



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1880号
学位記番号	論 第1651号
氏名	田村 哲也
授与年月日	平成 29年 6月 30日
学位論文の題名	Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production (神経保護的なエリスロポエチンは活性化ミクログリアによる貪食作用やサイトカイン産生を弱める働きがある) Brain Res. Vol.1662 : P.65-74, 2017
論文審査担当者	主査： 松川則之 副査： 飛田秀樹, 祖父江和哉

## 論文内容の要旨

【背景】 エリスロポエチン(EPO)は、腎臓から分泌される造血ホルモンであり、組織の酸素欠乏に反応して産生が促進される。腎性貧血に対してEPOはすでに臨床応用されている。近年、中枢神経系におけるEPOの産生、EPO受容体(EPOR)の発現が報告され、EPO-EPORシグナルが神経保護作用を示すことが注目されている。ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、活性化すると形態が変化する。脳血管疾患、炎症性神経疾患、神経変性疾患などにおいて傷害を受けた神経細胞の周囲に活性化ミクログリアの存在が確認されている。活性化ミクログリアは、神経細胞に対して傷害的にも保護的にも働くが、活性化ミクログリア由来の液性因子や過剰な貪食作用が神経細胞に傷害的な作用を及ぼすため、ミクログリアの活性化を調節することが神経保護の観点で重要と考えられた。著者らは、本研究の中で、中枢神経系の中でもミクログリアにEPORが高発現していることを見いだした。現在、活性化ミクログリアに対するEPOの作用に関しては議論があるが、ミクログリアにEPORが高発現していることからEPO-EPORシグナルがミクログリア活性を調節して神経保護作用を発揮するという仮説を立てた。

【方法と結果】 1日齢Wistarラットの脳より神経細胞とグリア細胞を初代培養し、EPORの発現を定量的RT-PCRと細胞免疫染色により解析したところ、ミクログリアでEPORの高発現が認められた。培養系を用いた解析では、ミクログリア細胞株BV-2細胞に対してリポポリサッカライド(LPS) 10ng/ml刺激で上昇した炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)とiNOS(誘導型一酸化窒素合成酵素)の遺伝子発現が、EPO 10mIU/mlの投与により有意に低下した(P<0.01)。次に、BV-2細胞に対してLPS 10ng/ml刺激後の貪食能を蛍光標識ビーズを用いて評価したところ、LPS単独刺激で増加した貪食能がEPO 10mIU/mlの投与により有意に抑制された(P<0.01)。実験動物を用いた解析では、8週齢の雄のICRマウスに対してLPS 5mg/kgとEPO 5000IU/kgを腹腔内投与し、6時間後に脳を摘出して解析した。LPS 5mg/kg単独刺激により炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)とiNOSの遺伝子発現は有意に上昇し、EPO投与により炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6)の遺伝子発現が有意に低下した(P<0.05)。また、脳の凍結切片におけるミクログリアの形態変化を共焦点顕微鏡で観察したところ、LPS刺激により活性化形態を示すミクログリアの割合が有意に増加し、EPOにより活性化ミクログリアの割合が有意に減少した(P<0.01)。EPOの作用機序の検討として、LPSの下流経路(NF $\kappa$ B、ERK、JNK、p38)とEPOの関係を調査した。その中で、LPSで活性化された下流経路のうちEPOがJNKのリン酸化を抑制する可能性が示唆された。

【考察】 本研究で使用したミクログリア細胞株BV-2細胞は、初代培養ミクログリアの代用として最も使用されており、EPORの発現も確認されている。ミクログリア活性化刺激としては、文献的に汎用されているLPS濃度を使用した。文献によりLPS濃度が異なることでEPOの作用に議論が生じている可能性がある。本研究の細胞レベルの実験では、初代培養ミクログリアとBV-2細胞ともに内因性EPOの発現は認められなかったため、外的なEPO作用を解析できた。生体レベルの実験では、アストロサイトからの内因性EPOの影響は無視できない可能性があったが、著者らの研究で炎症状態ではアストロサイトからのEPO産生が非常に減少することを確認している。また、マウス脳内の炎症性サイトカインは活性化ミクログリア由来限定ではないが、ミクログリアの形態変化を同時に評価することでミクログリアに対するEPOの作用を明らかにした。今回の研究により、LPSで活性化したミクログリアに対して、EPOがミクログリアの活性化を抑制し、炎症性サイトカイン産生および傷害的な貪食の抑制により神経保護効果を発揮している可能性が示唆された。さらに、EPOによるミクログリア活性化抑制には、JNK経路の関与が考えられた。EPOのミクログリア活性調節作用をさらに研究していくことで、ミクログリアが活性化している様々な脳神経疾患における新しい神経保護治療の発展に寄与できると考えられた。

【結論】 LPS刺激によって活性化されたミクログリアの活性をEPOが抑制することを細胞レベルおよび生体レベルで明らかにした。EPOはミクログリアの活性を調節することで脳神経保護効果を発揮している可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

エリスロポエチン(EPO)は、腎臓から分泌される造血ホルモンであり、組織の酸素欠乏に反応して産生が促進される。近年、中枢神経系におけるEPO-EPORシグナルが神経保護作用を示すことが注目されている。一方、ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、活性化すると形態が変化する。各種中枢神経疾患における傷害神経細胞の周囲に活性化ミクログリアの存在が確認されている。活性化ミクログリアには、神経細胞への傷害性と保護性の二種類が存在する。傷害性活性化ミクログリア由来の液性因子や過剰な貪食作用は神経細胞傷害を促進するため、ミクログリアの活性化調節が神経保護の観点から重要である。本研究では、EPO-EPORシグナルの観点から傷害性ミクログリア活性を調節して神経保護作用を発揮するという仮説のもとに実験を行った。

1日齢Wistarラットの脳より神経細胞とグリア細胞を初代培養し、EPORの発現を定量的RT-PCRと細胞免疫染色により解析したところ、ミクログリアでEPORの高発現が認められた。培養系を用いた解析では、ミクログリア細胞株BV-2細胞に対してリポポリサッカライド(LPS) 10ng/ml刺激で上昇した炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)とiNOS(誘導型一酸化窒素合成酵素)の遺伝子発現が、EPO 10mIU/mlの投与により有意に低下した(P<0.01)。次に、BV-2細胞に対してLPS 10ng/ml刺激後の貪食能を蛍光標識ビーズにて評価したところ、LPS刺激貪食能が有意に抑制された(P<0.01)。個体による検証実験として、8週齢の雄のICRマウスに対してLPS 5mg/kgとEPO 5000IU/kgを腹腔内投与し、6時間後に脳を摘出して解析した。LPS 5mg/kg単独刺激により炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)とiNOSの遺伝子発現は有意に上昇し、EPO投与により炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6)の遺伝子発現が有意に抑制した(P<0.05)。また、脳の凍結切片におけるミクログリアの形態変化を共焦点顕微鏡で観察したところ、LPS刺激により活性化形態を示すミクログリアの割合が有意に増加し、EPOにより活性化ミクログリアの割合が有意に減少した(P<0.01)。EPOの作用機序として、LPS刺激によるJNKのリン酸化を抑制する可能性が示唆された。

審査会では、主査松川則之教授が、primary cultureのglial cultureとneuron cultureのmedia条件、培養におけるマトリゲルの目的、BV-2細胞利用の妥当性など、10項目の質問を行った。第1副査の飛田秀樹教授が、RT-PCRのプライマー設定法、Western blotで核蛋白、細胞質内蛋白、膜上蛋白の分離法など10項目の質問を行った。最後に、第2副査の祖父江和哉教授より脳保護の最近の動向、集中治療におけるせん妄など、主科目の知識に関する点を中心に2項目の質問を行った。いずれの質問に対しても、概ね適切な回答が得られ、学位申請者は、本論文の背景・目的・方法・結果・成果の社会貢献等について十分に理解しており、また、専攻分野(麻酔科学・集中治療医学)に関する知識を十分に習得しているものと判断した。

脳血管障害・神経変性障害など中枢神経系疾患では、炎症機転が関連していることが古くから知られ、治療標的の一つと考えられる。しかしながら、ミクログリアは刺激状況により異なる反応をするために、病態における位置づけは不明な点が多い。本研究は、EPO-EPORシグナルの視点から傷害性ミクログリアを調節し神経保護効果を誘導できることを明らかにした論文であり、今後臨床応用に向け期待をさせるものである。

よって、本論文の著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 松川則之 副査 飛田秀樹、祖父江和哉