HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス海馬スライスにおける神経炎症とシナプス可塑性に関する研究［全文の要約］
Author(s)	干野, 晃嗣
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2316 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12575号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66127
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Hoshino_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

マウス海馬スライスにおける
神経炎症とシナプス可塑性に
関する研究
(Studies on the relationship between neuroinflammation and synaptic plasticity in the mouse hippocampus)

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

干　野　晃　嗣

【緒言】

炎症は生体における自然免疫反応であり、外来からの侵襲に対し自己を防衛するための仕組みと考えられている。近年、中枢神経系における炎症、すなわち神経炎症が、その後の認知機能低下に大きく関わっていることが動物実験、あるいは臨床的に報告され注目を集めている。敗血症罹患後の認知機能障害、いわゆる敗血症関連脳症は神経炎症が一因と考えられているが、未だ有効な治療法はなく、死亡率増加と関連しているため、その機序解明、治療法の開発は喫緊の命題である。一方、神経炎症が認知機能を引き起こすメカニズムとして、炎症性サイトカインである Interleukin-1β（IL-1β）の関連が強く示唆されている。しかし、脳内 IL-1βの上昇が認知機能障害を引き起こす詳細な機序は未だ不明であり、その機序解明も神経炎症に起因する疾患群の治療へとつながるものである。また、海馬は人間の学習や記憶を司る脳部位であり、そこで観察されるシナプスの可塑性、長期増強（long-term potentiation: LTP）はそうした機能の細胞学的モデルと考えられている。したがって、神経炎症と認知機能障害の関連を調査するにあたり、海馬におけるシナプス可塑性を指標とし電気生理学的に検討することは重要であると考えられる。以上の研究背景に基づき、本研究では神経炎症、特に IL-1βとマウス海馬シナプス可塑性の関係を検討することを目的とした。第一章では、IL-1βの外的投与と海馬の各部位における LTP の関係を調査した。また、第二章では、敗血症モデルマウスを作成しシナプス可塑性の評価を行い、さらに治療介入の可能性としてミノサイクリンを候補として挙げ、そのシナプス可塑性に対する影響を評価した。

第一章　IL-1βがマウス海馬シナプス可塑性におよぼす影響

【背景】

IL-1βが海馬シナプス可塑性を低下させるという報告は数多くみられ、シャーファー側枝-CA1 シナプス、貫通線維-歯状回シナプスにおいては良く研究されており、IL-1β は LTP を抑制すると報告されている。しかし、CA3 野における報告は少ない。

海馬 CA3 野では 2 種類の LTP が存在する。1 つは NMDA 受容体依存性である連合／交連線維における LTP で、もう 1 つは NMDA 受容体非依存性でシナプス前に発現する苔状線維 LTP である。Katsuki らは 1990 年に IL-1βがマウス海馬の苔状線維 LTP を抑制することを報告したが、彼らは導出された EPSP が苔状線維由来であることを証明する技法を特に用いてはいなかった。

したがって我々は、IL-1βが CA3 野を含むマウス海馬の各部位における LTP と LTD におよぼす影響を検討することで、IL-1βが海馬シナプス可塑性を変化させるメカニズムの一端を解明することを目的とし実験を行った。

【方法と結果】

4-6 週齢の C57BL/6J マウスを使用し、厚さ 300μm の海馬スライスを作成した。スライスを灌流槽に移して固定し、標準人工脊髄液を 2mL/時間の速度で灌流し電気生理学的検討を行った。興奮性シナプス後電位（excitatory postsynaptic potential: EPSP）を導出、安定した後にマウス由来組み換え IL-1β（1ng/mL）を 30 分間灌流投与した。投与終了時に 100Hz の高頻度刺激を用いて LTP を誘導し、高頻度刺激 60 分後の EPSP 振幅を基準値と比較して定量を行った。以上の実験をシャーファー側枝-CA1 シナプス、苔状線維-CA3 シナプス、CA3 野交連/連合線維シナプスにおいて行った。苔状線維シナプスの実験では苔状線維シナプス由来の応答であることを確認するために二発増強刺激率による選別、実験終了時のⅡ群代謝型グルタミン酸受容体アゴニストの投与、高頻度刺激前の N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体拮抗薬の投与を行った。結果、NMDA 受容体依存性の LTP であるシャーファー側枝-CA1 シナプス、および CA3 野交連/連合線維シナプスでは IL-1β投与により有意に LTP が抑制されたが（CA1: 138.4 ± 6.2% vs. 119.1 ± 3.8%, P < 0.05, CA3: 160.9 ± 7.4% vs. 134.3 ± 9.1%, P < 0.05）、NMDA 受容体非依存性の LTP である苔状線維シナプスでは抑制されなかった（155.0 ± 15.6% vs. 161.2 ± 19.8%, P > 0.05）。

【考察】

本実験で、IL-1βがマウス海馬スライスにおいて LTP をシナプス特異的に抑制することを初めて示した。IL-1β（1ng/mL）の 30 分間投与は NMDA 受容体依存性の LTP のみを抑制し、苔状線維シナプスの LTP も抑制するとした過去の報告とは異なる結果となった。過去の苔状線維シナプスにおける報告では、苔状線維由来の EPSP であることを確認する方法を用いていないため、NMDA 受容体依存性の可塑性をもつ交連/連合線維シナプス由来の EPSP が混在していた可能性が考えられた。

【結論】

IL-1βはマウス海馬 NMDA 受容体 LTP に対し、シナプス特異的な抑制作用を示した。これは、IL-1βがシナプス可塑性を抑制するメカニズムを解明する端緒となるものである。

第二章ミノサイクリンが盲腸結紮穿孔マウス海馬のシナプス可塑性にあたえる効果

【背景】

小膠細胞の活性化と引き続いて起こる TNF-α、IL-1βといった炎症性サイトカインの放出は敗血症関連脳症発症の重要なステップと考えられている。ミノサイクリン(MINO)は第二世代の半合成テトラサイクリンの一種であるが、抗菌活性だけではなく抗炎症作用、抗アポトーシス作用を有することが知られている。これらの抗菌活性以外の作用は、MINO が小膠細胞の活性化を抑制し、IL-1βなどの炎症性サイトカイン遺伝子の発現を抑制することに由来する。いくつかの臨床研究および動物実験で、虚血性脳障

害や敗血症関連脳症に対するMINOの神経保護効果は確認されているが､いずれも行動学試験や免疫組織化学を用いた研究であり、シナプス可塑性を電気生理学的に検討したものは限られている。したがって我々は、盲腸結紮穿孔（cecal ligation and puncture; CLP）による敗血症モデルマウスを作成し、敗血症関連脳症と海馬LTPの関係、およびミノサイクリンによる介入可能性について検討することとした。

【方法と結果】

実験には6週齢のC57BL/6Jマウスを使用した｡敗血症罹患時におけるMINOの海馬LTPへの作用を検討するために、 CLP+生理食塩水（vehicle）投与群、CLP+MINO 投与群、結紮穿孔を行わない偽手術（sham）+vehicle群、sham+MINO群の4群にわけて実験を行った。MINOは24時間ごとに60mg/kg（vehicle群では同量の生理食塩水）の投与を3回行い、３回目の投与はCLPもしくはsham手術終了直後に投与した。手術24時間後に第一章と同様の手順で海馬スライスを作成し、シャーファー側枝-CA1シナプスにおいてLTPの定量を行った。LTPの誘導にはtheta-burst stimulation（TBS）を用いた｡結果､CLP+MINO群ではCLP+vehicle群と比較し有意にLTPが改善し(196.7±10.8% vs. 149.1 ±2.6%, $P < 0.05$)、sham群と同程度にまで回復した。続いて、IL-1βがCLPマウスのシナプス可塑性に与える影響と、MINO と IL-1β抑制の関係を調べるためにIL-1ra（50ng/mL）をLTP誘導前の30分間灌流投与して実験を行った。結果、IL-1raはsham群においてはLTPを変化させなかったが、CLP+vehicle群ではIL-1ra投与によりLTPはsham群と同程度にまで改善し(206.7±12.4% vs. 157.8±8.2%, $P < 0.05$)、CLP+MINO群では相加的なLTP増強効果は見られなかった。

【考察】

本実験で､敗血症マウス海馬においてMINO投与がLTP抑制を防ぐことを初めて示した。また、CLPによるLTP低下がIL-1raの灌流投与により改善したことから、LTP低下の機序には IL-1 受容体を介したシグナルが関与している可能性が高いと考えられた。MINOは小膠細胞の活性化を抑制することから、小膠細胞の活性化抑制によるIL-1β産生の低下がMINOのLTP改善効果の主たる機序と推察された。

【結論】

敗血症マウス海馬においてミノサイクリン投与が海馬のLTP低下を防ぐことを初めて示し､この効果はミノサイクリンによるIL-1受容体シグナルの抑制が関連している可能性が示唆された。