

氏名	加藤 隼平		
学位の種類	博士（神経科学）		
学位記番号	博甲第 10142 号		
学位授与年月	令和 3 年 10 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	マカクサル内包局所梗塞後の時期および領域特異的 マクロファージ/ミクログリア応答		
主査	筑波大学准教授	博士（医学）	増田 知之
副査	筑波大学助教	博士（理学）	佐々木 哲也
副査	筑波大学助教	博士（生命科学）	本城 咲季子
副査	茨城県立医療大学教授	博士（医学）	河野 豊

## 論文の内容の要旨

加藤隼平氏の博士学位論文は、脳卒中後の患者にみられる脳の可塑的な変化を明らかにするために、ヒトに近い脳構造を有するマカクサルの脳梗塞モデルを用い、脳卒中後のグリア細胞について、その増減および表現型変化を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）脳卒中患者の脳では、血管が閉塞/損傷した部位周辺でマクロファージ/ミクログリアが活性化し、それらの誘発する炎症応答によって運動機能の回復が阻害される。これまでの脳卒中研究は主にげっ歯類を用いて進められてきたが、げっ歯類とヒトでは脳内に占めるグリア細胞の割合も異なるため、ヒトの脳卒中後の研究では、霊長類の脳を用いた検討がより望ましい。著者は脳卒中患者の非ヒト霊長類モデルであるマカクサル内包梗塞モデルを用い、脳卒中後の霊長類の脳におけるマクロファージ/ミクログリアの増減および表現型変化について、経時的な解析を試みた。

（方法）著者はマカクサルの内包後脚に血管収縮作用を有する薬剤であるエンドセリン-1 を注入し、局所梗塞のあるモデル動物を作製している。梗塞作製後、0 日、4 日、2-3 週間、1-3 ヶ月、6 ヶ月の時点で脳を取り出し、それぞれの凍結組織切片を作製している。切片作製後、著者は免疫組織化学染色法によって各種蛋白の発現状況を調べている。著者が解析対象とした蛋白は、Iba1（マクロファージ/ミクログリアマーカー）、CD68（貪食性マクロファージ/ミクログリアマーカー）、CD86（炎症性マクロファージ/ミクログリアマーカー）、CD206（抗炎症性マクロファージ/ミクログリアマーカー）、IL-18（炎症性マクロファージ/ミクログリアの生成するサイトカイン）、IL-10（抗炎症性マクロファージ/ミクログリアの生成するサイトカイン）、ならびに NeuN（神経細胞マーカー）である。これらの蛋白の発現状況について、著者は梗塞部と一次運動野第 V 層を対象領域としている。著者は、対象領域の吸光度/バックグラウンド領域の吸光度から得られた数値を目的蛋白の発現比としている。

（結果）著者は、梗塞部周囲のマクロファージ/ミクログリア（Iba1 陽性細胞）の割合が梗塞作製 0 日から 2-3 週間後にかけて徐々に増加すること、および梗塞作製後 2-3 週間から 6 ヶ月の期間中、梗塞部

周囲のマクロファージ/ミクログリア (Iba1 陽性細胞) の割合が対照群と比較して有意に多いことを明らかにしている。続いて著者は、CD86 と CD206 に対する抗体を用いて、梗塞作製後 2-3 週間から 6 ヶ月の期間におけるマクロファージ/ミクログリアの表現型の解析を行っている。その結果、梗塞作製 1-3 ヶ月後および 6 ヶ月後の梗塞部周囲では、炎症性マーカー (CD86) 陽性のマクロファージ/ミクログリアの割合が減少する一方、抗炎症性マーカー (CD206) 陽性のマクロファージ/ミクログリアの割合は減少しないことを明らかにしている。

さらに著者は、同期間中の IL-1 $\beta$  および IL-10 の発現も調べている。その結果、梗塞部周囲では炎症性マクロファージ/ミクログリアの生成するサイトカイン IL-1 $\beta$  の割合が減少する一方で、抗炎症性マクロファージ/ミクログリアの生成するサイトカインである IL-10 の割合は減少しないことを明らかにしている。この結果は、細胞表面マーカーの CD86 と CD206 を用いた結果と一致している。続いて著者は、梗塞作製 2-3 週間後の梗塞部周囲について、単一のマクロファージ/ミクログリアが CD86 と CD206 を共発現しているのか、蛍光免疫二重染色を行って確かめている。その結果、ほとんどの CD206 陽性細胞は CD86 も発現しており、梗塞作製 2-3 週間後の梗塞部周囲では、炎症性と抗炎症性の 2 つのマーカーを共発現するマクロファージ/ミクログリアが存在することを明らかにしている。

次に著者は、梗塞作製後の一次運動野第 V 層における細胞構成の経時的観察を行い、梗塞作製 2-3 週間以降の第 V 層において巨大錐体細胞が減少することを明らかにしている。さらに著者は、梗塞作製 2-3 週間後の第 V 層で、マクロファージ/ミクログリア (Iba1 陽性細胞) が対照群および他の時期と比較して有意に多いことを明らかにしている。続いて著者は、梗塞作製 2-3 週間後の第 V 層におけるマクロファージ/ミクログリアの表現型の解析を行っている。その結果、抗炎症性マーカー (CD206) 陽性のマクロファージ/ミクログリアの割合は、炎症性マーカー (CD86) 陽性のマクロファージ/ミクログリアの割合に比べ、有意に大きいことを明らかにしている。著者は同時期の第 V 層における IL-1 $\beta$  および IL-10 の発現も調べており、その結果は CD86 と CD206 を用いた結果と一致している。

(考察) 梗塞作製後の梗塞部周囲におけるマクロファージ/ミクログリアの経時的な変化を調べた結果、炎症性マクロファージ/ミクログリアの割合は梗塞作製 1-3 ヶ月後に減少するが、抗炎症性マクロファージ/ミクログリアの割合は持続し、げっ歯類モデルを用いた先行研究とは異なることが明らかとなった。脳卒中後の慢性期における抗炎症性マクロファージ/ミクログリアの優勢は、霊長類の脳に特徴的な事象ではないかと著者は考えている。さらに、梗塞作製 2-3 週間後の梗塞部周囲では、炎症性と抗炎症性の 2 つのマーカーを共発現するマクロファージ/ミクログリアの存在が明らかとなったが、これはげっ歯類でもみられる現象であり、炎症性と抗炎症性の中間状態を示していると著者は考察している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

著者は、マカクサル脳梗塞モデルを用い、炎症性マクロファージ/ミクログリアの割合は梗塞作製後に減少するが、抗炎症性マクロファージ/ミクログリアの割合は持続し、げっ歯類モデルとは異なることを明らかにした。本研究成果は、脳卒中後の治療法開発に重要な知見を与えるものであり、価値ある研究と考えられる。

令和 3 年 9 月 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (神経科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。