

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)		氏名	神垣 真由美
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当			
論 文 題 目				
<p>The Toll-like receptor 4-activated neuroprotective microglia subpopulation survives via granulocyte macrophage colony-stimulating factor and JAK2/STAT5 signaling (TLR4 活性化神経保護的ミクログリアは GM-CSF と JAK2/STAT5 シグナル伝達を介して生存を維持する)</p>				
論文審査担当者				
主 査	教授	橋本 浩一	印	
審査委員	教授	今泉 和則		
審査委員	教授	川上 秀史		
〔論文審査の要旨〕				
<p>ミクログリアは脳に定住するマクロファージであり、通常は細く長い突起をはりめぐらせて静止状態にある。ミクログリアはひとたび障害や感染を感知すると速やかに活性化し、傷害局所へ遊走して、異物や死細胞の貪食、神経保護因子の放出を介して脳内の恒常性維持に重要な役割を果たす。しかし、長期に及ぶミクログリアの強い活性化は、炎症性サイトカインや一酸化窒素、活性酸素種などを大量に放出して慢性炎症を引き起こし、アルツハイマー病などの多くの炎症性神経疾患の病態に深く関わることを示唆されている。このようにミクログリアは神経保護と神経毒性の二つの作用を持つが、その機序には不明の点が多い。我々はこれまでに、ラット初代培養ミクログリアにおいて、アストロサイトとの共培養から単離精製したミクログリアは 48 時間以内にはほぼ死滅することを見出した。また、リポ多糖類 (LPS) による Toll 様レセプター 4 (TLR4) の活性化が、濃度依存的にミクログリアの細胞死を誘発すること、この LPS による細胞死を生き抜いた一部のミクログリアは、LPS 無処置群より長期間生存し続けることを報告した。この結果は、LPS に対して異なる反応性を示す集団が存在する可能性を示唆する。通常、ミクログリアはおもにアストロサイトが供給するサイトカインに依存して生存すると考えられている。しかし、TLR4 活性化を受けたミクログリアがどのような機序で生存を維持するのかが不明であ</p>				

る。そこで今回その生存メカニズムを明らかにすることを目的とし、まずミクログリアの生存因子であるマクロファージ・コロニー刺激因子(M-CSF)、M-CSF受容体のリガンドであるインターロイキン(IL)-34、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)をミクログリアが自己産生する可能性について、ラット初代培養ミクログリアを用いて検討した。

LPS 処置ミクログリアにおいては、Quantitative RT-PCR を用いた解析から GM-CSF の mRNA 発現が顕著に増加しており、さらにウエスタンブロットにより蛋白発現も増加していることが確認された。一方、M-CSF、IL-34 の mRNA 発現は LPS 処置により変化は認められなかった。LPS 刺激ミクログリアの生存は、GM-CSF 中和抗体により有意に抑制された。また、LPS 処置後のそれぞれのリガンドに対する受容体の mRNA 発現を検討したところ、M-CSF 受容体には発現変化は認められなかったが、GM-CSF 受容体においては α 、 βc の 2 つのサブユニットのうち βc の有意な発現亢進が認められた。この結果より、LPS 処置ミクログリアの生存維持には GM-CSF の自己産生、およびその受容体の発現亢進が関与する可能性が示された。

次に、GM-CSF 受容体の下流シグナル伝達系の解析を行った。細胞生存に関与する JAK2/STAT5 系に着目し、選択的 JAK2 阻害薬である NVP-BSK805 を用いてミクログリア生存への影響を検討した。LPS 刺激ミクログリアの生存は NVP-BSK805 の前処置により有意に抑制された。さらに、ウエスタンブロットおよび免疫染色から、LPS 刺激により STAT5 のリン酸化が引き起こされること、このリン酸化は NVP-BSK805 の前処置により抑制されることが分かった。また、このリン酸化 STAT5 の染色は核部位において強く検出されたことから、リン酸化 STAT5 の核内移行が示された。このことから、LPS 刺激によるミクログリアの生存には JAK2/STAT5 の活性化が強く関与することが示唆された。

最後に、LPS 処置により長期間生存し続けるミクログリアが神経保護的か、傷害的であるかを検討するために、トランズウェルを用いて神経とミクログリアの共培養を行った。単独培養した神経細胞は LPS の有無に関わらず 7 日目までに多くは死滅したが、ミクログリアと共培養することで神経細胞死は有意に抑制された。この神経細胞死抑制作用は LPS 処置ミクログリアにおいても認められた。一般的に LPS 刺激したミクログリアは神経傷害的であると報告されているが、この結果より LPS 処置による TLR4 活性化生存ミクログリアは神経傷害的ではなく、むしろ神経保護的な役割を担うサブポピュレーションである可能性が明らかとなった。

以上の結果から、本論文は炎症時におけるミクログリアの異なる機能的集団の役割を明らかにし、ミクログリアを標的とする新しい神経疾患治療の開発の基礎につながる可能性を見出した。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。