

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791390

研究課題名（和文） 神経再生における Macrophage の役割

研究課題名（英文） The role of macrophages in neuronal regeneration

研究代表者

澤田 智一 (SAWADA TOMOKAZU)

浜松医科大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：10397375

研究成果の概要（和文）：

ラット坐骨神経圧挫モデルを用いて、Macrophageの末梢神経再生への効果を検討した。Macrophageを減少させたラットにおいて、血液神経関門(BNB)の再生はコントロール群と比べ有意な違いはなかった。血液神経関門再生に関してはMacrophageの与える影響よりも、schwann細胞等の他因子の影響が強い可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We sought to explore the role of macrophages in neuronal regeneration. There were no significant differences in the regeneration of the blood-nerve barrier (BNB) by selectively depleting the population of macrophages in nerve undergoing nerve compression injury. The influence of another factor is larger than macrophages for the regeneration of the BNB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

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：末梢神経、再生、macrophage

1. 研究開始当初の背景

末梢神経には神経組織内への血中物質の移行を制御し、神経内の環境の恒常性を維持する血液-神経関門（Blood-nerve barrier:以下 BNB）が存在する。我々は現在までにラット坐骨神経圧挫モデルを用いて、末梢神経における Waller 変性と、引き続きおこる再生時の神経内の変化について詳細に検討してきた。我々の検討では、末梢神経損傷により BNB が破綻すると、血液中より

macrophage などの細胞が神経内膜内に流入し、再生のための神経内環境を整える。軸索の再生が中枢側から徐々に起きるとそれを追いかけるように BNB は回復するが、macrophage は BNB 回復後も神経内に残り、神経の再生および成熟にも関わっていると考えられた。

また、末梢神経が Waller 変性を生じるとき、サイトカインはその過程で重要な役割を担っているといわれている。免疫反応における T細胞や macrophage の反応はサイトカイ

ンなどの複雑なネットワークにより制御されているが、Waller 変性を起こした末梢神経においても同様に、このサイトカインネットワークがみられる。前炎症サイトカインである TNF α はおもに macrophage より産生され、BNB の透過性を亢進し、macrophage の神経内誘導に関与しているといわれている。我々の以前の検討では TNF α は BNB の破綻だけではなく、回復にも重要な役割を担っていることが示唆された。

以上より、末梢神経の再生、それに伴う BNB の再生には macrophage が非常に重要な役割を担っていると思われるが、現在までに macrophage の作用について詳細に検討した報告は少ない。

近年 macrophage を apoptosis に誘導する薬剤：Clodronate Liposome を利用することで、macrophage を減少させることができる手法がある。これは Clodronate Liposome を投与し、macrophage がこれを貪食することで細胞内に不可逆の代謝性変化を引き起こし、細胞を殺すため suicide approach と呼ばれている。この手法を用いて BNB について検討した報告は慢性神経圧迫モデルを用い、BNB の破綻について述べた報告のみで、神経再生や BNB の再生についての報告はなされていない。よって、我々の従来の研究に上記の手法を取り入れ発展させることで、macrophage の神経再生における役割を詳細に解明することが可能であると考えた。

2. 研究の目的

上記の suicide approach を用いて、末梢神経再生時における macrophage の役割を明らかにすること。

3. 研究の方法

①雌 SD 系成熟ラット 8 週齢の坐骨神経を坐骨切痕の下で 155g/mm² 圧の血管クリップにて圧挫し、axonotmesis モデルを作製した。Clodronate Liposome の投与経路による効果をみるために、Clodronate Liposome を損傷前日、損傷後 2 日、損傷後 5 日に 2ml ずつ投与した (C 群)。投与は腹腔内投与、および静脈内投与(尾静脈)を行った。対照群には PBS Liposome を同様に投与した (P 群)。損傷後 14 日に坐骨神経を損傷中枢から末梢まで採取し、未固定凍結横断切片を作製、抗 ED-1 抗体 (Macrophage に対する抗体) を用い、Macrophage 数の検討を行った。

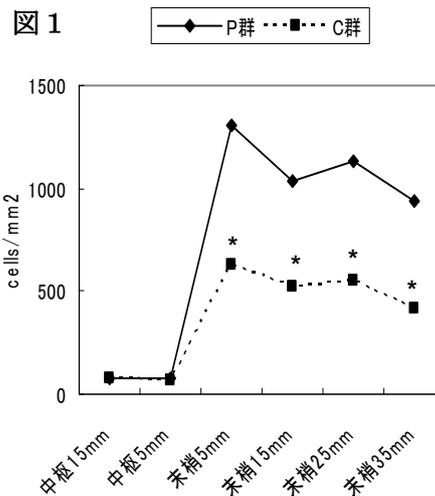
②上記の axonotmesis モデルラットに対し、尾静脈より Clodronate Liposome を損傷前日、損傷後 2 日、損傷後 5 日に 2ml ずつ投与した (A 群)。対照群には PBS Liposome を同様に投与した (B 群)。損傷後 14 日に坐骨神経を

損傷中枢から末梢まで採取し、未固定凍結横断切片を作製した。抗 ED-1 抗体

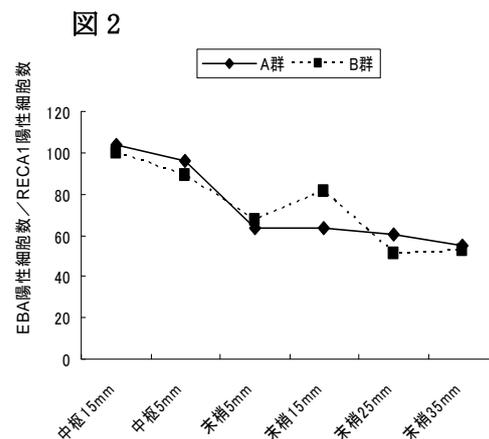
(macrophage)、抗 EBA 抗体(血液関門因子)、抗 RECA1 抗体(血管上皮細胞)を用いて免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

①、静脈内投与における Macrophage 数は、P 群と比較し C 群は約 50% と有意に減少した (図 1)。また、腹腔内投与の検討では、両群間に有意な Macrophage 数の差はみられなかった。



BNB は barrier 機能を持った血管の割合を EBA 陽性細胞数/RECA1 陽性細胞数として数値化して評価したところ、A 群と B 群に有意差はなかった (図 2)。



我々は過去の報告で、ラットの坐骨神経圧挫モデルにおいて、損傷後 14 日目に Macrophage 数がピークとなり、Macrophage が軸索再生の環境を整えると報告した。しかし今回の結果から、Macrophage 減少モデル

でも BNB はコントロール群と同等に再生していることがわかった。この理由として、BNB 再生に関しては Macrophage の与える影響よりも、schwann 細胞等の他因子の影響が強い可能性が考えられた。

以上を日本整形外科学会基礎学術集会にて発表予定である。また、今後は同モデルにおける schwann 細胞やサイトカインの変化を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

宮城道人、澤田智一 他、成体ラット脊髄・後根神経節における BMP receptor (BMPR) の発現分布の解析、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010. 10. 14、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田智一 (SAWADA TOMOKAZU)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10397375

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

宮城道人 (MIYAGI MICHIHITO)
浜松医科大学・大学院生
研究者番号：20467228