

受賞者

岡田 誠司

九州大学医学研究院SSP幹細胞ユニット神経再生分野

研究テーマ

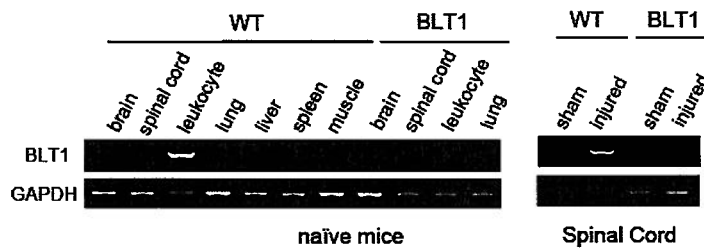
脊髄損傷に於けるLTB4とBLT1の役割の解析

1. 目的

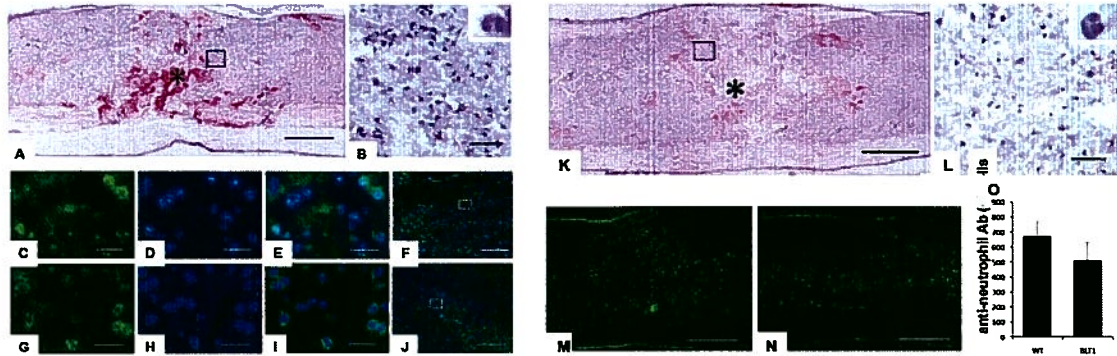
中枢神経外傷に於ける病態形成には、外力による一次的機械的損傷に加えて、それに続発する微小循環系の破綻や過度の炎症反応による自己崩壊的な組織障害機序、いわゆる二次損傷の存在が解明されているが、この二次損傷を如何にして抑制するかが中枢神経外傷の治療研究の大きな柱となっている。申請者らは強力な白血球走化活性を有する生理活性脂質であるロイコトリエンB4(LTB4)に焦点をあて、中枢神経外傷に於けるLTB4ならびにその受容体であるBLT1の役割について実験を行った。LTB4は種々の炎症疾患モデルに於いて炎症反応の最上流に位置するイニシエーターとして重要であり、初期の好中球浸潤に必須かつ十分であることが報告されているが、中枢神経外傷での解析はこれまでに報告がない。本研究の目的は、BLT1ノックアウトマスをを用いて、脊髄損傷の病態形成に於けるLTB4-BLT1 pathwayの役割を明らかにし、中枢神経外傷治療への応用可能性を検討することである。

2. 方法ならびに結果

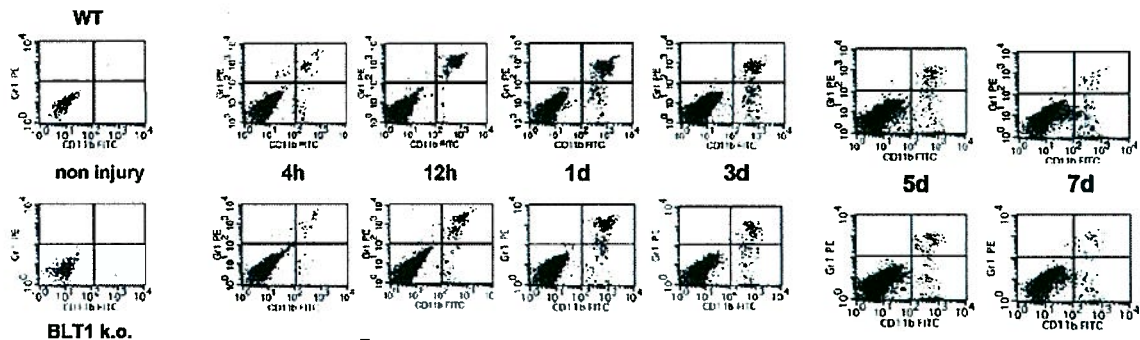
脊髄損傷は、コンピューター制御下に定量的な圧挫損傷を作成できるIH impactorを用いて成体B6マウス第10胸髄に70Kdynの損傷を作成した。まず、BLT1の発現臓器を調べるためRT-PCRを行った結果、BLT1は中枢神経系には発現しておらず、白血球に選択的に発現していた。しかし、損傷脊髄に於いては多数の好中球浸潤が見られ、BLT1 mRNAの発現上昇が見られた。抗Gr-1抗体を用いて、末梢血中から完全に好中球を除去したマウスにおいて脊髄損傷を加えた結果では、浸潤好中球と共にBLT1 mRNAの発現は全く見られなかったため、BLT1は白血球、特に好中球に主として発現していることが確認された(下図)。



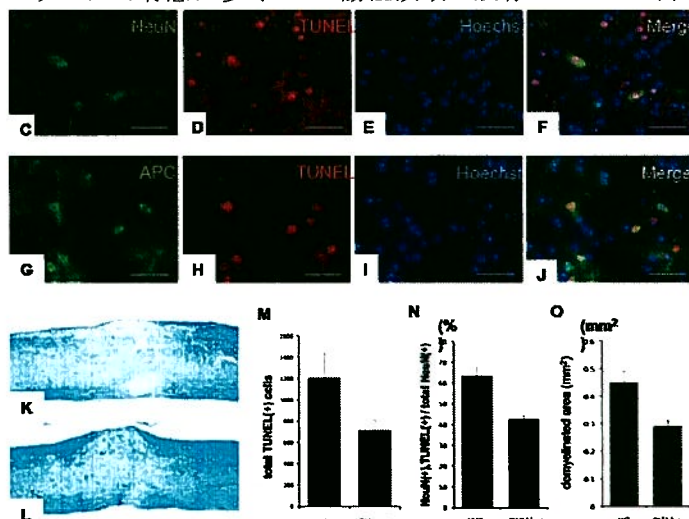
抗好中球抗体(下図C-F)、抗MPO抗体(下図G-J)を用いて免疫染色を行った結果、損傷後12時間の脊髄に於いては多数の浸潤好中球が確認されたが、抗好中球抗体陽性細胞数はBLT1ノックアウトマウス(下図K, L)に於いて有意に減少していた(次項上図)。



より正確な定量を行うために、flow cytometryによる経時的評価を行ったが、損傷脊髄への好中球浸潤は損傷後4時間から確認され、12時間でピークとなり、その後は漸減してゆく経過が明らかとなった。この傾向はWTマウス、BLT1ノックアウトマウスでも同様であったが、損傷後12時間ならびに24時間後に於いては浸潤好中球の定量はBLT1ノックアウトマウスに於いて有意に減少しており、全体として23.4%抑制されていた(下図)。



損傷脊髄に浸潤した好中球をセルソーターを用いて回収し、末梢血中の活性化されていない好中球と比較した結果、IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CXCL1, CXCL2, CCL2の発現が有意に上昇していた。脊髄全体でのmRNA発現も、IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CXCL1に加え、Fas, FasLおよびCasp8の発現抑制がBLT1ノックアウトマウスに於いて確認された。この影響を受けて、損傷12時間の病理切片に於けるTUNEL陽性アポトーシス細胞数も有意に減少しており、TUNEL陽性細胞はニューロンならびにオリゴデンドロサイトを中心に確認された。残存した髄鞘を比較するためにLFB染色を行ったが、BLT1ノックアウトマウスにて有意に多くのLFB陽性領域が残存していた(下図)。



運動機能解析の結果では、損傷後7日および14日にてWTマウスに比較してBLT1ノックアウトマウスで良好な回復が認められたが、損傷後21日以降では両群に有意な差は認められなかった。

#### 4. 考察

様々な炎症性疾患に於いては好中球が組織融解作用を呈して病態を悪化させることが知られている。好中球浸潤を制御するケモカインや接着因子は数多く知られているが、特にLTB<sub>4</sub>-BLT<sub>1</sub>経路は最も上流に位置する走化性因子として同定されている。事実、腹膜炎モデルや関節炎モデルに於いて、BLT<sub>1</sub>ノックアウトマウスを用いた解析では好中球浸潤が殆ど見られず、病態が劇的に改善することが明らかとなっている。これまで外傷モデルにてBLT<sub>1</sub>の役割を調べた報告は皆無であったが、我々は脊髄損傷モデルを用いて解析した。その結果、閉鎖空間への好中球浸潤が主たる病態である自己免疫疾患程の劇的な好中球浸潤減少は認められなかったが、全体として25%程度の好中球浸潤の抑制、炎症性サイトカインやアポトーシスシグナルの減少、有意な機能回復が確認された。Flow cytometryの結果、損傷後4時間で損傷脊髄に好中球浸潤が見られ両群に於いて差がなかったことは、損傷により破綻した血管からleakした好中球自体が自己増幅的に更なる好中球浸潤を呼び込むという外傷特有の病態を示唆している。このために自己免疫疾患程の劇的な差が認められなかったものと考えられた。BLT<sub>1</sub>の発現自体はマクロファージにも認められ、今回の解析に於いても各タイムポイントでの浸潤量に差は見られなかったが全体量としてのマクロファージ浸潤はBLT<sub>1</sub>ノックアウトマウスで有意に減少していた。マクロファージは軸索伸展阻害因子であるミエリンデブリスのクリアランスに重要であることが知られているが、今回の検討に於いても急性期の運動機能回復に差がみられたものの、慢性期ではその差が収束化していた。また、好中球を抗Gr-1抗体で完全に除去したマウスに於いては損傷後の機能的回復は著しく阻害されており、単に好中球は組織障害作用のみを持つのではないことも明らかとなった。脊髄損傷の病態としては外傷後の炎症が二次的な損傷を引き起こし、この拡大を防ぐことが主な治療戦略とされているが、今回の解析からもそのタイミングと程度が治療に受容であることが示唆された。

#### 5. 発表論文

- Okada S, et al., The role of cytokine signaling in pathophysiology for spinal cord injury. *Inflammation and Regeneration*. 28:440-, 2008
- Saiwai H, et al., LTB<sub>4</sub>-BLT<sub>1</sub> pathway mediates neutrophil infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. On submission.