

Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 澤田, 智一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/372

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 503号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏名	澤田智一		
論文題目	Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry (免疫組織化学的手法を用いたラット坐骨神経圧挫損傷におけるTNF α 、インターロイキン10の部位的、経時的定量計測)		

博士(医学) 澤田 智一

論文題目

Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry

(免疫組織化学的手法を用いたラット坐骨神経圧挫損傷におけるTNF α 、インターロイキン10の部位的、経時的定量計測)

論文の内容の要旨

[はじめに]

切断や圧挫された末梢神経軸索はワーラー変性を生じ、この際、サイトカインはその過程で重要な役割を担っていると考えられている。免疫反応におけるT細胞やマクロファージ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、ワーラー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。これまで末梢神経損傷後のサイトカインの変化を詳細に示したものはなく、特に神経再生時の変化はいまだ不明である。本研究の目的は免疫組織学的手法とenzyme linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて、ラット坐骨神経損傷後のワーラー変性と神経再生における前炎症サイトカインtumor necrosis factor-alpha (TNF α) や抗炎症サイトカインinterleukin-10 (IL-10) の経時的、部位的、形態学的変化を詳細に検討することである。

[材料ならびに方法]

200-250 gの雌SD系ラットを用い、麻酔下に左坐骨神経を坐骨切痕のレベルで圧挫し、有連続損傷モデルを作製した。圧挫には155 g/mm²圧の脳動脈瘤血管クリップを用い、圧挫時間は5分とした。損傷後1、3、7、14、21、28、56日に坐骨神経を圧挫部から末梢35 mmまで採取し、5 mmごとに分け、凍結横断切片を作製した。抗TNF α 抗体、抗IL-10抗体を使用し免疫組織化学染色を施行、陽性細胞を解析ソフトMac Scopeを使用して計測した。また、坐骨神経を圧挫部から末梢45 mmまで採取し、15 mmごとにわけ、ELISA kitにてTNF α 、IL-10の蛋白量を測定した。コントロールには正常ラットの坐骨神経を用い、統計解析はANOVAを使用した。

[結果]

TNF α 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、コントロールと比し有意差がなくなった。損傷後14日に末梢5、15 mmでコントロールと比し有意な減少がみられた後、21日から56日後では有意差がなくなった。TNF α 陽性細胞の大きさは損傷後3日から7日で有意に増大した。ELISAにおける測定では、TNF α の有意な変化はみられなかった。

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日後に末梢全ての領域において最大となった。損傷後14日に末梢5、15 mmで減少し、56日では末梢全ての部位で有意差はなくなった。IL-10陽性細胞の大きさには有意な変化はなかった。ELISAによるIL-10の蛋白量変化は細胞数とほぼ同様の結果を示した。

〔考察〕

我々は以前、神経圧挫損傷により血液-神経関門(BNB)は損傷後3日目に末梢全体で一斉に破綻し、その後、中枢から末梢にむけて軸索の再生を追うように徐々に回復し、21日までに末梢全てで回復したことを報告した。TNF α は血管の透過性を亢進させBNBを損傷し、マクロファージの神経内誘導に関与しているといわれている。以前のBNBの検討と合わせて考えると、BNBの破綻はTNF α が増加する神経損傷後3日と一致して生じており、また、BNBの回復は損傷後14日の末梢15 mmまでみられ、これはTNF α の減少部位と一致している。このことはTNF α がBNBの破綻のみならず、回復にも関与していることが示唆された。

IL-10は前炎症サイトカインの産生や効果を抑制することで局所の炎症反応を減少させる。本研究では末梢神経損傷とそれに伴う再生時において、IL-10はTNF α の変化に先立って変化していた。そのためIL-10は炎症反応を抑制するだけでなく、TNF α を抑制することで神経再生時にBNBを回復させている可能性が示唆された。

以上より、我々は以下のような仮説を立てた。ラットの坐骨神経は圧挫後、IL-10が減少することにより、TNF α が増加する。増加したTNF α の作用により、BNBの透過性がいっせいに亢進し、破綻する。破綻したBNBを通じ、マクロファージが神経内に遊走し、変性したミエリン、軸索の貪食が盛んになる(神経内炎症の亢進)。炎症に対してIL-10が抑制をかけるように増加することで、TNF α が減少する。TNF α が減少することでBNBの透過性は減弱し、BNBは中枢から回復していく。以上よりTNF α はBNBの破綻と回復に、IL10はこれらの変化の鍵として重要な役割を担っていると考えた。

〔結語〕

ラットの末梢神経の圧挫損傷において、TNF α はBNBの破綻と回復において重要な役割を担っており、また、IL-10はTNF α の変化の鍵であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

切断や圧挫された末梢神経軸索はワーラー変性を生じるが、この際、サイトカインはその過程で重要な役割を担っていると考えられている。免疫反応におけるT細胞やマクロファージ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、ワーラー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重要な働きをしていると考えられている。これまで末梢神経損傷後のサイトカインの変化を詳細に示した研究はなく、特に神経再生時の変化はいまだ不明である。そこで、申請者は、免疫組織学的手法とenzyme linked immunosorbent assay (ELISA)を用いて、ラット坐骨神経損傷後のワーラー変性と神経再生における前炎症サイトカインtumor necrosis factor-alpha (TNF α)および、抗炎症サイトカインinterleukin-10 (IL-10)の経時的、部位的、形態学的変化を詳細に検討した。

200-250 gの雌SD系ラットを用い、麻酔下に左坐骨神経を坐骨切痕のレベルで圧挫し、有連続損傷モデルを作製した。圧挫には155 g/mm²圧の脳動脈瘤血管クリップを用い、圧挫時間は5分とした。損傷後1、3、7、14、21、28、56日に坐骨神経を圧挫部から末梢35 mmまで採取し、5 mmごとに分け、凍結横断切片を作製した。抗TNF α 抗体、抗IL-10抗体を使用し免疫組織化学染色を施行、陽性細胞を解析ソフトMac Scopeを使用して計測した。また、坐骨神経を圧挫部から末梢45 mmまで採取し、15 mmごとに分け、ELISA kitにてTNF α 、IL-10の蛋白量を測定した。コントロールには正常ラットsham operationの坐骨神経

を用い、統計解析はANOVAを使用した。

TNF α 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、コントロールと比し有意差がなくなった。損傷後14日に末梢5、15 mmでコントロールと比し有意な減少がみられた後、21日から56日後では有意差がなくなった。TNF α 陽性細胞の大きさは損傷後3日から7日で有意に増大した。ELISAにおける測定では、TNF α 蛋白量の有意な変化はみられなかった。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日後に末梢全ての領域において最大となった。損傷後14日に末梢5、15 mmで減少し、56日では末梢全ての部位で有意差はなくなった。IL-10陽性細胞の大きさには有意な変化はなかった。ELISAによるIL-10の蛋白量変化は細胞数の変化とはほぼ同様の結果を示した。

申請者等は以前、神経圧挫損傷により血液-神経関門(BNB)は損傷後3日目に末梢全体で一斉に破綻し、その後、中枢から末梢にむけて軸索の再生を追うように徐々に回復し、21日までに末梢全てで回復したことを報告した。TNF α は血管の透過性を亢進させ、BNBを損傷し、マクロファージの神経内誘導に関与しているといわれている。以前のBNBの検討と合わせて考えると、BNBの破綻はTNF α が増加する神経損傷後3日と一致して生じており、また、BNBの回復は損傷後14日の末梢15 mmまでみられ、これはTNF α の減少部位と一致している。このことはTNF α がBNBの破綻のみならず、回復にも関与していることを示唆していた。IL-10は前炎症サイトカインの産生や効果を抑制することで局所の炎症反応を減少させる。本研究では末梢神経損傷とそれに伴う再生時において、IL-10はTNF α の変化に先立って変化していた。そのためIL-10は炎症反応を抑制するだけでなく、TNF α を抑制することで神経再生時にBNBを回復させている可能性が示唆された。

以上より、申請者は以下のような仮説を立てた。ラットの坐骨神経は圧挫後、IL-10が減少することにより、TNF α が増加する。増加したTNF α の作用により、BNBの透過性がいっせいに亢進し、その結果マクロファージが神経内に遊走し、変性したミエリン、軸索の貪食が盛んになる(神経内炎症の亢進)。炎症に対してIL-10が抑制をかけるように増加することで、TNF α が減少する。TNF α が減少することでBNBの透過性は減弱し、BNBは中枢から回復していく。以上よりTNF α はBNBの透過性を亢進と回復に、IL-10はこれらの変化の鍵として重要な役割を担っていると考えた。

審査委員会では、ラットの末梢神経の圧挫損傷において、TNF α やIL-10がBNBの透過性の調節に重要な役割を担っていることを初めて報告した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) なぜ雌のラットを使用したのか
- 2) どの細胞がIL-10やTNF α を発現していたのか
- 3) IL-10やTNF α の受容体の発現変動はあるのか
- 4) 本モデルの再現性について
- 5) 対側の坐骨神経をコントロールとしない理由
- 6) IL-10やTNF α の遺伝子発現は変化していたのか
- 7) なぜIL-10やTNF α を選んで検討を加えたのか
- 8) なぜ坐骨神経で実験を行ったのか
- 9) BNB破綻の測定方法

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文

にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 佐藤 康 二

副査 難波 宏 樹 副査 宮嶋 裕 明