

氏名	しまだのぶひろ 島田宣弘
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 567 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	末梢神経障害モデルにおいて M1 マクロファージ浸潤は筋・骨萎縮を増悪させる
論文審査委員	(委員長) 教授 藤本 茂 (委員) 教授 竹下 克志 准教授 小出 玲 爾

論文内容の要旨

1 研究目的

末梢神経障害後の障害局所の筋・骨萎縮が患者の機能予後を増悪させ、慢性痛への移行を促進することが知られている。末梢神経障害後の筋・骨萎縮は痛みによる不動化のためと考えられていたが、本研究ではそれらが M1 マクロファージを介した神経原性炎症によって引き起こされると仮説を立てた。本研究の目的は、神経障害モデルマウスで、末梢神経障害後の筋・骨萎縮への M1 マクロファージの関与を明らかにし、M1 マクロファージの抑制による筋・骨萎縮の予防の可能性について検討することである。

2 研究方法

絞扼性神経損傷モデルマウスで、神経障害後の筋重量、全骨密度を測定した。神経障害後の局所組織変化を可視化するために、骨の免疫組織染色と筋の生体イメージングを行った。組織に浸潤した細胞はフローサイトメトリーで定量した。局所組織のサイトカイン変化を RT-PCR で検討した。クロドロン酸リポソームによる M1 マクロファージ除去モデル、抗炎症薬（デキサメタゾン、ロキソプロフェン）、神経障害性痛治療薬（プレガバリン、アミトリプチリン、ノイロトロピン）投与モデルで、筋・骨への M1 マクロファージ浸潤と筋・骨萎縮の抑制が可能かを検討した。

3 研究成果

コントロール手術群と比較して、神経障害群で神経障害後 1 週間後に大腿二頭筋、腓腹筋の重量が、2 週間後に大腿骨、脛骨の全骨密度が低下した。神経障害 1 週間後に大腿骨の免疫組織染色で破骨細胞の増加を認め、神経障害 2 時間後から筋組織の生体イメージングで M1 マクロファージの増加を認めた。大腿二頭筋、腓腹筋のフローサイトメトリーでは神経障害群で M1 マクロファージ数が有意に増加した。大腿二頭筋、腓腹筋の RT-PCR では、神経障害群で TNF α 、IL1- β 、CCL2、CCR2 が増加した。クロドロン酸リポソームによる M1 マクロファージ除去群では、M1 マクロファージの筋・骨への浸潤と筋・骨萎縮が回避できた。また、デキサメタゾンの投与が完全に、ロキソプロフェンとプレガバリンの投与が部分的に M1 マクロファージの筋・骨への浸潤と筋・骨萎縮を抑制した。

4 考察

本研究は神経障害時の痛みの原因として着目されていた M1 マクロファージが筋・骨萎縮にも関与することを明らかにした。神経障害後に M1 マクロファージが局所の筋・骨に誘導される機序としては、TNF α 、IL1- β 、CCL2、CCR2 などの炎症性サイトカインが関与していると考えられた。近年、これらのサイトカインが炎症性疾患での筋萎縮や骨代謝異常に関わることが報告されており、神経障害でも筋・骨萎縮の原因となる可能性がある。一方、神経原性炎症では中枢神経系の感作が痛みの増悪や慢性化に関わることが分かっているが、本研究では中枢神経系に作用するアミトリプチリン、ノイロトロピンの投与では筋・骨への M1 マクロファージの集積や筋・骨萎縮を抑制できなかった。神経障害後の筋・骨萎縮への中枢神経系の影響は少ないと考えられた。本研究では、デキサメタゾン、ロキソプロフェン、プレガバリンが神経障害後の M1 マクロファージの集積や筋・骨萎縮を抑制した。臨床においても、これらの薬剤の早期使用で神経障害後の筋・骨萎縮を予防できると期待される。

5 結論

末梢神経障害モデルマウスで、M1 マクロファージの浸潤が末梢神経障害後の筋・骨萎縮を増悪させることが明らかになった。M1 マクロファージの抑制により、筋・骨への M1 マクロファージの浸潤と筋・骨萎縮が予防できた。

論文審査の結果の要旨

(本論文は何を明らかにしたのか)

従来、末梢神経障害後の筋・骨萎縮は痛みによる不動が主な原因であると考えられていたが、本研究ではそれらが M1 マクロファージを介した神経原性炎症によって引き起こされると仮説を立てた。絞扼性神経障害モデルマウスを用いて、神経障害後の筋重量、全骨密度を測定し、不動モデルのコントロール群と比較したところ、神経障害群で筋重量と骨密度の低下が認められた。また、神経障害後に破骨細胞の増加、筋組織の生体イメージングで M1 マクロファージの増加を認めた。さらに神経障害群で TNF α などのサイトカインが増加した一方で、クロドロン酸リポソームによる M1 マクロファージ除去により、筋骨萎縮が回避できた。また、デキサメタゾンとプレガバリン投与が M1 マクロファージの筋骨への浸潤を抑制する可能性が示唆された。これらの結果により、痛みの原因として注目されていた M1 マクロファージの浸潤が炎症性サイトカインを介して末梢神経障害後の筋・骨萎縮にも関与することが明らかとなった。

(上記内容をどのように評価したのか)

絞扼性神経障害モデルマウスを用いて、神経障害後の筋重量、全骨密度を測定し、不動モデルのコントロール群と比較した。局所組織変化を可視化するために、骨の免疫組織染色と筋の生体イメージングを行った。組織に浸潤した細胞はフローサイトメトリーで定量した。新規性のある仮説を独創的な方法で行った熱意を感じる研究である。

(問題点および訂正の指導内容)

問題点として以下の点が指摘された。

1. M1 マクロファージや今回注目したサイトカインに着目した根拠について明らかにする

2. 薬物の効果について明確な道筋を示した研究ではないことを **Limitation** に明記する
3. 仮説の図から今回は検討されていない「慢性痛」を削除する
4. 神経結紮マウスの運動量が低下していないことを検証できていないことは **Limitation** に記載し、過去の報告から運動量低下の可能性が低いことを考察する。また、結紮した神経以外の領域の筋肉のデータを測定できていないことも **Limitation** に追記する。
5. 図 17-19 の図をわかりやすく修正する

いずれも適切に修正された。

(本学学位論文としての可否の判断結果およびその理由)

上記の結果を踏まえ、本学学位論文として合格と判断するに至った。新規性のある仮説を立て、真摯にそれを証明しており、今後臨床応用につながる可能性も感じさせられる。

(主に提出された論文についての評価)

熱意ある研究成果が示されており、独創性のある意義ある研究であると判断した。

最終試験の結果の要旨

(本論文は何を明らかにしたのか)

従来、末梢神経障害後の筋・骨委縮は痛みによる不動が主な原因であると考えられていたが、本研究ではそれらが M1 マクロファージを介した神経原性炎症によって引き起こされると仮説を立てた。絞扼性神経障害モデルマウスを用いて、神経障害後の筋重量、全骨密度を測定し、不動モデルのコントロール群と比較したところ、神経障害群で筋重量と骨密度の低下が認められた。また、神経障害後に破骨細胞の増加、筋組織の生体イメージングで M1 マクロファージの増加を認めた。さらに神経障害群で TNF α などのサイトカインが増加した一方で、クロドロン酸リポソームによる M1 マクロファージ除去により、筋骨委縮が回避できた。また、デキサメサゾンとプレガバリン投与が M1 マクロファージの筋骨への浸潤を抑制する可能性が示唆された。これらの結果により、痛みの原因として注目されていた M1 マクロファージの浸潤が炎症性サイトカインを介して末梢神経障害後の筋・骨委縮にも関与することが明らかとなった。

(上記内容をどのように評価したのか)

絞扼性神経障害モデルマウスを用いて、神経障害後の筋重量、全骨密度を測定し、不動モデルのコントロール群と比較した。局所組織変化を可視化するために、骨の免疫組織染色と筋の生体イメージングを行った。組織に浸潤した細胞はフローサイトメトリーで定量した。新規性のある仮説を独創的な方法で行った熱意を感じる研究である。

(問題点および訂正の指導内容)

問題点として以下の点が指摘された。

1. M1 マクロファージや今回注目したサイトカインに着目した根拠について明らかにする
2. 薬物の効果について明確な道筋を示した研究ではないことを **Limitation** に明記する
3. 仮説の図から今回は検討されていない「慢性痛」を削除する
4. 神経結紮マウスの運動量が低下していないことを検証できていないことは **Limitation** に記載し、過去の報告から運動量低下の可能性が低いことを考察する。また、結紮した神経以外の領域の筋肉のデータを測定できていないことも **Limitation** に追記する。

5. 図 17-19 の図をわかりやすく修正する

いずれも適切に修正された。

(本学学位論文としての合否の判断結果およびその理由)

上記の結果を踏まえ、本学学位論文として合格と判断するに至った。新規性のある仮説を立て、真摯にそれを証明しており、今後臨床応用につながる可能性も感じさせられる。

(提出された論文とプレゼンを総合的に評価したもの)

申請者は、研究内容について丁寧にわかりやすく発表しており、質問に対しても的確かつ誠実に答えられていた。本学の学位論文として相応しい内容であったと判断した。