

主論文の要約

**Astroglial major histocompatibility complex class
I following immune activation leads to behavioral
and neuropathological changes**

免疫活性化に伴いアストロサイトに誘導される
主要組織適合遺伝子複合体クラス I は行動学的および
神経病理学的変化をもたらす

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻

臨床医薬学講座 医療薬学分野

(指導：山田 清文 教授)

祖父江 顕

【背景と目的】

中枢神経系は免疫学的特権部位とされてきたが、サイトカインや主要組織適合遺伝子複合体クラス I (major histocompatibility complex class I; MHCI) など免疫関連因子の発見によりその概念が変化してきている。また、細菌やウイルス感染等の末梢免疫活性化により、うつ病などの神経精神疾患が誘発されることが報告されている。しかし、血液脳関門による物質移行制御のもと末梢免疫活性と中枢での神経炎症反応の相関については不明な点が多い。一方、MHC 遺伝領域はヒトの第 6 染色体に位置しており、ゲノムワイド関連解析では統合失調症など精神疾患のホットスポットとして同定されている。また、マウス MHC 遺伝領域のうち MHC class I 遺伝子は H-2K や H-2D などがあり、シナプスの刈り込みや可塑性など中枢神経系への影響も報告されている。中枢神経系において MHCI は主に神経細胞に発現しており、グリア細胞における MHCI の発現は少なく、ウイルス感染時には増加する事が知られているが、グリア細胞で誘導される MHCI の病態生理学的役割については不明な点が多い。本研究では、末梢免疫活性化による中枢神経系における MHCI の発現変化、ならびに前頭前皮質のアストロサイトにおける膜貫通型 MHCI/H-2D あるいは分泌型 MHCI/sH-2D の発現が周囲の細胞の形態と高次脳機能におよぼす影響について検討した。

【方法】

1. 末梢免疫活性化による脳内 MHCI の発現変化の解析

7 週齢 C57BL/6J 系雄性マウスに生理食塩水 (saline) あるいは合成 2 本鎖 RNA アナログである polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C; 3 mg/kg,i.p.) を腹腔内投与し、6 時間あるいは 24 時間後に前頭前皮質を摘出して MHCI および炎症性サイトカインの mRNA 量を qPCR で測定した。さらに、神経細胞およびアストロサイトにおける MHCI/H-2D mRNA の発現変化は *in situ* hybridization 法により確認した。

2. MHCI の細胞内局在に関する解析

H-2D あるいは sH-2D 遺伝子を導入した培養アストロサイトおよびアストロサイトーマ (C8-D1A) において、各 H-2D 分子と各細胞小器官 (初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソーム、小胞体、ゴルジ体およびエキソソーム) との共局在を二重免疫染色法で調べた。また、エキソソーム分泌についてはウエスタンブロット法で確認した。

3. モデルマウスの作製とアストロサイト H-2D および sH-2D の機能解析

グリア線維酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター下で機能するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いてアストロサイト特異的に H-2D あるいは sH-2D を前頭前皮質に発現させたマウスを作製し網羅的な行動解析 (オープンフィールド、運動量、Y 字迷路、高架式十字迷路、新奇物体探索試験、社会性行動試験、メタンフェタミン感受性試験) および神経病理学的解析 (組織免疫染色: ミクログリア・パルプアルブミン (PV)

陽性細胞変化、Golgi 染色：スパイン密度変化)を行った。

4. モデルマウスの行動障害・神経病理学的変化に対するエクソソーム膜合成阻害薬 (GW4869) の効果

GW4869 をコントロールあるいは sH-2D を導入したマウスに 1 日 1 回 6 週間腹腔内投与をして行動解析 (社会性行動試験、新規物体探索試験) および神経病理学的解析 (マイクログリア、PV 陽性細胞変化解析) を行った。

【結果】

1. 末梢免疫活性化による脳内 MHCI の発現変化の解析

Saline 処置マウスと比較して、polyI:C 処置マウスでは MHCI/H-2D、H-2K および β 2 ミクログロブリン mRNA レベルが polyI:C 処置 6 時間後で有意に上昇し、その上昇は 24 時間後も持続した (Fig. 1b-d)。また、炎症性サイトカインである IFN- β 、TNF- α および IL-6 mRNA も polyI:C 処置 6 時間後で発現上昇を示し、IL-6 の発現上昇は 24 時間後まで持続した (Fig. 1e-g)。さらに、polyI:C 投与 24 時間後における H-2D mRNA の発現は、神経細胞およびアストロサイトで上昇することを *in situ* hybridization 法で確認した (Fig. 1h)。

2. MHCI の細胞内局在に関する解析

HA 融合 H-2D 遺伝子を導入した C8-D1A 細胞では、H-2D タンパク質の発現がエクソソームマーカーの CD63 と共局在した (Fig. 2a)。更に、H-2D あるいは sH-2D を導入した C8-D1A 細胞を用いて培養上清からエクソソームを抽出してウエスタンブロットを行った結果、H-2D を遺伝子導入した細胞に比べて sH-2D を遺伝子導入した細胞では培養上清中のエクソソーム分画に sH-2D が効率よく濃縮された (Fig. 2c-g)。

3. モデルマウスの作製とアストロサイト H-2D および sH-2D の機能解析

前頭前皮質のアストロサイト特異的に H-2D あるいは sH-2D タンパク質を発現させたマウス (Fig. 3) では、社会性行動試験および新奇物体探索試験で障害が認められた (Fig. 4b-d)。また、アストロサイトに sH-2D タンパク質を発現したマウスの前頭前皮質では、マイクログリアの数および大きさの上昇、パルブアルブミン陽性細胞数の減少が認められた (Fig. 5a-d)。さらに、H-2D あるいは sH-2D を導入したマウスの前頭前皮質では、スパイン密度の低下が観察された (Fig. 5e,f)。

4. モデルマウスの行動障害・神経病理学的変化に対するエクソソーム膜合成阻害薬 (GW4869) の効果

sH-2D を導入したマウスの社会性行動の障害は、GW4869 を腹腔内投与することにより改善した (Fig. 6a,b)。また、新奇物体探索試験において、GW4869 は sH-2D を導入したマウスの物体認知記憶の障害を改善した (Fig. 6c)。コントロールマウスに GW4869

を投与しても社会性行動および物体認知記憶に有意な変化は認められなかった(Fig. 6b,c)。さらに、GW4869の投与はsH-2Dを導入したマウスにおけるミクログリア活性化、パルプアルブミン陽性細胞数低下を有意に改善した(Fig.6d-h)。

【考察】

本研究では末梢免疫反応と中枢での神経炎症反応の相関を探索する目的でsalineあるいはpolyI:Cを腹腔内に処置したマウスの前頭前皮質におけるMHCIおよび炎症性サイトカインのmRNA変化を調べた。PolyI:C処置したマウスでは、アストロサイトでMHCI mRNA発現の時間依存的に上昇することを見出した。このことからpolyI:Cによる末梢免疫炎症反応が中枢の神経炎症反応を活性化すること、特にアストロサイトの活性化に伴うMHCIの発現が関与することが示唆された。また、H-2DあるいはsH-2Dを培養アストロサイトおよびC8-D1Aに発現させ、MHCIの分子動態を調べた結果、MHCIはエクソソームに共局在すること、sH-2DはH-2Dに比べて培養液中のエクソソームに多く含有されることを示した。これらの結果からMHCIはエクソソームを介して細胞外へ分泌されることが示唆される。さらに、MHCIの脳内での機能を調べる目的で前頭前皮質のGFAP陽性アストロサイト特異的にH-2DおよびsH-2Dを発現するマウスを作製し、アストロサイトにおけるMHCIの機能を系統的行動解析により調べた。その結果、H-2DおよびsH-2Dを発現するマウスは、社会性行動および物体認知記憶の障害を示し、神経病理学的な変化としてミクログリアの活性化、PV陽性細胞の数の低下およびスパイン密度の低下が観察された。アストロサイトにおけるMHCIの発現はミクログリアの活性化を引き起こし、社会性行動や物体認知記憶に関わる神経細胞の障害を引き起こすことが示唆された。また、これらのsH-2D発現モデルに対するエクソソーム膜合成阻害薬の慢性処置により、社会性行動・物体認知記憶の障害およびミクログリアの活性化などの神経病理学的変化は有意に改善した。したがって、アストロサイトからのエクソソーム分泌が近傍の神経細胞やミクログリアに作用することで脳機能障害を誘発することが示唆された。

【結論】

全身性免疫炎症反応に連動して中枢神経系のアストロサイトは活性化しMHCIが発現すること、その結果、周囲のミクログリアは活性化し、社会性行動と認知記憶に関わる神経細胞は障害されることが示唆された。MHCIの過剰発現による脳機能障害にアストロサイトのエクソソーム分泌が関与していると考えられる。