

抗 IL-6 受容体抗体は脊髄損傷マウス
における神経障害性疼痛を軽減する。

氏名 村上 智俊

所属 山口大学大学院医学系研究科

システム統御医学系専攻 整形外科学分野

平成25年 10月

目次

1.	要旨	1
2.	研究の背景	3
3.	目的	5
4.	方法	6
5.	結果	11
6.	考察	14
7.	結論	16
8.	図・図説明文	17
9.	参考文献	23

1 要旨

2 【目的】 マウス脊髄損傷において、抗 IL-6 受容体抗体(MR16-1)にて神経障害性疼痛
3 の抑制効果が得られるか否かを検討した。

4 【方法】 10 週齢の雌 C57BL/6J マウスを用いた。IH-impactor を使用し第 10 胸
5 椎高位で脊髄損傷モデルを作成した。損傷直後から浸透圧ポンプ(Alzet)を用いて
6 MR16-1 を 14 日間持続腹腔内投与したものを MR16-1 群とし、対照群は脊髄損傷の
7 みのコントロール群と椎弓切除のみ行った Sham 群とした。12、24、72 時間後の脊
8 髄組織における IL-6 発現量を ELISA 法で調べた。Basso Mouse Scale(BMS)を用い
9 て、損傷後 3 日から 42 日までの運動機能を評価した。感覚評価は Plantar test と von
10 Frey test を損傷後 3 週と 6 週で行った。損傷後 42 日の組織で Luxol fast blue(LFB)
11 染色を行い、残存した白質面積を計測した。

12 【結果】IL-6 発現量は損傷後 24 時間から 72 時間でコントロール群に比べて MR16-1
13 群の方が有意に低下していた。運動機能は損傷後 14 日以降でコントロール群に比べ
14 て MR16-1 群の方が有意に高かった。感覚評価は損傷後 6 週でコントロール群に比べ
15 て MR16-1 群の方が有意にアロデニア発現を抑制していた。LFB 染色を行った組織
16 はコントロール群に比べて MR16-1 群の方が有意に残存した白質面積が大きかった。

17 【考察】 MR16-1 群でアロデニア発現の抑制を認めたことから、MR16-1 は神経障害
18 性疼痛への治療効果を有すると考えられた。また、MR16-1 治療で神経組織傷害の軽

- 1 減と運動機能改善が得られる可能性がある。これらから抗 IL-6 受容体抗体は脊髄損
- 2 傷後の二次損傷を軽減し、ヒト脊髄損傷治療に有用となる可能性があると考えた。
- 3

1 【研究の背景】

2 脊髄損傷は交通事故、転落事故、スポーツ事故などにより毎年約 5000 人の新たな
3 受傷者が生じている。脊髄損傷患者の約 2/3 以上が日常的に深刻な神経障害性疼痛を
4 経験するといわれている。神経障害性疼痛は一般的な鎮痛剤が無効であり、脊髄損傷
5 患者にとって長期にわたり問題となり、現在有効な治療法は確立されていない。この
6 続発する自己崩壊的な二次損傷を最小限に抑えることが、脊髄損傷研究の大きな柱の
7 1 つとなっている。これまで多くの脊髄損傷モデル実験で、様々な薬剤や抗体を用い、
8 優れた保護効果と機能回復を認めたとの報告がある [1-7]。しかしながら、これらの
9 様々な薬剤や抗体が脊髄損傷後の神経障害疼痛を抑制するといった報告は皆無であ
10 る。IL-6 は脊髄損傷後の急性期炎症サイトカインの中心的な役割を果たし、二次損傷
11 に深くかかわる [8-10]。JAK/STAT 系は細胞膜から細胞核へサイトカインや免疫・炎症
12 反応を強固に結びつける重要な経路の 1 つである [11-12]。このようにして IL-6 から
13 のシグナルは主にそれぞれ JAK/STAT3 経路を介して神経損傷を引き起こす。IL-6 によ
14 るこの経路の早期活性化は主に脊髄損傷部のマイクログリア活性化を引き起こし、神
15 経障害性疼痛に導く一因となると考えられている [13-15]。したがって、IL-6 の発現
16 量を抑制することが脊髄損傷による神経傷害を軽減する有効な治療方法となる可能
17 性がある。本研究はこれを目的として、マウス脊髄圧挫損傷モデルに抗マウス IL-6
18 受容体抗体 (MR16-1) を用い、その効果を判定した。これまでに脊髄損傷後に抗 IL-6

- 1 受容体抗体を投与して、脊髄損傷後のアロデニアなどの神経障害性疼痛の抑制を検討
- 2 した報告はない。今回、我々は MR16-1 がマウス脊髄損傷において神経疼痛性障害を
- 3 抑制効果があることを報告する。
- 4

1 【目的】

2 本研究の目的はマウス脊髄損傷モデルにおいて、MR16-1 が神経組織傷害を軽減し、
3 運動機能を改善するだけでなく、脊髄損傷後のアロデニアなどの神経障害性疼痛発現
4 を抑制するか否かを検討することである。

5

1 【方法】

2 本研究における動物実験の取り扱い、山口大学大学院医学系研究科動物実験委員
3 会の審査および許可を得た上で行った。

4

5 実験動物

6 本研究には成体雌（10 週齢）C57BL/6J マウスを計 60 匹使用した。脊髄損傷を作
7 製し MR16-1 を投与したものを MR16-1 群 (n=25) とし、脊髄損傷のみのコントロール群
8 (n=25) と椎弓切除のみ行い脊髄損傷を作製しない Sham 群 (n=10) を対照群に分けた。

9 これら 3 群を後述する IL-6 発現量、運動機能評価、感覚評価、脊髄白質の評価を行
10 った。

11

12 脊髄損傷モデルの作製

13 麻酔はケタミン (100 mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) を腹腔内に投与し、麻酔下に手
14 術を行った。マウスの胸椎部背側を除毛し、正中に約 1.5 cm の縦切開を加えた。顕
15 微鏡下に第 10 胸椎椎弓を切除し、硬膜を露出した。脊髄損傷モデルの作製には IH-
16 impactor を用いた [16]。この IH-impactor は脊髄損傷モデル作製の標準的な装置で、
17 脊髄損傷に関する実験において世界的に広く使用されているものである。第 8、12 胸
18 椎を把持し胸椎を固定した後、60kdyn の力で impact rod を 3 mm の高さより第 10 胸

1 椎髄節部中央の硬膜上に落下させ、中等度の脊髄損傷を作製した。直ちに閉創し覚醒
2 させた。

3

4 MR16-1 の投与

5 MR16-1 (Chugai, Tokyo, Japan) を腹腔内浸透圧ポンプ (Alzet) に充填し、脊髄損
6 傷直後から 150 μ g/日の量を 14 日間腹腔内に持続投与した。対照群は溶媒のみを投与
7 した。

8

9 脊髄損傷後の動物の管理

10 室温を 25 $^{\circ}$ C に保ち、食物、水を自由に摂取させた。脊髄損傷による神経因性膀胱
11 に伴う腎障害や尿路感染などの予防に、自排尿がみられるまで連日用手排尿を行った。

12

13 ELISA 法

14 損傷後 12 時間, 24 時間および 72 時間のマウスから第 10 胸椎高位の脊髄 (損傷中
15 心部組織 5 mm) を採取し、ELISA 法を用いて IL-6 の発現量を評価した。採取した脊髄
16 を RIPA lysis バッファー (Santa Cruz Biotechnology) でホモジェナイズした。遠心
17 分離 (15000 rpm, 15 分) 後、上清を採取したものを蛋白抽出液とし、ELISA 法に使
18 用した。蛋白抽出液は使用時まで -80° C で保存した。

1 mouse IL-6 ELISA kit (Invitrogen Co.)を用い、ELISA 法で抽出液の IL-6 蛋白濃度
2 (pg/mg)の計測を行った[17]。

3

4 運動機能評価

5 脊髄損傷後、3、7、14、21、28、42 日目にマウスの運動機能を Basso Mouse Scale
6 (BMS) を用いて評価した。BMS score は、後肢各関節の動き、体重支持、ステップ、
7 前後肢の協調性、体幹の安定性、歩行時の尾の位置などを点数化したもので、0 から
8 9 点の採点で、後肢の完全麻痺が 0 点、正常運動が 9 点となる[18]。オープン・フィ
9 ルド (100×75 cm) 上でのマウスの行動を、MR16-1 群と対照群を識別できないブラ
10 インドの状態を観察して評価した。右後肢と左後肢の BMS score に差が生じた場合は、
11 2つの値の平均値を用いた。

12

13 感覚評価

14 感覚評価は脊髄損傷後 3 週と 6 週で行った。すべての感覚テストは各群が識別で
15 きないブラインドの状態を観察して評価した。両後肢を各 3 回ずつテストした。熱刺
16 激により後肢を引っ込めるまでの時間を Ugo Basile Plantar Test (Comerio, Italy)
17 を使って、Hargreaves 法[19]で測定した。ガラス板の上にマウスを乗せ、片方の後肢
18 の下から熱源を放射させて、後肢を引っ込めた時間を自動的に測定した。また、触刺

1 激により後肢を引っ込めるまでの時間を Dynamic Ugo Basile Plantar Aesthesiometer
2 (Comerio, Italy)を使って、von Frey テストに従って測定した。マウスをワイヤーメ
3 ッシュの網の上におき、後肢の足底表面に von Frey モノフィラメントを押し当てて、
4 後肢を引っ込めた力を自動的に測定した。

5

6 脊髄組織標本の作製

7 損傷後 42 日目のマウスを灌流固定した。ケタミン(100 mg/kg)とキシラジン
8 (10mg/kg)の腹腔内投与による麻酔下を開胸し、灌流針を左心に留置し、右心を切開
9 した。その後、生理食塩水 50 ml を灌流し脱血し、続けて低温の 4%パラホルムアル
10 デヒドを 50 ml 灌流して経心的に灌流固定を行った。灌流固定後に胸椎全体を摘出し、
11 慎重に胸椎全体の椎弓を切除し、損傷部を中心に 5 mm 長の脊髄を摘出した。その後、
12 順次脱水、透徹、パラフィン包埋を行った。包埋した脊髄から、250 μ m 間隔、厚さ
13 10 μ m の脊髄横断連続切片を作製した。250 μ m 間隔で作製した脊髄連続切片の中で、
14 後述する luxol fast blue 染色で脊髄白質面積が最も少ない切片を損傷中心と定義し
15 た。

16

17 Luxol fast blue 染色による脊髄白質面積計測

18 Luxol fast blue (LFB) 染色とは、LFB のミエリンとの特異的な親和性を利用して、

1 髓鞘を含む脊髄白質を青色に染色する方法である。この染色法は脊髄損傷の研究にお
2 ける組織の破壊、白質の脱髄の評価に広く使用されている [21-22]。マウスの脊髄損
3 傷における LFB 染色では、損傷後に青色に染まる白質の面積が減少し、塩基性の核を
4 持つ瘢痕組織によって置換される。LFB に染色される白質面積が減少していれば、よ
5 り多くのミエリンが損傷されていることを意味する。本研究では、損傷後 42 日目の
6 脊髄組織標本を用いて、LFB 染色を行い、脊髄白質を評価した。評価には損傷中心部
7 から採取した脊髄組織標本を使用した。LFB 染色後の脊髄組織標本をイメージキャ
8 ナで読み込み、脊髄白質の面積をパーソナルコンピュータ上で計測した。面積の計測
9 には、Image J version 1.42q を用いた。

10

11 統計学的解析

12 結果を平均値と標準誤差で示した。統計学的解析にはコンピュータソフト
13 GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) を用い、 $p < 0.05$
14 を有意と判断した。ELISA、白質面積の比較には、unpaired T-test を用いた。BMS score、
15 Plantar test、von-Frey test の比較には、各時点で Mann-Whitney's U test を用
16 いた。

17

1 【結果】

2 ELISA

3 脊髄損傷後 12 時間の IL-6 発現量は、MR16-1 群が 430.6 ± 66.8 pg/mg、コントロー
4 ル群が 362.1 ± 42.3 pg/mg、Sham 群が 80.0 ± 12.0 pg/mg であった。損傷後 12 時間で
5 は MR16-1 群とコントロール群間で有意差は認めなかった。損傷後 24 時間と 72 時間
6 では脊髄損傷部位の IL-6 発現量は MR16-1 群が有意に低かった (図 1)。

7 脊髄損傷後 24 時間の IL-6 発現量は、MR16-1 群が 258.0 ± 44.7 pg/mg、コントロー
8 ル群が 503.3 ± 24.0 pg/mg、Sham 群が 78.0 ± 12.0 pg/mg であった。脊髄損傷後 72 時
9 間の IL-6 発現量は、MR16-1 群が 111.2 ± 6.9 pg/mg、コントロール群が 166.4 ± 5.0
10 pg/mg、Sham 群が 77.0 ± 11.5 pg/mg であった。脊髄損傷後 72 時間から 2 週間では脊
11 髄損傷部の IL-6 発現量は 3 群間で有意差はなかった。

12

13 運動機能評価

14 BMS score で評価した運動機能では、MR16-1 群の継続的な機能改善を認めた。損傷
15 後 3 日目の BMS score は、MR16-1 群が 0.8 ± 0.18 点、コントロール群が 0.2 ± 0.18
16 点、Sham 群が 9.0 ± 0.00 点であった (図 2)。損傷後 1 週の BMS score は、MR16-1 群
17 が 3.0 ± 0.31 点、コントロール群が 2.2 ± 0.24 点、Sham 群が 9.0 ± 0.00 点であった。
18 損傷後 2 週の BMS score は、MR16-1 群が 4.6 ± 0.22 点、コントロール群が 3.2 ± 0.16

1 点、Sham 群が 9.0 ± 0.00 点であった。損傷後 3 週の BMS score は、MR16-1 群が 4.6
2 ± 0.22 点、コントロール群が 3.2 ± 0.16 点、Sham 群が 9.0 ± 0.00 点であった。損傷
3 後 4 週の BMS score は、MR16-1 群が 5.4 ± 0.22 点、コントロール群が 4.6 ± 0.17 点、
4 Sham 群が 9.0 ± 0.00 点であった。損傷後 6 週の BMS score は、MR16-1 群が 6.8 ± 0.15
5 点、コントロール群が 5.0 ± 0.19 点、Sham 群が 9.0 ± 0.00 点であった。損傷後 2~6
6 週で MR16-1 群はコントロール群と比べ有意な運動機能改善を認めた。

7

8 感覚評価

9 MR16-1 を持続投与したマウスは感覚の改善を認めた (図 3)。MR16-1 群の感覚評価
10 の結果は、損傷後 3 週で von Frey テストが 11.7 ± 0.64 g, Plantar テストが 9.8 ± 0.86
11 秒であり、損傷後 6 週では von Frey テストが 7.0 ± 0.84 g, Plantar テストが 2.9 ± 0.37
12 秒であった。コントロール群の感覚評価の結果は、損傷後 3 週で von Frey テストが
13 11.9 ± 0.69 g, Plantar テストが 9.2 ± 0.82 秒であり、損傷後 6 週では von Frey テス
14 トが 5.3 ± 1.1 g, Plantar テストが 1.7 ± 0.27 秒であった。Sham 群の感覚評価の結果
15 は、損傷後 3 週で von Frey テストが 6.9 ± 0.26 g, Plantar テストが 4.2 ± 0.23 秒で
16 あり、損傷後 6 週では von Frey テストが 6.4 ± 0.24 g, Plantar テストが 4.5 ± 0.21
17 秒であった。

18 脊髄損傷後 3 週では、ほとんどのマウスは感覚が回復し始めた段階であった。この

1 段階ではほとんどのマウスが感覚鈍麻の状態であったため、アロデニア出現の評価は
2 できなかつた。脊髄損傷後 6 週では、コントロール群に比べて MR16-1 群は有意に感
3 覚過敏の出現が抑制されていた。このデータはコントロール群が脊髄損傷後の感覚の
4 自然回復の経緯を示し、Sham 群は脊髄損傷がなく正常な感覚評価を示している。

5

6 脊髄白質の評価

7 LFB 染色では対照群より MR16-1 群の方がより広い範囲で白質が染色された (図 4A,
8 B)。LFB 染色で脊髄損傷中心部組織の横断面の残存白質面積は、MR16-1 群が 482 ± 22
9 μm^2 、コントロール群が $263 \pm 43 \mu\text{m}^2$ であり (図 4B)、MR16-1 群の方が有意に残存し
10 た白質面積が大きかった。

11

1 【考察】

2 脊髄損傷後の慢性疼痛やアロデニアは治療が困難とされている[23]。今回、我々は
3 マウス脊髄損傷モデルに MR16-1 投与し、はじめて痛覚過敏やアロデニアなどの神経
4 障害性疼痛出現を抑制したことを示した。MR16-1 を投与したマウス脊髄損傷モデルは
5 後肢に軽度の痛覚過敏を生じたのみであった。

6 脊髄損傷後1日で損傷部位のマクロファージ, 好中球, マイクログリアが活性化し、
7 IL-6 の発現量は増加するとの報告がある[24-26]。本研究において、脊髄損傷後 24～
8 72 時間で IL-6 発現量は MR16-1 で治療したマウスが有意に低下していた。またこれら
9 の治療したマウスは治療しなかったマウスに比べ脊髄損傷後 14 日から有意に運動機
10 能の改善を認めた。この結果は過去の報告と一致して、MR16-1 がマウス脊髄損傷にお
11 いて神経保護効果をもたらすことを示している[27]。MR16-1 で治療した脊髄損傷マウ
12 スはアストログリオシスによる結合組織産生を抑制するとの報告がある。グリオ
13 シスを抑制することで損傷した脊髄のミエリンを保護するためである[27]。本研究で
14 も脊髄損傷後 42 日の MR16-1 で治療した脊髄損傷部 LFB 染色組織において、ミエリン
15 損傷が保護されていることを明らかにした。

16 IL-6 は脊髄損傷後の急性期炎症サイトカインの中心的な役割を果たし、二次損傷が
17 生じる一因となる。IL-6 は脊髄損傷で見られる主要な炎症細胞であるマクロファージ
18 やマイクログリアの活性化や浸潤を促進することが知られている[9]。ひとたび IL-6

1 が放出されると、細胞膜上の IL-6 受容体に結合し、細胞内の gp130 にシグナル伝達
2 される[28-30]。さらに gp130-JAK/STAT 系を介して、アストロサイトの分化が促進さ
3 れる。これらの細胞がコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) を産生し、グリ
4 ア癬痕を形成する。それゆえに IL-6 の強発現は炎症や組織損傷を悪化させる[27]。
5 他方では、近年 IL-6 ノックアウトマウスを用いた実験で、IL-6 の発現を過度に抑制
6 すると軸索再生傷害やグリオシス産生により、機能回復に支障をきたすとの報告も
7 ある[9]。これらの脊髄損傷後の IL-6 の発現を抑制することで炎症による損傷を軽減
8 するという発見や仮説に基づき、脊髄損傷後に MR16-1 投与し炎症を抑え、アストロ
9 グリオシス減少や組織損傷軽減により機能改善に導くといった研究が行われてき
10 た。

11 全体としてこれらの結果から、脊髄損傷後、適度に IL-6 発現を持続的に抑えるこ
12 とで炎症活性化による損傷を軽減し、機能や感覚の回復を促進していると言える。

13 本薬剤はすでに IL-6 受容体に対するヒト型化モノクローナル抗体 (MRA ; トシリズ
14 マブ) として関節リウマチの治療に使われている。この薬剤がヒト脊髄損傷治療に有
15 用となる可能性があると考えた。

1 【結論】

2 今回我々はマウス脊髄損傷モデルに MR16-1 を持続投与し、その効果を検討した。

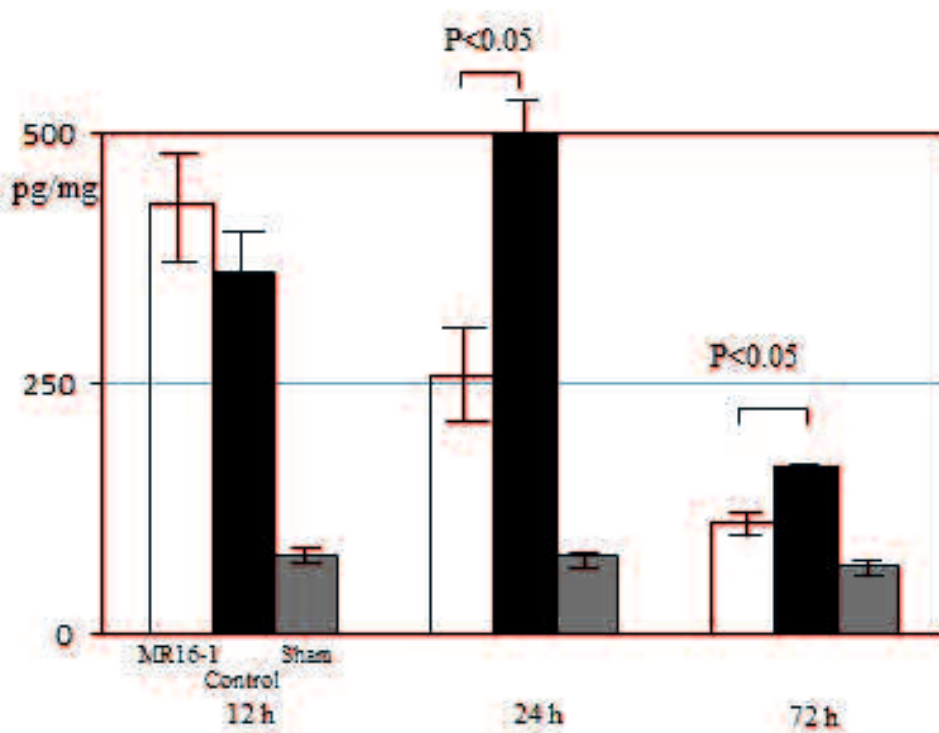
3 MR16-1 を投与することで脊髄損傷後の運動・感覚機能改善だけでなく、痛覚過敏やア

4 ロデニアの神経障害性疼痛発現を有意に抑制することが示された。

5

1 図

2 図 1. ELISA



3

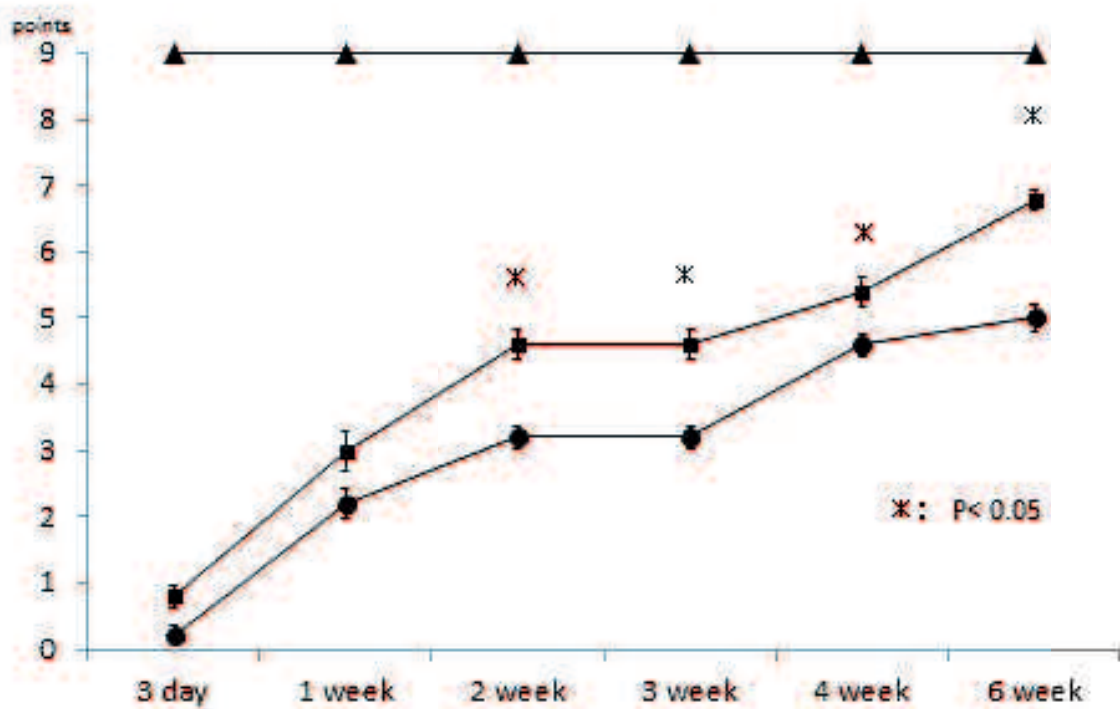
4 脊髄損傷後、各群急性期の損傷部脊髄 IL-6 発現量

5 脊髄損傷後 12 時間では MR16-1 群とコントロール群間で有意差は認めなかった。

6 脊髄損傷後 24 時間と 72 時間はコントロール群に比べ MR16-1 群が有意に低かった。

7

1 図 2. Basso Mouse Scale (BMS)



2

3 —■— : MR16-1 群

4 —●— : コントロール群

5 —▲— : Sham 群

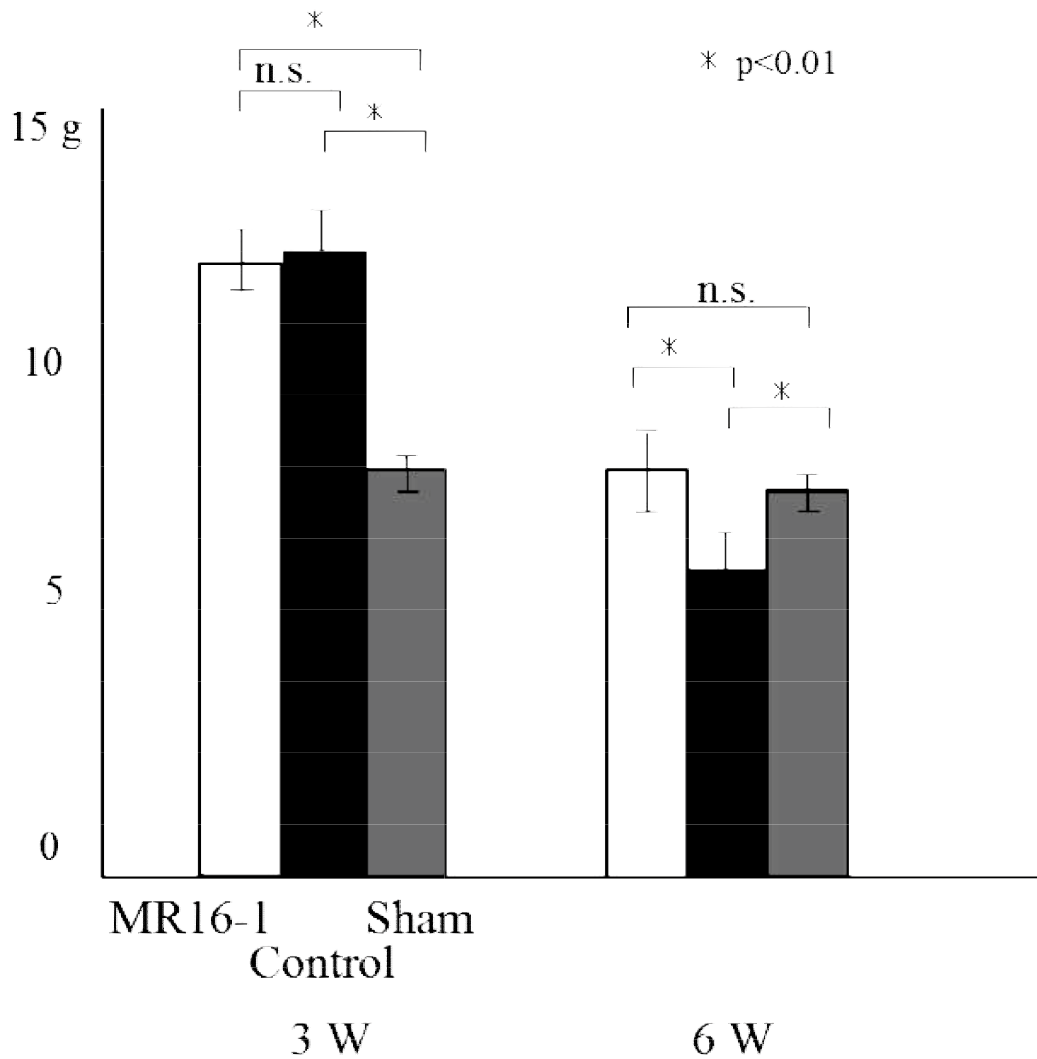
6 * : MR16-1 群とコントロール群間の有意差 (+) (p < 0.05)

7 脊髄損傷後 2~6 週で MR16-1 群はコントロール群に比べ有意な運動機能回復を認めた。

8

1 図3. 感覚評価

A. Von Frey threshold test



2

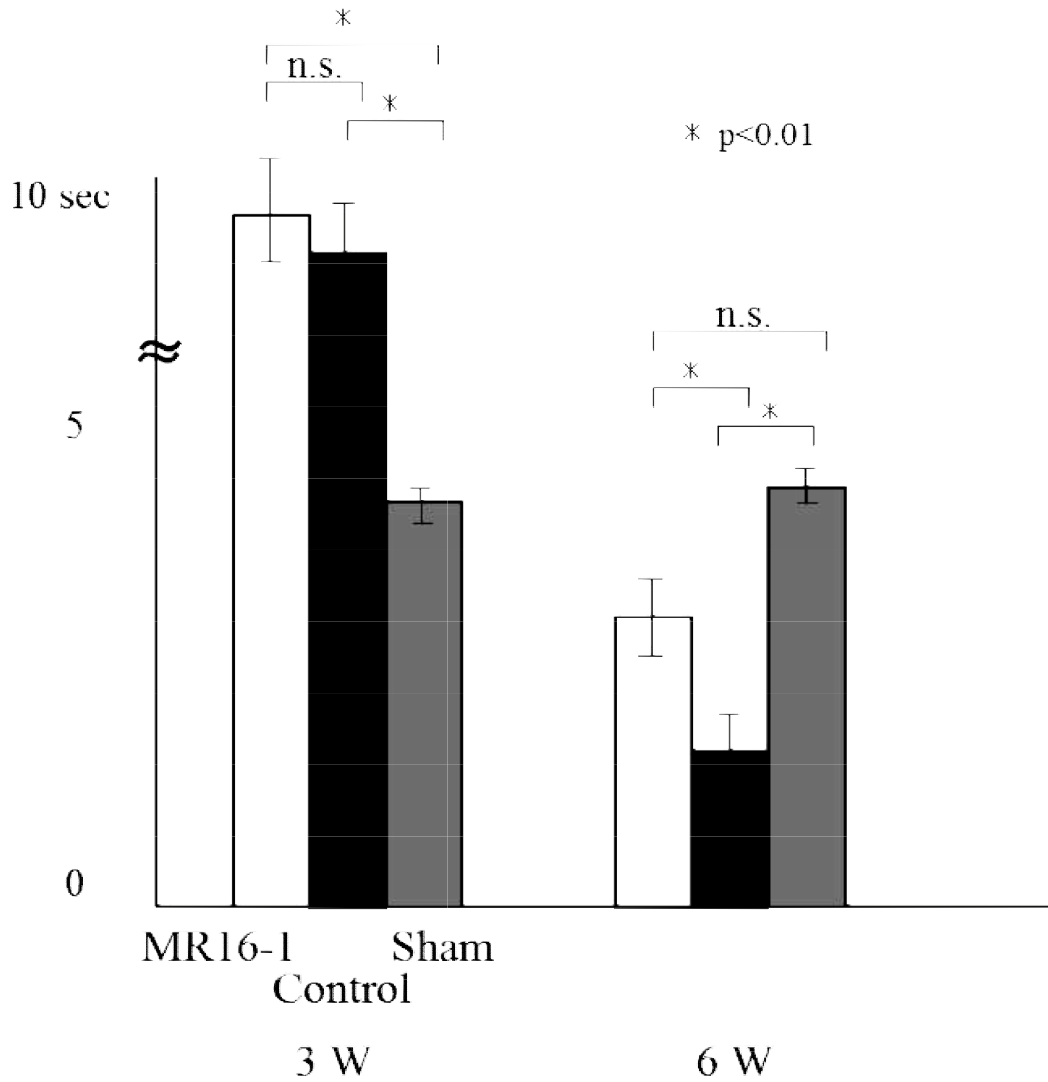
3 コントロール群：脊髄損傷後の感覚の自然回復の経緯を表す。

4 Sham 群：脊髄損傷がなく正常な感覚評価を表す。

5

1

B. Plantar thermal test



2

3 脊髄損傷後 3 週では MR16-1 群・コントロール群ともに感覚鈍麻の状態

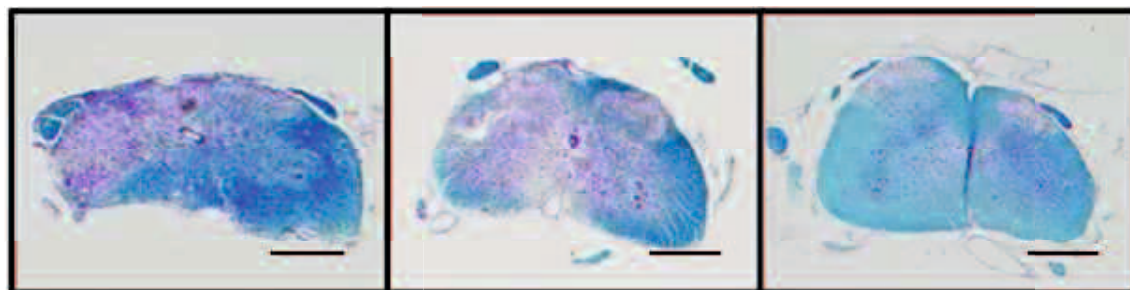
4 脊髄損傷後 6 週ではコントロール群に比べて MR16-1 群は有意に感覚過敏出現の抑制

5 を認めた。

6

1 図4. Luxol fast blue (LFB) 染色

A



MR16-1

Control

Sham

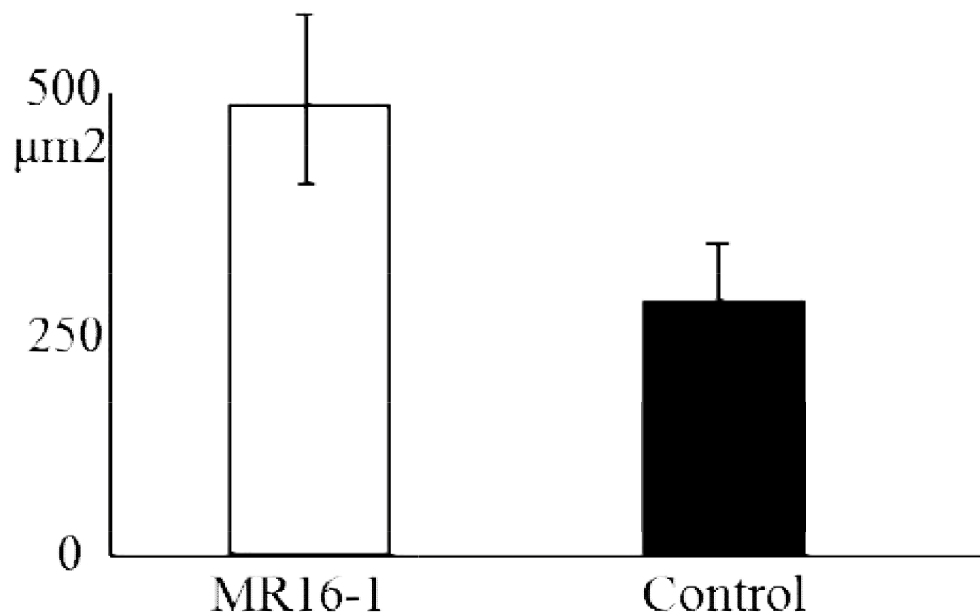
2

3 Scale bar = 50 μ m

4 損傷中心部脊髄組織の LFB 染色像

5 MR16-1 群はコントロール群に比べ LFB 陽性領域を広範囲に認める。

B. LFB positive area (6 weeks after injury).



1

2 MR16-1 群とコントロール群の脊髓損傷中心部組織の残存白質面積

3 MR16-1 群はコントロール群に比べ残存白質面積が有意に大きい。

4

1 参考文献

- 2 [1] Donnelly DJ, Popovich PG, Inflammation and its role in neuroprotection,
3 axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury, *Exp Neurol.*
4 209 (2008) 378-388.
- 5 [2] Jones TB, McDaniel EE, Popovich PG, Inflammatory-mediated injury and repair
6 in the traumatically injured spinal cord, *Curr Pharm Des.* 11 (2005) 1223-1236.
- 7 [3] Popovich PG, Jones TB, Manipulating neuroinflammatory reactions in the
8 injured spinal cord: back to basics, *Trends Pharmacol Sci.* 24 (2003) 13-17.
- 9 [4] Schwab JM, Brichtel K, Mueller CA, Failli V, Kaps HP, et al, Experimental
10 strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective,
11 *Prog Neurobiol.* 78 (2006) 91-116.
- 12 [5] Thuret S, Moon LD, Gage FH, Therapeutic interventions after spinal cord
13 injury, *Nat Rev Neurosci.* 7 (2006) 628-643.
- 14 [6] Lee HL, Lee KM, Son SJ, Hwang SH, Cho HJ, Temporal expression of cytokines
15 and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model, *Neuroreport.* 15 (2004)
16 2807-2811.
- 17 [7] Siddall P, Xu CL, Cousins M, Allodynia following traumatic spinal cord injury
18 in the rat, *Neuroreport,* 6 (1995) 1241-1244.
- 19 [8] Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, et al, Blockade of
20 interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates
21 functional recovery in experimental spinal cord injury, *J Neurosci Res.* 76 (2004)
22 265-276.
- 23 [9] Mukaino M, Nakamura M, Yamada O, Okada S, Morikawa S, et al,
24 Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing
25 microglia-dominant inflammation, *Exp Neurol.* 224 (2010) 403-414.
- 26 [10] Lacroix S, Chang L, Rose-John S, Tuszynski MH, Delivery of
27 hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and
28 macrophage infiltration and inhibits axonal growth, *J Comp Neurol.* 454 (2002)
29 213-228.
- 30 [11] Hirano T, Nakajima K, Hibi M, Signaling mechanisms through gp130: a model
31 of the cytokine system, *Cytokine Growth Factor Rev.* 8 (1997) 241-252.
- 32 [12] Cattaneo E, Conti L, De-Fraja C, Signalling through the JAK-STAT pathway
33 in the developing brain, *Trends Neurosci.* 22 (1999) 365-369.
- 34 [13] Dominguez E, Rivat C, Pommier B, Mauborgne A, et al, JAK/STAT3 pathway is
35 activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes

1 to neuropathic pain development in rat, *J Neurochem.* 107 (2008) 50-60.

2 [14] Yamauchi K, Osuka K, Takayasu M, Usuda N, Nakazawa A, et al, Activation
3 of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice, *J*
4 *Neurochem.* 96 (2006); 1060-1070.

5 [15] Dominguez E, Mauborgne A, Mallet J, Desclaux M, Pohl M, SOCS3-mediated
6 blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal
7 cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury,
8 *J Neurosci.* 30 (2010) 5754-5766.

9 [16] Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, Main JA, Lump JJ Jr, Experimental
10 modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury
11 device, *J Neurotrauma.* 20 (2003) 179-193.

12 [17] Nakajima Y, Osuka K, Seki Y, Gupta RC, Hara M, et al, Taurine reduces
13 inflammatory responses after spinal cord injury, *J Neurotrauma.* 27 (2010)
14 403-410.

15 [18] Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, et al, Basso Mouse
16 Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury
17 in five common mouse strains, *J Neurotrauma.* 23 (2006) 635-659.

18 [19] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J, A new and sensitive
19 method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia, *Pain.* 32
20 (1988) 77-88.

21 [20] Kim HY, Wang J, Lu Y, Chung JM, Chung K, Superoxide signaling in pain is
22 independent of nitric oxide signaling, *Neuroreport.* 20 (2009) 1424-1428.

23 [21] Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, et al, Tumor necrosis
24 factor- α antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat
25 spinal cord injury, *Spine (Phila Pa 1976).* 36 (2011) 1350-1358.

26 [22] Cho N, Nguyen DH, Satkunendrarajah K, Branch DR, Fehlings MG, Evaluating
27 the role of IL-11, a novel cytokine in the IL-6 family, in a mouse model of spinal
28 cord injury, *J Neuroinflammation.* 9 (2012) 134.

29 [23] Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, et al, Early exercise in
30 spinal cord injured rats induces allodynia through TrkB signaling. *Biochem*
31 *Biophys Res Commun,* 381 (2009) 339-344.

32 [24] Klusman I, Schwab ME, Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental
33 spinal cord injury, *Brain Res.* 762 (1997) 173-184.

34 [25] Perigolo-Vicente R, Ritt K, Pereira MR, Torres PM, Paes-de-Carvalho R, et
35 al, IL-6 treatment increases the survival of retinal ganglion cells in vitro:
36 The role of adenosine A1 receptor, *Biochem Biophys Res Commun.* 12 (2012)

1 2332-2337.

2 [26] Lee HK, Wang L, Shin YK, Lee KY, Suh DJ, et al, Interleukin-6 induces
3 proinflammatory signaling in Schwann cells: A high-throughput analysis, *Biochem*
4 *Biophys Res Commun.* 382 (2009) 410-414.

5 [27] Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, et al, Blockade
6 of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an
7 alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice,
8 *J Neuroinflammation.* 9 (2012) 40.

9 [28] Inomata Y, Hirata A, Yonemura N, Koga T, Kido N, et al, Neuroprotective
10 effects of interleukin-6 on NMDA-induced rat retinal damage, *Biochem Biophys*
11 *Res Commun.* 302 (2003) 226-232.

12 [29] Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M, Characterization
13 of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody, *Immunol Lett.* 84 (2002) 231-240.

14 [30] Wagley Y, Yoo YC, Seo HG, Rhee MH, Kim TH, et al, The IL-6/sIL-6R treatment
15 of a malignant melanoma cell line enhances susceptibility to TNF- α -induced
16 apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun.* 354 (2007) 985-991.