

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2006～2008	
課題番号：18591629	
研究課題名 (和文)	神経再生における TNF $\alpha$ 、IL10 の経時的・部位的变化の検討
研究課題名 (英文)	Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor- $\alpha$ and interleukin-10 in nerve regeneration
研究代表者	長野 昭 (NAGANO AKIRA) 浜松医科大学・医学部・教授 研究者番号：50272547

## 研究成果の概要：

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神経再生時における TNF  $\alpha$ 、IL-10 の経時的・部位的变化の検討を行った。血液-神経関門(BNB)の検討とあわせて考えると、免疫染色における TNF  $\alpha$  陽性細胞数の変化と BNB の変化が同時期、同部位に起きており、TNF  $\alpha$  が BNB の変化に深く関わっていることが考えられた。また、IL10 の変化は TNF  $\alpha$  の変化に先立っており、IL-10 は TNF  $\alpha$  の変化の鍵になっていることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,200,000	0	2,200,000
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

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：脳・神経、再生医学、神経再生、Waller 変性、サイトカイン、血液-神経関門

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に血液-脳関門が存在するのと同様に、末梢神経にも、正常にその機能を果たすために、血中物質の神経組織内への物質移行を制御し、神経内環境の恒常性を維持する血液-神経関門(以下 BNB)が存在し、一旦、末梢神経が損傷されるとそれとともに BNB が破綻することが知られている。従来の評価法では定量的な評価は困難であるため、以前、我々は抗血液関門抗体などの免疫組織化学的手法に着目し、定

量的に BNB の破綻、再生を評価する方法を確立し、詳細に検討を行った。また、BNB の破綻後に遊走、進入する炎症性細胞の変化を検討した。

その結果、軸索変性に伴い BNB は、損傷部より中枢 5mm および末梢全ての部分で一斉に破綻するとともに、血液中より macrophage および T 細胞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生じ、それを追いかけるように BNB は回復するが、macrophage はその後も神

経内に残り、神経の再生および成熟にも関わっていることが推測された。

近年ニューロンネットワーク形成に関わる分子機構の解明が進んでいる。神経再生はニューロンネットワークの再構築に至る一連の過程であり、種々の神経栄養因子、サイトカイン、接着因子、細胞骨格系蛋白質、シグナル伝達物質などが複雑に関与している。しかしながら個々の詳細な機構の解明には今だ課題も多く、更なる解明が望まれる。TNF $\alpha$ は炎症性サイトカイン、IL10は抗炎症性サイトカインの代表的なものであり、現在までに神経損傷後や再生時の変化についての詳細な報告はなかった。今回我々は実際に神経再生やBNBの破綻に作用するサイトカインに着目し、その変化を詳細に検討することで再生のメカニズムを解明していきたいと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 免疫組織化学的手法を用いて神経再生におけるTNF $\alpha$ 、IL10の経時的・部位的変化を詳細に検討すること。

(2) TNF $\alpha$ 、IL10を産生するmacrophageが神経再生にどのように影響するかを調べることを目的として、macrophage減少モデル作成を行うこと。

## 3. 研究の方法

(1) 雌SD系成熟ラットの坐骨神経を坐骨切痕の下で155g/mm<sup>2</sup>圧の血管クリップにて圧挫し、axonotmesisモデルを作製した。損傷後1, 3, 7, 14, 21, 28, 56日に坐骨神経を坐骨切痕中枢から末梢まで採取し、未固定凍結横断切片を作製し、以下の検討を行った。

検討するサイトカインは、炎症性サイトカインのTNF $\alpha$ 、抗炎症性サイトカインのIL10に対して行った。

### 【免疫組織学的検索】

Recruit macrophage: 抗ED-1抗体、resident macrophage: 抗OX-6抗体、Schwann細胞: 抗S-100 protein抗体、TNF $\alpha$ : 抗TNF $\alpha$ 抗体、IL10: 抗IL10抗体をマーカーとしてそれぞれ用い、免疫組織化学染色を行った。

TNF $\alpha$ 陽性細胞数、IL10陽性細胞数を画像解析ソフトを用いて計測し、神経圧挫後より経時的、圧挫部より部位的に検討した。

また、recruit macrophage、resident macrophage、Schwann細胞とTNF $\alpha$ ・IL10の二重染色をそれぞれ行い、サイトカインの産生細胞を経時的、部位的に検討した。

【ELISA(Enzyme-linked immunoassay)を用いた検索】

モデルは上記と同様の方法で作製した。坐骨神経を圧挫部より中枢と末梢4.5cmまで採取し、検体を1.5cmごとに分け、ELISAにてTNF $\alpha$ 、IL10の蛋白量を測定した。

(2) 上記と同様のモデルを用いて検討を行った。Macrophageをapoptosisに誘導する薬剤Clodronate Liposomeを神経損傷前日・損傷後2日・損傷後5日に投与した。投与方法は腹腔内、尾静脈内(2ml/匹)をそれぞれ行い、至適投与方法を検討した。

損傷後14日に坐骨神経を採取、未固定凍結横断切片を作製し、免疫組織化学染色を行った

## 4. 研究成果

(1) TNF $\alpha$ 陽性細胞数は損傷後3日で末梢全ての部分において有意に増加し、7日で減少し、有意差がなくなった。損傷後14日に末梢5、15mmでさらに減少がみられた後、21日から56日後では有意差がなくなった(図1)。TNF $\alpha$ 陽性細胞数の大きさはWaller変性時に有意に大きくなり、二重染色では、macrophageのみならず、Schwann細胞もTNF $\alpha$ 陽性になっていた。TNF $\alpha$ は前炎症性サイトカインであり、血液-神経関門(BNB)の破綻や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末梢神経損傷後、軸索の変性に伴いBNBは3日で一斉に破綻し、中枢部より14日から徐々に回復していたことより、TNF $\alpha$ がBNBの変化に深く関わっていることが考えられた。

一方、IL-10陽性細胞数は損傷後翌日に有意に減少し、3日で一斉に増加に転じ、7日後に末梢全てにおいて最大となった。以降、徐々に中枢より減少し、56日では末梢全ての部位で有意差はなくなった(図2)。ELISAによるIL-10の蛋白量も同様の結果を示した。

IL-10は抗炎症サイトカインであり、これらの結果より、末梢神経損傷とそれに伴う再生時において、IL10の変化はTNF $\alpha$ の変化に先立っており、IL-10はTNF $\alpha$ の変化の鍵になっていることが示唆された。

図 1: TNF $\alpha$  陽性細胞数の変化

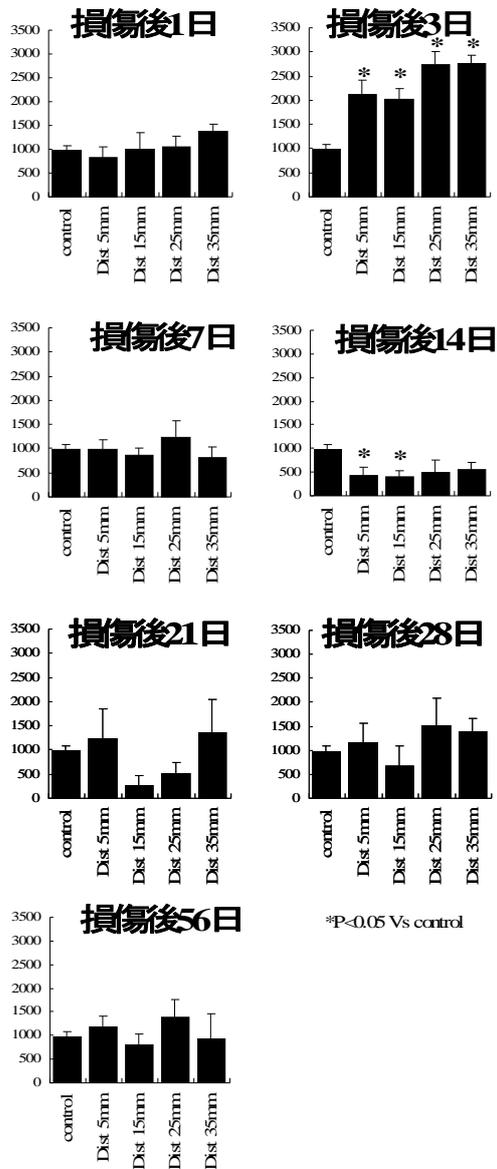
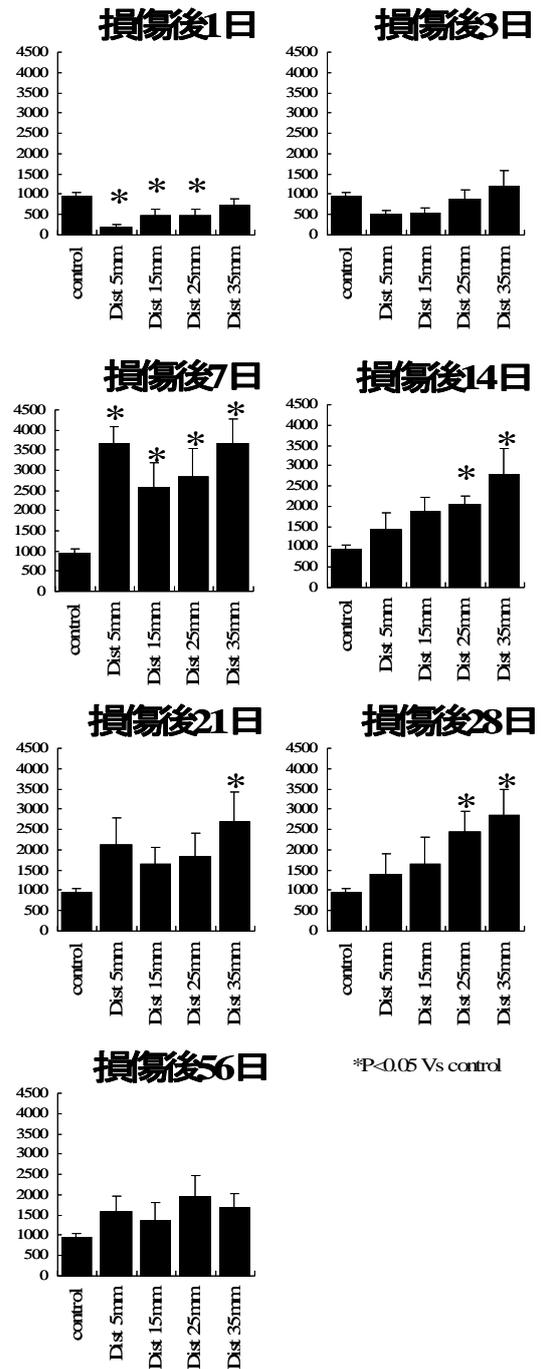


図 2: IL10 陽性細胞数の変化



(2) Clodronate Liposome 腹腔内投与群の Macrophage 数は control 群と比べ減少する傾向にあったが、全ての部位で有意差が得られなかった。尾静脈内投与群では約 1/2~1/3 まで減少し、すべての部位において有意差がみられた。

今後は尾静脈内投与にて macrophage 減少モデルを作成し、神経再生について検討をしていく予定である。

研究者番号:50313945

大村 威夫 (OMURA TAKAO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:70402295

(3)連携研究者

## 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 1 件)

- ① Sawada T, Sano M, Omura T, Omura K, Hasegawa T, Funahashi S, Nagano A. Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry. Neuroscience Letters. 417:55-60, 2007. Reviewed

[学会発表] (計 2 件)

- ① 澤田智一 他、末梢神経再生における TNF  $\alpha$  の変化の検討、第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会、2006.10.19、長崎市。
- ② 澤田智一 他、末梢神経損傷後に遊走する炎症性細胞と IL10 の検討、第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会、2005.10.20、伊勢市。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長野 昭 (NAGANO AKIRA)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号:50272547

### (2)研究分担者

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

佐野 倫生 (SANO MICHIO)

浜松医科大学・医学部・助手