



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 [全文の要約]
Author(s)	樋口, まどか
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2621 他
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/2115/81729
Type	doctoral thesis
File Information	Madoka_Higuchi_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

樋口 まどか

学位論文（要約）

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

樋口 まどか

学位論文の要約

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

氏名 樋口まどか

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。MS 患者の半数以上で過活動膀胱を呈し、さらにその半数は排出障害を呈する排尿筋尿道括約筋協調不全を伴うとされるが、脱髄部位により排尿症状は多彩である。

これまでに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- κ B 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 autoimmune 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) を試験管内で活性化、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)。当モデルでは固有の神経活性化が起点となっており、具体的には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- κ B 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。さらに集積病原 T 細胞が、L5 背側血管にて IL-6 アンプを活性化、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を惹起することが明らかとなった。このように、特定の神経回路の活性化により固有の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不全で突然死する。これは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ためである。この微小炎症から生じる ATP が神経伝達物質として機能し、過剰な迷走神経活性化から消化管炎症や心機能低下を誘導する新規神経回路を形成することが明らかとなった（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、当該因子により病態の一過性が形成される可能性を考えた。今回、腰髄 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。本研究では、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、さらに下部尿路障害モデルに EAE を誘導し、ゲートウェイ反射を応用したストレス反応について検討を行った。

【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、当マウスの脾臓から単離した病原性 CD4+T 細胞を試験管内で活性化、マウスに移入することで移入 EAE を誘導した。移入後 day5、day12 に採取した L5 のメタボローム解析により中枢神経系の炎症に対して抑制的に機能すると考えられる物質 A を同定し、これを EAE マウスに投与、臨床スコアを評価した。物質 A の投与前後に脾細胞の分画変化、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 への細胞集積、排尿中枢である中脳水道の神経活性化、排尿時の膀胱内圧測定を行った。下部尿路閉塞モデルと間質性膀胱炎モデルに対しても病原性 CD4+T 細胞を移入し臨床スコアを評価した。

【結果】

(第1章) メタボローム解析により 100 を超える代謝産物について解析を行った。定常マウスでは後肢懸垂により L5 にて物質 A の発現が低下し、電気刺激により増加した。さらに電気刺激時間依存的に物質 A の発現量は増加した。免疫 EAE では麻痺発症とともに L5 において物質 A が増加した。免疫 EAE では物質 A 投与により臨床スコアが抑制された。物質 A 投与による脾臓免疫細胞の分画に変化を認めなかったが、L5 への病原性 T 細胞の集積が顕著に抑制された。非免疫細胞のサイトカイン刺激では物質 A 投与により IL-6 発現は増加した。MOG 免疫時に物質 A 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認められなかった。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の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) 物質 A は重力刺激と L5 の炎症で増加する可能性がある。物質 A がどの様に EAE 病態誘導を抑制するかは現時点では明らかにできなかったが、MOG 免疫時に物質 A 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 での病態発症が抑制された。免疫時の物質 A 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考えられた。

(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が考えられた。

下部尿路障害モデルに対する EAE 誘導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】

物質 A は EAE の発症を抑制し、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。また物質 A は EAE による血液脳関門の血管透過性低下を阻害し、病原 T 細胞の腰髄周囲への集積を抑制した。

EAE モデルを用いた多発性硬化症の排尿評価では、臨床スコアに相関しない不可逆的な排尿変化を認め、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。

【本研究で得られた知見の意義】

物質 A は中枢神経の炎症疾患に対して治療薬として使用できる可能性がある。

多発性硬化症や中枢神経の自己免疫疾患の排尿障害について、EAE マウスを用いて検討できる可能性がある。

【今後の課題】

中枢神経の炎症に対する物質 A の抑制作用について、その作用部位と機序についてさらに検討が必要である。

中枢神経の炎症による排尿障害の機序・治療について、さらなる解明が必要である。