

Zhang L, Kaneko S (equal contribution(ZL and SK)/equal first), Kikuchi K, Sano A, Maeda M, Kishino A, Shibata S, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, Kimura T, Okano H, Nakamura M.

Mol Brain. 2014 Mar 10;7:14. doi: 10.1186/1756-6606-7-14.

・ Selection of lower instrumented vertebra in treating Lenke type 2A adolescent idiopathic scoliosis.

Cao K, Watanabe K, Kawakami N, Tsuji T, Hosogane N, Yonezawa I, Machida M, Yagi M, Kaneko S, Toyama Y, Matsumoto M.

Spine (Phila Pa 1976). 2014 Feb 15;39(4):E253-61. doi: 10.1097/BRS.000000000000126.

和文

・ 胸椎への手術アプローチ-前方進入法-

金子慎二郎、塩田匡宣、朝妻孝仁

脊椎脊髄ジャーナル、26巻4号、P. 293-P. 303, 2013

・ 脊椎・脊髄腫瘍と脊髄圧迫 転移性脊椎腫瘍を中心として

金子慎二郎、朝妻孝仁、町田正文、臼井宏

成人病と生活習慣病、43巻4号、P. 500-P. 504, 2013

・ 高齢者胸・腰椎前方手術の侵襲度および周術期合併症の検討

町田正文、斉藤正史、福田健太郎、塩田匡宣、金子慎二郎、河野仁

Journal of Spine Research、4巻7号、P. 1113-P. 1116, 2013

・ バックロフェン髄注(ITB)療法における至適薬液投与量に関する因子の検討

竹光正和、町田真理、長谷川淳、三宅敦、名越慈人、飯塚慎吾、藤吉兼浩、八木満、金子慎二郎、塩田匡宣、町田正文、臼井宏、森俊樹、植村修

日本脊髄障害医学会雑誌、26巻1号、P. 66-P. 67, 2013

2. 学会発表

・ 成人脊柱変形に対する手術前simulationとしての casting testの有効性に関する検討

金子慎二郎、町田正文、塩田匡宣、竹光正和、八木満、藤吉兼浩、飯塚慎吾、名越慈人、三宅敦、長谷川淳、臼井宏

第42回日本脊椎脊髄病学会、2013年4月、沖縄

・ 近傍椎体に既存(陳旧性)骨折を有する骨粗鬆症性椎体圧潰に対する前方固定術

金子慎二郎、塩田匡宣、町田正文、竹光正和、八木満、藤吉兼浩、飯塚慎吾、名越慈人、三宅敦、長谷川淳、臼井宏

第42回日本脊椎脊髄病学会、2013年4月、沖縄

・ 成人脊柱変形に対する手術前simulationとしての casting testの有効性に関する検討

金子慎二郎、斉藤正史、河野仁、朝妻孝仁

第47回日本側弯症学会、2013年10月、高知

・ 非典型的atlanto-occipital subluxation (AOS) の2例-AOSの新規分類法の提唱-

金子慎二郎、河野仁、斉藤正史、朝妻孝仁

日本脊髄障害医学会、2013年11月、福岡

・ 成人脊柱変形に対する矯正固定術前後の全脊柱 alignmentの代償性変化に関する検討-非固定椎に於ける

矢状面alignmentの 変化を中心として-

金子慎二郎、斉藤正史、河野仁、渡邊泰伸、中道清広、谷戸祥之、朝妻孝仁

第4回日本成人脊柱変形学会、2014年3月、東京

・ 成人脊柱変形(後側弯症)に対する矯正固定術前後の全脊柱alignmentの代償性変化に関する検討-非固定椎に於ける矢状面alignmentの変化を中心として-

金子慎二郎、斉藤正史、河野仁、渡邊泰伸、中道清広、谷戸祥之、朝妻孝仁

関東整形災害外科学会、2014年3月、横浜

招待講演

・ 成人脊柱変形に対する手術治療戦略

金子慎二郎

第25回多摩慶應脊椎外科研究会、2014年1月

・ 成人脊柱変形に対する手術治療戦略-OLIFの応用も含めて-

金子慎二郎

第2回多摩骨・関節・脊椎懇話会、2014年3月

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他

痛みと神経リハビリテーション

研究分担者 住谷 昌彦 東京大学医学部附属病院 緩和ケア診療部 准教授

研究要旨

脊髄損傷後には運動麻痺だけでなく神経障害性疼痛を発症し、痛みが患者のQOLを低下させる大きな要因となる。しかし、脊髄損傷後疼痛は薬物療法の抵抗性を示すことが珍しくなく、神経リハビリテーション治療が有用である可能性が示されている。しかし、脊椎脊髄疾患による神経障害性疼痛のうち、どのような患者に対して有効性が期待出来るのかについての調査はまだ十分に行われていない。脊髄脊髄疾患による神経障害性疼痛の分類と評価方法を確立することによって、神経リハビリテーション治療開発の基盤とする。

①高齢化社会により担がん患者人口が増加し、それとともに脊椎にがん転移を来した結果、脊髄損傷後疼痛を含む神経障害性疼痛を発症する患者が増えている。がん脊椎転移は運動障害だけでなく痛みが患者のQOLを大きく損ない、治療対象として重要であるががん転移性脊髄損傷による痛みの分類と治療転帰についての解析は十分に行われていない。がん脊椎転移によって脊髄損傷を発症した患者19名について、痛みの部位、感覚障害、運動障害、治療法とその転帰を調査した。のべ38箇所脊椎転移があり、疼痛部位は局所17脊椎/脊髄損傷レベルより遠位 (below-level pain) 5脊椎/脊髄損傷レベル (at-level pain) 13脊椎/脊髄損傷レベルより近位 (above-level pain) 0脊椎であった。運動障害と感覚障害、疼痛部位の神経解剖学的範囲は一致していなかった。放射線療法が14例のべ18脊椎を対象に行われ、運動障害の改善が3例、感覚障害の改善が4例、痛みの緩和は局所8人/below-level pain 2人/at-level pain 3人であった。がん脊椎転移による急性脊髄損傷患者の主たる疼痛部位は転移脊椎局所であり、神経障害性疼痛の発症は比較的低かった。脊髄損傷後疼痛はat-level painとbelow-level painに分類でき、放射線治療の治療効果が異なることが示唆された。

②脊椎脊髄疾患の中でも癒着性くも膜炎は下肢運動障害とともに神経障害性疼痛を発症する。癒着性くも膜炎に対しては外科的な除圧術などの根治療法の適応がなく薬物療法を中心とした対症療法が行われているが治療抵抗性であり、新規疼痛治療が求められている。35人の腰下肢痛患者を対象にし、腰椎穿刺や腰椎手術の既往の有無によって患者を2群に分けた。腰椎MRIを仰臥位と腹臥位で撮像し、T2強調画像axial像でhigh intensity area (くも膜下腔) の背側半分の面積に対するlow intensity area (馬尾) の面積の比を求めた。解析対象は第2腰椎から第5腰椎/仙椎までの計11レベルとした。第4腰椎上端と正中位および第5腰椎正中位で、腰椎手術の既往群で馬尾の可動性が低下しており癒着性くも膜炎の存在が示唆された。神経障害性疼痛の国際疼痛学会診断アルゴリズムでは、神経系の病変を客観的に示す検査結果が必要であり、姿勢変化による腰椎MRIでの馬尾神経の可動性評価は癒着性くも膜炎による神経障害性疼痛の診断を補助できると考えられる。

A. 研究目的

脊髄損傷では、求心路遮断による神経障害性疼痛が発症し、患者の生活の質(Quality of Life : QOL)が大きく損なわれる。さらに、疼痛だけでなく運

動麻痺と痙性などの不随意運動による運動障害が日常生活動作(Activities of daily living : ADL)を低下させる。このような脊髄損傷を引き起こす原因は、これまでは外傷が大半であったが、人口の高齢化に伴ってがん患者が増加し、さらにはがん脊椎

転移による脊髄損傷が増加してきている。また、このようながん脊椎転移による脊髄損傷の特徴と分類化については十分に検討されていない。

高齢化により腰部脊柱管狭窄症を呈する患者が増えているが、馬尾神経に対する硬膜外からの狭窄症状だけでなく、硬膜内で馬尾神経が障害される癒着性くも膜炎について評価方法が確立されておらず十分な注意が払われていないと考えられる。

しかし、癒着性くも膜炎も脊髄損傷と同様に神経障害性疼痛の発症以外に、瀰漫性の下肢筋力低下を来すためその治療が重要であり、それを検出する評価方法の確立が先だって重要である。がん転移性脊髄損傷と癒着性くも膜炎の評価から、神経リハビリテーション治療の適応を検討するための評価方法と分類化を目的として研究を実施した。

B. 研究方法

①研究対象は2012年4月～2013年3月までの期間に東京大学医学部附属病院脊髄損傷boardで診療した急性期脊髄損傷患者のうち、固形がんの脊椎転移が原因であると診断された19名とした。これら患者について、がん種、罹患脊椎の部位と数、痛み以外の感覚障害の有無と脊髄レベル、運動障害の脊髄レベル、痛みの部位[a. 局所、b. 脊髄損傷レベルより遠位 (below-level pain)、c. 脊髄損傷レベル (at-level pain)、d. 脊髄損傷レベルより近位 (above-level pain)]、痛みの強さ4段階Likert scale (なし、軽症、中等症、重症)、膀胱直腸障害の有無、治療の内容とその転帰について評価した。

②研究対象は東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンターを腰下肢痛を主訴に受診した35名。癒着性くも膜炎の発症リスクとして挙げられる腰椎手術の既往あるいは油性造影剤を用いた脊髄腔造影の既往がある患者17人 (ハイリスク群) とこれらの既往のない18人 (コントロール群) の2群に分けた。コントロール群は全例、腰部脊柱管狭窄症を罹患していた。腰椎MRIを仰臥位と腹臥位で撮像し、T2強調画像axial像でhigh intensity area (くも膜下腔) の背側半分の面積に対するlow intensity area (馬尾) の面積の比を求めた。解析対象は第2腰椎から第5腰椎/仙椎までの計11レベルとした。統計処理は、患者群内での仰臥位-腹

臥位での結果の比較にはWilcoxon signed-rank testを用い、各体位での患者群間の結果の比較にはMann-Whitney testを用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

(倫理面への配慮)

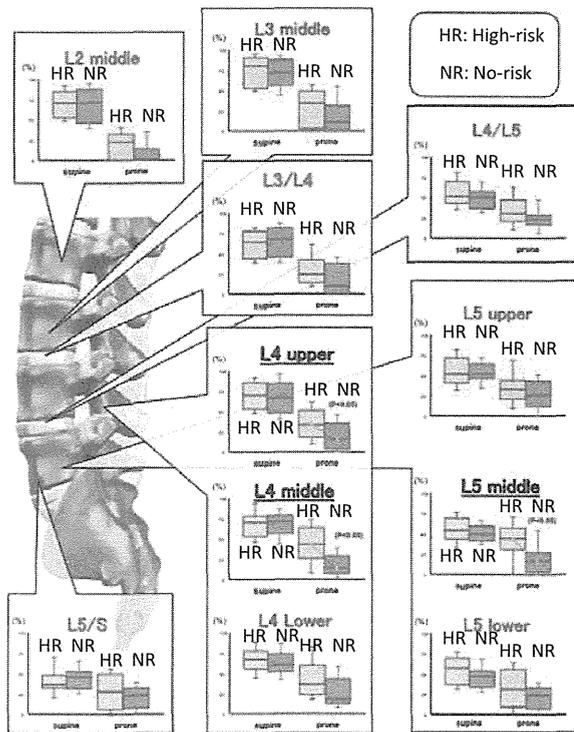
患者から同意を得て調査を実施した。調査内容は東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

①患者19名は、男性11例、女性8例で、年齢は44-81歳 (平均65.1歳) であった。がん種は、肺がん3例、中咽頭がん2例、乳がん2例、腎臓がん2例、前立腺がん2例、肝細胞がん2例、胃がん2例、膵がん1例、膀胱がん1例、食道がん1例、甲状腺がん1例であった。のべ38箇所 of 脊椎転移があり、頸椎8箇所、胸椎19箇所、腰椎9箇所、仙骨1箇所であった (※連続した脊椎は一つと数え、最も多い脊椎の数でカウントした)。痛みの部位は、a) 局所: 17脊椎 (89%)、b) below-level pain: 5脊椎 (26%)、c) at-level pain: 13 (68%)、d) above-level pain: 0 (0%) であった。痛みの強さは、なし2例、軽度6例、中等度6例、重度5例であった。脊髄損傷後疼痛部位別の疼痛強度は、b) below-level painでは、なし1例、軽度4例、中等度0例、重度1例、c) at-level painでは、なし0例、軽度3例、中等度7例、重度4例であった。膀胱直腸障害があった症例は13例であった。運動障害、痛み、痛み以外の感覚障害についての脊髄障害レベルは必ずしも一致しなかった。治療は、放射線照射が14例のべ18箇所の転移脊椎に対して実施されていた。化学療法1例、ホルモン療法2例、手術治療が7例に実施されていた。脊髄損傷に対するステロイドパルス療法は9例で実施され、ビスホスホネート製剤が4例に使用されていた。痛みの部位別の治療効果では、a) 局所の痛みは17例中8例で改善し、b) below-level painは5例中2例で改善、c) at-level painは13例中3例が改善した。手術療法を行った7例では、a) 局所の痛みが3例で改善、b) below-level painが改善した症例はなし、c) at-level painの改善は3例で改善した。疼痛が全く変化しなかった患者が2例いた。

②癒着性くも膜炎のhigh risk群は男:女7:10、control群は5:13 ($p=0.49$)、年齢はhigh risk群

72.4±11.1、control群72.2±9.6(p=0.47)、痛みの強さ (NRS: numerical rating scale) はhigh risk群6.8±1.6、control群7.7±1.6 (p=0.12) であり、患者背景に有意差はなかった。



図：仰臥位/腹臥位におけるくも膜下腔での馬尾神経の可動性 (HR:high risk群 ; NR:control群) 第4腰椎上端と正中位および第5腰椎正中位で、high risk群で馬尾の可動性が低下しており癒着性くも膜炎の存在が示唆された。

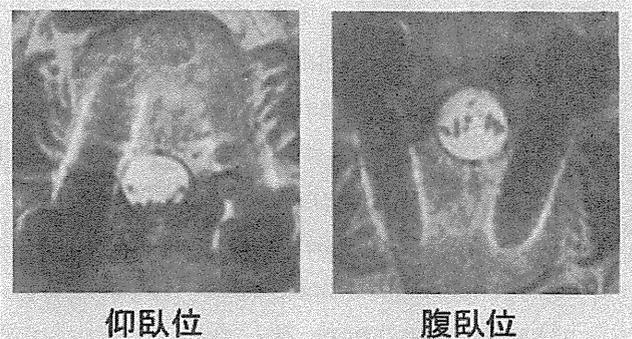
D. 考察

①がん脊椎転移による急性脊髄損傷患者の痛みは、転移脊椎局所の疼痛 (=侵害受容性疼痛) であり、神経障害性疼痛 (at-level pain/below-level pain) の頻度は比較的低い。このことは、神経リハビリテーション治療の対象が比較的少ないことを示す。ただし、薬物療法他の治療によって転移脊椎局所の痛みは改善率が高いが、神経障害性疼痛は治療抵抗性であることが示唆された。さらに、一般に脊髄損傷後の神経障害性疼痛の発症率は60-70%程度と報告されており、亜急性期以降に神経障害性疼痛が発症してくることが想定され、神経障害性疼痛の発症前からの神経リハビリテーション導入による予防効果について検討する必要がある。

ある。運動障害と感覚障害、疼痛部位の脊髄損傷レベルは必ずしも一致しなかったが、運動障害は多くの症例で発現しており神経リハビリテーションの効果が期待される。

②癒着性くも膜炎は過去50年間で1000例程度しか報告されていない(2004年イギリス調査)が、診断基準および画像所見が確立していないために偽陰性になり適切な医療が提供されていない可能性がある。癒着性くも膜炎の臨床的定義は、1)運動により増悪する腰痛、2)両側あるいは片側の下肢痛、3)神経学的異常所見、4)腰椎MRIにおける特徴的な所見(硬膜嚢の中心に存在する神経根の塊、硬膜嚢の周囲に付着した神経根、くも膜下腔内の軟部組織など)が成されてきた。しかし、これら腰椎MRIの特徴的所見として挙げられている変化は感度が低いことが考えられ、新たな診断基準ならびに画像所見の確立が必要である。健常者では体位によって馬尾神経がくも膜下腔内を重力方向に移動する。しかし、癒着性くも膜炎患者ではその可動性が低下していることが報告されている。このことを利用して仰臥位と腹臥位でのくも膜下腔での馬尾神経の可動性を評価した我々の結果は、複数の腰椎レベルで癒着性くも膜炎 high risk患者で馬尾神経の可動性が低下していることを示した。我々のMRI撮像方法は非侵襲的であり勘弁であるため、癒着性くも膜炎の新たな診断方法になり得ると考えられる。今後は、腰椎手術回数や手術脊椎数による比較から、癒着性くも膜炎の診断と重症度について検討する必要がある。

馬尾神経の可動性が低下した所見



図：仰臥位/腹臥位におけるくも膜下腔での馬尾神経の可動性が低下している1例

E. 結論

①がん脊椎転移による急性脊髄損傷患者の運動障害と痛みについて評価した。急性期には神経障害性疼痛の発症頻度は比較的低位が、脊椎転移に対する各種治療法に抵抗性を示して居り、さらに亜急性期以降に発症する可能性も考えられるため、神経リハビリテーション治療による予防が期待される。

②癒着性くも膜炎は診断基準が確立されていないため神経障害性疼痛の発症が偽陰性となり適切な治療法が行われてきた可能性がある。体位変換によるくも膜下腔内での馬尾神経の可動性を評価する方法を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 01) Chikuda H, Ohtsu H, Ogata T, Sugita S, Sumitani M, Koyama Y, Matsumoto M, Toyama Y, the OSCIS investigators. Optimal treatment for spinal cord injury associated with cervical canal stenosis (OSCIS): A study protocol for a randomized controlled trial comparing early versus delayed surgery. *Trials* 2013; 14:245:7
- 02) 住谷昌彦, 緒方徹, 四津有人, 宮内哲. 幻肢痛. *J Clin Rehab* 2013; 22(7): 684-9
- 03) 住谷昌彦, 緒方徹, 四津有人, 大竹祐子, 宮内哲. 幻肢と幻肢痛の機序. *日本義肢装具学会誌* 2013; 29: 206-11

2. 学会発表

- 01) K.Azuma, M.Sumitani, T.Kogure, M.Sumitani, H.Sekiyama, S.Katano, Y.Yamada. MRI examinations in supine and prone positions: A novel diagnostic test of the lumbar adhesive arachnoiditis. 5th Association of South-East Asian Pain Societies Conference – Pain: The Unseen Disease, Singapore, 2013.5

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

神経損傷バイオマーカー開発に関する研究

研究分担者 山内 淳司 国立成育医療研究センター研究所 室長

研究要旨

近年、神経科学領域で注目されている脊髄可塑性の科学的根拠に立脚した神経リハビリテーション（neurorehabilitation）方法の体系化において、適応症例の選別法についての基礎基盤構築を目指す。当該研究においてすでに臨床データが蓄積されつつある軸索損傷マーカーの pNF-H は今後様々な疾患において臨床情報を補完する血液マーカーとして期待されるが、その血中上昇メカニズムは必ずしも明らかではない。

本年度は pNF-H 上昇のメカニズムを解析する為に培養系の神経損傷モデルを作成し、pNF-H の漏出メカニズムについて検討を行った。こうした pNF-H に関する基礎知見が増していくことで、今後、この新規のマーカー値を正しく判断することが可能となり、脊髄損傷のみならず、他の神経疾患においても疾患の診断や重症度評価に寄与することが期待される。

A. 研究目的

当該研究班でもすでに取り上げている軸索伸長バイオマーカー pNF-H は神経損傷に伴って末梢血液・脳脊髄液中に漏出することが報告されており、すでに脊髄損傷臨床例での調査が実施されている。

こうした臨床面での展開とはうらはらに、本来神経細胞（ニューロン）の細胞内で発現している pNF-H がどのような経路とメカニズムで血中あるいは脳脊髄液中に達するかの知見はごく限られている。新規のマーカーを臨床に利用する場合、その値の変動が意味する生命現象を理解することは、値の解釈において重要であることは言うまでもない。特に、血中 pNF-H 値は他の神経損傷マーカー（たとえば S100B）が一過性の上昇を示し、数日内に正常化するのと異なり、数週間から数か月にわたって上昇・高値維持を示すことが特徴として挙げられる。こうした変化が何を示すのか、また治療介入による変化を捉える指標となりうるのかが分かることによって pNF-H はさらに有用性の高いマーカーになることが期待される。

こうした目的のもと、本年度は培養系における神経損傷実験系を立ち上げ、その中で培養液中への pNF-H 漏出を検出することでそのメカニズムを検討した。

B. 研究方法

1) 培養神経細胞損傷モデルの作成

神経細胞として損傷可能な長い軸索を豊富に伸ばす、後根神経節を選択し、ラットの胎生 15 日目よりこれを採取した。後根神経節は採取後そのままの形でコラーゲンコートしたプラスチック・ディスク上に播種され、その後 3 週

間培養し、約 1cm 程度の軸索がディスク上に形成されるまで、NGF 存在下で培養を行った。

2) 神経損傷の作成

神経損傷はメスもちいて軸索を切断する。損傷翌日、メディアムを採取し、中に含まれる pNF-H を ELISA 法によって測定した。神経の切断においては、軸索のみを切断する方法と、ディスクごと切離する方法を実施した。ディスクごと切り離した場合は、切断から遠位側と近位（細胞体）側とを分離して培養する実験も行った。

C. 研究結果

1) 培養実験系の神経損傷モデルにおいても pNF-H は検出された。

培養後根神経節に対し、メスを用いて軸索損傷を加え、24 時間経過を見たところ培養液中で pNF-H を検出することができた。しかし、pNF-H の値については変動が大きく、実験条件を統制することが困難であることが示唆された。

2) 近位側と遠位側との間に一定の傾向は確認できなかった。

次に、ディスク上で後根神経節を培養した後、神経を切離すると同時にディスク自体も切断し、細胞体部分と切断された軸索遠位部が別個に分離することが可能な状態にした。

ディスクの切離後、細胞体部分と軸索遠位部を別個の培養皿に移しさらに 24 時間の培養を行った後にメディアム中の pNF-H を計測した。当初の予想ではいずれかのメディアム中での

pNF-H上昇が予想されたが、結果は安定せず、どちらのメディアウムからもpNF-Hが検出されないことがしばしば見られた。

D. 考察

pNF-Hは生理的には軸索に存在する骨格蛋白であり、損傷によってこれが周辺に漏出するものと考えられる。しかしながら、損傷から数週間たっても上昇が続くメカニズムについては分かっていない。

我々はそのメカニズムを明らかにするために培養系での実験を試みた。使用した後根神経節からは末梢神経が形成されるため、中枢神経系である脊髄との差異については留意する必要があるものの、pNF-Hが軸索に発現している点では共通である。実際に、培養ディスク上で軸索を損傷することによって培養メディアウム中でpNF-Hが検出されるようになったことは、今回の培養実験系がある程度、生体内の神経損傷を模倣していることを裏付けている。

興味深いことに、軸索損傷を一定に与えているにもかかわらず、得られるpNF-Hの値には大きな差が生じた。これは後根神経節に含まれるニューロンの数の差がもたらすものとも考えられるが、中には検出されないサンプルも存在したため、ニューロンの数だけでは説明は困難と思われる。

可能性の一つが切り方のばらつきである。今回はメスを用いた鋭的切離を試みたが、これはあくまでマクロレベルでの評価である。細胞レベルではメス刃は非常に大きく、また鈍的なものであるため、実際に軸索が切られる場面では鈍的な損傷が生じていることが予想され、さらにその度合いは必ずしもコントロールされていなかったことが予想される。

このことは近位側と遠位側とに分離してpNF-Hの漏出源を同定しようとした実験が安定した結果につながらなかったことを説明するとも考えられる。すなわち、今回の結果からは、pNF-Hが高濃度で検出されるためには、細胞体か損傷された軸索の遠位部のいずれが重要か、というよりも損傷のされ方が決定因子となっていることを示唆している。

実際の脊髄損傷を考えると、臨床的に生じる脊髄損傷は鈍的外傷によるものであり、軸索は引きちぎられる、圧挫を受けることによって損

傷を受けていると推察される。こうした損傷は神経軸索の広い範囲を挫滅することになり、今回の実験系のように、損傷個所が限局したモデルとは異なるのかもしれない。

今回の実験系は軸索損傷とそれに伴うpNF-H上昇について一定のモデルを提唱できた反面、脊髄損傷においてpNF-Hが上昇する環境はメスで軸索を切離するモデルでは再現できない部分も存在することを示唆している。今後、異なるモデルの作成によりpNF-Hの上昇メカニズム、さらには血中pNF-H値の解釈についての知見が深まることが期待される。

E. 結論

pNF-Hの上昇メカニズムを検討する上で、後根神経節培養を用いたin vitro損傷モデルは有用であった。今後、鋭的切離モデルの他に、圧座損傷や圧迫モデルといった、より実際の損傷環境に近いin vitroモデルの作成と解析によってpNF-Hの上昇メカニズムが明らかになると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto Y, Torii T, Nakamura K, Takashima S, Sanbe A, Tanoue A, Yamauchi J. Signaling through Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-1 regulates migration in Schwann cells. *Cell. Signal.* 25, 2013, p.1379-1387
2. Torii T, Miyamoto Y, Onami N, Tsumura H, Nemoto N, Kawahara K, Kato M, Kotera J, Nakamura K, Tanoue A, Yamauchi J. In vivo expression of the Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-1 in mice exhibits enhanced myelin thickness in nerves. *J. Mol. Neurosci.* 51, 2013, p.522-531
3. Yamauchi J, Miyamoto Y, Torii T, Takashima S, Kondo K, Kawahara K, Nemoto N, Jonah R. C, Tsujimoto G, Tanoue A. Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for

initiation of myelination and the extent of myelination during development. *Sci. Signal.* 25(243), 2012, ra69

4. Miyamoto Y, Torii T, Yamamori N, Eguchi T, Nagao M, Nakamura K, Tanoue A, Yamauchi J. Paxillin is the target of c-Jun N-terminal kinase in Schwann cells and regulates migration. *Cell. Signal.* 24, 2012, p.2061-2069
5. Torii T, Miyamoto Y, Nakamura K, Maeda M, Tanoue A #, Yamauchi J#. Arf6 guanine-nucleotide exchange factor, cytohesin-2, interacts with actinin-1 and regulates neurite extension. *Cell.*

Signal. 24, 2012, p.1872-1882 #These authors contributed equally to this work

2. 学会発表
特になし
- F. 知的財産権の出願・登録状況
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ogata T	Chapter 26 Applications and limitations of pNF-H, a novel biomarker for spinal cord injury : Strategy for the evaluation of therapeutic outcomes	Uchida K, Makamura M, Ozawa H, Katoh S	Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord	Springer	Japan	2014	323-331

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
河島 則天, 緒方 徹	脊髄損傷後の歩行機能回復に向けた新しいビジョン —神経の再生・修復から機能回復まで—	Spinal Surgery	27(2)	125-129	2013
Obata H, Abe M O, Masani K, <u>Nakazawa K</u>	Modulation between bilateral legs and within unilateral muscle synergists of postural muscle activity changes with development and aging	Experimental Brain Research	232	1-11	2014
Ogawa T, <u>Kawashima N</u> , Ogata T, <u>Nakazawa K</u>	Predictive control of ankle stiffness at heel contact is a key element of locomotor adaptation during split-belt treadmill walking in humans	Journal of Neurophysiology	111(8)	722-732	2014
<u>Chikuda H</u> , Ohtsu H, <u>Ogata T</u> , Sugita S, <u>Sumitani M</u> , Koyama Y, Matsumoto M, Toyama Y, on behalf of the OSCIS investigators	Optimal treatment for Spinal Cord Injury associated with cervical canal Stenosis (OSCIS): a study protocol for a randomized controlled trial comparing early versus delayed surgery	TRIALS	14	1-7	2013
Zhang L, <u>Kaneko S</u> (equal contribution(ZL and SK)/equal first), Kikuchi K, Sano A, Maeda M, Kishino A, Shibata S, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, Kimura T, Okano H, Nakamura M.	Rewiring of regenerated axons by combining treadmill training with semaphorin3A inhibition	Molecular Brain	7(14)	1-17	2014

研究成果の刊行物

Kenzo Uchida • Masaya Nakamura
Hiroshi Ozawa • Shinsuke Katoh
Editors

Yoshiaki Toyama
Honorary Editor

Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord

 Springer

Chapter 26

Applications and Limitations of pNF-H, a Novel Biomarker for Spinal Cord Injury: Strategy for the Evaluation of Therapeutic Outcomes

Toru Ogata, Kentaro Hayakawa, and Hirotaka Chikuda

Abstract The development of proper outcome measurements is as important as developing novel therapies. One of the characteristic issues in spinal cord injury (SCI) is the difficulty in severity evaluation at an early time point. In general, the assessment of tissue damage can be achieved by measurement of tissue-specific proteins released into peripheral blood. Phosphorylated neurofilament NF-H (pNF-H) is a cytoskeletal structural protein in neurons. In addition to its physiological function, pNF-H has been reported as a biomarker for axonal damage because of its stability within blood. In both rodent SCI models and human SCI patients, higher pNF-H values in blood correlate with more severe neural tissue damage. It would be possible to determine the severity of SCI by measuring blood pNF-H at either 24 or 96 h after injury. This better prognostic evaluation may reduce the number of required patients in clinical studies and facilitate the development of novel therapies for SCI.

Keywords Biomarker • ELISA • Prognosis

26.1 Introduction

The development of novel therapies for spinal cord injury (SCI) has been attempted in various ways, including surgical, pharmacological, and cellular approaches. Focusing on acute SCI, it is still controversial whether immediate decompression is

T. Ogata (✉)

Research Institute, National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities,
4-1 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8555, Japan
e-mail: ogata-toru@rehab.go.jp

K. Hayakawa • H. Chikuda

Department of Orthopaedic Surgery, The University of Tokyo,
7-3-1, Hongou, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

K. Uchida et al. (eds.), *Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord*,
DOI 10.1007/978-4-431-54502-6_26, © Springer Japan 2014

323

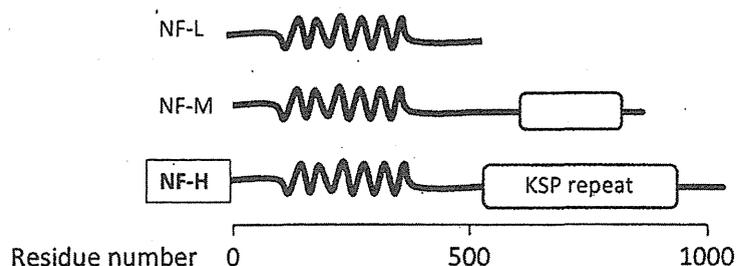


Fig. 26.1 The structure of high molecular weight neurofilament. NF-H is the longest form of neurofilament, having 150 kd as its molecular weight. Near its C-terminus NF-H contains more than 50 repeats of the serine-lysine-proline (KSP) motif, which is phosphorylated by kinases such as CDK5, physiologically

beneficial for SCI without bone lesions [1]. As for pharmacological approach, several drugs are now in clinical trials, such as anti-Nogo drugs [2], minocycline [3], the Rho-inhibitor Cethrin [4], and G-CSF [5], which are intended to either reduce secondary damage or promote neural regeneration and plastic reorganization. Although there are promising preclinical results to support the effectiveness of these therapies, the variability of SCI severity and the difficulty in making an accurate prognostic evaluation make the design of clinical trials impose on including a large number of patients, which is one of the main obstacles in this field.

The proper prognostic evaluation of SCI has been based on clinical findings and radiological results such as magnetic resonance imaging and computed tomography. However, it is sometimes difficult to perform precise neurological evaluation because of damage to other organs and/or the unconsciousness of patients [6]. In addition, spontaneous recovery is frequently observed in acute SCI patients, even in the case of patients manifesting complete paralysis. Therefore, when we observe neurological recovery several months after SCI, we can hardly determine whether the improvement is due to specific therapeutic intervention or the natural course of the patient. Therefore, the development of an objective method to evaluate the severity and prognosis of SCI is necessary.

In other medical fields, blood samples give large amounts of information related to diagnosis and severity. In the field of central nervous system disorders, S100B, a protein expressed in glial cells, and neuron specific enolase (NSE) have been used for the diagnosis of cerebrovascular diseases [7, 8]. These proteins are physiologically expressed within neural cells and thought to be released to peripheral cerebrospinal fluid, and peripheral blood flow, when cells are damaged and the cell membrane is disrupted. Several studies measured these proteins in blood samples from SCI patients, but were of limited usefulness because of their short life in blood and low specificity to the nervous system.

High molecular weight neurofilament (NF-H) is one of the cytoskeletal molecules expressed in neurons (Fig. 26.1). Multiple phosphorylation in its KSP region contributes to the stabilization of the complex with the fiber bundles in axons. In addition to its physiological functions, pNF-H is also known as an accumulating

protein in degenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [9]. In some types of ALS, the dysfunction of transport systems, which send newly synthesized neurofilaments to axons, causes accumulation of pNF-H at the cell bodies. In 2005, Shaw et al. reported that the phosphorylated form of NF-H (pNF-H) showed resistance to degradation by calpains and is stable in blood [10]. They also insisted that this molecule has the potential to be used as a biomarker to evaluate axonal damage in CNS disorders. In fact, they reported that pNF-H is elevated in both blood samples and cerebrospinal fluid samples from ALS patients [11]. In this chapter, we discuss the usefulness and limitations of this novel biomarker, pNF-H, in the clinical field of SCI.

26.2 Measurement of pNF-H in Rodent Models

To evaluate the sensitivity of blood pNF-H level in discriminating the severity of SCI, we used a mouse SCI model, in which we took daily blood samples from the tail vein. The blood pNF-H values were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The severity of SCI was determined by setting damage force in a spinal cord contusion device. The trend of average pNF-H values showed a single peak pattern regardless of the severity. The values marked their peak value at the third day after injury, returning to the pre-injured level (below minimal detection value) after 2–3 weeks. Although the trends are similar, their peak values differ depending on the severity. The mice who received the most severe injury (90 kdyn) had the highest pNF-H value at 3 days after injury, while mice with less severe SCI show lower pNF-H values. Therefore, blood pNF-H seems to correlate with the degree of trauma in the spinal cord (Fig. 26.2).

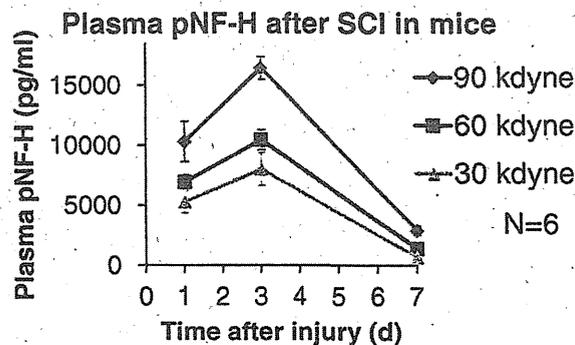


Fig. 26.2 The time course of blood pNF-H levels in rodent SCI model. Mice received various degrees of SCI (impact force: 30, 60, or 90 kdyn). Serial peripheral blood samples were collected to determine pNF-H levels. Regardless of the severity of SCI, the peak pNF-H values were observed at 3 days after injury and higher peak pNF-H values correspond to more severe damage to spinal cord

26.3 Measurement of pNF-H in Humans

To confirm the usability of pNF-H in clinical practice, we collected blood samples from acute SCI patients. In this study, we set inclusion criteria as patients having cervical SCI and not having severe traumatic brain injury. In some cases, blood samples were repeatedly collected until 3 weeks after injury. We recorded clinical symptoms on admission and also at the final examination (average duration of 6 months).

First of all, we confirmed that pNF-H is elevated in SCI patients' blood samples. In most patients who showed complete SCI, pNF-H was initially detected as early as 18 h after injury. Serial samples indicated that the pNF-H level increases gradually for several days after injury (Fig. 26.3). In contrast to the rodent model, in which pNF-H marks its peak value at 3 days after injury, human SCI samples showed sustained elevation of pNF-H even after 3 days. When we plotted the pNF-H values according to the severity of paralysis at end point, we observed higher pNF-H values in complete SCI (AIS A) group compared to incomplete SCI (AIS C and D) group with a statistically significant difference. Thus, the difference was observed at both 24 and 96 h after injury (Fig. 26.4).

In some cases, we continued to measure pNF-H for up to 3 weeks. All four cases (two cases with AIS A and two cases with AIS C) showed sustained elevation of pNF-H even at 3 weeks after injury. At the third week, the difference in pNF-H value between AIS A and C become unclear (data not shown).

26.4 Discussion

We evaluated the usefulness of pNF-H as a biomarker for SCI in both animal models and clinical cases and found that blood pNF-H level in the early phase of SCI is correlated with its overall severity [12, 13].

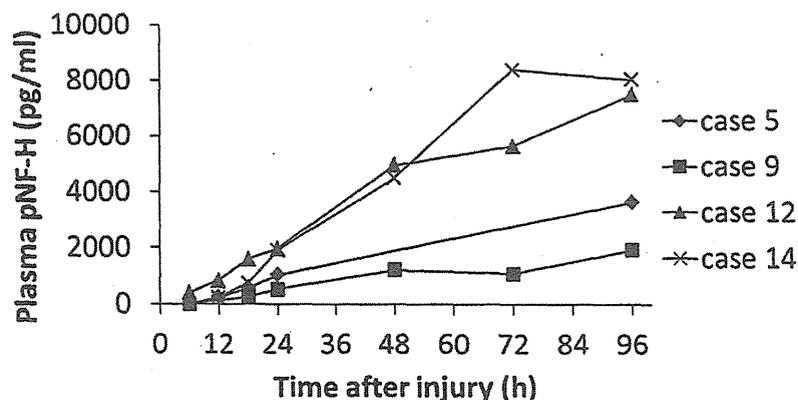


Fig. 26.3 Serial pNF-H measurements in complete SCI patients. The plasma pNF-H levels of four patients who were graded as AIS A at the final follow-up are shown. In those patients, pNF-H was detectable in plasma from 18 h after injury (221–825 pg/ml), and it increased until 96 h after injury (1,919–8,023 pg/ml)

Fig. 26.4 Blood pNF-H level was elevated in accordance with the severity of the injury. There was a marked difference between AIS A patients (complete SCI) and AIS C–E patients (incomplete SCI), with statistical significance at 24 h after injury

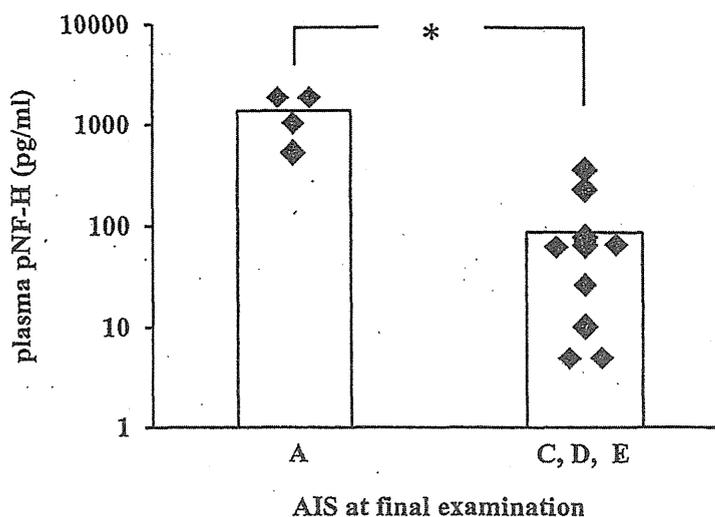


Table 26.1. The list of biomarkers for central nervous system disorders

Name	Cell types	Physiological function	Reference
pNF-H	Neurons (axon)	Cytoskeletal molecule	[13]
Tau	Neurons	Microtubule associated protein	[20]
UCHL1	Neurons (cell body)	Deubiquitinating enzyme	[15]
NSE	Neurons	Glycolytic enzyme	[21]
S100B	Astrocytes	Calcium-binding protein	[8]
GFAP	Astrocytes	Intermediate filament	[22]
MBP	Oligodendrocytes	A structural protein of myelin	[23]

26.4.1 Comparison with Other Biomarkers

The characteristics of pNF-H compared to preexisting biomarkers for CNS disorders are (1) it is measurable in blood samples and (2) it remains elevated for several days or even more. The first point enables easy access to samples compared to cerebrospinal fluid, in which most of the biomarkers, including pNF-H, exist at higher concentration than in peripheral blood [14]. Repeated measurement would be useful to achieve more information about the state of injured spinal cord. As for the second point, pNF-H in complete SCI patients remains elevated for more than 1 month. Other biomarkers, such as S100 and NSE, are elevated within blood but their levels return to baseline rapidly (within 24–48 h) [8]. The short duration of the detection time-window makes it difficult to obtain proper samples to evaluate the severity of patients. The gradual increase of pNF-H (detectable at 18 h after injury) may have some disadvantages. Since most of the therapeutic interventions are intended to start as early as possible, the ideal biomarker should be detectable immediately after injury. It would be beneficial to use pNF-H in combination with other biomarkers which become detectable at an early time point, such as S100B or UCHL1 [15]. Table 26.1 shows a list of possible biomarkers in the CNS.

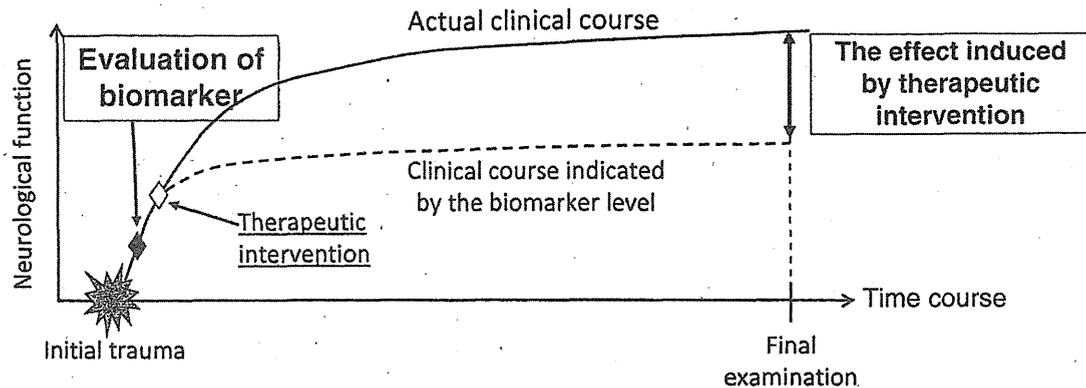


Fig. 26.5 Application of biomarkers for the evaluation of novel therapies for SCI. The evaluation of biomarkers might assist in the precise prediction of prognosis before therapeutic intervention. The effect induced by therapeutic intervention is then estimated by the difference between the actual clinical course and the clinical course indicated by the biomarker level

26.4.2 Possible Applications of pNF-H

One of the possible applications of pNF-H measurement is the prognostic evaluation of acute SCI. A precise prognostic evaluation is helpful to organize rehabilitation programs for each patient. Furthermore, such evaluation may contribute to designing clinical trials of novel therapies for SCI. Several approaches to improve the outcomes of SCI by intervention at an early time point, such as within 1 week after injury, are in the preclinical stage. At the moment, we cannot distinguish patients with “definite complete paralysis,” who will remain completely paralyzed after several months, and those with “temporary complete paralysis,” who manifest complete paralysis on admission and gradually recover to incomplete paralysis over 1–3 months. If we could set up a definite cutoff line of pNF-H values at 24 h after injury to distinguish these two subgroups at recruitment, we can exclude “temporary paralysis” from clinical trials to improve the specificity of the outcome (schematically shown in Fig. 26.5). To set up such a cutoff value, further clinical studies are required to associate early pNF-H levels with neurological findings in the chronic stage [13].

26.4.3 The Limitation of pNF-H as a Biomarker

Despite its high sensitivity in CNS disorders, the specificity of pNF-H is still controversial. So far, elevation of pNF-H is reported in traumatic brain injury, subarachnoid hemorrhage, ALS, and prolonged febrile seizure [16–19]. We also confirmed that pNF-H is expressed in peripheral nerves and detectable in peripheral nerve injury. Considering that brain trauma is a common comorbidity of cervical SCI, we should be careful in the assessment of blood pNF-H values. In addition, it is

possible that patients have elevated pNF-H values prior to their injury, due to other diseases. To exclude such a possibility, it would be recommended to perform sequential measurements of blood pNF-H, in which gradual increases within 7–14 days may represent a newly generated insult to the CNS.

26.4.4 *Issues to Be Solved*

There remain several unresolved aspects regarding basic knowledge about pNF-H levels. For example, in both rodent and human SCI, blood pNF-H gradually increases for several days, but it is not clear whether the increase represents secondary axonal damage and/or axonal degeneration after a primary injury. As we showed, the time course is different between rodent and human SCI. Considering the large molecular size of pNF-H, its sustained elevation in human SCI implicates certain mechanisms to carry the molecule beyond the blood–brain barrier. At present, we are only able to assess blood-pNF-H levels empirically. The understanding of the mechanisms how pNF-H is released to peripheral blood may give us more insight into the state of the injured spinal cord and enable us to use this biomarker for more theoretical considerations.

26.5 Conclusion

At this moment, we should be careful in using pNF-H values for clinical purposes, including clinical trials; it might be useful in confirming complete paralysis, but its potential to estimate prognosis of incomplete SCI remains unknown. However, in spite of several crucial limitations that have yet to be solved, measurement of blood pNF-H is a novel way to look into the pathological processes after trauma in the spinal cord. Therefore, future studies, both clinical and basic, may provide us with new insight into the pathological processes of the injured spinal cord.

Conflict of Interest Toru Ogata, Kentaro Hayakawa, and Hirotaka Chikuda declare that they have no conflict of interest.

References

1. Chikuda H, Ohtsu H, Ogata T, Sugita S, Sumitani M, Koyama Y, Matsumoto M, Toyama Y (2013) Optimal treatment for spinal cord injury associated with cervical canal stenosis (OSCIS): a study protocol for a randomized controlled trial comparing early versus delayed surgery. *Trials* 14:245
2. Zörner B, Schwab ME (2010) Anti-nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Ann N Y Acad Sci* 1198(Suppl 1):E22–E34

3. Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, Hurlbert RJ (2012) Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain J Neurol* 135:1224–1236
4. Mckerracher L, Anderson K (2013) Analysis of recruitment and outcomes in the phase I/IIa cethrin clinical trial for acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 30:1795–804
5. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Yamauchi T, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Ito Y, Takahashi K, Koda M (2012) Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. *Eur Spine J* 21:2580–2587
6. Bach-y-Rita P, Illis LS (1993) Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission. *Paraplegia* 31:82–87
7. Kochanek PM, Berger RP, Bayir H, Wagner AK, Jenkins LW, Clark RS (2008) Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Curr Opin Crit Care* 14:135–141
8. Loy DN, Sroufe AE, Pelt JL, Burke DA, Cao QL, Talbott JF, Whittemore SR (2005) Serum biomarkers for experimental acute spinal cord injury: rapid elevation of neuron-specific enolase and S-100beta. *Neurosurgery* 56:391–397
9. Chou SM, Wang HS, Taniguchi A (1996) Role of SOD-1 and nitric oxide/cyclic GMP cascade on neurofilament aggregation in ALS/MND. *J Neurol Sci* 139(Suppl):16–26
10. Shaw G, Yang C, Ellis R, Anderson K, Parker Mickle J, Scheff S, Pike B, Anderson DK, Howland DR (2005) Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 336:1268–1277
11. Boylan KB, Glass JD, Crook JE, Yang C, Thomas CS, Desaro P, Johnston A, Overstreet K, Kelly C, Polak M, Shaw G (2013) Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:467–472
12. Ueno T, Ohori Y, Ito J, Hoshikawa S, Yamamoto S, Nakamura K, Tanaka S, Akai M, Tobimatsu Y, Ogata T (2011) Hyperphosphorylated neurofilament NF-H as a biomarker of the efficacy of minocycline therapy for spinal cord injury. *Spinal Cord* 49:333–336
13. Hayakawa K, Okazaki R, Ishii K, Ueno T, Izawa N, Tanaka Y, Toyooka S, Matsuoka N, Morioka K, Ohori Y, Nakamura K, Akai M, Tobimatsu Y, Hamabe Y, Ogata T (2012) Phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a biomarker for evaluating the severity of spinal cord injury patients, a pilot study. *Spinal cord* 50:493–496
14. Kwon BK, Stammers AM, Belanger LM, Bernardo A, Chan D, Bishop CM, Slobogean GP, Zhang H, Umedaly H, Giffin M, Street J, Boyd MC, Paquette SJ, Fisher CG, Dvorak MF (2010) Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 27:669–682
15. Blyth BJ, Farahvar A, He H, Nayak A, Yang C, Shaw G, Bazarian JJ (2011) Elevated serum ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 is associated with abnormal blood–brain barrier function after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 28:2453–2462
16. Lewis SB, Wolper RA, Miralia L, Yang C, Shaw G (2008) Detection of phosphorylated NF-H in the cerebrospinal fluid and blood of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1261–1271
17. Boylan K, Yang C, Crook J, Overstreet K, Heckman M, Wang Y, Borchelt D, Shaw G (2009) Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. *J Neurochem* 111:1182–1191
18. Anderson KJ, Scheff SW, Miller KM, Roberts KN, Gilmer LK, Yang C, Shaw G (2008) The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25:1079–1085
19. Matsushige T, Inoue H, Fukunaga S, Hasegawa S, Okuda M, Ichiyama T (2012) Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *Journal of the neurological sciences* 321:39–42

20. Park D, Joo SS, Lee HJ, Choi KC, Kim SU, Kim YB (2012) Microtubule-associated protein 2, an early blood marker of ischemic brain injury. *J Neurosci Res* 90:461–467
21. Costine BA, Quebeda-Clerkin PB, Dodge CP, Harris BT, Hillier SC, Duhaime AC (2012) Neuron-specific enolase, but not S100B or myelin basic protein, increases in peripheral blood corresponding to lesion volume after cortical impact in piglets. *J Neurotrauma* 29:2689–2695
22. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, Edwards M, Rosmalen CF, Vissers JL (2010) GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology* 75:1786–1793
23. Papa L, Ramia MM, Kelly JM, Burks SS, Pawlowicz A, Berger RP (2013) Systematic review of clinical research on biomarkers for pediatric traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 30:324–338