

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 順一

本研究は脊髄損傷におけるグリア前駆細胞の役割の解明のために、最初にラット脊髄損傷モデルをもちいて、反応性グリア前駆細胞数の経時的变化を観察した。次に、野生型マウスを用いて損傷脊髄内の炎症性サイトカインの測定を行った。ここでグリア前駆細胞の細胞株（CG-4 細胞）に炎症性サイトカインを添加し細胞毒性の解析を行い、最後に IFN γ 受容体欠損マウスに脊髄損傷モデル作成し、脊髄内の反応性グリア前駆細胞の解析を行い下記の結果を得ている。

- 1 ラット脊髄に損傷を作成し、損傷脊髄に GFP 発現レトロウイルスベクターを感染させ、損傷に応じて増殖する細胞を標識した。損傷脊髄内でこの反応性グリア前駆細胞を免疫染色し解析した。損傷後 4 日目に比較して 7 日目では反応性グリア前駆細胞は減少していた。またグリア前駆細胞を NG2⁺ で染色すると、アポトーシスのマーカーである TUNEL⁺ と 2 重陽性となることを確認し、細胞の減少には細胞死が関わっていることを示した。
- 2 野生型マウスに脊髄の損傷を作成し、損傷脊髄内の mRNA 発現量を real time PCR にて定量測定を行った。損傷脊髄では、IL-1 β , TNF α は急性期から IFN γ は亜急性期から発現していることが示された。
- 3 グリア前駆細胞における炎症性サイトカインの直接作用を解析する目的で、CG-4 細胞に対して、IL-1 β , TNF α , IFN γ を添加し、MTT assay, DNA fragmentation, Western blotting 法を行った。3 種類の炎症性サイトカインの内、IFN γ だけが時間・濃度依存性に生細胞数の減少、DNA の断片化、cleaved caspase3 蛋白が検出された。よって IFN γ はグリア前駆細胞に直接的に細胞死を誘導することが示された。
- 4 *in vivo* での損傷脊髄内の IFN γ シグナルを証明するために、免疫組織染色にて解析を行った。ラット、マウスでは、損傷 3 日目の脊髄横断切片で IFN γ 受容体が確認された。またマウス損傷脊髄では NG2⁺ 細胞と 2 重陽性となっており、グリア前駆細胞に IFN γ 受容体が存在していることが示された。
- 5 *in vivo* おける IFN γ の反応性グリア前駆細胞への作用を解析するため、野生型マウスと IFN γ 受容体欠損マウスの脊髄損傷後の組織切片と後肢運動機能を解析した。IFN γ 受容体欠損マウスでは野生型マウスに比較して正常組織の残存面積が広く、反応性グリア前駆細胞数が保たれていた。また野生型マウスの損傷脊髄内では、Olig2⁺ 細胞が TUNEL

染色と 2 重陽性となっておりグリア前駆細胞が細胞死を起こしていることが示唆された。さらに IFN γ 受容体欠損マウスで、後肢運動機能が有意に改善（損傷後 14 日目）したことから、IFN γ シグナルが生体内においても反応性グリア前駆細胞の細胞死を誘導し、同時に炎症メカニズムにより組織破壊を促進させ、運動機能の悪化に関与していることが示された。

以上、本論文はグリア前駆細胞に対して IFN γ が細胞毒性をもちアポトーシスを誘導することを明らかにした。また IFN γ 受容体欠損マウスを用い、脊髄損傷における反応性グリア前駆細胞保持と組織損傷の軽減の可能性を示した。本研究はこれまで未知に等しかった損傷脊髄に対する炎症制御に IFN γ が果たしている病態の解明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。