

学位論文題名

末梢神経再生過程における
マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割

学位論文内容の要旨

I. 緒言

末梢神経損傷から再生へと至る過程においては、神経細胞体から連絡を絶たれた軸索がマクロファージによって処理され増殖したシュワン細胞に置き換わる、ワーラー変性と呼ばれる病態が存在する。末梢神経再生を担う神経栄養因子の産生は、シュワン細胞だけでなくマクロファージによっても行われることがわかっており、神経再生過程におけるマクロファージの役割は極めて重要である。MIF はマクロファージを炎症部位に集める機能を有する炎症性サイトカインであり、近年 MIF の組織損傷修復における役割が注目されているが、末梢神経においては神経再生における機能はおろか、MIF の存在すら確認されていない。本研究ではラット末梢神経における MIF の存在を証明しその局在を明らかにするとともに、神経損傷後の mRNA 動態を分析した。さらに MIF の中和抗体を投与することによって MIF 機能を阻害した際の神経再生に与える影響について検討した。

II. 方法と結果

ラット坐骨神経からタンパク、RNA を抽出して、ウエスタンブロット分析及び RT-PCR 法を行うことにより MIF タンパク、mRNA の発現を証明した。

損傷のない坐骨神経から凍結切片を作成し、MIF のほか、シュワン細胞に特異的に反応する S-100、軸索に特異的なタンパクである neurofilament について酵素抗体法による免疫組織染色を行った。その結果、MIF の染色性は S-100 のそれと相似性が認められ、neurofilament が染色された軸索には免疫反応が認められなかった。これらの結果から正常神経における MIF の局在がシュワン細胞にあることが示された。

次にラット坐骨神経を大腿中央部で切断し、受傷後 4 日目に MIF タンパクの神経における局在が変化するかどうかについて、酵素抗体法による免疫組織学的検討を行った。神経切断端近位ではシュワン細胞だけではなく、軸索にも MIF の発現が認められた。一方、ワーラー変性に陥った切断端遠位では軸索が処理された後も神経内膜内で残存するシュワン細胞に MIF の免疫反応が認められていた。

切断された坐骨神経における MIF mRNA 発現の変化を調べるために、受傷後 0, 12, 24 時間、及び 2, 4, 7, 14, 21 日目に切断端近位、遠位の神経片を採取し、ノーザンブロット分析を行った。近位、遠位ともに神経切断後 12 時間ですでに MIF mRNA 発現の上昇が始まっており、24 時間から 7 日目まで高値が持続した。その後発現は 14 日から 21 日までに急速に受傷前のレベルに低下した。

さらに末梢神経再生モデルを作成し、MIF の中和抗体を投与する実験を行った。モデルは Lundborg らの方法¹⁾に従い、神経断端を 10mm のギャップを置いてシリコンチューブで架橋する、シリコンチャンバーモデルを用いた。右側のチューブ内は対照として 40 μ l の非免疫 IgG (50 μ g/ml) で満たし、左側のチューブ内は同量の抗ラット MIF 抗体 (50 μ g/ml) で満たした。3 日ごとに各々のシリコンチャンバー内に非免疫 IgG と抗 MIF 抗体を屠殺するまで局所投与し続けた。神経再生速度の評価にはピンチテスト²⁾を用いた。すなわち、術後

2, 4, 6 週に各々5匹ずつのラット坐骨神経を足関節レベルまで展開し、神経の遠位端より近位に向かって神経につまみ刺激を加えていき、軸索反射が初めて出現した部位までの近位切断端からの距離を測定した。その結果、抗 MIF 抗体投与群の神経再生距離はどの週数においても対照群より有意に短い値となった ($p < 0.01$)。また、神経再生モデルにおける再生軸索数を評価するために抗 neurofilament 抗体を用いた免疫組織学的検討をシリコンチューブ内、及び切断端遠位に再生してきた神経について行った。軸索数の測定を容易にするため、二次抗体に FITC 標識 IgG を用いた蛍光抗体法による免疫染色を行い、強拡大 400 倍での 1 視野あたりの軸索数を測定した。その結果、シリコンチャンバー内に新たに再生した神経においては術後 2, 4 週の時点で抗 MIF 抗体投与群の軸索数は有意に減少していた ($p < 0.05$)。術後 6 週では有意差は認められなかった。切断端遠位の神経では術後 4 週の時点でのみ両群間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。術後 2 週と 6 週では差が認められなかった。

III. 考察

本研究において初めて末梢神経系における MIF 発現を証明した。正常坐骨神経においては MIF タンパクがシュワン細胞に貯えられていることが明らかとなった。しかし、神経損傷後に MIF の分布が単一ではなかったことは特筆すべきことであり、特に神経切断端近位において軸索内にも MIF タンパクの発現が認められたことは、神経損傷後に MIF が逆行性軸索流によって神経細胞体まで運ばれている可能性を示唆している。

神経切断後の MIF mRNA 動態を検討したノーザンブロット分析によって、受傷後 24 時間から 7 日目まで MIF mRNA の高い発現を認めた。この時期において MIF はマクロファージの浸潤を引き起こすことによってワーラー変性を円滑に進めるとともに、マクロファージがシュワン細胞から NGF などの神経栄養因子の放出を促すのを間接的に制御しているものと考えられる。

さらにシリコンチャンバーモデルを用いて行った比較実験において、抗 MIF 抗体投与の影響として神経再生の遅延と再生軸索の減少が引き起こされることを証明した。この影響は術後 4 週までの期間により顕著であり、6 週では対照群との間に有意差を認めなかった。ノーザンブロット分析の結果と併せて考えると、MIF は末梢神経再生過程の比較的早期の段階でその機能を発揮するものと考えられた。この時期において抗 MIF 抗体投与が神経再生を阻害した機序として、マクロファージが担うワーラー変性の進行や NGF 刺激作用を阻害することが考えられた。一方 MIF そのものにシュワン細胞の生命維持作用があり、抗体投与によりシュワン細胞の増殖能が阻害され、再生に必要なシュワン細胞数が減少した可能性も考えられる。

以上の結果を総合すると MIF は末梢神経再生過程のサイトカインネットワークにおいて、他の神経栄養因子や炎症性サイトカインより上流で神経再生に関わっていることが示唆される。この点は神経再生を促進する物質として MIF の臨床応用を考えた場合、非常に有利と考えられる。本研究はその可能性を開く第一歩であり、末梢神経再生過程における MIF の役割を解明する一助になったと考えられる。

IV. 文献

- 1 Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G, Varon S (1983): Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J Comp Neurol* 218: 460-470.
- 2 Kanje M, Lundborg G, Edstrom A (1988): A new method for studies of the effects of locally applied drugs on peripheral nerve regeneration in vivo. *Brain Res* 439: 116-121.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 福 島 菊 郎

学 位 論 文 題 名

末梢神経再生過程における

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割

末梢神経再生過程におけるマクロファージの役割は極めて重要である。MIF はマクロファージを炎症部位に集める機能を有する炎症性サイトカインであり、近年 MIF の組織損傷修復における役割が注目されているが、末梢神経においては神経再生における機能はおろか、MIF の存在すら確認されていない。本研究ではラット末梢神経における MIF の存在を証明しその局在を明らかにするとともに、神経損傷後の mRNA 動態を分析した。さらに MIF の中和抗体を投与することによって MIF 機能を阻害した際の神経再生に与える影響について検討した。

まず、ラット坐骨神経からタンパク、RNA を抽出して、ウエスタンブロット分析及び RT-PCR 法を行うことにより MIF タンパク、mRNA の発現を証明した。次いで損傷のない坐骨神経から凍結切片を作成し、酵素抗体法による免疫組織染色を行った。その結果、正常神経における MIF の局在がシュワン細胞にあることが示された。次にラット坐骨神経を大腿中央部で切断し、受傷後 4 日目に MIF タンパクの神経における局在が変化するかどうかについて、酵素抗体法による免疫組織学的検討を行った。神経切断端近位ではシュワン細胞だけではなく、軸索にも MIF の発現が認められた。一方、ワーラー変性に陥った切断端遠位では軸索が処理された後も神経内膜内で残存するシュワン細胞に MIF の免疫反応が認められていた。続いて切断された坐骨神経における MIF mRNA 発現の変化を調べるために、ノーザンブロット分析を行った。近位、遠位ともに神経切断後 12 時間ですでに MIF mRNA 発現の上昇が始まっており、24 時間から 7 日目まで高値が持続した。その後発現は 14 日から 21 日までに急速に受傷前のレベルに低下した。

さらに末梢神経再生モデルを作成し、MIF の中和抗体を投与する実験を行った。モデルは神経断端を 10mm のギャップをおいてシリコンチューブで架橋する、シリコンチャンバーモデルを用いた。右側のチューブ内は対照として非免疫 IgG で満たし、左側のチューブ内は同量の抗ラット MIF 抗体で満たした。3 日ごとに各々のシリコンチャンバー内に非免

疫 IgG と抗 MIF 抗体を屠殺するまで局所投与し続けた。神経再生速度の評価にはピンチテストを用い、術後 2、4、6 週に各々 5 匹ずつのラット坐骨神経について再生距離を測定した。その結果、抗 MIF 抗体投与群の神経再生距離はどの週数においても対照群より有意に短い値となった。また、神経再生モデルにおける再生軸索数を評価するために抗 neurofilament 抗体を用いた免疫組織学的検討をシリコンチューブ内、及び切断端遠位に再生してきた神経について行い、強拡大 400 倍での 1 視野あたりの軸索数を測定した。その結果、シリコンチャンバー内に新たに再生した神経においては術後 2、4 週の時点で抗 MIF 抗体投与群の軸索数は有意に減少していた。術後 6 週では有意差は認められなかった。切断端遠位の神経では術後 4 週の時点でのみ両群間に有意差が認められた。術後 2 週と 6 週では差が認められなかった。

本研究において初めて末梢神経系における MIF 発現を証明し、シュワン細胞がその発現細胞であること、神経損傷後に局在が変化することを示した。さらに神経切断後 24 時間から 7 日目まで MIF mRNA の高い発現を認めた。この時期において MIF はマクロファージの浸潤を引き起こすことによってワーラー変性を円滑に進めるとともに、マクロファージがシュワン細胞から NGF などの神経栄養因子の放出を促すのを間接的に制御しているものと考察した。さらにシリコンチャンバーモデルを用いて行った比較実験において、抗 MIF 抗体投与の影響として神経再生の遅延と再生軸索の減少が起こることを証明した。抗 MIF 抗体投与が神経再生を阻害した機序として、マクロファージが担うワーラー変性の進行や NGF 刺激作用を阻害することが考えられた。一方 MIF そのものにシュワン細胞の生命維持作用があり、抗体投与によりシュワン細胞の増殖能が阻害され、再生に必要なシュワン細胞数が減少した可能性についても示唆した。

副査の福島教授より神経切断端遠位の軸索における MIF 発現の有無や加齢変化について質問があり、次いで副査の石橋教授から神経断端遠位における MIF mRNA の発現上昇の由来細胞や MIF がサイトカインネットワークの上流に位置する根拠についての質問があった。また主査の三浪教授より MIF が逆行性軸索流で運ばれる可能性を支持する知見についてと臨床応用を視野においた今後の研究の展望について質問があり、これらに対して申請者は自己の研究結果と文献的知識に基づいて概ね妥当な回答を行った。審査委員の研究に対する評価は高く、今後の更なる研究の発展が期待された。

この論文は、MIF が末梢神経再生過程に促進的な役割を果たすことを初めて証明したことで高く評価され、今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。