

主論文の要旨

**Keratan Sulfate Expression in Microglia Is Diminished in
the Spinal Cord in Experimental Autoimmune Neuritis**

〔 Experimental autoimmune neuritis の脊髄ではミクログリアの
ケラタン硫酸発現が低下する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

松井 寛樹

【緒言】

Experimental autoimmune neuritis(EAN)はギランバレー症候群の動物モデルであり、末梢神経については広く研究されているものの、中枢神経(CNS)については未解明の点も多い。これまでの研究でプロテオグリカンの糖鎖であるケラタン硫酸(KS)の発現は神経損傷後の蓄積した活性化ミクログリア/マクロファージとの関連が報告されているが、ミクログリア/マクロファージにおける KS の生物学的意義は未だはっきりしない。

本研究では、EAN における CNS の病態を明らかにすることを目的とし、特に KS に焦点を当て解析を行った。

【対象及び方法】

Male Lewis rat 8～10 週齢に human P2 peptide と complete freund adjuvant(CFA)を混合したものを後趾に皮下注射し感作させることで EAN ラットを作成した。Control は PBS を CFA と混合させたものを皮下注射したラットを用いた。

これらのラットの行動所見を 5 段階で毎日評価し、感作後 4、7、12、18、35、90 日目に頸髄、胸髄、胸腰髄、腰髄、坐骨神経を採取し western blotting で KS とミクログリアの発現を解析した。使用した抗体は KS については 5D4、ミクログリア/マクロファージは Iba1、CD68(M1 型)、CD206(M2 型)を用いた。

また、5D4、Iba1、CD68、CD11b の各抗体を使用し免疫染色を行い KS の局在とミクログリア/マクロファージの形態変化、炎症性/抗炎症性について評価した。

Control と EAN ラットの坐骨神経と脊髄からミクログリア/マクロファージを単離し flow cytometry を用いた cell population の解析、KS の定量を行った。

Control と EAN におけるサイトカイン発現量を定量するため real time PCR を行った。各プライマーについては表 1 に示す。

In vitro の実験として初代培養ミクログリアを用い、ノンターゲット siRNA と KSGal6ST に対する siRNA 導入を行った群をそれぞれ準備した。各群について未処理群、LPS と IFN- γ で刺激し活性化させた群での KS の発現、サイトカイン産生量の変化、iNOS の変化につき western blotting、ELISA、real time PCR で評価した。

【結果】

EAN の発症は感作後 9 日目で症状のピークは 14-18 日目に見られ、改善は 25 日目に観察された(図 1a)。組織学的検討で EAN のピークにおける坐骨神経では炎症細胞浸潤と脱髄が確認できた(図 1b)。

Western blotting にて Control と EAN の脊髄と坐骨神経における KS の発現を解析したところ、Control では脊髄のすべての部位に 150-200kDa 程度の分子量を持つ KSPG の発現を認めたが、EAN では発現を認めなかった。坐骨神経では共に KS の発現を認めなかった(図 2)。

次に KS の組織内局在について解析した。KS 陽性細胞は Control の脊髄において Iba1

陽性ミクログリア/マクロファージと共局在していた。EAN ピークではミクログリア/マクロファージの数は有意に増加したが、KS は消失した。また、EAN の脊髄におけるミクログリア/マクロファージは活性化していた(図 3a)。別のミクログリア/マクロファージのマーカーである CD11b を使用して同様の検討を行ったところ Iba1 と CD11b はほぼ一致した(図 3b)。以上より、Control の脊髄において KS はミクログリア/マクロファージに発現することが示唆された。Iba1 陽性細胞は EAN ピークにおいて前角、後角の両方で増加していた。Control の脊髄における KS 陽性ミクログリアは後角より前角の方が有意に多かったが、EAN ピークでは前角、後角ともに KS の発現は消失していた(図 3c, 3d)。

続いて EAN の症状進行に伴う KS の発現量解析を行った。KS の発現は EAN 発症前(感作後 4-7 日)では認められたが、発症後(12 日)、ピーク(18 日)、寛解時(35 日)でいずれも消失していた。感作後 90 日目で発現量の回復が認められた。Iba1 の発現量は 12 日と 18 日で有意に増加しており KS の発現と逆相関していた。炎症性ミクログリア(M1 型)のマーカーである CD68 と抗炎症性ミクログリア(M2 型)のマーカーである CD206 の発現量は、EAN 発症に伴って顕著な増加を認めた(図 4)。

次に KS とミクログリア/マクロファージの活性化マーカーを用いた免疫組織化学的解析を行った。Control 脊髄では CD68 の発現はほぼ見られず、EAN の発症によって CD68 の発現が確認された。EAN ピークにおける CD68 陽性細胞は Iba1 陽性細胞とほぼ一致し KS は消失していることから、活性化ミクログリア/マクロファージには KS が発現していないと考えられた(図 5)。この結果を支持するため、脊髄から精製した免疫細胞を単離し、この細胞の可溶化液について Western blotting を行い KS の発現を解析したところ、同様の結果を得た(図 6a)。これらの精製した細胞はほぼ生細胞であり(図 6b)、CD11b、CD45、KS の発現量を解析した。坐骨神経では主に CD11b 陰性/CD45 陽性細胞(リンパ球)と CD11b 陽性/CD45 陽性細胞(ミクログリア/マクロファージ)の 2 種類が存在し(図 6b)、EAN 発症によって両者とも細胞数が増加した(図 6b, 6c)。脊髄でも同様の細胞群が存在し EAN 発症によって細胞数が増加した(図 6b, 6d)。EAN では CD11b 陽性/CD45 弱陽性のミクログリアと CD11b 陽性/CD45 強陽性の活性化ミクログリア/マクロファージが含まれており、ミクログリア/マクロファージの CD45 細胞表面発現量は EAN 発症によって有意に上昇していた(図 6e, 6f)。また、ミクログリア/マクロファージにおける KS 発現量は、EAN の発症によって有意に低下しており(図 6g, 6h)、KS 陽性ミクログリア/マクロファージの細胞数も減少していた(図 6g, 6i)。一方、坐骨神経でのリンパ球、マクロファージはともに KS の発現はなかった(図 6j)。従って KS はミクログリア/マクロファージに特異的に発現し、EAN ピークで活性化したミクログリア/マクロファージでは消失することが分かった。

次に EAN の脊髄におけるサイトカイン産生量を解析した。EAN では IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインは増加し、IL-4 や IL-10 などの抗炎症性サイトカインは減少していた(図 7)。

最後に、ミクログリア/マクロファージに存在する KS の生物学的な役割を明らかに

するため、初代培養ミクログリアを用いた実験を行った。初代培養ミクログリアにおける KS の発現は、LPS と IFN- γ による刺激で顕著に増加し、KS 合成酵素の 1 つである KSGal6ST の knockdown によって消失した(図 8a)。また、ミクログリアに存在する内在性の KS を knockdown した上で、LPS と IFN- γ で刺激を行うと TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカイン産生能が増強された(図 8b, 8c)。さらに、M1 型ミクログリアのマーカーである iNOS の発現量も同様な結果を得た(図 8d)。

【考察】

本研究ではギランバレー症候群のモデルである EAN を使い、KS の役割解析を行った。KS の発現は EAN 病態形成およびミクログリア/マクロファージの活性化と逆相関を示した。つまり、EAN 発症から寛解に至るまでミクログリア/マクロファージにおける KS の発現が消失するということが示された。

また、EAN のミクログリアは KS の発現が消失する一方で活性化マーカーである CD68 を発現していた。KS 陽性細胞が KS 陰性/CD68 陽性細胞に変化したのか、元々あった KS 陰性細胞が CD68 陽性細胞を増加させたのかは不明だが、少なくとも EAN における脊髄の炎症がこれらのマーカーの発現変化に重要であることが考えられ、KS の発現プロファイルと生物学的な役割は CNS の炎症環境によって変わるのだろうと推測される。

加えて、EAN における KS の役割をさらに明らかにするため、初代培養ミクログリアの KS を knockdown させる実験を行った。これにより KS の少ないミクログリアは炎症刺激に対して、より高い感受性を示すことが考えられた。しかし、KS 発現の消失が炎症の結果である可能性もあり、これらの役割の評価にはさらなる研究が必要である。

【結論】

我々は KS の発現と EAN の病態形成およびミクログリア/マクロファージの活性化に興味深い逆相関を見出した。これまでの報告と併せると、本研究により KS の発現プロファイルと生物学的な役割は CNS における炎症環境によって変化することが示唆された。