

審査の結果の要旨

岡崎 廉太郎

本研究は 細胞内シグナルErk2の、中枢神経炎症制御において果たす役割を明らかにするため、カプリゾン投与マウス脱髄モデルにおけるErk2 コンディショナルノックアウトマウスの解析と、初代培養を用いたミクログリア-アストロサイト細胞間相互作用の解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. 脳梁部脱髄巣ではミクログリアの浸潤、反応性アストロサイトの増加といったグリオオーシスの所見が観察された。脱髄が顕在化した脳梁部では、組織学的あるいは生化学的にErk1/2が活性化しており、リン酸化Erk 陽性細胞の多くがアストロサイトであった。一方、リン酸化Erk 陽性となる成熟オリゴデンドロサイトやミクログリアは僅かであった。
2. 脱髄におけるErk1/2シグナルの関与を検討するため、脳室内カテーテルと浸透圧ポンプを用いて脳室内投与を行ったところ、四肢協調運動の指標となるRota-rodスコアの改善、あるいは脳梁部の炎症関連分子発現が減少した。すなわち脱髄や炎症が軽減しており、Erk1/2シグナルが関与していることが示唆された。
3. 中枢神経特異的なErk2の機能解析のためNestinプロモーター制御下でCre recombinaseを発現するNestin-Cre^{tg}マウスと、Erk2^{flox/flox}マウスを交配させたErk2 cKOマウスを用いた。このmutantマウスでは神経幹細胞由来の細胞でErk2が欠失するため、Creレポーターマウス (B6. Cg-Tg (CAG-floxed Neo-EGFP)) とNestin-Cretgマウスを交配させて得られた成体マウスを解析したところ、神経幹細胞由来のニューロンやアストロサイトでErk2が欠失する一方、骨髄由来のミクログリアやマクロファージではErk2は欠失していなかった。
4. Erk2欠損が、脱髄の特徴である脳梁部のグリオオーシスにもたらす影響について検討したところ、Erk2欠失により脱髄部のアストログリオオーシスが軽減し、ミクログリア/マクロファージの集積が抑制された。また、脳梁部の炎症を定量RT-PCRで評価すると、脱髄部の炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β) や、ケモカイン (Ccl-2、Ccl-3、Ccl-5、Cxcl-10) のmRNA発現がErk2 cKOマウスで減少していた。こうしたグリオオーシスや炎症の変化が脱髄にもたらす影響をLFB染色で検討したところ、Erk2 cKOマウスは脱髄が軽減していた。さらに、Erk2 cKOマウスではRota-rodスコアも改善しており、四肢協調運動機能が保たれていた。以上より、Erk2欠損により、カプリゾン投与後のグリオオーシス、炎症、脱髄が軽減しており、運動機能低下の回避を伴っていた。
5. 脱髄巣における初期病態にErk2欠損による変化の検討では、脳梁組織中のIba1蛋白量

のErk2欠損による有意な変化はなく、またミエリン関連分子MBPとMAGのmRNA発現量はErk2 cK0マウスとErk2^{fllox/fllox}マウスに差がなかった。したがって、Erk2 cK0マウスではカプリゾン投与初期のオリゴデンドロサイト障害やミクログリア活性に影響していないと考えられた。

6. 単離された初代培養系を用いて、アストロサイトにおけるErk2シグナルが炎症環境において炎症関連分子産生に関与しているかを検討した。ミクログリア由来の調整メEDIUMをアストロサイトに添加すると、Erk1/2、p38 MAPK、そしてSTAT3リン酸化および、I κ B α の分解など細胞内シグナル活性化が誘導された。さらに、炎症関連分子のmRNA発現は、Mek阻害薬では濃度依存的に減少しており、炎症環境におけるアストロサイトの炎症関連分子産生は、MAPK、なかでもErk1/2シグナルを介すると考えられた。一方、Erk2 cK0マウスより得られたアストロサイト単離培養に調整メEDIUMを添加するとTNF α 、IL1- β 、Ccl-3発現が増加し、減少はCcl-2のみであった。

以上、本論文は中枢神経脱髄モデルにおけるErk2 cK0マウスの解析、あるいは初代培養を用いたグリア細胞間相互作用の解析から、アストロサイトのErk2シグナルが炎症関連分子産生を介して炎症の増悪に関与することを明らかにした。これらの知見はこれまでに未知なものであり、中枢神経におけるErk2シグナルが重要な働きを担っていると示唆するものである。今後の中枢神経炎症性疾患治療法の解明に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。