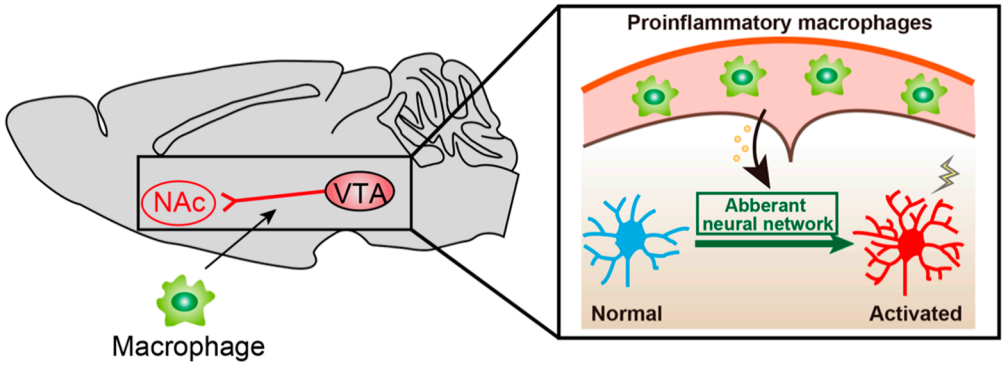
151　脳内免疫システムの異常による脳発達障害の病態機構	田辺　章悟

【目的】脳の髄膜や脈絡叢に局在する免疫系細胞は脳の発達に関与することが知られているが、脳内の免疫系の異常が脳発達障害に関わるのかは明らかになっていない。過去の研究から、発達期のマウスの髄膜に炎症を誘導すると注意欠陥・多動性障害に類似した行動異常が観察されること、側坐核で神経が過剰に活性化することを見出していた。本研究では、幼若期の髄膜炎に伴う行動異常に関わる脳領域の特定とそのメカニズムの解明を目的に研究を行った。

【方法】生後 7 日のマウスに炎症性物質であるカラギーナンを投与して髄膜炎を誘導した。成熟後、アデノ随伴ウイルスを用いて神経活動を薬理遺伝学的に抑制する hM4D（Gi）を側坐核に投射しているドパミン作動性神経特異的に発現させ、オープンフィールド試験、プレパルス抑制試験を行った。また、マクロファージを除去できるクロドロン酸リポソームを発達期のマウスに投与し、カラギーナンを投与して髄膜炎を誘導した。

【結果】hM4D（Gi）のリガンドである Clozapine-N-Oxide（CNO）を投与して神経活動を抑制させると、NAc の過剰な神経活動が抑制された。さらに行動学的な解析から多動行動が大きく抑制され、プレパルス抑制の減弱も正常化することを確認できた。カラギーナンの投与後には脳でマクロファージが大幅に増加する。クロドロン酸リポソームを投与した上でカラギーナンを大槽内に投与すると脳内のマクロファージが減少していることが確認できた。成熟後に行動学的な解析を行ったところ、多動行動が抑制され、PPI の減弱も抑制される傾向が得られた。

炎症性のマクロファージにより異常な神経回路が形成される



151. 脳内免疫システムの異常による脳発達障害の病態機構

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：脳発達障害，マクロファージ，薬理遺伝学

緒　言

脳の発達には免疫系細胞が積極的に関与していることが明らかになっている。脳内に常在する免疫系細胞であるミクログリアはシナプスの形成や不必要なシナプスの剪定、あるいは神経新生に関わり、T 細胞は抑制性ニューロンの神経回路形成の制御、B 細胞はオリゴデンドロサイトの発達に寄与する。このように免疫系細胞は脳の発達を制御する重要な因子であり、近年の遺伝子多型の解析から免疫系の異常が脳発達障害に関わることが明らかになってきた［1］。母体がウイルス感染を起こすと胎児は難聴や精神遅滞、運動障害を起こすことがある。また、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り、幼年期の髄膜炎は注意欠陥・多動性障害（Attention-deficit hyperactivity disorder：ADHD）の強力なリスクファクターとして知られている［2］。このように発達期の過剰な免疫応答は正常な脳の発達を阻害し、通常形成されない神経回路が作られることで脳発達障害に発展する。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神経回路形成システムが必要であり、免疫系はそのシステムにおける重要なファクターである。脳発達障害では、そのシステムが破綻することで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。その考えのもと、我々は幼年期のマウスに髄膜炎を誘導するとADHD 様の異常行動が観察されることを見出していた。本研究では、幼年期の髄膜炎が神経回路形成を障害し、ADHD 様の行動異常を引き起こすメカニズムの解明を目的に研究を行った。

方　法

1. 幼年期髄膜炎の誘導と組織学的な解析

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。マクロファージの除去にはクロドロン酸リポソームを P6 マウスに腹腔内投与することで実施した。

2. 薬理遺伝学的処置

生後 8 週齢の C57BL/6J マウスに対して、イソフルラン麻酔下で retroAAV-DIO-hSyn-hM4D （Gi）-mCherry を側坐核に、AAV9-hSyn-Cre を腹側被蓋野に脳定位固定装置を用いて投与した。2 週間後、Clozapine-N-Oxide（CNO）を腹腔内投与し、組織学的解析と下記の行動学的解析を実施した。

3. 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。オープンフィールド試験では、50×50 cm の塩化ビニル製の箱の中を 100 Lx の明るさにして自由に行動させ、120 分間の総移動距離を計測した。驚愕反応試験では、マウスに 74 または 78 dB の弱い音刺激を与えた後に、110 dB および 120 dB の音で刺激したときの驚愕反応を計測した。

結　果

1.　腹側被蓋野 - 側坐核の神経回路が ADHD 様行動に関わる

過去の研究から、幼年期にカラギーナンで髄膜炎を誘導すると ADHD 様の多動行動を引き起こすとともに側坐核（Nucleus Accumbens：NAc）で過剰に神経が活性化することを見出していた。NAc は前頭前野など複数の脳領域から投射を受けるが、腹側被蓋野（Ventral Tegmental Area：VTA）から NAc へドパミン神経の投射が多動行動に関わる神経回路として知られている。VTA-NAc の神経回路が幼年期の髄膜炎による ADHD 様の行動異常に関わるのかを明らかにするため、Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs（DRAEDD）を用いて薬理遺伝学的に NAc へ投射している VTA の神経活動を抑制した。リガンドである Clozapin-N-Oxide（CNO）で神経活動を抑制できる hM4D（Gi）を Cre 依存的に発現する DIO-hM4D（Gi）-mCherry をコードした逆行性のアデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus：retro AAV）を NAc に、hSyn-Cre をコードした AAV9 を VTA に投与し、VTA から NAc へ投射しているニューロン特異的に hM4D（Gi）を発現させた（図 1a、b）。CNO を投与して神経活動を抑制させると、NAc の過剰な神経活動が抑制された。さらに行動学的な解析から多動行動が大きく抑制され（図 1c、d）、プレパルス抑制（Prepulse-inhibition：PPI）の減弱も正常化することを確認できた。以上の結果から、VTA-NAc の神経回路が過剰に働くことで ADHD 様の神経行動が引き起こされていることが示唆された。

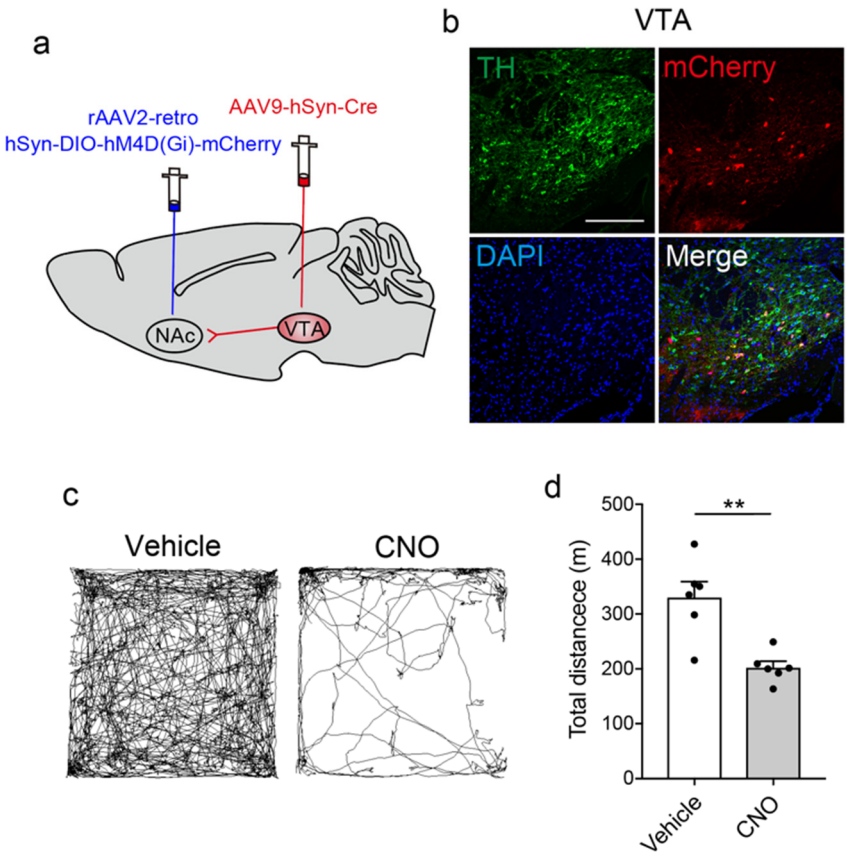


図 1. VTA-NAc の過剰な神経活動がカラギーナンによる ADHD 様行動を誘導する

a）DIO-hM4D（Gi）-mCherry をコードした retroAAV を NAc に、hSyn-Cre をコードした AAV9 を VTA に投与し、VTA から NAc へ投射しているニューロン特異的に hM4D（Gi）を発現させた。

b）VTA で TH 陽性のドパミン神経に mCherry の蛍光が確認できた。Scale bar：200 μ m。

c）Vehicle あるいは CNO 投与後にオープンフィールド試験を行った。図はマウスの軌跡を示す。

d）オープンフィールドにおける 120 分間の総移動距離（**p<0.01、two-tailed student t-test）。

2. マクロファージは炎症後の ADHD 様行動を誘導する

カラギーナンの投与後には脳でマクロファージが大幅に増加することを見出している。マクロファージが ADHD 様の異常行動に関与しているのかを明らかにするため、マクロファージを特異的に死滅させることをできるクロドロン酸リポソームを投与した上でカラギーナンを大槽内に投与した。フローサイトメトリーにより、クロドロン酸リポソームで脳内のマクロファージが大幅に減少していることが確認できた（図 2a、b）。成熟後には行動学的な解析を行ったところ、多動行動が抑制され（図 2c、d）、PPI の減弱も抑制される傾向が得られた。以上の結果から、マクロファージが ADHD 様の異常行動を引き起こす一因であることが示唆された。

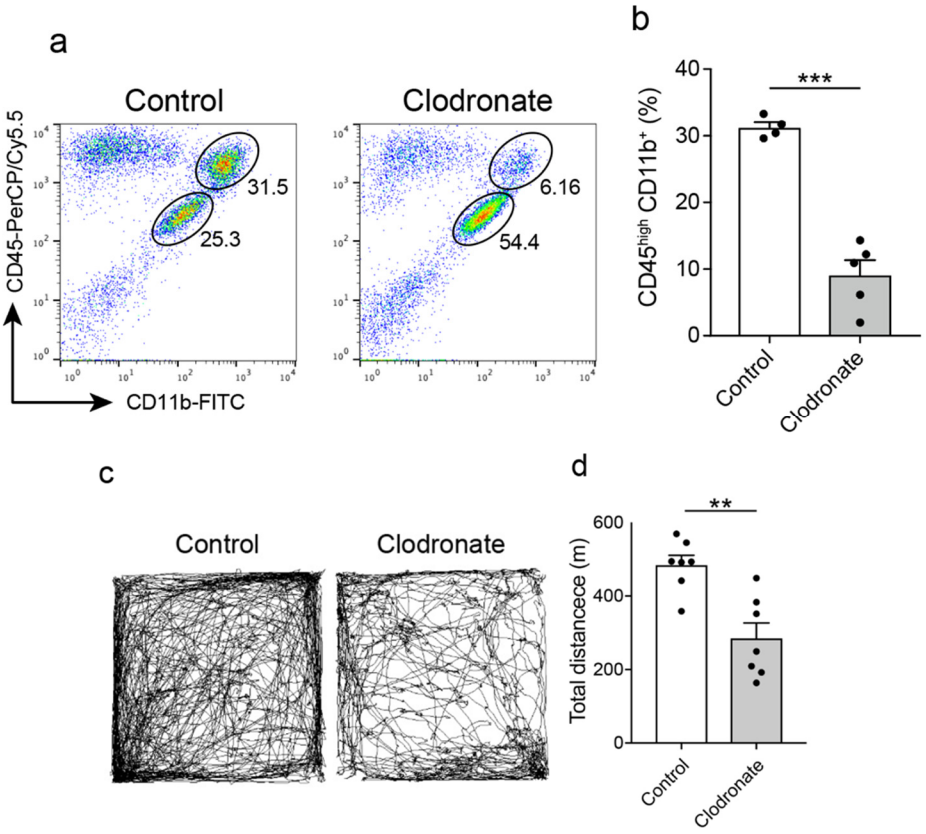


図 2. マクロファージが ADHD 様の行動異常の誘発に寄与する

a) クロドロン酸リポソームを発達期のマウスに投与し、$CD45^{high}$ $CD11b^{+}$脳内のマクロファージをフローサイトメトリーで検出した。

b) $CD45^{high}$ $CD11b^{+}$マクロファージの割合を示す。***$p<0.001$、student's *t*-test。

c) クロドロン酸リポソームを投与したマウスの成熟後にオープンフィールド試験を行った。図はマウスの軌跡を示す。

d) オープンフィールドにおける 120 分間の総移動距離を示す。**$p<0.01$、two-tailed student *t*-test。

3. マクロファージの一部は脳実質に局在する

マクロファージの脳内での局在を観察するため、マクロファージに Cre が発現する CCR2-Cre マウスと Cre 依存的に tdTomato が発現する Ai9 マウスを交配させ、カラギーナンを投与して幼年期の髄膜炎を誘導した。24 時間後に組織学的な解析を行ったところ、マクロファージは髄膜、線条体、中脳など脳内の至るところで検出され、一部のマクロファージは脳実質に浸潤している様子が確認された。

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マクロファージによって誘導されること、VTA-NAc の過剰な神経活動の亢進が神経症状を引き起こすことを示した。マクロファージは造血幹細胞に由来するミエロイド系の免疫系細胞であるが、そのサブタイプは局在する臓器や病態によって多岐にわたることから非常に多様性に富んだ細胞であることがわかっている［3］。ミクログリアとは遺伝子発現パターンの異なる脳内マクロファージは脈絡叢、髄膜、血管壁に局在し、血管の構造維持や生体防御に働く。カラギーナン投与により誘導されるマクロファージは炎症性のサブタイプであるが、炎症性マクロファージは多発性硬化症モデルマウスではミエリンやシナプスの貪食に関わることが報告されている［4］。しかし、本研究ではマクロファージがドパミン神経のシナプスを増加させていることが示唆されることから、これまで知られていたマクロファージの作用とは異なる新しい機能であることが伺える。今後、マクロファージの遺伝子発現解析を通してドパミン神経のシナプス形成に働く分子の同定、脳発達障害の発症を予防できる標的遺伝子の発見へ繋がることが期待される。

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） 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

3） Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanism, and significance of macrophage plasticity. Annu Rev Pathol. 2020 Jan 24; 15-123-147. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31530089 DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.

4） Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Cotleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff RM. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. J Exp Med. 2014 Jul 28;211(8):1533-49. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25002752. doi: 10.1084/jem.20132477.