

研究テーマ

免疫グロブリン療法による末梢神経軸索再生方法の開発

研究代表者

施設名 : 北海道大学大学院医学院

氏名 : 竹内 博紀

研究テーマ：免疫グロブリン療法による末梢神経軸索再生方法の開発

所属先：北海道大学大学院医学院

氏名：竹内 博紀

背景：末梢神経損傷は中枢神経損傷と比較して予後は良好とされているが、末梢神経損傷後の臨床成績は、必ずしも良好ではない。これは、損傷早期での軸索再生速度が遅いことや軸索の再生量が少ないために生じると考えられる。末梢神経損傷後の治療方法も未だ、直接縫合や自家神経移植が主流である。近年、人工神経などの使用も可能となったが、適応が限られる点や自家神経移植よりも臨床成績が劣る。末梢神経損傷後の効果的な治療方法は開発されていない。

我々は末梢神経損傷後のワーラー変性部では、損傷後12時間をピークとして神経上膜に好中球が集積すること、神経上膜に集積する好中球が細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps, NETs) を分泌すること、神経上膜に集積するNETsを阻害することで、ワーラー変性部のマクロファージの神経実質部の集積が促進し、髄鞘デブリス除去、さらに軸索再生が促進することを報告した (Y Yamamoto, Life Science Alliance, 2022)。さらに、近年、免疫グロブリン (Immune globulin, IgG) 投与が、好中球からのNETs分泌阻害効果を持つことが示唆されている。

目的：本研究の目的は、ラット坐骨神経を使用して、圧挫損傷後のIgG投与が、神経上膜に集積する好中球のNETs分泌を阻害し、軸索再生と機能回復を促進するか検討することである。

方法①：IgG投与による好中球のNETs分泌阻害効果の検討

Lewis ratの坐骨神経圧挫損傷モデルを作成し、損傷直後に腹腔内にIgG 2000mg/kgを投与。コントロールとして生理食塩水の腹腔内投与を行った。各群N=3とした。損傷12時間後に灌流固定を行い、坐骨神経の凍結切片を作成。免疫染色 (CitH3, MPO, DAPI)を行い、損傷部から10mmで評価を行った。

方法②：IgG投与が末梢神経損傷後のワーラー変性部に与える影響の検討

Lewis ratの坐骨神経圧挫損傷モデル、切断縫合モデルを作成し、損傷直後に腹腔内にIgG 2000mg/kgを投与。コントロールとして生理食塩水の腹腔内投与を行った。各群N=3とした。圧挫損傷モデルでは損傷後1週間、切断縫合モデルでは縫合後3週間で灌流固定を行い、坐骨神経の凍結切片を作成。免疫染色 (CD68, β 3 tubelin)を行い、損傷部から5mm毎に評価を行った。

方法③：IgG投与が末梢神経損傷後の機能回復に与える影響の検討

Lewis ratの坐骨神経圧挫損傷モデルを作成し、損傷直後に腹腔内にIgG 2000mg/kgを投与。コントロールとして生理食塩水の腹腔内投与を行った。各群N=10とした。評価項目として損傷後3週間で感覚機能検査、運動機能検査、損傷後6週間で感覚機能検

査、運動機能検査、神経生理機能検査を行った。感覚機能検査、運動機能検査に関しては以下の通りに行った。

Electric von Frey試験（損傷後3週、6週）

マウスを遮光したケースに入れて、10分間自由に行動させた。マウスが落ち着いた後に、ダイナミックプランター・エスチオメータ (UGO BASILE, Gemonio, Italy)のフィラメントを、10g/20秒の強度でマウスの両前後肢の中心に当てた。マウスが肢を払うまでの時間を、それぞれ5回ずつ計測し、その中央値3回分の平均値を反応時間として計測した。

熱刺激試験（損傷後3週、6週）

マウスを直径5cmの遮光した筒に入れて、1分間拘束した。プランター式鎮痛効果測定装置(UGO BASILE, Gemonio, Italy)のIR光源を50°Cの強度でマウスの尾の中央に当て、尾を払うまでの時間を5回計測した。マウスは計測後、自由に行動させ、次の計測までに最低5分間のインターバルを設けた。中央値3回分の平均値を反応時間として計測した。

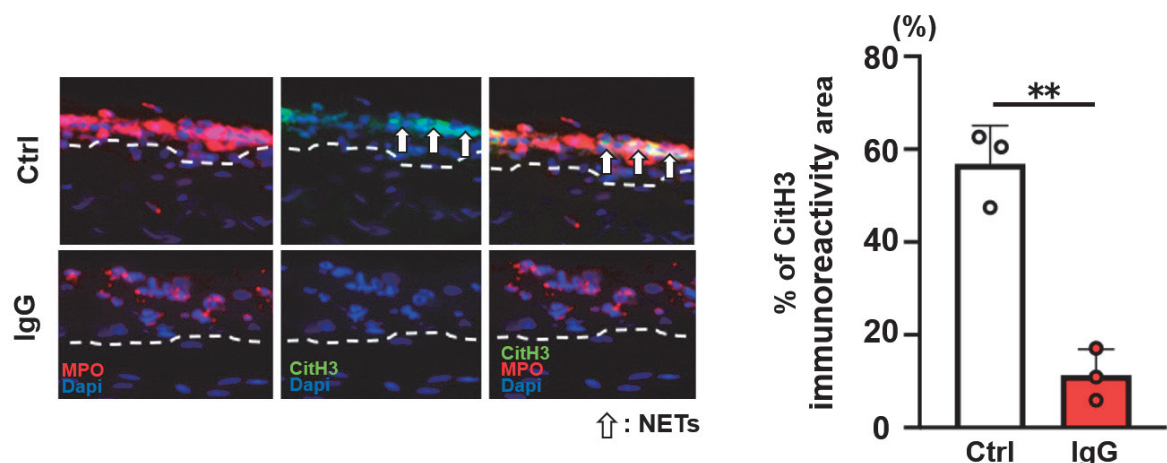
トレッドミル歩行解析試験（損傷後3週、6週）

透明な床のトレッドミル歩行解析機器 (DigiGait) (Mouse Specific, Inc., MA, USA)にマウスを入れて、15cm/sの速度で歩行させた。マウスの前後肢を、下からハイスピードカメラを用いて連続撮影し、その歩容をDigiGaitマウス用歩行解析システム (Mouse Specific, Inc., MA, USA)を用いて解析した。

統計学的手法として、スチューデントのt検定を用いて各項目を統計学的に解析した。p値<0.05を統計学的有意とした。

結果①

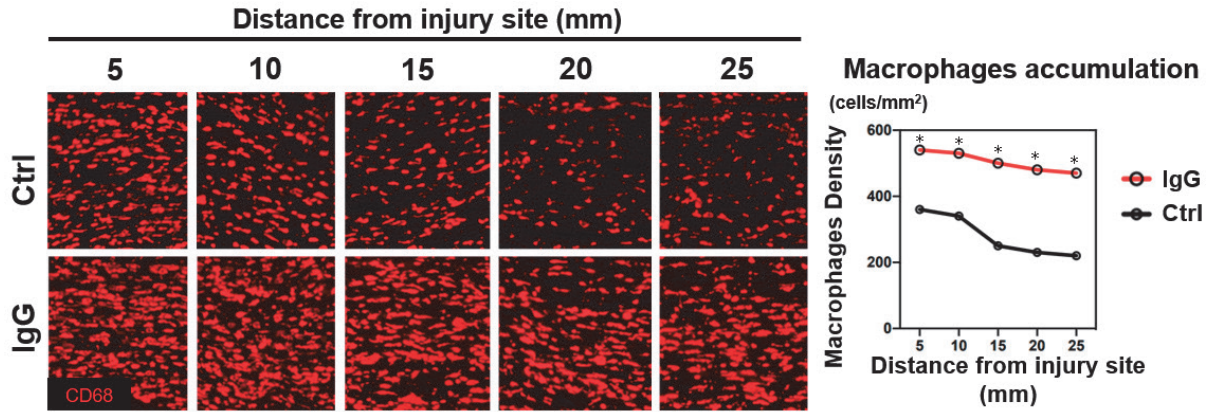
IgG投与後のラット坐骨神経圧挫損傷後の免疫染色像と解析結果を示す。



CitH3の染色がNETs発現を反映している。IgG投与により、CitH3で染色される面積がコントロール群と比較して有意に減少した。以上のことからIgG投与により神経上膜に集積する好中球からのNETs分泌が抑制された。

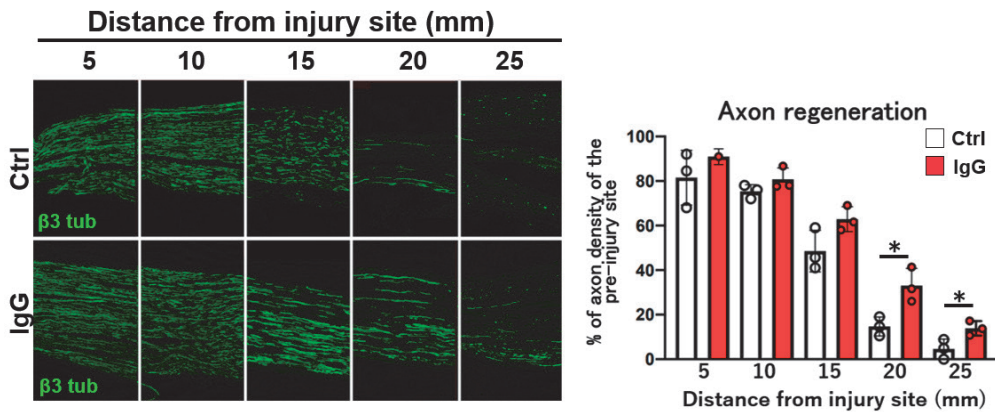
結果②

ラット坐骨神経圧挫損傷1週間後のマクロファージに対する免疫染色像と解析結果を示す。



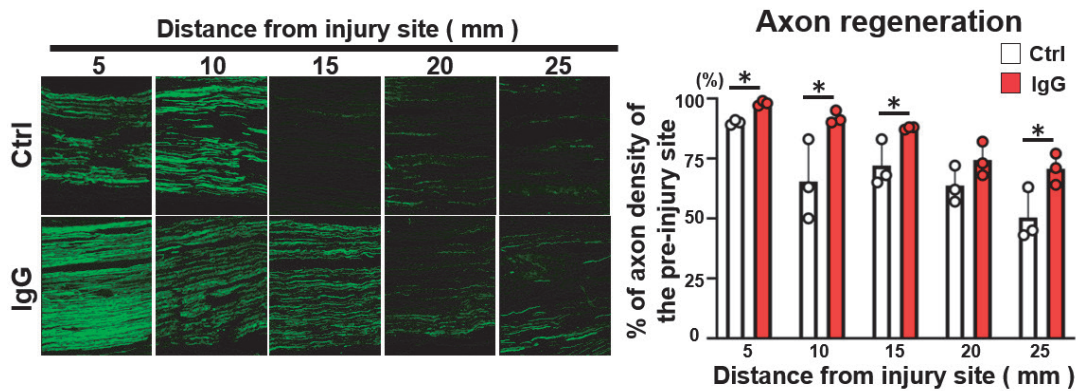
IgG投与により、コントロール群と比較してマクロファージの神経実質内浸潤が有意に促進した。

ラット坐骨神経圧挫損傷1週間後の軸索に対する免疫染色像と解析結果を示す。



IgG投与により、コントロール群と比較して圧挫損傷後1wの軸索再生が有意に促進した。

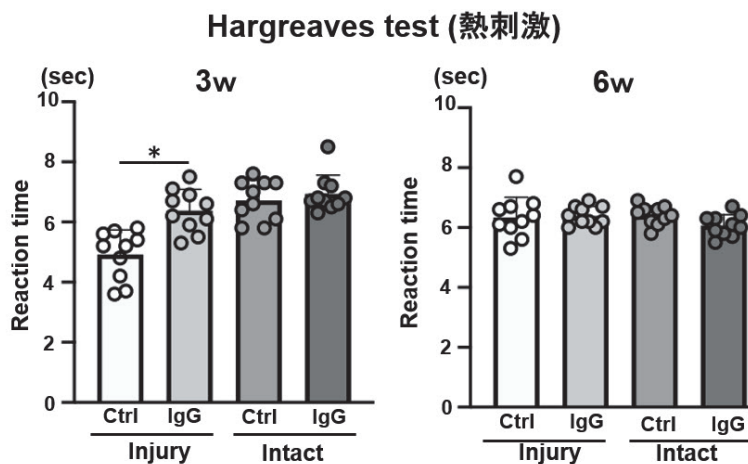
ラット坐骨神経切断損傷1週間後の軸索に対する免疫染色像と解析結果を示す。



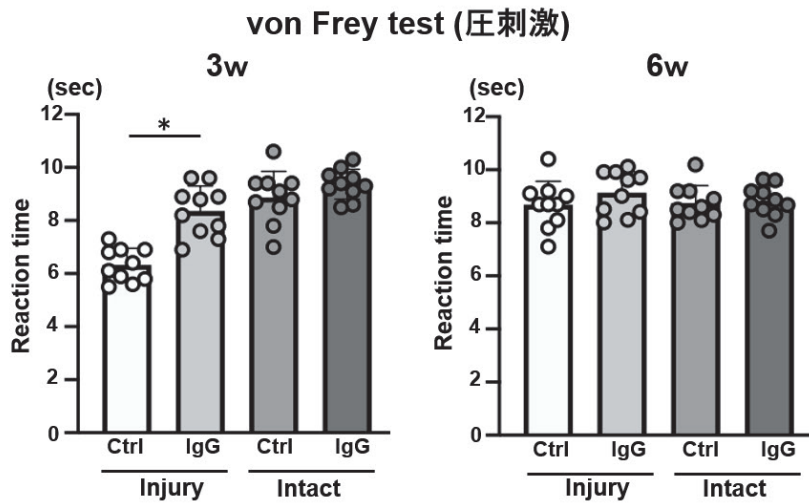
IgG投与により、コントロール群と比較して切断損傷後3wの軸索再生が有意に促進した。

結果③

ラット坐骨神経圧挫損傷3週間後と6週間後の感覚機能検査の解析結果を示す。

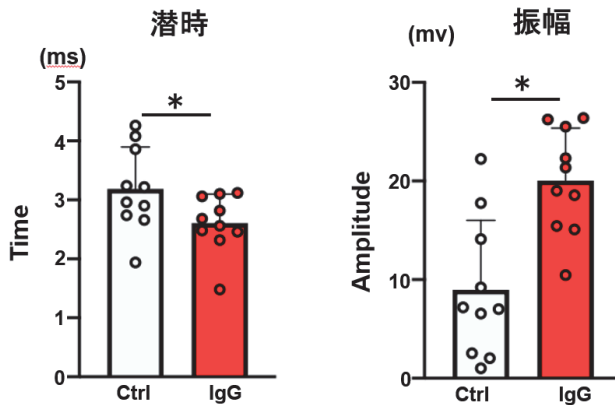


Hargreaves testにてコントロール群がIgG投与群と比較して、損傷後3週において低下を認めたが、6週ではIgG投与群とコントロール群に有意差は認めなかった。以上の結果から、IgG投与により、損傷後3週の熱刺激に対する閾値を改善した。

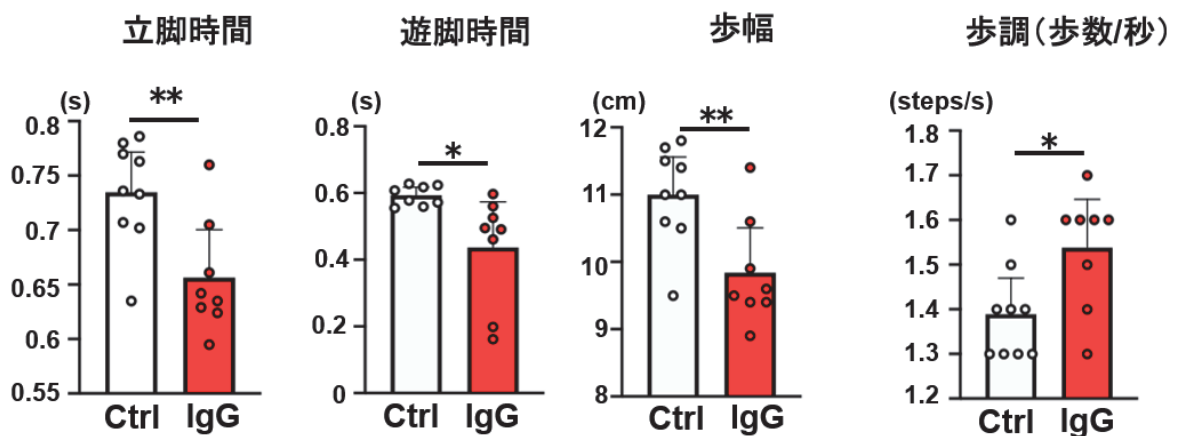


Von Frey testにて、コントロール群がIgG投与群と比較して損傷後3週で低下を認めしたが、6週ではIgG投与群とコントロール群に有意差は認められなかった。以上の結果から、IgG投与により損傷後3週の圧刺激に対する閾値を改善した。

前脛骨筋に対する神経生理機能検査を示す。



IgG投与がコントロール群と比較して潜時、振幅ともに改善した。損傷後6週間での歩行解析結果を示す。



IgG投与群がコントロール群と比較して、立脚時間、遊脚時間、歩幅、歩調において、歩行機能を改善した。

考察

IgG投与により好中球からのNETs分泌が抑制された。過去の報告からIgGが好中球のFCガンマ受容体に結合すると好中球からラクトフェリン放出を誘導する。ラクトフェリンは鉄結合性の糖蛋白であり正の電荷をもつ。NETsの成分であるDNAを構成するアミノ酸の持つ負の電荷と電子相互作用を介して、結合することで好中球からのNETs放出を抑制していると想定される。IgGの投与量として、臨床例では400mgを5日日間連続で投与、あるいは2000mg/kgの単回投与がある。一般的な投与方法としては前者であり、後者は重症な川崎病などに限られる。今回は腹腔内に2000mg/kgと高容量を用いているが、マウスに対する予備実験において400mg/kgの静脈内投与でもNETs分泌抑制を確認している。そのため腹腔内では吸収率の問題があり高容量で投与したが、静脈内投与であれば臨床における通常投与量で効果を期待できる。IgGの静脈内投与で一番多い副作用としては頭痛や倦怠感などが報告されている。これらは投与速度を遅くすることで予防できる。また投与後に顆粒球減少の副作用もあるが、一過性であり臨床で問題になることはほとんどない。以上のことから安全に投与可能であると考えられる。

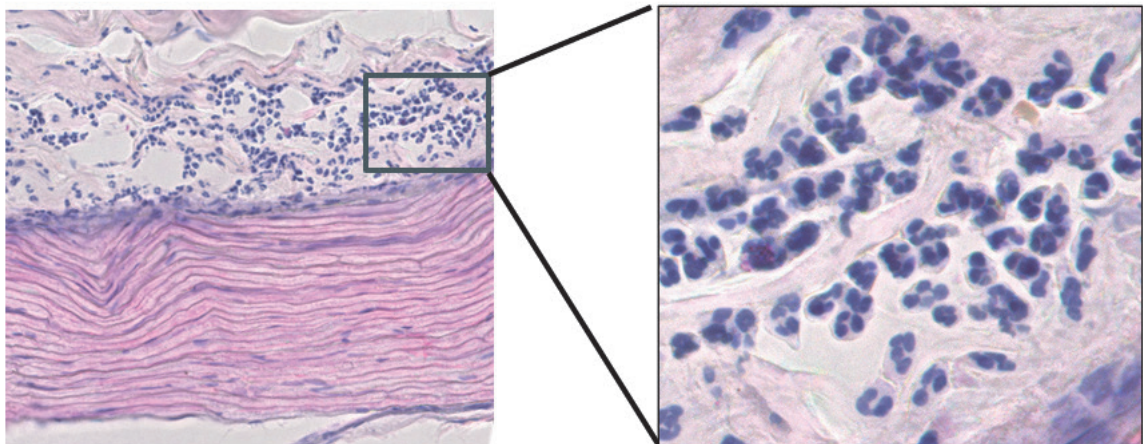
末梢神経損傷後のワーラー変性部に集積する好中球からのNETs分泌を阻害することで、損傷後早期でのマクロファージの神経実質内集積を促進し、ミエリンクリアランスを促進し、軸索再生を促進した。さらにIgG投与が圧挫、切断損傷でもワーラー変性部修復機転を促進することが明らかとなった。これは損傷形態に依らずIgG投与が末梢神経損傷後の軸索再生を促進することを明らかにした。さらに今回の結果から、IgG投与によりラットの坐骨神経圧挫損傷後早期の感覚機能を改善したことから、早期での軸索再生を促進することが明らかとなった。3週の時点でコントロール群の閾値が低下しており、感覚過敏の状態と考えられる。これは、3週の時点で、コントロール群でも受容器に軸索が到達しているが、接続が不完全であり、その状態で刺激が加わると過剰な情報として伝達されることを想定している。実際の臨床でも一過性に痛覚過敏の状態となり、通常の状態に戻ることを経験している。また、損傷後6週で感覚機能に差がなかったことは、ラットでは損傷部から受容器までの距離が数cm程度であり、圧挫損傷は予後が良好なことが知られている。従って、6週の時点でコントロール群でも受容器まで軸索が十分に到達し、受容器との接続も完成していることが想定される。これは動物モデルの限界であり、臨床例では、損傷部位によっては、受容器までの距離が長いことも想定されるため、動物モデルよりも効果が期待できる。また損傷後6週での神経伝導機能を改善し、歩行解析にても機能回復を促進していた。一般的に感覚神経損傷よりも、運動機能損傷の予後は不良である。これは、感覚神経の細胞体は神経根にあるが、運動神経の細胞体は脊髄にあること、感覚神経では無髄

神経も含まれるが、運動神経では再髄鞘化が必要なことが理由として考えられる。しかし、今回の結果ではIgG投与により、運動神経の再生も促進した。

現在、IgG製剤は自己免疫疾患などにおいて、既に使用されている。点滴で投与可能なため、安全で簡便に投与可能である。点滴投与であるため、局所展開も不要であり、体位による圧迫などが原因となる、腓骨神経麻痺や橈骨神経麻痺にも、治療適応となる。以上のことから想定される臨床応用としては、全ての末梢神経損傷が適応となり、損傷同日に、IgGの単回投与を、自己免疫疾患と同様の投与量で行う。これらは安全性の高い既存薬を使用するため、実現性の高い方法である。しかしながら、臨床応用の前に、今回の齧歯類で観察された好中球集積が、臨床例でも認められるかを確認する必要がある。現在多施設臨床研究により、臨床例において、切断指などの末梢神経損傷後や遊離皮弁採取時に不要となった神経に関して、好中球の時空間的推移を検討している。症例数は少ないが、臨床例においても末梢神経損傷後ワーラー変性部において、好中球が神経上膜に集積していることを確認できた。今後症例数をさらに増やし検討を行っていく予定である。

臨床例での末梢神経損傷後ワーラー変性部でのH.E.染色

損傷後約3時間でワーラー変性部の神経上膜に好中球が集積している。



結語

ワーラー変性部の神経上膜に集積する好中球が分泌するNETs阻害を阻害することでワーラー変性部の神経実質内に集積するマクロファージの浸潤が促進し、軸索再生が促進した。IgG投与により、ワーラー変性部の神経上膜に集積するNETs発現が阻害され、感覚機能、神経伝導機能、歩行機能の回復が有意に促進した。ワーラー変性部神経上膜のNETsは、末梢神経損傷の治療標的となり、IgG投与は末梢神経損傷の新規治療方法となる可能性がある。

【参考文献】

- 1.Yamamoto Y et al. Neutrophils delay repair process in Wallerian degeneration by releasing NETs outside the parenchyma. *Life Science Alliance*.2022 12;5(10)
- 2.Uozumui Ryo et al. Pharmaceutical immunoglobulins reduce neutrophil extracellular trap formation and ameliorate the development of MPO-ANCA-associated vasculitis Short title: Effect of IVIG-S on MPO-AAV. 2020;30(3):544-550
- 3.Cristina Meregalli et at. Human intravenous immunoglobulin alleviates neuropathic symptoms in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neurotoxicity. *Int J Mol Sci*.2021 21;22(3):1058
- 4.Okubo Kosu et al. Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EbioMedicine*.2016;10:204-15.
5. Victoria Mutua et al. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;61(2):194-211
- 7.Vidal Delgado-Rizo et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. *Front Immunol*. 2017 6:8:81
- 8.Andrea Kuhnle et al. Polysialic acid modulates the binding of external lactoferrin in neutrophil extracellular traps. *Biology(Basel)*. 2019 28;8(2):20
9. Ron M G et al. Nerve physiology. Mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin* 2013. 29(3):317-30.
- 10.Chanyang Ju et al. Peripheral Nerve Regeneration after Injury and Rehabilitation Managements. *PLos One*. 2020. May 26;15(5).
- 11.Max Modrak et al. Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. *J Neurosci Res*.2020 May;98(5):780-795
- 12.Jill E Shea. Side-to-side nerve bridges reduce muscle atrophy after peripheral nerve injury in a rodent model. *J Surg Res*. 2014 Mar;187(1):350-8.