

知的障害および発達障害の病態形成に関与する脳と免疫系の相互作用

島田 厚良* 石井 さなえ**

Brain-immune interaction involved in the pathogenesis of neurodevelopmental diseases

SHIMADA Atsuyoshi HASEGAWA-ISHII Sanae

要 約

妊娠後期における感染に誘発された母体の免疫系の活性化は、胎内環境を悪化させ、発達中の胎児脳に脆弱性をもたらし、知的障害や発達障害を引き起こす。このことは、免疫系と脳が相互に影響し合うことを示唆するが、その組織・細胞レベルでの機構は明らかではない。本研究ではまず、免疫系細胞と脳の接点はどこかを調べるため、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子導入マウスの骨髄を通常のC57BL/6マウスに骨髄移植し、移植後2週間、1、4、8ヵ月後にマウスを固定し、頭蓋内における骨髄由来細胞の分布を調べた。その結果、骨髄由来細胞は移植後早期に髄膜、脈絡叢間質、血管周囲腔に、移植4-8ヵ月後には、脈絡叢が付着する脳実質領域に分布し、これらの領域が免疫系細胞と脳との接点であることを示した。免疫系と脳の相互作用という新しい観点から、発達障害の病態形成の理解を深め、将来的には予防法や治療薬の開発につなげたい。

キーワード：脳 免疫 発達障害 骨髄移植 脈絡叢

1. 背景と目的

知的障害および発達障害の原因として、遺伝子異常に基づく疾患が多数知られている。1 遺伝子1酵素欠損によって生じるフェニルケトン尿症など各種の先天代謝異常、ミトコンドリア病、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに代表される先天性筋疾患、その他、MECP2遺伝子異常に起因するRett症候群など種々の症候群における精神運動発達遅滞などである。染色体の数の異常に基づく疾患として、21トリソミーであるダウン症候群がよく知られている。染色体の微細な欠失に基づく疾患にはPrader-Willi症候群、Angelman症候群などがある。これらは、

知的障害および発達障害を発症する児の体を構成する細胞に含まれる遺伝情報に何らかの異常があって、児の発達段階で脳に何らかの障害を発症する例である¹⁾。一方、児の側にそもそもの異常は無くても、妊娠中に母親の胎内環境が異常になることによって、児の子宮内発達に影響を及ぼす例も少なくない。子宮内感染を起こす例としては、先天性トキソプラズマ症、先天性風疹症候群、先天性サイトメガロウイルス感染症、先天性ヘルペスウイルス感染症がよく知られている。母親が催奇形性を有する薬物を服用したり、アルコールを摂取したり、喫煙あるいは放射線曝露によっても児の精神運動発達遅滞の誘因になる。

一般に、児に肢体・臓器の奇形が誘発されるのは、臓器形成が盛んに行われる妊娠3ヵ月頃までの早期である。それに対して、妊娠後期から出生後1週間頃までの周産期もしくは周生期と呼ばれる期間は、

* 愛知県心身障害者コロニー 中央病院 中央検査部

** 愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所
病理学部 日本学術振興会特別研究員

肢体・臓器の奇形の発生は少ないものの、とりわけ早産と関連して、脳室周囲白質軟化症に代表される低酸素性虚血性脳症が起こりやすく、典型的には痙直型脳性麻痺を引き起こす。周産期は脳にとっては未だ発達段階であり、細胞移動を終えた神経細胞が遠隔の神経細胞に軸索を伸ばして回路を形成したり、軸索を保護し絶縁する役割を持つオリゴデンドロサイトが軸索周囲に髄鞘を形成したりと、脳内では成熟へ向けた細胞活動が活発に行われている時期である。この時期、低酸素虚血の時間と程度に応じて、重篤であれば、重度の知的障害を伴って重症心身障害となるが、比較的軽度であれば、脳性麻痺よりはある種の学習障害を引き起こすといわれている。重篤度の差はあれ、脳室周囲白質軟化症では、低酸素虚血が起こるよりも前の段階で、母体に感染や炎症性疾患があると、比較的軽度の低酸素虚血刺激でも胎児に脳障害を誘発すると考えられている²⁾。これは、母体で免疫系が活性化されることによって子宮内の環境が変化し、胎盤を通して胎児の側に免疫系の変化を生じさせ、未だ発達段階にある胎児の脳組織にある種の脆弱性をもたらしからである。このことは、免疫系と脳が互いに影響し合う仕組みが生体内に存在することを示唆する。この胎児期における免疫系と脳の相互作用が引き起こす何らかの脳障害は、発生の時期と部位、また、その重篤度に応じて、脳性麻痺や学習障害のほか、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の原因ともなると推察されている。また、胎児に限らず、成体においても免疫系と脳の相互作用が脳の障害を引き起こす可能性は知られており、うつ病やアルツハイマー病などがその例である。従って、免疫系と脳が相互作用する仕組みを知ることは、胎児期から生後発達さらには老年期にいたるまでの、多岐にわたる精神・神経疾患を理解する上で、極めて重要なことである。

しかしながら、長年にわたって、脳は「免疫系から隔絶された特権器官」であると考えられてきた。この考え方の大元は、古くは、エールリッヒおよびゴールドマンによる2つの実験、すなわち、生体の血液中に青色色素を注入しても、全身臓器は染色されるが、脳・脊髄だけは青く染まらない、逆に、脊髄の髄膜空間に青色色素を注入すると、脳・脊髄は染色されるが、全身臓器は青く染まらない、という

事実に端を発しているといわれている³⁾。さらに、メダワの実験、すなわち、皮膚組織片を各臓器に移植すると拒絶反応が起こるが、脳に移植しても拒絶されない、という結果⁴⁾によって、脳と免疫系とは隔絶された存在であると信じられていた。これに対して、近年の実験結果から、自律神経系、内分泌系などが介在することによって、脳と免疫系は相互作用し合う関係にあると考えられるようになってきた。しかし、免疫系の細胞が体内のどこでどのように脳の細胞と近接して細胞間相互作用をするのか、組織・細胞レベルでの詳細な機構についてはまだ明らかではない。そこで、我々は、免疫系の細胞が脳の細胞とどこで接点を持つのかについて明らかにすることを目的として、本研究を行った。

2. 方法

免疫系細胞とはすなわち血球系細胞を指し、全ての血球系細胞は骨髄に由来する。そこで、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を遺伝子導入した C57BL/6 (GFP-B6) マウスをドナーとして骨髄細胞を採取し、通常の C57BL/6 (B6) マウスをレシピエントとして骨髄移植を行った。この手法により、レシピエントの B6 マウスの中で、骨髄由来細胞は緑色蛍光を発する (=GFP 陽性である) ことで同定できる。移植2週間、1ヵ月、4ヵ月、8ヵ月後にレシピエントマウスを固定し、脳のパラフィン切片を作製し、GFP に対する免疫染色を行い、GFP 陽性の骨髄由来免疫系細胞がレシピエント B6 マウスの脳のどこに分布するかを調べた (図1)。

3. 結果

骨髄移植後2週間から1ヵ月で、レシピエント B6 マウスの骨髄や血球系細胞はほぼ全てが GFP 陽性細胞に置き換わった (図2)。このことは、レシピエント B6 マウスの免疫系が、ドナー由来に置換されたことを示す。レシピエント B6 マウスの頭蓋内では、脳を取り囲む髄膜、脳室内に存在する脈絡叢の間質、脳実質中の血管周囲腔に GFP 陽性の血球系細胞が存在した。髄膜、脈絡叢間質、血管周囲腔は解剖学的に一つながりの空間 (髄膜空間) で、有

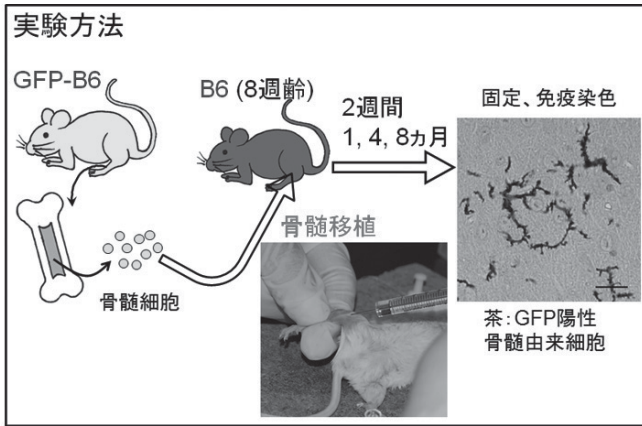


図1：実験全体の概要図。GFP 遺伝子導入 (GFP-B6) マウスをドナー、通常の C57BL/6 (B6) マウスをレシピエントとした骨髄移植を行い、その2週間、1、4、8ヵ月後にマウスを固定し、GFP に対する免疫染色を行った。

窓性の毛細血管を多く含むため、この毛細血管から血球系細胞が浸出したものと考えられる。また、脳室周囲器官と呼ばれる脳領域にも GFP 陽性細胞が存在した。脳室周囲器官には血液脳関門が無いので、毛細血管から血球系細胞が浸出したものと考えられる。脳室周囲器官以外の脳実質にはほとんど GFP 陽性細胞は見られなかった。

骨髄移植後4ヵ月から8ヵ月の経過で、骨髄由来細胞は脳実質中の特定の部位に進入した。脳実質に進入した骨髄由来細胞は、複雑な突起を持つ形態を示し、Iba-1 陽性のミエロイド系細胞であった。骨髄由来細胞が脳内のどの部位に進入するかについて調べるため、脳を前後方向に6箇所に分け、各位置で冠状断に切断し、断面をさらに解剖学的な小領域に分割した。そしてそれぞれの小領域における GFP 陽性細胞の数をカウントし、脳内 GFP 陽性細胞密度を計測した。その結果、GFP 陽性細胞密度が高かったのは、分界条床核、手綱核、内側扁桃核、蝸牛神経核の4領域であった (図3)。

これらの脳領域に共通する解剖学的な特徴を考えると、いずれも脳室の近くに位置し、脈絡叢が脳実質に付着する部位を含む領域であった。脈絡叢が付着する部位では脳実質が極めて薄く、これを髄膜と脳室上衣が挟み込む。付着部から脈絡叢へ向けて、脳室上衣は脈絡叢上皮に移行し、髄膜と脈絡叢上皮の間に脈絡叢間質が形成される。すなわち、脈絡叢間質と脳実質はこの付着部位で解剖学的につな

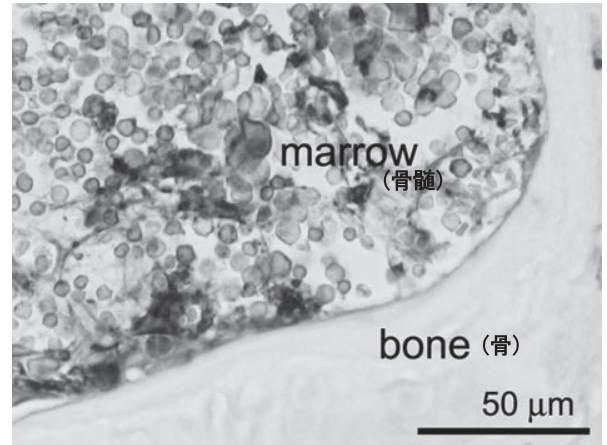


図2：骨髄移植から2週間後のレシピエント B6 マウスの骨髄。骨髄細胞のほぼすべてが GFP を発現し、骨髄がドナー由来細胞で置換されていることを示す。

がっている。

脈絡叢付着部位の組織構築を、免疫組織化学的手法を用いて調べた結果、薄くなった脳実質は、アストロサイトという細胞の線維性の突起からできていることが示された。そこで、このアストロサイトの突起には骨髄由来細胞を脈絡叢間質から脳実質へ誘引するような生理活性物質 (サイトカイン) が発現されているのではないかと推測し、免疫組織化学的手法を用いて脳で発現されることが知られているサイトカインについてその分布を調べた。その結果、脈絡叢付着部位のアストロサイトの突起にはフラクタルカインというサイトカインが強く発現されることがわかった。骨髄由来細胞はフラクタルカインの受容体を有することから、脈絡叢間質の骨髄由来細胞が、脳実質のアストロサイトの線維性突起が放出するフラクタルカインに誘引されて、脈絡叢付着部位を通して脳実質に進入する可能性が考えられた⁵⁾。

4. 考察

脳表面や血管周囲腔の表面は、アストロサイトの突起で覆われている。すなわち、脳表面のすぐ外側を覆う髄膜や血管周囲腔に存在する骨髄由来細胞は、アストロサイトの突起と非常に近接している。また、脳室周囲器官には血液脳関門が無いことから、毛細血管から浸出した血球系細胞は脳の細胞と近接する。すなわち、免疫系細胞と脳との接点として①

骨髄由来細胞の脳内分布

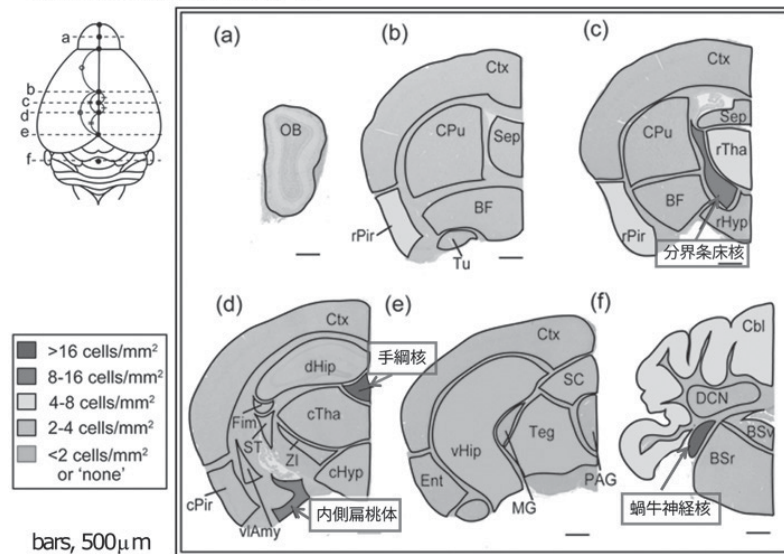


図3：レシピエント B6 マウスの脳内における骨髄由来細胞の分布。骨髄由来細胞は脳内の特定の領域に集中して分布した。特に、分界条床核、手網核、内側扁桃核、蝸牛神経核には高密度の骨髄由来細胞が分布した。(参考文献5より)

髄膜、②血管周囲腔、③脳室周囲器官が挙げられる。

さらに本研究の結果は、脈絡叢間質の骨髄由来細胞が、長期間にわたってゆっくりと脈絡叢付着部位を通して脳領域に進入することを示した。脳に進入した骨髄由来細胞は、近接するアストロサイトやニューロンの樹状突起、またオリゴデンドロサイトの突起と接することから、脈絡叢付着部位を含む脳領域は、免疫系細胞と脳との第四の接点であり、脳の細胞と相互作用を行う可能性が示唆された。このことは、正常な状態でも、免疫系細胞は脳のごく一部には進入し、脳細胞と相互作用を行い得ることを示しており、脳は免疫系から隔離された特権器官だと考えられていたこれまでの概念を覆す新しい発見である。

本研究により得られたこの知見は、成体の個体内で、免疫系と脳がいかに相互作用するのかについての最も根本的な部分の解明である。次の研究課題として、胎児や新生児においても、同様の相互作用が成り立つのかを明らかにすべきである。さらに、母体において活性化された免疫系の情報が、いかにして胎盤を通して胎児の血液へと伝搬されるのかを解明する必要がある。それによって、母体、母体血液、胎盤、胎児血液、そして、胎児脳へと免疫系応答が

伝えられる仕組みが明らかとなる。発達障害は、この仕組みを通して児の脳が恒久的に、免疫系との相互作用をうまくできなくなった状態を反映しているのではないかと考える。この新しい視点から、発達障害の病態形成の理解を深め、将来的には予防法や治療薬の開発につなげたい。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金 研究課題番号：22790392 (石井)、21590458 および 24650190 (島田) による助成を受けて行いました。また、関西医科大学の稲葉宗夫准教授、李銘准教授、石明博士、池原進教授の協力を得て実験を遂行しました。実験補助としては永野崇子氏の協力を得ました。深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 松本昭子、土橋圭子 編集、「発達障害児の医療・療育・教育 改訂2版」1章 発達障害とは何か、③発達障害(脳障害)の原因。金芳堂。2009.
- 2) Volpe, J. J. Neurology of the Newborn. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2008.

- 3) Palmer, A. M. The blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37: 1-2, 2010
- 4) Medawar, P. B. Immunity to homologous grafted skin III. The fate of skin homografts transplanted to the skin, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British J Exp Pathol* 29: 58-69, 1948
- 5) Hasegawa-Ishii S, Shimada A., Inaba M., Li M., Shi M., Kawamura N., Takei S., Chiba Y., Hosokawa M., Ikehara S. Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain Behav Immun.* 29: 82-97, 2013

受付日 2014 年 9 月 30 日

受理日 2014 年 10 月 29 日

Abstract

Maternal immune activation during pregnancy has detrimental effects on the brain development of their offspring, resulting in neurodevelopmental disorders. However, the mechanism of the brain-immune interaction remains to be elucidated. To determine the sites of brain-immune interaction, we made bone marrow chimeric mice in which the recipients' immune system was reconstituted by marrow cells derived from GFP-transgenic mice and examined the distribution of donor-derived marrow cells in the brain 2 weeks and 1, 4 and 8 months after bone marrow transplantation (BMT). Marrow-derived cells were distributed in the meninges, choroid plexus stroma, perivascular spaces and circumventricular organs early after BMT and in the discrete brain regions adjacent to the attachments of choroid plexus during 4-8 months after BMT, indicating that these sites are the brain-immune interface. The findings of the present study would enhance the understanding of the mechanisms underlying neurodevelopmental disorders from the viewpoint of the brain-immune interaction.

[Keywords] Brain, Immune system, Neurodevelopmental disorders, Bone marrow transplantation, Choroid plexus