[課程―２]

[審査の結果の要旨]

氏名　木原　泰行

本研究は様々な疾患で重要な役割を担っている脂質メディエーターの多発性硬化症における役割を解析するために、多発性硬化症のマウスモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）を用いて血小板活性化因子（PAF）及びアラキドン酸カスケードの役割解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

１．　野生型 C57BL/6 マウス（WT）に MOG 抗原を用いて EAE を誘導し、未免疫マウス及び誘導期、急性期、慢性期の EAE マウスより脊髄を採取し、LC-MS/MS により脊髄中の PAF 量を、定量的 PCR 法により PAF 受容体発現量を測定した。PAF 量、PAF 受容体発現量共に、急性期で劇的に上昇し、慢性期では未免疫マウスより高い値を保っていたものの急性期よりは有意に低下していた。また、PAF 量、PAF 受容体発現量共に、EAE の臨床症状と正の相関を示した。

２．　PAF 受容体欠損マウス（PAFR-KO）および WT に EAE を誘導して臨床症状の推移、脊髄病巣部の病理学的解析、脊髄中の遺伝子発現、リンパ球の抗原への応答を解析した。PAFR-KO マウスは WT に比べて臨床スコアの上昇と体重低下が有意に抑制されていること、組織学的観察により脱髄・炎症の程度も軽減していることを示した。また、PAF 受容体欠損マウスは発症率が有意に低く、脊髄中のサイトカイン・ケモカイン類の mRNA 発現量も低いことが、マイクロアレイ解析により明らかとなった。脾臓及びリンパ節の細胞の MOG 抗原に対する細胞増殖、サイトカイン産生、及び EAE マウスの抗原特異的な抗体価には差が認められなかった。

３．　PAFR-KO 及び WT よりチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを調整し、PAF 存在下での貪食能及びそれに伴う TNF-α 産生能を測定した。WT のマクロファージは PAF 存在下でドン職、TNF-α 産生とも亢進した。一方で PAFR-KO のマクロファージではそれらの亢進は認められなかった。

４．　WT に MOG 抗原を用いて EAE を誘導し、未免疫マウス及び誘導期、急性期、慢性期の EAE マウスより脊髄を採取し、定量的 PCR 法によりホスホリパーゼ A_2（PLA_2）及び PAF 合成酵

素（LysoPAFAT）の mRNA 発現量、Western blotting により LysoPAFAT 発現量、さらに PLA_2、LysoPAFAT、PAF 分解酵素（PAF-AH）の酵素活性を測定した。脊髄中における cPLA2α の発現量と酵素活性及び、PAF 合成酵素の発現と酵素活性が EAE の臨床症状と相関して推移した。さらに、cPLA2α 活性と PAF 合成酵素活性も強く相関していることを示した。PAF-AH 活性は EAE の臨床症状に関わらず一定の値を示した。

５．　WT マウスの神経系初代培養（神経、アストロサイト、マイクログリア）、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の mRNA を調整し、RT-PCR 法により LysoPAFAT の発現を解析した。LysoPAFAT の mRNA 発現はマイクログリアに強く認められ、アストロサイトにも発現が認められたが、神経及び T 細胞にはほとんど発現が認められなかった。

６．　WT に MOG 抗原を用いて EAE を誘導し、未免疫マウス及び誘導期、急性期、慢性期の EAE マウスより脊髄を採取し、LC-MS/MS により脊髄中のエイコサノイド量を、定量的 PCR 法によりアラキドン酸カスケードに関与する遺伝子群の発現量を測定した。ナイーブマウスの脊髄中には測定したエイコサノイドの全てが検出され、PGD_2 が最も豊富に存在していた。EAE 誘導後、脊髄では発症直前から慢性期まで継続して５-リポキシゲナーゼ（5-LO）代謝産物含量の低下が認められた。シクロオキシゲナーゼ（COX）代謝産物については、急性期に PGD_2 及び PGI_2 含量が減少する一方で、PGE_2 が脊髄でもっとも豊富に存在するエイコサノイドとなることが示された。これらの脂質を産生する酵素群の発現量は、おおむね代謝産物量と同様の変動を示したが、5-LO 代謝経路の酵素と受容体の遺伝子発現は代謝産物量の低下と相反して急性期に劇的に上昇していた。特に急性期のロイコトリエン B4 第一受容体（BLT1）の発現は未免疫マウスに比べて 40 倍と非常に高い値を示した。

７．　BLT1-KO マウス及び WT に EAE を誘導して臨床症状の推移、脊髄病巣部の病理学的解析を行った。BLT1-KO マウスは WT に比べて臨床スコアの上昇と体重低下が有意に抑制されており、発症が遅れることが明らかとなった。組織学的観察により炎症の程度も軽減していることを明らかにした。

以上、本論文は多発性硬化症モデルの EAE において、PAF 及びエイコサノイドが病態形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。多発性硬化症の病態解明や新規治療法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。