HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	実験的自己免疫性脳脊髄炎における中枢神経炎症の抑制と排尿機能障害の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	樋口, まどか
Description	配架番号：2621
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14500号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81728
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Madoka_Higuchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　　氏 名　樋口まどか

学 位 論 文 題 名

実験的自己免疫性脳脊髄炎における中枢神経炎症の抑制と排尿機能障害の検討
(studies on the suppression of inflammation of central nervous system and urinary disfunction in experimental autoimmune encephalomyelitis)

【背景と目的】
多発性硬化症(MS：multiple sclerosis)は中枢神経系の自己免疫疾患であり、多くは再発・寛解を繰り返す。遺伝学的に自己反応性 CD4+T 細胞の関連が証明され、中枢神経への炎症誘導により脱髄を生じ、神経症状を呈する。半数以上で過活動膀胱を呈し、さらにその半数は排尿筋尿道括約筋協調不全とされるが、脱髄部位により排尿症状も多彩である。
一方、血管内皮細胞や尿細管上皮細胞などの非免疫細胞において、NF-κB と STAT3 の同時活性化により IL-6 などの炎症性メディエーター発現が相乗的に増加し､臓器特異的な炎症性疾患の起点となる IL-6 amplifier(IL-6 アンプ)が報告されている。多発性硬化症のモデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE:experimental allergic encephalomyelitis)では、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG：myelin oligodendrocyte glycoprotein)を認識する CD4+T 細胞（病原 T 細胞）を誘導、単離し、これを正常マウスに移入することで尾から始まり上行する一過性の麻痺を呈する(移入 EAE)。後脚への重力刺激によるヒラメ筋を介した感覚-交感神経のクロストークにより､ノルアドレナリン産生、血管内皮細胞での NF-κB 活性から CCL20 が放出され、第 5 腰髄（L5）背側血管に病原 T 細胞が集積する。この集積病原 T 細胞が、さらに L5 背側血管にて IL-6 アンプを活性、血管透過性が亢進し、さらなる病原 T 細胞の集積と微小炎症が生じる。このように、特定の神経回路の活性化により特定血管に血管ゲートが形成され、局所炎症が起こる機序はゲートウェイ反射と呼ばれる。また、睡眠障害ストレスを移入 EAE マウスに負荷すると消化管出血による心機能不全で突然死する。ストレスに反応する室傍核での交感神経様神経が活性化され、病原 T 細胞が第 3 脳室、歯状回、視床に囲まれた特定血管に集積し、微小炎症を誘導する。この炎症から生じる ATP が神経伝達物質として機能し、神経回路を新規に活性化し、過剰な迷走神経活性化から消化管炎症や心機能低下を生じる（ストレスゲートウェイ反射)。
定常マウスに病原 T 細胞を移入した EAE の病態は一過性であることから、中枢神経系には炎症抑制因子が存在し、これらにより病態が一過性なのではないかと考えた。今回、L5 のメタボローム解析を行い、EAE および中枢神経の炎症に対して抑制的に関わる代謝産物の同定を試みた。
また、中枢神経系の免疫疾患発症時での排尿障害についての検討は少ない。さらに下部尿路障害と中枢炎症や慢性ストレスとの関係についての検討・報告はほとんどない。今回、病原 T 細胞を移入した移入 EAE モデルを用いて、中枢神経の自己免疫疾患における排尿変化やその治療法について、また、ゲートウェイ反射を応用し下部尿路障害モデルのストレス反応について検討した。

【方法】
（第 1 章）定常、後肢懸垂、後肢懸垂かつ電気刺激の 3 群のマウスで GC/MS および LC/MS による L5 のメタボローム解析を行った。また MOG ペプチドで C57BL/6 マウスを免疫し免疫 EAE を誘導後、このマウスから脾臓を摘出し病原性 CD4+T 細胞を採取し、マウスに移入することで移入 EAE を誘導した。移入後 day5、day12 に FAD 解析を行った。メタボローム解析により中枢神経炎症に対して抑制的にはたらくと考えられる FAD を同定し、EAE マウスに投与し臨床スコアを評価した。投与前後に脾臓細胞の分画変化、L5 の細胞集積、IL-6 アンプへの関与を検討した。
（第 2 章）移入 EAE マウスの移入前、麻痺ピーク時、移入 4 週後、移入 6 週後にて 24 時間の排尿回数と平均 1 回尿量、排尿時膀胱内圧の測定を行った。各群で膀胱の組織学的評価、L5 の細胞集積、排尿中枢である中脳水道の神経活性化を検討した。下部尿路閉塞モデルと間質性膀胱炎モデルに対して病原性 CD4+T 細胞を移入し症状スコアを評価した。
【結果】
（第 1 章）後肢懸垂により L5 にて FAD 発現が低下し、電気刺激により増加した。免疫 EAE 発症とともに L5 での FAD が増加した。免疫 EAE では FAD 投与により臨床スコアが抑制された。FAD による免疫細胞の分画に変化を認めず、L5 への病原性 T 細胞の集積が抑制された。非免疫細胞のサイトカイン刺激では FAD 投与により IL-6 発現は増加した。MOG 免疫時に FAD を投与し病原性 T 細胞を移入すると、移入 EAE では発症が抑制された。
(第 2 章)移入 EAE マウスで発症とともに排尿回数が減少した。 1 回尿量は移入 4 週頃に増加し、病態が寛解した 6 週目も増加していた。移入 4 週から 6 週にかけて排尿時膀胱内圧が上昇した。膀胱の HE 染色では組織学的な違いはなかった。寛解期も L5 に病原 T 細胞の集積があり、病態ピーク時で中脳水道神経活性化を認めた。下部尿路障害モデルでの EAE 誘導では、下部尿路閉塞モデル、間質性膀胱炎モデルともに症状スコアに sham との有意差を認めなかった。
【考察】
(第 1 章)FAD は重力刺激と L5 の炎症で増加する可能性がある。FAD がどの様に EAE 病態誘導を抑制するかは現時点では不明であるが、MOG 免疫時に FAD を投与したマウスから病原 T 細胞を採取し移入したところ、移入 EAE での発症が抑制された。免疫時の FAD 暴露により CD4+T 細胞が MOG に対して病原性を獲得しなかった可能性がある。
(第 2 章)EAE マウスでは麻痺とともに 1 回尿量が増加した。膀胱の組織学的な変化がなかったこと、麻痺ピーク時の中脳水道活性、麻痺寛解後の L5 周囲での病原 T 細胞残存から、神経学的に排尿機能の変化が表れている可能性が示唆された。また寛解後の EAE での排尿時膀胱内圧の上昇は、神経因性膀胱の一症状として、MS における排尿筋尿道括約筋協調不全を再現している可能性を考える。
下部尿路障害モデルに対する EAE 移入では臨床スコアにおいて sham との間に違いを認めず、下部尿路障害モデルにおいて病原 T 細胞は通常の EAE と同様な病態を示した。下部尿路障害モデルでも重力刺激による L5 腰髄周囲血管の微小炎症に勝る炎症誘導はなかったと考えられた。
【結論】
FAD は中枢神経の炎症に対して抑制的にはたらく因子である可能性がある。
EAE モデルを用いた多発性硬化症の排尿評価では、中枢神経の炎症による排尿変化が不可逆的な場合もあることが示唆された。