

審査の結果の要旨

氏名 利 光 正 岳

本研究は正期産児の低酸素性虚血性脳症(HIE)に対して、内因性の脳保護機構として機能すると考えられる神経伝達物質ノルエピネフリン(NE)の作用について、新生児ラットのHIEモデルおよびミクログリア初代培養系を用いて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. HIEにおける内因性NEの機能を解明するために、日齢7日目(P7)の新生児ラットに低酸素・虚血負荷(片側頸動脈の結紮・切断、8%酸素に2時間暴露)を行い、HIEモデルを作製した。低酸素・虚血負荷直後に選択的NE再取り込み阻害剤Atomoxetine(Atx)または生理食塩水を腹腔内投与してNEの効果を検討した。7日後(P14)に神経細胞を特異的に検出するKB染色で脳組織傷害の評価を行い、Atx群はVehicle群と比較して脳組織傷害の軽減を認めた。
2. 低酸素・虚血負荷24時間後(P8)において、Atx群はVehicle群と比較してアポトーシスの指標であるTUNEL陽性細胞の減少を認めた。同時に、Atx群はTUNEL染色の陰性領域にリン酸化CREB染色の発現亢進を認めた。この結果は、Atxを用いた脳内NE経路の促進は転写因子CREBを介した抗アポトーシス作用により脳保護的に機能することを示唆した。
3. NEの脳保護効果にミクログリアが関与しているかどうかミクログリアの数と形態に着目して検討した。P8において、Atx群はVehicle群と比較してミクログリア数の維持を認めた。形態に関して、Vehicle群ではamoeboid型、Atx群ではramified型の比率が多い結果であった。両群間におけるミクログリアの数と形態の違いは、NEのミクログリアへの関与を示唆した。
4. NEのミクログリアを介した脳組織傷害への影響を探るため、新生児ラット由来初代培養ミクログリアを用いて検討した。低酸素刺激によりミクログリアIL-1 β mRNA発現は、ミクログリア単培養では抑制され、トランスウェルを用いた神経細胞との共培養で増加を認めた。この結果は、低酸素自体はミクログリアの炎症性応答を誘導せず、低酸素環境下の神経細胞から放出された液性因子がミクログリアの炎症性応答の起点となっている可能性を示唆した。神経細胞から放出された液性因子の代替因子としてLPSで刺激したミクログリア単培養にNEを投与してミクログリアIL-1 β 蛋白の

産生減少を認めた。NE のミクログリア M1/M2 比への影響を iNOS/Arg1 mRNA 比を指標として検討した。低酸素群は常酸素群と比較して iNOS/Arg1 mRNA 比が低下した。低酸素に NE を加えると、iNOS/Arg1 mRNA 比低下の亢進を認めた。以上の培養実験結果は、NE がミクログリア IL-1 β 産生の抑制ならびにミクログリア M2 極性化の亢進を介して、低酸素虚血に対する脳傷害を軽減した可能性を示唆した。

5. ミクログリアの低酸素に対する作用を *in vivo* で検討するためにクロドロネートリポソームを使用した。その結果、白質内のミクログリアが一部除去されたクロドロネートリポソーム群では、コントロール群に比較して低酸素虚血に対する脳白質傷害の悪化を認め、ミクログリアは早期には脳保護的に作用していることを示唆した。

以上、本論文は低酸素虚血に対する神経伝達物質 NE の内因性脳保護機構としての機能を、*in vivo* および *in vitro* において検討して明らかにした。特に、本研究において示された、Atx の低酸素虚血に対する発達期脳の保護効果は、これまで明らかにされておらず、正期産児 HIE の軽減ならびに病態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。