

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	野村 太一
<p>学位論文題目</p> <p>Yokukansan Reduces Cuprizone-Induced Demyelination in the Corpus Callosum Through Anti-inflammatory Effects on Microglia (抑肝散はミクログリアに抗炎症作用を示し、 脳梁における Cuprizone 誘発性脱髄を抑制する)</p> <p>共著者名</p> <p>板東良雄, Hua You, 田中達英, 吉田成孝</p> <p>Neurochemical Research, 2017年, 42巻, 3525-3536</p> <p>研究目的</p> <p>多発性硬化症は中枢神経系における炎症性脱髄疾患である。ミクログリアは炎症性サイトカインを放出することで病態形成に関与する。そのため、ミクログリアによる炎症の増悪を抑制することが治療戦略上重要である。一方、抑肝散は様々な精神疾患に有用な漢方薬であり、ミクログリアの活性化を抑制する作用が報告されている。そこで、抑肝散がミクログリアの活性化を抑制することで脱髄を軽減するかについて検討を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>実験動物と抑肝散の経口投与</p> <p>6週齢のC57BL/6雌マウスを使用した。通常食投与群と0.2% Cuprizone 含有食投与群に分け、各4週間投与した。後半の2週間において、1.0g/kgの抑肝散または蒸留水を経口投与した。</p> <p>組織化学染色</p> <p>通常食または Cuprizone 含有食を4週間投与したマウスを灌流固定し、凍結切片を作成した。脱髄を評価するために、ルクソール・ファスト・ブルー(LFB)染色とミエリン塩基性蛋白(MBP)による免疫染色を行った。その他マーカーについても同様に免疫染色を行った。</p> <p>マウスミクログリア細胞株</p> <p>マウスミクログリア細胞株であるBV2細胞を用い、リポ多糖(LPS) 1<math>\mu</math>g/mlもしくは蒸留水とともに、抑肝散100<math>\mu</math>g/mlもしくは500<math>\mu</math>g/mlを添加し、24時間培養し細胞を回収した。</p>			

#### 定量的RT-PCR法

回収したBV2細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを作成した。IL-1 $\beta$ , iNOS, GAPDHのプライマーを用いてmRNAの発現量を比較した。

#### ウェスタンブロッティング法

回収したBV2細胞より蛋白質を抽出し、IL-1 $\beta$ , iNOS, GAPDHの抗体を用いて蛋白質の発現量を比較した。

### 成 績

#### 抑肝散投与による脳梁におけるクプリゾン誘発性脱髄の抑制

通常食投与群において、蒸留水または抑肝散投与によるLFB染色とMBP免疫染色の脳梁における染色性の変化は認めなかった。しかし、クプリゾン投与群に蒸留水を投与すると、脳梁は薄くなり、LFB染色とMBP免疫染色の染色性が低下した。一方、クプリゾン投与群に抑肝散を投与すると、これらの染色性は蒸留水投与群と比較して上昇した。

#### 抑肝散投与によるミクログリアの活性化抑制

クプリゾン誘発性脱髄に伴って、脳梁にはIba-1陽性ミクログリアが有意に増加した。抑肝散をクプリゾン投与群に与えると、クプリゾンに蒸留水を投与した群と比べ、脳梁におけるIba-1陽性ミクログリアは有意に減少した。さらに、抑肝散をクプリゾンに加えて投与すると、ミクログリアの活性化のマーカーである、CD68やIL-1 $\beta$ の発現が有意に減少した。

#### 抑肝散の投与による、その他のグリア細胞の組織学的変化

通常食投与群に抑肝散を投与しても、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞とアストロサイトの数は変化しなかった。クプリゾンを投与するとオリゴデンドロサイトの数は有意に減少したが、オリゴデンドロサイト前駆細胞とアストロサイトの数が有意に上昇した。しかし、クプリゾンに抑肝散を投与した群では、蒸留水を投与した群と比べてオリゴデンドロサイト前駆細胞の数は変化しなかったが、オリゴデンドロサイトの数は有意に上昇し、アストロサイトの数は有意に減少していた。

#### LPS刺激を行ったBV2細胞における、抑肝散の抗炎症作用

BV2細胞をLPSにより刺激すると、IL-1 $\beta$ , iNOSのmRNAの発現量がRT-PCR法において、有意に増加した。しかし、LPS刺激を行ったBV2細胞に抑肝散を500 $\mu$ g/ml添加すると、IL-1 $\beta$ とiNOSのmRNA発現量が有意に低下した。ウェスタンブロッティング法における解析でも、BV2細胞をLPS刺激することでIL-1 $\beta$ とiNOSの蛋白質の発現量が有意に増加した。しかし、LPS刺激に加え、抑肝散を500 $\mu$ g/ml添加すると、IL-1 $\beta$ とiNOSの蛋白質の発現量が有意に減少した。

## 考 案

クプリゾン<sup>1</sup>はマウスに投与することでオリゴデンドロサイトを特異的に傷害し、脱髄を誘導できる。そして、脱髄の進行や増悪にはミクログリアによる炎症が重要である。抑肝散を投与することで、ミクログリアの活性化が抑制され、脳梁におけるクプリゾン誘発性脱髄が抑制された。抑肝散の投与は、アストロサイトの増殖も抑制したが、アストロサイトはIL-1 $\beta$ により増殖することが知られており、ミクログリアにおけるIL-1 $\beta$ の発現低下の結果と考えられる。

抑肝散は7つの生薬から成り、その1つである geissoschizine methyl ether(GM)は再髄鞘化に寄与することが報告されている。しかし、GMはマウスの脳梁にはあまり分布しないことが報告されており、オリゴデンドロサイト前駆細胞の数も抑肝散を投与しても変化しなかった。また、GMが脱髄時に抗炎症作用を示す報告もないため、抑肝散に含まれる、その他の成分が抗炎症効果を示すと考えられる。詳細なメカニズムの解明には成分ごとのさらなる研究が必要である。

## 結 論

抑肝散がミクログリアに対して、IL-1 $\beta$ やiNOSの発現を抑制することで抗炎症作用を示し、クプリゾン誘発性脱髄を抑制することが示唆された。抑肝散は多発性硬化症においても、ミクログリアの活性化を抑制する可能性が考えられ、新規治療薬となる可能性がある。

## 引 用 文 献

1. Bando Y, Nomura T, Bochimoto H, Murakami K, Tanaka T, Watanabe T, Yoshida S (2015) Abnormal morphology of myelin and axon pathology in murine models of multiple sclerosis Neurochem Int 81: 16-27

## 参 考 論 文

1. Bando Y, Nomura T, Bochimoto H, Murakami K, Tanaka T, Watanabe T, Yoshida S (2015) Abnormal morphology of myelin and axon pathology in murine models of multiple sclerosis Neurochem Int 81: 16-27
2. Nomura T, Bando Y, Bochimoto H, Koga D, Watanabe T, Yoshida S (2013) Three-dimensional ultra-structures of myelin and the axons in the spinal cord: Application of SEM with the osmium maceration method to the central nervous system in two mouse models Neurosci Res 75: 190-197

平成31年1月30日

大学院博士課程委員会委員長 殿


審査委員長 渡部 剛 

学位論文審査結果の報告について


野村 太一 氏提出の学位論文審査及び学力の確認を終了しましたので、  
下記により提出します。

記




1. 学位論文の要旨 (3,000字以内)
2. 学位論文の審査結果の要旨 (800字以内) 1部
3. 学力確認の結果

審査委員長 渡部 剛 (適)・否 

審査委員 船越 洋 (適)・否 

審査委員 高草 本 薫 (適)・否 

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	野村 太一
<p>審査委員長 <u>渡部 剛</u> </p> <p>審査委員 <u>高草木 薫</u> </p> <p>審査委員 <u>船越 洋</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Yokukansan Reduces Cuprizone-induced Demyelination in the Corpus Callosum through Anti-inflammatory Effects on Microglia. (抑肝散はミクログリアに抗炎症作用を示し、脳梁におけるクプリゾン誘発性脱髄を抑制する)</b></p> <p>掲載雑誌：Neurochemical Research (2017) 42:3525-3536</p> <p>(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること)</p> <p>炎症性脱髄疾患である多発性硬化症の臨床では、脱髄に伴いミクログリアが活性化されることで起こる炎症の増悪を軽減・阻止する治療法の確立が、喫緊の課題である。本論文提出者は、銅キレート剤であるクプリゾン投与により誘発されるマウス脱髄疾患モデルを用いて、様々な精神疾患への有効性が示唆されている漢方薬の抑肝散が脱髄疾患の病態改善に寄与するかどうかを検討した。</p> <p>その結果、クプリゾン誘発性脱髄モデルマウスに抑肝散を持続投与することで、大脳脳梁部において、1) 脱髄が軽減すること、2) Iba-1 陽性の活性型ミクログリアが減少し、活性化のマーカである CD68 や IL-1<math>\beta</math> の発現も低下すること、3) アストロサイトは有意に減少、オリゴデンドロサイトは有意に増加することが明らかになった。さらに、ミクログリアの培養細胞株である BV2 細胞の培地に抑肝散を添加することで、LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生亢進が有意に抑制されることを、IL-1<math>\beta</math> や iNOS の定量的 PCR 解析で確認した。これらの知見は、抑肝散が脱髄疾患におけるミクログリア活性化を抑制することを示唆するもので、脱髄疾患に対する新規治療法の開発・確立につながる重要な成果であると思われる。</p> <p>本研究で用いられた方法の妥当性は、適切な対照実験によって検証されており、論文の記述および図版の質・構成も得られた知見を説明するのに十分なものである。また、本論文の内容および関連領域に関して、論文提出者に試問を行ったところ、適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。</p> <p>以上の結果に基づき、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判定した。</p>			