

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 倉岡 睦季

### Pathophysiological roles of mast cell in brain ischemic models of mice (マウス脳虚血モデルにおけるマスト細胞の役割)

人口の高齢化が進み、脳虚血疾患は深刻な問題となりつつある。脳神経障害による影響は患者の死亡、後遺症による QOL 低下など、多大な社会的・経済的負荷を与える。脳虚血の基礎病態、治療に関する研究は盛んに行なわれているが、未だ不明な点が多い。本研究ではまずマウスにおける局所脳虚血病態モデルの効率的な作製方法を検討した。次いで、局所および全脳虚血モデルを用いて脳虚血急性期におけるマスト細胞の関与する病態機序を解析した。

#### 第一章 遠位中大脳動脈直接閉塞法を用いたマウス局所脳虚血モデルの作製

脳を支配する動脈は頸動脈が移行した Willis 環より派生するが、片側頸動脈閉塞時でも脳は側副循環による血液供給を受けていると考えられる。従って、閉塞部位が近位にあるほど脳虚血病変にばらつきが出る可能性が高い。本章ではマウスを開頭し、直接遠位中大脳動脈に閉塞処置を行った脳虚血モデル（遠位中大脳動脈直接閉塞モデル）を作製し、そのモデルの性状について総頸動脈片側閉塞モデルと比較し、解析を行った。遠位中大脳動脈閉塞群では大脳皮質域に一定の虚血病変が誘導され、処置後 24 時間で病巣は最大となった。全個体は生存し、効率よく脳組織材料を得ることができた。一方、片側総頸動脈閉塞群では一部のマウスは死亡し、しかも虚血後 24 時間後の虚血病変に大きなばらつきが認められた。以上の結果から、遠位中大脳動脈直接閉塞法は局所脳虚血病変を効率良く誘導するための有効な手法であることが示された。

#### 第二章 マウス脳虚血モデルにおけるマスト細胞の役割に関する検討

脳虚血急性期は脳半球の膨張を特徴とする脳浮腫が発生する。脳浮腫は細胞膨化や滲出液増加から進行する病態で臨床的に非常に重要な点であるが、その発生機序は十分に解明されていない。しかし、近年脳浮腫を伴う虚血病態にマスト細胞が関与していることが示唆され、注目されている。すなわち、マスト細胞は大脳皮質、海馬および間脳の実質あるいは血管壁周囲に局在し、産生するヒスタミンや TNF- $\alpha$  あるいはサイトカインを介して、血管透過性の亢進ならびに免疫細胞の活性化・遊走に働いているのではないかと推定されている。そこで、本章ではマスト細胞の機能を調節する薬剤およびマスト細胞機能不全マウスを用いて、脳虚血病態におけるマスト細胞の役割を脳浮腫による虚血病巣の膨張に着目して検索した。マスト細胞を活性化させる Compound 48/80 あるいは安定化させる Cromoglycate を投与した中大脳動脈永久閉塞モデルマ

ウスの脳虚血病変領域はそれぞれ増加ないし減少傾向を示した。また、マスト細胞を欠損する *W/W<sup>u</sup>* マウスの脳虚血病変領域は野生型 (WT) マウスのもよりも有意に減少した。これらの変化は、虚血後 12 時間・2 日で最も顕著であった。以上の結果から、マスト細胞の活性化が初期の脳虚血病巣の膨張に強く影響していることが示唆された。

### 第三章 マスト細胞欠損マウスを用いた全脳虚血モデルにおける MMP 発現の解析

Matrix Metalloproteinase (MMP) は細胞外基質分解酵素として知られ、その過剰発現は組織破壊・炎症を促進させる。脳虚血病態においても MMP は脳血管基底膜を破壊し、血液脳関門を破綻させて滲出液を増大させる可能性が考えられる。脳虚血急性期で MMP-9 および MMP-2 の発現が増加することが知られているが、マスト細胞との関連については不明である。そこで、本章では MMP 発現と炎症病態の進行機構におけるマスト細胞の働きに着目して検索を行なった。なお、本実験ではマスト細胞欠損 *W/W<sup>u</sup>* マウスおよび WT マウスに両側総頸動脈閉塞処置を行ない (全脳虚血)、再灌流後 24 時間の脳の虚血病変および MMP の発現を比較した。その結果、*W/W<sup>u</sup>* マウスの虚血後の血管透過性は WT マウスと比較して著しく減少した。また、全脳虚血処置を行った *W/W<sup>u</sup>* マウスの MMP-9 活性は WT マウスのそれよりも有意に減少していた。これは虚血病変周辺の MMP-9 陽性神経細胞の減少が反映された結果であると考えられた。以上の結果から、マスト細胞は炎症性刺激を介して神経細胞の MMP-9 産生を促進し、滲出液増加を中心とした病巣膨張に関与する可能性が示唆された。

以上の結果は、マウスを用いた脳虚血モデルに関する知見を充実させ、特にマスト細胞が脳虚血後の脳浮腫の誘導に強く関与していることを示唆した。これらの研究成果は獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値のあるものと認めた。