

学位論文要旨

氏名 川久保 歩



論文題目

「GFP 骨髄キメラマウスを用いた椎間板傷害後に増加するマクロ
ファージの起源解析」

指導教授承認印

高相 勲士



GFP 骨髄キメラマウスを用いた椎間板傷害後に増加するマクロファージの起源解析

氏名 川久保 歩

<背景>

腰痛の生涯罹患率は約 85%と報告されており、性・年齢階級別にみた症状別有訴率においても高齢になるほど男性女性ともに腰痛の有訴率が高い。疼痛が3ヶ月以上継続する慢性腰痛の多くは既存の薬物治療には抵抗性であり治療にしばしば難渋する。慢性腰痛の原因として椎間板由来の疼痛が注目されている。近年変性が進んだ椎間板内にマクロファージが存在することが示されている。我々は過去の研究で傷害された椎間板ではマクロファージが増加し、炎症を介して椎間板の変性に関与する可能性を明らかにしてきた。これまですべてのマクロファージは骨髄に由来し、組織障害などの環境変化により動員されると考えられていた。しかし最近の研究で内在性マクロファージが骨格筋や末梢神経などの組織に存在し組織の恒常性に寄与していることが示されている。マクロファージには炎症性サイトカインを発現する M1 マクロファージと抗炎症や組織修復に関与する M2 マクロファージが存在し、そのどちらもがヒト椎間板に存在していると報告されている。しかし、椎間板傷害後に増加するマクロファージが動員性マクロファージによるものか内在性マクロファージなのかについては明らかになっていない。本研究では緑色蛍光タンパク質 (GFP) トランスジェニック骨髄キメラマウスを用いて、椎間板障害におけるマクロファージの起源を検討した。

<対象と方法>

10 週齢の雄の C57BL/6J マウスと GFP トランスジェニック C57BL/6J マウスを用いた。

C57BL / 6J マウス骨髄から有核細胞を採取後、100 ng/ml 単球コロニー刺激因子 (monocyte colony-stimulating factor, M-CSF) で培養し、骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophage, BMM)を得た。また、C57BL/6J マウスから椎間板を採取し、酵素処理後、抗 F4/80 抗体を用いた椎間板由来マクロファージ (disc-derived macrophages, DM) を採取した。BMM, DM を IL-4, IL10, IL4+IL10, LPS+IFN- γ で刺激し、BMM, DM の M1, M2 マクロファージへの分化能 Real time PCR で検討した。C57BL / 6J マウスに 10.5 Gy 放射線照射後、GFP トランスジェニックマウス骨髄より採取した有核細胞を移植した。移植 2 か月後、末梢血を用いたキメラ率を検討後、27G 針を用いてマウスの尾椎椎間板傷害モデルを作製した。椎間板を傷害させない群を傷害 0 日として椎間板を採取し、さらに傷害後 1 日、3 日、7 日、14 日に採取した。フローサイトメトリーを用いて骨髄由来マクロファージ (GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞) と内在性マクロファージ (GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞) の割合を検討した。また、骨髄由来、内在性マクロファージにおける CD86 (M1 マクロファージマーカー)および CD206 (M2 マクロファージマーカー)の陽性率を検討した。

<結果>

BMM, DM ともに IFN / LPS 刺激により M1 マクロファージマーカーである CD86、iNOS の発現が増加した。また、両細胞ともに IL-10 刺激により CD86 の発現が抑制された。M2 マクロファージマーカーである CD206 の発現は両細胞ともに IL-4 刺激、IL10 刺激で増加し IL-4 / IL-10 刺激でさらに増加し、Fizz1 の発現は IL-4 / IL-10 刺激により増加した。また、両細胞ともに IFN / LPS 刺激により CD206 の発現が抑制された。末梢血の GFP キメラ率はいずれの個体も 97%以上であった。傷害後 1 日目から 14 日目まですべて、F4/80+ CD11b+ 細胞は増加した。傷害 0 日目では GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞が GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞に比べ有意に多かった。傷害後 1 日目から GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞は増加し、その割合は GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞に比べ有意に多かった。CD86+ 細胞は椎間板傷害後 3 日目から 14 日

目まで GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞で有意に増加していたが、GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞では椎間板傷害後 1 日目から 14 日まで有意に減少していた。一方、GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞および GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞における CD206+ 細胞は傷害後 7 日目から 14 日目まで増加したが、その割合は GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞で有意に多かった。

<考察>

マウス椎間板内在マクロファージは骨髄マクロファージのように M1、M2 分化能を有する可能性が示唆された。GFP 骨髄キメラマウスにおいて GFP+ 細胞と CD86+ GFP+ 細胞は椎間板傷害後より増加した。CD206+ 細胞は GFP- 細胞で多く認められた。以上より M1 マクロファージは動員性、M2 マクロファージは内在性マクロファージに由来することが明らかになった。M1 マクロファージは炎症性変化に関与し、M2 マクロファージは抗炎症や組織修復に重要な役割を果たすことが知られている。マクロファージ動員に関与するケモカイン、サイトカインは新たな治療標的になり得る。また、内在性マクロファージは炎症抑制や修復促進のための重要な細胞標的かもしれない。