

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \* **高知大学学位授与記録** \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

**目 次**

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第100号	濱田 朋弥	Zinc-aggravated M1 microglia regulates astrocytic engulfment via P2X7 receptors  (亜鉛誘導性増悪化M1ミクログリアによるP2X7受容体を介したアストロサイトの食作用抑制制御の研究)	1

氏名(本籍)	濱田 朋弥 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第100号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和2年5月12日
学位論文題目	Zinc-aggravated M1 microglia regulates astrocytic engulfment via P2X7 receptors  (亜鉛誘導性増悪化M1ミクログリアによるP2X7受容体を介したアストロサイトの食作用抑制制御の研究)
発表誌名	Journal of Trace Elements in Medicine and Biology( In press)

審査委員	主査	教授	山口	正洋
	副査	教授	古谷	博和
	副査	教授	數井	裕光

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨




# 学位論文要旨

	氏名	濱田 朋弥
論文題目	Zinc-aggravated M1 microglia regulates astrocytic engulfment via P2X7 receptors (亜鉛誘導性増悪化 M1 ミクログリアによる P2X7 受容体を介したアストロサイトの食作用抑制制御の研究)	
(論文要旨)		
<p>【背景】ミクログリアやアストロサイトなどグリア細胞は、細胞間コミュニケーションを介して、中枢神経系における重要な役割を担っている。ミクログリアは活性化すると炎症性の M1 または抗炎症性の M2 のいずれかに極性誘導され、アストロサイトの食作用など神経保護機能に影響を及ぼすことが報告されている。最近、細胞外亜鉛濃度の増加が M1 ミクログリアの炎症応答を増悪化させることが明らかとなり、その機序にミクログリアの亜鉛取り込みを介した細胞内亜鉛集積とそれに続く活性酸素産生が重要であることが示されている。しかし、亜鉛によって増悪化した M1 ミクログリアがアストロサイトの神経保護機能にどのような影響を及ぼすかは明らかになっていない。</p> <p>【目的】亜鉛により増悪化した M1 ミクログリアが、アストロサイトの食作用に及ぼす影響について調べた。</p> <p>【方法】初代培養ミクログリアならびにアストロサイトは、生後 1 日齢の新生仔マウス(C57BL/6)より単離培養した。初代培養ミクログリアに 30- 60 <math>\mu</math>M ZnCl<sub>2</sub> を 2 時間暴露した後、細胞を洗浄し 0.1-10 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) を添加することでミクログリアの極性を M1 へ誘導した。LPS 刺激 22 時間後の培養上清をミクログリア由来コンディションメディウム (MCM) としてアストロサイトに処置し、蛍光ラテックスビーズを用いて食作用への影響を検討した。また、亜鉛による M1 ミクログリアの増悪化を抑制するため、膜透過性亜鉛キレート薬 (TPEN) または活性酸素除去薬存在下 (Trolox) でミクログリアに ZnCl<sub>2</sub> ならびに LPS 処置を施し、同様の検討を行った。更に、分子機序の解明を目的に、アストロサイトの食作用に関与する P2X7 受容体 (P2X7R) の発現が MCM によって変化するか否かをリアルタイム PCR 法により検討した。</p> <p>【結果】低・中濃度 (0.1-1 ng/mL) LPS 処置後の MCM はアストロサイトの食作用を濃度依存的に増加させたが、高濃度 (10 ng/mL) LPS 処置後の MCM はその作用が観察されなかった。ZnCl<sub>2</sub> の前処置は、1 ng/mL LPS 処置後の CM による食作用誘導能</p>		

を抑制したが、TPEN ならびに Trolox により誘導能が回復した。また、1 ng/mL LPS 処置後のMCMはアストロサイトのP2X7R発現を誘導したが、ZnCl<sub>2</sub>前処置したMCMでは抑制されていた。

**【結論】** 亜鉛誘導性増悪化 M1 ミクログリアは、アストロサイトに対する食作用誘導能が抑制されており、これはミクログリアにおける細胞内亜鉛集積ならびに活性酸素産生を介して分泌された液性因子によるアストロサイトの P2X7R 発現制御が関与していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名
	濱田 朋弥
審 査 委 員	主 査 氏 名 山口 正洋 
	副 査 氏 名 古谷 博和 
	副 査 氏 名 數井 裕光 

題 目 Zinc-aggravated M1 microglia regulates astrocytic engulfment via P2X7 receptors  
(亜鉛誘導性増悪化M1 ミクログリアによるP2X7 受容体を介したアストロサイトの食作用抑制制御の研究)

著 者 Tomoya Hamada, Takaaki Aratake, Youichirou Higashi, Yusuke Ueba,  
Takahiro Shimizu, Shogo Shimizu, Toshio Yawata, Tetsuya Ueba, Rina Nakamura,  
Toshifumi Akizawa, Mikiya Fujieda, Motoaki Saito

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Journal of Trace Elements in Medicine and Biology  
( In press)

### 要 旨

#### 【背景・目的】

ミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞は、細胞間コミュニケーションによって中枢神経系において重要な役割を担っている。ミクログリアは活性化すると炎症性の M1 または非炎症性の M2 のいずれかに極性誘導され、アストロサイトの食作用など神経保護機能に影響を及ぼすことが報告されている。海馬における脳梗塞などの場合、障害された神経細胞からシナプス小胞中の亜鉛が細胞外に放出される。最近、細胞外亜鉛濃度の増加が M1 ミクログリアの炎症応答を増悪化させることが明らかとなり、その機序にミクログリアの亜鉛取り込みを介した細胞内亜鉛集積とそれに続く活性酸素産生が重要であることが示されている。しかし、亜鉛によって増悪化した M1 ミクログリアがアストロサイトの神経保護機能にどのような影響を及ぼすかは明らかになっていない。そこで本研究では、亜鉛により増悪化した M1 ミクログリアが、アストロサイトの食作用に及ぼす影響について調べた。

#### 【方法】

ミクログリアならびにアストロサイトは、生後 1 日齢の新生仔マウス (C57BL/6)より単離培養した。この初代培養ミクログリアに 30 – 60  $\mu$ M 塩化亜鉛を 2 時間暴露した後、細胞を洗浄し 0.1 – 10 ng/ml lipopolysaccharide (LPS)を添加することでミクログリアの極性を M1 へ誘導した。LPS 刺激 22 時間後の培養上清をミクログリア由来コンディショニングメディウム(MCM)としてアス

トロサイトに添加し、蛍光ラテックスビーズを用いて食作用への影響を検討した。また、亜鉛による M1 ミクログリアの増悪化を抑制するため、膜透過性亜鉛キレート剤(TPEN)または活性酸素除去薬(Trolox)存在下でミクログリアに塩化亜鉛ならびに LPS 処置を施し、同様の検討を行った。更に、分子機序の解明を目的に、アストロサイトの食作用に関与するプリン受容体 (P2X7 受容体) の発現が MCM によって変化するか否かをリアルタイム PCR 法により検討した。

#### 【結果】

低・中濃度(0.1 – 1 ng/ml)LPS 処置後の MCM がアストロサイトの食作用を濃度依存的に増加させたため、1 ng/ml LPS による処置を基準とした。塩化亜鉛の前処置は、LPS 処置後の MCM によるアストロサイトの食作用誘導能を抑制した。更に TPEN ならびに Trolox の前処置により、MCM の食作用抑制効果が軽減した。また、LPS 処置後の MCM はアストロサイトの P2X7 受容体の発現を誘導したが、塩化亜鉛の前処置を行った MCM ではその発現が抑制されていた。

#### 【結論・考察】

亜鉛誘導性増悪化 M1 ミクログリアは、アストロサイトに対する食作用誘導能が抑制されており、このメカニズムとして、細胞内亜鉛集積ならびに活性酸素産生によってミクログリアから分泌される液性因子が影響を受け、アストロサイトの P2X7R 発現誘導を抑制することで食作用を抑制するという可能性が考えられた。

申請者は本論文において、脳梗塞時における脳損傷の増悪化の一因として、亜鉛による M1 ミクログリア活性化を介したアストロサイトの神経保護作用の抑制という新たな機序を明らかにした。これは今後、脳梗塞時の障害を軽減して回復を促進する治療法の開発に結びつく重要な知見である。よって、審査委員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。