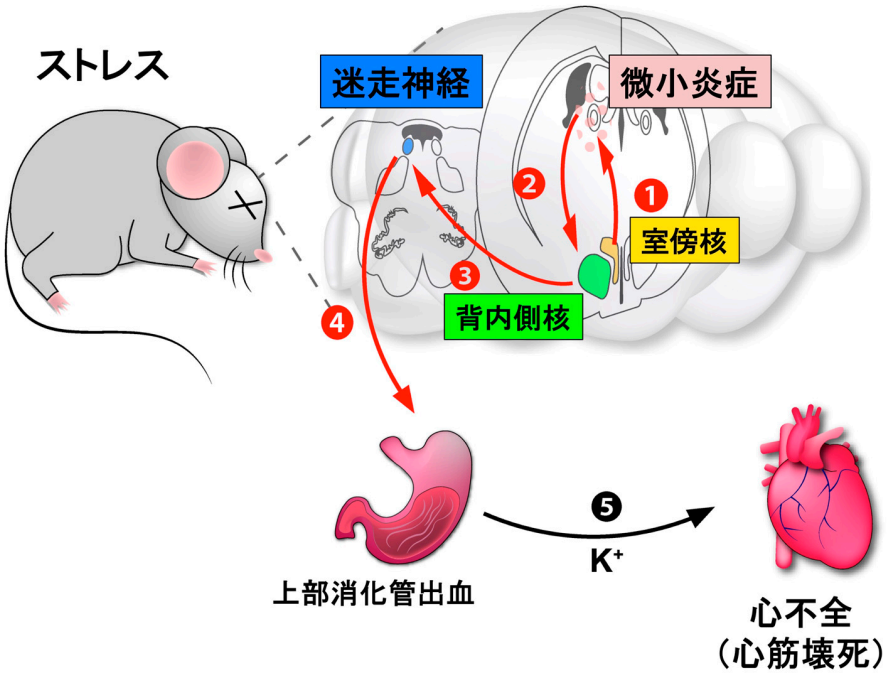
115　過剰ストレス神経活性化を介した中枢神経系炎症の解析	有馬　康伸

【目的】過度のストレスは、多くの病気に寄与することが知られているが、その分子機構は未だ不明であり、現代社会の多くの病気の機序を解明するためにストレスと病態形成の関係性の解明が急がれている。本研究では、ストレスによって誘導される過剰な神経活性化が、どのような分子機序にて、炎症病態の増悪に寄与するかを解析する。本研究成果はなぜ過度のストレスが良くないのかを説明できる点で非常に意義深い研究であり、本解析で明らかとなる分子機構を基盤とし、新規治療薬の創出を目指すことで、社会に大きく還元することできる。

【方法】慢性ストレスを誘導するため、睡眠障害作製ケージや床敷を湿らせたケージを用いた。これらのマウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を誘導する中枢神経系抗原ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）認識 $CD4^{+}T$ 細胞を移入し、その病態を観察した。またストレスと病態の関連性を検討するため、ストレスに関連する脳領域を電気的、薬理学的に遮断し、また脳内微小炎症を模倣するため、サイトカインや免疫細胞を直接脳内へ投与する実験を行った。さらに、胃・十二指腸、心臓での機能障害も観察されたため、各臓器での外科的、薬理学的な解析を実施し、慢性ストレスによる末梢臓器の機能障害についても検討を行った。

【結果】慢性ストレス下での EAE 誘導はマウスに突然死を引き起こした。突然死の詳細を解析した結果、免疫細胞の侵入口が脳内に形成されることを発見した。この細胞集積による微小な炎症の役割について解析を行うと、通常時では誘導されない神経回路活性化を引き起こし、最終的に上過剰な迷走神経活性化が生じることで、胃・十二指腸潰瘍が起こり、出血、それに伴う血中カリウムイオン濃度の上昇が心機能障害を引き起こし、マウスの突然死を誘導した。

ストレスーゲートウェイ反射



115. 過剰ストレス神経活性化を介した中枢神経系炎症の解析

有馬　康伸

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学分野

Key words：炎症，神経活性化，ストレス，ゲートウェイ反射

緒　言

慢性的なストレスは、胃腸疾患や心疾患を含む様々な病気を誘発、増悪することが経験的に知られているが、その詳細な分子機構は、未だ不明な点が多い。以前我々は、重力による局所的な神経活性化が特異的な血管の状態を変化させることで免疫細胞の中枢神経系への侵入口を形成させ、多発性硬化症モデル：実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の病態に寄与することを明らかにし、局所神経活性化による免疫細胞の侵入口形成機構を「ゲートウェイ反射」として報告した［1］。本機構は、重力刺激ばかりではなく、局所神経活性化の種類や場所の変化によって、それぞれ固有の血管に侵入口が移動することも明らかになってきており、例えば多くの病気に付随する痛みによる神経活性化は、脊髄の腹側血管に侵入口を形成させて病気の再発に寄与することが証明されている［2］。慢性的なストレスも過剰な神経活性化を誘導することから、ゲートウェイ反射に基づいて解析することで、睡眠障害、過労などによる突然死の分子機構を明らかにできると考え、研究を実施した［3］。

方　法

1. ストレスによる病態増悪に関与する中枢神経組織での血液脳関門破綻部位と神経回路の探索

中枢神経組織への侵入口を探索するために多発性硬化症モデルである EAE を用いた。病気誘導時に各種ストレスを負荷することで神経活性化を誘導した。具体的なモデルとして、睡眠障害ストレスモデルや床敷湿潤ストレスを負荷した。病態の変化を臨床症状で経過観察するとともに、免疫細胞の集積を組織切片またはフローサイトメーターにより解析した。さらにストレス誘導性の神経活性化がどのように病態に影響するかを解析するために切片を用いて、脳内におけるストレス特異的な神経活性化部位を cfos に対する免疫染色法により解析した。特定した部位の重要性を検討するため、部位特異的な神経活性化の誘導、もしくは抑制を薬剤投与および、電気的な手法を用いた。さらに炎症部位と神経活性化部位、さらに末梢臓器の接続経路を同定するために各種神経トレーサーを用いて、包括的に解析を実施した。

2. ストレス下で形成させる脳内での侵入口形成機構の同定

ストレス下での免疫細胞の侵入口形成にどのような神経伝達物質が関与するかについて、6-OHDA などの薬剤を用いて検証した。さらに免疫細胞の集積を誘導するため、どの遊走因子ケモカインが重要かを同定するため、各ケモカインに対する阻害抗体を腹腔内投与し、臨床症状、切片を用いた免疫細胞集積の解析を行った。

結　果

移入 EAE モデルでは通常、尾部および後肢麻痺を主徴とし、死亡するマウスは現れないが、慢性ストレス下での EAE 誘導はマウスに突然死を引き起こした。突然死マウスの剖検の結果、胃・十二指腸潰瘍による出血に伴う心機能障害がその死因として最終的に示唆された（図 1）。具体的なメカニズムは以下に示す通りである。まず EAE を引き起こす病原性 $CD4^{+}$T 細胞が中枢神経系のどこから侵入したか解析したところ、通常の EAE では第 5 腰髄の背側血管であった侵入口が、脳内の第 3 脳室、海馬、歯状回に囲まれた特定血管に移動していることを発見した（図 1）。ストレス負荷がなぜこの部分に免疫細胞の侵入口を形成するかについて解析するため、まずストレス中枢である視床下部室傍核での

神経活性化に着目すると、当該部位の中でも交感神経が活性化され、その中の一部の神経は特定血管に配位することが明らかとなった。実際に機能的配位であるかについて解析するため、6-OHDA 投与による交感神経切除を行うと細胞集積が顕著に抑制された。さらに脳の当該部位を電気的に破壊することで、特定の血管への免疫細胞の集積と突然死が抑制されたことからも、特定血管への細胞集積には視床下部室傍核での神経活性化が重要であることが示された。また特定血管での細胞集積を誘導するケモカインについて各種中和抗体を用いて、検証した結果 CCL5 が重要な因子であることがわかり、EAE 誘導とは関係なく、ストレスによりケモカイン産生が上昇することも明らかとなった。

次に特定血管周囲での微小な炎症がマウスの突然死に重要かについて解析するため、ストレスを加えたマウスの脳の特定血管周囲にサイトカイン等を直接投与した。サイトカイン投与したマウスでは、睡眠障害マウスに移入 EAE を誘導した場合と同様に、胃・十二指腸潰瘍、心機能障害によりマウスは死亡したことから、特定血管での微小炎症の重要性が明らかとなった。次に特定血管周囲での微小炎症の役割について検討を行った。睡眠障害マウスに移入 EAE を誘導した場合の脳内神経活性化を切片を用いて解析すると、視床下部背内側核の活性化が惹起されていた。これは特定血管での炎症が起因して通常では活性化されない神経回路が活性化されるという非常に新しい知見である。次に炎症によって誘導される神経伝達物質の同定を試みた結果、微小炎症によりアデノシン三リン酸（ATP）が増加することが明らかとなった。さらにこの ATP は微小血管での血管内皮細胞から分泌されていることも明らかとなった。ATP シグナルの重要性を検証するため、特定血管周囲に P2X7 受容体の阻害剤を投与すると、視床下部背内側核での神経活性化は顕著に抑制され、血便および突然死が顕著に抑制された。視床下部背内側核から胃・十二指腸への接続について解析するため、視床下部背内側核へ順行性神経トレーサーを投与すると、迷走神経への接続が確認され、さらにこの部位での神経活性化の上昇も確認された。一般的に迷走神経の過剰な活性化は、胃での潰瘍を引き起こすことが知られており、実際に外科的に迷走神経を切除することで、血便および突然死は顕著に抑制されたため、迷走神経の過剰な活性化が本突然死モデルでは重要であることが明らかとなった。迷走神経の過剰活性化による胃・十二指腸からの出血に起因して、血中のカリウム濃度が上昇しており、心電図の結果からも高カリウム状態を示すテント状 T 波も現れていたことから最終的には心機能低下によるマウスの突然死が誘導されることも解明された（図 2）。

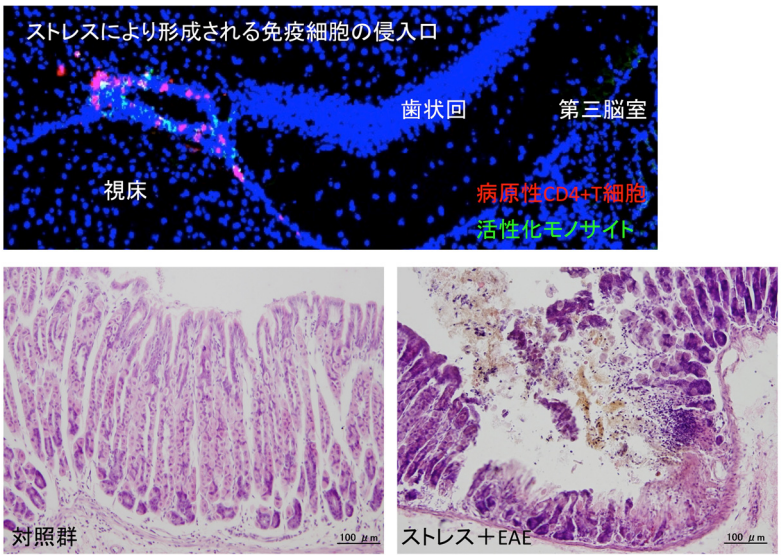


図 1. ストレス依存性免疫細胞侵入口とそれに伴う胃・十二指腸潰瘍の切片像
（上段）ストレス依存性視床下部室傍核活性化によって特定血管の内皮細胞から CCL5 が分泌され、病原性 $CD4^{+}$T 細胞が集積することで免疫細胞の侵入口が形成される。（下段）対照群（左図）と比較し、ストレス環境下で EAE を誘導された場合には胃・十二指腸で潰瘍が生じる（右図）

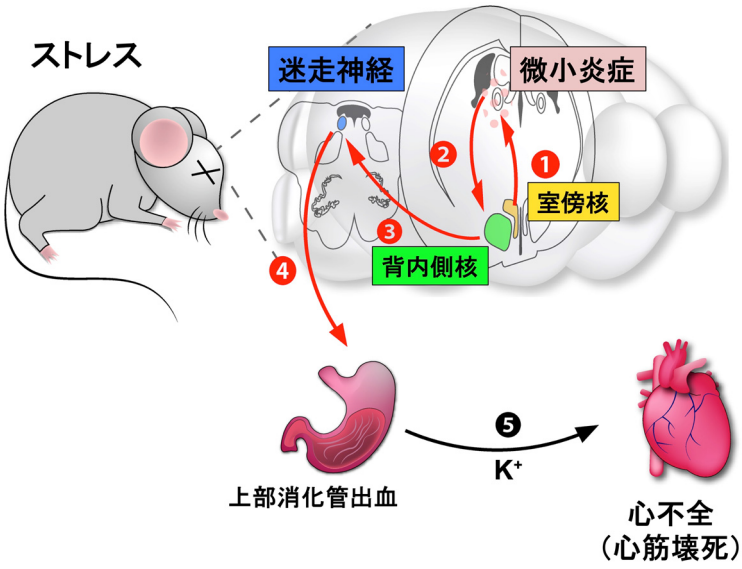


図 2. ストレスーゲートウェイ反射

ストレス依存性に視床下部室傍核が活性化されることで、脳内特定血管において免疫細胞の侵入口が形成される。当該特定血管での微小炎症は ATP を介して、視床下部背内側核を新たに活性化させ、最終的に迷走神経の過剰活性化を誘導する。これにより胃・十二指腸で潰瘍が生じ、出血、それに伴う血中カリウム濃度の上昇により心機能低下が生じて突然死が誘導された。

考　察

本研究により、脳内の特定血管での微小炎症が、定常状態では生じない神経回路活性化を誘導し、ストレス応答を増強してしまうことで、胃・十二指腸潰瘍、心機能障害を引き起こし、突然死を誘導することが明らかとなった。過剰なストレスが精神状態を変容することが経験的に知られていることからも、本研究が「病は気から」の一端を明らかとした世界初の成果である。本研究は、自己反応性 T 細胞である EAE 病原性 $CD4^{+}T$ 細胞の特定血管への集積、微小炎症がストレス応答を増強することを示していることから、同程度のストレス環境下でも、病気になる人と、ならない人の違いを、脳内微小炎症を誘導する病原性 $CD4^{+}T$ 細胞の有無の検査によって予測できる可能性もある。また、アルツハイマー病やパーキンソン病、精神疾患などにおいても脳内に微小炎症が誘導されることが知られていることから、このような疾患においても本機構が作用し、脳自体を含む体内臓器の機能障害を誘導している可能性も示唆される。さらに、多発性硬化症の中でも進行型病態の治療法が確立されておらず、本研究で用いた疾患モデルは進行型多発性硬化症のモデルとなるとともに、本研究成果を基に進行型への移行メカニズムの解明や、新規治療法の創出が期待される。今後は、様々な疾患、外部刺激で誘導される脳内での微小炎症が、脳を含む体内臓器のどの部位へ影響するかについて解析を進め、難治性疾患の治療法の創出に貢献する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野教授の村上正晃先生である。

文 献

1) Arima Y, M Harada, D Kamimura, J Park, F Kawano, FE Yull, T Kawamoto, Y Iwakura, UAK Betz, G Márquez, T S Blackwell, Y Ohira, T Hirano, M Murakami. Regional Neural Activation Defines a Gateway for Autoreactive T Cells to Cross the Blood-Brain Barrier. Cell. 2012 Feb 3;148(3):447-57. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.022.

2) Arima, Y., D. Kamimura, T. Atsumi, M. Harada, T. Kawamoto, N. Nishikawa, A. Stofkova1, T. Ohki, K. Higuchi, Y. Morimoto, P. Wieghofer, Y. Okada, Y. Mori, S. Sakoda, S. Saika, Y. Yoshioka, I. Komuro, T. Yamashita, T. Hirano, M. Prinz, M. Murakami. A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. Elife. 2015 Aug 11;4. doi: 10.7554/eLife.08733.

3) Arima, Y., T. Ohki, N. Nishikawa, K. Higuchi, M. Ota, Y. Tanaka, J. Nio-Kobayashi, M. Elfeky, R. Sakai, Y. Mori, T. Kawamoto, A. Stofkova, Y. Sakashita, Y. Morimoto, M. Kuwatani, T. Iwanaga, Y. Yoshioka, N. Sakamoto, A. Yoshimura, M. Takiguchi, S. Sakoda, M. Prinz, D. Kamimura, M. Murakami. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. Elife. 2017 Aug 15;6. pii: e25517. doi: 10.7554/eLife.25517.