

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 森内 裕太

本論文は網膜変性時に活性化が観察されるマイクログリアの役割を明らかにするため、マイクログリアを人為的に活性化できる新たなモデルマウスを作成し、網膜変性のオンセットと病態進展におけるマイクログリアの役割について検討を加えたものであり、下記の結果を得ている。

1. 従来マイクログリアの解析に使われてきた既存の網膜変性モデル動物では、視細胞変性を初発段階として様々な細胞系列が活性化するため、網膜中の活性化マイクログリアの役割を正確に評価することは困難であった。そこで、学位申請者はマイクログリアの活性化に関与する受容体の下流経路である **Ras** シグナルに着目した。マイクログリア特異的かつ誘導的に **Ras** の恒常的活性化型変異体である **RasV12** を発現させることでマイクログリアを任意のタイミングで活性化可能な **Cx3cr1-RasV12** マウスを新たに作出した。
2. 生後 14 日目の **Cx3cr1-RasV12** マウスに、タモキシフェンを皮下投与し、タモキシフェン投与後 7 日目に網膜の組織像の解析を行った。**RasV12** 発現マイクログリアは正常網膜ではマイクログリアが存在しない外顆粒層と神経節細胞層付近で分布していた。また、**RasV12** 発現マイクログリアは増殖能を有することが明らかとなった。以上の結果から、**Ras** シグナルの活性化はマイクログリアの外顆粒層への遊走、増殖を誘導することが明らかになった。さらに、活性化マイクログリアが産生しうる典型的なサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子発現を検討した結果、**Cx3cr1-RasV12** マウスの網膜でサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子発現が上昇していた。従って、本動物モデルでマイクログリアの活性化が誘導されることが明らかになった。
3. タモキシフェン投与後 7 日目の **Cx3cr1-RasV12** マウスは視細胞変性が観察された。一方で、**Cx3cr1-RasV12** マウスの視細胞以外の網膜構成細胞に変性は観察されなかった。したがって、**Cx3cr1-RasV12** マウスでは視細胞特異的な変性が誘導されることが明らかとなった。次に、**Ras** 活性化マイクログリアによる視細胞変性誘導のメカニズムを明らかにすることを試みた。まず、炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量した。その結果、神経変性に関与するサイトカインの発現が **Cx3cr1-RasV12** マウスで上昇していた。次に、**Ras** 活性化マイクログリアが神経傷害性因子の一酸化窒素(**NO**)を合成している可能性を検討するため、**NO** 合成酵素である **iNOS** の発現を検討したところ、**Ras** 活性化マイクログリアで **iNOS** が強く発現誘導されていた。以上から、**Ras** 活性化マイクログリアが炎症性サイトカインや **NO** を産生することで視細胞に傷害していることが示唆された。また、**Cx3cr1-RasV12** マウスの視細胞で特異的に **Eat-me** シグナルであるホスファチジルセリンが細胞外に露出

していることが明らかになった。実際に **Ras** 活性化マイクログリアが視細胞をファゴサイトーシスする様子をタイムラプスイメージングで観察した結果、**Ras** 活性化マイクログリアが視細胞の細胞核をファゴサイトーシスしている様子が観察された。以上から、マイクログリアでの **Ras** シグナルの活性化は視細胞のファゴサイトーシスを亢進させ、視細胞の変性を誘導することが明らかになった。

4. **Ras** 活性化マイクログリアは外顆粒層だけでなく、内網状膜層(IPL)にも分布していた。視細胞層に存在する **Ras** 活性化マイクログリアと IPL に存在する **Ras** 活性化マイクログリアの動態をタイムラプスイメージングで観察した。その結果、外顆粒層に存在するマイクログリアは仮足を積極的に運動させているが、IPL に存在するマイクログリアの運動性は低かった。以上から、マイクログリアの活性状態が網膜内の微小環境によって異なって制御されることが示唆された。本論文では IPL で **Ras** 活性化マイクログリアの活性を制御した候補因子として IL-33 に着目し、IL-33 による **Ras** 活性化マイクログリアの抑制効果について検討した。IL-33 が **Ras** 活性化マイクログリアの活性を制御しているかどうかを検討するため、Cx3cr1-RasV12 マウスに IL-33 タンパクを硝子体内注射した。IL-33 を注射した Cx3cr1-RasV12 マウスで、マイクログリアの神経傷害的な活性化を抑制する *Tgfb1* の遺伝子発現が上昇した。したがって、IL-33 が *Tgfb1* の発現誘導を介して、**Ras** 活性化マイクログリアを抑制していることが示唆された。

以上、本論文はこの数年大きな議論になりながら結論の出ていなかった活性化マイクログリアが視細胞変性の原因となりうるのか？という点について、活性化マイクログリアが変性を誘導し、さらに病態を悪化させることを明確に示した。多くの網膜変性症では視細胞のみに変性が生じるが、なぜ視細胞が特異的に変性に至るのか、という点については長年にわたる疑問であるが合理的な説明はついていない課題である。本研究で、**Ras** 活性化マイクログリアの動態が網膜の領域によって異なり、かつ、視細胞特異的に変性が生じることを観察したことは、この課題の解明にも本マウスが有用なツールであることを示唆しており今後の中樞神経変性研究の領域にとって重要な足がかりとなった。よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 2005 字