

氏 名	滝 直 也
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 705 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	脊髄損傷後の運動機能回復における血球細胞由来 I κ B ζ の役割
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 藤本 茂 (委 員) 教授 秋山 達 教授 五味 玲

論文内容の要旨

1 研究目的

転写因子 I κ B ζ (遺伝子名:*Nfkbiz*)は NF- κ B 活性を制御する働きを持ち、様々な炎症性疾患の病態生理に関与している。しかし、I κ B ζ と脊髄損傷後の二次損傷との関連については未だ明らかにされていない。本研究の目的は、マウス脊髄損傷モデルを用いて、血液細胞における I κ B ζ の欠損が脊髄損傷後の二次損傷に与える影響を検証することである。

2 研究方法

I κ B ζ のコンディショナルノックアウトマウス(*Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}*)を用いて、脊髄損傷後の血液細胞における I κ B ζ の働きを調べた。Infinite Horizons impactor を用いて 60 kdyn の力で脊髄正中を圧挫して脊髄圧挫損傷モデルを作成し、Basso Mouse Scale(BMS)で脊髄損傷後のマウス後肢運動機能を損傷後 42 日まで評価した。また、脊髄中の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現量を quantitative real-time PCR(qRT-PCR)、プロテインアレイを用いて評価し、WT 群、*Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}*群とで比較検討した。さらに、非血液細胞由来の I κ B ζ 欠損の影響を除外するために骨髄移植実験(BMT)を行い、WT \rightarrow WT 群、*Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}* \rightarrow WT 群での BMS を比較検討した。

3 研究成果

脊髄損傷後の後肢運動機能は *Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}*群で有意に改善した。qRT-PCR では、脊髄中および白血球中の *Nfkbiz* の mRNA 発現量は脊髄損傷後 12 時間をピークに上昇し、その後、緩やかに減少することが確認された。In situ ハイブリダイゼーションでは、脊髄損傷後 1 日の時点で、*Nfkbiz* の mRNA はマクロファージ様細胞の細胞内の核に発現していた。脊髄損傷後 12 時間の脊髄中では、IL-4、IL-10 の mRNA 発現量が *Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}*群で有意に高く、脊髄損傷後 1 日のプロテインアレイでは、*Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}*群で GM-CSF、CCL11 のタンパク質レベルが有意に高い結果であった。BMT では、*Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}*骨髄を放射線照射した WT マウスに移植した群(*Mx-1-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}* \rightarrow WT 群)の BMS スコアが有意に良好であった。

4 考察

*Mx-1-Cre; Nfkbiz^{fl/fl}*群では、脊髄損傷後 12 時間の脊髄中で IL-4、IL-10 の mRNA 発現量が有意に上昇しており、M2 マクロファージを活性化することで、炎症反応が抗炎症方向に変化した可能性が示唆された。IL-4、IL-10 は代表的な抗炎症性サイトカインであり、プロテインアレイで有意差の見られた GM-CSF、CCL11 は、いずれも過去の研究で脳・脊髄において組織修復に関与することが報告されている。本研究では、脊髄損傷後の後肢運動機能は *Mx-1-Cre; Nfkbiz^{fl/fl}*群で有意に改善しており、BMT の結果と合わせると、血液細胞における I κ B ζ の欠損により抗炎症反応、組織修復反応が活性化し、脊髄損傷後の二次損傷が軽減されたと考えられた。

5 結論

血液細胞における I κ B ζ の欠損は、炎症反応のバランスを抗炎症方向、組織再生方向にシフトさせることで、脊髄損傷後の運動機能回復を促進することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

脊髄損傷後の二次損傷における血液細胞中の I κ B ζ の役割は十分に解明されていない。本研究では、マウス脊髄損傷モデルを用いて、血液における I κ B ζ の欠損が脊髄損傷後の二次損傷に与える影響について検証した。研究の結果、血液細胞における I κ B ζ は脊髄損傷後の二次損傷からの回復を抑制する転写因子であることが示唆された。脊髄損傷後の二次損傷における血液細胞中の I κ B ζ の役割についての研究は新規性があり、研究計画、研究の実施、結果の提示と図表、結果の解釈、考察ともに良く練られていた。一方で、残された課題もあるが、課題についても言及されており、さらなる発展も期待される。学位論文としてふさわしい内容であると判断した。

ただし、以下について修正を要した。

方法

1. 雌性マウスのみ使用した理由について明記すること。
2. t 検定は、対応のない t 検定と修正。

結果・考察

3. 図 2 と図 8 の凡例は上下逆が見やすい。
4. 免疫組織化学染色が可視化できなかった理由について明記すること。
5. 図 4 B のノックアウトマウスの脊髄での mRNA 発現とその変化について言及すること。
6. 考察で、「この結果から、血液細胞における I κ B ζ は脊髄損傷後の二次損傷を増悪させる転写因子であることが示唆された。」とあるが、「二次損傷からの回復を抑制する転写因子」が正しい。
7. 今回の研究成果が、将来的な治療への応用にどのように結び付く可能性があるか、展望を述べること。

上記について適切に修正されたことを確認した。

最終試験の結果の要旨

脊髄損傷後の二次損傷における血液細胞中の $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の役割は十分に解明されていない。本研究では、マウス脊髄損傷モデルを用いて、血液における $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損が脊髄損傷後の二次損傷に与える影響について検証した。研究の結果、血液細胞における $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ は脊髄損傷後の二次損傷からの回復を抑制する転写因子であることが示唆された。脊髄損傷後の二次損傷における血液細胞中の $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の役割についての研究は新規性があり、研究成果とその限界、将来の展望について明確に述べられていた。

プレゼンテーションでは、リサーチクエスションを明確にし、詳細な研究計画、結果のわかりやすい紹介、結果の解釈と考察について理路整然と述べられ、納得できる成果であった。表やグラフについても適切に作成されていた。一方で、残された課題もあるが、その課題についても丁寧に言及されており、さらなる発展も期待される。学位論文としてふさわしい内容であると判断した。

以下について修正を要したが、適切に修正された。

方法

8. 雌性マウスのみ使用した理由について明記すること。

9. t 検定は、対応のない t 検定と修正。

結果・考察

10. 図2と図8の凡例は上下逆が見やすい。

11. 免疫組織化学染色が可視化できなかった理由について明記すること。

12. 図4 B のノックアウトマウスの脊髄での mRNA 発現とその変化について言及すること。

13. 考察で、「この結果から、血液細胞における $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ は脊髄損傷後の二次損傷を増悪させる転写因子であることが示唆された。」とあるが、「二次損傷からの回復を抑制する転写因子」が正しい。

14. 今回の研究成果が、将来的な治療への応用にどのように結び付く可能性があるか、展望を述べること。