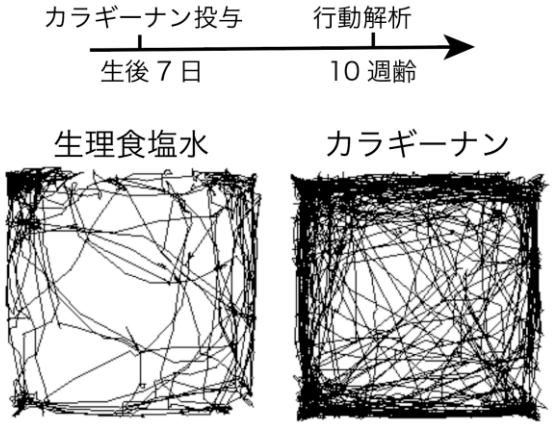
| 143　髄膜炎による異常な神経回路形成のメカニズム | 田辺　章悟 |
|---|---|

**【目的】**髄膜炎は脳や脊髄を覆う髄膜に炎症を起こす疾患の総称である。新生児期に髄膜炎を発症すると、知的障害、てんかん、運動麻痺など重篤な後遺症を残すことがある。しかし、幼年期の髄膜炎が永続的な脳発達障害を引き起こす詳細な分子基盤は解明されていない。近年の遺伝子多型の解析により、脳発達障害の発症には免疫関連分子が関係していることが明らかになってきた。脳内免疫システムは様々な形で脳内の神経回路形成を制御するが、脳発達障害への関与はほとんど解明されていない。本研究では、幼年期の髄膜炎が神経回路の形成を障害するメカニズムの解明を目的に研究を行った。

**【方法】**生後 7 日の C57BL/6J マウスに対して、カラギーナンを大槽に投与して髄膜炎を誘導した。24 時間後、フローサイトメトリーにより免疫系細胞の動態解析を行い、脳内に浸潤する免疫系細胞数を計測した。幼年期に髄膜炎を誘導したマウスを成体まで成長させ、明暗選択箱、オープンフィールド、高架式十字迷路、プレパルス抑制の行動学的解析を行った。さらに、異常行動に関係する脳領域を特定するため、神経活動を検出する c-fos 抗体を用いて免疫組織化学法による組織学的な解析を行った。

**【結果】**髄膜炎を誘導した 24 時間後に免疫系細胞の動態解析を行ったところ、いずれの免疫系細胞の数も大きく増加しており、カラギーナンの投与により髄膜炎が誘導されることが確認できた。幼年期に髄膜炎を誘導したマウスを成体まで成長させ、行動学的解析を行ったところ、多動行動や注意力の低下が観察された。さらに、異常行動に関係する脳領域を特定するために神経活動が変化している脳領域を探索したところ、孤束核で過剰な神経の活性化が認められた。これらの結果から、幼年期の髄膜炎により孤束核に投射する神経の接続性が変化して、行動異常を引き起こしている可能性が示唆される。今後、幼年期の髄膜炎で異常な神経回路の形成に寄与する免疫系細胞の特定やその分子機序の解明、更には孤束核と接続性が変化している脳領域を明らかにしていく必要がある。

幼年期の髄膜炎は成体での多動行動を発症させる



# 143. 髄膜炎による異常な神経回路形成のメカニズム

田辺　章悟

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 神経薬理研究部

Key words：幼年期髄膜炎，免疫系，神経回路，行動異常

## 緒　言

髄膜炎は脳や脊髄を覆う髄膜に炎症を起こす疾患の総称である。新生児期に髄膜炎を発症すると、知的障害、てんかん、運動麻痺など重篤な後遺症を残すことがある。幼年期の髄膜炎による脳発達障害は、成人でも症状を示し、重度の社会性障害やコミュニケーション障害が社会問題の一つとなっている。しかし、幼年期の髄膜炎が永続的な脳発達障害を引き起こす詳細な分子基盤は解明されていない。脳発達障害の病態を解明し、症状を制御する技術が開発されることで脳発達障害の人々に対する健康・医療の向上に繋がる。

近年の遺伝子多型の解析により、脳発達障害の発症には免疫関連分子が関係していることが明らかになってきた[1]。脳内の免疫系細胞は、生理的な脳の発達を制御する。脳内に常在している免疫系細胞であるミクログリアはシナプスの形成や軸索の伸長に関与し、T 細胞は抑制性ニューロンの神経回路形成を制御していることが報告された［2]。このように、脳内免疫システムは様々な形で脳内の神経回路の形成を制御することが明らかになっているが、脳発達障害への関与はほとんど解明されていない。正常に神経回路が発達するためには、適切な時期に適切な構造が造られる精緻なシステムが必要である。免疫系と神経系のクロストークはそのシステムにおける重要なファクターであり、脳発達障害では、そのシステムが破綻して正常な神経回路形成が行われていないことが考えられる。本研究では、幼年期の髄膜炎が神経回路の形成を障害するメカニズムの解明を目的に研究を行った。

## 方法および結果

### 1.　幼年期の髄膜炎における免疫系細胞の動態解析

生後7日のC57BL/6Jマウスに対して、炎症性物質であるカラギーナンを大槽に投与して髄膜炎を誘導した［3]。24時間後、フローサイトメトリーにより脳内に浸潤する$CD4^+$ T細胞、$CD8^+$ T細胞、$CD11b^+$ $CD45^{hi}$ Ly-6G$^-$ マクロファージ、$CD11b^+$ $CD45^{mid}$ミクログリア、$B220^+$ B細胞の動態解析を行った。生理食塩水投与群（Saline）とカラギーナン投与群　(Carrageenan）を比較すると、いずれの免疫系細胞も大きく増加しており、髄膜炎の誘導が確認できた（図1a、b)。また、$CD4^+$ T細胞は脳の実質には浸潤せず、髄膜に多く局在する組織像が観察された。

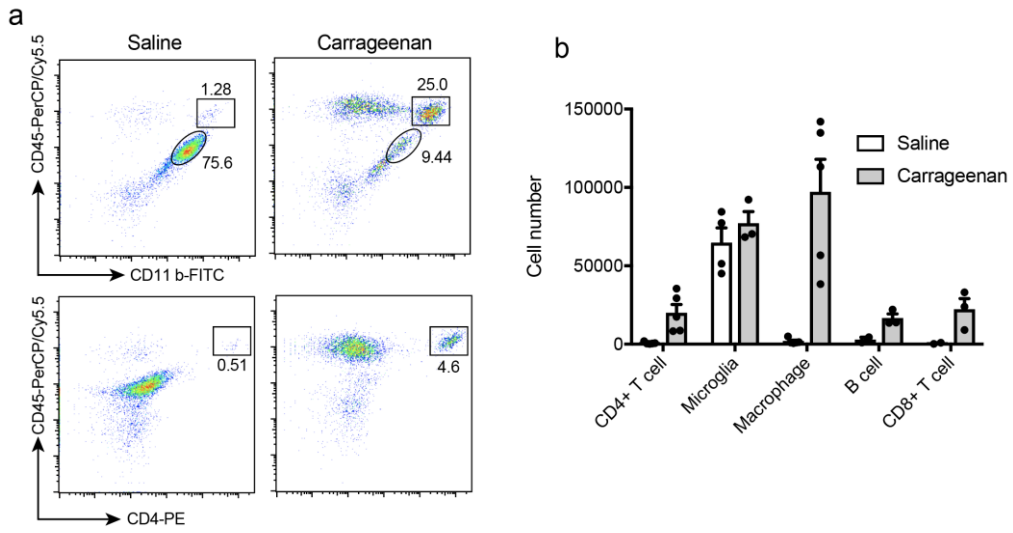



図 1. 幼年期髄膜炎における免疫系細胞の動態解析

a) フローサイトメトリーにより、髄膜炎誘導後の各免疫系細胞の動態を解析した。縦軸に CD45、横軸に CD11b（上段）または CD4（下段）の発現パターンを示す。上段の四角はマクロファージ、丸はミクログリア、下段の四角は $CD4^+$ T 細胞の百分率を示す。

b) フローサイトメトリーから算出した各免疫系細胞の細胞数を示す。

**2. 成体での行動学的解析**

生後 7 日で髄膜炎を誘導したマウスを 10 週齢まで成長させ、行動学的解析を行った。

1）明暗選択箱

10 分間、暗い箱と明るい箱を自由に行き来させ、それぞれの部屋に滞在する時間と回数を計測することで不安様行動を解析した。しかし、生理食塩水投与群とカラギーナン投与群の間で有意な差は観察されなかった。

2）オープンフィールド

120 分間、50×50 cm の箱の中を自由に行動させ、総移動距離と中央のスペースの滞在時間を計測することで行動性と不安様行動をそれぞれ解析した。カラギーナン投与群では、生理食塩水投与群と比べて総移動距離が有意に増加した（生理食塩水投与群：254.2±26.81 m、n＝11；カラギーナン投与群：360.1±26 m、n＝16）。一方で、中央の滞在時間には有意な差は認められなかった（図 2a～c）。カラギーナンを投与することで、多動行動を引き起こすことが示唆される。

3）高架式十字迷路

10 分間、幅 10 cm の十字路にマウスを立たせ、壁のない通路と壁のある通路におけるそれぞれの滞在時間を計測し、不安様行動を解析した。しかし、生理食塩水投与群とカラギーナン投与群の間で有意な差は観察されなかった。

4）プレパルス抑制

マウスは、突然の音刺激に対する驚愕反応を示す。直前に驚愕反応を引き起こさない弱い音刺激を与えることで、驚愕反応が減弱される。減弱された驚愕反応の割合を計測することで、注意機能や感覚情報制御機能の指標となる。74 または 78 dB の弱い音刺激を与えた後に、120 dB の音刺激で驚愕反応を誘導した。生理食塩水投与群とカラギーナン投与群の間で 120 dB のみの音刺激に対する驚愕反応には有意な差は認められなかったが、74 と 78 dB の音刺激によるプレパルス抑制の割合はカラギーナン投与群では有意に低かった（図 2d、e）。カラギーナンを投与することで、注意機能や感覚情報制御機能が低下していることが示唆される。

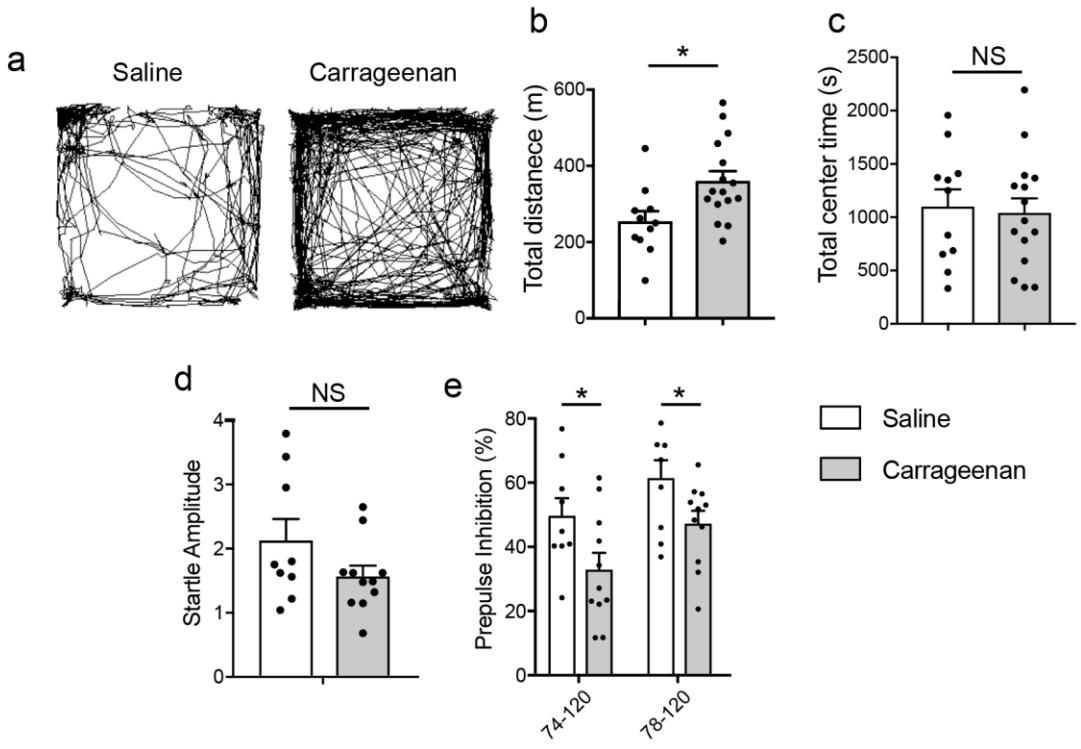



図 2. 幼年期髄膜炎後の成体での行動学的解析

a) 生理食塩水投与群（Saline）またはカラギーナン投与群（Carrageenan）でオープンフィールド試験を行った。図は自由行動後 60～90 分におけるマウスの軌跡を示す。

b) オープンフィールドにおける 120 分間の総移動距離 （*$p$<0.05、two-tailed student $t$-test）。

c) オープンフィールドにおける中央滞在時間（NS : not significant）。

d) 120 dB の音刺激に対する驚愕反応。

e) 74 または 78 dB の音刺激を与えた後の 120 dB に対する驚愕反応の百分率（*$p$<0.05、two-tailed student $t$-test）。

### 3. 行動異常に関与する脳領域の特定

成体での行動異常に関与する脳領域を特定するため、組織学的解析を行った。プレパルス抑制の行動実験を行った 120 分後、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、凍結切片を作製して神経活動の指標である c-fos に対する抗体を用いて免疫組織学染色を行った。多動行動や注意力に関与していると考えられている脳領域である前頭前皮質、孤束核、扁桃体、大脳皮質 S1 領域における c-fos$^+$細胞数を計測した。その結果、孤束核において c-fos$^+$細胞数が多く検出された。幼年期髄膜炎による多動行動や注意力の低下は、孤束核の過剰な活性化を起因としている可能性が考えられる。

## 考 察

本研究では、幼年期の髄膜炎に伴う異常な神経回路形成が神経症状を引き起こすのかを解析した。幼年期のマウスに髄膜炎を引き起こすと、成体で多動行動や注意力の低下が見られた。これらの神経症状はヒトの脳発達障害である注意欠陥多動性障害（Attention deficit hyperactivity disorder : ADHD）に類似している。実際、小児の細菌性髄膜炎は ADHD のリスクファクターであることが報告されている［4］。小児期の髄膜での炎症が異常な神経回路を形成させ、ADHD 様の神経症状を引き起こしていることが考えられる。本研究では、孤束核の神経が過剰に活性化していることを明らかにした。幼年期の髄膜炎により孤束核に投射する神経の接続性が変化している可能性が示唆される。

今後、幼年期の髄膜炎で異常な神経回路の形成に寄与する免疫系細胞の特定やその分子メカニズムの解明、更には孤束核と接続性が変化している脳領域を明らかにしていく必要がある。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立精神・神経医療研究センター神経研究所神経薬理研究部の村松里衣子部長である。

## 文　献

1) Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, Blencowe BJ, Geschwind DH. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. Nature. 2011 May 25;474(7351):380-4. PMID:21614001. DOI: 10.1038/nature10110.
2) Filiano AJ, Xu Y, Tustison NJ, Marsh RL, Baker W, Smirnov I, Overall CC, Gadani SP, Turner SD, Weng Z, Peerzade SN, Chen H, Lee KS, Scott MM, Beenhakker MP, Litvak V, Kipnis J. Unexpected role of interferon-γ in regulating neuronal connectivity and social behavior. Nature. 2016 Jul 21;535(7612):425-9. PMID:27409813. Epub 2016 Jul 13.
3) Gamache DA, Povlishock JT, Ellis EF. Carrageenan-induced brain inflammation. Characterization of the model. J Neurosurg. 1986 Nov;65(5):679-85. PMID:3772456.
4) Hadzic E, Sinanovic O, Memisevic H. Is Bacterial meningitis a risk factor for developing attention deficit hyperactivity disorder. Isr J Psychiatry Relat Sci. 2017;54(2):54-57. PMID:29248907