

平成21年5月1日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19890123

研究課題名(和文) 神経再生時に炎症性サイトカインが及ぼす影響と
そのメカニズムの解明研究課題名(英文) The research about the influence affected by the
inflammatory cytokines during nervous system regeneration

研究代表者

田中 啓之(TANAKA HIROYUKI)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00432542

研究成果の概要：

末梢神経損傷時には、その損傷部位において炎症が惹起され、再生現象が阻害されるとされてきた。本研究では、炎症を惹起させる炎症性サイトカインのうちの一つである IL-1 β が、神経損傷後初期の段階で損傷部位を中心として発現が上昇するが、それは神経組織自体に負の作用をもたらすのではなく、逆に神経軸索伸展という正の作用をもたらすということが、解明された。これにより炎症性サイトカインは時間的、空間的に適切に制御され、神経再生という現象が生じていることが解明された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：末梢神経再生

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：再生医学、神経科学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

末梢神経系においては中枢神経系とは異なり、比較的容易に神経再生が生じ、外傷性の末梢神経切断では早期に神経縫合を行うことにより比較的良好な機能回復が得られるとされてきた。これは軸索周囲のいわゆるグリア細胞が中枢神経系ではオリゴデンドロサイトであるのに対して、末梢神経系ではシュワン細胞であることに大きく起因していると考えられている。しかしながら、末梢

神経系においても通常は受傷前の正常なレベルにまで回復することは困難であり、まして広範囲にわたる損傷や受傷後長期を経過した例では満足な機能回復が得られることは極めて困難である。このように神経系組織を完全に再生させることは容易ではなく、様々な観点からのアプローチが必要であると考えられる。

神経系組織の再生を阻害する物質のうちの一つとして TNF α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 など

の炎症性サイトカインの存在が挙げられるが、これらは神経損傷後に発現が上昇し、神経系に悪影響を与えるとされてきた。しかしながら近年になり、神経損傷後の再生に炎症性サイトカインが必要であるという報告も散見されるようになってきている。具体的には、TNF α については軸索伸展に対して抑制的に働く Rho を活性化させるという報告 (Neumann et al., *J Neurosci.* 22(3):854-862,2002) があり、TNF α により軸索伸展が抑制されるということがすでに解明されている。一方 IL-6 については、IL-6 中和抗体の投与により脊髄損傷後の機能が回復したという報告 (Okano et al., *Kidney Int.* 68(5):1927-1931,2005) と、IL-6 ノックアウトマウスでは軸索再生が生じないという報告 (Cafferty et al., *J Neurosci.* 24(18):4432-4443,2004) があり、統一した見解が得られていない。実験の設定条件などに差が認められるものの、相反する結果が報告されていることから、まず *in vitro* において IL-6 が神経細胞に与える影響について、その分子メカニズムを含めて詳細に解明されなければならないと考える。また IL-1 β に関しては、他の細胞との共培養では軸索を伸展させる (Kannan et al., *J Immunol.* 157(1):313-320,1996, Edoff et al., *J Neurosci Res.* 67(2):255-263,2002) が、単独培養では軸索を伸展させる効果は認められない (Horie et al., *Neuroreport* 8(8):1955-1959,1997) と報告されている。

しかしながら、予備実験において、確かに後根神経節細胞の単独培養では IL-1 β 添加による効果は認められなかったが、Myelin Associated Glycoprotein (MAG) や Nogo などの軸索伸展阻害物質の存在下では、十分に軸索を伸展させる作用を有することが証明されている。現在までに報告されている方法では、他の細胞との共培養を行っているということ、単独培養であっても軸索を伸展させやすい条件で培養しているということにより、十分に IL-1 β が神経細胞に及ぼす影響が表面化せず、このような実験結果の違いが生じたものと考えられる。生体内においては発現量の多少はあるものの中枢神経系、末梢神経系の両者において MAG などの軸索伸展阻害物質が存在することが知られているため、予備実験で行った条件は *in vitro* ではあるものの、より *in vivo* に近い条件になっていると考えられ、このことから新しい視点による研究であると言えよう。さらにはこの研究を応用させることにより、神経損傷後のさらなる機能回復に寄与したいと考えている。

2. 研究の目的

中枢神経系、末梢神経系のいずれにおいて

も完全に組織再生させることは、現時点では困難であることから、損傷後により高度な機能回復を獲得するためには、損傷後に生体内で生じる反応を詳細に解明し、プラスに働く現象を促進させ、マイナスに働く現象を抑制することが重要であると言える。そこで中枢神経系および末梢神経系損傷後に惹起される炎症反応に関わるサイトカインに着目し、本研究を進捗させる予定である。まず炎症性サイトカインが神経再生時にどのような発現パターンを示すのか、そして神経細胞にどのような影響を及ぼすのかを *in vitro* にて解明し、次に *in vivo* にてそれらを投与あるいはブロックすることにより損傷後の神経再生にどのような影響を及ぼすのかを解明することにより、神経損傷に対する有効な治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炎症性サイトカインが *in vitro* にて神経細胞に及ぼす影響とそのメカニズムの解明

- ① ラットより中枢神経細胞として小脳顆粒細胞を、末梢神経細胞として後根神経節細胞を採取し、初代培養を行う。
- ② 培養液中に TNF α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 を添加することにより、それぞれの細胞の軸索伸展、生存率に影響が認められるかどうかを観察する。さらに MAG などの軸索伸展阻害物質存在下でも同様の実験を行い、軸索伸展に対する影響について観察を行う。
- ③ これらの細胞に影響を与えるサイトカインについては、その下流のシグナルについて解析を行う。特に、神経細胞の軸索伸展に影響を及ぼすシグナルである低分子量 G 蛋白質 Rho の活性化について詳細に検討を行う。その他にも MAPK のリン酸化などの解析も行う。
- ④ 関係するシグナルに関しては、そのインヒビターを培養系に添加することにより、細胞に影響を与えるかどうかの検討を行う。

(2) 炎症性サイトカインが *in vivo* にて神経組織に及ぼす影響とそのメカニズムの解明

- ① *in vitro* にて軸索伸展に影響を及ぼしたサイトカインについて、末梢神経損傷モデルを作製し、局所投与を行う。末梢神経損傷モデルとしてはラット坐骨神経を切断したモデルを作製する。切断した部位を再度縫合し、サイトカインを注入した群と、注入しないコントロール群とを作製する。
- ② 両モデルにおいて術後 2 週、3 週、4 週、6 週、8 週と経時的に機能回復の程度を調べる。具体的には神経細胞用のトレーサー (フルオロゴールドなど) を用いて、

組織学的に再生軸索の数、および損傷部からの軸索再生距離についての検討を行う。ルクソールファストブルー染色にて再生軸索の再髄鞘化についても検討を行う。電気生理学的には下腿（足関節背屈筋である前脛骨筋と足関節底屈筋である腓腹筋）の筋電図を測定することにより、機能回復の程度、および屈筋、伸筋の協調運動の有無について検討を行う。神経伝導速度についても測定を行う。またビデオレコーダーを用いた膝関節や足関節の可動域の測定やフットプリントの詳細な調査による行動解析も行う。

4. 研究成果

(1) まずラットより中枢神経細胞として小脳顆粒細胞を、末梢神経細胞として後根神経節細胞を採取し初代培養を行った。培養液中に IL-1 β を単独で添加したところ、それぞれの神経細胞において軸索伸展などの影響は認められなかった。ところが軸索伸展阻害物質である MAG を IL-1 β と同時に添加したところ、

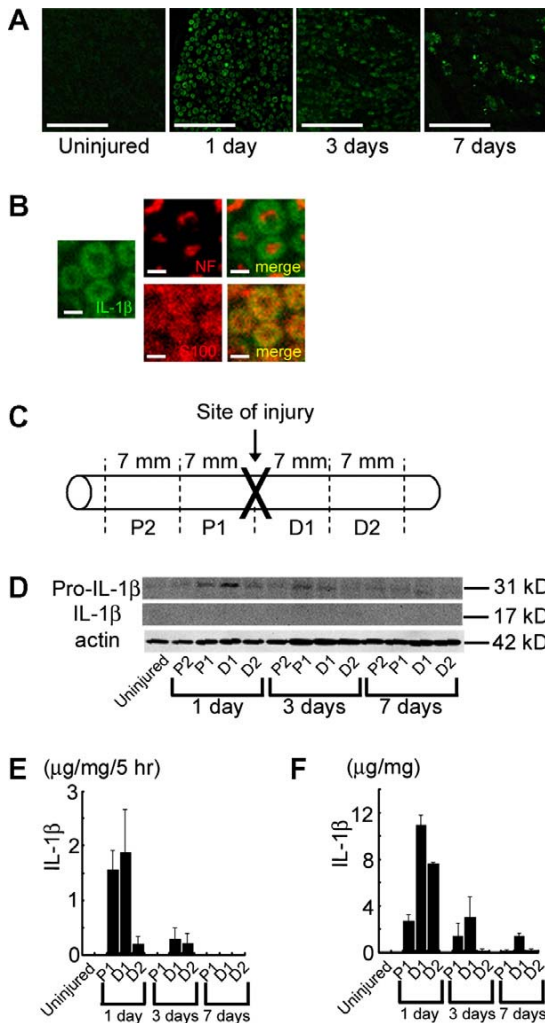


図 1

MAG の存在下においても、IL-1 β はその影響を打ち消すことがわかった。このことから IL-1 β は MAG などの軸索伸展阻害物質の影響をブロックし、軸索を伸展させることが解明された。MAG は低分子量 G 蛋白質の一つである Rho を活性化するが、IL-1 β は p38 MAPK を介して Rho をブロックするということがわかった。

(2) ラットの坐骨神経損傷モデルを作製し、IL-1 β の発現を確認したところ、損傷部周囲に IL-1 β の発現が上昇することもわかった。損傷後 24 時間をピークとして、7 日後まで上昇していることが免疫染色およびウエスタンブロッティングで確認できた。このことから坐骨神経損傷後には、損傷部周囲に一過性に IL-1 β の発現が上昇することがわかった

(図 1)。そこで、IL-1 β が坐骨神経損傷後の軸索伸展に寄与しているという仮説を立て、実験を進めた。ラット坐骨神経損傷モデルを作成し、持続浸透圧ポンプを用いて 2 週間におわり IL-1 β の持続投与を行い、手術後 12 週間の経過観察を行った。感覚神経の機能回復について、IL-1 β を投与した群においては、コントロール群と比べて優位に早期に回復が認められた。また組織学的検査において、軸索の数および面積について、IL-1 β 投与群において、コントロール群と比べて優位な増大を認めた (図 2)。

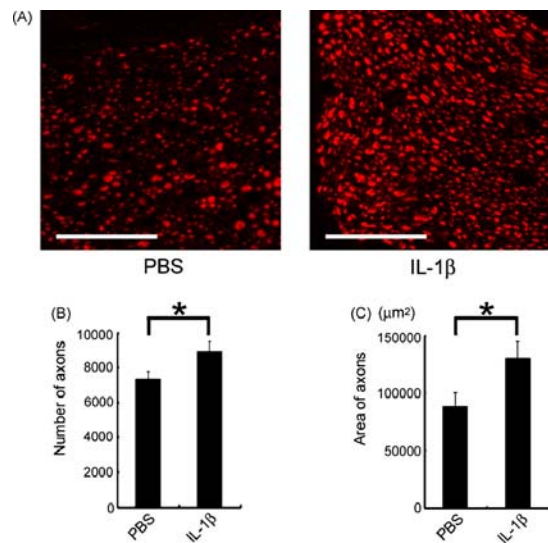


図 2

また、再生した軸索が正常に機能するためには再髄鞘化が必要であるため、再髄鞘化された面積について調べたところ、統計学的に優位な差は認められなかったものの、IL-1 β 投与群において、再髄鞘化が促進される傾向が認められた (図 3)。以上のことから、IL-1 β は末梢神経損傷後に、早期に損傷部周囲に発現が上昇することにより、軸索伸展阻害物質の影響をブロックし、神経損傷後の軸索伸展および再髄鞘化に寄与することが本研究に

より解明された。

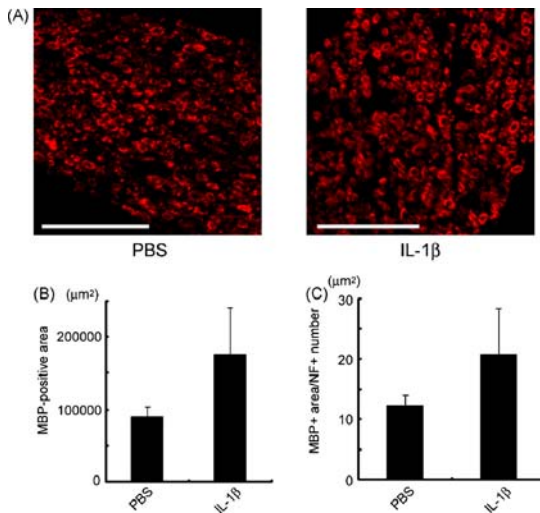


図 3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Ko Temporin, Hiroyuki Tanaka, Yusuke Kuroda, Kiyoshi Okada, Koji Yachi, Hisao Moritomo, Tsuyoshi Murase, Hideki Yoshikawa. IL-1b promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. *Neuroscience Letters*. 査読有 440(2): 130-133, 2008.
2. Ko Temporin, Hiroyuki Tanaka, Yusuke Kuroda, Kiyoshi Okada, Koji Yachi, Hisao Moritomo, Tsuyoshi Murase, Hideki Yoshikawa. IL-1b promotes neurite outgrowth by deactivating RhoA via p38 MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 365(2): 375-380, 2008.

[学会発表] (計 2 件)

1. 轉法輪 光 「IL-1b は坐骨神経損傷後の再生を促進する」第 51 回日本手の外科学会、平成 20 年 4 月 17 日、つくば市
2. 轉法輪 光 「神経細胞の突起伸展に対する IL-1b の影響」第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 19 年 10 月 26 日、浜松市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 啓之 (TANAKA HIROYUKI)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号 : 00432542

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし