

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 5月 2日現在

機関番号：83902

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2012～2013

課題番号：24650190

研究課題名(和文) 母体炎症に誘発される発達期脳障害の髄膜免疫系を標的とした実験的治療

研究課題名(英文) Meningeal immunity as a novel target for treating neurodevelopmental disorders induced by maternal immune activation.

研究代表者

島田 厚良 (Shimada, Atsuyoshi) 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長

研究者番号：50311444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中の母体炎症は子に自閉症を誘発する危険因子である。本研究の動物実験によって、脳を覆う髄膜の空間には骨髄由来の免疫細胞が配置されていることがわかった。この髄膜免疫系は、末梢の炎症を脳組織に伝達できること、胎児期における脳内免疫細胞は頭部間葉(後の髄膜)に分布し、脳実質には存在しないことがわかった。従って、母体炎症による胎児脳への影響は頭部間葉に存在する免疫細胞の応答によって生じると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Maternal inflammation during pregnancy is one of the risk factors for autism in offspring. In the present study using experimental animals, we showed that bone marrow-derived immune cells were stationed in the meningeal space that covered the brain parenchyma. The meningeal immunity played a key role to sense and react to peripheral inflammatory responses, resulting in the activation of brain parenchymal cells. Intracranial immune cells were located to the cephalic mesenchyme (meningeal precursors) during the fetal period, but not to the brain parenchyma. Therefore, we suggest that the effects of maternal inflammation on the fetal brains are induced by the reactions exerted by the cephalic mesenchymal immune cells during pregnancy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：発達障害 炎症 免疫 髄膜 脈絡叢 自閉症

1. 研究開始当初の背景

母体炎症は胎児脳の発達に悪影響を及ぼし、自閉症スペクトラム障害をはじめとする精神疾患の一因となる。最近、髄膜・脈絡叢に展開する免疫細胞群(髄膜免疫系)が脳機能を調節する可能性が示された。ここでは、炎症メディエーターを介する応答が母体の体循環から胎盤を通して胎児の体循環へ進入し、何らかの機序で胎児脳組織に反応を惹起すると仮定し、まずは、免疫系と脳組織が細胞間相互作用を介して関連しあう仕組みを解明することをめざした。

2. 研究の目的

(1)「健常な脳組織で、免疫系細胞と脳実質細胞が近接して細胞間相互作用を行う場(インターフェイス)はあるのか? あるとすればどこか? また、その部位へ骨髄由来細胞は

どの経路を通り、どんな仕組みによって脳に進入するのか?」について明らかにする。

(2)「末梢の炎症に応答して、脳組織ではどのサイトカインがいかなる時間経過で増減するのか?

それはどの細胞が産生し、どの細胞が受容するのか?」について明らかにする。

(3)「胎生期から周産期にかけての時期では頭蓋内の免疫系細胞群はどこに位置して、どのような状態にあるのか?」について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GFP 遺伝子導入 C57BL/6 マウスをドナー

とした同系骨髄キメラを骨髄内骨髄移植によって作製した。移植 2 週間、1、4、8 ヶ月後に固定して GFP, NeuN, Iba-1, GFAP, CNPase に対する免疫染色を行うことによって、ドナー由来細胞が脳実質のどの領域にどのような時間経過で進入して何に分化するのかを検討した。また、骨髄細胞進入領域でのサイトカイン（フラクタルカイン、CXCL12 など）発現を免疫染色および RT-PCR によって検討した。

(2) マウスに LPS を腹腔投与し、1、4、24 時間後に海馬をホモジナイズして、サイトカイン濃度をマルチプレックス解析した。また、マウスを全身灌流固定し、検出したサイトカインとその受容体に対する抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行った。

(3) 妊娠 14~19 日目までの各日の胎仔を子宮より取り出し、頭部を 4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定した。生後 1, 3, 6, 9 日齢のマウスより脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定した。また、生後 14, 28 日齢のマウスを 4%パラホルムアルデヒドにて全身灌流固定し、脳を摘出した。各脳はパラフィン包埋し、切片を作製して、抗 Iba-1 抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。

4. 研究成果

(1) ドナー骨髄由来細胞は移植 2 週間には脈絡叢間質に定着し、脳実質には移植 4 ヶ月から 8 ヶ月後の経過で複数の離散的な小領域に限定して進入した。脳に進入した骨髄由来細胞は多数の突起を有し Iba-1 陽性で、GFAP, NeuN, CNPase には陰性であったことから、ミエロイド系への分化を示した。この骨髄由来細胞は突起を介して、ニューロン樹状突起、アストロサイト、オリゴデンドロサイトと細胞間接触した。進入を認めた脳領域の多くは脈絡叢付着部であった。脈絡叢付着部は脳室上衣と髄膜に挟まれた狭い空間で、アストロサイトの線維性突起から成り、このアストロサイト突起はフラクタルカインを発現した。一方、脈絡叢間質には、ミエロイド系細胞のみならず CXCL12 を発現する細胞も存在し、ともに骨髄由来であった。脈絡叢とそれが付着する脳領域からはフラクタルカイン、CXCL12 に加え、関連分子である CX3CR1, ADAM10, CXCR4 の mRNA が検出された。従って、脈絡叢間質・付着部および隣接する脳実質領域は、CXCL12 やフラクタルカインシグナルによって骨髄由来細胞を成熟・分化・リクルートする装置として、脳と免疫系の相互作用に重要な場であると考えられた。

(2) LPS1 時間後に脈絡叢間質・血管周囲細胞が TNF α を発現した。4 時間後に増加したサイトカインのうち CXCL1 は脈絡叢上皮・血管内皮細胞に、CXCL2 は脈絡叢上皮・髄膜細胞・血管内皮細胞に、CXCL9 は脈絡叢間質・血管周囲細胞に、CCL2 は脈絡叢に発現した。24 時間後に増加した CCL11, G-CSF はアストロサイトが発現した。従って、末梢の炎症にตอบสนองして、まず、脈絡叢間質細胞・血管周囲細胞が炎症性サイトカインを発現すること、次いで、脈絡叢・髄膜・血管内皮が脳組織ケモカイン環境を変化させ、アストロサイトにサイトカインを産生させることがわかった。

(3) マウス胎仔脳におけるミエロイド系細胞 (Iba-1 陽性細胞) の分布を調べたところ、胎生期には多くのミエロイド系細胞が頭部間葉や脈絡叢間質に分布し脳実質にはほとんど存在せず、脳実質のミクログリアは生後 3 日齢から海馬に、生後 9 日齢から大脳新皮質に出現し始め、生後 14 日齢には成体脳と同程度に分布した。従って、胎生期に母体炎症によって影響を受けるのは頭部間葉に存在するミエロイド系細胞であろうと推察された。

以上(1)(2)(3)の結果を総合すると、母体炎症による胎児脳への影響は頭部間葉に存在する免疫細胞の応答によって生じると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

原著論文

① Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M and Tanaka M: Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. BMC Genomics 14: 248, 2013

② Yoshikawa K, Kita Y, Furukawa A, Kawamura N, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Takei S, Maruyama K, Shimizu T and Shimada A: Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic

progressive neuronal death.
Prostaglandins, Leukotrienes and
Essential Fatty Acids 88 : 373-381, 2013
10.1016/j.plefa.2013.02.007.

③ Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, Takei S, Chiba Y, Hosokawa M and Ikehara S : Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain, Behavior, and Immunity* 29: 82-97, 2013
10.1016/j.bbi.2012.12.010.

④ Takei S, Hasegawa-Ishii S, Uekawa A, Chiba Y, Umegaki H, Hosokawa M, Woodward DF, Watanabe K and Shimada A : Immunohistochemical demonstration of increased prostaglandin F_{2α} levels in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 218: 295-304, 2012.

⑤ Chiba Y, Takei S, Kawamura N, Kawaguchi Y, Sasaki K, Hasegawa-Ishii S, Furukawa A, Hosokawa M and Shimada A : Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 559-571, 2012.

著書・総説

⑥ 島田厚良, 石井さなえ : 脳と免疫系の相互作用という観点から老化促進モデルマウスをとらえる。基礎老化研究 36 : 13-20. 2012.

⑦ Shimada A and Hasegawa-Ishii S: Senescence-accelerated mice (SAMs) as a model for brain aging and immunosenescence. *Aging Dis* 2: 414-436, 2011.

⑧ 島田厚良, 石井さなえ : 免疫系と神経系の接点から老化促進モデルマウスをとらえる。日本老年医学会雑誌 48 : 439-446. 2011.

[学会発表] (計 11 件)

① Furukawa A, Kakita A, Chiba Y, Higuchi Y and Shimada A. Proteomic identification of oxidatively damaged proteins in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. 17th Biennial Meeting of Society for Free

Radical Research International (Kyoto)
2014. 3. 23-3. 26.

② Hasegawa-Ishii S and Shimada A. Enhanced recruitment of bone marrow-derived cells into the brain parenchyma in senescence-accelerated mice. Asian Association of Aging Research 2013 Seoul Symposium (Seoul) 2013. 11. 8-11. 9.

③ 島田厚良 : 脳と免疫系のインターフェイスから SAM をとらえる。第 28 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会 (名古屋) 2013. 7. 5-7. 6.

④ Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Takei S and Ikehara S. Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *PsychoNeuroImmunology Research Society's 20th Annual Scientific Meeting (Stockholm)* 2013. 6. 5-6. 8.

⑤ Takei S, Hasegawa-Ishii S, Woodward DF, Watanabe K and Shimada A. Immunohistochemical demonstration of enhanced prostaglandin F_{2α} production following kainic acid-induced seizures in rat hippocampus. *PsychoNeuroImmunology Research Society's 20th Annual Scientific Meeting (Stockholm)* 2013. 6. 5-6. 8.

⑥ 石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽一、細川昌則、池原進 : 脳と免疫系の接点としての脈絡叢間質および付着部における細胞動態とサイトカイン発現。第 54 回日本神経病理学会総会 (東京) 2013. 4. 24-4. 26.

⑦ 島田厚良、石井さなえ、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進 : 老化促進モデルマウスにみられる骨髄由来細胞の脳実質へのリクルートの亢進。第 53 回日本神経病理学会 (新潟) 2012. 6. 28-6. 30.

⑧ 石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進 : 骨髄由来免疫系細胞が健常脳に進入する新たな経路 : 骨髄内骨髄移植による組織学的同定。第 53 回日本神経病理学会 (新潟) 2012. 6. 28-6. 30.

⑨ Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, Takei S and Ikehara S. Intra bone marrow procedure facilitates entry of transplanted bone marrow cells through the tenia of choroid plexus into brain parenchyma. PsychoNeuroImmunology Research Society' s 19th Annual Scientific Meeting (San Diego) 2012. 6. 7-6. 9.

⑩ Shimada A, Hasegawa-Ishii S, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, Takei S and Ikehara S. Enhanced recruitment of bone marrow-derived cells into the brain parenchyma in senescence-accelerated mice. PsychoNeuroImmunology Research Society' s 19th Annual Scientific Meeting (San Diego) 2012. 6. 7-6. 9.

⑪ 石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進：骨髄由来免疫系細胞が健常脳に進入する新たな経路の骨髄内骨髄移植による組織学的同定。第 101 回日本病理学会総会（東京）2012. 4. 26-4. 28.

〔図書〕（計 1 件）

① Shimada A, Hasegawa-Ishii S and Furukawa A : SAMP10 strain as a model for the study of brain aging, In “The senescence-accelerated mouse (SAM): Achievements and Future Directions” (Ed.) Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T and Nomura Y, pp 157-174, Elsevier, Amsterdam, 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 厚良 (SHIMADA, Atsuyoshi)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長
研究者番号：5 0 3 1 1 4 4 4

(2) 研究協力者

石井さなえ (ISHII, Sanae)
日本学術振興会特別研究員 RPD
研究者番号：4 0 4 3 5 8 6 3

稲葉宗夫 (INABA, Muneo)
関西医科大学・医学部 非常勤講師
研究者番号：7 0 1 1 5 9 4 7