

審査の結果の要旨

市瀬（鈴木） 茉莉

本研究は、早産児において脳性麻痺の原因となる脳室周囲白質軟化症に対する低温療法の効果とその作用機序を明らかにするために、ラット脳室周囲白質軟化症モデル及びオリゴデンドロサイト初代培養系を用いて、低温による低酸素虚血負荷からのオリゴデンドロサイト保護効果を検討し、下記の結果を得ている。

下記の結果を得ている。

1. 雄の Sprague-Dawley (SD) 新生仔ラット哺乳 6 日齢を用いて、左総頸動脈を結紮後に 6%酸素下に 1 時間置き、ラット脳室周囲白質軟化症モデルを作成した。低酸素負荷中に直腸温が $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ の低温群は、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ の常温群に比して、低酸素負荷から 5 日後の脳室周囲白質における myelin basic protein (MBP) の頸動脈結紮側における発現減少が抑制されていた。ウェスタンブロットによる検討により、低温群では常温群に比べて、14、21.5 と特に 17kDa のリン酸化 MBP が頸動脈結紮側で増加していた。

2. ラット脳室周囲白質軟化症モデルにおいて、低酸素虚血負荷の 24 時間後には、常温群で優位に頸動脈結紮側脳室周囲白質の TUNEL 陽性細胞増加を認め、低温群ではその増加が抑制されていた。In vivo で、低温はオリゴデンドロサイトの細胞死を抑制することが示された。

3. ラット脳室周囲白質軟化症モデルにおいて、低酸素虚血負荷の 5 日後には、常温群では、頸動脈結紮側で有意にリン酸化 ERK 陽性細胞の減少を認めたが、低温群ではその減少が抑制されていた。In vivo において、低温による髄鞘化能維持には、ERK リン酸化が関与していることが示唆された。

4. ラットオリゴデンドロサイト初代培養系を作成し、premyelinating oligodendrocytes (pre-OLs) に対して低酸素無糖 (Oxygen Glucose Deprivation : OGD) 負荷をかけたところ、低酸素中に低温にすることにより、アポトーシスを抑制することが示された。

5. In vitro で髄鞘化能について評価するために、オリゴデンドロサイトと Dorsal root ganglia (DRG) ニューロンの共培養を行った。OGD による MBP の細胞内分布異常が低温により是正されることが示された。また、リン酸化 MBP 21.5kDa の発現及び DRG ニューロンと接触するオリゴデンドロサイトの割合は、常温下での OGD により低下し、低温により維持されていた。

6. Pre-OLs に対して常温下で OGD 負荷をかけると、ERK1/2 リン酸化レベルは有意に減少し、低温により維持された。U0126 を用いて ERK1/2 リン酸化を低下させると、低温による細胞死抑制効果及びニューロンとの接触能維持効果は減弱した。

7. 低温による保護効果が特に認められた 17 と 21.5kDa MBP は、exon2 を含むス

プライミングバリエーションである。MBP の遺伝子発現への低温の影響を検討するために、OGD 負荷直後の pre-OLs に DRG ニューロンを添加し、MBP の exon2 を含む(+)、あるいは含まない(-)、mRNA をリアルタイム PCR により定量した。MBP mRNA は低温により発現が抑制され、その変化は MBP exon2(+) mRNA でより顕著であった。低温下に置いた細胞は常温に戻すことで、OGD をかけずに常温に置いたコントロールと同じレベルまで MBP mRNA が回復した。

8. 低温により MBP mRNA が抑制される機序を明らかにするために、MBP の発現調節に関与する候補遺伝子について検討を行った。DEAD-box RNA ヘリカーゼ Ddx54 mRNA は低温下で有意に増加していた。NIH3T3、NG108-15、FBD-102b の三種類の細胞株に Ddx54 をトランスフェクションしたところ、MBP 転写活性が有意に低下した。このことから、低温下で増加した Ddx54 によって、MBP の転写活性が低下し、MBP mRNA 発現が抑制される可能性が示唆された。

以上、本論文は、*in vivo*、*in vitro* で低温はオリゴデンドロサイトの細胞死を抑制し、髄鞘化を維持することを示し、その作用に ERK1/2 リン酸化が関与すること、髄鞘化に必要な MBP のうち特に exon2 を含むアイソフォームが重要であることを提起した。Ddx54 は低温下での MBP 発現調節に関与している可能性があり、低温の作用機序の解明を分子基盤とした新規分子標的療法の候補になり得ると考えられる。今まで十分に検討されてこなかった、低温によるオリゴデンドロサイト保護効果の作用機序解明に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。