



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脳の特定血管における微小炎症は新たな神経回路を形成することで末梢臓器不全を引き起こす
Author(s)	西川, 直樹
Description	配架番号 : 2398
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13019号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13019
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70311
Type	doctoral thesis
File Information	Naoki_Nishikawa.pdf



学位論文

脳の特Ⓐ定血管における微小炎症は新たな神経回路を形成することで
末梢臓器不全を引き起こす

(Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-
homeostasis via the activation of a new neural circuit)

2018 年 3 月

北海道大学

西川 直樹

学位論文

脳の特異血管における微小炎症は新たな神経回路を形成することで
末梢臓器不全を引き起こす

(Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-
homeostasis via the activation of a new neural circuit)

2018 年 3 月
北海道大学
西川 直樹

目次

発表論文目録・ ・ ・ ・ ・	1 頁
緒言・ ・ ・ ・ ・	6 頁
略語表・ ・ ・ ・ ・	8 頁
実験方法・ ・ ・ ・ ・	10 頁
実験結果・ ・ ・ ・ ・	18 頁
考察・ ・ ・ ・ ・	62 頁
総括および結論・ ・ ・ ・ ・	65 頁
謝辞・ ・ ・ ・ ・	65 頁
引用文献・ ・ ・ ・ ・	66 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Naoki Nishikawa*, Yasunobu Arima*, Takuto Ohki*, Kotaro Higuchi* (*Equal contribution), Mitsutoshi Ota, Yuki Tanaka, Junko Nio-Kobayashi, Mohamed Elfeky, Ryota Sakai, Yuki Mori, Tadafumi Kawamoto, Andrea Stofkova, Yukihiro Sakashita, Yuji Morimoto, Masaki Kuwatani, Toshihiko Iwanaga, Yoshichika Yoshioka, Naoya Sakamoto, Akihiko Yoshimura, Mitsuyoshi Takiguchi, Saburo Sakoda, Marco Prinz, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami:

Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit
eLIFE, 6:e25517 DOI: 10.7554/eLife.25517, 2017 年 8 月

学会発表なし

緒言

我々は様々なストレスに暴露されながら生きている。

ストレスの原因には人間関係、仕事などが挙げられるが、その背景には過剰な神経活性化があると考えられる。

また慢性的なストレスが原因で胃潰瘍や不整脈、下痢、自己免疫性疾患の増悪などが引き起こされることは経験的に広く知られている。

しかし、慢性的なストレスがどのような分子メカニズムを経て、これら疾患を引き起こすかに関しては分かっていない。

自分の所属する研究室では、神経活性化による炎症増悪機構の解析とその分子機構の解明を世界に先駆けて追及してきた。具体的には、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis:EAE) マウス^{1,2}を用いて、抗重力筋からの感覚神経 - 交感神経の活性化が、第五腰髄背側血管でノルアドレナリン (noradrenaline:NA) を分泌させ、それに引き続く血管内細胞からの過剰なケモカイン産生が脳血液関門に免疫細胞の侵入口を形成し、病気を誘導することを報告した。³

この、特定の神経回路の活性化によって神経伝達物質が特定の血管部位に現れることで、通常は免疫細胞が侵入できない中枢神経系 (脳、脊髄) の血管に免疫細胞の侵入口が形成される現象をゲートウェイ反射と名付けた。

また最近では、疼痛刺激が EAE マウスで病態の再発を誘導することから痛み刺激によるゲートウェイ反射を報告した⁴。具体的には、疼痛刺激によって誘導される感覚神経の活性化が脳内の前帯状回を介し、交感神経を活性化し、これにより分泌される NA が major histocompatibility complex (MHC) class II 分子を高発現したモノサイトを第五腰髄腹側へ集積させ、抗原提示によって活性化した自己反応性 T 細胞由来の Interleukin (IL)-17 などが過剰なケモカイン産生を誘導し、病態を再発させることを報告した。

これら先行研究の結果をもとに、我々は慢性的なストレスによって誘導される過剰な神経活性化が炎症を惹起し、様々な病気を増悪させるという仮説を立てた。

慢性的なストレスモデルとしては睡眠障害モデルと連日ケージ内に水を撒く Wet bedding ストレスモデルを使用し、慢性的なストレスによって誘導される神経活性化が、どのように EAE の病態を増悪させるかを解明することから、慢

性的なストレスがどのような神経回路を活性化し、どのような分子メカニズムにより局所血管の性状変化を引き起こし、炎症病態の増悪に寄与するかを解明することを目的とした研究である。

本研究ではまず EAE マウスを用いたストレスモデルの作成実験を行った。

通常の EAE マウスでは病原性 cluster of differentiation (CD) 4 陽性 T 細胞の移注後、尾や脚の麻痺といった症状が認められるが、慢性ストレスモデルに EAE を誘導するとこれら症状を認めずに死亡する個体が有意に多く認められた。

次に慢性ストレスモデルに EAE を誘導した際の死亡原因を探った。

慢性ストレスモデルに EAE を誘導すると胃・十二指腸からの消化管出血を引き起こし、さらに高カリウム (K) 血症を引き起こし心停止を引き起こしていることを明らかにした。

通常の EAE マウスと明らかに表現型が異なるので、慢性ストレスモデルに EAE を誘導したマウスでは免疫細胞の中樞神経系への侵入血管に変化が生じているという仮説を立て、慢性ストレスモデルに EAE を誘導したマウスの中樞神経系を網羅的に調べた。その結果、第三脳室、海馬、視床に囲まれた特定血管に微小炎症を生じ、免疫細胞の侵入口を形成していることを明らかにした。

さらにこの特定血管の微小炎症が起こるメカニズムを調べたところ、ストレスに反応する視床下部室傍核 (PVN) での交感神経の活性化が重要であることを発見した。

次に第三脳室、海馬、視床に囲まれた特定血管の微小炎症がマウスの突然死にどのように影響するかを調べた。その結果、微小炎症により、アデノシン三リン酸 (ATP) が分泌され、分泌された ATP がさらに神経伝達物質として背内側核 (DMH) に作用し、迷走神経背側核 (DMX) を経由し、胃・十二指腸からの出血を引き起こすことを明らかにした。

以上より、慢性ストレスによって室傍核の交感神経が興奮し、その刺激が脳の視床、歯状回、第三脳室で囲まれた領域の特定血管で微小炎症を引き起こし、それによる免疫細胞の集積が特定血管で ATP を発現し、ATP を介した神経刺激で背内側核-迷走神経内側核という新たな神経回路を形成し、迷走神経内側核から上部消化管への過剰な神経刺激により消化液過多から出血を引き起こし、その血液を再吸収することにより高カリウム血症に陥り死亡することを明らかにした。これを慢性ストレスによるゲートウェイ反射と名付けた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AP	anterior-posterior
APC	allophycocyanin
BMDc	bone marrow-derived dendritic cell
CC	central canal
CCL	CC Chemokine Ligand
CD	cluster of differentiation
CMC	carboxymethyl cellulose
CREB	cAMP response element binding protein
CTB	cholera Toxin B subunit
CX3CL	chemokine (C-X3-C motif) ligand
Cy	cyanine
DAT	dopamine transporter
DC	dendritic cell
DMH	dorsomedial-nucleus-of-hypothalamus
DMX	dorsal motor vagal nucleus
DRG	dorsal root ganglions
DV	dorsal-ventral
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
FITC	fluorescein isothiocyanate
GABA	gamma aminobutric acid
Gr-1	granulocyte-differentiation antigen-1
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IL	interleukin
INF	interferon
K ⁺	potassium ion
KO	knock out
L5	the fifth lumbar
LMD	laser microdissection
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
ML	medial-lateral

MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
NA	noradrenaline
NAT	noradrenaline transporter
ND	not detected
NFATc1	nuclear factor of activated T cell c1
NK	natural killer
NTS	nucleus of the tractus solitaries
OVA	ovalbumin
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PHA-L	phaseolus vulgaris Leucoagglutinin
PVN	paraventricular-nucleus
RRID	research resource identifier
SD	sleep disorder
TH	tyrosine hydroxylase
WB	wet bed

実験方法

マウスの系統

C57BL/6 マウス (日本 SLC)。

C57BL/6-PL マウス (Taconic)。

C57BL/6-Tg (Tcra2D2, Tcrb2D2) 1Kuch/J マウス⁵ (Jackson lab)、

IL-17A-deficient⁶ マウスは共同研究者の慶應義塾大学吉村先生より戴いた。

B6.129S7-Ifng^{tm1Ts}/J マウス⁷は共同研究者の慶應義塾大学吉村先生より戴いた。

すべてのマウスは北海道大学医学部動物実験施設 SPF 環境で飼育し、マウスに対する実験では全て北海道大学動物実験に関する規定、北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定に従って行われた。

EAE 誘導マウス作成^{3 4 8}

ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白の 35-55 番目のペプチド (myelin oligodendrocyte glycoprotein: MOG (33-55)) (Sigma-Aldrich) と complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) で作製したエマルジョンを 200ug 尾部の付け根に皮下投与した (day0)。さらに Pertussis toxin (Sigma-Aldrich) を 200ng 静脈注射により投与した (days 0, 2 and 7)。10 日後に EAE を発症したマウスから脾臓を回収し、さらに脾臓から CD4 陽性 T 細胞を抗 CD4 microbeads (Milteny, Tokyo) を用いて単離した。単離した CD4 陽性 T 細胞 (4×10^6 cells) は rIL-23 (10 ng/ml; R&D, Minneapolis) と MOG ペプチド 25ug/ml を抗原提示させた骨髄由来の樹状細胞 (5×10^5 cells) と二日間共培養した。培養した細胞 (1.5×10^7 cells) は野生型、もしくは遺伝子改変マウスに静脈注射により投与した (図 1)。

Animal Model of MS: EAE

EAE is induced by generation of autoreactive helper T cells to
CNS antigens

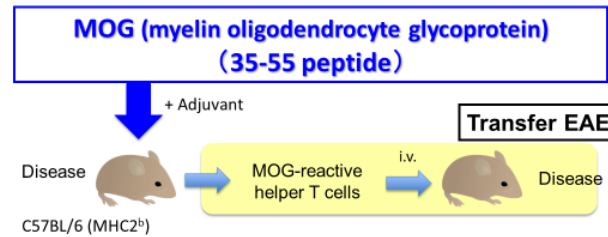


図 1. EAE 誘導マウスの作成方法

Day0 に中枢抗原である MOG (33-55) と complete Freund's adjuvant のエマルジョンを $200\mu\text{g}$ 尾注射し Day0, 2, 7 に Pertussis toxin 200ng を静脈注射することで EAE を発症されたマウスより病原性 CD4 陽性 T 細胞を単離し、それを培養したものを野生型、もしくは遺伝子改変マウスに静脈注射することで EAE を誘導したマウスを作成した。

EAE の病勢は EAE clinical score によって評価した (表 1)。

表 1. EAE clinical score

Score	Signs	Description
0	Normal behavior	No neurological signs.
1	Tail weakness	The mouse tail is limp and droops.
2	Hind legs weakness	Limb paresis, wobbly walk - when the mouse walks the hind legs are unsteady.
3	Hind legs paralysis	The mouse can't move it's hind legs and it drags them when he walks.
4	Full paralysis	The mouse can't move it's legs at all, it looks thinner and emaciated.
5	Death	

0 点は通常行動、1 点は尾の脱力、2 点は後ろ足の脱力による歩行異常、3 点は後ろ足の麻痺、4 点は前足・後ろ足両方の麻痺、5 点は死亡で EAE の病勢を評価した。

中枢神経系に影響を与えない抗原として、卵白を形成する主要なタンパク質であるオボアルブミン (Ovalbumin; OVA) の 323-339 番目のペプチド (Sigma-Aldrich) を用いた。ペプチドを除き、OVA に特異的な CD4 陽性 T 細胞が生成された。また MOG 病原性 CD4 陽性 T 細胞と同じ方法で得られた CD4 陽性 T 細胞を移注した。

睡眠障害モデル

6-8 週齢の C57BL/6 マウスを使用した。

MELQUEST 製の順化用回転籠 (SW-15S) 内でマウスを一週間程度飼育し、次に同社の睡眠障害モデルマウス作成装置 (SW-15-SD) へ移した。

EAE マウスの誘導をする場合は睡眠障害 (sleep disorder; SD) ^{9 10} ケージ移動後 2 日目に分離してきた病原性 CD4 陽性 T 細胞を静脈注射した (図 2)。

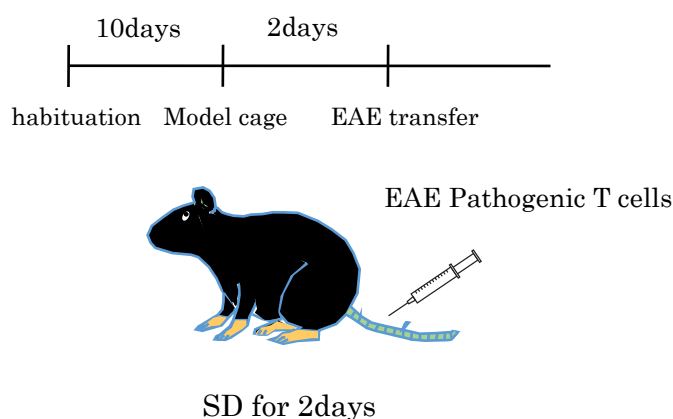


図 2. 睡眠障害モデルマウスの作成手順

順化ケージで 7~10 日程度順化を行い、その後睡眠障害モデルマウス作成ケージに移し、2 日後に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞の静脈注射を行った。

便潜血反応検査

各々のマウスより得られた便を生理食塩水に溶かし、8000 回転/分で 5 分間遠心分離を行い、沈殿物を生理食塩水で 100 倍希釈したものに Hemastix (SIEMENS) を用いて便潜血反応を評価した。

Wet bedding ストレスモデル

6-8 週齢の C57BL/6 マウスを使用。床敷きに連日 350ml の水を撒き、ケージ内が湿った状態を維持した。2 日後に病原性 CD4 陽性 T 細胞を静脈注射した。

血清 K⁺の測定

マウスから採取した血液を富士フィルムの富士ドライケム 7000 を用いて測定した。

ATP 測定

使用した type1 collagen+ endothelial BC1 の細胞株は大阪大学の宮坂先生より戴いた。BC1 細胞は 96well のプレートに 1×10^4 個/well ずつ分け、人 IL-6 (50ng/ml; Toray Industries) と人可溶性 IL-6 receptor α (50ng/ml; R&D Systems)、マウス IL-17A (50ng/ml; R&D Systems) で刺激した。ATP は TOYO Ink の ATP assay kit を用いて測定した。

心電図

マウスの側腹部に Primetech Corporation の TA11ETA-F10 を植え込み、マウスの両側に電極を設置することで心電図を測定した。解析システムには Primetech Corporation の Dataquest A, R, T Analysis を使用した。

ヘマトクリット測定

血液はヘパリン化した microhematocrit capillary で採取され、それを 12000 回転/分で 5 分間遠心分離し、KUBOTA のヘマトクリット計測版を用いてヘマトクリット値を測定した。

組織学的解析

脳を採取し、SECTION-LAB の SCEM 包埋剤で凍結包埋し、Leica Microsystems のミクロトーム装置の CM3050 と SECTION-LAB 社の Cryofilm type IIIc (16UF) を用いて凍結切片の切り出しを行った。¹¹

得られた切片をヘマトキシリン・エオジン染色、または免疫組織化学染色を行い、KEYENCE の BZ-9000 顕微鏡を用いて観察し、Bz-II 分析装置 (KEYENCE 社) の HS ALL ソフトウェアによって解析した。

フローサイトメトリーで用いた抗体

フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate; FITC) 結合の抗 CD19 抗体 (eBioscience; 研究資源識別子 (Research Resource Identifier (RRID)) AB_464966)、FITC 結合の抗 CD11b 抗体 (BioLegend; RRID AB_312712)、FITC 結合の抗 CD4 抗体 (BioLegend; RRID AB_312712)、FITC 結合の抗 natural killer (NK) 1.1 抗体 (eBioscience; RRID AB_465317)、フィコエ

リトリン(phycoerythrin;PE)結合の抗 CD44 抗体(BioLegend; RRID AB_312959)、PE 結合の抗 T 細胞受容体(T cell receptor;TCR)抗体(BioLegend; RRID AB_313430)、PE 結合の抗 CD11b 抗体(BioLegend; RRID AB_312791)、PE-cyanine(Cy)7 結合の抗 CD90.2 抗体(eBioscience; RRID AB_469642)、PE-Cy7 結合の抗 CD8 抗体(BioLegend; RRID AB_312760)、peridinin chlorophyll protein(PerCP)結合の抗 CD3 抗体(BioLegend; RRID AB_893319)、アロフィコシアニン(allophycocyanin;APC)結合の抗 CD4 抗体(BioLegend; RRID AB_312718)、APC 結合の抗 I-A/I-E 抗体(BioLegend; RRID AB_313329)、ビオチン結合の抗 CD11b 抗体(BioLegend; RRID AB_312787)、ビオチン結合の抗 CD19 抗体(eBioscience; RRID AB_312823)、ビオチン結合の抗 NK1.1 抗体(eBioscience; RRID AB_466804)、ビオチン結合の抗 CD11c 抗体(BioLegend; RRID AB_313772)、ビオチン結合の抗 TCR α 抗体(BioLegend; RRID AB_313426)、Pacific Blue 結合の抗 granulocyte-differentiation antigen-1(Gr-1)抗体(BioLegend; RRID AB_893559)、Pacific Blue 結合の抗 gdTCR 抗体(eBioscience; RRID AB_466669)を使用した。

免疫組織化学で用いた抗体

FITC 結合の抗 I-A/I-E 抗体(BioLegend; RRID AB_313321)、FITC 結合の抗ドパミントランスポーター抗体(Abcam; RRID AB_305226)、FITC 結合の抗ノルアドレナリントランスポーター抗体(Abcam; RRID AB_305477)、FITC 結合の抗 phospho-cAMP response element binding protein(CREB)抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_2561044)、FITC 結合の抗チロシンヒドロキシラーゼ(Abcam; RRID AB_1524535)、FITC 結合の抗リン酸化 c-Fos(Ser32)抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_10557109)、FITC 結合の positive control としてのウサギ免疫グロブリン(immunoglobulin;Ig)G 抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_1550038)、ビオチン結合の抗 CD4 抗体(BioLegend; RRID AB_312710)、ビオチン結合の抗 I-A/I-E 抗体(BioLegend; 商品コード AB_313319)、ビオチン結合の抗 P2X7 受容体抗体(Abcam; RRID AB_881835)、ビオチン結合の抗 nuclear factor of activated T cell c1(NFATc1)抗体(Santa cruz;RRID AB_2152503)、ビオチン結合の抗 Neurofilament L 抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_10828120)、ビオチン結合の抗 Phaseolus vulgaris Agglutinin 抗体(VECTOR Laboratories;RRID 10000080)、Alexa Fluor546 結合の抗ヤギロバ IgG(H+L)抗体(Molecular Probes;RRID AB_142628)、Alexa Fluor488 結合の抗ウサギヤギ IgG(H+L)抗体(ThermoFisher;RRID AB_2576217)、Alexa Fluor546 結合の抗ウサギヤギ IgG(H+L)抗(Molecular Probes;RRID AB_143051)、Alexa Fluor 647 結合の抗

ウサギヤギ IgG(H+L)抗体(Molecular Probes;RRID AB_141775)、Alexa Fluor 647 結合の抗鶏ヤギ IgG 抗体(Invitrogen; RRID:AB_1500594)、Alexa Fluor546 で標識されたストレプトアビジン(Invitrogen; RRID:AB_2532130)を使用した。

ウエスタンブロッティングで用いた抗体

マウス抗チューブリン抗体(Sigma Aldrich;RRID AB_477579)、ウサギ抗 p38 抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_10998134)、ウサギ抗リン酸化 p38 (Thr180/Tyr182)抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_2139682)、ウサギ抗 MAPKAPK-2 抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_2235082)、抗リン酸化 MAPKAPK-2(Thr334)抗体(Cell Signaling Technology; RRID AB_490938)を使用した。

生体内中和で用いた抗体

抗マウス IL-17 抗体(R&D Systems;RRID AB_2125018)、抗 CC Chemokine Ligand(CCL)5 抗体(R&D Systems;RRID AB_355385)、抗 CCL2 抗体(R&D Systems;RRID AB_354500)、抗 Chemokine (C-X3-C motif) ligand(CX3CL)1 抗体(R&D Systems;RRID AB_2276839)、抗 Interferon(INF)- γ 抗体¹²を使用した。6-ヒドロキシドパミン塩酸塩、ランソプラゾール、FITC 結合のコレラ毒素 B サブユニット(Cholera Toxin B subunit(CTB))、タモキシフェン、ムシモール、ATP、ミフェプリストンおよび Guggulsterone は Sigma Aldrich より購入した。Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin(PHA-L)は VECTOR より購入した。A-438079 塩酸塩は TOCRIS Bioscience より購入した。

フローサイトメトリー

単一細胞の懸濁液を作るため、心臓灌流後に脳を採取し、Miltenyi Biotec の神経組織解剖キットか Basel のコラゲナーゼ D を使用して酵素処理を行い、 10^6 個の細胞を細胞表面標識のため蛍光抗体と共に氷上で 30 分間反応させた。この細胞を cyan フローサイトメーター(Beckman Coulter)を用いて測定した。データは Summit software(Beckman Coulter)と Flowjo software(Tree Star)を用いて解析した。

免疫組織化学染色

マウスから脳を摘出し、4 %パラホルムアルデヒド で12時間固定後、10%スクロース溶液で12時間、20%スクロース溶液で12時間、30%スクロース溶液で12時間置換した。その後脊椎はSCEMコンパウンド(SECTION-LAB Co. Ltd., Japan)

で包埋した。切片作製部位に接着フィルム(Cryofilm type IIC9, 1 SECTION-LAB Co. Ltd., Japan)を貼り、凍結切片(10um)はmacrotoome(CM3600XP Leica Microsystems, Germany)を用いて作製した。その切片をヘマトキシリン/エオジン染色し、BZ-9000 microscope (KEYENCE)を用いて解析した。また3D画像はニューロルシーダを用いて解析した¹³。

Laser microdissection

約 100 枚の凍結切片を PAXgene(QIAGEN)で 15 分間固定し、その後 100%エタノールで 10 分間固定した。切片中の第三脳室周囲の組織を Laser microdissection 装置である SM6000B(Leica Microsystems)で切り出し、RNeasy マイクロキット(QIAGEN)を用いて全 RNA を抽出した。DNase 処置および逆転写後、cDNA をリアルタイム qPCR で測定した。

リアルタイム PCR

The GeneAmp 5700 sequence detection system(ABI)と KAPA PROBE FAST ABI Prism qPCR Kit(Kapa Biosystems)を用いて hypoxanthine phosphoribosyltransferase(HPRT)と CCR5 の mRNA を定量した。

KAPA PROBE FAST ABI Prism qPCR Kit を用いたリアルタイム PCR で使用した PCR プライマーの対は以下のとおりである。

マウス Hprt プライマー、5' -AGCCCCAAAATGGTTAAGGTTG -3' and 5' -CAAGGGCATATCCAACAACAAAC-3'、

プローベ、5' -ATCCAACAAAGTCTGGCCTGTATCCAACAC-3' ;

マウス Ccl5 プライマー、5' -CTCCCTGCTGCTTTGCCTAC-3' and 5' -CGGTTTCCTTCGAGTGACAAACA-3'、

プローベ、5' -TGCCTCGTGCCACGTCAAGGAGTATT-3' ;

マウス Ccl20 プライマー、5' -ACGAAGAAAA-GAAAATCTGTGTGC-3' and 5' -TCTTCTTGACTCTTAGGCTGAGG-3'、

プローベ、5' -AGCCCTTTTCACC-CAGTTCTGCTTTGGA-3' ;

マウス cfos プライマー、5' -CCTTCTCCAGCATGGGCTC-3' and 5' -CGTGGGATAAAGTTGGCACTA-3'、

プローベ、5' -TGTCACACACAGGACTTTTGCGCAGAT-3'

リアルタイム PCR の条件は、95℃で 3 秒間を 40 サイクル、次に 60℃で 30 秒を 40 サイクルとした。

HPRT の mRNA 発現量を基準として mRNA 発現量を相対評価している。

抗体および試薬の取り扱い

実験によっては以下の抗体を病原性 CD4 陽性 T 細胞移入後のマウスへ毎日腹腔内注射した。

抗 INF- γ 抗体(100mg/mouse)、抗 IL-17 抗体(100mg/mouse)、抗 CCL2 抗体(100mg/mouse)、抗 CX3CL1 抗体(100mg/mouse)、抗 CCL5 抗体(100mg/mouse)
ランソプラゾール治療群では病原性 CD4 陽性 T 細胞移入後、毎日ランソプラゾール 30mg/kg 経口投与した。

脳への微量薬剤投与

マウスを麻酔後に定位固定装置を用いて頭部を固定。剃毛後皮膚を 70%エタノールで洗浄した。脳内の座標は第三脳室の血管は(anterior-posterior(AP)1.06mm;medial-lateral (ML)1mm;dorsal-ventral (DV)2.25mm)、PVN は(AP1.06mm;ML0.25mm;DV4.8mm)、DMH は(AP1.46mm;ML0.37mm;DV5mm)であった。脳のそれぞれの部位に 30 ゲージの針を用いて 6-OHDA、FITC-CTB、PHA-L、Mussimol をそれぞれ 2mg/ml、1mg/ml、25mg/ml、0.25mg/ml の濃度で 0.2ml ずつ 90 秒以上かけて投与した¹⁴。病原性 CD4 陽性 T 細胞(10^6 個)と MOG を付加した骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cell (BMDC))(5×10^5 個)を混ぜたものも同様に第三脳室周囲の血管に投与した。第三脳室周囲の血管には他にも IL-6 (50 ng; Toray) と IL-17A (50 ng; R&D Systems)を混ぜたものと IFN- γ (50 ng; PeproTech, Tokyo) と IL-17A (50 ng)を混ぜたもの、 γ ATP (2 mg)、A438079 塩酸塩 (1 mg)を同様に投与している。サイトカインの注射後は毎日 Mifepristone (30 mg/kg; Sigma)か guggulsterone (30 mg/kg; Sigma) を腹腔内投与した。

頭部電極処理

マウスを麻酔後に定位固定装置で頭部を固定し、ドリルを用いて頭蓋骨に孔を開けた。そこから PVN (AP1.06mm;ML0.25mm;DV4.8mm)へ Brain Science Idea の電極を挿入し、400 μ A の直流電流を 5 秒間流した。

横隔膜下での迷走神経切断術

腹部を上部正中切開し胃と下部食道を露出し、胃を足側へ愛護的に牽引し食道下部にある迷走神経幹を同定し、少なくとも 1mm は迷走神経を切除した。さらに全ての迷走神経の分枝を切断するために横隔膜下の食道周囲の神経及び結合組織を取り除いた。

不動化ストレス

EAE の症状が回復したマウスを狭いプラスチック管に一日当たり 30 分間閉じ込めることによりストレスをかけ、これを二日以上施行して評価した¹⁵。

抗原提示の分析

MOG 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスである 2D2 マウスから得たナイーブ CD4 陽性 T 細胞と、睡眠障害モデルマウスから得られた T 細胞の内、CD11b 陽性細胞をそれぞれセルソーターである MoFlo (Beckman) と抗 CD11b マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて分けられた。

得られた CD4 陽性 T 細胞を豊富に含む細胞群 10^5 個を分離した CD11b 陽性細胞 5×10^4 個もしくは 10^5 個と共に MOG を加えず 96well のプレートで 2 日共培養した。細胞培養の上澄みの IL-2 濃度は ELISA キット (eBioscience) を用いて測定した。

統計手法

Student's t-tests (two-tailed) と ANOVA tests を用いて統計学的解析を行った。

P 値が 0.05 未満を統計的に有意差ありとした。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

実験結果

SD モデルでの活動性の変化

SD モデル^{9 10} マウスの活動時間帯、活動時間量を測定した (図 3)。

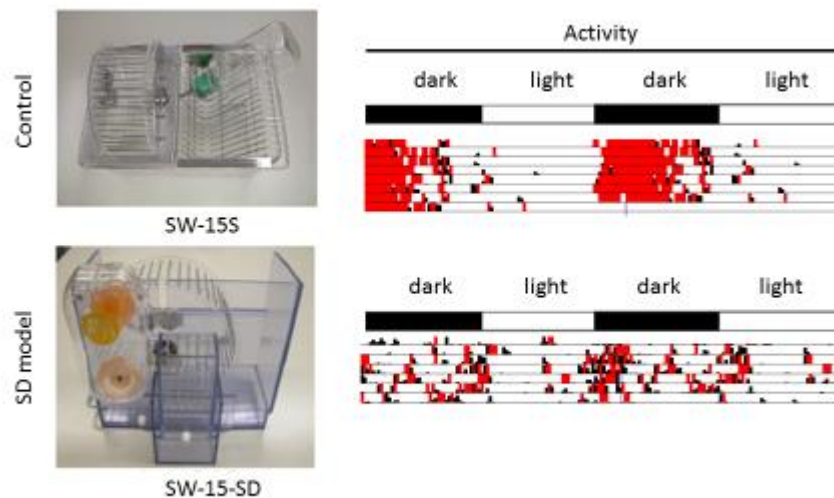


図 3. SD マウスとコントロールマウスでの活動時間帯の変化

C57BL/6 マウスを 10 日間順化ケージで飼育した後に SD 作成ケージに移した。活動計は赤い部分が活動していることを示している。下段の睡眠障害ストレスマウスは日中での活動性が増加し、24 時間を通して活動期が散在的に現れ、睡眠は断片的になっていることが分かる。

通常マウスは夜行性なので夜間の活動性が増加し、日中の活動性は多くない。しかし睡眠障害ストレスマウスは日中での活動性が増加し、24 時間を通して活動期が散在的に現れた。これは睡眠の変化が誘導されていることを示している。

ストレスによる EAE の病勢の変化

次に SD マウスに EAE を誘導した(図 4)。

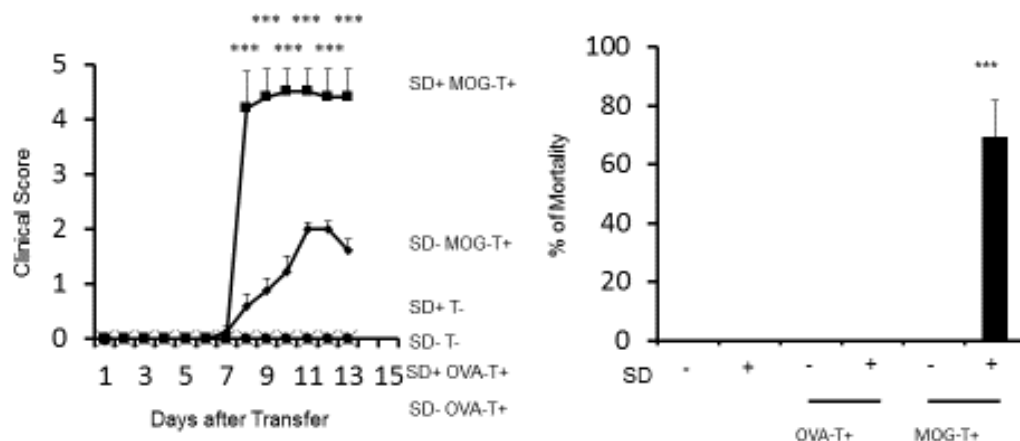


図 4. SD モデルでの EAE clinical score の推移

レシピエントマウスの免疫時に使用するタンパク質 (MOG or OVA or non)、睡眠障害ストレスの有無で EAE clinical score がどのように変化するか調べた (n=3-5)。OVA で免疫を行ったマウスでは EAE は発病せず、睡眠障害ストレスの有無に関わらず、通常のマウスと通常のマウスに睡眠障害ストレスを負荷したマウスと同様に EAE clinical score の上昇は認めなかった。EAE マウス (図 4 の SD-MOG-T+) では病気を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞移入後、約一週間で尾部の脱力が生じ、その後後脚麻痺、前脚麻痺に至る³ケースが多いが、EAE を誘導した SD マウス (図 4 の SD+MOG-T+) では病気を誘導する CD4 陽性 T 細胞移入後、尾部から生じる症状はほとんど生じなかった。しかし当該マウスは EAE 導入後、10 日程度で突然死してしまう個体が顕著に多く認められた。右は病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 10 日目のマウスの死亡率を示しており、EAE を誘導した SD マウス群のみ高い死亡率を示した (n=3-5)。

通常の EAE では病気を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞移入後、約一週間で尾部の脱力が生じ、その後後脚麻痺、前脚麻痺に至る³ケースが多い (図 4 の SD-MOG-T+) が、EAE を誘導した SD マウスでは病気を誘導する CD4 陽性 T 細胞移入後、尾部から生じる症状はほとんど生じなかった。しかし当該マウスは EAE 導入後、10 日程度で突然死してしまう個体が顕著に多く認められた (図 4 の SD+MOG-T+)。通常のマウスに睡眠障害ストレスを加えても死亡することは無く、本症状は病気を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞に依存していると考えられた。また OVA のような中枢神経系と無関係な抗原に特異的な活性化 CD4 陽性 T 細胞の移注を行っても EAE を発症することはない。

次に別の慢性ストレスモデルとして Wet bedding (WB) ストレスモデルを作成

した(図 5)。

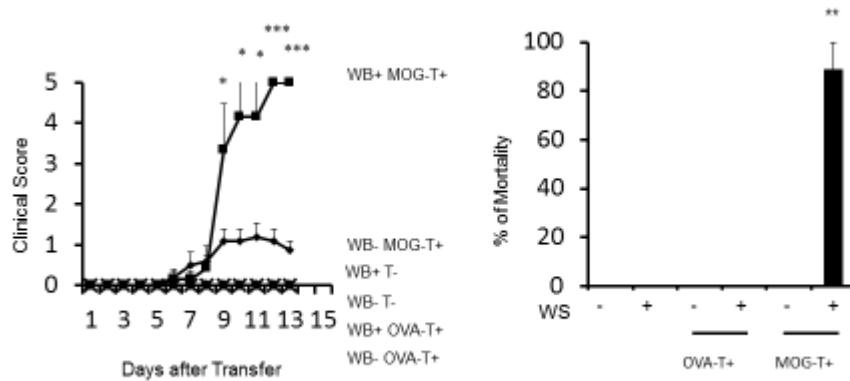


図 5. WB モデルでの EAE clinical score

レシピエントマウスを免疫時に使用するタンパク質(MOG or OVA or non)、wet bedding ストレスの有無で EAE clinical score がどのように変化するか調べた(n=3-5)。図 4 の実験同様、OVA で免疫を行ったマウスでは EAE は発病せず、WB ストレスの有無に関わらず、通常のマウスと通常のマウスに WB ストレスを負荷したマウスと同様に EAE clinical score の上昇は認めなかった。しかし WB ストレス負荷を行ったマウスに EAE を誘導した際は、睡眠障害ストレス負荷を与えたマウスに EAE を誘導した際と同様に、10 日ほどで突然死する個体を顕著に多く認めた。右は病原性 CD4 陽性 T 細胞移注 10 日目のマウスの死亡率を示しており、WB ストレス負荷を行ったマウスに EAE を誘導した群のみ高い死亡率を示した(n=3-5)。

WB ストレスでも SD モデル同様に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注と WB ストレスの両方をかけた群では突然死する個体が有意に多く認められた。

マウスにこれら慢性ストレス負荷を行った際の血液中のストレスホルモンを測定した(図 6)。

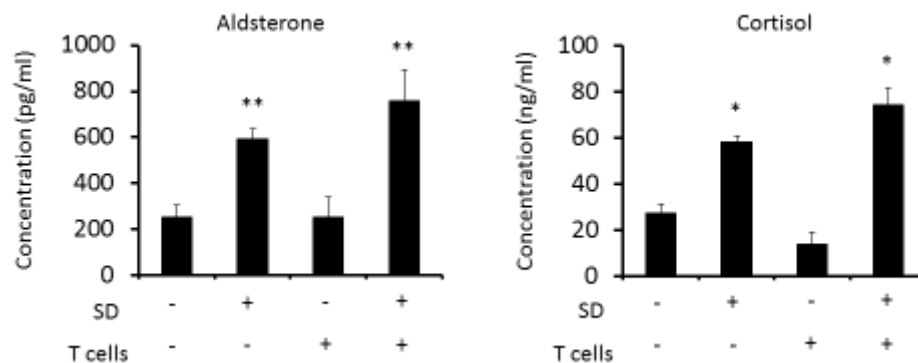


図 6. 睡眠障害ストレスの有無とストレスホルモン値

睡眠障害ストレス下で病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 9 日目に血清のアルドステロン値と血清コルチゾール値を測定した (n=4-5)。血中のアルドステロン値とコルチゾール値は病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の有無に関わらず、睡眠障害ストレスをかけた群で高かった。

血中のアルドステロン値とコルチゾール値は病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の有無に関わらず、睡眠障害ストレスをかけた群で高い結果となった。

一方同じようなストレス負荷でも、以前当研究室から発表した不動化ストレスや強制水泳ストレス (一日 20 分を 10 日間) といった一過性の過度なストレスモデル⁴では SD モデルや WB モデルで認められる突然死する個体は認められなかった。

これら結果から慢性的なストレス状態が進行性の多発性硬化症のモデルになりうる EAE マウスで、死亡という重度の表現型を引き起こすことが明らかになった。

EAE 誘導マウスに慢性ストレスを与えた際の死亡原因

次に慢性ストレス下に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した際の死亡原因を調べた。慢性ストレス下に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合に便の性状に違いがあることを発見した (図 7)。

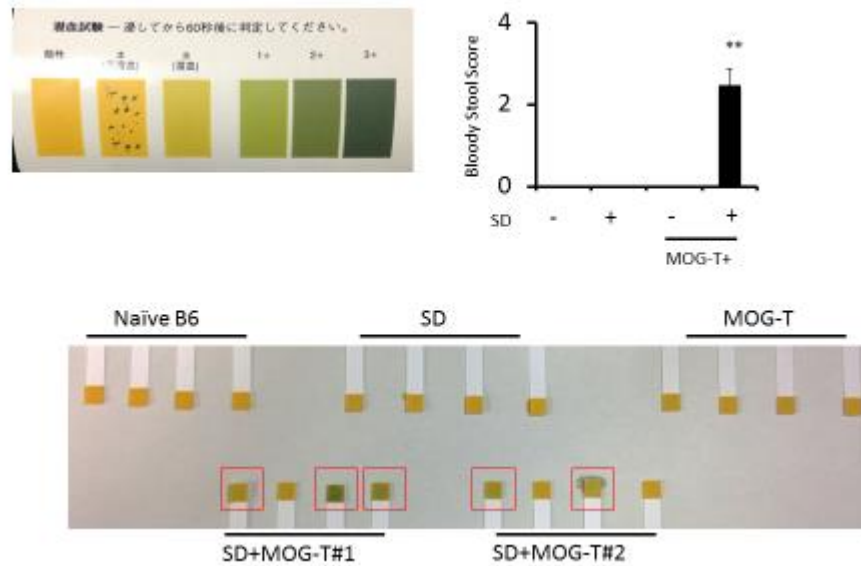


図 7. 便鮮血検査

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみかけたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみのマウス、睡眠障害ストレス下に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスでの便潜血反応を示す。便は病原性 CD4 陽性 T 細胞移注して 10 日後に採取した (n=3-4)。睡眠障害ストレス下に EAE を誘導したマウス群では便潜血陽性だったが、その他の群はいずれも便潜血陰性だった。

野生型のマウス、睡眠障害ストレス負荷のみのマウス、EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞移注のみのマウスでは何れも便潜血検査は陰性であったが、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を両方行ったマウスでは半数以上で便潜血テスト陽性となった。

次に出血の程度を知るために血液のヘマトクリット値を調べた (図 8)。

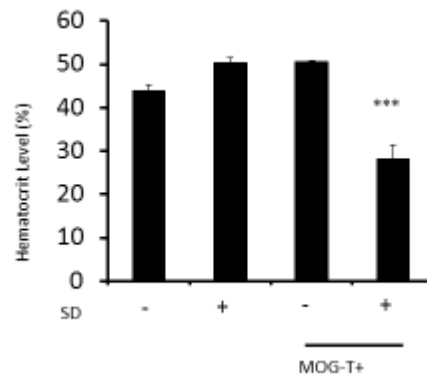


図 8. 血液中のヘマトクリット値

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみかけたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみのマウスと睡眠障害ストレス下に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスでヘマトクリット値を測定した。血液は病原性 CD4 陽性 T 細胞移注して 10 日後に採取した (n=3-4)。便潜血陽性の睡眠障害ストレス下に EAE を誘導した群は他の群と比較して有意にヘマトクリット値が低かった。

睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を両方行ったマウスは他の群より有意にヘマトクリット値が低い結果が得られた。

これら結果から睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を両方行ったマウスではヘマトクリット値が有意に低下するほどの消化管出血していることが判明した。

次に出血部位の同定のため、それぞれ群のマウスを灌流後に消化管を採取した。胃、十二指腸、回腸、空腸、結腸、直腸に関して便潜血反応で用いた Hemastix (SIEMENS) を用いて Bloody content Score を評価した (図 9)。

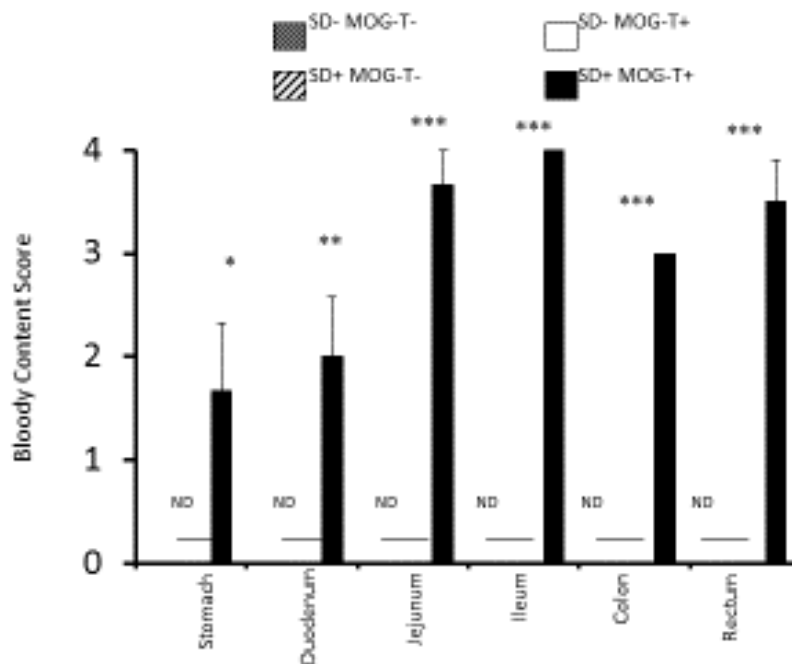


図 9. 各消化管での潜血反応の比較

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみかけたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみのマウスと睡眠障害ストレス下に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスの各種腸管を病原性 CD4 陽性 T 細胞移注して 10 日後に灌流してから採取した (n=3-4)。便潜血反応の実験結果と同様に、睡眠障害ストレス下に EAE を誘導したマウスのみ各種臓器で便潜血反応陽性となった。

睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行った群は各消化管で潜血反応を認めたが、野生群、睡眠障害ストレス単独群、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみの群はいずれも全ての消化管で潜血反応は認めなかった。

次に胃と十二指腸の肉眼所見を示す(図 10)。

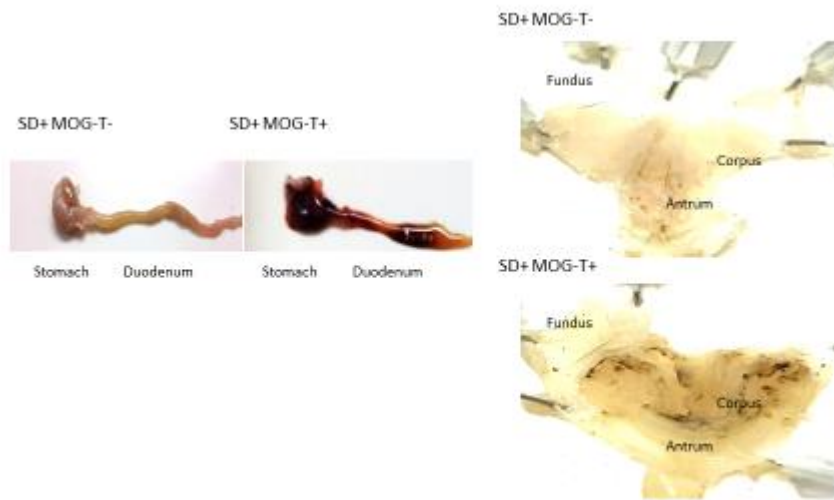


図 10. 臓器の肉眼所見

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみかけたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみのマウスと睡眠障害ストレス下に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスの胃と十二指腸を、病原性 CD4 陽性 T 細胞移注して 10 日後に灌流してから採取した。左は採取した胃と十二指腸の肉眼的所見、右は採取した胃を開いた図である (n=3)。野生型マウス、睡眠障害ストレスのみかけたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみのマウスは何れも同様の所見であったため、図では睡眠障害ストレスのみかけたマウスの組織を示している。左図の上は睡眠障害ストレス負荷のみマウスの胃で、下は病原性 CD4 陽性 T 細胞移注の両方を行ったマウスの胃である。睡眠障害ストレス負荷単独のマウスより得られた胃・十二指腸は肉眼的に出血を認めなかったが、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスから得られた胃・十二指腸は肉眼的に出血を認めた。更に胃内部を観察したところ、睡眠障害ストレス負荷単独のマウスの胃では内部に出血を認めなかったが、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスの胃では内部に黒色に変色した出血を認めた。

睡眠障害ストレス負荷のみのマウスより得られた胃・十二指腸は肉眼的に出血を認めなかったが、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスから得られた胃・十二指腸は肉眼的に出血を認めた。更に胃内部を観察したところ、睡眠障害ストレス負荷単独のマウスの胃では内部に出血を認めなかったが、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスの胃では内部に出血を認めた。

次にそれぞれのマウスの胃・十二指腸・回腸・空腸にヘマトキシリン・エオ

ジン染色を行った(図 11)。

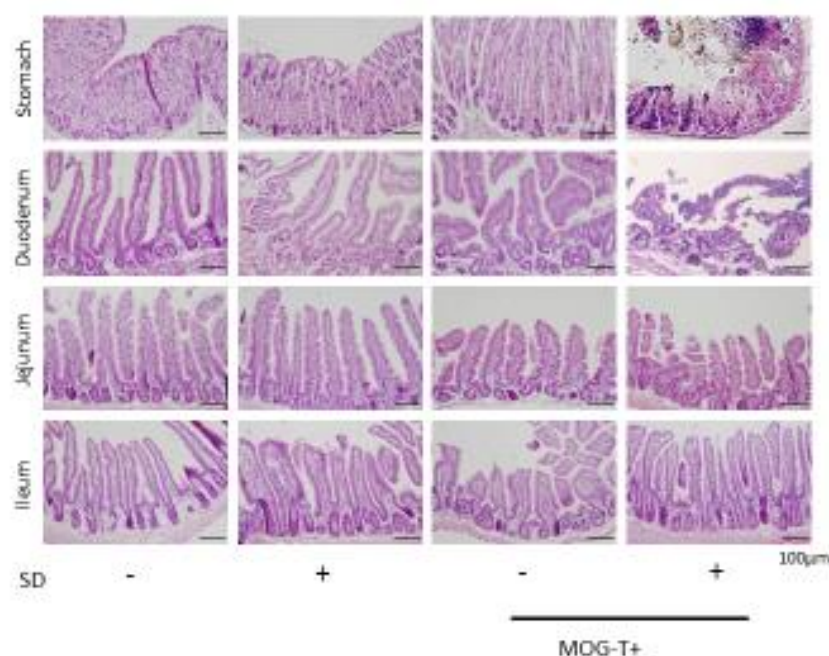


図 11. 胃・十二指腸・回腸・空腸のそれぞれのマウスの病理切片

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみかけたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみのマウスと睡眠障害ストレス下に EAE を誘導する病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスの胃・十二指腸・回腸・空腸を病原性 CD4 陽性 T 細胞移注して 10 日後に灌流してから採取しヘマトキシ・エオジン染色を行った。便潜血反応陰性であった 3 つの群のマウスではいずれの消化管も管腔構造に以上を認めなかったが、睡眠障害ストレス負荷と EAE 誘導を行った群では胃と十二指腸において管腔構造の崩壊と壊死所見を認めた。一方回腸・空腸の管腔構造は正常であった。この結果から消化管出血部位は胃と十二指腸ということも分かった。

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスでは何れの腸管においても正常な管腔構造を認めたが、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスでは胃と十二指腸において管腔構造の崩壊と壊死所見を認めた。

いくつかの研究^{16 17 18}で、非常に強いストレス存在下では迷走神経経由でアセチルコリンを介したムスカリン性 M3 受容体シグナル伝達で p38 および MAPKAPK2 のリン酸化を介して胃上皮を破壊することが報告されている。これら

報告ではさらに、p38 阻害剤が非常に強いストレス下での胃上皮の破壊を抑制できることを報告している。

我々は実験で使用した野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウス、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスそれぞれから単離した胃の p38 および MAPKAPK2 のリン酸化を調べた(図 12)。

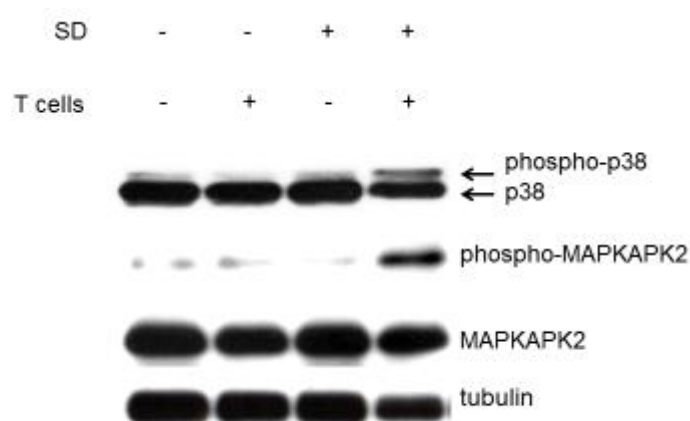


図 12. 胃の p38 と MAPKAPK2 のリン酸化に関して

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウス、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスそれぞれから単離した胃の p38 および MAPKAPK2 のリン酸化を調べた。野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスでは p38 と MAPKAPK2 両方のリン酸化は認められなかったが、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスでは p38 と MAPKAPK2 両方のリン酸化が認められた。

これら結果より睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスでは胃・十二指腸粘膜の障害が p38 と MAPKAPK2 のリン酸化によることを示している。

次に胃潰瘍といった上部消化管出血に対して一般的に用いられる、proton pump inhibitor であるランソプラゾールの投与で表現型の変化が認められるか調べた。

まず病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスにランソプラゾール、もしくは対照群としてカルボキシセルロース(carboxymethyl cellulose:CMC)を移注後 4 日目に経口投与して EAE clinical score がどのように変化するか調べた(図 13)。

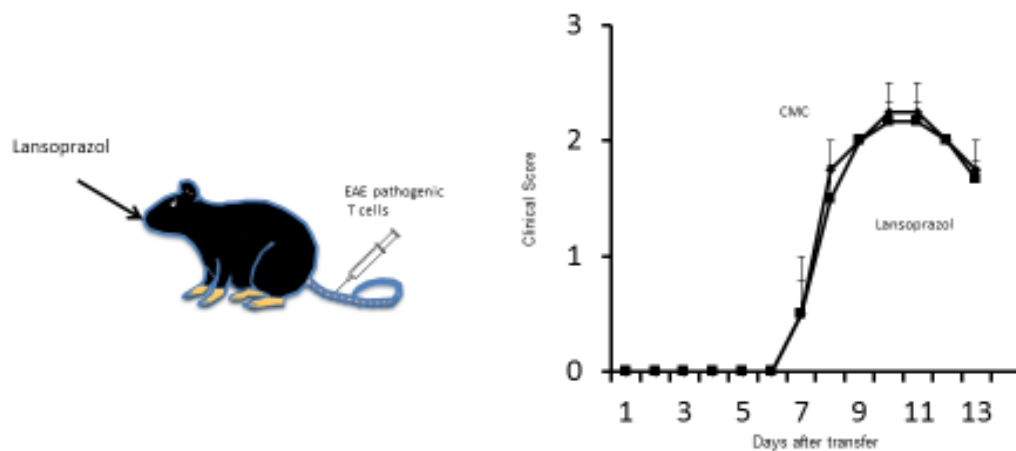


図 13. 病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスへのランソプラゾール経口投与が与える影響

ランソプラゾールもしくは CMC を病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 4 日目に 30mg/kg 経口投与して EAE clinical score を評価した (各グループ n=4-5)。両群とも EAE の病勢には影響を与えない結果であった。

ランソプラゾールと CMC で EAE clinical score に変化は認められず、尾や前後脚の麻痺に対してランソプラゾールは影響を示さないことが示された。

次に睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスに対してランソプラゾールもしくは CMC の経口投与を行った (図 14)。

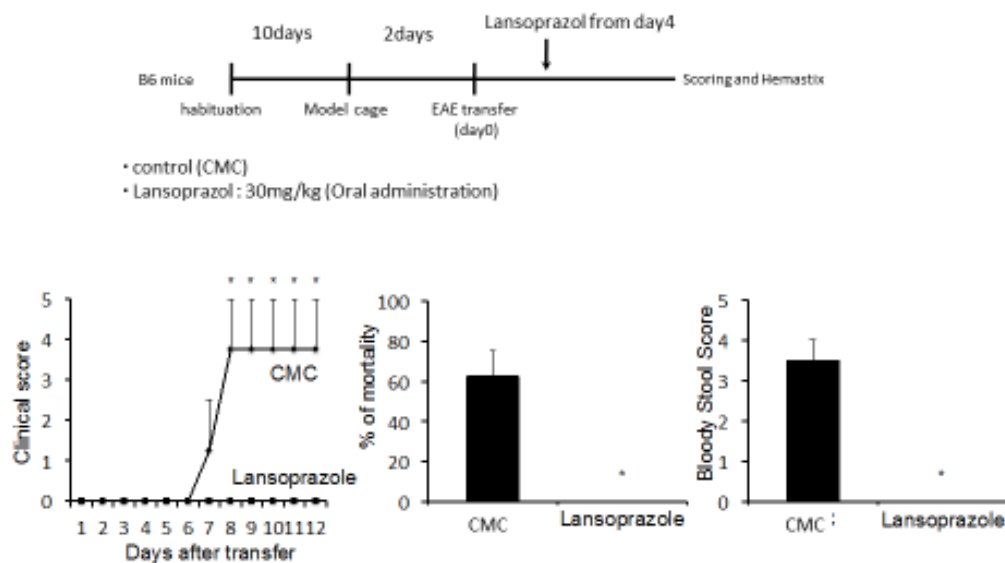


図 14. 睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスに対するランソプラゾール経口投与が与える影響

10 日間順化ケージで慣らした後に SD 作成ケージへ移し、その 2 日後に病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注し、さらにその 4 日後にランソプラゾールもしくは CMC を 30mg/kg 経口投与し EAE clinical score、致死率、Blood Stool Score を評価した (各グループ n=3-5)。CMC 投与群は睡眠障害ストレスマウスに EAE を誘導した場合と同様の臨床経過を辿ったが、ランソプラゾール投与群では消化管出血と死亡を抑制した。またランソプラゾール投与群は尾や脚への症状を認めることも無かった。

病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスへのランソプラゾール経口投与を行った場合と異なり、ランソプラゾール投与群では EAE clinical score の上昇を認めず、一匹の死亡も無く、Bloody Stool Score も 0 点となった。この結果から、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスでは上部消化管出血以外の症状を呈しないことが分かった。

次に睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスが上部消化管出血後にどのように死亡するか検討した。図 8 で示したように睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスではヘマトクリット値の低下が認められるが失血死するほどの低下ではなかった。死亡原因を調べるために野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウス、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスに対して血液検査を行った

(図 15)。

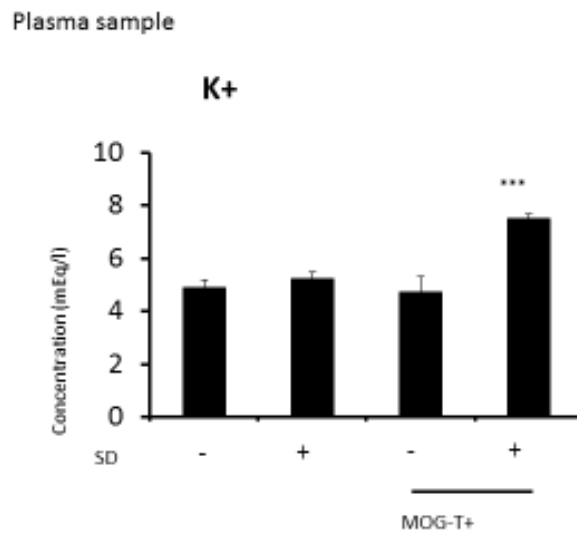


図 15. 各グループでの血清 K⁺値

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウス、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスの 4 グループを対象としている。病原性 CD4 陽性 T 細胞移注から 10 日後に採血を行っている (各グループ n=4-5)。睡眠障害ストレス負荷と EAE の誘導を行ったマウス群では他の 3 つのグループと比較して血清 K⁺ 高値を認めた。他の 3 つのグループは何れも同様の血清 K⁺ 値だった。

睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスのみ血清 K⁺ の上昇が認められた。血清 K⁺ の上昇は上部消化管から出血した血液の再吸収が原因と考えられた。高 K⁺ 血症は心臓の刺激伝導系への影響が知られており、死亡原因として考えられたので心電図を測定した (図 16)。

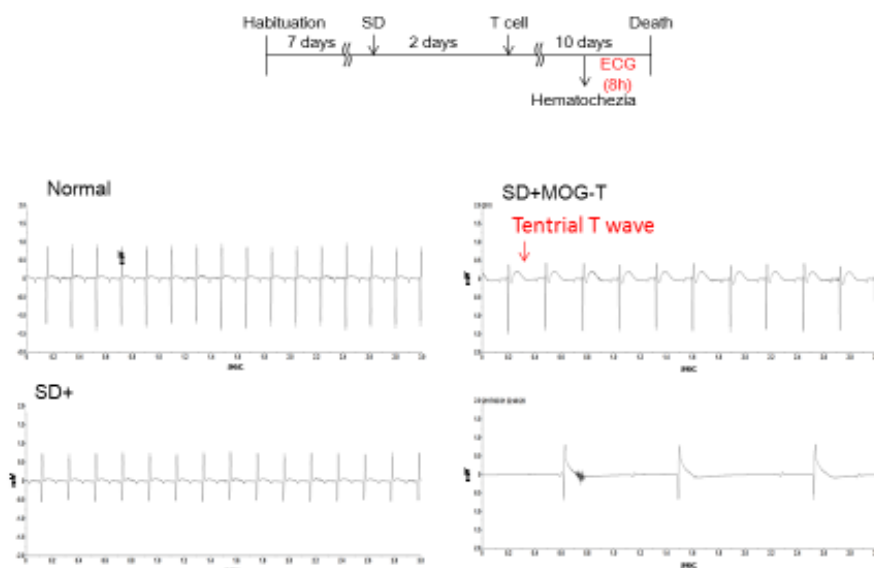


図 16. 各グループでの心電図と睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスでの死亡前の心電図変化

野生型マウスと睡眠障害ストレスのみマウス、睡眠障害ストレスと病原性 CD4 陽性細胞移注の両方を行ったマウスそれぞれの心電図を示す。心電図波形は病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 10 日と 8 時間経過した時点で計測され、右下の心電図は睡眠障害ストレスと病原性 CD4 陽性細胞移注の両方を行ったマウスの、そこから更に 2 時間経過した時点での心電図波形である。野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウスでは洞調律の正常心電図だったが、睡眠障害ストレス負荷と EAE 誘導を行ったマウスではテント状 T 波を認め、2 時間後には徐脈となっている。

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスでは洞調律の正常心電図が得られた(病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスは図中に無いが正常心電図だった)。一方睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスでは死亡する 2 時間ほど前から血清 K^+ が高値の場合に認められるテント状 T 波が観察されるようになり、その 2 時間後には徐脈となり心静止へと至った。

ここまでの結果から慢性ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスでは上部消化管出血が高 K^+ 血症を引き起こし、徐脈から心静止して死亡することが判明した。

ストレス負荷状態で病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注後の脳の特異血管での微小炎症はケモカインと炎症性サイトカインに依存して起こる

病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後の症状が慢性ストレス負荷の有無によって大きく異なるので、我々は中枢神経系での病原性 CD4 陽性 T 細胞が初期に集積する血管が異なるという仮説を立てた。

以前我々が報告したとおり、抗重力筋であるヒラメ筋による gateway reflex では病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 5 日目に第五腰椎(The fifth lumbar:L5)周囲に移注された病原性 CD4 陽性 T 細胞と MHC II 陽性細胞が集積することを報告した^{3 19} (図 17)。

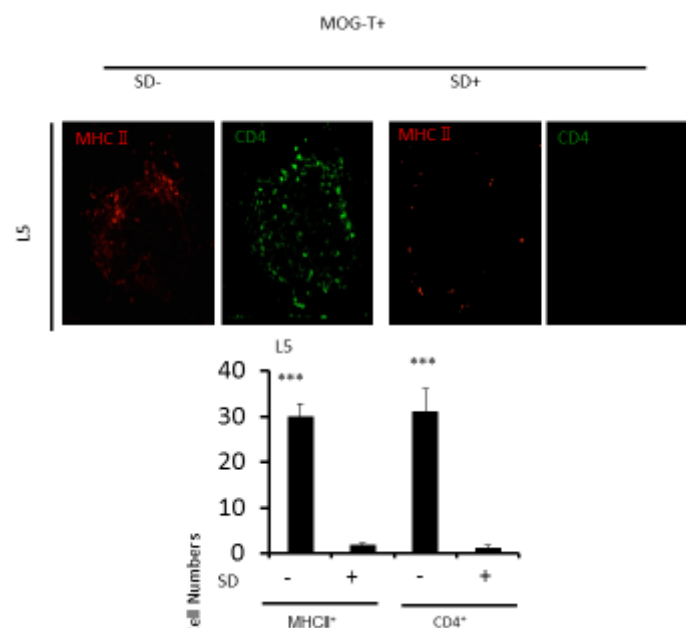


図 17. 第五腰椎の免疫染色像と免疫細胞数

病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注して EAE を誘導したマウスを睡眠障害ストレスの有無で分類した。病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注後 5 日目のマウスを使用した (n=3)。従来どおりの睡眠障害ストレス負荷を行わず EAE を誘導したマウスでは L5 周囲に CD4 陽性 T 細胞と MHC II 陽性細胞の集積を認めたが、睡眠障害ストレス負荷を行うと同部位での集積を認めなくなった。

睡眠障害ストレスなしで EAE を誘導したマウスは以前の報告どおり L5 周囲で CD4 陽性 T 細胞と MHC II 陽性細胞の集積を認めた。一方病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注して EAE を誘導したマウスに睡眠障害ストレスを負荷した場合は L5 周囲での免疫細胞の集積は認められなかった。

ここまでの結果から、睡眠障害ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注を行った場合は表現型がかなり異なり尾や下肢の麻痺の症状が出ないため、L5 から

遠位に免疫細胞の侵入血管が形成されている可能性を考え、中枢神経組織を網羅的に調べた。その結果、慢性ストレスモデルでは病原性 CD4 陽性 T 細胞と MHC II 陽性細胞は第 5 腰椎周囲ではなく第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管で集積することが分かった(図 18)。

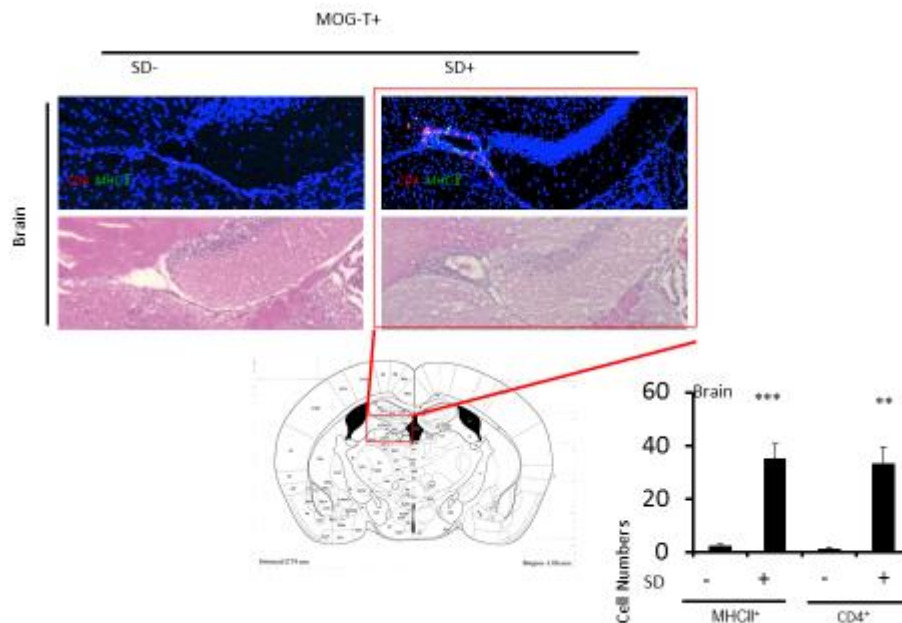


図 18. 脳の免疫組織像と免疫細胞数

病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注して EAE を誘導したマウスを睡眠障害ストレスの有無で分類した。右が睡眠障害ストレスを負荷したマウスで左は睡眠障害ストレスのないマウスの脳切片を示す。病原性 CD4 陽性 T 細胞移注 5 日目に脳を摘出し CD4(赤)と MHC II (緑)に関して組織免疫染色を行った。右下は蛍光している細胞数を示す。病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注して EAE を誘導したマウスに SD ストレスをかけた場合は第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管で CD4 陽性 T 細胞と MHC II 陽性細胞の集積が認められた。病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注して EAE を誘導したが SD ストレスをかけていないマウスでは同部位での免疫細胞の集積は認めなかった。

病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注して EAE を誘導したマウスに SD ストレスをかけた場合は第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管で CD4 陽性 T 細胞と MHC II 陽性細胞の集積が認められた。一方病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注して EAE を誘導したが SD ストレスをかけていないマウスでは同部位での免疫細胞の集積は認めなかった。

この結果より慢性ストレス負荷状態のマウスに病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合は中枢神経系への免疫細胞の侵入口は L5 周囲から第三脳室と視床と歯

状回に囲まれた領域の血管に移動したことがわかった。

次に慢性ストレス負荷状態のマウスに病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスにランソプラゾールを投与した際に EAE の表現型が変化した。ランソプラゾール投与が上部消化管出血を抑制したことによって表現系が変化したのではなく、免疫細胞の集積自体に影響を与えた可能性を考えた(図 19)。

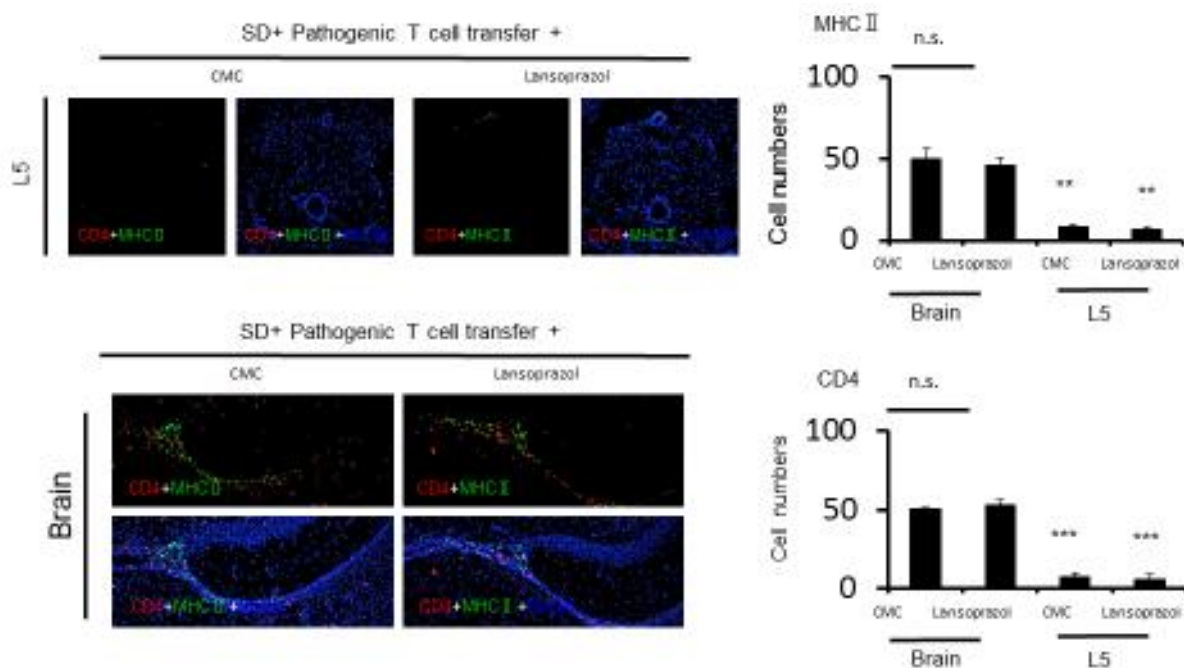


図 19. ランソプラゾールの投与の有無で L5、第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での免疫染色と免疫細胞数の変化

睡眠障害ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注を行ったマウスで CMS もしくはランソプラゾールを投与し L5 と第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管領域での免疫細胞の集積を組織免疫染色を用いて調べた。赤く染まっている細胞が CD4 陽性細胞で緑に染まっている細胞が MHCclass II 陽性細胞である。CMS 投与群とランソプラゾール投与群では表現型に違いが認められたが、L5、L5 と第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管領域での免疫細胞の集積に関しては両群で明らかな差は認めなかった。

睡眠障害ストレス負荷状態のマウスに病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスでは、ランソプラゾール投与の有無は L5 での免疫細胞の集積を惹起することではなく、第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での免疫細胞の集積を抑制することも無かった。

以上の結果から睡眠障害ストレスは免疫細胞の中枢神経系への侵入口を第五

腰椎周囲の血管から第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管に変化させ、ランソプラゾールを投与しても同血管への CD4 陽性 T 細胞と MHC II 陽性細胞の集積には影響を与えないことが判明した。

次に病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスでもランソプラゾールが特定血管での免疫細胞の集積に影響を与えるか検証した(図 20)。

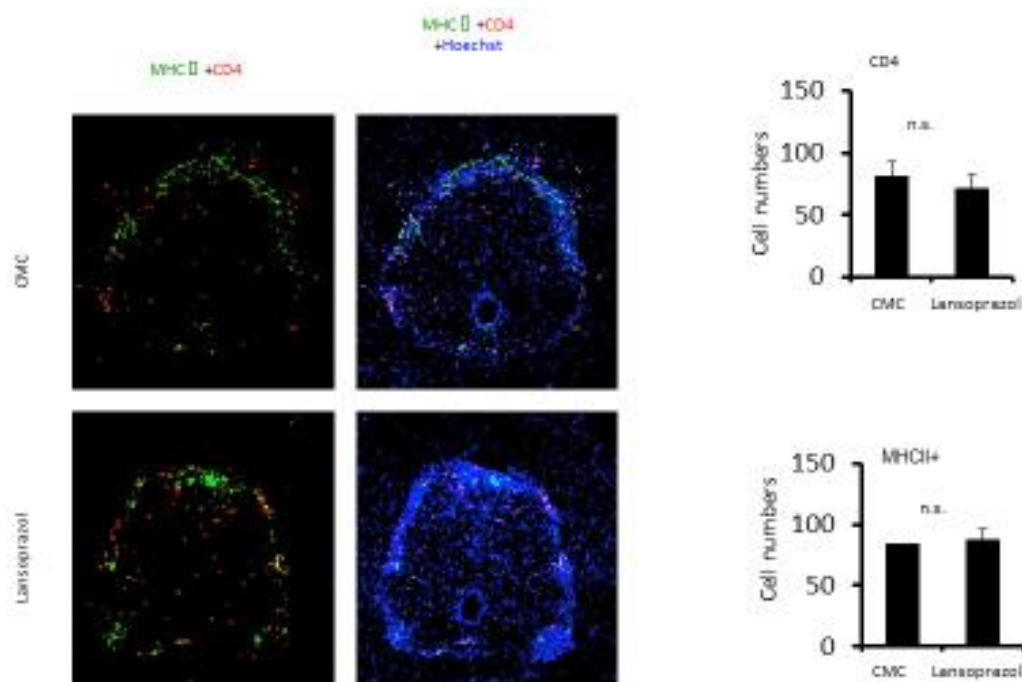


図 20. 病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注のみ行ったマウスでのランソプラゾール投与の有無での L5 の免疫染色と免疫細胞数の変化に関して

図 13 の実験同様にランソプラゾールもしくは CMC を病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 4 日目に 30mg/kg 経口投与して L5 に関して組織免疫染色を行なった。睡眠障害ストレスは負荷していない。赤く染まっている細胞が CD4 陽性細胞で緑に染まっている細胞が MHCclass II 陽性細胞である (n=4-5)。両群とも L5 背側に免疫細胞の集積を認めたが、細胞数に有意な差は認めなかった。

ランソプラゾールの投与に関係なく L5 背側に免疫細胞の集積が認められた。

次に第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での病原性 CD4 陽性 T 細胞と MHC II hiCD11b 陽性細胞(マクロファージ)を含む豊富な免疫細胞に関して、フローサイトメーターを用いて評価を行った(図 21)。

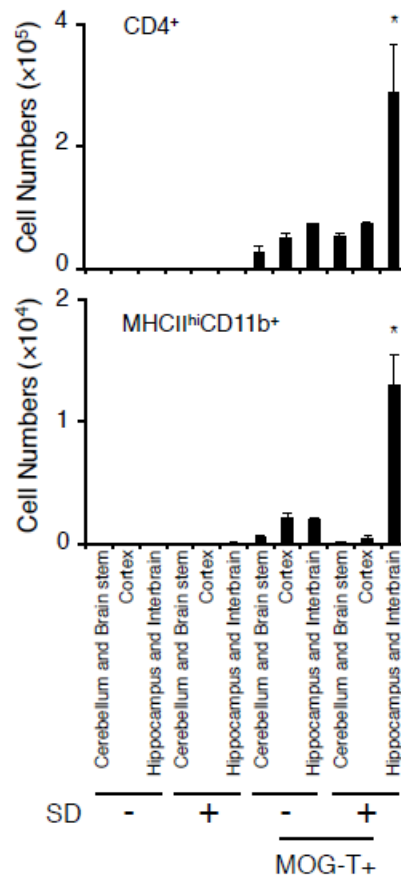


図 21. フローサイトメーターを用いた脳実質の免疫細胞の測定

野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウス、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスの 4 グループを対象として、脳を小脳と脳幹部・大脳皮質・海馬と間脳の 3 つに分けてフローサイトメーターを用いて CD4 陽性細胞と MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞に関して測定した。病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注から 10 日後のマウスを用いた (n=3-4)。病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行っていないマウスでは脳実質での免疫細胞は認めなかった。病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスでは脳実質で免疫細胞を認めたが、睡眠障害ストレス負荷も行ったマウスでは免疫細胞集積血管を含む海馬と間脳領域で CD4 陽性細胞と MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞共に有意に多く認められた。

病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行っていないマウスでは脳実質での免疫細胞は認めなかった。病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスでは脳実質で免疫細胞を認めたが、睡眠障害ストレス負荷も行ったマウスでは免疫細胞集積血管を含む海馬と間脳領域で CD4 陽性細胞と MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞共に有意に多く認められた。

さらに中枢の免疫細胞であるミクログリアを Td-tomato で蛍光標識したマウス⁴を用いることによって MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞が中枢神経系由来か末梢から侵入してきた細胞かを評価した(図 22)。

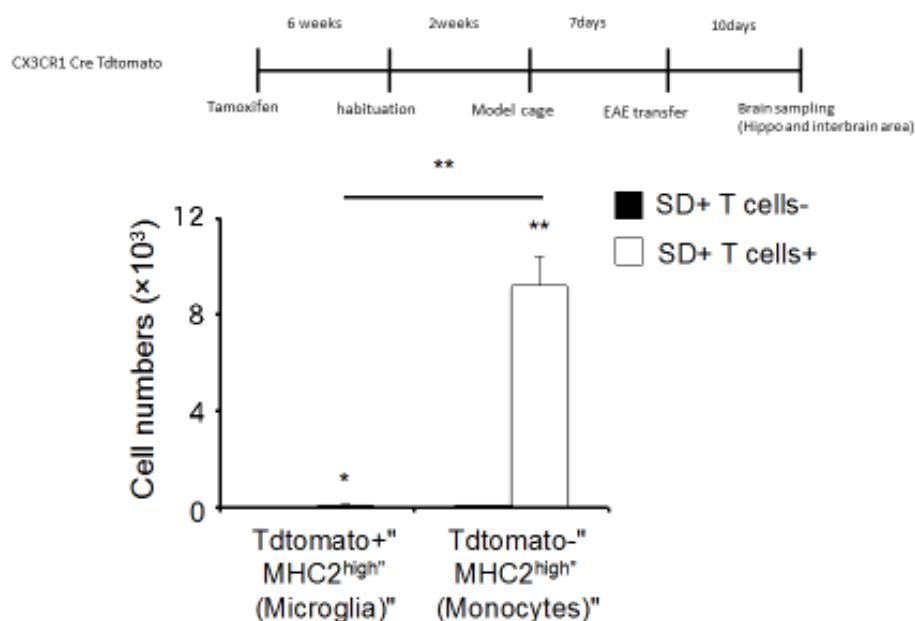


図 22. 海馬と間脳での MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞(ミクログリアか単球)数

CX3CR1 CreERROSA26-TdTomato マウス(タモキシフェン誘導のミクログリアを蛍光標識したマウス)をタモキシフェン投与後 6 週間経過した後に 2 週間の順化を行い、SD モデルケージで 7 日間飼育後に病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注し、10 日後に海馬と間脳を摘出し中枢神経系のミクログリア由来と末梢組織のモノサイト由来の MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞に関して測定した(n=4-5)。EAE の誘導を行わなかったマウスでは海馬と間脳でこれら細胞を認めなかった。睡眠障害ストレスを負荷したマウスでは末梢組織のモノサイト由来の MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞を海馬と間脳で認める結果となった。

このマウスに睡眠障害ストレスのみのかけた場合は海馬と間脳領域での MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞を認めなかった。このマウスに睡眠障害ストレスと病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行った場合は MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞を海馬と間脳領域で多く認めたが、そのほとんどは Tdtomato で蛍光されない末梢由来の単球であることが判明した。

この実験から睡眠障害ストレスと病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管で集積する MHC II^{hi}CD11b 陽性細胞が末梢由来の単球ということが分かった。

このことから睡眠障害ストレスと病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行っ

たマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管は中枢神経系への免疫細胞の侵入口を形成していることがわかる。

以上から病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注により EAE を引き起こした睡眠障害ストレス状態のマウスでは脳の第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管で微小炎症を引き起こし、末梢の免疫細胞の侵入口を形成することがわかった。

次に脳の微小炎症箇所で免疫細胞集積に関与するケモカインの同定を行った。EAE の発症において重要な CD4 陽性 T 細胞および MHCclass II 陽性抗原提示細胞を集積することが知られているケモカイン CCL5 について中和抗体を用いて調べた。

CCL5 は T 細胞などが産生し、T 細胞やマクロファージ、好中球などの免疫細胞を炎症部位へ誘導するケモカインである。この CCL5 の中和抗体を睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスに投与した (図 23)。

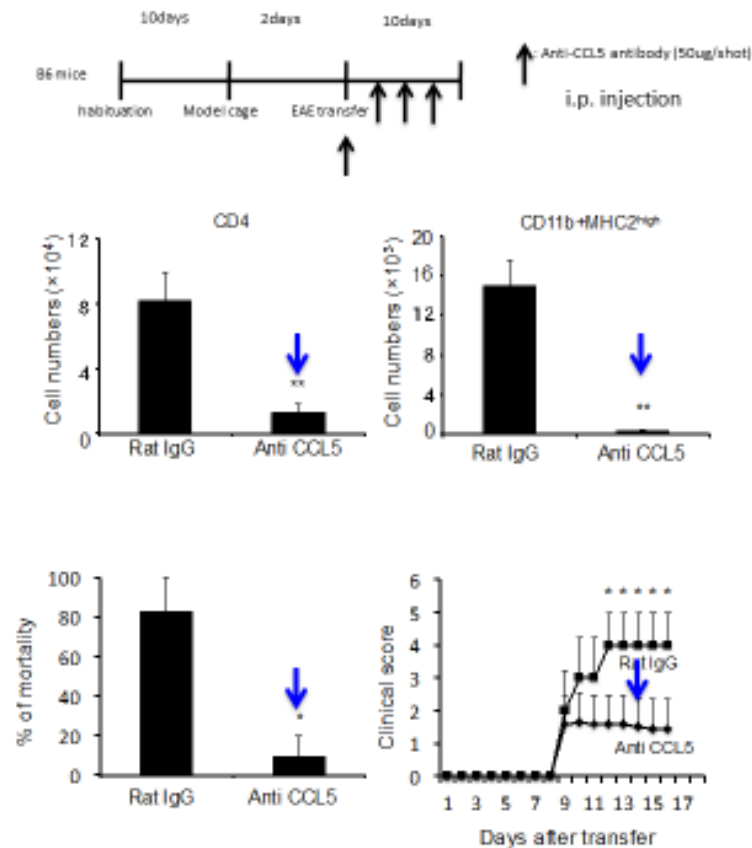


図 23. CCL5 中和抗体の投与は特定血管での免疫細胞の集積と死亡を下げる

10 日間順化ケージで飼育後、SD モデルケージに移行し、その 2 日後に病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行った。病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注日から 2 日毎に合計 4 回 CCL5 中和抗体を腹腔内投与した(一回投与量は $50 \mu\text{g}$)。対照群には RatIgG を同量同スケジュールで投与している。病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注から 10 日後に海馬と間脳での免疫細胞数に関してフローサイトメトリーを用いて評価した。また EAE 臨床スコアと死亡率についても評価した ($n=4-5$)。CCL5 中和抗体を投与した群では海馬と間脳での CD4 陽性細胞数、MHC II hiCD11b 細胞の有意な減少を認め、臨床スコア・死亡率共に低下を認めた。

睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスへの CCL5 の中和抗体投与は第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CD4 陽性細胞と MHC II hiCD11b 陽性細胞の集積を顕著に抑制し、マウスの死亡率を大きく下げた。

次に第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 の発現量に関して調べた(図 24)。

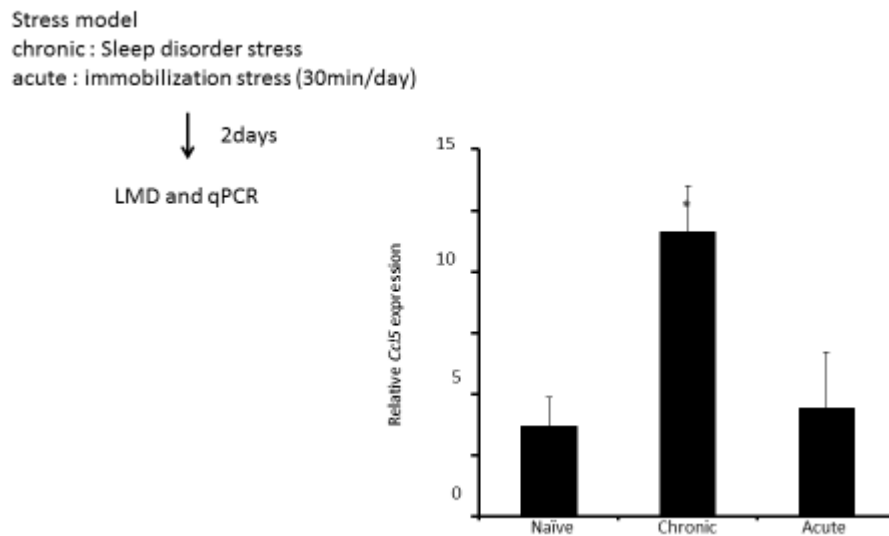


図 24. 慢性ストレス負荷もしくは急性ストレス負荷での第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 の発現量

病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注は行わず、慢性ストレスモデルとしては SD を急性ストレスモデルとしては不動化ストレス負荷(一日 30 分)をそれぞれ 2 日間行い、レーザーマイクロダイゼクション(laser microdissection:LMD)で第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管を回収し、qPCR で CCL5 の発現量を測定した(n=3-5)。EAE の誘導を行わなくても慢性ストレスを与えた群では第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 の発現量の増加を認めた。

興味深いことに病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行っていないマウスでも睡眠障害ストレスなどの慢性ストレスは第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 の発現量を増加させるが、不動化ストレスのような急性ストレスでは CCL5 の発現量の増加は認められなかった。

病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスでも同様に睡眠障害ストレスの有無で第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 の発現量が変化するか調べた(図 25)。

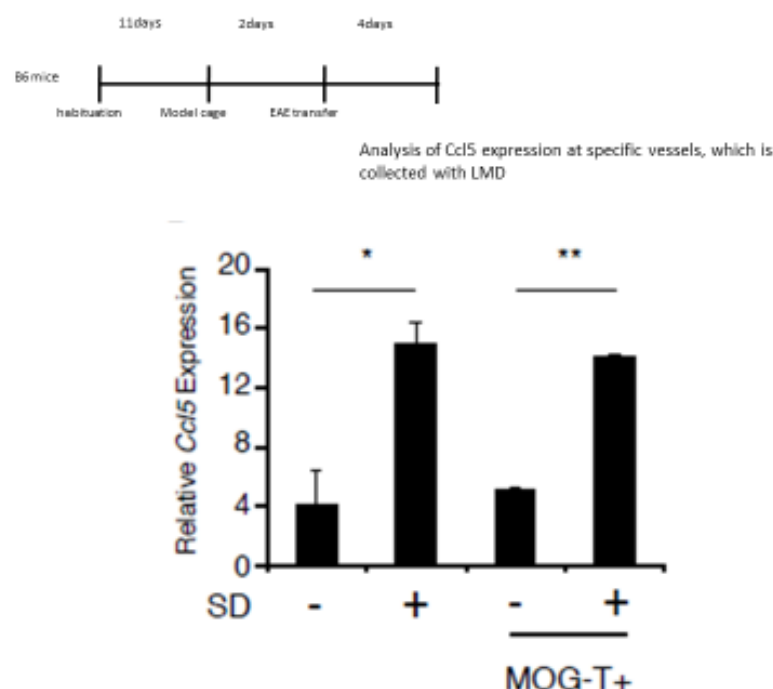


図 25. 病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスでの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 の発現量

11 日間順化し SD モデルケージへ移行し、その二日後に病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行い、更に 4 日経過後に LMD を用いて第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管を回収し qPCR を用いて CCL5 の発現量を測定した (n=3-5)。EAE の発現と関係なく、睡眠障害ストレスの負荷が第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 発現量増加を認めた。

野生型マウスでは CCL5 の発現量の増加は認めなかったが、睡眠障害ストレスのみ与えたマウスでは先ほどの実験結果同様、脳の特定期血管周囲で CCL5 の発現量の増加が認められた。病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウスでは CCL5 の発現量の増加は認められず、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったでは脳の特定期血管での CCL5 の発現量の増加を認めた。

これら結果より、睡眠障害ストレスといった慢性ストレス負荷では PVN の神経活性化が第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での CCL5 の発現量を増加させることがわかった。またこの反応は急性ストレス反応では認められない。図 5 に示したように WB ストレスモデルでも睡眠障害ストレスと同様の表現系を呈するので、睡眠障害ストレスは慢性ストレスの一例と考えられる。

さらに睡眠障害ストレス負荷のマウスに病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスに対する他の中和抗体投与の効果調べたところ(図 26)、Th1 サイトカインである INF- γ 、Th17 サイトカインである IL17-A それぞれの中和抗体投与は海馬と間脳での免疫細胞量を減少させた。

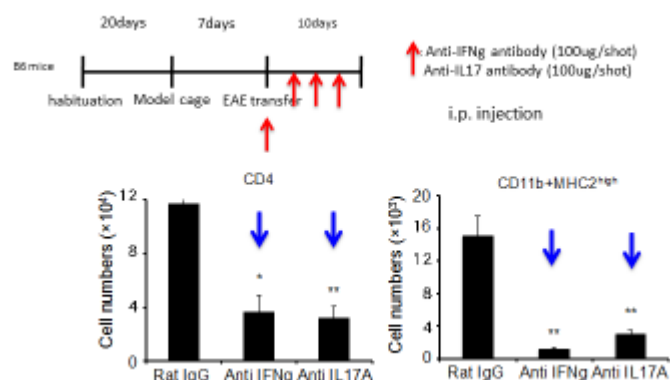


図 26. INF- γ と IL-17A の中和抗体投与時の海馬と間脳での免疫細胞の集積

20 日間順化後に SD モデルケージへと移行し、その 7 日後に病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行った。同日より一日間隔で計 4 日間 INF- γ の中和抗体もしくは IL-17A の中和抗体を 100 μ g/回ずつ腹腔内投与し、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注から 10 日目に海馬と間脳を採取しフローサイトメーターを用いて免疫細胞の測定を行った (n=4-5)。INF- γ の中和抗体もしくは IL-17A の中和抗体の投与は海馬と間脳での免疫細胞の集積を有意に抑制した。

この結果から慢性ストレス負荷かつ病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスでは INF- γ と IL-17A が第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の血管での微小炎症にとって重要と考え、次に INF- γ ノックアウト (Knock Out:KO) マウスと IL-17AKO マウスを用いた実験を行った(図 27)。

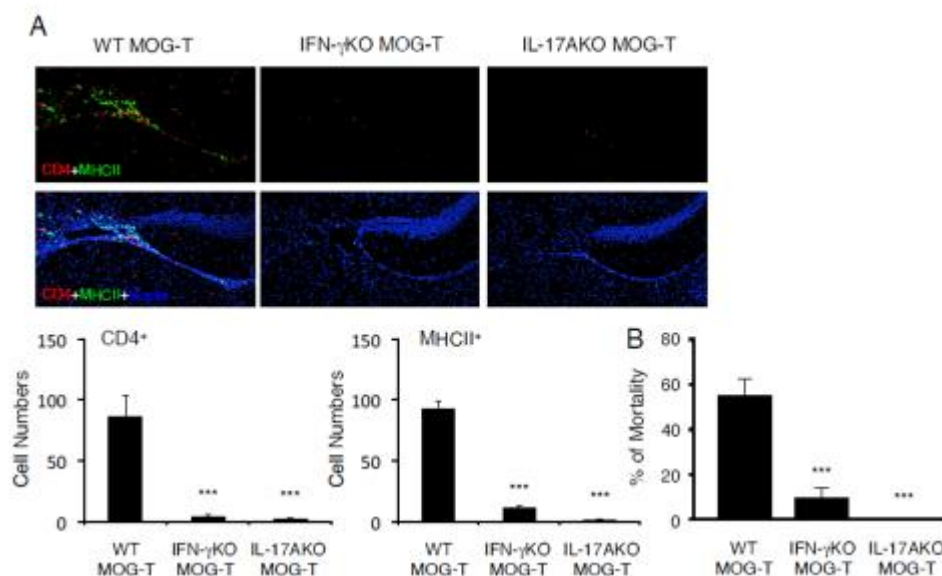


図 27. INF- γ もしくは IL-17A の欠損マウスから採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注は慢性ストレス下でも脳の特長血管での免疫細胞の集積を阻害する

上の図は慢性ストレス負荷を行っているマウスに、それぞれ野生型マウスより採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスと INF- γ KO マウスから採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウス、IL-17A KO マウスから採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスそれぞれの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域を CD4 陽性細胞と MHC II 陽性細胞に関して免疫染色したものである。下はそれぞれのマウスの海馬と間脳に関してフローサイトメーターを用いて CD4 陽性細胞と MHC II 陽性細胞に関して測定した結果である (n=3-5)。右は上記それぞれのマウスの死亡率 (n=3-5)。慢性ストレス下のマウスに野生型マウスより採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合は海馬と間脳で免疫細胞を認めたが、慢性ストレス下のマウスに INF- γ KO マウスから採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合と慢性ストレス下のマウスに IL-17A KO マウスから採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合は海馬と間脳で免疫細胞をほとんど認めず、これらマウスでは EAE 誘導後の死亡率も大きく低下した。

慢性ストレス下のマウスに野生型マウスより採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合は海馬と間脳で免疫細胞を認めたが、慢性ストレス下のマウスに INF- γ KO マウスから採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合と慢性ストレス下のマウスに IL-17A KO マウスから採取した病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注した場合は海馬と間脳で免疫細胞をほとんど認めず、これらマウスでは EAE 誘導後の死亡率も大きく低下した。

この結果から移注する病原性 CD4 陽性 T 細胞から分泌される INF- γ と IL-17A が、慢性ストレス負荷と EAE の誘導を行ったマウスで第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域に免疫細胞の集積を引き起こし、重篤な症状を引き起こす上で重要なことが示唆された。

さらに INF- γ 中和抗体と IL17-A 中和抗体の同時投与はマウスの死亡率と EAE 臨床スコアの改善を認めた(図 28)。

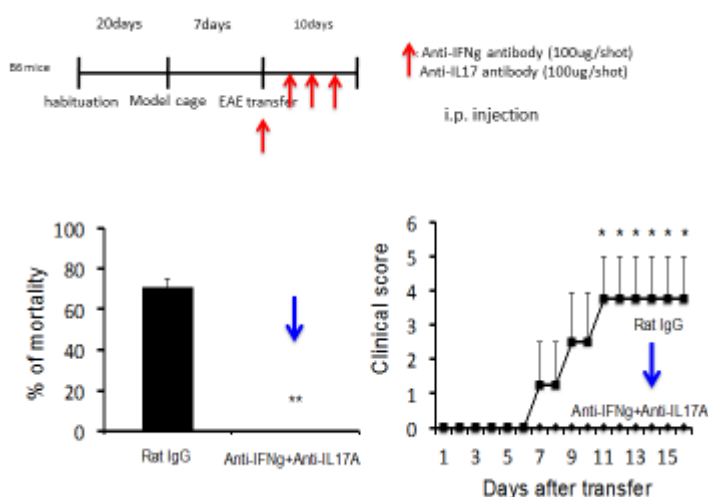


図 28. 慢性ストレスと病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注したマウスへの INF- γ と IL-17A の中和抗体の同時投与と死亡率・EAE 臨床スコア

20 日間順化後に SD モデルケージへと移行し、その 7 日後に病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行った。同日より一日間隔で計 4 日間 INF- γ の中和抗体と IL-17A の中和抗体をそれぞれ 100 μ g/回ずつ腹腔内投与し、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注から 10 日目までの死亡率と EAE 臨床スコアに関して調べた (n=4-5)。死亡率、臨床スコア共に有意な低下を認めた。

ここまでの結果から、慢性ストレスが脳の特設血管で CCL5 の発現を増加させ、それが病原性 CD4 陽性 T 細胞の集積を引き起こし、特に Th1 細胞と Th17 細胞と MHC II hiCD11b 陽性細胞が脳の特設血管で微小炎症を引き起こし、これが重篤な上部消化管出血を引き起こすことが示唆された。

我々はこれを stress-gateway 反射と名づけた。

慢性ストレス下での脳の特設血管の微小炎症が致死的な上部消化管出血を引き起こすために必要である

次に我々は、慢性ストレス下の脳の特設血管での微小炎症が重篤な上部消化管出血を引き起こす上で重要なことを検討した。これを調べるために、慢性ストレ

ス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と樹状細胞(dendritic cell:DC)を混ぜたもの、もしくは以前発表した gateway 反射^{3 19}で特定血管におけるケモカイン発現を増強する作用をもつ、病原性 CD4 陽性 T 細胞が分泌する炎症性サイトカインである INF- γ と IL-17A もしくは IL-6 と IL-17A を直接微量注射する手法をとった(図 29)。

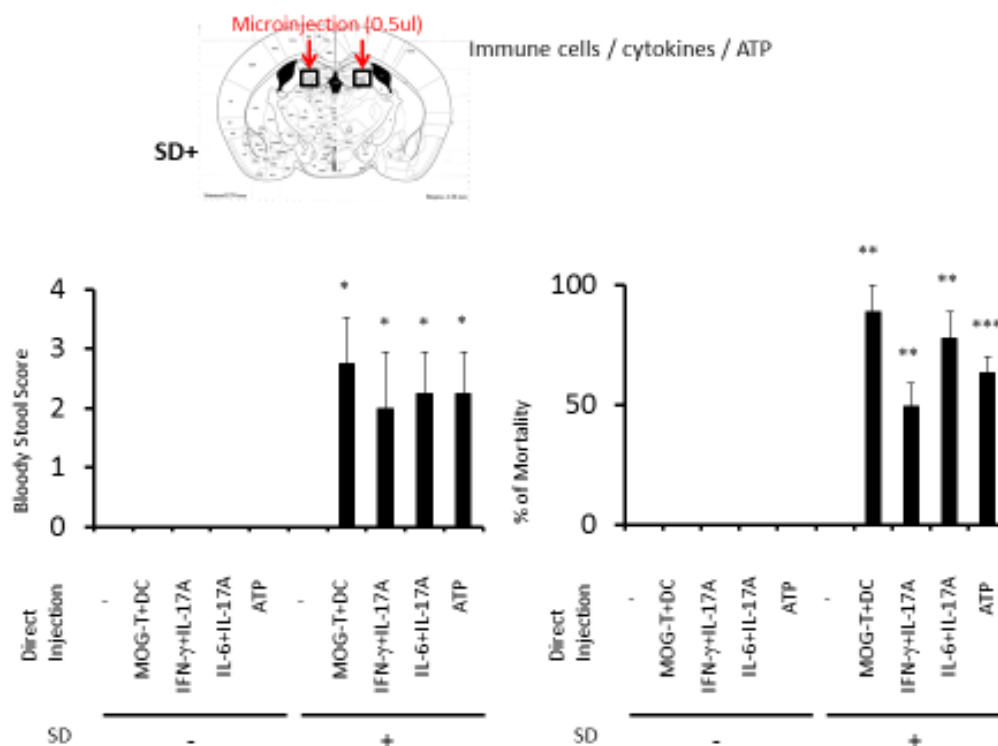


図 29. 慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管への免疫細胞もしくはサイトカインもしくは ATP の直接微量注入

睡眠障害ストレスマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管へ病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC もしくは INF- γ と IL-17A もしくは IL-6 と IL-17A もしくは ATP をそれぞれ微量注入し、その 2 日後に便潜血スコアと死亡率を評価した。EAE の誘導を行っていないマウスにおいて、睡眠障害ストレス負荷を行ったマウスでは、いずれの微量注入でも便潜血スコアの上昇、死亡率の上昇を認めた。

何れの微量注入群においても睡眠障害ストレスがなければ便潜血反応も死亡することもなかったが、睡眠障害ストレスがある場合は背景に病原性 CD4 陽性 T 細胞を移注がなくても、いずれにおいても上部消化管出血と死亡の表現型を

認めた。

さらに慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に IL-6 と IL-17A を直接微量注入する前に CCL5 の中和抗体を投与した場合の表現型の変化を調べた (図 30)。

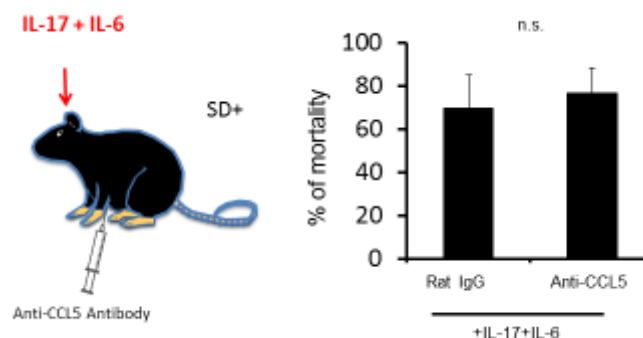


図 30. 睡眠障害ストレス下に脳の特定血管にサイトカインを微量注入する際に CCL5 中和抗体を全身投与した際の致死率

睡眠障害ストレス下のマウスに CCL5 中和抗体もしくは Rat IgG を腹腔内投与後に第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に IL-6 と IL-17A を直接微量注入し、2 日後に死亡率を評価した。CCL5 中和抗体の投与は死亡率に影響を与えなかった。

しかし CCL5 の中和抗体の投与の有無で死亡率は変化しなかった。

この結果から、CCL5 は特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞を含む免疫細胞を集積させる作用を持つが、脳内に注入されたサイトカインへの効果はないことが示唆された。

以上より、慢性ストレス下では CCL5 による病原性 CD4 陽性 T 細胞を含む免疫細胞の集積が脳の微小炎症を引き起こし、局所的なサイトカインの上昇に引き続いて重篤な上部消化管出血が起こることを明らかにした。

慢性ストレス状態での特定血管における脳微小炎症の発症には、PVN を解する交感神経経路が関与している

我々は次に慢性ストレス下で病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注が第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管でどのように免疫細胞の侵入口を形成するかを検討した。我々の以前の研究^{3 4}では gateway 反射が特定血管への交感神経/NA 経路を介して起こることを明らかにしている。また図 6 に示したように、慢性ストレス下だと交感神経の活性化や血清中のアルドステロン・コルチゾール値が上昇している。

このことから、我々は特定血管で薬剤を用いた交感神経切断を行った。

ドーパミン作動性ニューロンおよびノルアドレナリン作動性ニューロンを選択的に変性させる 6-hydroxydopamine (6-OHDA) は交感神経活性化後の NA 受容体によるシグナル伝達によって誘導されたチロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase: TH) 陽性交感神経ニューロンおよびリン酸化 CREB シグナルを枯渇させる。

この 6-OHDA を睡眠障害ストレス下で病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管直接注入し交感神経切除を行った (図 31)。

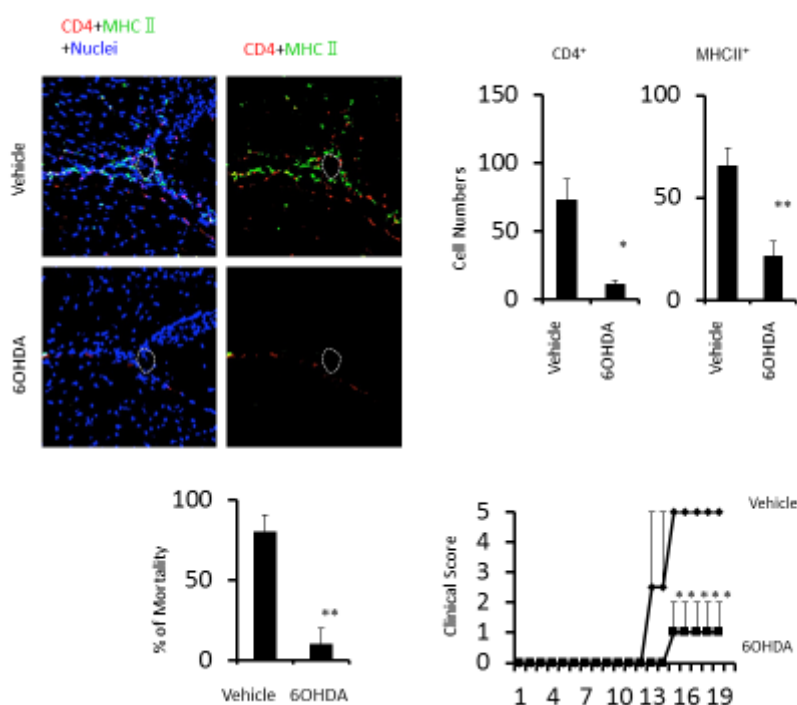


図 31. 睡眠障害ストレス下で病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスの脳の特 定血管での交感神経節断

睡眠障害ストレス下のマウスに病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注後 10 日目に第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に 6-OHDA もしくは溶媒を微量注射し、CD4 と MHC II と細胞核に関して免疫染色を行った。白枠が特定血管である。免疫細胞数に関しては隣に示している。また 6-OHDA もしくは溶媒を微量注射後の死亡率と EAE clinical score の経過を下に示す (n=3-5)。睡眠障害ストレス下で病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に 6-OHDA による交感神経遮断を行うと、その血管での免疫細胞の集積を抑制し、死亡率と EAE clinical score の改善を認めた。

睡眠障害ストレス下で病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注を行ったマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に 6-OHDA による交感神経遮断を行うと、その血管での免疫細胞の集積を抑制し、死亡率と EAE clinical score の改善を認めた。

次に慢性ストレス下での脳の特定血管での交感神経活性化がどのように調節されているかについて調べた。以前から TH 陽性ニューロンを含む PVN ニューロンはいくつかのストレス、特に慢性的なストレスで活性化すると報告されており^{20 21 22 23 20}、関与が考えられた。

次に PVN と DMH での慢性ストレスと病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の有無で交感神経の活性化に違いが出るか調べた (図 32)。

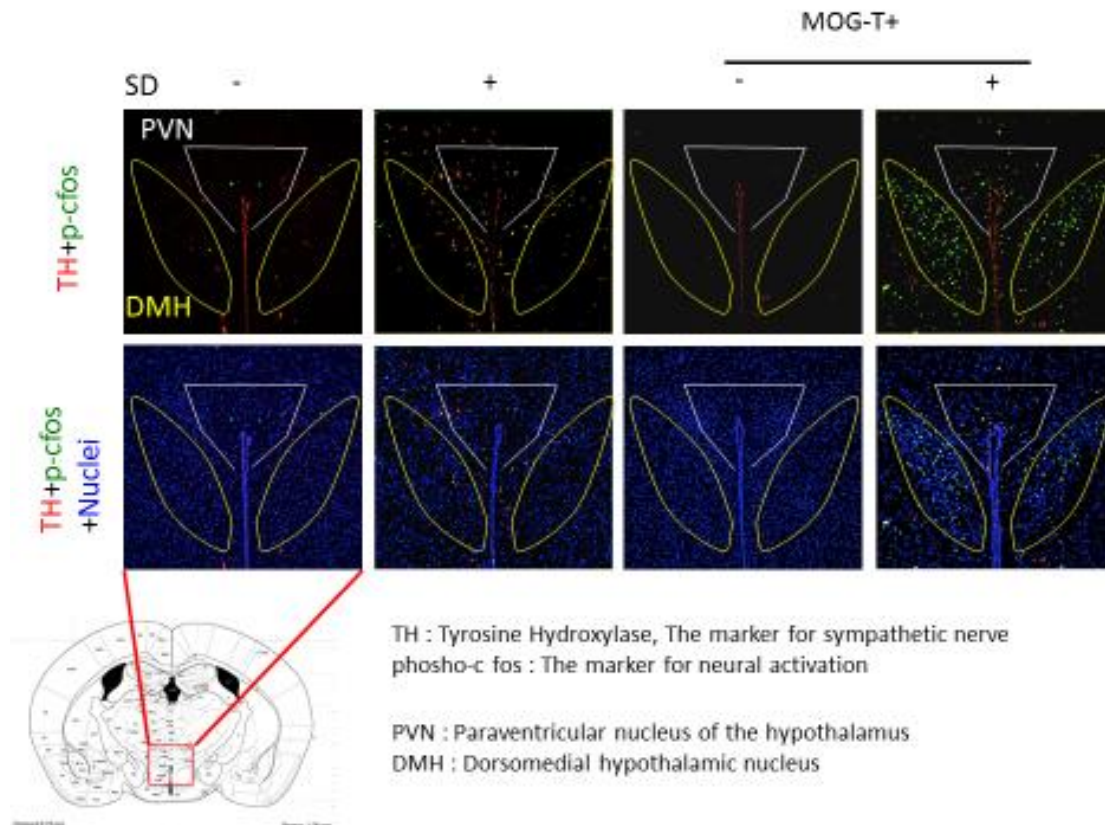


図 32. PVN と DMH を含む切片での免疫組織染色像

病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注後 10 日目で脳を採取し組織免疫染色を行った。交感神経のマーカである TH は赤く蛍光し、活性化している神経のマーカであるリン酸化 c-fos は緑で蛍光し、細胞核は青で蛍光している。赤と緑で蛍光した場合は交感神経が活性化を表す。白枠が PVN 領域で黄色枠が DMH 領域となっている。野生型マウス、睡眠障害ストレスのみ与えたマウス、病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注のみ行ったマウス、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスを使用した (n=3-5)。PVH 領域の交感神経の活性化は病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の有無とは関係なく、睡眠障害ストレスの有無と関連した。PVN 領域で交感神経とは関係なく活性化しているニューロンは睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスで多く認められた。

PVH 領域の交感神経の活性化は病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の有無とは関係なく、慢性ストレスの有無と関連した。更に PVN 領域で活性化しているニューロン、とくに交感神経と関係ないニューロンでは、睡眠障害ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスで多く認められ、これは特定血管の微小炎症と PVN 領域の神経乗り換えを示唆している。

特定血管と PVN 領域の神経の接続に関して更に調べるため、逆行性の神経トレーサーであるコレラトキシン B(cholera toxin B:CTB)を第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に注射した(図 33)

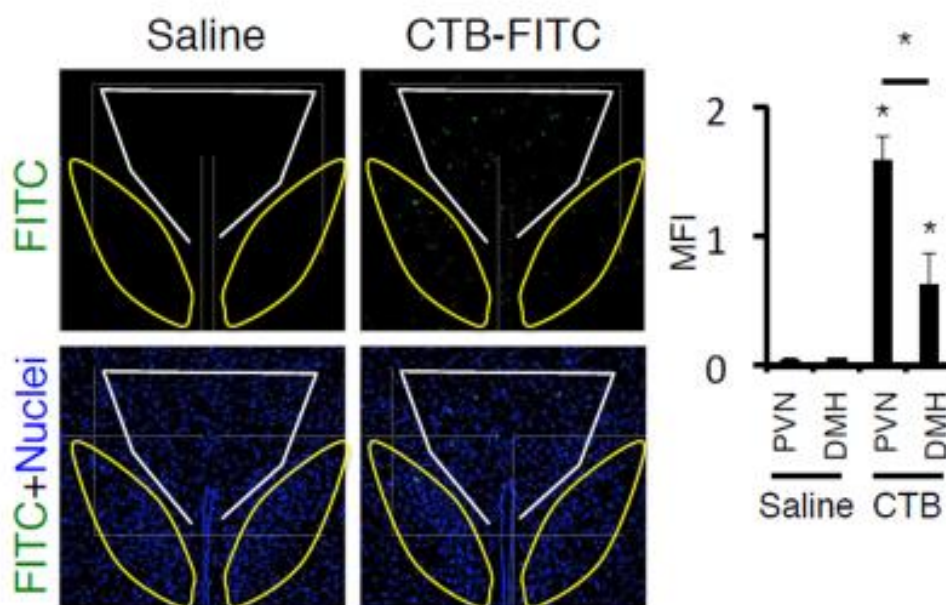


図 33. 第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に注射した FITC で標識した CTB

病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注後 5 日目に FITC で標識した CTB か生理食塩水を第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に微量注射し、PVN と DMH 領域で蛍光するか調べ、PVN で CTB 陽性となった。

PVN 領域で CTB 陽性となっており、第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管と PVN の神経の連絡が認められた。

更に、PVN 領域の TH 陽性ニューロンに関してノルアドレナリントランスポーター(noradrenaline transporter:NAT)とドパミントランスポーター(dopamine transporter:DAT)との関連に関して調べた(図 34)。

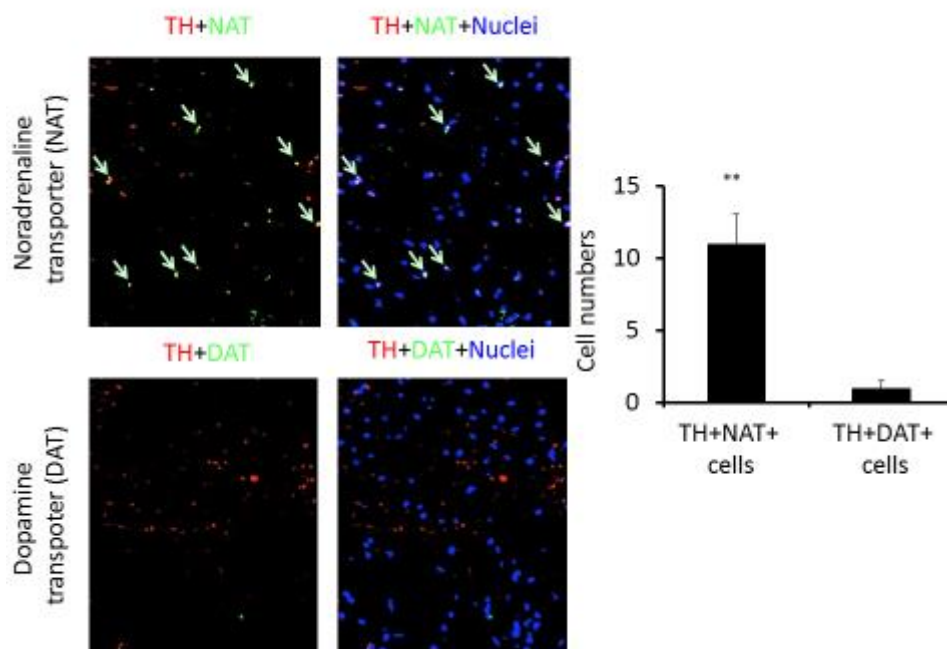


図 34. PVN 領域での TH 陽性細胞と NAT と DAT

慢性ストレス負荷と病原性 CD4 陽性 T 細胞の移注の両方を行ったマウスの PVN 領域に関して TH と NAT と DAT に関して組織免疫染色を行った (n=3)。TH 陽性ニューロンは NAT と共発現しているが、DAT とは共発現していなかった。

TH 陽性ニューロンは NAT と共発現しているが、DAT とは共発現していなかった。このことは第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に NA を分泌することを示唆しており、以前の研究^{3 4 19}で示したとおり、NA の分泌はケモカイン誘導において重要である。

以上の結果から PVN の交感神経経路が局所脳微小炎症および重度の上部消化管障害に関与することを示した。

慢性ストレス下の脳の特定血管での微小炎症は DMH ニューロンを活性化し、重度の上部消化管障害を引き起こす

我々は次に第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管からの神経が何処へつながるかを調べた。第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に順行性の神経トレーサーであるインゲンマメ白血球凝集素 (phaseolus vulgaris Leucoagglutinin:PHA-L) を注入した (図 35)。

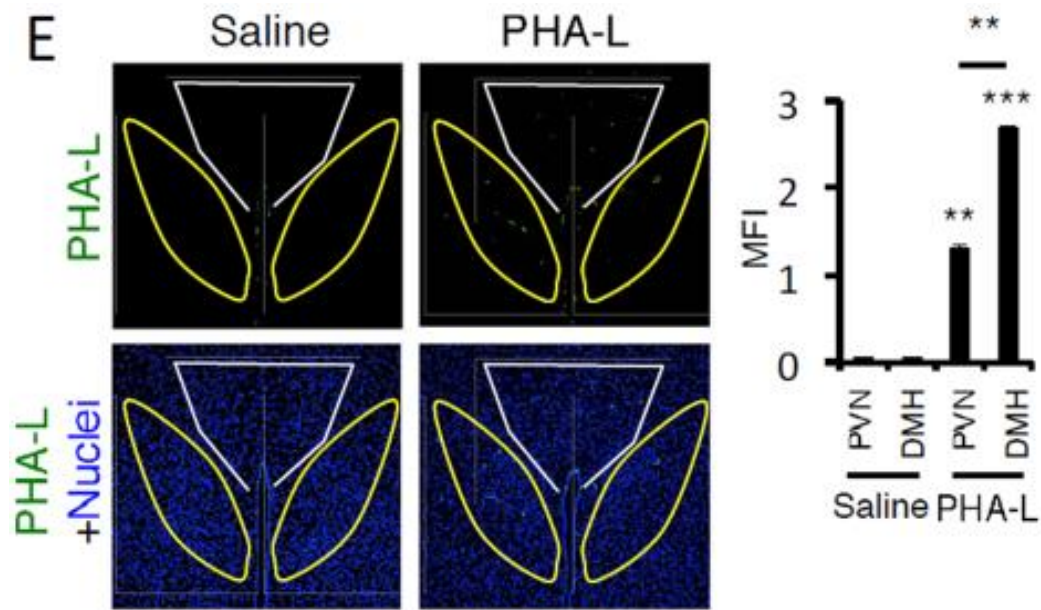


図 35. 第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管からの順行性神経トレーサー投与

慢性ストレス下のマウスに病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 5 日目に第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管からの順行性神経トレーサーである PHA-L を微量注入し、組織免疫染色を行った (n=3-5)。白枠が PNN 領域、黄色枠が DMH 領域である。PHA-L による蛍光反応は主に DMH 領域で認められ、わずかに PVN 領域でも蛍光反応が認められた。

PHA-L による蛍光反応は主に DMH 領域で認められ、わずかに PVN 領域でも蛍光反応が認められた。

次に、先ほどとは逆に DMH 領域に逆行性神経トレーサーの CTB を微量注入した (図 36)。

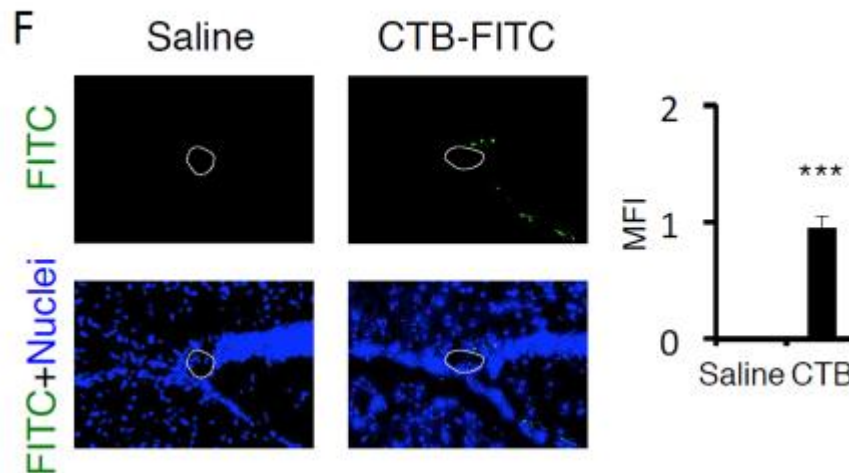


図 36. DMH 領域に CTB を微量注入後の第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管

慢性ストレス下のマウスに病原性 CD4 陽性 T 細胞移注後 5 日目に DMH 領域に逆行性神経トレーサーの CTB を微量注入し組織免疫染色を行い、第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管周囲を観察した (n=3-5)。白枠は特定血管を示す。第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管周囲で蛍光反応が認められた。

予想通り第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管周囲で蛍光反応が認められた。重要なことは図 32 で示したとおり、DMH の TH 陰性のニューロンは慢性ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注した際に高度に活性化する。ここまでの結果は慢性ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注した場合、局所脳微小炎症が主に DMH に分布するニューロンを活性化することを示唆している。以上の結果から我々は、慢性ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注した場合、脳の微小炎症が DMH を介して胃腸の恒常性を調節する新しい神経回路を確立する起点となることを発見した。

これを確認するために慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に生理食塩水もしくは病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC もしくは INF- γ と IL-17A もしくは ATP を微量注入した際の PVN 領域と DMH 領域の神経活性化に関して調べた (図 37)。

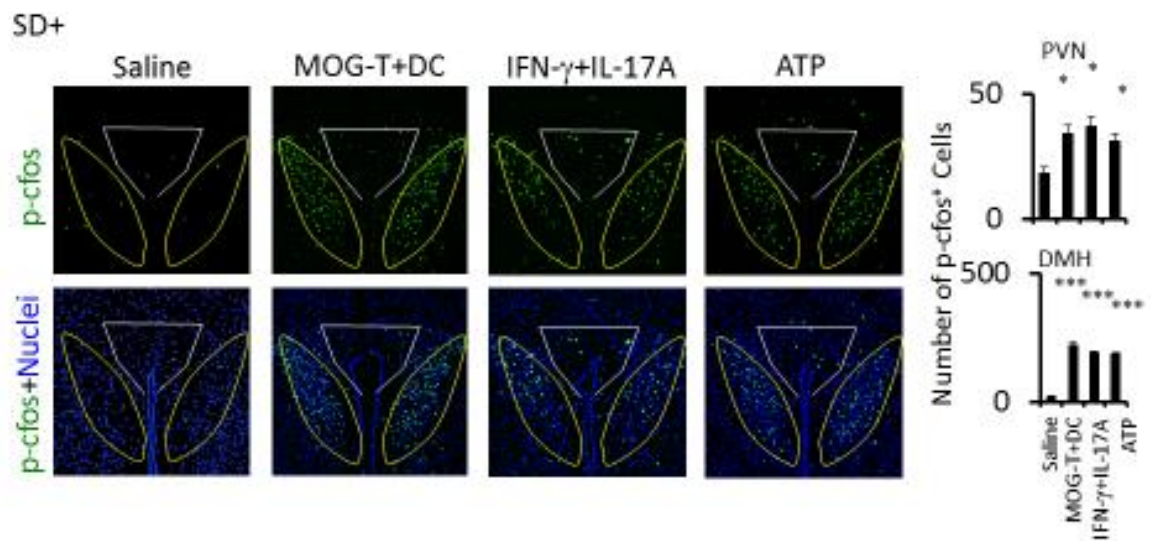


図 37. 慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管への薬剤投与と PVN・DMH 領域での神経活性化

慢性ストレス下のマウスで第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に生理食塩水もしくは病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC もしくは INF- γ と IL-17A もしくは ATP を微量注入した 2 日後に脳を摘出し、PVN と DMH を観察できる切片をリン酸化 c-fos で組織免疫染色した。右は特定血管への微量注入したもの毎のリン酸化 c-fos の発現細胞数を示している (n=3-5)。白枠が PVN 領域、黄色枠が DMH 領域を示している。病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC もしくは INF- γ と IL-17A もしくは ATP を微量注入した場合、特に DMH 領域で細胞細胞活性化マーカーであるリン酸化 c-fos の発現細胞が多く認めた。

病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC もしくは INF- γ と IL-17A もしくは ATP を微量注入した場合、特に DMH 領域で細胞細胞活性化マーカーであるリン酸化 c-fos の発現細胞が多く認めら、第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管から DMH 領域への神経投影が考えられた。

次に慢性ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注したマウスの PVN と DMH 周囲の神経を電氣的に破壊した場合の表現型の変化を調べた (図 38)。

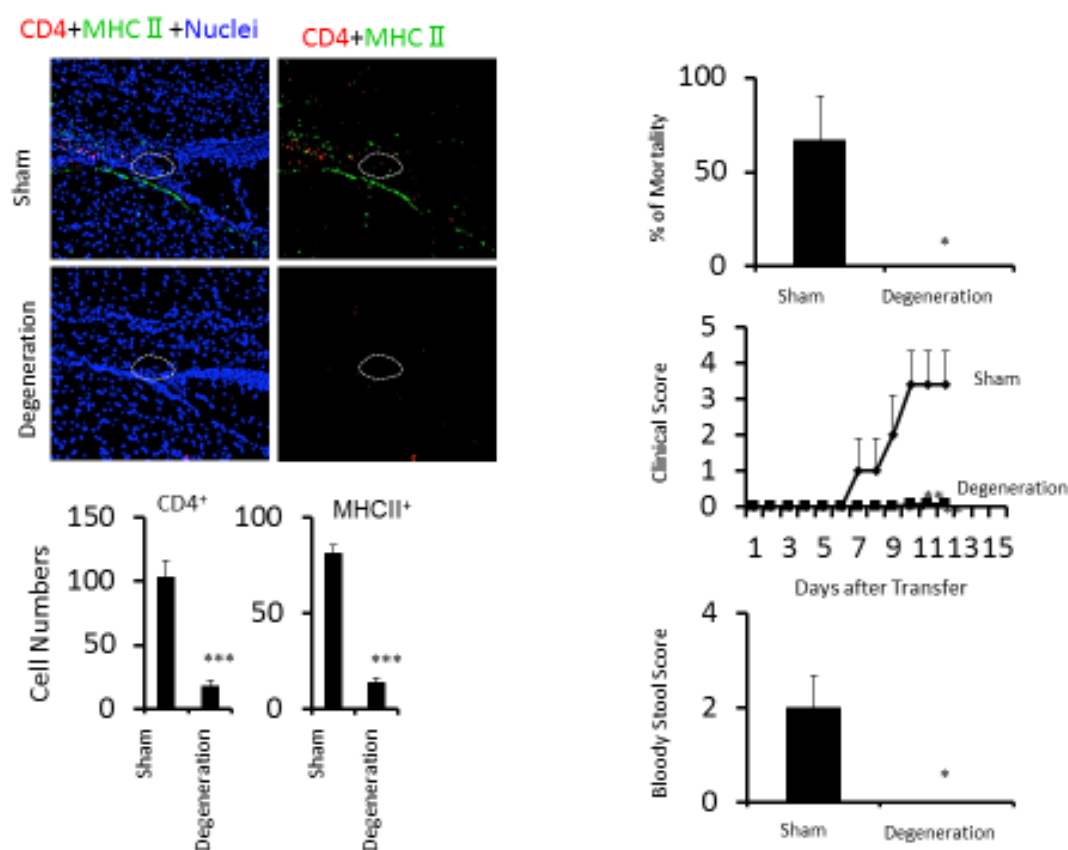


図 38. PVN と DMH 周囲の神経を電氣的に破壊した場合の表現型の変化

睡眠障害ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注したマウスを移注 10 日後に片側の PVN と DMH 周囲の神経を電氣的に破壊する群としない群を比較した。神経破壊後に脳を摘出し第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管近傍の切片を切り出し、CD4 と MHC II と細胞核で組織免疫染色を行った。白枠は特定血管を示す。またこの神経変性の有無での死亡率・EAE clinical score・便潜血スコアについても評価した (n=4-5)。睡眠障害ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注したマウスの PVN と DMH 周囲の神経を変性させると第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管での免疫細胞の集積が消失し、死亡率・EAE clinical score・便潜血スコア全てが改善した。

慢性ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注したマウスの PVN と DMH 周囲の神経を変性させると第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管での免疫細胞の集積が消失し、死亡率・EAE clinical score・便潜血スコア全てが改善した。DMH ニューロンの活性化は gamma aminobutric acid (GABA)-A 受容体の活性化によって抑制されることが以前報告されている²⁴。これを元に、GABA-A 受容体のアゴニストである Muscimol を DMH に局所投与を行った(図 39)。

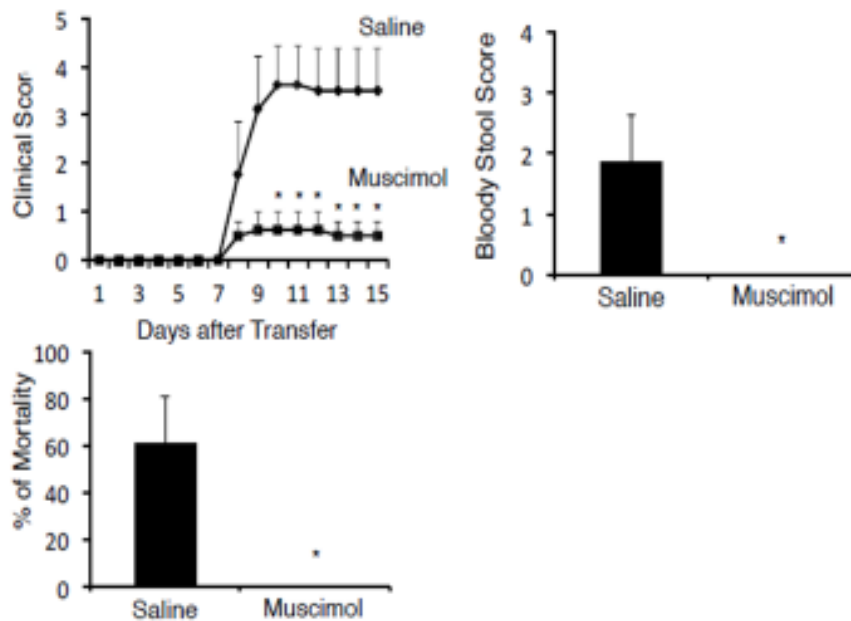


図 39. DMH 領域への muscimol 微量注入が表現型に与える影響

睡眠障害ストレス負荷下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注し、その 5 日後に DMH に生理食塩水か muscimol を微量注入したマウスの EAE clinical score と死亡率、便潜血スコアの変化を測定した (n=3-5)。睡眠障害ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注したマウスの DMH 領域への muscimol の微量注入は EAE clinical score と死亡率、便潜血スコアの何れも改善した。

慢性ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注したマウスの DMH 領域への muscimol の微量注入は EAE clinical score と死亡率、便潜血スコアの何れも改善した。

以上の結果より、慢性ストレス下に病原性 CD4 陽性 T 細胞移注したマウスでは第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管での微小炎症後の DMH の活性化が致命的な胃腸障害を引き起こす上で重要であることを示した。

脳の特定位点での微小炎症で誘導された ATP は DNH を活性化し、十度の胃腸障害を引き起こす

ATP は神経伝達物質であり、いくつかの細胞がサイトカインの刺激を受けた後に発現することが報告されている²⁵。In-vitro の血管内皮細胞を用いた実験 (図 40) を行い、IL-6 と IL-17A で血管内皮細胞を刺激した際に ATP の発現量増加を認めた。

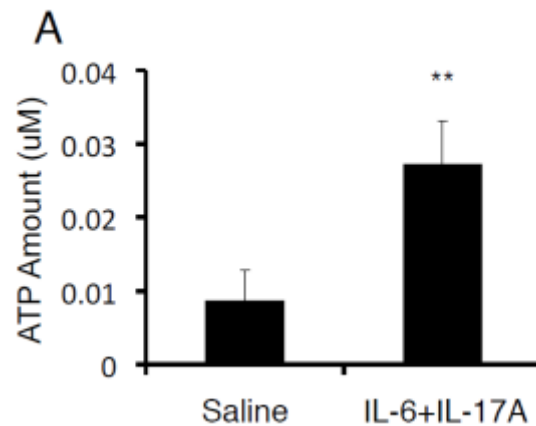


図 40. BC-1 cell を用いた ATP 発現実験

Invitro の実験で、血管内皮細胞に生理食塩水もしくは IL-6 と IL-17A を混ぜたもので刺激し ATP の発現量を調べた。IL-6 と IL-17A で血管内皮細胞を刺激した際に ATP の発現量増加を認めた。

慢性ストレス下のマウスの DMH 領域ニューロンは、図 37 で示したように第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に ATP を直接微量注入すると非常に活性化する。ATP がこの系で果たす役割を調べるため、慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に ATP 受容体の一つである P2X7 受容体の選択的拮抗薬である A438079 を微量注入する実験を行った(図 41)。

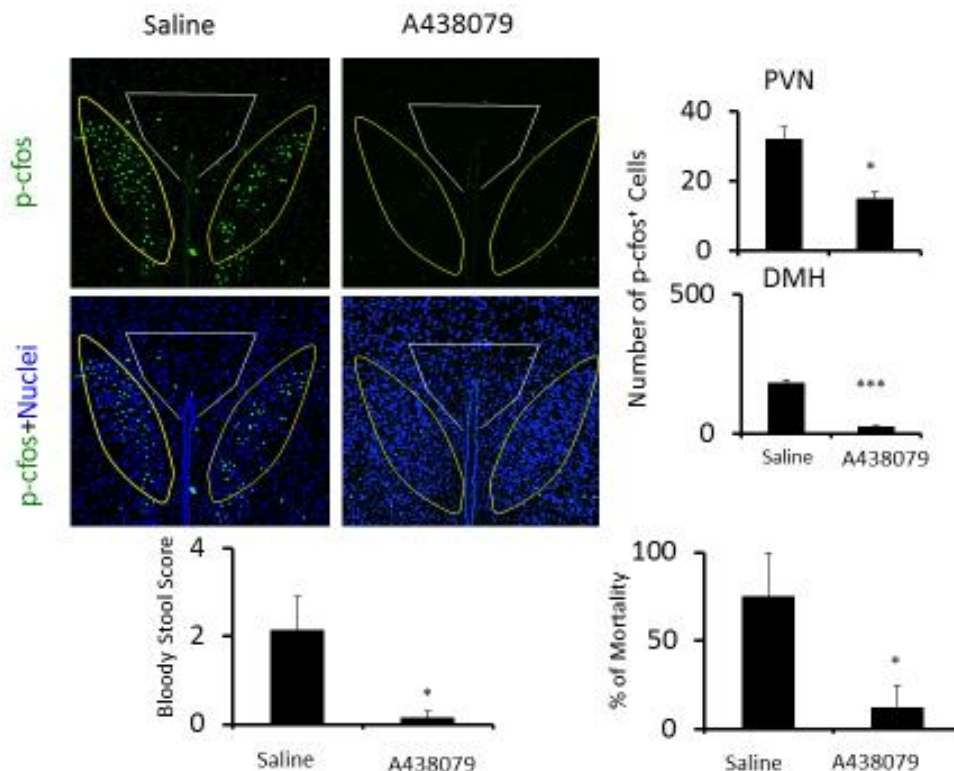


図 41. 睡眠障害ストレス下のマウスの特定血管にサイトカイン投与後、A438079 の投与が与える影響

睡眠障害ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に IL-6 と IL-17A を混ぜたものを微量注射した 2 日後に同じ特定血管へ生理食塩水もしくは A438079 を微量注射し、その後脳を摘出し PVN と DMX 両方の領域を含む切片を切り出し、リン酸化 c-fos と細胞核で組織免疫染色を行った。白枠で囲まれる部分が PVN 領域で、黄色枠で囲まれる部分が DMX 領域である。右は生理食塩水か A438079 の微量注入後の PVN 領域、DMX 領域でのリン酸化 c-fos 細胞数である (n=3)。下は生理食塩水か A438079 の微量注入後の便潜血スコアと死亡率を示している (n=3-5)。睡眠障害ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に IL-6 と IL-17A を混ぜたものを微量注射すると図 37 の INF- γ と IL-17A を微量注射した際と同様に DMX 領域と PVN 領域で神経活性化が起こるが、A438079 を同血管に微量注入した際には DMX 領域と PVN 領域で神経活性化が抑制される。また A438079 を同血管に微量注入は便潜血スコア、死亡率ともに改善した。

慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に IL-6 と IL-17A を混ぜたものを微量注射すると図 37 の INF- γ と IL-17A を微量注射した際と同様に DMX 領域と PVN 領域で神経活性化が起こるが、

A438079 を同血管に微量注入した際には DMX 領域と PVN 領域で神経活性化が抑制される。また A438079 を同血管に微量注入は便潜血スコア、死亡率ともに改善した。

これら結果より ATP はサイトカイン刺激による順行性の神経刺激物質として作用していることが示唆された。

ここまでの結果から我々は、慢性ストレス下のマウスでは特定血管の内細胞由来の CCL5 が病原性 CD4 陽性 T 細胞の集積を引き起こし、この細胞から INF- γ 、IL-17A、IL-6 等のサイトカインが分泌され、これが血管内皮細胞からの ATP 発現を促進し、DMH 領域の神経の活性化を引き起こす、という経路を明らかにした。

慢性ストレス下での迷走神経の活性化が重篤な胃腸障害を引き起こす上で重要である

PVN のニューロンが迷走神経の分枝を経由して胃腸の恒常性に影響を与える²⁶ことや DMH が迷走神経背側核(dorsal motor vagal nucleus:DMX)と連絡があることが報告されている²⁷。これら報告から迷走神経の活性化が脳の微小炎症による重篤な胃腸障害の発症と関連があるのではないかと考え、DMH および PVN の活性化が、胃や上部消化管に分布する迷走神経を増強するという仮説を立てた。

まず慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入した際の DMX での神経活性化に関して調べた(図 42)。

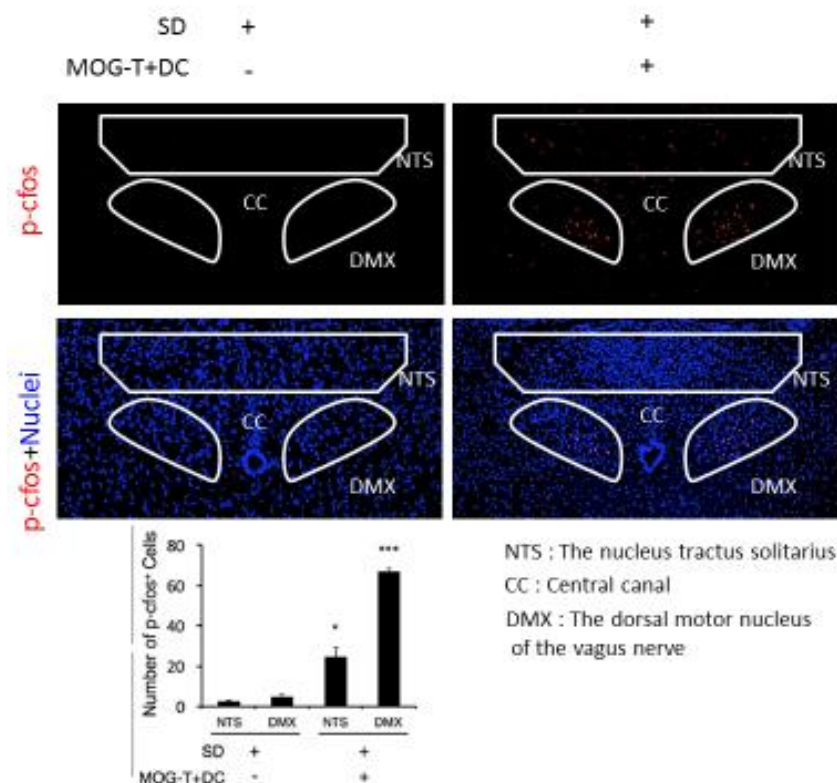


図 42. 睡眠障害ストレス下のマウスの脳特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入後の DMX・NTS での神経活性化

睡眠障害ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に生理食塩水もしくは病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入し、2 日後に脳を摘出し、DMX と孤束核(nucleus of the tractus solitaries:NTS)と中心管(central canal:CC)を含む切片を切り出し、リン酸化 c-fos と細胞核で組織免疫染色を行った(n=3)。下はそれぞれの切片での DMX と NTS でのリン酸化 c-fos 陽性細胞の数である。睡眠障害ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入すると DMX で高度の神経活性化が認められた。また求心性の主要な迷走神経核である NTS でも神経活性化が認められた。

慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入すると DMX で高度の神経活性化が認められた。また求心性の主要な迷走神経核である NTS でも神経活性化が認められた。このことは求心性ニューロンの活性化が、脳の微小炎症によって放出される ATP に依存する胃腸領域の重篤な障害時に誘発されることを示唆している。最後に迷走神経の関与を確かめるため、迷走神経切断術を施行したマウスでの表現型を確認した(図 43)。

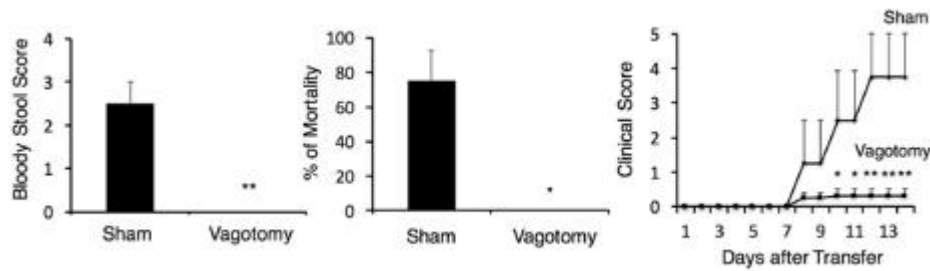


図 43. 迷走神経節断術が与える影響

睡眠障害ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入し、2 日後に迷走神経節断術を施行しその後便潜血スコアと死亡率、EAE clinical score を評価した (n=3-5)。迷走神経を切断すると睡眠障害ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入しても便潜血、死亡率、症状共に改善した。

迷走神経を切断すると慢性ストレス下のマウスの第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に病原性 CD4 陽性 T 細胞と MOG 蛋白と DC を微量注入しても便潜血、死亡率、症状共に改善した。これら結果から、重篤な胃腸障害が慢性ストレス下での脳の特定血管での微小炎症によって活性化される DMH-迷走神経を介して誘導されることがわかった。

考察

我々は、慢性ストレス下の EAE 誘導マウスでは第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管の微小炎症が DMH-迷走神経経路を介して重篤な胃腸障害を引き起こすことを示した。

当研究室では、絶え間ない重力刺激によって局所の交感神経の活性化が起こり、第五腰椎背側血管でのケモカイン発現を誘導し、病原性 CD4 陽性 T 細胞の中樞神経系への侵入口を形成すること報告し³、これを重力による gateway 反射と名づけた。また筋肉への外部からの電気刺激が L5 とは異なる部位の脊髓背側血管で免疫細胞の侵入口を形成することも報告しており、これを電気刺激による gateway 反射と報告した³。さらに我々は痛みが EAE の再発を引き起こすことに注目して、痛みが交感神経を介して脊髓腹側血管に免疫細胞の侵入口を形成することを発見し、痛みによる gateway 反射と報告した。

そして今回の研究では、慢性的なストレス状態が第三脳室と視床と歯状回に囲まれた領域の特定血管に免疫細胞の侵入口を形成することを発見し、これを

ストレスによる gateway 反射⁴と名付けた。

我々は、ストレス下で病原性 CD4 陽性 T 細胞移注すると第五腰椎背側血管ではなく、脳の特定の血管で免疫細胞の集積が認められることを発見した(図 17 と 18)。一方以前報告した重力による gateway 反射では、抗重力筋であるヒラメ筋からの感覚神経の活性化によって gateway 反射が起こることを報告³している。重力による中枢神経組織への免疫細胞の侵入口が慢性ストレス負荷では消失する。この原因としてはストレス負荷状態ではマウスは動きが減り、横になる頻度が増えるため、ヒラメ筋への刺激が減ることが考えられた。

我々の以前報告した研究⁴では、L5 腹側血管への活性化モノサイトの集積と痛みによる EAE の再発において CX3CL1 が重要なケモカインであることを示した。病原性 CD4 陽性 T 細胞移注による EAE マウスは麻痺などの症状を呈するが、一過性である。我々は EAE の症状が回復したマウスを EAE-recoverd マウスと呼んだ。通常の状態では EAE-recoverd マウスの症状が再発することはない。一方、90%以上の多発性硬化症患者が再発を経験しており、痛みの発生が多発性硬化症患者の神経症状および重症度と関連するとした報告^{28 29 30}がある。このことから、我々は痛み感覚が反射経路を介して多発性硬化症の再発を引き起こすという仮説を立てた。実際、痛み刺激が EAE-recoverd マウスでの EAE 再発を誘導した。精密な解析の結果、野生型マウスと EAE-recoverd マウスでは EAE の臨床症状が無いことは一致していても中枢神経系に大きな違いがあることが分かった。EAE-recoverd マウスでは L5 レベルの腰髄で MHC II hiCX3CR1 陽性 CD11b 陽性細胞が多く認められた。この細胞は中枢由来のミクログリアではなく、末梢由来の活性化モノサイトであった。大切なことは、EAE-recoverd マウスではこの活性化モノサイトが中枢神経系に長期間 (EAE 誘導後 150 日以上の場合もあった) 留まり、痛み誘発性の EAE 再発において重要という点である。一方、最近多くの論文で、初期免疫応答後、常在性 T 細胞が非免疫組織に長期間 (長い場合は 150 日以上) 留まり、その後の免疫応答に影響を及ぼすことを報告^{31 32}している。この常在性 T 細胞と我々の報告した EAE-recovered マウスの中枢神経系の活性化モノサイトの特徴は極めて類似している。

EAE-recovered マウスにおける CX3CR1 を有する滞在モノサイトは末梢から中枢へと移動してきて、中枢神経に長期間留まり、疼痛時の EAE 再発に寄与する。したがって常在性モノサイトの起源は CX3CR1 を有する血液を巡回するモノサイトの可能性がある。我々は以前、CX3CR1 を有する常在性モノサイトが、痛み刺激を介した神経回路活性化後に脊髄の腹側血管周囲で産生されるノルエピネフリンによる刺激後に CX3CL1 を発現することを示した。この結果はノルエピネフリンで調節される常在性モノサイトにおける CX3CR1-CX3CL1 の自己分泌

を示唆した。中枢神経に長期滞在する活性化モノサイトは EAE の初期に中枢神経に浸潤している。痛み特異的な神経経路は L5 腹側血管に中枢神経に常在性の活性化モノサイトの集積を引き起こし、血液中から病原性 CD4 陽性 T 細胞を含む免疫細胞が中枢神経系に集積し EAE の再発が起こる。

我々の今回の研究ではストレス状態の野生型マウスには中枢神經常在性活性化モノサイトが存在しないので CX3CL1 はストレスによる gateway 反射において重要ではない。一方、ストレスによる gateway 反射では CCL5 が病原性 CD4 陽性 T 細胞を末梢から脳の特設血管へ動員し微小炎症を引き起こし、MHC II hiCD11b 細胞を集めるために必要であることがわかった。

病原性 CD4 陽性 T 細胞から分泌されるであろうサイトカインの INF- γ , IL-17A, IL-6 もこの微小炎症の発生においても重要であり、結果として重度の胃腸障害を引き起こす。実際、特定血管における CD4 陽性 T 細胞と MHC II hiCD11b 細胞の集積と重度の胃腸障害は CCL5、IL-17A、INF- γ をブロックすると抑制された。さらに IL-17A もしくは INF- γ を欠損した病原性 CD4 陽性 T 細胞ではストレス下でも特定血管に集積しなかった。

以上から、特定血管におけるケモカイン／サイトカインの発現および MHC II hiCD11b 陽性細胞の集積もしくは病原性 CD4 陽性 T 細胞の集積が重篤な胃腸障害を診断または治療に役立つ可能性があることを示した。

本研究での致命的な胃腸障害は、脳の特設血管での微小炎症によって発現する ATP によって誘発される、今まで指摘されたことのない新たな DMH-迷走神経経路の活性化に依存することを発見した。またこの神経経路は慢性ストレス状態かつ脳の微小炎症がないとほとんど活性化しないことも明らかにした。

したがって、本研究での脳の特設血管における ATP は、この新しい神経経路を活性化するスイッチとみなせる。このように、脳の特設血管における微小炎症が、まだ発見されていない神経経路を活性化し、脳自体を含む様々な臓器の恒常性を調整できる可能性を示した。

アルツハイマー病、非アルツハイマー型認知症およびパーキンソン病のような神経変性疾患^{33 34}や精神障害患者³⁵やてんかん患者³⁶は脳に微小炎症が起こることが報告されている。これら微小炎症の病的意義はほとんど分かっていないが、本研究の結果のように脳の微小炎症が新たな神経回路を形成し、それによる脳を含む多臓器の障害が起きている可能性がある。

我々はストレス条件化に脳の自己免疫性炎症モデルを用いて脳腸軸の分子機構を明らかにした。本研究では脳の特設血管の微小炎症が致命的な胃腸障害をどのように引き起こすかを明らかにした。求心性および遠心性の神経系は全身に存在するため、脳の微小炎症が今回示した胃腸や心臓だけでなく、他の器官を含む末梢器官における調節不全を引き起こす可能性がある。本研究では、慢

性ストレスによって室傍核の交感神経が興奮し、その刺激が脳の視床、歯状回、第三脳室で囲まれた領域の特定血管で微小炎症を引き起こし、それによる免疫細胞の集積が特定血管で ATP を発現し、ATP を介した神経刺激で背内側核-迷走神経内側核という新たな神経回路を形成し、迷走神経内側核から上部消化管への過剰な神経刺激により消化液過多から出血を引き起こし、その血液を再吸収することにより高カリウム血症に陥り死亡することを明らかにした。

総括および結論

本研究より慢性ストレスが室傍核の交感神経活性化を引き起こし、それにより第三脳室、視床、歯状回に囲まれた特定血管の微小炎症を引き起こし、新たな神経回路を形成・活性化し、消化管出血から高 K 血症を引き起こし、心停止を引き起こすという、慢性ストレスによるゲートウェイ反射が明らかになった。

本研究から、胃潰瘍などのストレス性疾患では標的臓器への対症的治療ではなく脳の微小炎症を標的とした根本的治療が可能になる可能性や、ストレスで病気になる人とならない人の違いが病原性 CD4 陽性 T 細胞や脳の微小炎症の有無によるものの可能性、脳内で局所炎症を引き起こす病原性 CD4 陽性 T 細胞の有無を血液検査などで調べることにより、ストレス性疾患へのリスクを予測できる可能性を示した。

またアルツハイマー病などの認知症患者では脳内微小炎症が認められるが、今までは脳の微小炎症が病態へ関与するか不明であったが、本研究で示したように、脳の微小炎症が新規の神経回路を活性化して脳を含む臓器機能障害を引き起こす可能性が示された。

更なる研究は必要だが、この結果を元に新たな治療法など創出できることを期待したい。

謝辞

IL-17A-deficientマウス・B6.129S7-Ifng^{tm1Ts}/Jマウスを慶應義塾大学吉村先生よりご提供いただき感謝いたします。

また分子神経免疫学教室の坂下幸大様、大木拓究人様、樋口光太郎様、田中勇希先生、太田光俊先生、Mohamed Elfeiky先生、Stofkova Andrea先生、福本里登美様、中山千恵美様、江沢光江様、上村大輔先生に実験を手伝っていただき感謝致します。小林純子先生(北海道大学)、岩永敏彦先生(北海道大学)、酒井良太先生(慶應義塾大学)、川本忠文先生(鶴見大学)、森勇樹先生(コペン

ハーゲン大学)、吉岡芳親先生(大阪大学)、栞谷将城先生(北海道大学)、坂本直哉先生(北海道大学)、滝口満喜先生(北海道大学)、佐古田先生(刀根山病院)、Marco Prinz先生(Freiburg大学)、貴重な議論、ご助言をいただき深く感謝致します。さらに本研究を一貫して、有馬康伸先生(北海道大学)、村上正晃先生(北海道大学)、森本裕二先生(北海道大学)にご指導いただき深く感謝致します。

引用文献

1. Miller, S. D., Vanderlugt, C. L., Lenschow, D. J., Pope, J. G., Karandikar, N. J., Dal Canto, M. C. & Bluestone, J. A. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity*. 3, 739-745 (1995).
2. Steinman, L. Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annual review of immunology*. 32, 257-281 (2014).
3. Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J.-H., Kawano, F., Yull, F. E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U. A. & Márquez, G. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*. 148, 447-457 (2012).
4. Arima, Y., Kamimura, D., Atsumi, T., Harada, M., Kawamoto, T., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Higuchi, K. & Morimoto, Y. A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *Elife*. 4, e08733 (2015).
5. Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H. L., Linington, C., Sobel, R. A. & Kuchroo, V. K. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *Journal of Experimental Medicine*. 197, 1073-1081 (2003).
6. Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M. & Iwakura, Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*. 17, 375-387 (2002).
7. Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A. & Stewart, T. A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*. 259, 1739-1742 (1993).
8. Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y. & Hirano, T. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity*. 29,

- 628-636 (2008).
9. Miyazaki, K., Itoh, N., Ohyama, S., Kadota, K. & Oishi, K. Continuous exposure to a novel stressor based on water aversion induces abnormal circadian locomotor rhythms and sleep-wake cycles in mice. *PloS one*. 8, e55452 (2013).
 10. Oishi, K., Yamamoto, S., Itoh, N., Miyazaki, K., Nemoto, T., Nakakita, Y. & Kaneda, H. Disruption of behavioral circadian rhythms induced by psychophysiological stress affects plasma free amino acid profiles without affecting peripheral clock gene expression in mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 450, 880-884 (2014).
 11. Kawamoto, T. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole animals, insects and plants. *Archives of histology and cytology*. 66, 123-143 (2003).
 12. Ueda, N., Kuki, H., Kamimura, D., Sawa, S., Seino, K., Tashiro, T., Fushuku, K.-i., Taniguchi, M., Hirano, T. & Murakami, M. CD1d-restricted NKT cell activation enhanced homeostatic proliferation of CD8⁺ T cells in a manner dependent on IL-4. *International immunology*. 18, 1397-1404 (2006).
 13. Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Harada, M., Morii, E., Shintani, Y., Inoue, M., Iwakura, Y., Miyoshi, S. & Okumura, M. IL-6 amplifier, NF- κ B-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *The Journal of Immunology*. 189, 1928-1936 (2012).
 14. Kim, S. S., Wang, H., Li, X.-Y., Chen, T., Mercaldo, V., Descalzi, G., Wu, L.-J. & Zhuo, M. Neurabin in the anterior cingulate cortex regulates anxiety-like behavior in adult mice. *Molecular brain*. 4, 6 (2011).
 15. Yoshihara, T. & Yawaka, Y. Differential effects of repeated immobilization stress in early vs. late postnatal period on stress-induced corticosterone response in adult rats. *Neuroscience letters*. 534, 30-34 (2013).
 16. Debas, H. & Carvajal, S. H. Vagal regulation of acid secretion and gastrin release. *The Yale journal of biology and medicine*. 67, 145 (1994).
 17. Jia, Y.-T., Wei, W., Ma, B., Xu, Y., Liu, W.-J., Wang, Y., Lv, K.-Y., Tang, H.-T., Wei, D. & Xia, Z.-F. Activation of p38 MAPK by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. *The Journal of Immunology*. 179, 7808-7819 (2007).
 18. Uwada, J., Yazawa, T., Islam, M. T., Khan, M. R. I., Krug, S. M., Fromm, M., Karaki, S.-i., Suzuki, Y., Kuwahara, A. & Yoshiki, H. Activation of muscarinic receptors prevents TNF- α -mediated intestinal epithelial barrier disruption through p38 MAPK. *Cellular signalling*. 35, 188-196 (2017).

19. Sabharwal, L., Kamimura, D., Meng, J., Bando, H., Ogura, H., Nakayama, C., Jiang, J.-J., Kumai, N., Suzuki, H. & Atsumi, T. The Gateway Reflex, which is mediated by the inflammation amplifier, directs pathogenic immune cells into the CNS. *The Journal of Biochemistry*. 156, 299-304 (2014).
20. Herman, J. P. & Cullinan, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends in neurosciences*. 20, 78-84 (1997).
21. Ramot, A., Jiang, Z., Tian, J.-B., Nahum, T., Kuperman, Y., Justice, N. & Chen, A. Hypothalamic CRFR1 is essential for HPA axis regulation following chronic stress. *Nature Neuroscience*. 20, 385-388 (2017).
22. Shi, Y.-C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Weger, S. & Huang, X.-F. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell metabolism*. 17, 236-248 (2013).
23. Ulrich-Lai, Y. M. & Herman, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*. 10, 397-409 (2009).
24. Rusyniak, D. E., Zaretskaia, M. V., Zaretsky, D. V. & DiMicco, J. A. Microinjection of muscimol into the dorsomedial hypothalamus suppresses MDMA-evoked sympathetic and behavioral responses. *Brain research*. 1226, 116-123 (2008).
25. Burnstock, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in pharmacological sciences*. 27, 166-176 (2006).
26. Ferguson, A. V., Marcus, P., Spencer, J. & Wallace, J. L. Paraventricular nucleus stimulation causes gastroduodenal mucosal necrosis in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 255, R861-R865 (1988).
27. Thompson, R., Canteras, N. & Swanson, L. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: A PHA - L study in the rat. *Journal of comparative Neurology*. 376, 143-173 (1996).
28. Ehde, D. M., Gibbons, L. E., Chwastiak, L., Bombardier, C. H., Sullivan, M. D. & Kraft, G. H. Chronic pain in a large community sample of persons with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 9, 605-611 (2003).
29. Ehde, D., Osborne, T., Hanley, M., Jensen, M. & Kraft, G. The scope and nature of pain in persons with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 12, 629-638 (2006).
30. O'Connor, A. B., Schwid, S. R., Herrmann, D. N., Markman, J. D. & Dworkin, R. H. Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed

- classification. *PAIN®*. 137, 96-111 (2008).
31. Iijima, N. & Iwasaki, A. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science*. 346, 93-98 (2014).
 32. Mueller, S. N. & Mackay, L. K. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nature reviews Immunology*. 16, 79-89 (2016).
 33. Appel, S. H., Beers, D. R. & Henkel, J. S. T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? *Trends in immunology*. 31, 7-17 (2010).
 34. Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K. & Kosaka, K. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Journal of neuroimmunology*. 124, 83-92 (2002).
 35. Najjar, S., Pearlman, D. M., Alper, K., Najjar, A. & Devinsky, O. Neuroinflammation and psychiatric illness. *Journal of neuroinflammation*. 10, 816 (2013).
 36. Vezzani, A., French, J., Bartfai, T. & Baram, T. Z. The role of inflammation in epilepsy. *Nature reviews neurology*. 7, 31-40 (2011).