



Blockade of IL-6 signaling by MR16-1 inhibits reduction of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in a mouse model of spinal cord injury.

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2015-05-01<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 有馬, 秀幸<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/2816">http://hdl.handle.net/10271/2816</a>                                |

博士(医学) 有馬 秀幸

## 論文題目

Blockade of IL-6 signaling by MR16-1 inhibits reduction of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in a mouse model of spinal cord injury

(MR16-1によるIL-6シグナルの阻害はドコサヘキサエン酸含有フォスファチジルコリンレベルの減少をマウス脊髄損傷モデルにおいて抑制する)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

脊髄損傷に対する効果的な治療の確立は医学における重要な課題の一つである。脊髄損傷では、神経細胞やグリア細胞が直接障害される一次損傷後に続き、炎症等による二次損傷が惹起される。この二次的炎症反応を抑える目的で、炎症誘発サイトカインが脊髄損傷の治療標的として注目されている。これらのうちIL-6はマクロファージ/ミクログリアの活性化や浸潤を著しく促進することが知られている。マウスIL-6受容体抗体であるMR16-1は脊髄損傷モデルマウスにおいて、脊髄損傷部位での炎症やグリア瘢痕を抑制し、それにより運動機能を回復させるため脊髄損傷治療に有効であると報告されている。一方、IL-6は神経細胞に直接作用することで、脊髄修復に関わっているとの報告もある。IL-6は標的に従い異なる役割を持つことが考えられるため、脊髄損傷後の回復における分子レベルでの解析が重要である。脊髄を含む中枢神経細胞では、様々な脂質が細胞膜の構成やプロスタグランジンのような生理活性脂質としてシグナル伝達に重要な役割を果たすことが知られている。近年登場したマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法(matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry: MALDI-IMS)によって、脂質の組織内位置的情報を保持したまま、その変化を可視化させて解析することを可能にした。そこで本研究では、脊髄損傷モデルマウスにおいて、MR16-1治療後の損傷脊髄における脂質変化をMALDI-IMSを用いて解析した。

[材料ならびに方法]

動物実験に関しては浜松医科大学動物実験委員会の承認を得た。マウスの処理は同大学での内規に従い、動物愛護の観点から苦痛軽減に十分配慮して麻酔下に行った。8週齢C57BL/6JmsSlcマウスのT10高位に脊髄圧挫装置を用いて60 kdynの脊髄圧挫損傷モデルマウスを作成した。損傷直後にMR16-1を100 µg/g、腹腔内に単回投与した群(MR16-1群、n=19)と、同量のPBSを投与した対照群(C群、n=21)を比較した。行動解析としては、運動機能評価(BMSスコア)と残尿測定を行った。組織解析としては損傷後7日と28日の損傷部での免疫組織学的検討(Iba-1、Glial fibrillary acidic protein: GFAP)と、損傷後7日にMALDI-IMSを用いたリン脂質の1種であるフォスファチジルコリン(PC)分布の

解析を行った。マトリックスには 2,5-dihydroxy benzoic acid を用いた。MALDI-IMS 装置は time of flight(TOF) /TOF 型を用いた。

[結果]

- MR16-1 群は損傷後 21、28 日の時点で BMS スコアが有意に高値で、対照群よりも運動機能の有意な改善を示した。残尿量に、両群で有意差はみられなかった。損傷後 7 日目、28 日目の組織学的検討において MR16-1 治療は Iba-1 陽性細胞(マイクログリア/マクロファージ)の浸潤を抑制していた。また、損傷後 28 日の時点での Luxol fast blue 染色による髄鞘の評価では、MR16-1 群で多くの領域が温存されていた。
- 損傷後 7 日目の脊髄における MALDI-IMS 陽イオンモードの解析では両群ともに、質量電荷比( $m/z$ ) 700~880 において多数のピークが検出された。このうち 11 のピークについて、過去の報告データに基づき PC 分子種と同定した。可視化された PC は含有する脂肪酸の違いに基づき各々特徴的な組織内分布を示した。PC に含有される脂肪酸は、例えば 16:0 と 18:1 であれば PC(diacyl-16:0/18:1)と表記する。
- MR16-1 群では、損傷部において PC(diacyl-16:0/18:1)、PC(diacyl-16:0/22:6)、PC(diacyl-16:0/20:4)の減少が抑制されていた。正常灰白質に豊富に存在する PC(diacyl-16:0/22:6)は、MR16-1 群と対照群の損傷中心部で減少していた。しかし、MR16-1 群の損傷周辺部では、対照群と比較して PC(diacyl-16:0/22:6)が多く分布していた。
- 免疫染色によって GFAP 陽性細胞が損傷部位の周辺に多く分布していることが明らかになり、MR16-1 群では PC(diacyl-16:0/22:6)の局在と一致していることが明らかになった。

[考察]

脊髄損傷に対して、MR16-1 の単回投与が脊髄損傷部での炎症細胞浸潤を抑制し、損傷後 28 日目でも多くの髄鞘領域が温存されていた。局所炎症の抑制結果として MR16-1 群で下肢の運動機能の改善も見られた。脊髄損傷後 7 日目の損傷中心部位における DHA (脂肪酸 22:6) 含有 PC の減少は共通していたが、MR16-1 治療により損傷周辺部における DHA 含有 PC の減少が抑制されている事を明らかにした。DHA は神経細胞膜の重要な構成要素で、シグナル伝達において膜タンパク質の相互作用に関連することや神経の維持及び分化に関わっている事が知られている。それゆえに、MR16-1 治療により損傷部で多く検出された DHA 含有 PC は、神経細胞の温存によって運動機能の回復に関わっている可能性がある。さらに、MR16-1 治療群の損傷周辺部で GFAP 陽性アストロサイトと DHA 含有 PC の共局在を確認した。過去の研究では、脳のアストロサイトで DHA が合成される事は報告されている。これらを考慮すると、MR16-1 治療による脊髄損傷後の運動機能回復にはアストロサイトによる DHA の発現が関連していると

考えられた。

〔結論〕

MALDI-IMS 解析を行い、脊髄損傷モデルマウスにおいて、MR16-1 治療後の損傷部における 11 種類の PC 分布を明らかにした。MR16-1 投与による一時的な IL-6 シグナル遮断は脊髄損傷部において神経保護作用を有する DHA 含有 PC の減少を抑制し、脊髄損傷後の下肢運動機能を回復させることが明らかになった。