では細胞の肥大化や突起伸長などの形態変化を呈し、reactive astrocytes と呼ばれ、慢性期に移行する頃には損傷部において細胞同士で重合し、scar-forming astrocytes と呼ばれる (Yang *et al.*, 2020)。これら phenotype 別アストロサイトでは、それぞれ発現する遺伝子プロファイルが異なり、reactive astrocytes は $\beta 1$ integrin を介した type I collagen との相互作用により scar-forming astrocytes へと変化する (Hara *et al.*, 2017)。そして脳損傷や脊髄損傷等の中樞組織における外傷では、アストロサイトは神経機能に対して有益にも有害にも作用することが広く知られている (Karimi-Abdolrezaee and Billakanti, 2012; Karve *et al.*, 2016)。以前からアストロサイトの二面性を示唆する報告はあったが (Zamanian *et al.*, 2012)、最近の研究では、アストロサイトの遺伝子発現の特徴から A1 (neurotoxic type) ・ A2 (neurotrophic type) サブタイプの存在が提唱されており、その説を支持する報告が増えつつある。活性化したマイクログリアが分泌する液性因子 IL-1 α 、TNF、C1q によりアストロサイトは A1 化すると、何らかの液性因子の分泌による神経細胞死促進作用や、シナプス形成抑制作用を示す。この A1 アストロサイトの有害な作用は、脊髄損傷を含め様々な神経変性疾患モデル動物において示されている (Liddelow *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018; Yun *et al.*, 2018)。また前述したように、脊髄損傷後の活性化したアストロサイトは損傷部へ集積すると、グリア性瘢痕を形成し、軸索伸展阻害因子 CSPG を分泌することで軸索再生を阻害する (Silver and Miller, 2004)。一方グリア性瘢痕の形成は、損傷による炎症領域を正常な組織から隔離することで、保護的な役割も担っている (Okada *et al.*, 2006; Shinozaki *et al.*, 2017)。近年、脊髄損傷マウスにおいてアストロサイト除去により瘢痕形成を阻害した場合、損傷後の自発的な軸索再生は阻害されることが示された (Anderson *et al.*, 2016)。さらに急性期から亜急性期の脊髄損傷モデルでは、アストロサイトにおける brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Dougherty *et al.*, 2000)、nerve growth factor (NGF; Krenz and Weaver, 2000)、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF; Widenfalk *et al.*, 2001) の発現上昇が確認されており、これら神経栄養因子は損傷後の自発的な運動機能の回復に寄与すると考えられる。その他にアストロサイトは、細胞外マトリックス periostin を分泌し軸索伸展を促し、脊髄損傷の改善に寄与する可能性が報

告されている (Shih *et al.*, 2014)。本研究室においても、損傷部におけるアストロサイトが、軸索伸展因子 vimentin を分泌することで運動機能の回復に寄与することを示した (Teshigawara *et al.*, 2013; Shigyo *et al.*, 2015; Shigyo and Tohda, 2016)。通常の SCI では、アストロサイトの有害な作用が有益な作用よりも優位であるために、運動機能の回復が妨げられると考えられるが、アストロサイトの有益な作用を高めることが出来れば、損傷後の運動機能の回復がもたらされるかもしれない。しかし現段階では、有益な作用をもたらすアストロサイトを誘導するメカニズムは解明されていない。

Neuroleukin (NLK) は、細胞内と細胞外で異なる機能を併せ持つ多機能性タンパク質であり、別名でも呼称される。細胞内で機能する時には、glucose-6-phosphate isomerase と呼ばれ、glucose-6-phosphate を fructose-6-phosphate に変換する酵素として解糖系で機能する。細胞外分子としての NLK は別名 autocrine motility factor (AMF) とも呼ばれ、これはがん細胞から分泌されるサイトカインとして同定された (Liotta *et al.*, 1986)。分泌された AMF は、そのオートクライン活性によりがん細胞の運動能や増殖能を高め (Silletti *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1991)、またパラクライン様に血管内皮細胞に作用して血管新生を促す機能を持つ (Funasaka *et al.*, 2001)。NLK は、ラット横隔神経を胸腔内切除された際の筋組織培養において培養上清中から同定され (Gurney *et al.*, 1986a)、神経栄養因子様の作用を示す。培養感覚神経細胞に対して NLK が神経保護作用を示し (Gurney *et al.*, 1986b)、PC12 細胞において NLK の発現誘導を行うと、staurosporine 処置による神経細胞死に対して高い細胞生存能を示す (Romagnoli *et al.*, 2003)。Epidermal growth factor (EGF) 応答性の神経前駆細胞に対しては、NLK による神経突起伸展作用が報告されている (Sun *et al.*, 1999)。また神経幹細胞とセルトリ細胞の共培養系では、セルトリ細胞から分泌された NLK が神経幹細胞から神経細胞への分化を促進し、その過程において細胞生存能を高め、軸索伸展作用を示した (Deng *et al.*, 2014)。さらに recombinant NLK を培養軟骨細胞に処置すると、NLK の合成・分泌の亢進が示されており、NLK 分泌がポジティブフィードバック機構により制御されていることが示唆された (Tian *et al.*, 2015)。培養アストロサイトでは、セクレトーム解析による NLK 分泌が示されているが (Dowell *et al.*, 2009)、その分泌を促進するシグナリングの詳細や分泌された NLK の機能的意義は不明なままであった。

そこで筆者は、細胞外からの NLK 刺激は、ポジティブフィードバック機構を介したアストロサイトからの NLK 分泌を亢進し、分泌された NLK は軸索伸展に寄与すると想定した。本章では、まずアストロサイトにおける NLK 分泌が軸索伸展に寄与するかを検討し、その分泌メカニズムの解明に取り組んだ。次に、急性期脊髄損傷モデルマウスにおける NLK の有効性を検討した。

1.2. 実験材料及び実験方法

1.2.1. 倫理宣言

本研究は、すべての動物の取り扱いが富山大学動物実験指針に基づき実施した。また、動物実験プロトコールは、富山大学動物実験委員会の承認を得ている（動物実験承認番号：A2016INM-3）。

1.2.2. 実験材料

Recombinant neuroleukin (NLK)

ヒト recombinant NLK (Cat. No. ATGP0348, ATGen, Seongnam, South Korea) を超純水に溶解させ 10 - 500 $\mu\text{g/ml}$ とし、これを 1000 倍希釈して培養細胞への処置に用いた。なお、ヒト NLK とマウス NLK の相同性はアミノ酸配列の比較で 88.7% である。

1.2.3. マウス胎児大脳皮質神経細胞の初代培養

実験には胎生 14 日齢の ddY マウス (Japan SLC、浜松) を用いた。胎児を母体から取出し、phosphate buffered saline (PBS) 中で洗浄し、脳を単離、初代培養用に作製した培地 [Neurobasal media (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 中に 12% horse serum (HS, Thermo Fisher Scientific)、2 mM L-グルタミン、0.6% グルコースを溶解] (HS medium) に入れた。実体顕微鏡 (SZ61, Olympus, 東京) 下で大脳皮質のみを単離し、クリーンベンチ内でハサミを用いて細かく切断した後、700 rpm で 3 分間遠心した。上清を取り除き、沈渣に 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Thermo Fisher Scientific) を 2 ml 加え懸濁し、37°C で 15 分間インキュベーションした。この間、5 分おきに攪拌した。その後 HS medium を 4 ml 加えて、700 rpm で 3 分間遠心した。上清を取り除き、沈渣に 600 U/ml DNase I (Thermo Fisher Scientific) -0.03% trypsin inhibitor (Thermo Fisher Scientific) -PBS 溶液 2 ml を加え懸濁した。37°C で 15 分間、5 分おきに攪拌しながらインキュベーションした後、HS medium を 4 ml 加え 700 rpm で 3 分間遠心した。上清を取り除き、沈渣に calcium-,magnesium-free Hanks' balanced salt solution (HBSS, Thermo Fisher Scientific) を 4 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心した。上清を取り除き、HS medium を 6 ml 加え、先端を炙りなめしたパスツールピペットで細胞塊がほとんど見えなくなるまで懸濁した。70 μm nylon cell strainer (Becton Dickinson and Company (BD), Franklin, NJ, USA) で濾過し、trypan blue 染色で死細胞と弁別しながら生細胞を数えた後、 1.875×10^4 cells/cm² となるように 8-well チャンバースライド (BD) に播種した。8-well チャンバースライドは前日から poly-D-Lysine (PDL; 5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MD, USA) 溶液でコーティングし、37°C でインキュベーションした後、培養当日に滅菌水で 2 回洗浄したものを用いた。培養は 10% CO₂、37°C、飽和水蒸気下で行った。培養開始 4 時間後、培地を全量、無血清培地 [Neurobasal media (Thermo Fisher

Scientific) 中に 2% B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific)、2 mM L-グルタミン、0.6% グルコースを溶解] と交換した。

1.2.4. マウス脊髄アストロサイトの単離培養

実験には胎生 14 日齢の ddY マウス (Japan SLC) を用いた。アストロサイト単離培養の手順は以前の報告 (McCarthy and de Vellis, 1980; Marek *et al.*, 2008) を参考にした。

胎児を母体から取出し、PBS 中で洗浄し、脊髄を単離した。単離した脊髄を、初代培養用に作製した培地 [10% fetal bovine serum (FBS, 和光純薬) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, 1:1) medium (Thermo Fisher Scientific)] に入れた。実体顕微鏡 (SZ61, Olympus) 下で単離した脊髄の軟膜を取り除き、クリーンベンチ内でハサミを用いて細かく切断した後、700 rpm で 3 分間遠心した。上清を取り除き、沈渣に 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Thermo Fisher Scientific) を 2 ml 加え懸濁し、37°C で 30 分間インキュベーションした。この間、5 分おきに攪拌した。その後培地を 4 ml 加えて、1500 rpm で 2 分間遠心した。上清を取り除き、沈渣に 600 U/ml DNase I (Thermo Fisher Scientific) -0.03% trypsin inhibitor (Thermo Fisher Scientific) -PBS 溶液 2 ml を加え懸濁した。37°C で 15 分間、5 分おきに攪拌しながらインキュベーションした後、培地を 4 ml 加え 1500 rpm で 2 分間遠心した。上清を取り除き、培地を 3 ml 加え、先端を炙りなめしたパストゥールピペットで細胞塊がほとんど見えなくなるまで懸濁した。70 μ m nylon cell strainer (BD) で濾過し、細胞が含まれた培地全量を PDL (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) 溶液でコーティングした 6-cm ディッシュに播種した。4 時間後、培地を取り除き PBS で洗浄した。その後直ちに、0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Thermo Fisher Scientific) を 1 ml 加えた。細胞がディッシュからはがれたのを確認後、600 U/ml DNase I (Thermo Fisher Scientific) -0.03% trypsin inhibitor (Thermo Fisher Scientific) -PBS 溶液 1 ml を加え、培地を 4 ml 加えて 3000 rpm で 2 分間遠心した。上清を取り除き、培地を 2 ml 加え、先端を炙りなめしたパストゥールピペットで細胞塊がほとんど見えなくなるまで懸濁した。Trypan blue 染色で死細胞と弁別しながら生細胞を数えた後、 2.4×10^5 cells/cm² となるように、PDL (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) 溶液でコーティングした T-25 フラスコ (BD) に播種した。神経細胞、アストロサイト、他のグリア細胞が存在している条件下で 8 - 11 日間培養し、その後振盪 (37°C, 225 rpm, 15-18 hr) した。この振盪操作によって神経細胞、マイクログリア、オリゴデンドロサイト前駆細胞がはがれる。フラスコ底面に付着して残ったアストロサイトを 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Thermo Fisher Scientific) を用いてはがし、単離したアストロサイトは、PDL (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) 溶液でコーティングした 8-well チャンバースライド (BD) または 48 穴プレート (Thermo Fisher Scientific) に $1.3-2.7 \times 10^5$ cells/cm² になるように播種した。

アストロサイトの純度の評価は次の通り行った。単離培養開始 7 日後に、培養終了後、培地を取り除き 4% paraformaldehyde (PFA, 和光純薬、大阪) -PBS 溶液を加えて 1 時間室温で静置し固定した。溶液を取り除き、0.3 % tritonX-100 (和光純薬) -PBS 溶液で 3 回、5 分間の洗浄を行った。全量 100 μ l の 1 次抗体溶液 [0.3 % tritonX-100-PBS 溶液、1% normal goat serum (和光純薬)、rabbit 抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) ポリクローナル抗体 (1:1000; Cat. No. AB5804, Millipore, Burlington, MA, USA)] を加え、4°Cで一晩反応させた。翌日 1 次抗体溶液を取り除き、0.3% tritonX-100-PBS 溶液で 3 回、5 分間の洗浄を行った。その後 2 次抗体溶液 [0.3% tritonX-100-PBS 溶液、Alexa Fluor 594 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:400; Cat. No. A-11012, Thermo Fisher Scientific)] を 100 μ l 加え、遮光下、室温で 2 時間反応させた。反応後、2 次抗体溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行い、全量 100 μ l の 1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) 溶液を含む PBS 溶液を加え、遮光下、室温で 10 分間反応させた。反応後 DAPI 溶液を取り除いて、PBS で 2 回、5 分間の洗浄を行い、aqua poly mount (Polysciences, Warrington, PA, USA) で封入した細胞観察の結果、DAPI 陽性の全細胞における GFAP 陽性アストロサイトの割合は約 75%であった (データ未提示)。

1.2.5. マウス大脳皮質マイクログリアの単離培養

Saura の方法 (Saura *et al.*, 2003) を改良してマイクログリアの培養を実施した (Kuboyama *et al.*, 2017)。生後 2 - 4 日齢の ddY マウス 4 - 6 匹に対して 70% isopropanol (和光純薬) を噴霧することで消毒し、さらに UV 光に 1 分間当てて滅菌した。実体顕微鏡下で大脳皮質を単離し、10% FBS を含む DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) に移した後、クリーンベンチ内に運んだ。大脳皮質組織を micro scissors で細かくした後、1000 rpm、室温で 3 分間の遠心処理をした。上清を取り除き、沈渣に 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Thermo Fisher Scientific) を 2 ml 加え懸濁し、5 分に 1 度混和しながら 37°Cで 30 分間インキュベーションした。その後培地を 4 ml 加えて、2000 rpm で 5 分間遠心した。上清を取り除き、沈渣に 600 U/ml DNase I (Thermo Fisher Scientific) -0.03% trypsin inhibitor (Thermo Fisher Scientific) -PBS 溶液 2 ml を加え懸濁した。37°Cで 15 分間、5 分おきに攪拌しながらインキュベーションした後、培地を 4 ml 加え 1000 rpm で 3 分間遠心した。上清を取り除き、培地を 4 ml 加え、先端を炙りなめしたパスツールピペットで細胞塊がほとんど見えなくなるまで懸濁した。パスツールピペットを用いて 15% Bovine serum albumin (BSA, 和光純薬) 2 ml をチューブ底にゆっくり加え二層となるようにし、2000 rpm、6 分間で遠心した。これにより軸索の破片や脂質は上層に集まり、細胞体だけが下層に沈殿する。上清を除去し培地を 2 ml 加え懸濁した。Trypan blue 染色で死細胞と弁別しながら生細胞を数えた後、 $2.5 - 3.0 \times 10^6$ cells/dish となるように、10 cm-dish に播種した。そのまま 14-18 日間継続して培養し、その間 2 日毎に培地交換を実施した。

培養状況が confluent に達したことを確認した後、培地を取り除き PBS で洗浄した。DMEM/F-12 を 12 ml 加えた後に 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Thermo Fisher Scientific) を 3 ml 加え、60 分間 37°C でインキュベーションした。これによりマイクログリア以外のすべての細胞が dish 底からはがれる。その後上清を除去し、PBS 5ml で2回洗浄した。次に 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Thermo Fisher Scientific) 6 ml を加え、37°C で 5 分間インキュベーションし、スクレーパーではがした細胞を 50 ml チューブに移した。室温、1000 rpm、3 分間で遠心後、上清を除去し、10% FBS 含有 DMEM/F-12 を 2 ml 加え、trypan blue により生細胞をカウントし、8-well チャンバースライド (BD) に 1.5×10^4 cells/well となるように播種した。

1.2.6. アストロサイトから得た培養上清 (Astrocyte conditioned medium: ACM) またはアストロサイト lysate における NLK 量の定量

これまでに NLK のポジティブフィードバック制御が培養軟骨細胞で報告された場合、NLK の処置濃度は ng/ml オーダーだった (Tian *et al.*, 2015)。そのため本研究でも、培養脊髄アストロサイトに 10, 100, 300, 500 ng/ml の NLK または溶媒を 6 日間処置した。アストロサイトに NLK を処置した後、培地 [Neurobasal media (Thermo Fisher Scientific) 中に 2 mM L-グルタミン、0.6% グルコースのみを溶解] (supplement-free medium) を用いて洗浄し、さらに supplement-free medium を用いて 24 時間培養後の培養上清を ACM とした。中和抗体処置の場合、抗 autocrine motility factor receptor (AMFR) 抗体 (1 μ g/ml, Cat. No. NBP2-15734, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, Lucarelli *et al.*, 2015)、抗 78 kDa glucose regulated protein (GRP78) 抗体 (2 μ g/ml, Cat. No. cs-1050, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, Kelber *et al.*, 2009)、ネガティブコントロールとして normal rabbit immunoglobulin (IgG; 1 μ g/ml, Cat. No. sc-2027, Santa Cruz Biotechnology)、または normal goat IgG (2 μ g/ml, Cat. No. sc-2028, Santa Cruz Biotechnology) を用いた。上記中和抗体を使用した過去の報告 (Kelber *et al.*, 2009; Lucarelli *et al.*, 2015) と同様の濃度で細胞に処置したところ、細胞毒性が認められたため、細胞毒性が確認されない最高濃度を採用した。中和抗体を 15 分間処置した後、500 ng/ml の NLK または溶媒を細胞に処置して 24 時間培養した。その後 supplement-free medium を用いて洗浄後、さらに supplement-free medium を用いて 24 時間培養し ACM を得た。回収された ACM を 0.22 μ m フィルター (Millipore) を用いてろ過し、Amicon Ultra-0.5 10K Centrifugal Filter Unit (Millipore) により 14000 g、4°C、50 分間で遠心、濃縮した。ACM 中のタンパク質量は、NanoOrange Protein Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定した。

各細胞の Cell lysate を調製する場合、培地を除去、PBS で洗浄した後、protease and phosphate inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) が含まれた mammalian protein extraction reagent (M-PER) lysis buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え、氷上で 20 分間インキュベーションした。20 分後に細胞液を 14000 g、

4°C、10分間で遠心し細胞片を取り除いたのち、上清を cell lysate とした。Lysate 中のタンパク質濃度は、Pierce 660 nm Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。

以下の通り、SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングを実施した。各 lysate に 5% 2-mercaptoethanol (和光純薬)、NuPAGE lithium dodecyl sulphate (LDS) sample buffer (Thermo Fisher Scientific) を加えて 75°C で 5 分間熱処理を行った。このサンプルを 8% アクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動の後、そのゲルを用いてニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad, Berkeley, CA, USA) へのタンパク質の転写処理を 90 分間行った。転写後のメンブレンを 0.1% Tween 20 を含む tris buffer saline (0.1% T-TBS) で 2 回、5 分間の洗浄を行った。5% スキムミルク (和光純薬) を用いて 1 時間ブロッキング処理をし、0.1% T-TBS で 1 回軽く洗浄を行った後に、1 次抗体溶液 [Can Get Signal solution 1 (Toyobo, 大阪)、mouse 抗 NLK モノクローナル抗体 (1B7D7; 1:1000; Cat. No. ab66340, Abcam, Cambridge, UK)] を加え、4°C で一晩反応させた。翌日 1 次抗体溶液を取り除き、0.1% T-TBS で 3 回、10 分間の洗浄を行った後、2 次抗体溶液 [Can Get Signal solution 2 (Toyobo)、horseradish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:2000; Cat. No. sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)] を用いて室温で、2 時間反応させた。2 時間後、2 次抗体液を取り除き、0.1% T-TBS で 2 回、10 分間の洗浄を行った。検出液として electron chemiluminescence (ECL) Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にメンブレンを 2 分間浸した後、ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare) を用いて、メンブレン上のバンドを発光検出した。バンドの輝度の定量には、CS analyser を用いた (ATTO, 東京)。

NLK 検出の後、メンブレンを超純水で 1 回洗浄した。20 ml の WB stripping solution (nacalai tesque, 京都) を加え、50°C で 40 分間振盪した。抗体がはがれたことを ECL での発光検出によって確認した後に、0.1% T-TBS で 1 回、5 分間洗浄し、5% スキムミルク (和光純薬) を用いて 1 時間ブロッキング処理を行った。ブロッキング後、0.1% T-TBS で 1 回軽く洗浄し、1 次抗体溶液 [Can Get Signal solution 1 (Toyobo)、rabbit 抗 β -actin ポリクローナル抗体 (1:1000; Cat. No. 4970, Cell Signaling Technology, MA, USA)] を加え、4°C で一晩反応させた。翌日 1 次抗体溶液を取り除き、0.1% T-TBS で 3 回、10 分間の洗浄を行った後、2 次抗体溶液 [Can Get Signal solution 2 (Toyobo)、HRP 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:2000; Cat. No. sc-2004, Santa Cruz Biotechnology)] を用いて室温で、2 時間反応させた。2 時間後、2 次抗体液を取り除き、0.1% T-TBS で 2 回、10 分間の洗浄を行った。

1.2.7. アストロサイトの細胞質画分および膜画分 lysate の調製及び lysate 中の AMFR と GRP78 の検出

Mem-PER™ Plus (Thermo fisher scientific) を用いてプロトコールに従い、3 cm-dish で培養した培養開始 6 日後のアストロサイトを用いて、細胞膜画分 lysate と細胞質画分 lysate を調製した。タンパク質定量、

SDS-PAGE 実施後に、1 次抗体として rabbit 抗 AMFR ポリクローナル抗体 (1:1000 ; NovusBiologicals) または goat 抗 GRP78 ポリクローナル抗体 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit 抗 nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) ポリクローナル抗体 (H-302; 1:200; Cat. No. sc-5544, Santa Cruz Biotechnology) を、2 次抗体に goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology) または HRP 標識 donkey anti-goat IgG 抗体 (1:5000; Cat. No. sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) を用いたウェスタンブロッティングを行い、各画分 lysate における AMFR、GRP78、nAChR $\alpha 7$ の発現を確認した。

1.2.8. 軸索伸展作用の評価

PDL coating 上で培養された場合、単離培養 1 日後のマウス大脳皮質または脊髄神経細胞に 10 - 1000 ng/ml の NLK または ACM を 5 日間処置した。CSPG (2 mg/ml Aggrecan; Sigma-Aldrich) coating 上で培養された場合、培養 1 日後に 0.01 - 100 ng/ml の NLK を 4 日間処置した。培養終了後、培地を取り除き 4% PFA-PBS 溶液を加えて 1 時間室温で静置し固定した。溶液を取り除き、0.3% tritonX-100 -PBS 溶液で 3 回、5 分間の洗浄を行った。全量 100 μ l の 1 次抗体溶液 [0.3% tritonX-100-PBS 溶液、1% normal goat serum (和光純薬)、rabbit 抗 microtubule associated protein (MAP2) ポリクローナル抗体 (1:2000; Cat. No. ab32454, Abcam)、mouse 抗 phosphorylated neurofilament-H (pNF-H) モノクローナル抗体 (1:300; Cat. No. SMI-35R, Covance, Emeryville, CA, USA)] を加え、4°Cで一晩反応させた。翌日 1 次抗体溶液を取り除き、0.3% tritonX-100-PBS 溶液で 3 回、5 分間の洗浄を行った。その後 2 次抗体溶液 [0.3% tritonX-100-PBS 溶液、Alexa Fluor 488 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:400; Cat. No. A-11008, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 594 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:400; Cat. No. A-11005, Thermo Fisher Scientific)] を 100 μ l 加え、遮光下、室温で 2 時間反応させた。反応後、2 次抗体溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行い、全量 100 μ l の DAPI 溶液 (1 μ g/ml; Enzo Life Science) を含む PBS 溶液を加え、遮光下、室温で 10 分間反応させた。反応後 DAPI 溶液を取り除いて、PBS で 2 回、5 分間の洗浄を行い、aqua poly mount (Polysciences) で封入した。

蛍光免疫染色後のスライド観察には、蛍光倒立顕微鏡 Cell Observer (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)、20 x NA 0.8 objective lens を用い、ソフトウェアは AxioVision4.8 (Carl Zeiss) を用いて、一枚当たりの大きさ 432.49 μ m x 322.81 μ m の画像を撮影した。

画像を撮影後、画像解析ソフト MetaMorph version7.8 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて、撮影した画像の画面全体の pNF-H 陽性の神経軸索の長さを測定した。また画面全体の MAP2 陽性の細胞体数を計測し、総軸索長を除することで神経細胞あたりの軸索長を算出した。

1.2.9. 培養アストロサイトにおける NLK の直接結合タンパク質の同定

i) Drug affinity responsive target stability (DARTS) 法 (Lomenick *et al.*, 2009)

タンパク質量 10 μ g のアストロサイトの whole cell lysate または細胞膜画分 lysate に溶媒 (超純水) あるいは 10 μ g/ml の NLK を加え、室温で 30 分間反応させた。反応後、reaction buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.0)、50 mM NaCl、10 mM CaCl₂] 及び 1 μ g Thermolysin (和光純薬) を加え、37°C、30 分間でタンパク質分解反応させた。その後、氷上に直ちに移し 3 μ l の 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH 8.0) を加え、thermolysin によるタンパク分解反応を停止した。

ii) SDS-PAGE、銀染色、ウェスタンブロッティング

DARTS 後のサンプルに 5% 2-mercaptoethanol (和光純薬)、NuPAGE LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific)を加えて 75°Cで 5 分間熱処理をした。このサンプルを 8% アクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動を行った。その後ゲルからニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad) へのタンパク質の転写処理を 90 分間行った。転写後のメンブレンを 0.1% Tween 20 を含む TBS (0.1% T-TBS) で 2 回、5 分間の洗浄を行った。5%スキムミルク (和光純薬) を用いて 1 時間ブロッキング処理をし、0.1% T-TBS で 1 回軽く洗浄を行った後に、1 次抗体溶液 [Can Get Signal solution 1 (Toyobo)、goat 抗 GRP78 ポリクローナル抗体 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology)] を加え、4°Cで一晩反応させた。翌日 1 次抗体溶液を取り除き、0.1% T-TBS で 3 回、10 分間の洗浄を行った後、2 次抗体溶液 [Can Get Signal solution 2 (Toyobo)、HRP 標識 donkey anti-goat IgG 抗体 (1:5000 ; Santa Cruz Biotechnology)] を用いて室温で、2 時間反応させた。2 時間後、2 次抗体液を取り除き、0.1% T-TBS で 2 回、10 分間の洗浄を行い、バンドを検出した。

ゲルを銀染色する場合、電気泳動後のゲルを超純水で一回軽く洗浄し、固定液 [40% エタノール (和光純薬)、10% 酢酸 (和光純薬)] を加え一晩振盪させた。その後の操作は銀染色キット SilverQuest™ (Thermo Fisher Scientific) を使用しそのプロトコールに従った。

iii) nano LC-MS/MS

銀染色後のゲルにおいて、溶媒処置された lysate を用いたレーンと比較して、NLK 処置により細くなるバンドを MS 解析用に切り出し、日本バイオサービス (埼玉) に解析を依頼した。ゲル断片を脱色、システインの SH 基の還元処理及びアルキル化等を実施した上で、トリプシンによるゲル内消化を行った。その後、消化されたペプチド断片を抽出し、脱塩処理の上、nanoLC-MS/MS によるサンプルの解析を行った。解析によって得たスペクトルデータをもとに Mascot search (MS/MS Ion Search) により、切り取ったバンドに含まれるタンパク質を検討した。

1.2.10. 脊髄損傷マウスの作製

実験には、雌性 8 週齢 ddY マウス (Japan SLC) を用いた。動物の取り扱い、富山大学動物実験指針に従った。また、本動物実験のプロトコールは、富山大学動物実験委員会の承認を得ている。マウスはプラスチックケージ (23×16×12 cm) に入れ、12 時間の明暗周期 (明期: 7:00 - 19:00)、恒温恒湿 (22±2°C、55±10%) の環境下で飼育した。水及び固形飼料は自由摂取させた。3 種混合麻酔 [butorphanol tartrate (5 mg/kg、Meiji Seika ファルマ、東京), medetomidine hydrochloride (0.75 mg/kg、日本全薬工業、東京), midazolam (4 mg/kg、サンド、東京)] を用いてマウス腹腔内に投与して麻酔した。マウスの背部の毛を剃り、皮膚を 3 cm ほど切開した後に、筋肉を両側によけ、第 7-10 胸椎を露出させた。2 椎体分の椎弓を切除し、第 11-12 胸髄を露出させた。マウスの頭部および脊椎をステレオタキシス (NARISHIGE, 東京) で固定し、露出させた脊髄に重さ 6.5 g、先端直径 1 mm の錘を 3 cm の高さから 1 回自由落下させた。その後、筋肉および皮膚を滅菌済みシルクブレード縫合糸 4 号 (直径 0.10-0.149 mm, ハシモト, 東京) で縫合した。手術後、マウスに抗麻酔薬である 75 µg/ml atimamezole (日本全薬工業) を副腔内投与し、さらに補液として 900-1000 µl saline を臀部に皮下投与した。また、マウスを覚醒するまで 37°C のホットプレート (NHP-M30N、日伸理化、東京) 上で静置させることで体温を維持した。

1.2.11. 急性期脊髄損傷マウスにおける損傷部への NLK 脊髄実質内投与

損傷部における脊髄実質内への 1 mg/ml NLK あるいは溶媒 (20 mM Tris-HCl buffer, 1 mM Dithiothreitol, 10% glycerol) の投与は、損傷後 15 分以内に行った。脊髄に損傷を与え損傷部の止血を行った後、ガラスキャピラリー (Probeta) を用いて溶媒あるいは NLK を投与した。投与部位は、損傷部を含む正中線を軸に lateral ± 1.0 mm, depth 0.7 mm の位置に 2 か所とし、1 か所あたり 1 µl を KDS-210 シリンジポンプ (KD Scientific, Holliston, MA, USA) を用いて 0.25 µl/min の速度で投与した。投与終了後は 2 分間静置してからガラスキャピラリーを抜去した。ガラスキャピラリーはガラス管 [キャピラリーチューブ (外形 0.5 mm (ProBeta))] を縦引き型プーラー (PC-10, NARISHIGE) により引き伸ばし、マイクロフォージ (MF-900, NARISHIGE) を用いて内径を 40 µm に調節したものをを用いた。

1.2.12. 脊髄損傷マウスの後肢運動機能評価

手術翌日より 1 日 1 回、マウスの行動観察を行った。マウスを観察用の黒色オープンケージ (50.0 cm×42.5 cm×15.0 cm) に入れ、3 分間自由行動を観察し、その際の後肢運動機能を関節の動き、肢裏の付き方、前後肢の協調性、尾の動きなどに着目する Basso Mouse Scale (BMS, Table 1; Basso *et al.*, 2006) 、体重支持能力に着目する当研究室が開発した Body Support Scale (BSS, Table 2; Teshigawara *et al.*, 2013) および

BMS、BSS をもとに当研究室が開発した Toyama Mouse Score (TMS, Table 3; Shigyo *et al.*, 2014) により評価した。観察時の室内の照度は 500 ルクスとした。

Table 1 BMS

0	かかとの動きが全くない
1	可動範囲の半分以下でかかとうが動く。
2	可動範囲の半分を超えてかかとうが動く。
3	肢裏を付けることが出来る (体重支持が出来るかに関わらず)。 または、肢表をつけて前へ歩く。
4	前へ歩く歩数のうち、半分以下の確率で肢裏をつけて歩く。
以下、"前へ歩く歩数の内、半分を超えた確率で肢裏をつけて前へ歩く"を満たす。	
5	前肢との協調性が全くない。または、前へ歩く歩数のうち、ほとんどが前肢との協調性がなく、肢が回転つき回転して離れる。
6	前へ歩く歩数のうち、ほとんどが前肢との協調性がなく、肢が平衡につく (どのように離れるかに関わらず)。または、前へ歩く歩数のうちほとんどが前肢との協調性があり、肢が回転して回転して離れる。
7	前へ歩く歩数のうちほとんどが前肢との協調性があり、肢が平衡につく (どのように離れるかに関わらず)。
以下、"前へ歩く歩数の内、半分を超えた確率で肢裏をつけて前へ歩く"かつ、"前へ歩く歩数のうちほとんどが前肢との協調性があり、肢が平衡につき平衡に離れる"を満たす。	
7	後ろ半身の動きが不安定 (痙攣、背骨の湾曲、よたよた歩き、尻をつく等)。
8	後ろ半身の動きが少し不安定で、腰や尾の先端 (尾を上げている時)が左右に揺れる。または、後ろ半身の動きが正常で、尾を下げっぱなしか上げ下げしている状態。
9	後ろ半身の動きが正常で、尾を常に上げている状態。

Table 2 BSS

0	肢裏がつかない
以下、"かかとうが動き、肢裏をつく"を満たす。	
1	体重支持が出来ない。
2	体重支持が出来ないが、時々後ろ半身を持ち上げる。
3	体重支持で歩行できるが、よろよろと不安定。または、時々体重支持が出来なくなる。
4	安定した体重支持で歩行できる。

Table 3 TMS

かかとの動き				かかと以外の関節の動		指の動き		肢裏のつき方				Coordination		Hindlimb movement at		Body Supporting	
頻度		可動域						静止時		移動時							
なし	0	なし	0	なし	0	なし	0	つかない	0	つかない	0	なし	0	なし	0	体重支持できない	0
50%以下	1	50%以下	1	あり	1	あり	1	一部つく	1	移動時に足裏が一部つく	1	あり	1	回転	1	時々おしりが持ち上がる	5
50%以上	2	50%以上	2					かかとがつく	2	移動時に足裏全体をつくが、頻度50%以下	2			平行	2	常にお尻が持ち上がるが、不安定	10
										移動時に足裏全体をつくが、頻度50%以上	3					常にお尻が持ち上がり、安定	15
										常に足裏全体で移動	4						
合計																	15
/30点																	

1.2.13. 脊髄組織切片の作製

損傷後 20 日目に、30 mg/ml trichloroacetaldehyde monohydrate (和光純薬) -saline を 400-500 μ l を用いてマウス腹腔内に投与して麻酔した。胸部を切開し、左心室に翼状針 (トップ、東京) を刺入した後、右心耳に切れ込みを入れ、氷冷した saline を 20 ml 灌流し、続いて氷冷した 4% PFA-PBS を 20 ml 灌流して組織を固定した。マウスの背部を切開し、損傷部位を含む頸椎から腰椎までを筋肉が付着した状態で摘出し、4% PFA-PBS に浸して一晩 4°C で保存した。後日脊椎から脊髄を取り出し、損傷部位中心に 3 cm の長さに切った。組織を 30% sucrose (和光純薬) -PBS に浸しスクロース置換を行った後、クリオモルド 3 号 (サクラファインテックジャパン, 東京) に Tissue-Tek OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) と共に埋め込み、-30°C に保存した。クリオスタット (CM3050S, Leica, Heidelberg, Germany) を用いて、12 μ m 厚の連続矢状断切片を作製した。その際、庫内温度およびステージ温度は -20°C に設定した。切り出した切片はコーティング済みスライドガラス (松浪硝子工業, 大阪) に貼り付け、-30°C に保存した。

1.2.14. 脊髄組織切片の蛍光免疫染色

脊髄組織切片を常温に戻した後、Shandon Sequenza® (Thermo fisher scientific) にスライドガラスをセットし、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った。全量 300 μ l のブロッキング溶液 [0.3% tritonX-100-PBS 溶液、5% normal goat serum (NGS, 和光純薬)] を加え、1 時間静置した。次に 1 次抗体液 [0.3% tritonX-100-PBS 溶液、5% BSA 中に以下の一次抗体 2 種を組み合わせたもの: ① mouse 抗 GFAP モノクローナル抗体 (G-A-5; 1:1000; Cat. No. G3893, Sigma-Aldrich) および rabbit 抗 NF-H ポリクローナル抗体 (1:1000; Cat. No. AB1989, Chemicon, Temecula, CA, USA) の場合、② mouse 抗 NLK モノクローナル抗体 (1B7D7; 1:1000; Abcam)、rabbit 抗 GFAP ポリクローナル抗体 (1:1000; Millipore) の場合] を 200 μ l 加え、4°C で一晩反応させた。翌日、0.3% tritonX-100-PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、2 次抗体溶液 [0.3% tritonX-100-PBS 溶液、5% BSA、Alexa Fluor 488 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:400; Thermo fisher scientific)、Alexa Fluor 594 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:400; Thermo fisher scientific)、Alexa Fluor 594 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:400; Thermo fisher scientific)、Alexa Fluor 488 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:400; Thermo fisher scientific)、DAPI 溶液 [1 μ g/ml (Enzo Life Science)] を 200 μ l 加え、遮光下、常温で 2 時間反応させた。反応後、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行い、aqua poly mount (Polysciences) で封入した。

1.2.15. 脊髄組織切片の画像解析

スライドの観察には蛍光倒立顕微鏡 Cell Observer (Carl Zeiss)、20 x NA 0.8 objective lens、Axio Vision4.8 ソフトウェア (Carl Zeiss) を用いた。GFAP 染色像をもとに、GFAP 陽性領域に囲まれた範囲をグリア性

痕跡に囲まれた損傷部と規定し、損傷部面積が最も広い 3 枚の切片を定量に用いる切片として選んだ。その切片について、損傷部と損傷境界が十分に観察可能な範囲を CCD camera (AxioCam MRm, Carl Zeiss) を用いて撮影し、多次元イメージング取得機能 (蛍光マルチチャンネル、MosaiX) により画像を取得した。

取得した画像を用いた定量には、画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, Rockville, MD, USA) を用い、損傷部の面積と、損傷部内の NLK の発光輝度を求めた。また、損傷部内の NF-H 陽性軸索の長さを Image J を用いてトレースし、損傷部における軸索密度を算出した。

1.2.16. 統計解析

データは平均値±標準誤差 (S.E.M.) で表した。有意差検定には、Prism 5.04 (Graph Pad software, San Diego, CA, USA) を用い、unpaired two-tailed *t*-test、One-way analysis of variance (ANOVA) *post hoc* Bonferroni test、repeated measures Two-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test を行った。有意水準は 5% とした。

1.3. 実験結果

1.3.1. 細胞外 NLK のアストロサイトへの作用の検討

まず、アストロサイトに NLK を処置することで、アストロサイトにおける NLK 発現に変化が起きるか検討した。単離培養開始 4 時間後のマウス胎仔脊髄アストロサイトにヒト recombinant NLK (500 ng/ml) または溶媒を処置し、さらに 6 日間培養した後、cell lysate を調製した。ウェスタンブロッティングによって lysate 中の NLK 発現量を検討した。また NLK 検出後のメンブレンをストリッピング処理し、抗 β -actin 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより lysate 中での β -actin を検出し internal control とした。その結果、溶媒処置群と比較して NLK 処置によりアストロサイトにおける NLK 発現が有意に増加した (Figure 1A)。また検出された NLK のバンドは、62 kDa と 47 kDa の 2 か所に検出されたが、高分子側のバンドの分子量は以前に報告された AMF (NLK の別名) の分子量と一致する (Watanabe *et al.*, 1996)。一方ヒト線維肉腫細胞では、細胞内で分解されたために低分子にシフトした AMF の発現が確認されており、今回検出された低分子の NLK と分子量が一致している (Niinaka *et al.*, 1998)。そのため 2 つのバンドを合わせて定量した。

NLK により細胞内の NLK の発現が有意に増加した。NLK はがん細胞から分泌される液性因子として知られており (Liotta *et al.*, 1986)、機能は不明だが培養アストロサイトからも分泌されることが報告されている (Dowell *et al.*, 2009)。本実験では、細胞外からの NLK 刺激による細胞内の NLK 発現量の増加に伴い、アストロサイトからの NLK 分泌が、促進される可能性を考え以下の検討を行った。培養開始 4 時間後の初代培養アストロサイトに溶媒または NLK (10, 100, 300, 500 ng/ml) を処置し 6 日間培養した。6 日後、NLK が含まれていない無血清培地に交換し、1 日間培養した培養上清を CM とした。抗 NLK 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって CM 中の NLK 量を検討したところ、溶媒処置されたアストロサイトから得た CM 中でも NLK が検出された (Figure 1B)。NLK 処置したアストロサイトから得た CM 中では、処置濃度依存的に NLK 量が増加していた。溶媒処置時と比較して、500 ng/ml NLK を処置した場合、CM 中の NLK 量が有意に増加していた (Figure 1B)。さらに CM 中に検出された NLK の分子量は、lysate のものと比較して、若干高分子側にシフトしており、68 kDa であった。この CM 中の NLK の分子量は、セルトリ細胞の CM から検出された NLK の分子量と一致している (Deng *et al.*, 2014)。NLK のアミノ酸配列から推定される分子量は約 63 kDa であるため、高分子側へのシフトは何らかの翻訳後修飾の影響を示唆している。本実験から、細胞外 NLK はアストロサイトにおける NLK 発現と NLK 分泌の両方を増強することが示された。また Figure 1A でみられた NLK 刺激による細胞内 NLK の発現量の増加は、初代培養神経細胞及びマイクログリアでは確認されなかった (Figure 2A, B)。

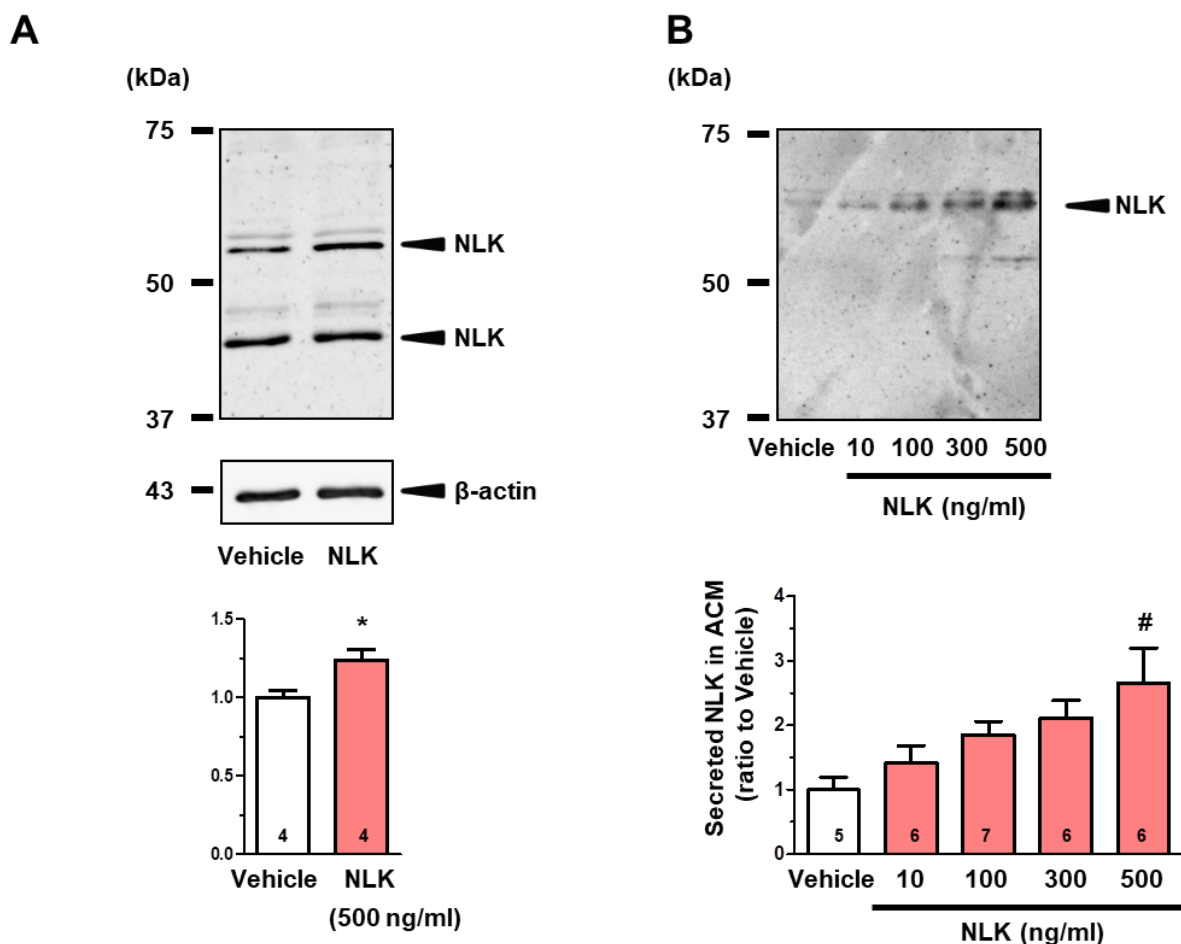
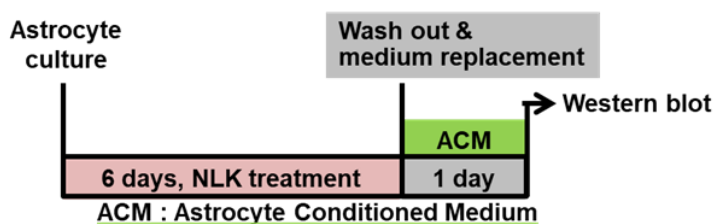


Figure 1 アストロサイトからの neuroleukin (NLK)分泌への細胞外 NLK の作用

マウス脊髄アストロサイトを初代培養し、培養開始4時間後にヒト recombinant NLK (10, 100, 300, 500 ng/ml) または溶媒 (超純水) を処置した。その後6日間培養し、NLKの含まれていない無血清培地に交換し、さらに1日間培養した培養上清を conditioned medium (CM) とし、細胞を回収して cell lysate を調製した。(A) 抗 NLK 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより lysate または (B) CM 中の NLK を検出し、定量した。カラム内の数字は独立して行った実験の回数を示す。* $p < 0.05$, vs Vehicle, unpaired two-tailed t -test, ($n = 4$). # $p < 0.05$, vs Vehicle, One-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, ($n = 5 - 7$).

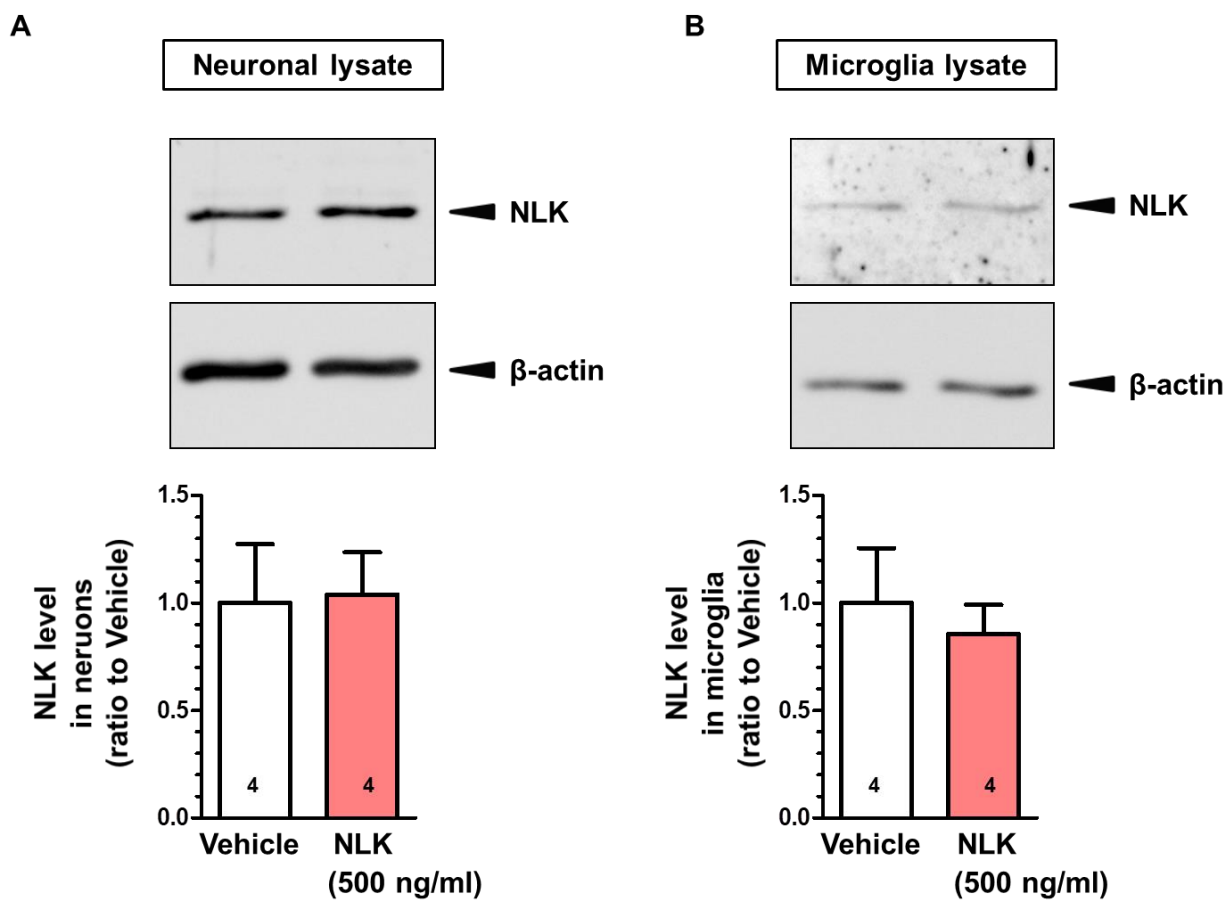


Figure 2 細胞外 NLK の培養神経細胞及び培養マイクログリアへの作用

マウス大脳皮質神経細胞及びマイクログリアをそれぞれ初代培養し、培養開始 4 時間後にヒト recombinant NLK (500 ng/ml) または溶媒 (超純水) を処置した。その後 6 日間培養し、細胞を回収して cell lysate を調製した。抗 NLK 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、(A) 神経細胞、(B) マイクログリアそれぞれの lysate 中における NLK を検出、定量した。カラム内の数字は独立して行った実験の回数を示す。* $p < 0.05$, vs Vehicle, unpaired two-tailed t -test, (n = 4).

1.3.2. 細胞外 NLK の軸索伸展作用の検討

NLK 処置されたアストロサイトから得た CM の軸索伸展活性を検討した。ddY マウス胎生 14 日齢の大脳皮質神経細胞を単離培養し、1 日後、CM を処置した。その後 5 日間培養し、細胞を固定した。蛍光免疫染色により 1 細胞あたりの pNF-H 陽性軸索長を定量することで、NLK の軸索伸展活性を評価した。溶媒処置されたアストロサイト CM と比較して、NLK 処置時のアストロサイトから得た CM は有意に軸索伸展活性を示した (Figure 3A)。この結果から、NLK 処置されたアストロサイトは軸索伸展を促す何らかの液性因子を分泌したと考えられた。

さらに細胞外 NLK 自身の軸索伸展活性についても検討した。単離培養 1 日後の大脳皮質神経細胞に NLK (10, 50, 100 ng/ml) または溶媒を処置したところ、溶媒処置時に比べ NLK 処置下では、どの処置濃度においても有意に軸索密度が増加した (Figure 3B)。さらに脊髄神経細胞にも NLK (10, 100, 1000 ng/ml) または溶媒を処置したところ、100 ng/ml の NLK は有意な軸索伸展活性を示した (Figure 3C)。

ここまでの検討結果をまとめると、NLK 刺激によってアストロサイトから分泌される軸索伸展因子の一つが、NLK である可能性が示唆された。

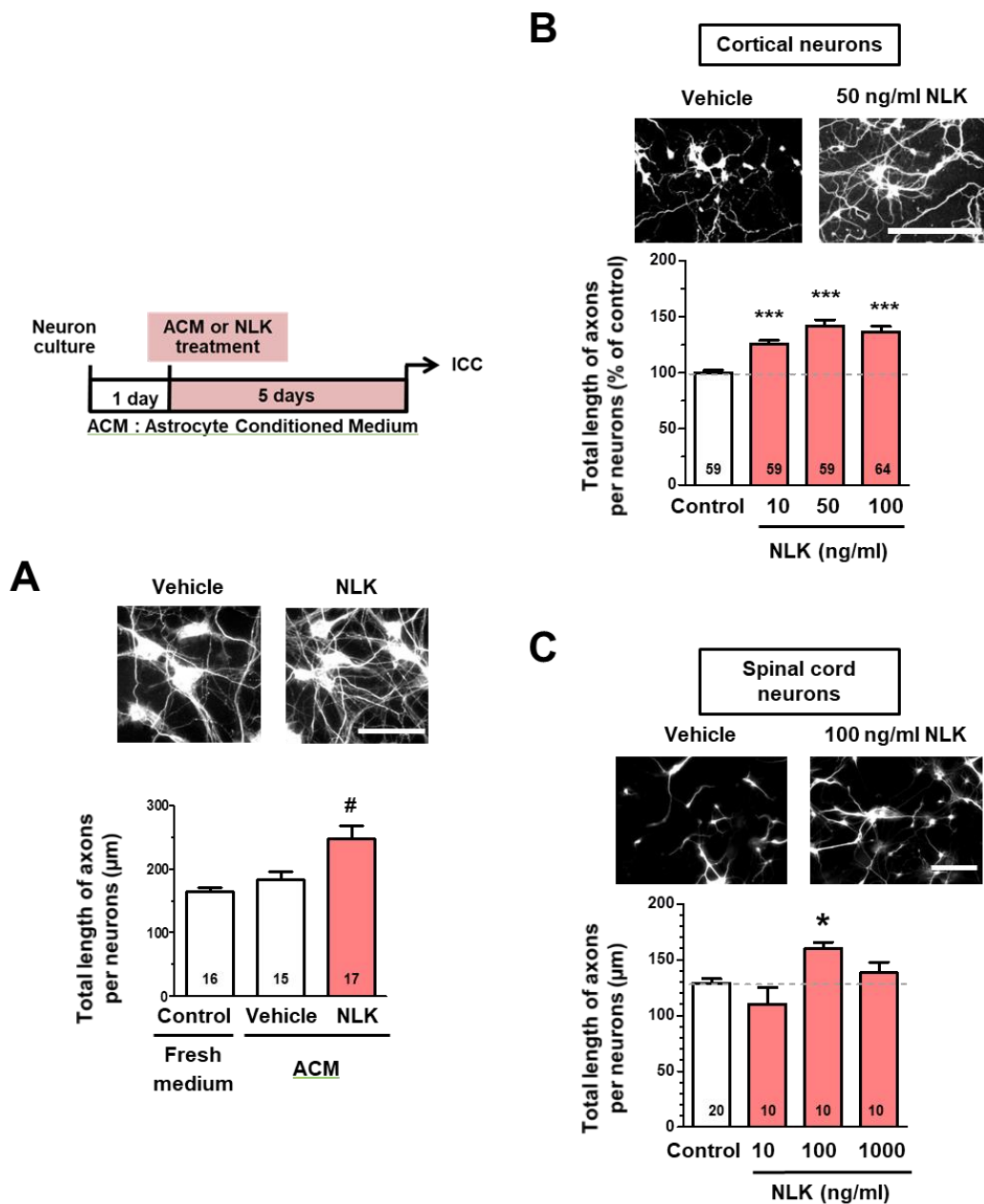


Figure 3 細胞外 NLK による軸索伸展作用

培養開始 1 日後のマウス胎仔大脳皮質神経細胞に対し、NLK または溶媒を処置したアストロサイトから得た CM を処置した。さらに 5 日間培養後、抗 MAP2 抗体および抗 pNF-H 抗体を用いて免疫染色を行った。(A) 抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色画像を例示した。MAP2 陽性の神経細胞 1 個あたりの pNF-H 陽性軸索の長さを測定した。解析に用いた画像の枚数をカラム内に示した。^{*} $p < 0.05$, vs Vehicle, One-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, (n = 15–17). Scale bar = 100 μm . (B) 大脳皮質神経細胞及び (C) 脊髄神経細胞を 1 日培養した後、NLK (10, 50, 100, 1000 ng/ml) または溶媒を処置した。さらに 5 日間培養し、抗 MAP2 抗体および抗 pNF-H 抗体を用いて免疫染色を行った。抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色画像を例示した。MAP2 陽性の神経細胞 1 個あたりの pNF-H 陽性軸索の長さを測定した。解析に用いた画像の枚数をカラム内に示した。^{*} $p < 0.05$, ^{***} $p < 0.001$ vs Control, One-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, (n = 10–64). Scale bar = 100 μm .

1. 3. 3. CSPG coating assay を用いた NLK の軸索伸展作用の検討

脊髄損傷組織において、損傷部では軸索再生を阻害する因子である CSPGs が蓄積する (Silver and Miller, 2004)。そこで NLK がその様な阻害環境下であっても、軸索伸展作用を示すか検討した。マウス胎仔大脳皮質神経細胞を、PDL coating 上または CSPG coating 上で初代培養し、翌日、ヒト recombinant NLK (10, 100 ng/ml) または溶媒を処置した。その後 4 日間培養し、蛍光免疫染色により 1 細胞当たりの pNF-H 陽性軸索の長さを算出した。

溶媒処置された神経細胞においては、PDL coating 上で培養された場合と比べ、CSPG coating 上で培養されると有意に軸索の長さが減少した。また CSPG coating 上で培養された神経細胞に 10 ng/ml の NLK を処置すると、溶媒処置時と比較して有意に軸索長が増加した (Figure 3A)。同様の方法で、脊髄由来神経細胞に対しても NLK (0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) を処置したところ、10 ng/ml の NLK は有意に軸索長を増加した (Figure 3B)。この結果から、CSPG coating 上においても NLK は軸索伸展活性を有することが示された。

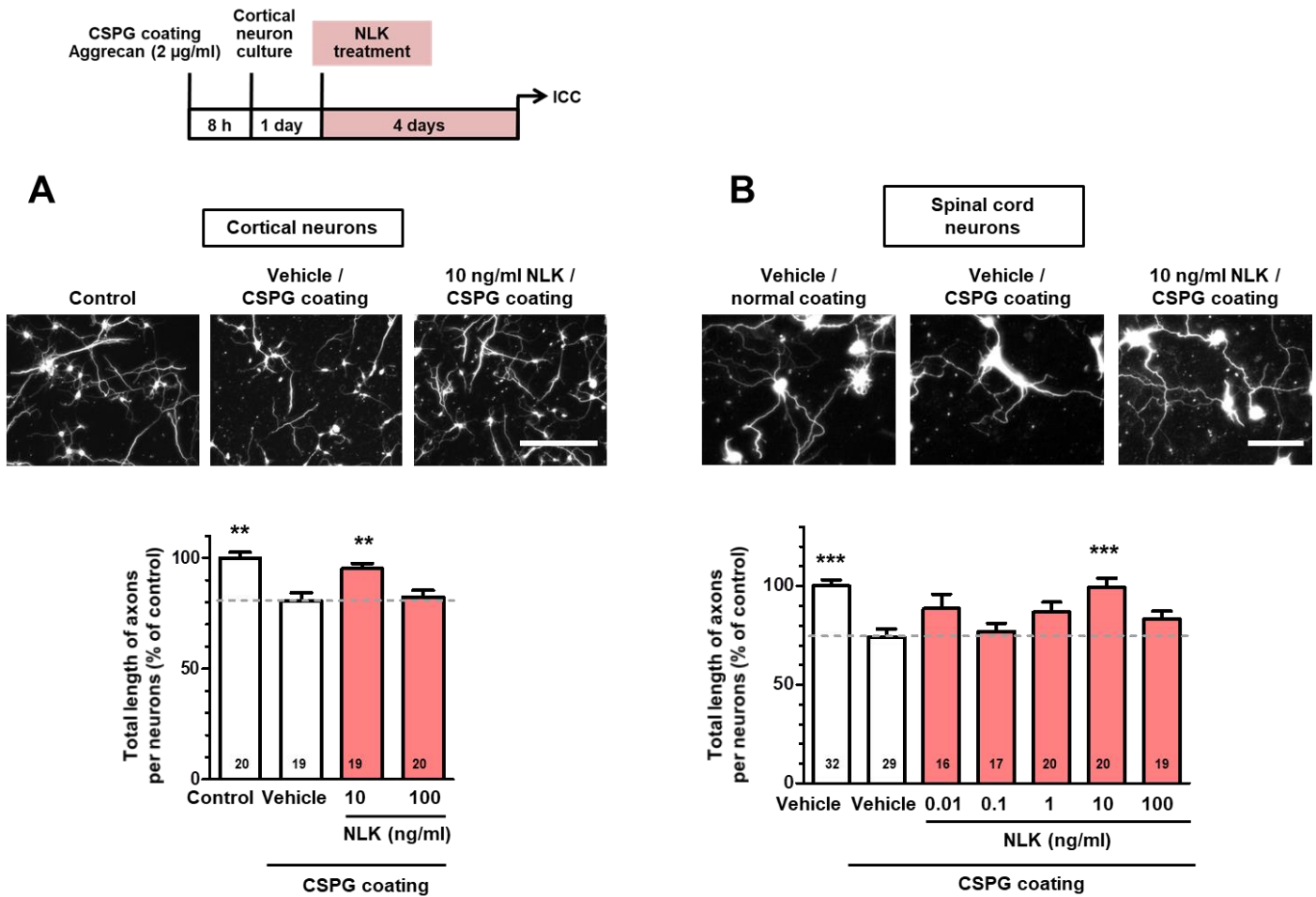


Figure 4 CSPG coating 上における NLK の軸索伸展作用

PDL coating または CSPG coating 上で (A) 大脳皮質神経細胞及び (B) 脊髄神経細胞を初代培養し、翌日、ヒト recombinant NLK (0.01 - 100 ng/ml) または溶媒 (Control, Vehicle) を処置した。さらに 4 日間培養し、抗 MAP2 抗体および抗 pNF-H 抗体を用いて免疫染色を行った。抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色画像を例示した。MAP2 陽性の神経細胞 1 個あたりの pNF-H 陽性軸索の長さを測定した。解析に用いた画像の枚数をカラム内に示した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Control, One-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, (n = 16 - 32). Scale bar = 100 µm.

1.3.4. アストロサイトからの NLK 分泌における autocrine motility factor receptor (AMFR) の関与の検討

これまでの実験結果から、NLK 処置によりアストロサイトからの NLK 分泌が増強されることが明らかとなった。本実験では、アストロサイトからの NLK 分泌メカニズムの解明における最初の検討事項として AMFR と NLK 分泌の関係性について検討した。

AMFR は、NLK の受容体として知られた 7 回膜貫通型受容体である。がん細胞において、分泌された AMF (NLK の別名) は、オートクライン様に、または周辺細胞にパラクライン様に AMFR を介して作用し、がん細胞の遊走能や増殖能を高めることが報告されている (Silletti *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 1999)。グリア細胞においても AMFR の発現は確認されているものの (Leclerc *et al.*, 2000)、特にアストロサイトの細胞膜表面において、この受容体が発現しているという報告はない。そこでまずは、培養アストロサイトの細胞膜表面における AMFR の有無について検討した。

単離培養 6 日後のマウス胎仔脊髄アストロサイトを用いて、細胞質画分および細胞膜画分 lysate を調製した。細胞質と細胞膜とに分画できているかを検討するために、細胞膜に特異的に局在する nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) (Xiu *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2008) の発現をウェスタンブロッティングにより確認した。その結果、細胞膜画分 lysate のレーンでのみ nAChR $\alpha 7$ のバンドが検出された (Figure 5A)。またウェスタンブロッティングにより、各 lysate 中の AMFR 発現を確認したところ、細胞質画分 lysate 中では AMFR のバンドが検出されたが、細胞膜画分では検出されなかった (Figure 5A)。

しかし、ウェスタンブロッティングでは検出できない程低い発現量の AMFR が細胞膜上にある可能性は否定できないため、アストロサイトにおける NLK が誘発する NLK 分泌現象への AMFR の関わりを機能的に検証した。AMFR の機能中和抗体をアストロサイトへ処置することで、細胞膜上の AMFR をマスクし、NLK 分泌が減弱するかを検討した。NLK は解糖系の酵素でもあり、その基質認識部位を利用して AMFR の C 末端領域に存在する糖鎖付加部位と細胞外に露出された他の C 末領域の両方を認識することで、細胞内にシグナルを伝える (Haga *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006)。本実験で用いられた AMFR 抗体は、AMFR の C 末領域に結合することで阻害作用を示すことが報告されている (Lucarelli *et al.*, 2015)。また AMFR 中和抗体の用量は、Lucarelli の報告 (Lucarelli *et al.*, 2015) を参考にし、細胞毒性を示さない最も高い濃度に設定した。

単離培養 4 時間後、マウス胎仔脊髄アストロサイトに AMFR 中和抗体 (1 $\mu\text{g/ml}$) あるいは normal rabbit IgG (1 $\mu\text{g/ml}$) を処置した。その 15 分後に溶媒または recombinant NLK (500 ng/ml) を培地に添加し、ウェル内で 2 回ピペッティングを穏やかに行った。さらに 1 日間培養し、CM を得た。抗 NLK 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって CM 中の NLK を検出した。Normal rabbit IgG 処置群間において、溶媒処置アストロサイトから得た CM と比較して、NLK 処置時の CM 中の NLK 量は増加傾向を示した。

中和抗体前処置群間においても、溶媒処置 CM と比較して、NLK 処置 CM 中に含まれる NLK 量は増加していた (Figure 5B)。この結果から、NLK 刺激によるアストロサイトからの NLK 分泌メカニズムに対して、細胞膜上の AMFR は関与しないと考えられる。

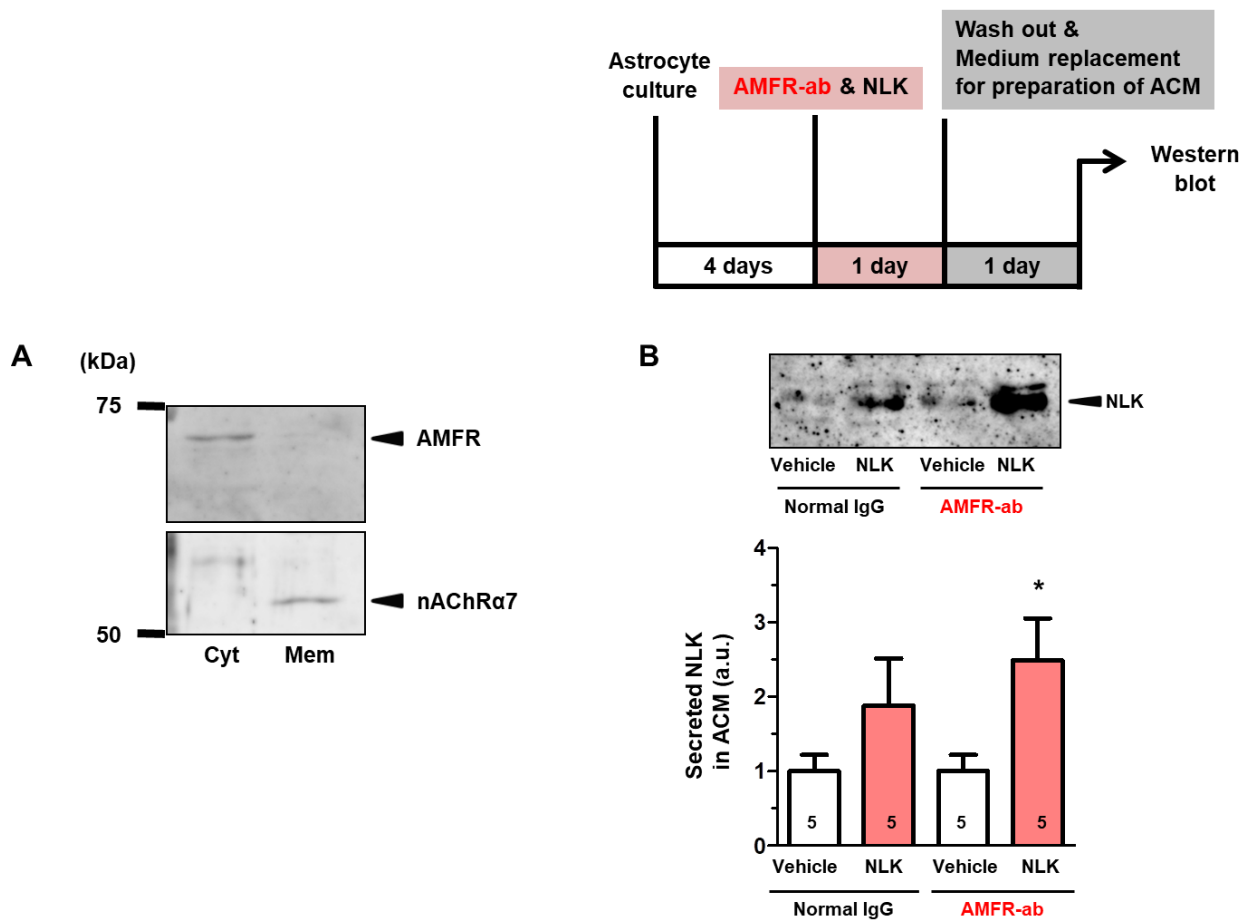


Figure 5 アストロサイトからの NLK 分泌における AMFR の関与

(A) 6日間培養したマウス脊髄アストロサイトから細胞質画分および細胞膜画分 lysate を調製した。抗 AMFR 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって、各 lysate 中に含まれる AMFR、nAChRα7 を検出した。(B) 単離培養開始4日後のアストロサイトに対し、normal IgG (1 μg/ml) または AMFR 抗体 (1 μg/ml) を処置した。15分後 NLK (500 ng/ml) または溶媒を処置し、さらに1日間培養した。その後、NLK の含まれていない無血清培地に交換し、さらに1日培養して CM を得た。この CM における NLK をウェスタンブロッティングにより検出、定量化した。カラム内の数字は独立して行った実験の回数を示す。

* $p < 0.05$, vs AMFR-ab / Vehicle, unpaired two-tailed t -test, (n = 5).

1.3.5. アストロサイトに発現する細胞外 NLK の直接結合タンパク質の同定

1.3.4. から、NLK の受容体として最もよく研究されている AMFR は、アストロサイトの細胞膜上において発現も機能もみられないことが示唆された。当研究室では、薬物の作用機序の全容を明らかにするには、まず薬物が直接結合するタンパク質を同定することが重要であると考えており、drug affinity responsive target stability (DARTS) 法 (Lomenick *et al.*, 2009) を用いて、種々の薬物の結合タンパク質を同定してきた (Tohda *et al.*, 2012; Watari *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017; Tanabe *et al.*, 2018)。この方法では、cell lysate 等のタンパク質抽出液から、着目している分子の結合タンパク質を網羅的に探索することが可能となる。薬物が標的タンパク質と結合することで、タンパク質の構造がわずかに変化し、それによりタンパク質分解酵素に対する脆弱性が変化する。DARTS 法ではこの現象を利用し、薬物処置によりタンパク質分解反応が亢進または減弱するタンパク質を探索・同定する。本研究においても、アストロサイトにおける NLK の結合タンパク質を DARTS 法により探索した。

マウス胎仔脊髄アストロサイトの whole cell lysate に recombinant NLK (0.1, 1, 10 µg/ml) を加えて DARTS 反応を行った後、サンプルを電気泳動し、銀染色によりゲル中のタンパク質を染色した。その結果、溶媒処置レーンと比較して NLK 処置で薄く変化するバンドが一ヶ所検出された (Figure 6A, 赤矢頭)。その薄く変化したバンド、およびそれに対応する他レーンのバンドを切り出した。ゲル内トリプシン消化後、nano LC-MS/MS 解析し、Mscot データベースと UniProt データベースを用いた検索をしたところ、直接結合タンパク候補として 78kDa glucose regulated protein (GRP78) が示唆された (score: 630, coverage: 30%)。銀染色により検出されたこのバンドの変化が GRP78 であるかを確認するために、DARTS 反応を再び行い、抗 GRP78 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。その結果、lysate 中の GRP78 の発現が、溶媒処置時と比較して NLK 処置により低くなっていることを確かめた (Figure 6B)。

GRP78 は、heat shock protein 70 ファミリーに属するシャペロン分子であり、小胞体内においてタンパク質のフォールディングや品質管理、小胞体ストレスシグナルの制御などを担う。また近年、小胞体以外での GRP78 の発現が報告されており、核内、細胞質、細胞膜上または分泌型など、この分子の局在は様々である (Ni *et al.*, 2011)。中枢神経系においては、神経細胞やアストロサイトの細胞膜に発現しているという報告がある (Honda *et al.*, 2009; Goldenberg-Cohen *et al.*, 2012; Bellani *et al.*, 2014; Louessard *et al.*, 2017)。そこで初代培養アストロサイトの細胞質画分および細胞膜画分 lysate を調製し、ウェスタンブロッティングにより GRP78 の発現を確認したところ、両画分でバンドが検出された (Figure 6C)。さらにその細胞膜画分 lysate を用いて DARTS 反応を行い、GRP78 の発現をウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、溶媒処置時と比較して NLK 処置により GRP78 のバンドは薄く変化した (Figure 6D)。この結果から、NLK が、アストロサイトの細胞膜に存在する GRP78 に結合する可能性が示唆された。

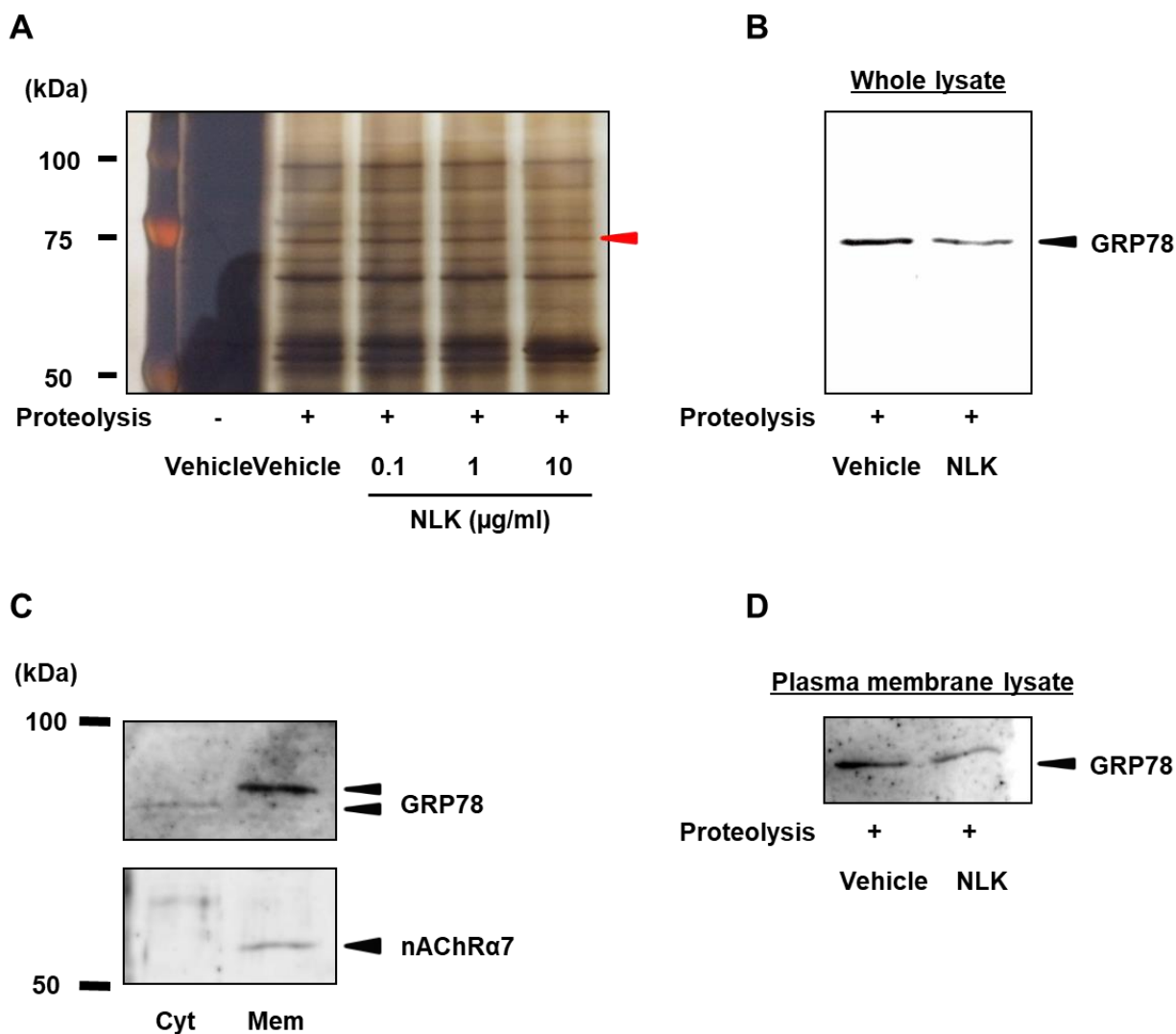


Figure 6 アストロサイトにおける NLK の直接結合タンパク質の探索

(A) DARTS 後のサンプルを電気泳動し、ゲル中のタンパク質を銀染色により可視化した。溶媒処置レーンと比較して、NLK 処置レーンで薄く変化したバンドが確認された (赤矢頭)。切り出したバンドのゲル内トリプシン消化後、nano LC-MS/MS 解析し、Mscot データベースと UniProt データベースを用いた検索により、このバンドが 78kDa glucose regulated protein (GRP78) であると示唆された。(B) 銀染色で変化が確認されたバンドが GRP78 であるか確認するため、DARTS 後のサンプル中における GRP78 を、抗 GRP78 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。(C) 培養 6 日後のマウス胎仔脊髄アストロサイトから細胞質画分および細胞膜画分 lysate を調製した。抗 GRP78 抗体および抗 nAChRα7 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって、各画分中に含まれる GRP78 と nAChRα7 を検出した。(D) アストロサイトの細胞膜画分 lysate を用いて DARTS を行った後、ウェスタンブロッティングにより lysate 中の GRP78 を検出した。

1.3.6. アストロサイトからの NLK 分泌における GRP78 の関与の検討

次に、アストロサイトにおける細胞外 NLK 誘導性の NLK 分泌に、GRP78 が関与するかを機能的に検証した。1.3.5.では、アストロサイトの細胞膜における GRP78 の発現が確認され、NLK とアストロサイト細胞膜上の GRP78 が結合する可能性を示した (Figure 5A - D)。そこで、GRP78 の機能中和抗体をアストロサイトに前処置し細胞膜上の GRP78 をマスクすることで、NLK 分泌が減弱するかを検討した。GRP78 の抗体濃度は、本実験と同じ抗体を用いている報告と同濃度で用いたところ細胞死が認められたため (Kelber *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2013)、細胞死が誘導されない最高濃度に設定した。培養開始 4 日後のマウス胎仔脊髄アストロサイトに GRP78 中和抗体 (2 µg/ml) あるいは normal goat IgG (2 µg/ml) を処置してから NLK (500 ng/ml) を処置した。Normal rabbit IgG 処置群間において、溶媒処置アストロサイトから得た CM と比較して、NLK 処置時の CM 中の NLK 量は有意に増加した。一方、中和抗体処置群間では、NLK 処置による CM 中の NLK の増加は認められなかった (Figure 7)。

これらの結果から、細胞外 NLK 刺激によるアストロサイトからの NLK 分泌メカニズムにおいて、細胞膜上の GRP78 が関与することが示唆された。

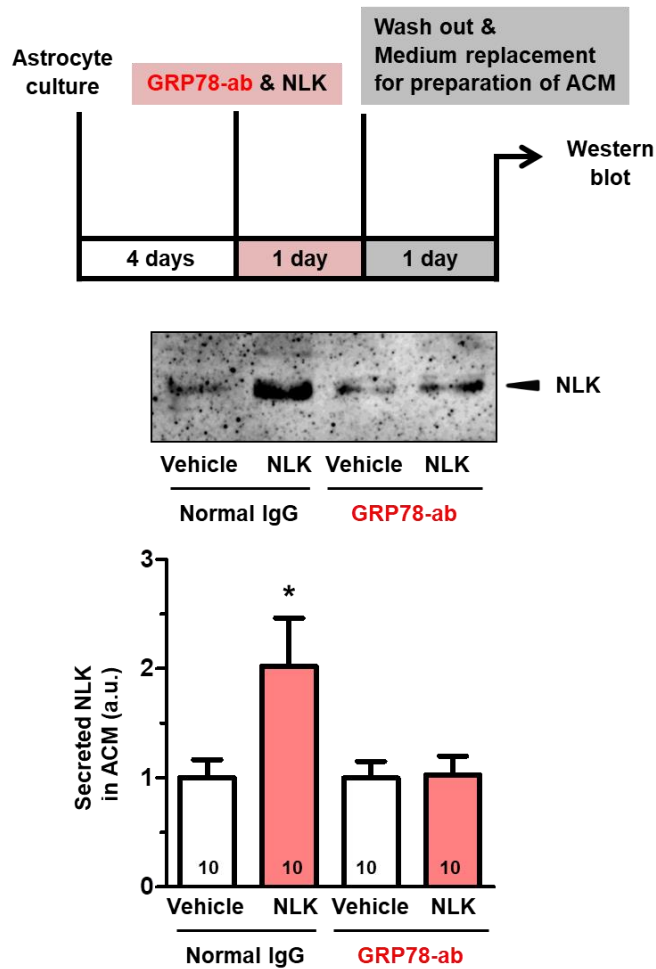


Figure 7 アストロサイトからの NLK 分泌における GRP78 の関与

単離培養開始 4 日後のマウス胎仔脊髄アストロサイトに対し normal IgG (2 μ g/ml) または GRP78 中和抗体 (2 μ g/ml) を処置した。15 分後 NLK (500 ng/ml) または溶媒を処置し、さらに 1 日間培養した。その後、NLK の含まれていない無血清培地に交換し、さらに 1 日培養して CM を得た。この CM 中の NLK をウェスタンブロッティングにより検出、定量化した。カラム内の数字は独立して行った実験の回数を示す。

* $p < 0.05$, vs Normal IgG / Vehicle, unpaired two-tailed t -test, (n = 10).

1.3.7. 急性期脊髄損傷マウスに対する NLK の軸索伸展作用の検討

脊髄損傷では、運動機能を制御する下行性伝導路が損傷を受けることで、永続的な運動機能障害が生じる。損傷後、活性化アストロサイトは損傷部に集積し、軸索伸展阻害因子である CSPGs を分泌する (Silver and Miller, 2004)。その様な阻害的な環境により、損傷後の軸索再生と運動機能の回復は阻害される。本研究ではこれまでに、NLK が PDL coating 上 (Figure 3)、及び CSPGs coating 上 (Figure 4) のどちらにもいても軸索伸展作用を示すことが明らかとなった。そこで、NLK の軸索伸展活性を脊髄損傷マウスを用いて評価した。脊髄実質への投与量は、他の growth factor の例を参考にした。軸索伸展活性を有する acidic fibroblast growth factor (aFGF, Dazert *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2015) を脊髄損傷ラットの損傷部に単回注入した結果、運動機能が有意に回復したという知見がある (Tsai *et al.*, 2008)。よって本実験では、NLK の投与量を aFGF と類似した値に設定した。

損傷後 15 分以内に、recombinant NLK (2 µg/mouse) または溶媒を損傷部へ注入した。損傷 20 日目において、損傷領域を含んだ脊髄組織を単離し矢状断切片を作製した。その後、抗 NF-H 抗体、抗 GFAP 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。損傷領域は、GFAP 陽性領域により囲まれた部分とし、損傷領域の大きさは、NLK 投与群と溶媒投与群で差はなかった (Figure 7D)。また損傷領域内における NF-H 陽性軸索密度は NLK 投与により有意に増加した (Figure 7A, B, C)。次に抗 GFAP 抗体と抗 NLK 抗体を用いて、脊髄損傷マウスの損傷部または偽手術マウスの脊髄切片における NLK 発現について検討した。偽手術マウスの脊髄では、GFAP 陽性のグリア性瘢痕も、および NLK 陽性染色像もほとんど確認できなかった。一方損傷溶媒投与群では、損傷領域内を中心に NLK の高い発現が観察された (Figure 7E)。さらに NLK 投与群の損傷領域内では、溶媒投与群よりも有意に高い NLK 発現を示した (Figure 7E, F)

以上の結果から、NLK の脊髄実質内投与により、急性期脊髄損傷マウスの損傷領域内では軸索伸展が促進されることが示された。また損傷領域内の NLK 発現は、損傷自体により増加し、投与された NLK は、その発現増加をさらに増強することが示された。

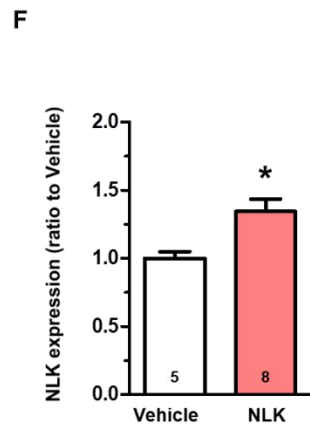
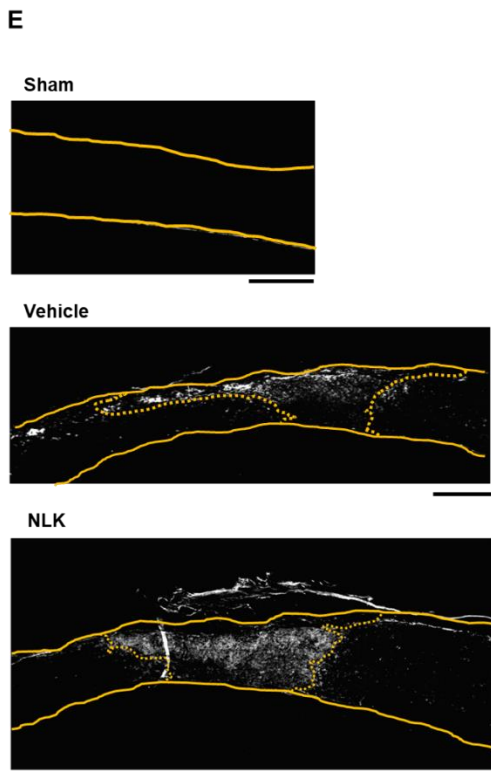
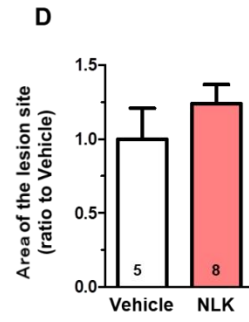
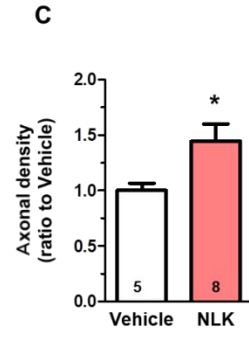
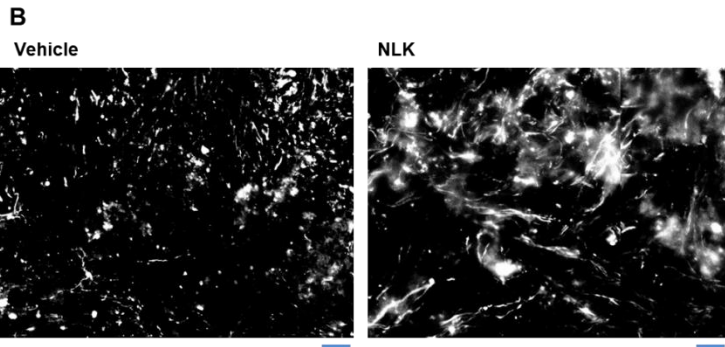
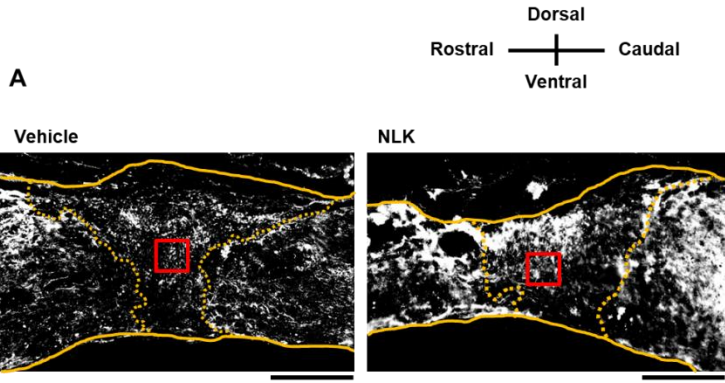


Figure 8 急性期脊髄損傷マウスに対する NLK の軸索伸展作用

脊髄損傷後 15 分以内に、NLK (2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) または溶媒 (Vehicle) を損傷部に注入した。損傷後 20 日目の脊髄切片を用いて、蛍光免疫染色により NF-H、GFAP、NLK の発現を検出した。(A, E) 損傷領域における NF-H、及び NLK の典型的な染色画像を示した。黄色の実線は脊髄組織の輪郭を示し、黄色の点線は損傷領域の境界を示した。Black scale bars = 500 μm . (B) A の赤枠により囲った領域を拡大して示した。Blue scale bars = 20 μm . (C) 損傷領域内における NF-H 陽性軸索密度を定量した。(D) 損傷領域の大きさを定量した。(F) 損傷領域内の NLK 発現量を定量した。* $p < 0.05$, unpaired two-tailed t -test. (NLK: $n = 8$ mice, Vehicle: $n = 5$ mice).

1.3.8. 急性期脊髄損傷マウスに対する NLK の後肢運動機能改善作用の検討

急性期脊髄損傷マウスにおける NLK による後肢運動機能改善作用を検討した。脊髄圧挫損傷マウスに対して、損傷 15 分以内に、損傷部へ recombinant NLK (2 µg/mouse) または溶媒を実質内注入した。

後肢運動機能の評価には、BMS、BSS、TMS を用いた。椎弓切除のみを行った sham 群では、溶媒、NLK のどちらを投与された群においても、各評価法においてスコアは損傷後 20 日目まで満点だった (データ未提示)。このことから、実質内投与自体によって損傷が引き起こされるような手技的な問題はなかったと言える。一方損傷マウスでは、損傷後 20 日目までの行動観察の結果、NLK 投与群では溶媒投与群と比較して、運動機能の回復がみられた (Figure 9A, B, C)。一般的に脊髄損傷マウスの運動機能評価に用いられる BMS では、薬物投与と運動機能の経日変化との間に有意な交互作用が見られた ($F(20, 520) = 2.79$; $p < 0.0001$) (Figure 9A)。主に体重支持能力に着目した BSS においても、薬物投与と運動機能の経日変化との間に有意な交互作用が見られた ($F(20, 520) = 1.85$; $p < 0.0001$) (Figure 9B)。また TMS においても、薬物投与と運動機能の経日変化との間に有意な交互作用が見られ ($F(20, 520) = 4.00$; $p < 0.0001$)、損傷 16 日目以降、NLK 投与群は溶媒投与群と比較して有意に高いスコアを示した (Figure 9C)。損傷後 20 日目における溶媒投与群の各スコアの平均値は BMS が 1.33、BSS が 0.168、TMS が 4.58 であり、NLK 投与群では BMS が 2.50、BSS が 0.75、TMS が 8.75 となった。これらの結果から、recombinant NLK 単回投与による急性期脊髄損傷マウスにおける後肢運動機能改善作用が示された。

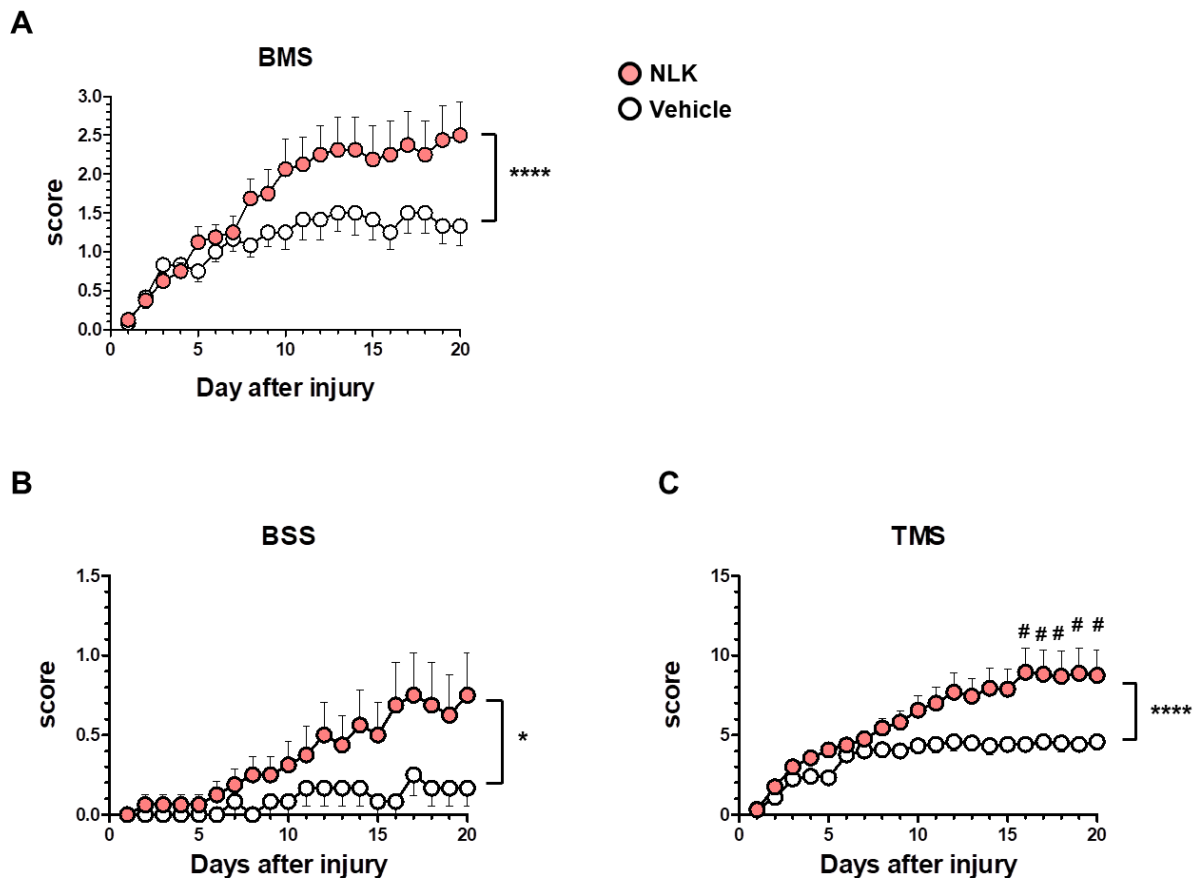


Figure 9 急性期脊髄損傷マウスにおける NLK の後肢運動機能改善作用

ヒト recombinant NLK (2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) または溶媒を、脊髄損傷後 15 分以内に、損傷部へ単回注入した。手術翌日より、1 日に 1 回行動観察を行い、後肢運動機能を BMS (A)、BSS (B)、TMS (C) により評価した。* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ vs vehicle, drug \times day interaction by repeated measures Two-way ANOVA. # $p < 0.05$, *post hoc* Bonferroni test. NLK 投与群 : 8 mice, 16 hindlimbs, $n = 18$ 、溶媒処置群 (Vehicle): 6 mice, 12 hindlimbs, $n = 12$.

1.4. 考察

本章では、既に神経保護作用 (Gurney *et al.*, 1986b; Romagnoli *et al.*, 2003; Deng *et al.* 2014) や軸索伸展活性 (Gurney *et al.*, 1986a; Sun *et al.*, 1999; Deng *et al.* 2014) といった神経栄養因子様の作用をもたらすことが報告されていた NLK に着目し、アストロサイトから分泌される NLK の機能的意義の解明を試みた。これまでに脊髄損傷におけるアストロサイトの有益な作用として、アストロサイトが軸索伸展因子を分泌する報告はあるものの (Teshigawara *et al.*, 2013; Shih *et al.*, 2014)、その分泌能を高めるメカニズムは不明なままである。本章では細胞外からの NLK 刺激により、アストロサイトからの NLK 分泌が促進され (Figure 1)、分泌された NLK が軸索伸展を促進する可能性を示した (Figure 3)。さらにアストロサイトの細胞膜に局在する GRP78 が、アストロサイトからの NLK 分泌に関与する重要な分子であることが明らかとなった (Figure 6, 7)。アストロサイトから分泌される軸索伸展因子 NLK の分泌メカニズムを制御する NLK - GRP78 シグナリングは、本研究によってはじめて明らかにされた。さらに本研究では、急性期脊髄損傷マウスにおける NLK の軸索伸展活性 (Figure 8A - C) と運動機能改善作用 (Figure 9) を初めて示した。損傷部に投与した NLK は損傷直後の単回投与であったのに対し、損傷 20 日目においても、有意な運動機能の回復 (Figure 9) と損傷領域内の NLK の発現増加 (Figure 8E, F) が確認された。組織に投与された NLK は、細胞内に取り込まれるにしても、細胞外に留まるにしても、やがては代謝されると考えるのが常識的であり、20 日間細胞外で活性を保ったまま留まり、軸索伸展作用を発揮し続けていたとは考えにくい。NLK は細胞内で解糖系に関与する酵素でもあるため (Watanabe *et al.*, 1996)、アストロサイトに限らず他の細胞にも発現していると考えられるが、*in vitro* の検討では、神経細胞やマイクログリアにおいては NLK の発現が上昇しなかった (Figure 2)。一方、アストロサイトではその発現及び分泌が増強されたことより (Figure 1)、NLK 投与によって内在性の NLK が増加するようなポジティブフィードバック機構が、少なくともアストロサイトに存在すると示唆される。そしてこの機構が損傷部への単回投与で惹起されたことで、NLK の軸索伸展作用が持続し、運動機能の回復に寄与した可能性が考えられる。

本章の検討結果からでは、NLK 刺激によりアストロサイトから分泌される軸索伸展因子が NLK 以外にも存在する可能性は否定できない。Deng らは、セルトリ細胞由来の CM 中に NLK 抗体を加えて神経細胞に処置することで、CM による軸索伸展作用が阻害されることを示している (Deng *et al.*, 2104)。本研究においても同様の方法で CM 中の NLK を阻害することで、CM による軸索伸展活性が抑制されるかを検討する予定である。

本章では、細胞外から NLK を処置してその作用を検討したが、アストロサイトから分泌される内因性の NLK にも、NLK 分泌亢進作用や軸索伸展作用があるかは不明である。急性期 SCI マウスへの NLK 投

与の検討では、偽手術マウスの脊髄組織において、NLK の発現は全く確認されなかったのに対し、脊髄損傷マウスの損傷部において NLK の発現は増加していた (Figure 8E, F)。他の研究でも、脳損傷モデルマウスの急性期・亜急性期では、損傷部周辺において NLK の mRNA 及びタンパク質の発現増加が報告されている (Decourt *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2019)。同様の傾向はヒトの脳損傷患者でも確認されている (Shaikh *et al.*, 2015)。NLK の発現制御機序としては、転写因子 hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の関与が示されており (Niizeki *et al.*, 2002; Mikami *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2017; Geng *et al.*, 2018)、その発現制御は、PI3K-Akt シグナリング依存的であることが報告されている (Funasaka *et al.*, 2005)。また、脊髄損傷モデル動物においても損傷急性期から亜急性期にかけて、損傷部での HIF-1 α の発現増加が示されている (Xiaowei *et al.*, 2006; Tao and Shi, 2016)。他の神経変性疾患モデル動物においても、グリア性痕中のアストロサイトにおける HIF-1 α の発現増加が確認されている (Le Moan *et al.*, 2015)。脊髄損傷モデル動物では、損傷が極端に重篤でない限りある程度の自発的な運動機能の回復がみられることが知られており、本研究においても損傷対照群の運動機能は損傷 8 日後まで緩やかな回復傾向を示した (Figure 9)。一つの可能性として、上記のような HIF-1 α 介在のメカニズムによるアストロサイトにおける内因性の NLK 発現・分泌の増加が、神経保護作用や軸索伸展作用による自発的な機能回復に寄与しているのかもしれない。

NLK の分泌メカニズムを解明する糸口として、細胞膜に発現し NLK の直接結合タンパク質として最も研究されている AMFR にまず着目した。AMFR は NLK の受容体として機能し、細胞内シグナルの伝達に寄与することが知られている (Yanagawa *et al.*, 2004)。例えばがん細胞株において、NLK は AMFR を介して MAPK 経路を活性化し、その結果抗がん剤に対する抵抗性やマトリックスメタロプロテアーゼの産生を亢進する (Haga *et al.*, 2008)。また培養軟骨細胞における NLK の細胞増殖作用には、AMFR を介した Akt シグナリングや smad2/3 の活性化の関与が示唆されている (Tian *et al.*, 2015)。ヒトの胃がん、肺がん、腎細胞がん患者においても、NLK および AMFR の発現は、リンパ節転移の程度や生命予後の悪さと相関する (Chiu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014; Lucarelli *et al.*, 2015)。本章では、アストロサイトにおける AMFR の発現を確認したところ、細胞膜での発現は検出されず細胞質にのみ検出された。他のグループの報告でも、ラット小脳由来における vimentin 陽性のグリア細胞には、細胞質にのみ AMFR の発現が示されており (Leclerc *et al.*, 2000)、今回の実験結果と一致する。細胞内の AMFR は滑面小胞体に局在し、E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、ミトコンドリアの融合・分裂過程の調節に関与するが (Fairbank *et al.*, 2009)、アストロサイトにおける AMFR の機能は細胞質がメインなのかもしれない。またアストロサイトからの NLK 分泌への AMFR の関与を機能的に検証した結果、AMFR 機能中和抗体処置によっても細胞外 NLK 誘導性の NLK 分泌は抑制されなかった。以上の結果から、少なくとも細胞膜に存在する AMFR

はアストロサイトにおける NLK 分泌に関与しないことが示唆された。研究例は少ないが、がん細胞株において、細胞外の NLK は Rac1-PI3k を介したラフト依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが報告されている (Kojic *et al.*, 2007&2008)。しかしこの現象には細胞膜の AMFR が NLK の結合相手として重要であるとの知見もあり (Shankar *et al.*, 2013)、本章ではアストロサイトの細胞質でのみ AMFR の発現が検出されたことから、NLK がエンドサイトーシスによって細胞質内に取り込まれ、細胞質内の AMFR に結合して NLK 分泌のシグナルが活性化される可能性は低いと考えられる。そこで筆者は、アストロサイトにおいては細胞外の NLK の受容体が別に存在すると仮定し、DARTS 法により網羅的に検討した。その結果、細胞膜に発現する GRP78 が NLK の受容体として同定された (Figure 6)。GRP78 中和抗体処置により NLK 分泌が基礎分泌レベルまで抑制されたことから (Figure 7)、細胞膜の GRP78 がアストロサイトの NLK 分泌に主として関わると考えられる。GRP78 は本来小胞体に存在し、タンパク質のフォールディング、カルシウム恒常性の調節、合成されたポリペプチドの小胞体内腔への移行補助、ミスフォールディングされたタンパク質のプロテアソーム系への輸送等に関与するシャペロン分子である (Casas, 2017)。さらに GRP78 は、小胞体ストレス応答シグナルにおいても重要な役割を担う。通常 GRP78 は、小胞体膜を挟む様にして細胞質に存在する Inositol-Requiring Enzyme 1 α (IRE1 α), Activating Transcription Factor 6 (ATF6), PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase (Perk) といった小胞体ストレスセンサータンパク質と結合している。虚血や低酸素、炎症等の環境下では細胞がストレスを受けることで、小胞体内に正しくフォールディングされなかった変性タンパク質が蓄積する。この蓄積によって GRP78 は、変性タンパク質のリフォールディングや分解に対応するためにセンサータンパク質から解離する。それにより解離したセンサータンパク質により小胞体ストレス応答シグナルが開始され、GRP78 を含むシャペロン分子の転写促進やリボソームにおける翻訳抑制作用等により、変性タンパク質の蓄積が抑制される。また小胞体ストレス応答を上回るレベルで変性タンパク質の蓄積が生じれば、アポトーシスが誘導される (Xu *et al.*, 2005; Lewy *et al.*, 2017)。一方近年、GRP78 が小胞体のみならず、細胞膜 (Berger *et al.*, 1997)、細胞質 (Ni *et al.*, 2009)、ミトコンドリア内 (Sun *et al.*, 2006)、核内 (Huang *et al.*, 2009)、分泌型 (Kern *et al.*, 2009) で存在することが報告されている。特に細胞膜に発現し、細胞内にシグナルを伝える受容体としての機能が多く報告されており、いくつものリガンド存在する (Table 4)。例えば、がん細胞の細胞膜に発現する GPI アンカー型タンパク質、Cripto は細胞膜の GRP78 に結合することで、PI3k-Akt シグナリングや MAPK 経路を介した細胞増殖作用を示す (Shani *et al.*, 2008; Kelber *et al.*, 2009)。その他 Cripto 以外のリガンドと受容体型 GRP78 の間においても、上記シグナリングを介した細胞のフェノタイプへの影響が報告されているものの (Table 4)、アストロサイトにおける受容体型 GRP78 の下流シグナルは全く検討されていない。今後まずは PI3k-Akt シグナリングや MAPK 経路が、NLK-GRP78 を介したアストロサ

イトからの NLK 分泌に関与するか、各種阻害剤を用いて検討したい。

NLK の軸索伸展メカニズムについてはこれまで不明である。脊髄損傷において、CSPG は損傷部に蓄積し軸索再生を阻害する (Silver and Miller, 2004)。本章において NLK 投与が損傷部の CSPG を減少させるかについては不明であるが、本研究室ではこれまでに、その様な阻害的環境下でも CSPG の発現に変化を与えず、軸索伸展作用を示す薬物をいくつか見出している (Teshigawara *et al.*, 2013; Tanabe *et al.*, 2016; Kodani *et al.*, 2019)。CSPG 存在下の軸索伸展アッセイにおいても、NLK は軸索伸展作用を示した (Figure 4)。この結果から、NLK は少なくとも CSPG の減少を介さずに損傷部において軸索伸展作用を発揮した可能性が考えられる。第 2 章では NLK の軸索伸展メカニズムの解明に取り組む。

1.5. 小括

本章では、NLK 刺激によるアストロサイトからの NLK 分泌が、軸索伸展に寄与する可能性を示した。この NLK 分泌には細胞膜の GRP78 が大きく関与することが示された。さらに、急性期脊髄損傷マウスにおいて、NLK が軸索伸展作用と運動機能改善作用を示すことを初めて見出した。以上の結果から、NLK または細胞膜の GRP78 を標的とする薬剤は、急性期脊髄損傷の新規治療薬となりうるかもしれない。

Table 4 受容体型GRP78に対するリガンドと下流のシグナル分子の代表例について

Cell type	Ligands	Downstream molecules	Activated cellular functions	References
Prostate cancer	α 2-macroglobulin	PI3k/Rac/PAK2/LIMK/cofilin	Motility	Misra <i>et al.</i> , 2005.
		PI3k/Akt, ERK1/2	Survival, proliferation	Misra <i>et al.</i> , 2006.
		PI3k/PDK1/PLK1/c-Myc	Proliferation, oncogenesis	Gopal <i>et al.</i> , 2016.
Liver cancer	IGF-1 receptor	PI3k/Akt, ERK1/2	Migration, proliferation	Yin <i>et al.</i> , 2017.
Postate cancer Lung cancer	Par-4	FADD/caspase 8, 3	Apoptosis	Burikhanov <i>et al.</i> , 2009.
Colon cancer	Integrin- β 1, uPA receptor	FAK	Cytoskeletal reorganization, invasion	Li <i>et al.</i> , 2013.
Testicular cancer Mammary epithelial cell	Cripto	PI3k/Akt, MAPK, Smad 2/3	Metastasis, proliferation	Kelber <i>et al.</i> , 2009.
Endothelial cells	T-cadherin	Akt/GSK3 β	Survival	Philippova <i>et al.</i> , 2008.
Pancreatic β cells	secreted GRP78	caspase 3/7	Apoptosis	Vig <i>et al.</i> , 2019
Hepatocytes	Vaspin	PI3k/Akt, AMPK/SRBP1-inhibition	Gluconeogenesis Suppression of fatty acid synthesis	Nakatsuka <i>et al.</i> , 2012.
Forebrain neurons Astrocytes	ADoPep1	Inhibition of caspase 3/7 activity Inhibition of p38 phosphorylation	Neuroprotection under hypoxia	Goldenberg-Cohen <i>et al.</i> , 2012.
Hippocampal neurons	α -synuclein	Rac1/PAK2/LIMK1/cofilin	Dysregulation of actin turnover	Bellani <i>et al.</i> , 2014.
Cortical neurons	t-PA	Inhibition of eIF2 α phosphorylation	Neuroprotection under ischemia	Louessard <i>et al.</i> , 2017.

第2章 NLKの軸索伸展メカニズムの検討

(Tanie *et al.*, 2020)

2.1. 緒言

これまでに NLK は、感覚神経細胞や神経幹細胞に対して神経保護作用を示すこと、また軸索伸展活性を有することが示されている (Gurney *et al.*, 1986a, b; Sun *et al.*, 1999; Romagnoli *et al.*, 2003; Deng *et al.* 2014)。第1章においても recombinant NLK を培養神経細胞に処置すると、CSPG 存在下 (Figure 4)、非存在下 (Figure 3) のどちらにおいても有意な軸索伸展作用を示した。また急性期脊髄損傷マウスの損傷部に NLK を単回注入すると、軸索密度の増加と後肢運動機能の回復が確認された (Tanie *et al.*, 2018)。これらの結果から、NLK の軸索伸展活性は脊髄損傷からの回復に有用と考えられるが、その軸索伸展シグナルを明らかにする必要がある。

前章では、アストロサイトからの NLK 分泌を制御する受容体として、細胞膜の GRP78 が同定された。この結果を受けて、神経細胞においても NLK の軸索伸展作用を制御する最上流タンパク質が GRP78 である可能性を予想した。そこでまず本章では、神経細胞における NLK と GRP78 の結合性について検証した後、細胞実験によって NLK の軸索伸展作用における受容体型 GRP78 の関与を検討した。続いて、受容体よりもさらに下流のシグナル因子の同定も試みた。さらに脊髄損傷マウスを用いた GRP78 の機能障害実験を実施し、NLK-GRP78 シグナリングが NLK による脊髄損傷改善作用や損傷部での軸索伸展作用に寄与するかを検討した。

2.2. 実験材料及び実験方法

2.2.1. 倫理宣言

1.2.1.の項に同じ。

2.2.2. マウス胎児大脳皮質神経細胞の初代培養

1.2.3.の項に同じ。

2.2.3. 軸索伸展作用の評価

中和抗体処置の場合、抗 AMFR 抗体 (1, 10, 100 ng/ml, Cat. No. NBP2-15734, Novus Biologicals, Lucarelli *et al.*, 2015)、抗 GRP78 抗体 (10, 100 ng/ml, EPR40402, Cat. No. ab108613, Abcam)、ネガティブコントロールとして normal rabbit IgG (1, 10, 100 ng/ml, Cat. No. sc-2027, Santa Cruz Biotechnology) を用いた。上記中和抗体を使用した過去の報告 (Lucarelli *et al.*, 2015) と同様の濃度で細胞に処置したところ、細胞毒性が認められたため、細胞毒性が確認されない最高濃度を採用した。培養 1 日後の神経細胞に中和抗体を 15 分間処置した後、100 ng/ml の recombinant NLK (ATGen) または溶媒 (超純水) を処置し、さらに 5 日間培養した。Akt 阻害実験の場合、培養 1 日後の神経細胞に対して、NLK (100 ng/ml) と Akt 阻害剤 (0.1 μ M, Akti-1/2, 東京化成工業、東京) を同時に処置し、さらに 5 日間培養した。

蛍光免疫染色、画像撮影、解析方法については、1.2.8.の項と同じである。

2.2.4. 培養神経細胞の細胞質画分および膜画分 lysate の調製及び lysate 中の AMFR と GRP78 の検出

Mem-PER™ Plus (Thermo fisher scientific) を用いてプロトコールに従い、6 cm-dish で培養した培養 6 日後の神経細胞を用いて、細胞膜画分 lysate と細胞質画分 lysate を調製した。タンパク質定量、SDS-PAGE 実施後に、1 次抗体として rabbit 抗 AMFR ポリクローナル抗体 (1:1000; NovusBiologicals) または goat 抗 GRP78 ポリクローナル抗体 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit 抗 nAChR α 7 ポリクローナル抗体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology) を、2 次抗体に HRP 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:2000; Santa Cruz) または HRP 標識 donkey anti-goat IgG 抗体 (1:5000; Santa Cruz Biotechnology) を用いたウェスタンブロッティングを行い、各画分 lysate における AMFR、GRP78、nAChR α 7 の発現を確認した。

2.2.5. DARTS 法による結合実験

Mem-PER™ Plus (Thermo fisher scientific) を用いてプロトコールに従い、培養 6 日後の大脳皮質神経細胞を用いて、細胞膜画分 lysate と細胞質画分 lysate を調製した。

5 μg の神経細胞の細胞膜画分 lysate、0.0005 μg の thermolysin (和光純薬)、溶媒 (超純水) あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NLK を用いて 1.2.9. で述べた方法と同様に DARTS 反応を行った。SDS-PAGE を行った後、1 次抗体に抗 GRP78 ポリクローナル抗体 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology)、2 次抗体に HRP 標識 donkey anti-goat IgG 抗体 (1:5000; Santa Cruz Biotechnology) を用いたウェスタンブロッティングを行い、細胞画分 lysate における GRP78 の発現を確認した。

2.2.6. 免疫沈降法による結合実験

20 pmol recombinant NLK と 10 pmol recombinant GRP78 (Cat. No. SPR-119A, Stress Marq Biosciences Inc., Victoria, British Columbia, Canada) を室温にて 1 時間反応させた。一方で、50 μl の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を 1% BSA (和光純薬) 含有 0.01% tween-PBS (0.01% T-PBS) と混合し、4°C、30 分間でローテーションすることでブロッキング処理を行った。その後、mouse 抗 His-tag モノクローナル抗体 (1 μg , Cat. No. LS-C51081, Life Span Biosciences Inc. Seattle, WA, USA) または normal mouse IgG (1 μg , Cat. No. sc-2025, Santa Cruz Bitechology) を用いて 4°C、30 分間でローテーションすることで protein G と抗体を反応させた。Protein G と抗体をクロスリンクさせるために、Protein G-抗体複合体を 50 mM dimethyl pimelimidate dihydrochloride (東京化成工業、東京) に加え、室温で 1 時間ローテーションしながら反応させた。架橋剤を洗浄後、protein G を NLK と GRP78 を反応させたサンプルと混合し、室温で 2 時間ローテーションしながら反応させた。沈降物を溶出するため、0.1 M glycine-HCl (pH 2.8) と LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え、95°C で 5 分間反応させた。8% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 後、rabbit 抗 GRP78 モノクローナル抗体 (EPR40402; 1:2000; Abcam) と HRP 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology) を用いてウェスタンブロッティングを行い沈降物中の GRP78 を検出した。また検出後のメンブレンをストリッピング処理し、mouse 抗 NLK モノクローナル抗体 (1B7D7; 1:1000; Abcam)、HRP 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:10000; Cat. No. 97040, abcam) を用いて NLK の検出を行った。

2.2.7. 培養神経細胞における Akt リン酸化の検出

単離培養 6 日後の大脳皮質神経細胞に GRP78 中和抗体 (100 ng/ml, Abcam) または normal rabbit IgG (100 ng/ml, Santa Cruz Biotechnology) を 15 分間処置した後、100 ng/ml の NLK または溶媒 (超純水) を添加し、さらに 30 分間培養した。培地を除去、PBS で洗浄した後、protease and phosphate inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) が含まれた M-PER lysis buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え、氷上で 20 分間インキュベーションした。20 分後に細胞液を 14000 g、4°C、10 分間で遠心し細胞片を取り除いたのち、

上清を cell lysate とした。Lysate 中のタンパク質濃度は、Pierce 660 nm Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。Lysate 中のタンパク質量 50 µg に対し、0.5 µg の rabbit 抗リン酸化セリンポリクローナル抗体 (Cat. No. AB1603, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) または normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、免疫沈降処理を行った (操作は 2.2.6.と同様)。その後、沈降物におけるセリンリン酸化 Akt を検出するために、1 次抗体として rabbit 抗 Akt ポリクローナル抗体 (1:1,000; Cat.No. 9272, Cell Signaling Technology) を、2次抗体として HRP 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:2000 ; Cat. No. sc-2004, Santa Cruz) を用いてウェスタンブロッティングを行った。

2.2.8. 脊髄損傷マウスの作製

1.2.10.の項に同じ。

2.2.9. 脊髄損傷マウスへの NLK 持続投与

i) ミニ浸透圧ポンプの準備

ミニ浸透圧ポンプ (Cat. No. 1004, Alzet, Cupertino, CA, USA) は 0.11 µl/h の流速で 28 日間連続して内用液を放出し続ける製品を用いた。ポンプを 100 µg/ml の recombinant NLK、100 µg/ml の GRP78 中和抗体、100 µg/ml の normal rabbit IgG または溶媒 [人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid, aCSF); 130 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 3.5 mM KCl, 1.3 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂•6H₂O, 10 mM glucose at pH 7.4] で満たし、ポリ塩化ビニルチューブを介してカニューレ (Brain Infusion Kit 3, Alzet) と結合した。カニューレの脳内挿入部は 3 mm 長とし、ポンプを saline に浸し、16 時間以上、37°C で静置し平衡化した。ポンプへ充填する抗体濃度と NLK 濃度は、マウスにおける脳脊髄液産生速度が 0.325 µl/min (Casaca-Carreira *et al.*, 2018)、ポンプの流速が 0.11 µl/h であることを基に算出した。その結果、投与されたマウスの脳脊髄液中での NLK 及び抗体濃度は約 65 ng/ml となるが、それぞれの濃度は *in vitro* で軸索伸展作用 (Figure 3) と NLK の軸索伸展阻害作用 (Figure 11) を示す。

ii) 脊髄損傷マウスへのミニ浸透圧ポンプの留置

雌性 8 週齢 ddY マウス (Japan SLC) に 3 種混合麻酔 [butorphanol tartrate (5 mg/kg、Meiji Seika ファルマ、東京), medetomidine hydrochloride (0.75 mg/kg、日本全薬工業、東京), midazolam (4 mg/kg、サンド、東京)] を腹腔内に投与して麻酔をかけた。マウス頭頂部の毛を剃り、皮膚に切れ込みを入れて開き、頭蓋骨を露出させた後、頭部をステレオタキシス (NARISHIGE) 上で固定した。電動ドリルを用いて、頭蓋骨にカニューレを挿入するための穴を開けた (anteroposterior: -0.22 mm, mediolateral: + 1mm,

dorsoventricular: -2.5 mm)。

1.2.10. で述べた方法と同様に脊髄損傷マウスを作製し、損傷部の筋肉及び皮膚の縫合を行った。損傷前に作製した頭蓋骨の穴にカニューレを挿入し、アロンアルファ A (第一三共、東京) を用いて頭蓋骨へ固定した後、浸透圧ポンプをマウスの背部の皮下に埋め込み、皮膚を滅菌済みシングルブレード縫合糸 4 号 (ハシモト) で縫合した。手術後、マウスに抗麻酔薬である 75 µg/ml atipamezole (日本全薬工業) を腹腔内投与し、さらに補液として 900-1000 µl saline を臀部に皮下投与した。また、マウスを覚醒するまで 37°C のホットプレート (NHP-M30N、日伸理化) 上で静置させ体温を維持した。

2.2.10. 脊髄損傷マウスの後肢運動機能評価

1.2.12. の項に同じ。

2.2.11. 脊髄組織切片の作製

方法は、1.2.13. の項と同じであるが、矢状断切片の厚さは 14 µm とした。

2.2.12. 脊髄組織切片の蛍光免疫染色

染色方法と用いる機器は 1.2.14. と同じである。1 次抗体液として、0.3% tritonX-100-PBS 溶液、5% NGS (和光純薬)、chicken 抗 NF-H IgY polyclonal 抗体 (1:1,000; Cat. No. AB5539, Chemicon) を用いた。2 次抗体液として、0.3% tritonX-100-PBS 溶液、5% NGS、Alexa Fluor 488 標識 goat anti-chicken IgY 抗体 (1:400; Cat. No. A-11039, Thermo fisher scientific)、DAPI 溶液 [1 µg/ml (Enzo Life Science)] を用いた。

2.2.13. 脊髄組織切片の画像解析

組織切片の解析には倒立蛍光顕微鏡 (BZ-X710; キーエンス、大阪)、20 x NA 0.75 対物レンズ (CFI Plan Apo-λ; ニコンインステック、東京) を用いた。CCD camera 及び BZ-X Analyzer (キーエンス) を用いて、損傷部を中心にその吻側領域から尾側領域にかけて撮影し、広域連結画像を取得した。損傷部は DAPI 陽性核が密に集積した領域を損傷領域と規定し、1 匹あたり損傷部面積が最も広い 3 枚の切片を定量に用いる切片として選んだ。取得した画像を用いた定量には、画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, Rockville, MD, USA) を用い、損傷部の面積を求め、損傷領域の全軸索長は、画像解析ソフト MetaMorph version 7.8 (Molecular Devices) を用いて測定した。この得られた軸索長と面積の値を基に損傷領域における軸索密度を定量した。

2.2.14. 統計解析

データは平均値±標準誤差 (S.E.M.)で表した。有意差検定には、Prism 5.04 (Graph Pad software, San Diego, CA, USA) 及び JMP14 (SAS institute, Cary, NC, USA) を用い、unpaired two-tailed *t*-test、One-way analysis of variance (ANOVA) *post hoc* Bonferroni test、repeated measures Two-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test、split plot ANOVA *post hoc* Tukey's HSD test を行った。有意水準は 5%とした。

2.3.1. 神経細胞における NLK と GRP78 の結合の検討

第 1 章では、細胞膜の GRP78 がアストロサイトにおける NLK 分泌を制御する受容体として機能することが明らかになった。そのため、神経細胞においても、細胞膜に存在する GRP78 は NLK の受容体として機能し、軸索伸展に寄与すると想定した。細胞内、特に小胞体に局在する分子シャペロンとしての機能は、これまでによく研究されている(Casas, 2017)。しかし、神経細胞において GRP78 がシグナルを伝達する受容体様の機能を発揮するという例は、多くない (Honda *et al.*, 2009; Bellani *et al.*, 2014; Louessard *et al.*, 2017)。そこでまず、神経細胞において、確かに細胞膜に GRP78 が発現するか検討した。単離培養 6 日後のマウス胎仔大脳皮質神経細胞から細胞質画分および細胞膜画分 lysate を調製した。細胞質と細胞膜で分画出来ているかを確認するために、nAChR α 7 の発現を確認した (Figure 10A)。抗 GRP78 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、GRP78 の発現が細胞質と細胞膜の両方で検出された (Figure 10A)。

次に神経細胞における NLK と GRP78 の発現を DARTS 法によって検討した。神経細胞の細胞膜画分 lysate とヒト recombinant NLK を用いて DARTS 反応をかけた後、抗 GRP78 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、サンプル中の GRP78 の発現を検出した (Figure 10B)。その結果、溶媒処置時と比較して NLK 処置により、有意に GRP78 のバンドが濃く変化した (Figure 10C)。この結果から、神経細胞膜に存在する GRP78 と NLK が結合することが示唆された。今回のバンドの変化は、第 1 章で検出した DARTS 後のバンド変化と逆転している (Figure 6)。当研究室における DARTS 法を用いた結合実験では、lysate に含まれるタンパク質量や薬物濃度、タンパク質分解酵素濃度の違いによって、同じタンパク質間の結合を検討してもバンドの変化が逆転する傾向を経験的に得ている。本検討では前章と比較して、用いている lysate 量、タンパク質分解酵素濃度ともに低くして用いており、これがバンドの変化の逆転につながっていると思われる。

さらに抗 His-tag 抗体を用いた免疫沈降法によって、NLK と GRP78 の直接結合を検討した。その結果、normal IgG を用いた免疫沈降の場合、バンドは検出されなかったが、抗 His-tag 抗体を用いた場合では NLK 及び GRP78 のバンドが検出された (Figure 10D)。この結果から NLK と GRP78 が直接結合することが示された。Recombinant GRP78 を用いた場合と異なり、Cell lysate 中の GRP78 を検出する場合は、バンドが 2 本確認された。この結果から、lysate 由来の一部の GRP78 は何らかの翻訳後修飾を受けるのかもしれない。

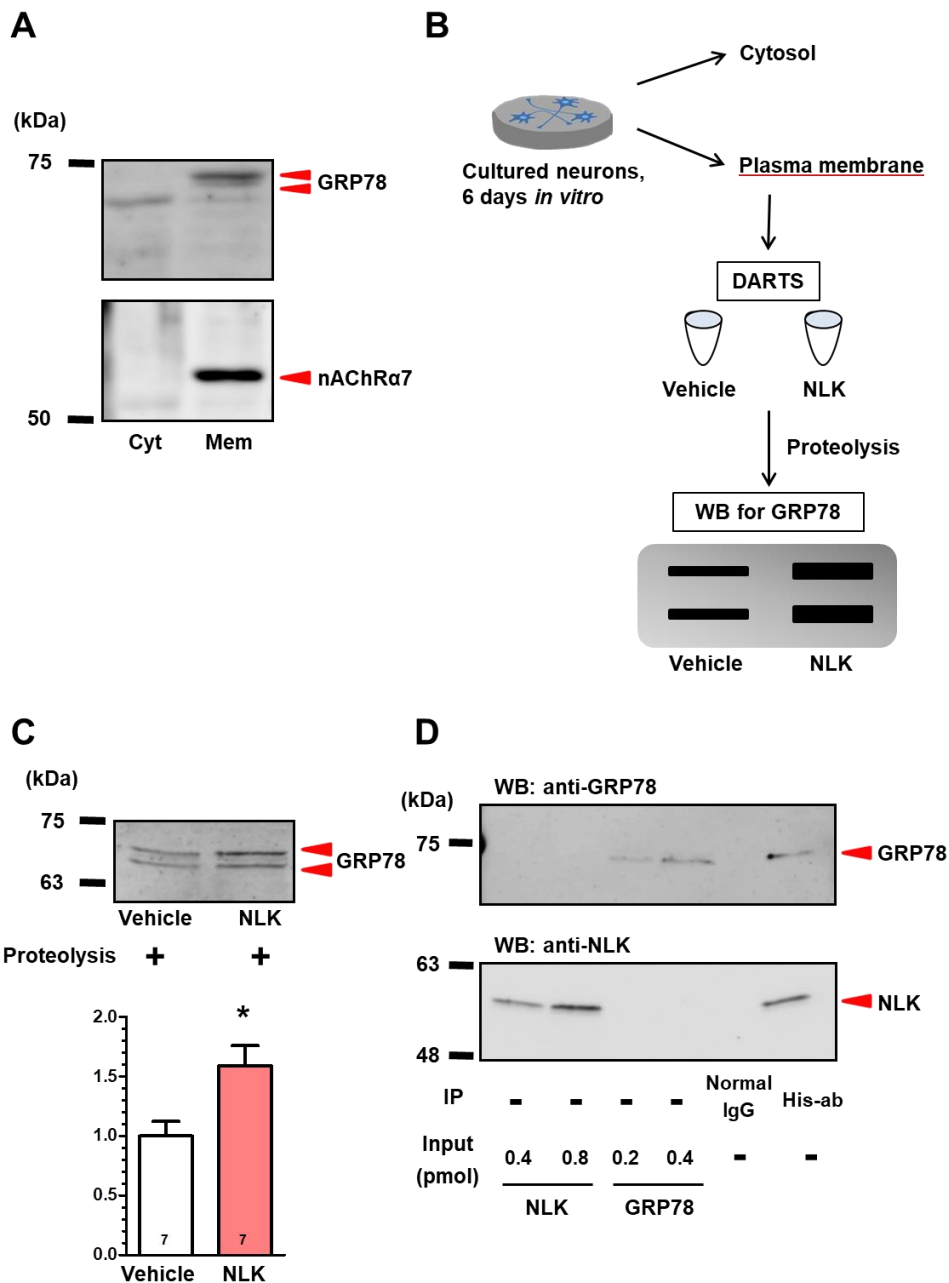


Figure10 神経細胞における NLK と GRP78 の結合

(A) 培養 6 日後のマウス大脳皮質神経細胞から細胞質画分および細胞膜画分 lysate を調製した。抗 GRP78 抗体および抗 nAChRα7 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって、各 lysate 中の GRP78 と nAChRα7 を検出した。(B) 神経細胞の細胞膜画分 lysate を用いて DARTS を行った後、ウェスタンブロッティングにより GRP78 を検出した。(C) その定量結果を示した。カラム内の数字は独立して行った実験の回数を示す。* $p < 0.05$, unpaired two-tailed t -test, ($n = 7$). (D) Recombinant NLK (20 pmol) と recombinant GRP78 (10 pmol) を反応させた後、抗 His-tag 抗体または normal mouse IgG を用いた免疫沈降を行った。沈降物中の NLK および GRP78 をウェスタンブロッティングにより検出した。Input として、recombinant NLK (0.4, 0.8 pmol) または recombinant GRP78 (0.2, 0.4 pmol) を用いた。

2.3.2. NLK の軸索伸展活性における細胞膜に発現する GRP78 の関与の検討

前項で、GRP78 は神経細胞の細胞膜に発現し、NLK と結合することが示された。次に、NLK の軸索伸展活性が細胞膜の GRP78 を介するかを検討するため、GRP78 をマスクする機能中和抗体を用いた。

単離培養 1 日後のマウス胎仔大脳皮質神経細胞に、GRP78 中和抗体 (10, 100 ng/ml) または normal IgG (10, 100 ng/ml) を 15 分間処置した後、recombinat NLK (100 ng/ml) または溶媒を処置してさらに 5 日間培養した。細胞を固定後、蛍光免疫染色により MAP2 陽性細胞あたりの pNF-H 陽性軸索長を定量することで、NLK の軸索伸展活性を評価した。その結果、normal IgG 処置群間では、溶媒処置条件と比較して、NLK 処置により有意な軸索長の増加が認められた (Figure 11)。一方 GRP78 中和抗体を用いた場合、どちらの処置濃度においても NLK の軸索伸展作用は減弱した (Figure 11)。この結果から、NLK の軸索伸展作用に細胞膜の GRP78 が関与することが示唆された。

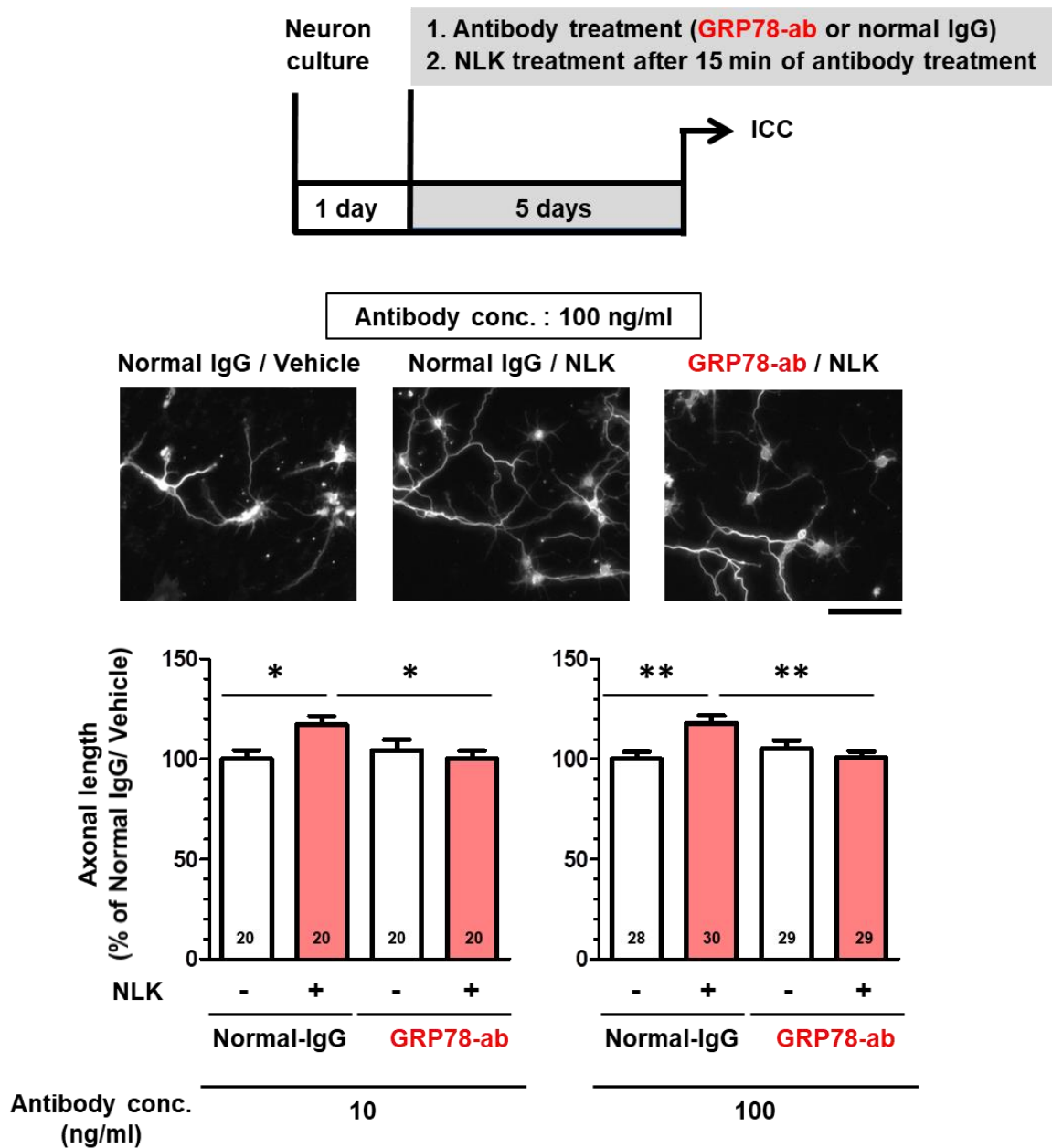


Figure 11 NLK の軸索伸展作用における細胞膜の GRP78 の関与

単離培養開始 1 日後のマウス大脳皮質神経細胞に対し normal IgG (10, 100 ng/ml) または GRP78 中和抗体 (10, 100 ng/ml) を 15 分間処置した後、NLK (100 ng/ml) または溶媒 (超純水) を処置した。さらに 5 日間培養した後、細胞を固定し、抗 MAP2 抗体および抗 pNF-H 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色画像を例示した。MAP2 陽性の神経細胞 1 個あたりの pNF-H 陽性軸索の長さを測定した。解析に用いた画像の枚数をカラム内に示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, One-way ANOVA *post hoc* Bonferroni's multiple comparison test, (n = 20 - 30). Scale bar = 100 μ m.

2.3.3. NLK の軸索伸展活性における細胞膜に発現する AMFR の関与の検討

AMFR は、NLK の受容体の一つとして知られており、7 回膜貫通型受容体である。この受容体は、がん細胞において NLK の刺激を受けると、細胞増殖や運動能の促進に関与する (Silletti *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 1999; Fairbank *et al.*, 2009)。また培養神経細胞においても AMFR の発現は確認されている (Leclerc *et al.*, 2000)。そこで、第 1 章でも用いた AMFR の機能中和抗体を用いて細胞膜の AMFR をマスクすることで、NLK の軸索伸展作用が減弱するかを検討した。また AMFR 中和抗体の用量は、Lucarelli の報告 (Lucarelli *et al.*, 2015) を参考にしたところ、細胞死が確認されたため、細胞死が確認されない最大濃度を採用した。

培養 1 日後のマウス胎仔大脳皮質神経細胞に AMFR (1, 10, 100 ng/ml) 中和抗体または normal IgG (1, 10, 100 ng/ml) を 15 分間処置した後、NLK (100 ng/ml) または溶媒 (超純水) を処置してさらに 5 日間培養した。その後、細胞を固定し蛍光免疫染色により、1 細胞当たりの pNF-H 陽性軸索の長さを算出した。Normal IgG 処置群間では、NLK 処置により有意な軸索長の増加、または増加傾向が確認された。さらにどの中和抗体の処置濃度においても、NLK は軸索伸展作用を示した (Figure 12)。この結果から、細胞膜上に存在する AMFR は、NLK の軸索伸展作用に関与しないことが明らかとなった。

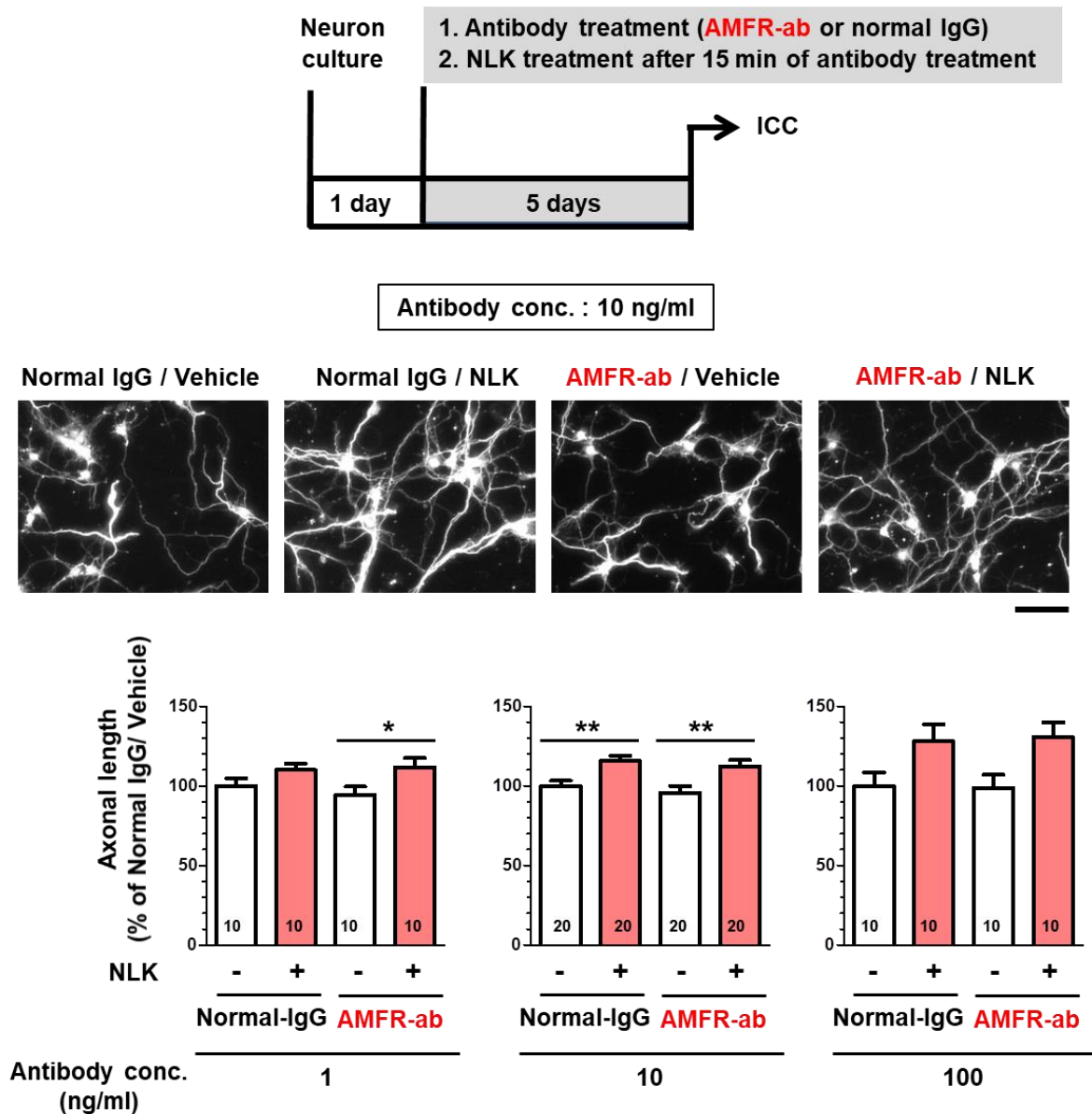


Figure 12 NLK の軸索伸展作用における AMFR の関与の検討

単離培養開始 1 日後のマウス大脳皮質神経細胞に対し normal IgG (1, 10, 100 ng/ml) または AMFR 中和抗体 (1, 10, 100 ng/ml) を 15 分間処置した後、NLK (100 ng/ml) または溶媒 (超純水) を処置した。さらに 5 日間培養した後、細胞を固定し、抗 MAP2 抗体および抗 pNF-H 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色画像を例示した。MAP2 陽性の神経細胞 1 個あたりの pNF-H 陽性軸索の長さを測定した。解析に用いた画像の枚数をカラム内に示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, One-way ANOVA *post hoc* Bonferroni's multiple comparison test, (n = 10 - 20). Scale bar = 100 μ m.

2.3.4. NLK の軸索伸展メカニズムにおける Akt シグナリングの関与の検討

これまでのがん細胞や血管内皮細胞において、 α -macroglobulin, T-cadherin, Cripto, insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) など、細胞膜の GRP78 に対するリガンドがいくつも報告されている。これらのリガンドは GRP78 と結合することで、PI3K-Akt シグナリングを活性化する (Misra *et al.*, 2006; Philippova *et al.*, 2008; Kelber *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2017)。細胞膜において GRP78 は PI3K と結合し、それにより PI3K が活性化され PIP₃ の産生を亢進することで Akt の活性化に寄与する (Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013)。また大脳皮質由来の培養神経細胞に recombinant NLK を処置すると Akt の活性化が誘導される (Deng *et al.*, 2014)。しかし、細胞外からの NLK 刺激を細胞質の Akt に伝達するための受容体タンパク質については、未だ検討されていない。そこで筆者は細胞膜の GRP78 が NLK 誘導性の Akt の活性化と軸索伸展作用に関与すると予想した。

単離培養 6 日後のマウス胎仔大脳皮質神経細胞に、GRP78 中和抗体 (100 ng/ml) または normal IgG (100 ng/ml) を 15 分間処置した後、NLK (100 ng/ml) または溶媒 (超純水) を加えてさらに 30 分間培養した。その後 cell lysate を調製し、lysate 中のリン酸化された Akt タンパク質を抗セリンリン酸化抗体による免疫沈降と抗 Akt 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した (Figure 13A)。その結果、normal IgG 処置群間では溶媒処置時と比べて NLK 処置により有意に Akt のセリンリン酸化レベルが上昇した。一方で GRP78 中和抗体処置群間では、その上昇が抑制された (Figure 13B)。この結果から、NLK 誘導性の Akt のリン酸化に細胞膜の GRP78 が関与することが示された。

次に Akt 阻害剤を処置することで NLK の軸索伸展作用が抑制されるか検討した。本実験で用いた阻害剤は、Akt の PH ドメインに結合し PIP₃ を認識できなくすることで、Akt の活性化を阻害する (Diez *et al.*, 2016)。マウス胎仔大脳皮質神経細胞を 1 日培養後、Akt inhibitor (0.1 μ M) を recombinant NLK (100 ng/ml) または溶媒と同時に処置し、さらに 5 日間培養した。その後固定し、蛍光免疫染色により 1 細胞当たりの pNF-H 陽性軸索の長さを算出した。Akt 阻害剤の単独処置では、軸索長への影響はないことが示された。溶媒処置時と比較して NLK 処置により有意に軸索長が増加したが、NLK と同時に Akt 阻害剤を処置することで、その増加は有意に抑制された (Figure 14)。以上の結果から Akt は、軸索伸展作用を示す NLK-GRP78 シグナリングの下流分子であることが示された。

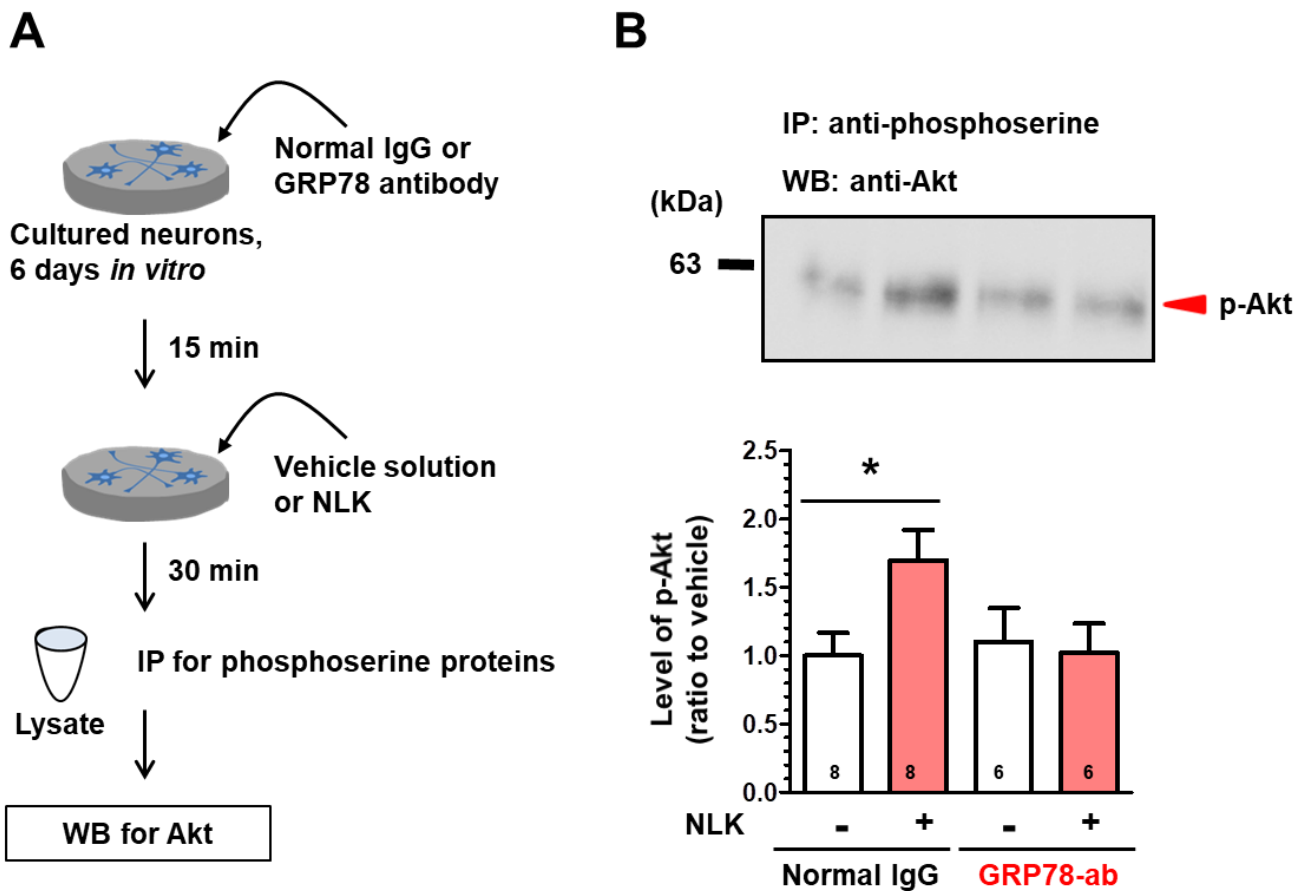


Figure 13 細胞膜の GRP78 を介した NLK による Akt のリン酸化

(A) 単離培養 6 日後のマウス大脳皮質神経細胞に対し normal IgG (100 ng/ml) または GRP78 中和抗体 (100 ng/ml) を 15 分間処置した後、NLK (100 ng/ml) または溶媒 (Vehicle) を処置した。30 分後 cell lysate を回収し、抗セリンリン酸化抗体を用いた免疫沈降法によって、lysate 中のセリンリン酸化タンパク質を得た。その免疫沈降物に含まれるリン酸化 Akt は、抗 Akt 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出された。(B) 検出した Akt のバンドを定量化した。カラム内の数字は独立して行った実験の回数を示す。* $p < 0.05$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni's multiple comparison test, n = 6 - 8.

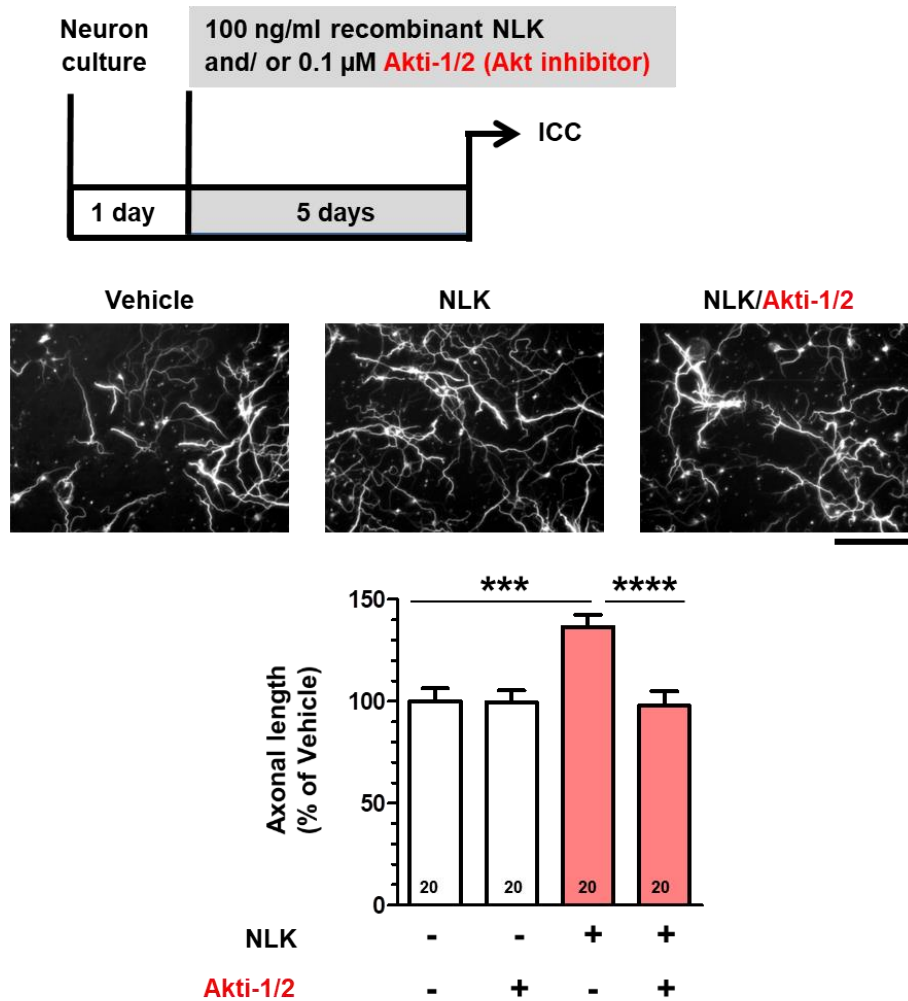


Figure 14 NLK の軸索伸展メカニズムへの Akt 活性化の関与

単離培養 1 日後のマウス胎仔大脳皮質神経細胞に、Akt 阻害剤 (Akti-1/2, 0.1 μM) と recombinant NLK (100 ng/ml) または溶媒を同時処置し 5 日間培養した。細胞を固定後、抗 MAP2 抗体および抗 pNF-H 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色画像を例示した。MAP2 陽性の神経細胞 1 個あたりの pNF-H 陽性軸索の長さを測定した。解析に用いた画像の枚数をカラム内に示した。*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni's multiple comparison test, $n = 20$. Scale bar = 100 μm.

2.3.5. NLK - GRP78 シグナリングによる急性期脊髄損傷マウスにおける後肢運動機能改善作用の検討

脊髄損傷では、損傷部において CSPGs をはじめとした様々な軸索伸展阻害因子が存在し、その様な阻害的環境により、軸索伸長及び運動機能の回復は阻害される (Silver and Miller, 2004)。第 1 章では、CSPG 存在下において、培養神経細胞に NLK を処置すると有意な軸索伸展作用が確認された (Figure 4)。また急性期脊髄損傷マウスの損傷部に NLK を単回注入すると、損傷領域における軸索密度の増加と後肢運動機能の回復が認められた (Figure 8, 9)。本章ではこれまでに、細胞膜の GRP78 が NLK 誘導性の Akt の活性化や NLK の軸索伸展活性に必須であることが明らかとなった (Figure 11, 13, 14)。そこでこの軸索伸展作用を示す NLK-GRP78 シグナリングの効果を急性期脊髄損傷マウスにおいて検討することとした。

損傷後直ちに浸透圧ポンプを用いて、recombinant NLK または溶媒 (ACSF) と GRP78 中和抗体を側脳室内から 21 日間持続投与した。投与期間中の NLK 及び GRP78 中和抗体濃度は、CSF 中において 65 ng/ml に維持された。前項までに、10 - 100 ng/ml の NLK で軸索伸展作用が確認されており (Figure 3, 4)、GRP78 中和抗体においても 10 - 100 ng/ml で NLK の軸索伸展作用を阻害することが明らかにされている (Figure 11)。また 10 - 100 ng/ml の NLK ではアストロサイトからの NLK 分泌が促進されないことも確認している (Figure 1)。

損傷後 21 日間の行動観察の結果、BMS (Figure 15A) および TMS (Figure 15B) どちらの評価系においても、normal IgG / vehicle 投与群と比較して normal IgG / NLK 投与群では、薬物投与と運動機能の経日変化との間に有意な交互作用が見られた [BMS: $F(20, 600) = 3.74, p < 0.0001$; TMS: $F(20, 600) = 4.38, p < 0.0001$]。BMS では損傷 14、16 日目において、TMS では損傷 14 - 17 日目及び 20、21 日目において、normal IgG / vehicle 投与群と比較して、normal IgG / NLK 投与群は有意に高いスコアを示した。一方で GRP78-ab / NLK 投与群では、NLK による運動機能改善作用は認められず、normal IgG / NLK 投与群との間に、薬物投与と運動機能の経日変化との間に有意な交互作用が確認された [BMS: $F(20, 640) = 9.20, p < 0.0001$; TMS: $F(20, 640) = 8.82, p < 0.0001$]。損傷 11 日目以降、どちらの評価系においても normal IgG / NLK 投与群と比較して、GRP78-ab / NLK 投与群は有意に低いスコアを示した。また normal IgG / vehicle 投与群と GRP78-ab / NLK 投与群間では薬物投与と運動機能の経日変化との間に有意な交互作用は認められなかった。損傷後 21 日目における各群のスコア平均値は、normal IgG / vehicle 投与群で BMS スコア 2.375、TMS スコア 6.000、normal IgG / NLK 投与群で、BMS スコア 3.625、TMS スコア 9.625、GRP78-ab / NLK 投与群で BMS スコア 1.611、TMS 4.833 スコアを示した。また 21 日間の行動観察において、薬物投与による異常な体重減少はなかった (Figure 15C)。これらの結果から、NLK の脊髄損傷改善作用は GRP78 を介することが示唆された。

- Normal IgG/NLK
- Normal IgG/Vehicle
- GRP78-ab/NLK

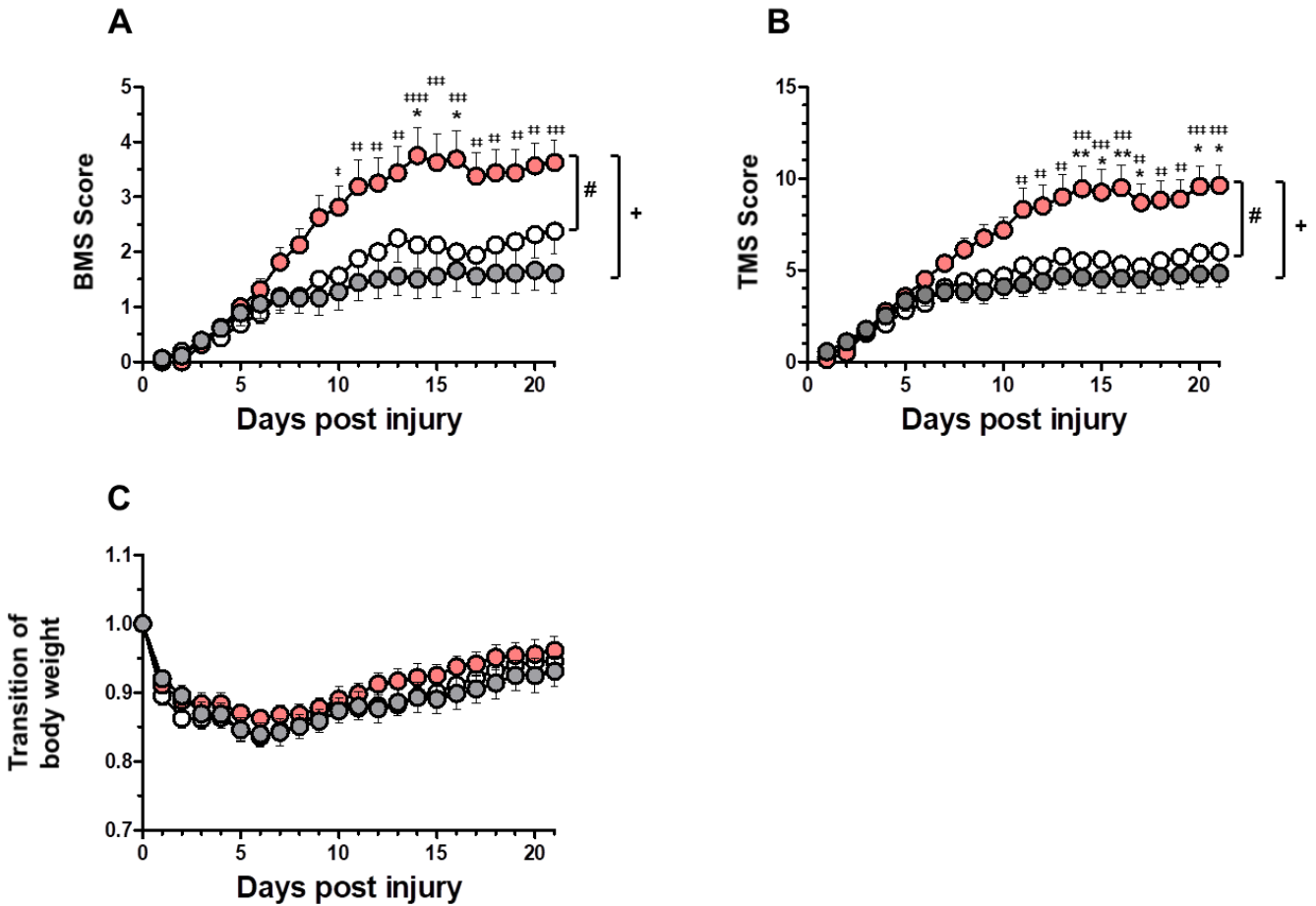


Figure 15 NLK - GRP78 シグナリングの脊髄損傷における運動機能改善作用

損傷後直ちに、Normal IgG と recombinant NLK (Normal IgG / NLK; pink circles, 8 mice, 16 hindlimbs, n = 16) または Normal IgG / と溶媒 (Normal IgG / Vehicle; white circles, 8 mice, n = 16) または GRP78 中和抗体と NLK (GRP78-ab / NLK; gray circles, 9 mice, n = 18) を、それぞれ脊髄損傷マウスの側脳室内に同時投与した。後肢運動機能の評価には、BMS (A) 及び TMS (B)を用いた。 $\#p < 0.05$ vs Normal IgG / Vehicle, $+p < 0.05$ vs GRP78-ab / NLK, drug \times day interaction, repeated measures two-way ANOVA. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs Normal IgG, $\ddagger p < 0.05$, $\ddagger\ddagger p < 0.01$, $\ddagger\ddagger\ddagger p < 0.001$, $\ddagger\ddagger\ddagger\ddagger p < 0.001$ vs GRP78-ab / NLK, *post hoc* Bonferroni test. (C) 21 日間の行動評価における、各群の体重推移を示した。

2.3.6. NLK - GRP78 シグナリングによる急性期脊髄損傷マウスにおける軸索伸展作用の検討

前項で用いた損傷 21 日目の脊髄損傷マウスについて、損傷領域を含んだ脊髄組織を単離し矢状断切片を作製後、抗 NF-H 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った (Figure 16A, B)。損傷領域は DAPI 染色により決定した (Figure 16A)。Normal / IgG 投与群と比較して、normal IgG / NLK 投与群では有意に損傷領域内の NF-H 陽性軸索密度が増加した。一方で GRP78 中和抗体を NLK と同時に投与された場合、normal IgG / NLK 投与群と比べて、その軸索密度の増加は有意に減弱した (Figure 16C)。また各処置群間において、損傷領域の大きさに有意な差はなかった (Figure 16D)。これらの結果から、脊髄損傷に対する NLK の軸索伸展活性に GRP78 が関与することが示された。

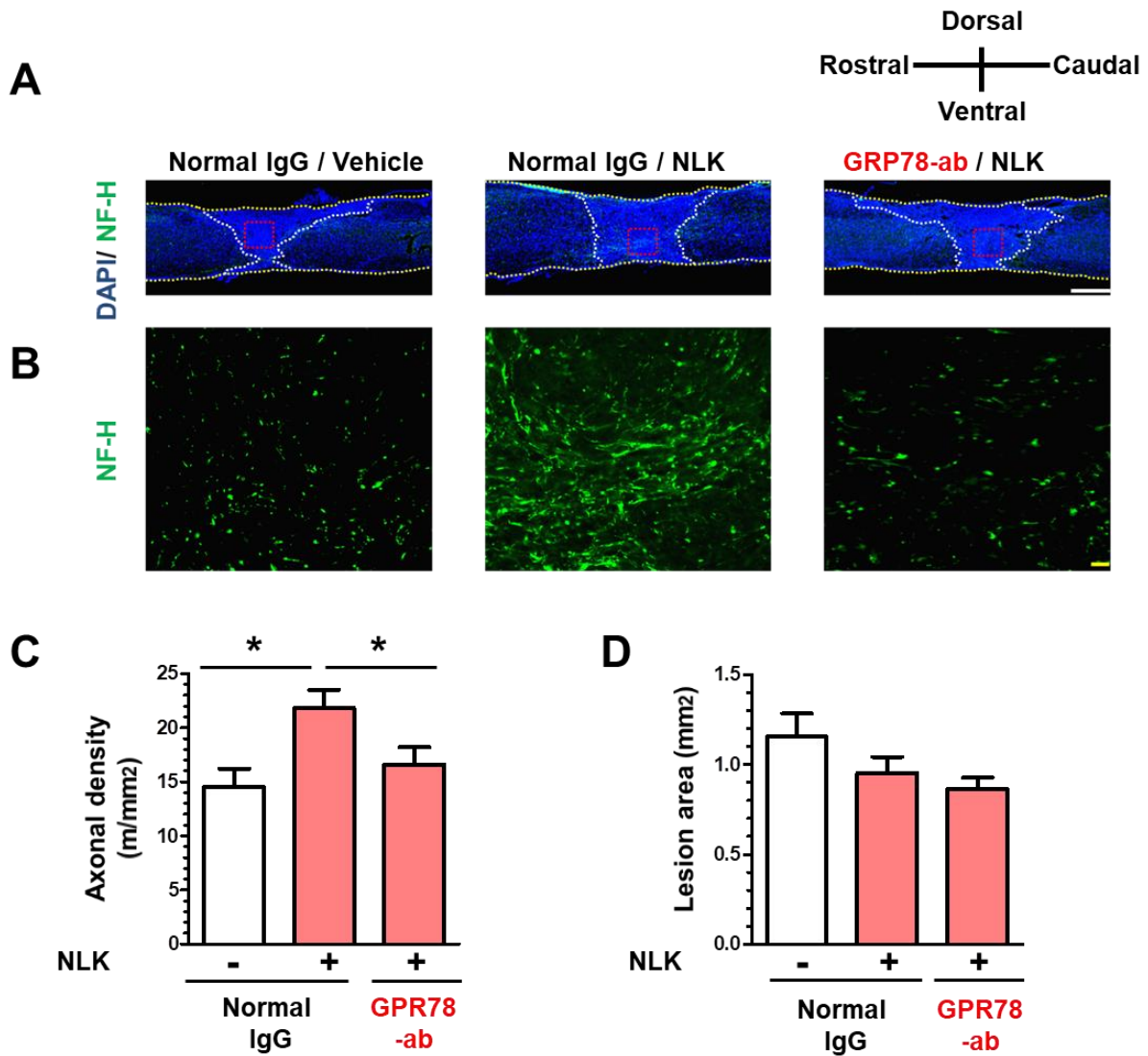


Figure 16 脊髄損傷における NLK - GRP78 シグナリングの軸索伸展作用

損傷 21 日目における脊髄矢状断切片を用いて、NF-H の蛍光免疫染色を行った。DAPI による各染色を行った。(A) DAPI および pNF-H による代表的な merge 画像を示した。黄色の実線は脊髄組織の輪郭を示し、白色の点線は損傷領域の境界を示した。Black scale bars = 500 μ m. (B) A の赤枠によって囲った領域を拡大し、NF-H による染色画像を示した。Blue scale bars = 20 μ m. 損傷領域内における NF-H 陽性軸索密度を定量した。* $p < 0.05$, split plot ANOVA *post hoc* Tukey's HSD test. (D) 損傷領域の大きさを定量した。One-way ANOVA. Normal IgG/ NLK: $n = 8$ mice, Normal IgG / Vehicle: $n = 8$ mice, RP78-ab / NLK: $n = 9$ mice.

2.4. 考察

これまでNLKの軸索伸展活性については、*in vitro*、*in vivo*のどちらにおいても報告があったものの (Sun *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2014; Tanie *et al.*, 2018)、そのシグナルパスウェイは不明なままであった。本章では、軸索伸展シグナルを制御する NLK の受容体として細胞膜に発現する GRP78 の関与を示した (Figure 11, 13, 14, 16)。この NLK-GRP78 シグナリングは、軸索伸展を促進する新規のシグナルである。さらに急性期脊髄損傷マウスに GRP78 中和抗体を投与することで、NLK の脊髄損傷改善作用は阻害された (Figure 15)。この結果から、NLK-GRP78 シグナリングが損傷部の軸索伸展や運動機能の回復に寄与することが証明された。

前章の考察でも述べた通り、GRP78 は小胞体で分子シャペロンとして機能する他に、細胞膜に発現し細胞内へシグナルを伝達する受容体様の機能を有する (Gonzalez-Gronow *et al.*, 2009)。研究例は多くないが、神経細胞における受容体型 GRP78 の下流シグナルについても報告がある。Tissue plasminogen activator (t-PA) は細胞膜の GRP78 を介して Perk 等の小胞体関連タンパク質の活性化を抑制し、虚血環境下による神経細胞死を緩和する (Louessard *et al.*, 2017)。また海馬神経細胞において、 α -synuclein は GRP78 を介して Rac1/PAK2/LIMK1/cofilin1 経路を活性化し、アクチンの重合制御に関与する (Bellani *et al.*, 2014)。一方本章では、GRP78 の下流タンパク質として Akt が同定された。Akt の上流のシグナル分子である PI3k は、受容体型 GRP78 の N 末領域に結合して活性化し、PIP₃ の産生亢進、Akt の活性化に寄与する (Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013)。この PI3k - Akt シグナリングは、軸索伸展メカニズムにも大きく関与する経路としてよく知られている (Read and Gorman, 2009; Zhao *et al.*, 2012)。これまでも受容体型 GRP78 へのリガンド刺激による Akt の活性化が示されており、その活性化は細胞生存、増殖、運動能の制御に必須であることががん細胞や血管内皮細胞において示されている (Misra *et al.*, 2006; Philippova *et al.*, 2008; Kelber *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2017)。それら Akt 活性化の機能に加えて、本研究ではその活性化が細胞膜の GRP78 を介した軸索伸展作用に関与することを初めて示した。

7 回膜貫通型受容体である AMFR は、最もよく知られた NLK の受容体である。神経細胞での発現も確認されており (Leclerc *et al.*, 2000)、げっ歯類を用いた記憶・学習試験において、スコアの高さと脳内での NLK・AMFR の発現の高さに相関があることが示されている (Luo *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2012)。本章では、AMFR 中和抗体を前処置しても NLK の軸索伸展作用が抑制されなかったことから、AMFR は NLK の軸索伸展活性には関与しないことが示された。現在、AMFR 以外にも NLK の結合タンパク質が報告されており、HER2 (Kho *et al.*, 2013)、G protein coupled estrogen receptor 1 (GPER-1, Li *et al.*, 2019)、insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3, Mishra *et al.*, 2004)、fibronectin (Lagana *et al.*, 2005) が挙げられる。このうち GPER-1 と IGFBP-3 については神経細胞での発現が知られており、GPER-1 は軸索伸展にも関与

する受容体であることが報告されている (Ruiz-Palmero *et al.*, 2013)。そのため NLK の軸索伸展作用における GPER-1 の関与を完全には否定できないが、GRP78 の中和抗体処置により NLK の軸索伸展作用や運動機能改善作用は完全に抑制されたため (Figure 11, 15, 16)、細胞膜に発現する GRP78 が NLK の軸索伸展作用を制御する主要な受容体であると考えている。

NLK-GRP78 シグナリングは軸索伸展に寄与するが、神経保護作用も示す可能性は否定できない。過去に NLK の神経保護作用が示されており (Gurney *et al.*, 1986b; Romagnoli *et al.*, 2003; Deng *et al.* 2014)、PI3k-Akt シグナリングは細胞生存に大きく関わる経路でもある (Robbins and Hague, 2016)。さらに上述した通り、Louessard らは虚血下において、t-PA による受容体型 GRP78 を介した神経保護作用を示した (Louessard *et al.*, 2017)。本研究で用いた神経細胞の初代培養系において、培養終了時に溶媒処置群よりも NLK 処置群で有意に生存する細胞数が多いという結果は得られていないが (データ未提示)、脊髓損傷部の様な培養環境よりもさらにシビアな生体環境下では、NLK が神経保護作用に寄与する可能性は十分に考えられる。

NLK の持続投与により、損傷領域内での NF-H 陽性軸索密度の有意な増加が認められ、これが損傷後の神経伝導路の再建につながり、後肢運動機能の回復に至ったと考えている。しかし投与した NLK がどの神経細胞の軸索を伸展させたか、今回の結果からは判断できない。前章では大脳皮質由来、脊髓由来神経細胞の両方で NLK の軸索伸展活性を確認した (Figure 3, 4)。また NLK は側脳室内投与であるため、脳脊髄液流により脳・脊髓のどちらにも到達しうる点、神経細胞における受容体型 GRP78 の局在が細胞体・軸索上・シナプスのどこであるか未検討である点から、投与された NLK の作用点は不明であり、伸展した軸索は損傷部に存在する介在ニューロンである可能性、脳からの下行性伝導路である可能性、あるいはその両方である可能性が考えられる。運動機能を制御する下行性伝導路には皮質脊髓路 (Courtine *et al.*, 2005)、縫線脊髓路 (Alstermark *et al.*, 1987)、赤核脊髓路 (Muir and Whishaw, 2000)、毛様体脊髓路 (Alstermark *et al.*, 1987) 等が挙げられる。損傷部及びその周辺におけるこれらの伝導路の伸展と運動機能の回復に一定の相関があることは、当研究室を含め多くの知見が証明している (Ito *et al.*, 2018; Ohtake *et al.*, 2019; Kodani *et al.*, 2019)。現在、縫線脊髓路について抗 5-HT 抗体を用いた蛍光免疫染色により脊髓組織での軸索伸展の程度を検討中である。またげっ歯類と比較して、ヒトでは皮質脊髓路の運動機能への寄与が大きいことが知られており (Barthélemy *et al.*, 2011)、NLK-GRP78 シグナリングのヒトへの有効性を予測するためにも、皮質脊髓路に対する軸索伸展作用も検討したい。その方法として皮質脊髓路の可視化には、大脳皮質の運動野の神経細胞体へ順行性トレーサーである Biotinylated Dextran Amine 等を注入する手法で検討することが出来る。さらに今回検出された NF-H 陽性軸索密度の増加からだけでは、どのように神経伝導路が再建されたのか、その実態は不明である。皮質脊髓路や縫線脊髓路においては、損傷

した軸索が損傷部より吻側で sprouting することで、介在ニューロンに投射し、投射された細胞は損傷部よりも下位の運動ニューロンに投射することで神経伝導路が再構築され、損傷後の自発的回復の過程に寄与することが報告されている (Bareyre *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2010)。本章の検討でもこの様な迂回路の形成を NLK が促進した結果、運動機能の回復につながる可能性は否定できない。脊髄完全切断モデルでは、損傷部に移植された神経幹細胞が下行性伝導路とシナプス形成し、かつ損傷部から長距離伸長して運動ニューロンに投射して伝導路を再建する現象が報告されている (Lu *et al.*, 2012)。NLK による軸索伸展においても可能性の一つとして、損傷部で生存した介在ニューロンが上述した通り損傷した神経伝導路を中継することで、運動機能の回復に寄与したと考えている。

2.5. 小括

本章では、NLK は細胞膜の GRP78 に結合し軸索伸展作用を示すこと、その下流分子として Akt の活性化が重要であることを明らかにした。この軸索伸展をもたらす NLK-GRP78 シグナリングは、急性期脊髄損傷治療における治療ターゲットとなることを初めて示した。

総括

本研究では、軸索伸展作用を増強するようなアストロサイトの有益な機能を活性化し、かつ神経細胞の軸索伸展に寄与する因子の発見を目的として、アストロサイトから分泌されるタンパク質であり、これまで機能的な意義が不明だった NLK に着目した。第 1 章では、アストロサイトから分泌された NLK が軸索伸展に寄与する可能性を示し、また NLK 分泌を制御する受容体として細胞膜に局在する GRP78 を見出した。さらに急性期脊髄損傷マウスにおいて、NLK が損傷部での軸索伸展を亢進し運動機能を改善することを明らかにした。第 2 章では、受容体型 GRP78 が神経細胞においても NLK の受容体として軸索伸展に関与することを見出し、それには Akt の活性化が必須であることを明らかにした。以上の結果から、急性期脊髄損傷治療において軸索伸展に寄与する有益な治療ターゲットとして、神経細胞とアストロサイトの両方に共通した NLK-GRP78 シグナリングを見出した (Figure 17)。

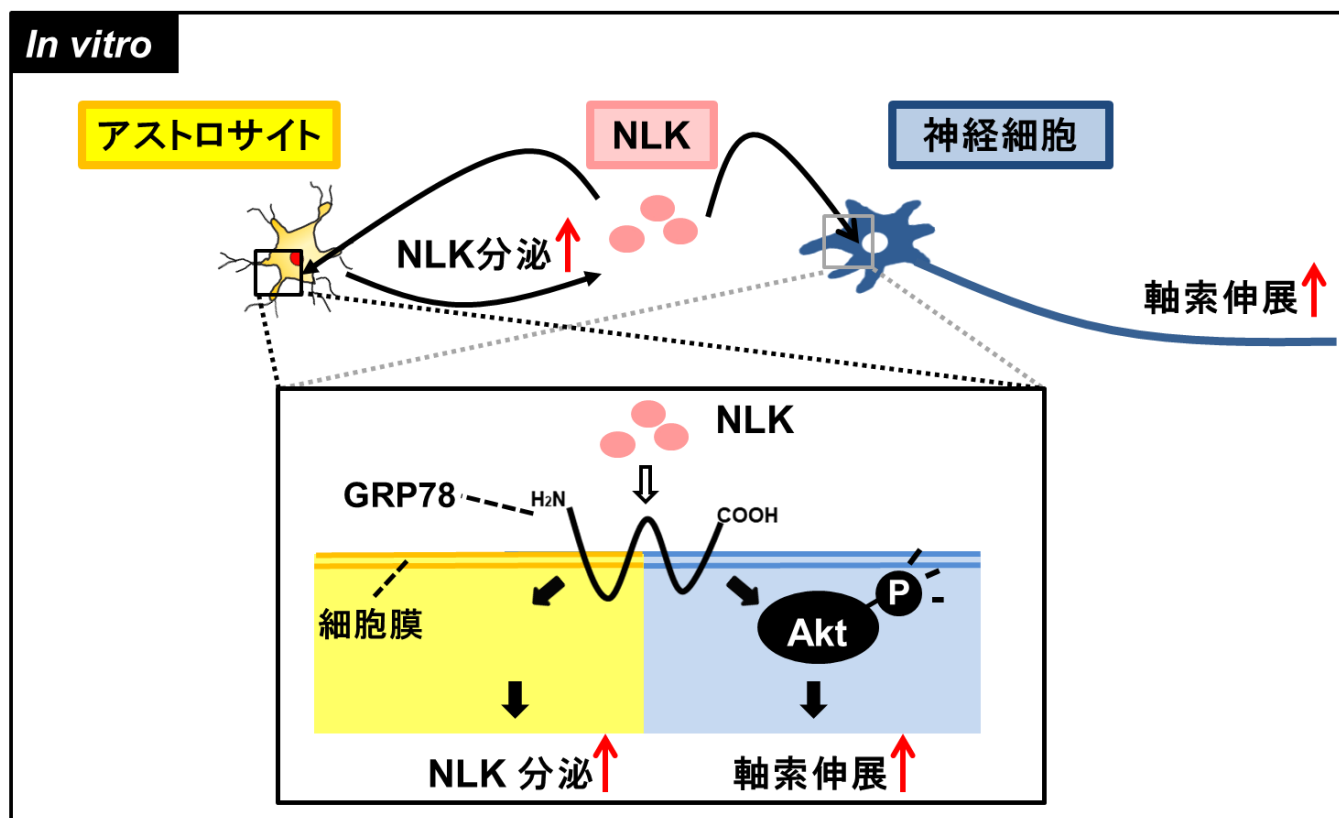
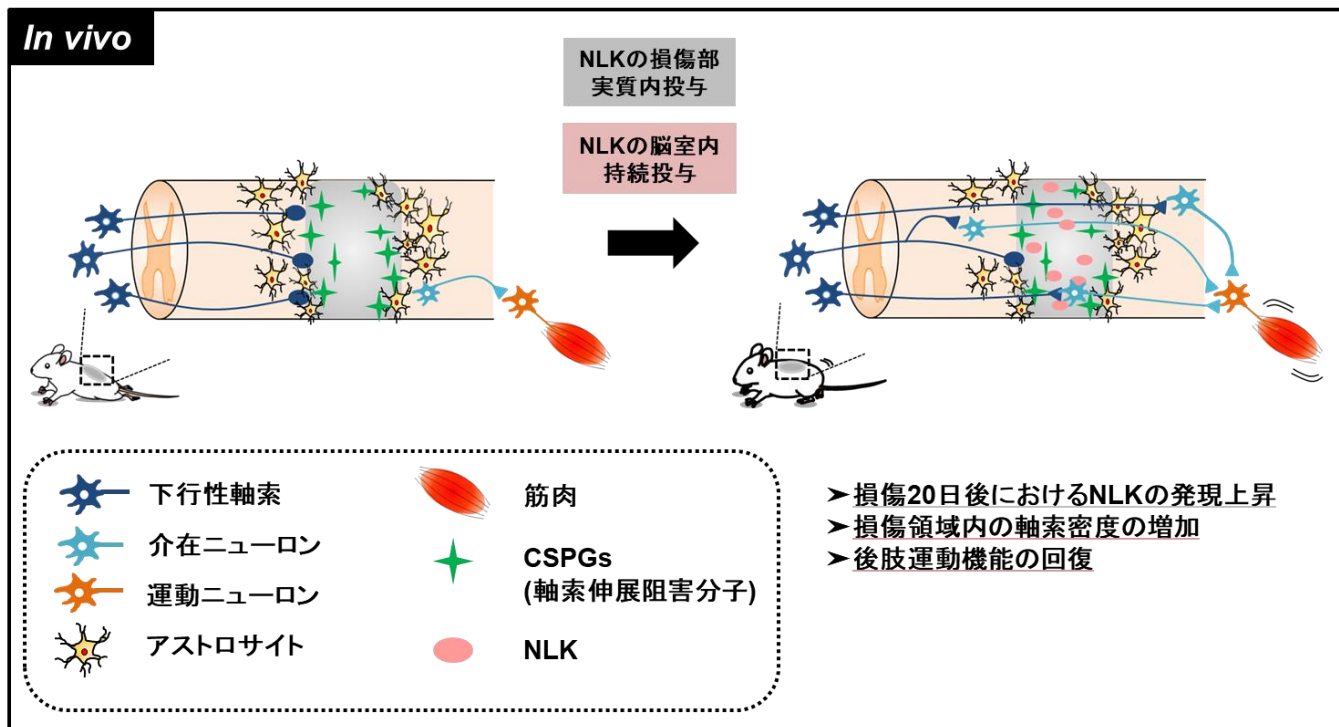
本研究から細胞外 NLK は、神経細胞への直接的な軸索伸展作用とアストロサイトからの NLK 分泌を介した軸索伸展増強作用を示すことを見出した。この知見から、NLK 自体が急性期脊髄損傷治療薬として有用となるかもしれない。しかし本研究では、NLK 分泌を促進させる濃度 (500 ng/ml) と軸索伸展作用を示す濃度 (10 - 100 ng/ml) には解離があり、今後神経細胞とアストロサイトの両方に有効である投与量の検討は必須と考えている。NLK はタンパク質であるため、その分子量の大きさから経口投与や静脈内投与では中枢への移行は難しく、第 2 章で用いた脳脊髄液中への直接投与が望ましいと思われる。現在臨床では、脊髄腔内に治療薬を直接投与する方法は脊髄損傷に対して行われていないが、重度痙縮治療において中枢性筋弛緩薬であるバクロフェンを脊髄腔内に持続投与する intrathecal baclofen therapy (ITB) が世界中で採用されている (日薬理誌, No. 131, 2008)。当研究室でも、軸索伸展作用のある低分子化合物を浸透圧ミニポンプによって髄腔内持続投与することで、慢性期脊髄損傷マウスにおける運動機能改善作用を確認している (中野, 修士論文)。NLK-GRP78 シグナリングを活性化させるもう一つの手段として、受容体型 GRP78 を NLK とは別に直接刺激する薬物を用いる方法が想定されるが、その様な薬物の内、既に臨床で使用されている薬物に t-PA がある (Louessard *et al.*, 2017)。本剤は心筋梗塞や脳梗塞において発症 4.5 - 6 時間以内のみ静脈内投与が認められている遺伝子組み換えタンパク質製剤であり、抗血栓作用を有する。静脈内投与された tPA が中枢に移行するかは不明だが、これまでに t-PA は神経保護作用 (Chevilley *et al.*, 2015; Louessard *et al.*, 2017) や軸索伸展作用 (Xin *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014) が報告されている。しかし、脊髄損傷の様な出血を伴う外傷には出血リスクが高まることから投与禁忌となっており、脊髄損傷治療への応用は難しい。現在、抗がん作用や抗血管新生作用を目的とした、受容体型 GRP78 を標的とする低分子化合物の開発が進んでいる (Lin *et al.*, 2015; Hughes *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2020)。受容

体型 GRP78 を刺激する薬物が、低分子で中枢移行性の良好な特性を有していれば経口投与での治療も可能となり、低侵襲性の効果的な治療法になるかもしれない。

第 1 章の結果から、損傷部に単回注入された NLK は、神経細胞に対して一過性に軸索伸展作用をもたらすだけでなく、損傷部のアストロサイトへも作用し NLK の発現増加と分泌を促進する。これによって NLK の軸索伸展促進作用が持続、増幅され、運動機能の回復につながる。これまでに、NLK は神経保護作用 (Gurney *et al.*, 1986b; Deng *et al.*, 2014) や軸索伸展作用 (Sun *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2014; Tanie *et al.*, 2018) といった神経栄養因子様の作用を有することが示されている。他の研究では、神経栄養因子の損傷部への投与により脊髄損傷改善作用が報告されているものの (Ziemlińska *et al.*, 2014)、投与された神経栄養因子が、損傷部のアストロサイトからの NLK 分泌を制御して軸索伸展に寄与するという報告はない。他にもがん細胞において、成長因子では唯一、EGF 処置により NLK 分泌の亢進が示されている (Kho *et al.*, 2014)。EGF は軸索伸展作用を有するが (Hermann *et al.*, 2000)、EGF によるアストロサイトからの NLK 分泌亢進作用の報告はない。よって、アストロサイトからの NLK 分泌を介した軸索伸展増強作用が、他の神経栄養因子や成長因子には見られない NLK-GRP78 シグナリングの新規性だと筆者は考えている。しかし培養神経細胞では、NT-3 (Krüttgen *et al.*, 1998) や BDNF (Nakajima *et al.*, 2015) 等の発現が positive feedback 制御されることが示されており、一般的にアストロサイトにおいても神経栄養因子や成長因子の発現・分泌が autocrine loop により増強されることが想定されている (Buffo *et al.*, 2010)。よってそれら因子の投与による、損傷部のアストロサイトを介した軸索伸展増強作用の生じうる可能性は否定できない。今後、NLK と他の神経栄養因子や成長因子を比較して、脊髄損傷改善作用を検討する必要があると思われる。

以上、本研究は、脊髄損傷改善作用を示す NLK-GRP78 シグナリングを見出した。損傷部におけるアストロサイトは有害にも有益にも働く二面性を有していると考えられるが、このシグナリングは軸索伸展に積極的に寄与するアストロサイトの有益な面を高め、かつ軸索伸展作用にも直接寄与する。損傷部に集積する活性化アストロサイトを利用し、軸索伸展の引き金となる NLK-GRP78 シグナリングは、今後の脊髄損傷における、より効果的な新規治療ターゲットとして期待される。

Figure 17 本研究のまとめ



参考文献

- Alstermark B, Kümmel H, Tantisira B. Monosynaptic raphespinal and reticulospinal projection to forelimb motoneurons in cats. *Neurosci Lett*. 1987. 74(3):286-90.
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 2016. 532(7598):195-200.
- 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.
- Barthélemy D, Grey MJ, Nielsen JB, Bouyer L. Involvement of the corticospinal tract in the control of human gait. *Prog Brain Res*. 2011. 192:181-97.
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci*. 2004. 7(3):269-77.
- Bellani S, Mescola A, Ronzitti G, Tsushima H, Tilve S, Canale C, Valtorta F, Chiergatti E. GRP78 clustering at the cell surface of neurons transduces the action of exogenous alpha-synuclein. *Cell Death Differ*. 2014. 21(12):1971-83.
- Berger CL, Dong Z, Hanlon D, Bisaccia E, Edelson RL. A Lymphocyte Cell Surface Heat Shock Protein Homologous to the Endoplasmic Reticulum Chaperone, Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein BIP. *Int J Cancer*. 1997. 71(6):1077-85.
- Bradbury EJ, Burnside ER. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nat. Commun*. 2019. 10(1):3879.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol*. 2010. 79(2):77-89.
- Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell*. 2009. 138(2):377-88.
- Casaca-Carreira J, Temel Y, Heschem SA, Jahanshahi A. Transependymal Cerebrospinal Fluid Flow: Opportunity for Drug Delivery? *Mol. Neurobiol*. 2018. 55 (4), 2780–2788.
- Casas C. GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection. *Front Neurosci*. 2017. 11:177.

- Chevilley A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D. Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front Cell Neurosci.* 2015. 9:415.
- Chiu CG, St-Pierre P, Nabi IR, Wiseman SM. Autocrine Motility Factor Receptor: A Clinical Review. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008. 8(2):207-17.
- Courtine G, Roy RR, Raven J, Hodgson J, McKay H, Yang H, Zhong H, Tuszynski MH, Edgerton VR. Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain.* 2005. 128(Pt 10):2338-58.
- Courtine G, Sofroniew MV. Spinal Cord Repair: Advances in Biology and Technology. *Nat Med.* 2019. 25(6):898-908.
- Deng L, Shi B, Zhuang Y, Chu J, Shi X, Zhang S, Guo M. Performance and mechanism of neuroleukin in the growth and survival of sertoli cell-induced neurons in a coculture system. *Cell Transplant.* 2014. 23(3):381-94.
- Dazert S, Kim D, Luo L, Aletsee C, Garfunkel S, Maciag T, Baird A, Ryan AF. Focal delivery of fibroblast growth factor-1 by transfected cells induces spiral ganglion neurite targeting in vitro. *J Cell Physiol.* 1998. 177(1):123-9.
- Decourt B, Bouleau Y, Dulon D, Hafidi A. Expression analysis of neuroleukin, calmodulin, cortactin, and Rho7/Rnd2 in the intact and injured mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005. 159(1):36-54.
- Diez H, Benitez MJ, Fernandez S, Torres-Aleman I, Garrido JJ, Wandosell F. Class I PI3-kinase or Akt inhibition do not impair axonal polarization, but slow down axonal elongation. *Biochim Biophys Acta.* 2016. 1863(11):2574-2583.
- Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB. Brainderived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 2000. 7(6 Pt B), 574–585.
- Dowell JA, Johnson JA, Li L. Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics. *J. Proteome Res.* 2009. 8, 4135–4143.
- Fairbank M, St-Pierre P, Nabi IR. The Complex Biology of Autocrine Motility factor/phosphoglucose Isomerase (AMF/PGI) and Its Receptor, the gp78/AMFR E3 Ubiquitin Ligase. *Mol Biosyst.* 2009. 5(8):793-801.
- Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H. Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor hat stimulates endothelial cell motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. 284(5) : 1116-25.

Funasaka T, Yanagawa T, Hogan V, Raz A. Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression by hypoxia. *FASEB J*. 2005. 19(11):1422-30.

Geng H, Xue C, Mendonca J, Sun XX, Liu Q, Reardon PN, Chen Y, Qian K, Hua V, Chen A, Pan F, Yuan J, Dang S, Beer TM, Dai MS, Kachhap SK, Qian DZ. Interplay between hypoxia and androgen controls a metabolic switch conferring resistance to androgen/AR-targeted therapy. *Nat Commun*. 2018. 9(1):4972.

Goldenberg-Cohen N, Raiter A, Gaydar V, Dratviman-Storobinsky O, Goldstein T, Weizman A, Hardy B. Peptide-binding GRP78 protects neurons from hypoxia-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2012 Mar;17(3):278-88.

Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J, Pizzo SV. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal*. 2009. 11(9):2299-306.

Gopal U, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Activated α 2-Macroglobulin Regulates Transcriptional Activation of c-MYC Target Genes through Cell Surface GRP78 Protein. *J Biol Chem*. 2016. 291(20):10904-15.

Gurney ME, Apatoff BR, Heinrich SP. Suppression of terminal axonal sprouting at the neuromuscular junction by monoclonal antibodies against a muscle-derived antigen of 56,000 daltons. *J Cell Biol*. 1986a. 102(6):2264-72.

Gurney ME, Heinrich SP, Lee MR, Yin HS. Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science*. 1986b. 234, 566–574.

Haga A, Funasaka T, Deyashiki Y, Raz A. Autocrine motility factor stimulates the invasiveness of malignant cells as well as up-regulation of matrix *met* *allo*proteinase-3 expression via a MAPK pathway. *FEBS Lett*. 2008. 582(13):1877-82.

Haga A, Tanaka N, Funasaka T, Hashimoto K, Nakamura KT, Watanabe H, Raz A, Nagase H. The autocrine motility factor (AMF) and AMF-receptor combination needs sugar chain recognition ability and interaction using the C-terminal region of AMF. *J Mol Biol*. 2006. 358 (3): 741-53.

Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, Kijima K, Yoshizaki S, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat Med*. 2017. 23(7):818-828.

Hermann PM, van Kesteren RE, Wildering WC, Painter SD, Reno JM, Smith JS, Kumar SB, Geraerts WP, Ericsson LH, Smit AB, Bulloch AG, Nagle GT. Neurotrophic actions of a novel molluscan epidermal growth factor. *J Neurosci*. 2000. 20(17):6355-64.

Honda T, Horie M, Daito T, Ikuta K, Tomonaga K. Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at the cell surface. *J Virol.* 2009. 83(23):12622-5.

Huang SP, Chen JC, Wu CC, Chen CT, Tang NY, Ho YT, Lo C, Lin JP, Chung JG, Lin JG. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res.* 2009. 29(1):165-74.

Huang Z, Zhang N, Zha L, Mao HC, Chen X, Xiang JF, Zhang H, Wang ZW. Aberrant Expression of the Autocrine Motility Factor Receptor Correlates with Poor Prognosis and Promotes Metastasis in Gastric Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014. 15(2):989-97.

Hughes SJ, Antoshchenko T, Chen Y, Lu H, Pizarro JC, Park HW. Probing the ATP Site of GRP78 with Nucleotide Triphosphate Analogs. *PLoS One.* 2016. 11(5):e0154862.

Hurlbert RJ. Methylprednisolone for Acute Spinal Cord Injury: An Inappropriate Standard of Care. *J Neurosurg.* 2000. 93(1 Suppl):1-7.

Inada T, Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Someya Y, Ikeda O, Hashimoto M, Suda K, Kajino T, Ueda H, Ito Y, Ueta T, Hanaoka H, Takahashi K, Koda M. Multicenter Prospective Nonrandomized Controlled Clinical Trial to Prove Neurotherapeutic Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Acute Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2014. 39(3):213-9.

Ito S, Nagoshi N, Tsuji O, Shibata S, Shinozaki M, Kawabata S, Kojima K, Yasutake K, Hirokawa T, Matsumoto M, Takei K, Nakamura M, Okano H. LOTUS Inhibits Neuronal Apoptosis and Promotes Tract Regeneration in Contusive Spinal Cord Injury Model Mice. *eNeuro.* 2018. 5(5):ENEURO.0303-18.2018.

Karimi-Abdolrezaee S, Billakanti R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. *Mol. Neurobiol.* 2012. 46, 251 - 264.

Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br. J. Pharmacol.* 2016. 173, 692 - 702.

Kelber JA, Panopoulos AD, Shani G, Booker EC, Belmonte JC, Vale WW, Gray PC. Blockade of Cripto binding to cell surface GRP78 inhibits oncogenic Cripto signaling via MAPK/PI3K and Smad2/3 pathways. *Oncogene.* 2009. 28(24): 2324-36.

Kern J, Untergasser G, Zenzmaier C, Sarg B, Guenther Gastl, Eberhard Gunsilius, Michael Steurer. GRP-78 Secreted by Tumor Cells Blocks the Antiangiogenic Activity of Bortezomib. *Blood.* 2009. 114(18):3960-7.

Kho DH, Nangia-Makker P, Balan V, Hogan V, Tait L, Wang Y, Raz A. Autocrine motility factor promotes HER2 cleavage and signaling in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2013. 73(4):1411-9.

Kho DH, Zhang T, Balan V, Wang Y, Ha SW, Xie Y, Raz A. Autocrine motility factor modulates EGF-mediated invasion signaling. *Cancer Res.* 2014. 74(8):2229-37.

Kodani A, Kikuchi T, Tohda C. Acteoside improves muscle atrophy and motor function by inducing new myokine secretion in chronic spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2019. 36(12):1935-1948.

Kojic LD, Joshi B, Lajoie P, Le PU, Cox ME, Turbin DA, Wiseman SM, Nabi IR. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2007. 282(40):29305-13.

Kojic LD, Wiseman SM, Ghaidi F, Joshi B, Nedev H, Saragovi HU, Nabi IR. Raft-dependent Endocytosis of Autocrine Motility factor/phosphoglucose Isomerase: A Potential Drug Delivery Route for Tumor Cells. *PLoS One.* 2008. 3(10):e3597.

Krenz NR, Weaver LC. Nerve growth factor in glia and inflammatory cells of the injured rat spinal cord. *J. Neurochem.* 2000. 74, 730–739.

Krüttgen A, Möller JC, Heymach JV Jr, Shooter EM. Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(16):9614-9.

Kuboyama T, Wahane S, Huang Y, Zhou X, Wong JK, Koemeter-Cox A, Martini M, Friedel RH, Zou H. HDAC3 inhibition ameliorates spinal cord injury by immunomodulation. *Sci Rep.* 2017. 7(1):8641.

Lagana A, Goetz JG, Y N, Altschuler Y, Nabi IR. pH-specific sequestration of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor by fibronectin and heparan sulphate. *J Cell Sci.* 2005. 118(Pt 18):4175-85.

Le Moan N, Baeten KM, Rafalski VA, Ryu JK, Rios Coronado PE, Bedard C, Syme C, Davalos D, Akassoglou K. Hypoxia Inducible Factor-1 α in Astrocytes and/or Myeloid Cells Is Not Required for the Development of Autoimmune Demyelinating Disease. *eNeuro.* 2015. 2(2):ENEURO.0050-14.2015.

Leclerc N, Vallée A, Nabi IR. Expression of the AMF/neuroleukin receptor in developing and adult brain cerebellum. *J Neurosci Res.* 2000. 60(5):602-12.

Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, Lee J, Han SH, Han DW, Cheong JH, Ryu JH, Shin CY. tPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Mol Neurobiol.* 2014. 49(1):199-215.

Lewy TG, Grabowski JM, Bloom ME. BiP: Master Regulator of the Unfolded Protein Response and Crucial Factor in Flavivirus Biology. *Yale J Biol Med.* 2017. 90(2):291-300.

Li Y, Jia Y, Bian Y, Tong H, Qu J, Wang K, Wan XP. Autocrine motility factor promotes endometrial cancer progression by targeting GPER-1. *Cell Commun Signal.* 2019. 17(1):22.

Li Z, Zhang L, Zhao Y, Li H, Xiao H, Fu R, Zhao C, Wu H, Li Z. Cell-surface GRP78 facilitates colorectal cancer cell migration and invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013. 45(5):987-94.

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic Reactive Astrocytes Are Induced by Activated Microglia. *Nature.* 2017. 541(7638):481 - 487.

Lin ML, Chen SS, Ng SH. CHM-1 Suppresses Formation of Cell Surface-associated GRP78-p85 α Complexes, Inhibiting PI3K-AKT Signaling and Inducing Apoptosis of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 2015. 35(10):5359-68.

Lin CH, Lin W, Su YC, Cheng-Yo Hsuan Y, Chen YC, Chang CP, Chou W, Lin KC. Modulation of parietal cytokine and chemokine gene profiles by mesenchymal stem cell as a basis for neurotrauma recovery. *J Formos Med Assoc.* 2019. 118(12):1661-1673.

Liu W, Wang Y, Gong F, Rong Y, Luo Y, Tang P, Zhou Z, Zhou Z, Xu T, Jiang T, Yang S, Yin G, Chen J, Fan J, Cai W. Exosomes Derived from Bone Mesenchymal Stem Cells Repair Traumatic Spinal Cord Injury by Suppressing the Activation of A1 Neurotoxic Reactive Astrocytes. *J Neurotrauma.* 2019. 36(3):469-484.

Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Schiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986. 83, 3302–3306.

Liu R, Li X, Gao W, Zhou Y, Wey S, Mitra SK, Krasnoperov V, Dong D, Liu S, Li D, Zhu G, Louie S, Conti PS, Li Z, Lee AS, Gill PS. Monoclonal antibody against cell surface GRP78 as a novel agent in suppressing PI3K/AKT signaling, tumor growth, and metastasis. *Clin Cancer Res.* 2013. 19(24):6802-11.

Lomenick B, Hao R, Jonai N, Chin RM, Aghajani M, Warburton S, Wang J, Wu RP, Gomez F, Loo JA, Wohlschlegel JA, Vondriska TM, Pelletier J, Herschman HR, Clardy J, Clarke CF, Huang J. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106(51):21984-9.

Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, Terrisse A, Carraro V, Fafournoux P,

- Bruhat A, Orset C, Vivien D, Ali C, Roussel BD. Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ.* 2017. 24 (9):1518-1529.
- Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, Brock J, Blesch A, Rosenzweig ES, Havton LA, Zheng B, Conner JM, Marsala M, Tuszynski MH. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell.* 2012. 150(6):1264-73.
- Lu Y, Yu SS, Zong M, Fan SS, Lu TB, Gong RH, Sun LS, Fan LY. Glucose-6-Phosphate Isomerase (G6PI) Mediates Hypoxia-Induced Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. *Sci Rep.* 2017. 7:40274.
- Lucarelli G, Galleggiante V, Rutigliano M, Sanguedolce F, Cagiano S, Bufo P, Lastilla G, Maiorano E, Ribatti D, Giglio A, Serino G, Vavallo A, Bettocchi C, Selvaggi FP, Battaglia M, Ditunno P. Metabolomic profile of glycolysis and the pentose phosphate pathway identifies the central role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in clear cell-renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015. 6 (15): 13371-86.
- Luo Y, Long JM, Lu C, Chan SL, Spangler EL, Mascarucci P, Raz A, Longo DL, Mattson MP, Ingram DK, Weng NP. A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. *J Neurochem.* 2002. 80(2):354-61.
- Marek R, Caruso M, Rostami A, Grinspan JB, Das Sarma J. Magnetic cell sorting: a fast and effective method of concurrent isolation of high purity viable astrocytes and microglia from neonatal mouse brain tissue. *J Neurosci Methods.* 2008. 175(1):108-18.
- Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, Yoshida M, Ando M, Yamada H. Early Complications of High-Dose Methylprednisolone Sodium Succinate Treatment in the Follow-Up of Acute Cervical Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001. 26(4):426-30.
- McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980. 85(3):890-902.
- Miao YR, Eckhardt BL, Cao Y, Pasqualini R, Argani P, Arap W, Ramsay RG, Anderson RL. Inhibition of established micrometastases by targeted drug delivery via cell surface-associated GRP78. *Clin Cancer Res.* 2013. 19(8):2107-16.
- Mikami M, Sadahira Y, Haga A, Otsuki T, Wada H, Sugihara T. Hypoxia-inducible factor-1 drives the motility of the erythroid progenitor cell line, UT-7/Epo, via autocrine motility factor. *Exp Hematol.* 2005. 33(5):531-41.
- Mishra S, Raz A, Murphy LJ. Insulin-like growth factor binding protein-3 interacts with autocrine motility

factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and inhibits the AMF/PGI function. *Cancer Res.* 2004. 64(7):2516-22.

Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem.* 2005. 280(28):26278-86.

Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem.* 2006. 281(19):13694-707.

Muir GD, Wishaw IQ. Red nucleus lesions impair overground locomotion in rats: a kinetic analysis. *Eur J Neurosci.* 2000. 12(3):1113-22.

Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, D'Amico J, Harvey PJ, Li X, Harris RL, Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ, Fouad K. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors. *Nat Med.* 2010. 16(6):694-700.

Nagoshi N, Tsuji O, Kitamura K, Suda K, Maeda T, Yato Y, Abe T, Hayata D, Matsumoto M, Okano H, Nakamura M. Phase I/II Study of Intrathecal Administration of Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor in Patients with Acute Spinal Cord Injury: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial of Safety and Efficacy. *J Neurotrauma.* 2020. doi: 10.1089/neu.2019.6854. Online ahead of print.

Nakajima S, Numakawa T, Adachi N, Ooshima Y, Odaka H, Yoshimura A, Kunugi H. Self-amplified BDNF transcription is a regulatory system for synaptic maturation in cultured cortical neurons. *Neurochem Int.* 2015. 91:55-61.

Nakamura M, Okano H. Cell Transplantation Therapies for Spinal Cord Injury Focusing on Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Res.* 2013. 23(1):70-80.

Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes.* 2012. 61(11):2823-32.

Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J.* 2011. 434(2):181-8.

Ni M, Zhou H, Wey S, Baumeister P, Lee AS. Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS One*. 2009. 4(8):e6868.

Niinaka Y, Paku S, Haga A, Watanabe H, Raz A. Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res*. 1998. 58 (12): 2667-74.

Niizeki H, Kobayashi M, Horiuchi I, Akakura N, Chen J, Wang J, Hamada JI, Seth P, Katoh H, Watanabe H, Raz A, Hosokawa M. Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer*. 2002. 86(12):1914-9.

Ohtake Y, Sami A, Jiang X, Horiuchi M, Slattery K, Ma L, Smith GM, Selzer ME, Muramatsu SI, Li S. Promoting Axon Regeneration in Adult CNS by Targeting Liver Kinase B1. *Mol Ther*. 2019. 27(1):102-117.

Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med*. 2006. 12, 829-834.

Ono K, Toyono T, Inenaga K. Nicotinic receptor subtypes in rat subfornical organ neurons and glial cells. *Neuroscience*. 2008. 154 (3): 994-1001.

Osaka M, Honmou O, Murakami T, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis DJ. Intravenous Administration of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow After Contusive Spinal Cord Injury Improves Functional Outcome. *Brain Res*. 2010. 1343:226-35.

Oshigiri T, Sasaki T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Oka S, Morita T, Hirota R, Yoshimoto M, Yamashita T, Hashimoto-Torii K, Honmou O. Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Alters Motor Cortex Gene Expression in a Rat Model of Acute Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2019. 36(3):411-420.

Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005. 50(4):427-34.

Philippova M, Ivanov D, Joshi MB, Kyriakakis E, Rupp K, Afonyushkin T, Bochkov V, Erne P, Resink TJ. Identification of proteins associating with glycosylphosphatidylinositol- anchored T-cadherin on the surface of vascular endothelial cells: role for Grp78/BiP in T-cadherin-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*. 2008. 28(12):4004-17.

Pollard ME, Apple DF. Factors Associated With Improved Neurologic Outcomes in Patients With Incomplete Tetraplegia. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003. 28(1):33-9.

Qiao Y, Dsouza C, Matthews AA, Jin Y, He W, Bao J, Jiang F, Chandna R, Ge R, Fu L. Discovery of small molecules targeting GRP78 for antiangiogenic and anticancer therapy. *Eur J Med Chem.* 2020. 193:112228.

Read DE, Gorman AM. Involvement of Akt in neurite outgrowth. *Cell Mol Life Sci.* 2009. 66(18):2975-84.

Robbins HL, Hague A. The PI3K/Akt Pathway in Tumors of Endocrine Tissues. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016. 6:188.

Romagnoli A, Oliverio S, Evangelisti C, Iannicola C, Ippolito G, Piacentini M. Neuroleukin inhibition sensitises neuronal cells to caspase-dependent apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. 302(3):448-53.

Ruiz-Palmero I, Hernando M, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. G protein-coupled estrogen receptor is required for the neuritogenic mechanism of 17 β -estradiol in developing hippocampal neurons. *Mol Cell Endocrinol.* 2013. 372(1-2):105-15.

Saura J, Tusell JM, Serratos J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia.* 2003. 44(3):183-9.

Shaikh H, Boudes E, Khoja Z, Shevell M, Wintermark P. Angiogenesis dysregulation in term asphyxiated newborns treated with hypothermia. *PLoS One.* 2015. 10(5):e0128028.

Shani G, Fischer WH, Justice NJ, Kelber JA, Vale W, Gray PC. GRP78 and Cripto form a complex at the cell surface and collaborate to inhibit transforming growth factor beta signaling and enhance cell growth. *Mol Cell Biol.* 2008. 28(2) 666-77.

Shankar J, Kojic LD, St-Pierre P, Wang PT, Fu M, Joshi B, Nabi IR. Raft endocytosis of AMF regulates mitochondrial dynamics through Rac1 signaling and the Gp78 ubiquitin ligase. *J Cell Sci.* 2013. 126(Pt 15):3295-304.

Shigyo M, Kuboyama T, Sawai Y, Tada-Umezaki M, Tohda C. Extracellular vimentin interacts with insulin-like growth factor 1 receptor to promote axonal growth. *Sci. Rep.* 2015. 5, 12055.

Shigyo M, Tanabe N, Kuboyama T, Choi SH, Tohda C. New reliable scoring system, Toyama mouse score, to evaluate locomotor function following spinal cord injury in mice. *BMC Res Notes.* 2014. 7:332.

Shigyo M, Tohda C. Extracellular vimentin is a novel axonal growth facilitator for functional recovery in spinal cord-injured mice. *Sci. Rep.* 2016. 6:28293.

Shih CH, Lacagnina M, Leuer-Bisciotti K, Pröschel C. Astroglial-derived periostin promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2014. 34(7):2438-43.

Shimizu K, Tani M, Watanabe H, Nagamachi Y, Niinaka Y, Shiroishi T, Ohwada S, Raz A, Yokota J. The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett*. 1999. 456(2):295-300.

Shinozaki, Y., Shibata, K., Yoshida, K., Shigetomi, E., Gachet, C., Ikenaka, K, Tanaka KF, Koizumi S. Transformation of astrocytes to a neuroprotective phenotype by microglia via P2Y1 receptor downregulation. *Cell Rep*. 2017. 19, 1151–1164.

Silletti S, Watanabe H, Hogan V, Nabi IR, Raz A. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res*. 1991. 51, 3507–3511.

Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci*. 2004. 5, 146–156.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol*. 2010. 119(1):7-35.

Sun YJ, Chou CC, Chen WS, Wu RT, Meng M, Hsiao CD. The crystal structure of a multifunctional protein: phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96(10):5412-7.

Sun FC, Wei S, Li CW, Chang YS, Chao CC, Lai YK. Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J*. 2006. 396(1):31-9.

Tanabe N, Kuboyama T, Kazuma K, Konno K, Tohda C. The Extract of Roots of *Sophora flavescens* Enhances the Recovery of Motor Function by Axonal Growth in Mice with a Spinal Cord Injury. *Front Pharmacol*. 2016. 6:326.

Tanabe N, Kuboyama T, Tohda C. Matrine directly activates extracellular heat shock protein 90, resulting in axonal growth and functional recovery in spinal cord injured-mice. *Front. Pharmacol*. 2018. 9:446.

Tanaka N, Haga A, Naba N, Shiraiwa K, Kusakabe Y, Hashimoto K, Funasaka T, Nagase H, Raz A, Nakamura KT. Crystal structures of mouse autocrine motility factor in complex with carbohydrate phosphate inhibitors provide insight into structure-activity relationship of the inhibitors. *J Mol Biol*. 2006. 356 (2): 312-24.

Tanie Y, Kuboyama T, Tohda C. GRP78-Mediated Signaling Contributes to Axonal Growth Resulting in Motor Function Recovery in Spinal Cord-Injured Mice. *Front Pharmacol*. 2020. 11:789.

Tanie Y, Tanabe N, Kuboyama T, Tohda C. Extracellular Neuroleukin Enhances Neuroleukin Secretion From

Astrocytes and Promotes Axonal Growth in vitro and in vivo. *Front Pharmacol.* 2018. 9:1228.

Tao B, Shi K. Decreased miR-195 Expression Protects Rats from Spinal Cord Injury Primarily by Targeting HIF-1 α . *Ann Clin Lab Sci.* 2016. 46(1):49-53.

Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto Kf, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br. J. Pharmacol.* 2013. 168, 903–919.

Tian K, Zhong W, Zheng X, Zhang J, Liu P, Zhang W, Liu H. Neuroleukin/autocrine motility factor receptor pathway promotes proliferation of articular chondrocytes through activation of AKT and Smad2/3. *Sci. Rep.* 2015. 5:15101.

Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D₃-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep.* 2012. 2:535.

Tsai MC, Shen LF, Kuo HS, Cheng H, Chak KF. Involvement of acidic fibroblast growth factor in spinal cord injury repair processes revealed by a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics.* 2008. 7(9):1668-87.

Tsai MJ, Tsai SK, Huang MC, Liou DY, Huang SL, Hsieh WH, Huang WC, Huang SS, Cheng H. Acidic FGF promotes neurite outgrowth of cortical neurons and improves neuroprotective effect in a cerebral ischemic rat model. *Neuroscience.* 2015. 305:238-47.

Vig S, Buitinga M, Rondas D, Crèvecoeur I, van Zandvoort M, Waelkens E, Eizirik DL, Gysemans C, Baatsen P, Mathieu C, Overbergh L. Cytokine-induced translocation of GRP78 to the plasma membrane triggers a pro-apoptotic feedback loop in pancreatic beta cells. *Cell Death Dis.* 2019. 10(4):309.

Walters BC, Hadley MN, Hurlbert RJ, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, Harrigan MR, Rozelle CJ, Ryken TC, Theodore N; American Association of Neurological Surgeons; Congress of Neurological Surgeons. Guidelines for the Management of Acute Cervical Spine and Spinal Cord Injuries: 2013 Update. *Neurosurgery.* 2013. 60(CN_suppl_1):82-91.

Wang L, Pei S, Han L, Guo B, Li Y, Duan R, Yao Y, Xue B, Chen X, Jia Y. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Reduce A1 Astrocytes via Downregulation of Phosphorylated NF κ B P65 Subunit in Spinal Cord Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018. 50(4):1535-1559.

Watanabe H, Carmi P, Hogan V, Raz T, Silletti S, Nabi IR, Raz A. Purification of human tumor cell autocrine

motility factor and molecular cloning of its receptor. *J. Biol. Chem.* 1991. 266, 13442–13448.

Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T, Raz A. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res.* 1996. 56 (13): 2960-3.

Watari H, Shimada Y, Tohda C. Cytosolic aspartate aminotransferase, a direct binding protein of kamikihito, regulates axon growth. *Traditional & Kampo Medicine.* 2016. 3: 41–49

Widenfalk J, Lundströmer K, Jubran M, Brene S, Olson L. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J. Neurosci.* 2001. 21(10):3457-75.

Xiaowei H, Ninghui Z, Wei X, Yiping T, Linfeng X. The experimental study of hypoxia-inducible factor-1alpha and its target genes in spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2006. 44(1):35-43.

Xin H, Li Y, Shen LH, Liu X, Wang X, Zhang J, Pourabdollah-Nejad D S, Zhang C, Zhang L, Jiang H, Zhang ZG, Chopp M. Increasing tPA activity in astrocytes induced by multipotent mesenchymal stromal cells facilitate neurite outgrowth after stroke in the mouse. *PLoS One.* 2010. 5(2):e9027.

Xiu J, Nordberg A, Zhang JT, Guan ZZ. Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the alpha7, alpha4 and beta2 subunits in response to nanomolar concentrations of the beta-amyloid peptide(1-42). *Neurochem Int.* 2005. 47(4): 281-90.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005. 115(10):2656-64.

Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, Watanabe H, Raz A. Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy. *Endocr Relat Cancer.* 2004. 11(4):749-59.

Yang T, Dai Y, Chen G, Cui S. Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci.* 2020. 14:78.

Yang Z, Kuboyama T, Tohda C. A Systematic Strategy for Discovering a Therapeutic Drug for Alzheimer's Disease and Its Target Molecule. *Front Pharmacol.* 2017. 19; 8:340.

Yang Y, Cheng XR, Zhang GR, Zhou WX, Zhang YX. Autocrine motility factor receptor is involved in the process of learning and memory in the central nervous system. *Behav Brain Res.* 2012. 229(2):412-8.

Yin Y, Chen C, Chen J, Zhan R, Zhang Q, Xu X, Li D, Li M. Cell surface GRP78 facilitates hepatoma cells

proliferation and migration by activating IGF-IR. *Cell Signal*. 2017. 35:154-162.

Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2006. 7(8):617-27.

Yun SP, Kam T, Panicker N, Kim SM, Oh Y, Park J, Kwon S, Park YJ, Karuppagounder SS, Park H, Kim S, Oh N, Kim NA, Lee S, Brahmachari S, Mao X, Lee JH, Kumar M, An D, Kang S, Lee Y, Lee KC, Na DH, Kim D, Lee SH, Roschke VV, Liddelow SA, Mari Z, Barres BA, Dawson VL, Lee S, Dawson TM, Ko HS. Block of A1 Astrocyte Conversion by Microglia Is Neuroprotective in Models of Parkinson's Disease. *Nat Med*. 2018. 24(7):931-938.

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*. 2012. 32(18):6391-410.

Zhang Y, Tseng CC, Tsai YL, Fu X, Schiff R, Lee AS. Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocalization of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. *PLoS One*. 2013. 8(11):e80071.

Zhao Q, Du J, Gu H, Teng X, Zhang Q, Qin H, Liu N. Effects of YC-1 on hypoxia-inducible factor 1-driven transcription activity, cell proliferative vitality, and apoptosis in hypoxic human pancreatic cancer cells. *Pancreas*. 2007. 34(2):242-7.

Zhao T, Qi Y, Li Y, Xu K. PI3 Kinase regulation of neural regeneration and muscle hypertrophy after spinal cord injury. *Mol Biol Rep*. 2012. 39(4):3541-7.

Ziemlińska E, Kügler S, Schachner M, Wewiór I, Czarkowska-Bauch J, Skup M. Overexpression of BDNF increases excitability of the lumbar spinal network and leads to robust early locomotor recovery in completely spinalized rats. *PLoS One*. 2014. 9(2):e88833.

安藤優子、ITB (髄腔内バクロフェン) 療法 - 日本における新しい重度攣縮の治療 -. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)*. 2008. 131, 109-114.

中野葵 Diosgenin の持続的髄腔内投与による慢性期脊髄損傷の運動機能回復 修士論文

医学のあゆみ、271 巻 7 号、2019、医歯薬出版株式会社

謝辞

大変興味深いテーマを与えて頂き、研究の面白さや論理的に考え組み立てる力、リーダーシップを持ち研究を進めることの重要性など、多くのことを日々丁寧に御指導して下さい、自分を成長させることのできる沢山の機会を与えてくださいました富山大学 和漢医薬学総合研究所 神経機能学領域 教授 東田千尋先生に心より深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、実験手技、解析方法、論文の書き方等、幅広くご指導、ご支援して下さい、様々な視点から自分の研究を見つめることの重要性を示して下さいました前・神経機能学領域 助教、現・第一薬科大学 生薬学分野 准教授 久保山友晴先生に深く感謝いたします。

本研究において、様々な視点から有益な御助言を下された、富山大学 和漢医薬学総合研究所 神経機能学領域 助教 楊熙蒙先生に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、実験手技や解析方法等をご指導、ご支援して下さいただけでなく、研究の方向性についても共に思案して下さいました和漢医薬学総合研究所 神経機能学領域 卒業生 執行美智子博士、田辺紀生博士に深く感謝致します。

本研究について、多くの有益な助言、御意見を下さっただけでなく、日々の研究生活においても精神的に支えて下さいました和漢医薬学総合研究所 神経機能学領域 長瀬綸沙氏、近藤麻布氏、須山真聡氏、真継理子氏、野本かおり氏、そして同領域に在籍されていた研究員、技術補佐員、および卒業生の皆様に心より感謝いたします。