おかむら　としゆき
岡村　敏行

（論文内容の要旨）

中枢神経系は神経細胞の他にアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトなど多様な細胞種で構成されている。その中で、ミクログリアは脳内においてマクロファージ様の挙動を示す細胞として知られており、脳内の免疫機構を担う細胞である。種々の神経変性疾患時にミクログリアの活性化が見られることから、近年、脳組織傷害や神経変性疾患における役割が注目されており，ミクログリアの機能解明は神経変性疾患や脳梗塞などの脳疾患の治療薬開発に寄与することができると考えられる。著者はミクログリアの機能の中で、脳組織に傷害を与えることにより生じる、傷害部位への突起伸長、ケモカインの遊離、そして傷害部位への集積という 3 つの機能に着目し、培養脳組織切片を用いた検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章　脳局所傷害時におけるミクログリア突起伸長

脳組織に微細な傷害を与えるとミクログリアは傷害を素早く感知し、傷害部位へとその突起を伸長させ、細胞体を移動させることがこれまでに報告されている。本研究において著者は、蛍光タンパク質である EGFP をミクログリア選択的に発現する Iba1-EGFP トランスジェニックマウスより作製した培養海馬組織切片を用い、レーザー照射により脳組織に局所傷害を与え、ミクログリアの形態変化をタイムラプス顕微鏡を用いて連続的に観察した。その結果、ミクログリアは傷害に対して反応し傷害部位へと突起を伸長させ、傷害後 30 分以内に傷害部位がミクログリアの突起に被覆された。この突起伸長は ATP の受容体である P2 受容体の阻害薬 Reactive Blue-2 および Brilliant Blue G の処置、または ATP の分解酵素である apyrase の処置により抑制された。また、cAMP のアナログである dibutyryl cAMP を処置したところ、突起の伸長が抑制された。これらの結果より、レーザー照射によって生じる脳組織傷害において、傷害細胞から漏出した ATP がミクログリアの突起伸長を惹起すること、また、細胞内シグナル伝達分子である cAMP がミクログリアの突起伸長を抑制的に調節することが示唆された。

第二章　NMDA 誘発神経細胞傷害によるミクログリアでのケモカイン MIP-1α 産生誘導

当研究室ではこれまでに中大脳動脈の閉塞により作製した脳虚血モデルラットの脳でケモカイン MIP-1α および MCP-1 mRNA の産生が増大することを明らかにしている。また、培養大脳皮質線条体組織切片を用いた研究により、NMDA 処置による神経細胞選択的傷害がアストロサイトにおけるケモカイン MCP-1 の発現を誘導することが明らかにしている。本研究では、培養大脳皮質線条体組織切片を用いてケモカイン MIP-1αの発現について検討を行った。リアルタイム RT-PCR により MIP-1αの mRNA 発現について検討したところ、NMDA 処置開始後 6-9 時間をピークとする一過性の発現誘導が認められた。蛍光二重免疫染色により、MIP-1αタンパク質に関し mRNA と同様のタイムコースで産生が増大すること、MIP-1αを発現している細胞の大部分がミクログリアであることが示された。さらに、MIP-1α mRNA 産生誘導におけるミクログリアの寄与を確認するために、リポソームに封入したクロドロン酸を処置することで、培養脳組織切片よりミクログリアを選択的に除去し、NMDA 処置による MIP-1α mRNA 発現を検討した。その結果、ミクログリアを除去した培養脳組織切片では NMDA 処置による MIP-1α mRNA の発現誘導が消失した。以上の結果より、NMDA 処置によりミクログリアにおいて MIP-1αの発現が誘導されることが明らかとなった。

第三章　NMDA 誘発神経細胞傷害によるミクログリアの傷害部位への集積

脳虚血モデル動物を用いた研究により、海馬神経細胞の虚血細胞死により活性化ミクログリアが錐体細胞層や顆粒細胞層に集積することが報告されている。著者は Iba1-EGFP トランスジェニックマウスより作製した培養海馬組織切片を用いることにより、NMDA 処置による神経細胞選択的傷害時のミクログリアの動態を連続的に観察した。NMDA 処置後の培養海馬組織切片において、傷害細胞のマーカーである propidiumu iodide (PI)の蛍光が錐体細胞層で観察された。EGFP で標識されたミクログリアは、観察開始直後には培養海馬組織切片上にほぼ均一に分布していたが、時間とともに錐体細胞層への集積が観察された。この集積は NMDA 処置後 3 日後から見られ、5-6 日後をピークとしていた。詳細な検討を行ったところ、傷害された神経細胞がミクログリアにより貪食、除去される様子が観察され、また、PI の蛍光も時間とともに減少した。リポソームに封入したクロドロン酸を処置することによりミクログリアを除去した培養海馬切片では、PI 蛍光の減少が抑制された。以上の結果から、ミクログリアは傷害部位へと集積し、傷害された神経細胞を貪食、除去する役割を担っていることが示唆された。

以上、著者は、培養脳組織切片を活用することにより、脳局所傷害によりミクログリアが傷害部位へと突起を伸長させ傷害部位を被覆すること、その細胞間情報を媒介する分子として ATP が、また細胞内シグナルを制御する分子として cAMP が関与することを示唆する結果を得た。さらに、神経細胞傷害により、ミクログリアにおいてケモカインの一種である MIP-1αの発現が誘導されること、ミクログリアが傷害部位へと集積し、傷害された細胞の除去に関わっている可能性がある事を見いだした。本研究成果は、脳組織傷害を引き金とするミクログリア形態および機能変化の一端を明らかにするとともに、その解析に培養脳組織切片の利用が有効であることを示しており、神経変性疾患や脳虚血におけるミクログリアの役割の解明やミクログリアをターゲットとする新規治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

ふ り が な 氏　　名	おか むら　とし ゆき 岡　村　　敏　之

（論文審査の結果の要旨）

本論文は、ミクログリアの機能の中で、脳組織に傷害を与えることにより生じる傷害部位への突起伸長、ケモカインの遊離、そして傷害部位への集積という 3 つの機能に着目し、培養脳組織切片を用いた検討を行い、以下の新知見を得た。

まず、蛍光タンパク質である EGFP をミクログリア選択的に発現する Iba1-EGFP トランスジェニックマウスより作製した培養海馬組織切片を用い、レーザー照射により脳組織に局所傷害を与え、ミクログリアの形態変化をタイムラプス顕微鏡を用いて連続的に観察した。その結果、ミクログリアは傷害に対して反応し傷害部位へと突起を伸長させ、傷害後 30 分以内に傷害部位がミクログリアの突起に被覆された。この突起伸長は ATP の受容体である P2 受容体の阻害薬 Reactive Blue-2 および Brilliant Blue G の処置、または ATP の分解酵素である apyrase の処置により抑制された。また、cAMP のアナログである dibutyryl cAMP を処置したところ、突起の伸長が抑制された。これらの結果より、レーザー照射によって生じる脳組織傷害において、傷害細胞から漏出した ATP がミクログリアの突起伸長を惹起すること、また、細胞内シグナル伝達分子である cAMP がミクログリアの突起伸長を抑制的に調節することが示唆された。

次に、培養大脳皮質線条体組織切片を用いてケモカイン MIP-1αの発現について検討を行った。リアルタイム RT-PCR により MIP-1αの mRNA 発現について検討したところ、NMDA 処置開始後 6-9 時間をピークとする一過性の発現誘導が認められた。蛍光二重免疫染色により、MIP-1αタンパク質に関し mRNA と同様のタイムコースで産生が増大すること、MIP-1αを発現している細胞の大部分がミクログリアであることが示された。さらに、MIP-1α mRNA 産生誘導におけるミクログリアの寄与を確認するために、リポソームに封入したクロドロン酸を処置することで、培養脳組織切片よりミクログリアを選択的に除去し、NMDA 処置による MIP-1α mRNA 発現を検討した。その結果、ミクログリアを除去した培養脳組織切片では NMDA 処置による MIP-1α mRNA の発現誘導が消失した。以上の結果より、NMDA 処置によりミクログリアにおいて MIP-1αの発現が誘導されることが明らかとなった。

最後に、Iba1-EGFP トランスジェニックマウスより作製した培養海馬組織切片を用いることにより、NMDA 処置による神経細胞選択的傷害時のミクログリアの動態を連続的に観察した。NMDA 処置後の培養海馬組織切片において、傷害細胞のマーカーである propidiumu iodide (PI)の蛍光が錐体細胞層で観察された。EGFP で標識されたミクログリアは、観察開始直後には培養海馬組織切片上にほぼ均一に分布していたが、時間とともに錐体細胞層への集積が観察された。この集積は NMDA 処置後 3 日後から見られ、5-6 日後をピークとしていた。詳細な検討を行ったところ、傷害された神経細胞がミクログリアにより貪食、除去される様子が観察され、また、PI の蛍光も時間とともに減少した。リポソームに封入したクロドロン酸を処置することによりミクログリアを除去した培養海馬切片では、PI 蛍光の減少が抑制された。以上の結果から、ミクログリアは傷害部位へと集積し、傷害された神経細胞を貪食、除去する役割を担っていることが示唆された。

以上、本論文は、培養脳組織切片を活用することにより、脳局所傷害によりミクログリアが傷害部位へと突起を伸長させ傷害部位を被覆すること、その細胞間情報を媒介する分

子として ATP が、また細胞内シグナルを制御する分子として cAMP が関与することを明らかにした。さらに、神経細胞傷害により、ミクログリアにおいてケモカインの一種である MIP-1αの発現が誘導されること、ミクログリアが傷害部位へと集積し、傷害された細胞の除去に関わっている可能性がある事が示された。本研究成果は、脳組織傷害を引き金とするミクログリア形態および機能変化の一端を明らかにするとともに、その解析に培養脳組織切片の利用が有効であることを示しており、神経変性疾患や脳虚血におけるミクログリアの役割の解明やミクログリアをターゲットとする新規治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成２１年２月２３日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。