

Title	Contribution of Microglia/Macrophages to Expansion of Infarction and Response of Oligodendrocytes after Focal Cerebral Ischemia in Rats
Author(s)	馬淵, 卓真
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42883
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"＞ 大阪大学の博士論文について ＜/a＞ をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	馬 潤 卓 真
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 15767 号
学位授与年月日	平成12年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Contribution of Microglia/Macrophages to Expansion of Infarction and Response of Oligodendrocytes after Focal Cerebral Ischemia in Rats (ラット局所脳虚血モデルにおける、マイクログリア・マクロファージの脳梗塞進展への関与とオリゴデンドロサイトの動態)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 吉峰 俊樹 教授 佐古田三郎

論文内容の要旨

- 〔目的〕げっ歯類の中大脳動脈永久閉塞モデルにおける脳梗塞の進展様式は、血管閉塞後24時間以上かけて、虚血中心部より辺縁部に向かい徐々に進展することが知られている。この虚血辺縁部における緩徐な梗塞進展の機序を明らかにすることは虚血性脳血管障害の治療上有用と考えられる。本研究の第一の目的は、この梗塞進展に関わる細胞の同定と、それらの細胞からのサイトカイン (IL-1 β) 産生について評価すること、第二にはオリゴデンドロサイトの虚血に対する脆弱性と虚血後の動態について評価することである。
- 〔方法〕対象動物は体重250-300gの雄性ラットで、中大脳動脈永久閉塞モデルを用いた。総頸動脈から中大脳動脈起始部にナイロン糸を挿入し、血管を閉塞後3、6、16、24、48、72、96時間および7日後 (各 n=3-5、計46) に4%PFA または Zamboni 固定液で灌流固定した。脳を摘出後パラフィン切片または凍結切片を作成し、免疫組織化学染色、レクチン組織染色、Tunel 染色、in situ hybridization 法に供した。梗塞進展の評価部位は、進展過程を比較的容易に観察しうる、海馬を含む冠状切片の頭頂葉皮質領域を用いた。神経細胞、アストロサイト、顆粒球細胞、血液脳関門破綻、細胞の増殖活性、サイトカイン IL-1 β の産生、アポトーシス前駆蛋白 Bax の発現、マイクログリア・マクロファージの検出は各々 MAP2 (microtubule associated protein2)、GFAP (glial fibrillary acidic protein)、MPO (myeloperoxidase)、アルブミン、PCNA (proliferating cell nuclear antigen)、IL-1 β (interleukin-1 β)、Bax、CD11b/c に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を用いて行った。またオリゴデンドロサイトは PLP (proteolipid protein) mRNA の局在を検出する in situ hybridization 法を、DNA の断片化は Tunel 染色法を用いて検出し、マイクログリア・マクロファージについては、レクチン組織染色によっても検出、評価を行った。
- 〔成績〕MAP2免疫反応性の低下した領域、即ち神経細胞障害を示す領域は、血管閉塞後6-48時間にかけて徐々に拡大していった。マイクログリアは血管閉塞後3時間には非活性 ramified 型として検出され始め、この型のマイクログリアは7日後まで常に MAP2免疫反応性が残存する領域にのみ認められた。形態学的に異なる活性化 ameboid 型マイクログリアは、16-24時間後に梗塞中心部より梗塞辺縁部および MAP2の免疫反応がまだ残存するが、48時間以降に梗塞に陥る虚血辺縁部位にも集積が認められた。この梗塞辺縁部及び周辺部に集積する活性化マイクログリアまたはマクロファージは PCNA 陽性で、IL-1 β 産生が観察された。MPO 陽性顆粒球細胞は主に梗塞内にのみ認められた。また、PLP mRNA に対する in situ hybridization

法にて検出されるオリゴデンドロサイトの消失は、神経細胞障害や血液脳関門障害よりはるかに遅れ、梗塞巣の完成した24時間後でさえ、炎症細胞であるマクロファージ、顆粒球と共にオリゴデンドロサイトが検出された。しかしこの時点で、梗塞領域に存在するオリゴデンドロサイトの一部にDNA断片化が観察された。

血管閉塞48時間後に梗塞領域は完成し、多数の炎症細胞の浸潤を認めた。炎症細胞の多くを占めるマクロファージは、血管閉塞24時間後にBax蛋白の発現を認め、48時間後にはTunel陽性となった。この時間帯に梗塞領域に存在するマクロファージの約27%にDNA断片化が観察された。7日後には梗塞部位と生存部位の境界で、反応性アストロサイト、ramified型マイクログリアが集積するグリア瘢痕形成領域に、オリゴデンドロサイトも集積するのが認められた。

〔総括〕以上の結果から、(1) 虚血後早期に梗塞巣の辺縁部から周辺に集積したマイクログリア・マクロファージからのIL-1 β 等のサイトカイン産生は、脳梗塞の進展に寄与している可能性が示された。(2) オリゴデンドロサイトは虚血障害部位においても一部残存しており、比較的虚血侵襲に抵抗性を示すと考えられた。(3) 一旦梗塞巣に浸潤したマクロファージの一部は、アポトーシスを生じている可能性が示唆された。(4) オリゴデンドロサイトは、アストロサイトやマイクログリアと共に梗塞部位のグリア瘢痕形成に関与しているものと考えられた。脳梗塞進展阻止の観点から、マイクログリア・マクロファージの活性化やサイトカイン産生の抑制は脳梗塞の有用な治療手段となりうるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラットの中大脳動脈閉塞モデルを用いて、(1) 脳梗塞の進展過程に、マイクログリアの活性化およびマクロファージの浸潤が関与していること、(2) 一旦梗塞領域に浸潤したマクロファージの除去過程に、アポトーシスが関与している可能性、(3) オリゴデンドロサイトは、神経細胞に比較し、虚血侵襲に抵抗性であり、慢性期においては、他のグリア細胞と共に組織修復へ寄与していることを示したものである。

(1) 脳梗塞進展への活性化マイクログリア・マクロファージの関与は、時間経過による梗塞巣の進展と、それに伴う各種炎症細胞の集積を初めて詳細に検討し、かつ同細胞からの炎症性サイトカインIL-1 β の産生を確認することで示している。また、(2) 梗塞巣に浸潤したマクロファージのアポトーシスへの関与は、同細胞がアポトーシス促進因子であるBaxを発現した後に、断片化DNAの出現を確認することによって示しており、脳梗塞巣へ浸潤したマクロファージが、除去されていく過程にアポトーシスが関与している可能性を初めて示唆したものである。さらに、(3) 虚血後の脳梗塞領域において、オリゴデンドロサイトは虚血後24時間近く残存していることから、同細胞が虚血侵襲に抵抗性であることを示した。慢性期においては、梗塞周辺領域でアストロサイトと共存して集積していることを確認し、組織修復過程への関与を初めて示唆したものである。

以上、臨床的に脳梗塞の進展阻止という観点から、これらの知見は重要性を帯び、本研究が学位授与に値するものとする。