

論文審査の要旨

報告番号	保研 第 <b>18</b> 号		氏名	高田 聖也
審査委員	主査	樋口 逸郎		
	副査	米 和徳	副査	沖 利通
	副査	新地 洋之	副査	窪田 正大

Disruption of Midkine gene reduces traumatic brain injury through the modulation of Neuroinflammation

ミッドカイン遺伝子の欠損は神経炎症の調節を通じて外傷性脳損傷を軽減する

主査及び副査の5名は、令和2年2月17日13時00分から13時30分にかけて、学位申請者 高田 聖也 氏に論文発表を行わせ、論文審査を実施した。その発表要旨と審査結果は以下の通りであった。

【はじめに】外傷性脳損傷は直接的な損傷である一時損傷と、神経炎症、酸化ストレス、アポトーシス、免疫炎症反応を含む二次損傷に大別される。二次損傷を軽減することがTBI後の機能改善のために重要であり、二次損傷を調節する因子として、ミクログリアが注目されている。外傷性脳損傷後最初の免疫反応はミクログリア応答である。アストロサイトを活性化して炎症をコントロールするとともに、自身が炎症性のサイトカインを放出するM1型と、抗炎症性サイトカインを放出するM2型に分極化し、炎症反応を微調整する。外傷性脳損傷治療においては、M1型の減少、M2型の増加を促すことが重要である。このM1/M2分極化を調節する因子としてミッドカインに着目した。ミッドカインは中胎生期に発現が増加するヘパリン結合性タンパク質である。近年、ミッドカインの阻害が中枢神経系の自己免疫疾患における過剰免疫を抑制し、中枢神経炎症の調節に効果的であることが報告されており、外傷性脳損傷後の免疫炎症反応にも作用する可能性がある。本研究では、外傷性脳損傷後の免疫応答に対するMKの働きを、ミクログリア/マクロファージ分極に着目して調べた。

【対象と方法】野生型(Mdk+/+)マウスおよびミッドカイン遺伝子欠損型(Mdk-/-)マウスを合計64匹(22.8±2.3g)使用した。流体パーカッションモデルを用いて、外傷性脳損傷(TBI)を作成した。TBI3、7、14日後に神経学的所見や運動機能評価を行い、脳を採取した。Iba1(ミクログリア/マクロファージ)、GFAP(活性化アストロサイト)、CD16/32(M1型マーカー)、Arginase-1(M2型マーカー)、caspase-3(アポトーシス)の発現を免疫組織化学染色で調べた。また、caspase-3と共染色しているNeuN陽性細胞をカウントし、アポトーシス陽性ニューロンの割合を調べた。また、M1型マーカー (CD16、TNF-a、CD11b)とM2型マーカー (CD206、Arginase-1)のmRNA発現量をRT-PCRで調べた。さらに、Flow cytometryを用いて過剰免疫抑制に働く制御性T細胞(Treg)、M1型(CD80、iNos)およびM2型(CD163、Arginase-1)のミクログリア/マクロファージ(CD11b+CD45low/ CD11b+CD45high)の割合を調べた。

【結果】Mdk-/-マウスにおいて、TBI14日後の脳脱落面積が小さく、神経学的重症度も軽度であった。Mdk-/-マウスにおいて、損傷3日後の損傷周囲部におけるIba1発現が有意に低下した一方で、GFAPの発現に有意な差はなかった。TBI3日後の損傷周囲部におけるCD16/32の免疫反応性、TNF-aおよびCD11bのmRNAレベルがMdk-/-マウスにおいて有意に低下した。脳全体におけるCD163+ macrophageの割合がMdk-/-マウスで有意に増加した。Arginase-1+ macrophageの割合がMdk-/-マウスにおいて有意に低下した一方でArginase-1+ microgliaの割合は有意に増加した。iNos+ microgliaおよびmacrophageの発現はほとんど観察されなかった。TregはMdk-/-マウスで増加する傾向を示したが有意な差はなかった。損傷7日後におけるcaspase-3の発現はMdk-/-マウスで有意に低下した。

【結論】

本研究では、MKの欠損が損傷早期におけるミクログリア/マクロファージの遊走減少、損傷周囲部におけるM1型ミクログリア/マクロファージ減少と脳全体におけるM1型のmRNA発現低下、脳全体におけるM2型ミクログリアの増加を促すことを明らかにした。MK欠損によるM1/M2分極調整は、Caspase-3を介したアポトーシスによる神経細胞死を減少させた。その結果、MKの欠損は外傷性脳損傷後の脳脱落面積及び神経学的障害を軽減させることを示唆した。

【審査結果】審査の結果、5名の審査委員は、本研究成果は、ミッドカイン遺伝子の欠損が神経炎症の調節を通じて外傷性脳損傷を軽減するメカニズムを明らかにしたもので、新たな中枢神経損傷後の治療アプローチ確立のための一助になると考えた。以上より、本論文は博士（保健学）の学位論文としての価値を十分に有すると判定した。