

—総説—

## 免疫系に関わる因子が脳皮質神経細胞層の構築に及ぼす影響

宗宮仁美, 福光秀文, 古川昭栄\*

**要約**：自閉症を含む発達障害や統合失調症は様々な臨床症状を呈するが、認知機能障害を病態の中核症状としている。患者の剖検脳皮質において微細構造の異常が報告されており、認知を含む高次脳機能障害の一因であると考えられている。また、これらの精神疾患患者の脳内では免疫系サイトカインの発現プロファイルが変化しており、病態脳形成に免疫系異常が関与する可能性が示唆されている。そこで本研究では、免疫系に関わる因子が脳皮質構築過程に及ぼす影響を明らかにし、病態脳形成への関与を検討した。本研究結果から免疫系にかかわる環境因子が胎仔の脳皮質神経細胞層の構築過程をわずかに修飾することによって、脳皮質の機能失調にかかわる初期病変を作ることを明らかにした。

**索引用語**：発達障害、統合失調症、脳皮質、神経発生、サイトカイン

### Immune-related Factors Influenced the Development of the Mouse Cerebral Cortex

Hitomi SOUMIYA, Hidefumi FUKUMITSU, Shoei FURUKAWA\*

**Abstract**: Clinical symptoms are variable in subjects where cognitive impairments are a major feature with psychiatric, and neurodevelopmental disorders, including schizophrenia and autism. The cerebral cortex plays important roles in cognitive function. Abnormal neuronal morphology and cytoarchitecture of the cerebral cortex are found in postmortem brains from human subjects with severe psychiatric disorders such as schizophrenia and autism. These impairments are thought to be responsible for the abnormal cognitive functions and behavior of such patients. As immunological dysfunctions have also been reported in schizophrenic or autism patients, it may underlie the development of the psychiatric brain. In this study, we examined how immune-related factors affect the development of the cerebral cortex. The results obtained in this study suggest that subtle alterations in the genesis and development of the cerebral cortex induced by immune-related factors might cause functional disorders of the cerebral cortex.

**Key phrases**: neurodevelopmental disorder, schizophrenia, cerebral cortex, neurogenesis, cytokine

#### 1. 緒言

発達障害とは、子どもの成長過程において何らかの理由により社会適応上の不調が起きる病態をいう。発達障害の権威の1人である杉山登志郎博士は、その著書の中で発達障害を4つのグループに大別している。第一のグループは、認知機能の全般的遅れを示す精神遅滞と境界知能、第二のグループは、社会性の障害である広汎性発達障害（自閉症スペクトラム）、第三のグループは注意欠陥性多動性障害（ADHD）や学習障害、発達性協調運動障害などの脳のある領域の働きと他の働きの連動に際して障害が生じるタイプで軽度発達障害、第四のグループは虐待に基づく発達

障害である<sup>1)</sup>。これまでの研究により、第一群の精神遅滞を生じるグループでは、滑脳症の原因遺伝子 *lissencephaly1* (*Lis1*) と二重皮質の原因遺伝子 *doublecortin* という2つの原因遺伝子が同定されている。遺伝子改変動物を用いた研究から、これらの遺伝子の異常は脳皮質構築過程における神経細胞の移動障害を引き起こすことが報告されている。また、第二群および第三群の発達障害については、ゲノム解析の結果から、その変異の存在により1%未満の発症率を~数%までに引き上げる遺伝子（発症リスク遺伝子）は数十種類報告されているが、原因遺伝子は見つかっていない。たとえば、自閉症の場合、遺伝的背景がほぼ同一である一卵性双生児では、一方が自閉症と診断された場

合、もう一方が自閉症と診断される確率はおよそ 90% であり、二卵性の場合には約 30% と低下する<sup>2)</sup>ため、遺伝的な要因が背景にあることは明らかであるが、遺伝以外の要因の存在も否定できない。遺伝以外の環境要因としては、妊娠期のメチル水銀などの重金属摂取<sup>3)</sup>、サリドマイド<sup>4)</sup>、感染症の罹患<sup>5, 6)</sup>により、自閉症の発症率が高まるという疫学調査の結果が報告されている。したがって、第二、三群の発達障害の発症には、複数の遺伝子の発現や機能低下に基づく発症脆弱性に対して、感染症などの環境的要因が複雑に絡み合っており、脳にわずかな器質的变化を誘導することが病態脳の形成の引き金を引くと考えられている。また、発達障害には分類されていないが、人口の約 1% が罹患している統合失調症も、これまでの様々な研究から脳の発達過程の異常に基づく病理所見が認められること、自閉症と統合失調症の発症リスク因子（遺伝的要因と環境要因の双方）が一部重なっていること、から、発達障害と統合失調症の病態形成メカニズムには何らかの類似性、相関性があると考えられている。

自閉症や統合失調症は様々な症状を呈するが、幻覚、記憶障害や注意障害など認知機能の障害は病態の中核症状であり、患者をもっとも翻弄し消耗させる症状である。これらの疾患患者の剖検脳の解析から、認知機能等の高次脳機能を司る大脳皮質での解剖学的、機能的異常が繰り返し報告されており、これらの異常が認知機能障害や異常行動に関与していると考えられている<sup>7, 8)</sup>。しかし、大脳皮質を機能失調に陥れる生化学的な変化は特定されておらず、病態大脳皮質の形成機序についても不明である。

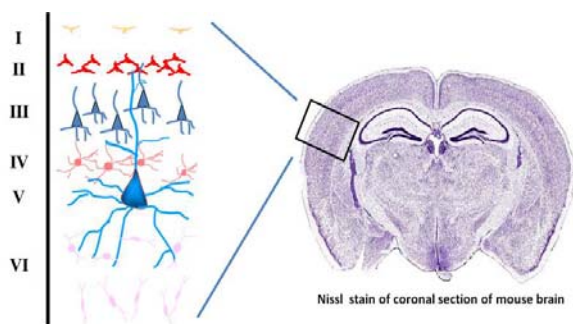


Fig. 1. Cytoarchitecture of the cerebral cortex.

大脳皮質の神経細胞は、7~8 割を占める興奮性で投射型の神経細胞と、抑制性で介在型の神経細胞から構成されている。細胞形態および軸索投射といった性質の類似する錐体細胞が集合して層状に配置することにより、6層構造を形成する<sup>9, 10)</sup> (Fig. 1)。また、特定機能に関わる神経細胞が大脳皮質の層間を円柱状に分布し、機能単位（カラム）を形成している。このカラムの中では各層を構成する神経細胞間で局所回路が形成され、情報処理が行われている。さらに、各層の神経細胞が異なる脳部位に投射して神経間連絡することにより、無数のカラム同士を結び付けて、複

雑かつ膨大な情報処理を可能としている。大脳皮質の構築過程は、①脳室周囲（脳室帯：ventricular zone; VZ）に存在し、脳構成細胞に共通の幹細胞である大脳皮質前駆細胞の増殖と、そこからの多様な神経細胞の生成、②誕生した神経細胞の移動と最終定着位置への配置、③自らの標的へと軸索を伸ばしシナプスを形成する神経連絡網形成、という、大きく3つの過程に分けられる。①、②のプロセスで異常が生じると、脳回欠損、異所性細胞塊の形成が、③のプロセスの障害では、脳梁低形成、神経連絡の不全が起こりうる<sup>11)</sup>。また、後者のプロセスは前者のそれに大なり小なりの影響を受ける。したがって、これらの構築過程の異常に基づく神経細胞の解剖学的又は機能的変化によって神経回路に歪みが生じると、脳の情報処理機能が障害されて破綻し、さまざまな精神・神経疾患の原因になると考えられている。

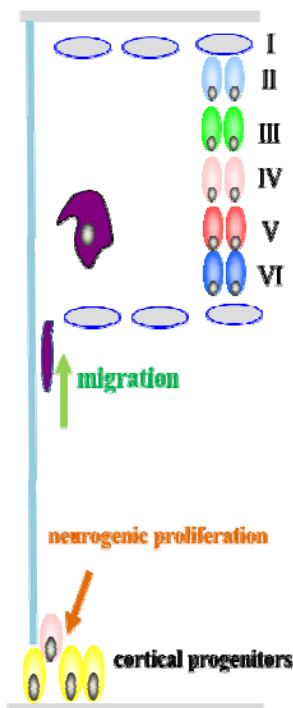
大脳皮質神経細胞構築過程において、多種多様な神経細胞が生成される際、転写因子や細胞周期関連の調節因子などの細胞内因子が重要な役割を果たすことが明らかにされつつあるが、これらの細胞内因子の働きを制御し、大脳皮質前駆細胞の増殖、神経細胞の発生・分化のタイミングを調節し、生成される神経細胞の種類と数を決定しているのは大脳皮質から供給される細胞外因子である。筆者の所属する研究室では、大脳皮質構築過程において脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor; BDNF）、ニューロトロフィン-3（neurotrophin-3; NT-3）、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドなどの神経栄養因子の作用により、誕生する神経細胞の性質や数が変動することをすでに報告している<sup>12, 13, 14)</sup>。

一方、疫学調査により、妊娠中に母体がインフルエンザ等の感染症に罹患すると、子が自閉症などの精神疾患を発症するリスクが高くなることが明らかにされている<sup>5, 6)</sup>。この疫学調査に基づいて作製された動物モデルの解析により、母体・胎仔の免疫系が賦活化されると、成熟した仔に行動異常が誘発されることが明らかにされている。また、近年、自閉症や統合失調症患者において脳脊髄液中のサイトカイン量の増加や免疫関連分子の発現プロファイルに変化が起きていること<sup>15, 16)</sup>が報告されており、免疫系に関与する分子が精神疾患の病態脳形成に関与する可能性が示唆されている。実際に大脳皮質構築過程において、炎症性サイトカインであるインターロイキン（interleukin; IL）-6は、神経幹細胞に作用し JAK/STAT 経路を活性化することによりグリア細胞の発生を促進し<sup>17)</sup>、ケモカインである stromal cell-derived factor1（SDF1）は、抑制性神経細胞の移動に影響することが知られている<sup>18)</sup>。しかし、免疫系の賦活化が大脳皮質構築過程において、どのような初期病変を作るのか、その初期病変は大脳皮質の機能的神経ネットワークを形成する過程でどのような影響を及ぼすのかなどの病態脳形成メカニズムは不明である。

そこで、本研究では、マウス胎仔脳室内に直接造血系サイトカインである幹細胞因子を注入し、大脳皮質構築過程に及ぼす影響を検討した。次に妊娠期免疫賦活化による精神疾患モデル動物の大脳皮質構築過程、神経ネットワーク構築などの発達プロセスにおける変化を検討した。

## 2. マウス大脳皮質構築過程に及ぼす幹細胞因子の役割

大脳皮質を構成する様々な神経細胞は、胎生期に脳室と接する前駆細胞の増殖領域（脳室帯: ventricular zone, VZ）から次々に誕生し、将来の灰白質（皮質板: cortical plate: CP）に向かって移動し、定着する<sup>19)</sup>（Fig. 2）。このとき、



**Fig. 2. Laminar formation during development of the cerebral cortex.**

新しく誕生した神経細胞はそのつど、髄膜付近まで移動して定着するため、早生まれの細胞ほど深層に、遅く生まれた細胞ほど上層に配置される。この移動と定着の過程に障害が起こると、正常とは異なる場所に神経細胞が集積するようになる。重度の細胞移動障害（滑脳症、二重皮質）では MRI 画像でも異所性細胞塊が確認され、患者の多くは難治性てんかん、発達障害を伴う。細胞塊を構成する神経細胞の神経活動が正常な大脳皮質神経ネットワークの活動に影響を及ぼし、病態発症に関与すると考えられている<sup>20, 21)</sup>。このような大脳皮質内に異所性細胞塊がみられる患者を対象として遺伝子解析が実施された結果、細胞骨格タンパク質あるいはその関連タンパク質をコードするいくつかの遺伝子に変異が見出され、その後の研究からこれらのタンパク質が神経細胞の移動や定着に関わることが報告されている。しかし、これらの原因遺伝子の変異をもつのは患者のごく一部に限られており<sup>22)</sup>、大脳皮質における

異所性細胞塊の形成には複数の要因が関与していると予想されている。したがって、病態をさらに理解するためには、複数の要因に基づく異所性細胞塊の形成機序を明らかにし、その中から共通する機構を抽出することが重要である。

細胞移動や定着ばかりでなく、細胞増殖や細胞死のプログラミングの制御不全も細胞の異所性集積の原因となりうる。近年の研究から、転写因子や細胞周期および細胞骨格の制御因子が大脳皮質前駆細胞の増殖や細胞生存、細胞移動に関与することが明らかにされつつある。これらの細胞内因子の機能を制御して、誕生する神経細胞の数及び発生、移動開始と定着のタイミングを決定しているのは大脳皮質内で環境因子として供給される成長因子やサイトカインである<sup>23)</sup>。それゆえ、成長因子やサイトカインの発現、機能制御の不全が異所性細胞塊の原因になる可能性がある。

幹細胞因子 (stem cell factor; SCF) は、血小板由来成長因子受容体やコロニー刺激因子 1 受容体や *fms* 様チロシンキナーゼリガンド 3 受容体と同じファミリーに属する III 型チロシンキナーゼ受容体 *c-kit* のリガンドである<sup>24)</sup>。これまでに、1) SCF と *c-kit* は、移動中の神経前駆細胞や皮質板内の神経細胞を含む発達過程の大脳皮質の細胞に発現している<sup>25, 26)</sup>こと、2) 様々な幹細胞や前駆細胞の増殖、分化、移動を調節することにより、SCF/*c-kit* シグナルが造血や胎児個体の発生<sup>27, 28)</sup>、癌細胞の増殖や浸潤<sup>29)</sup>に関わっていること、3) 外因性の SCF が培養下の大脳皮質前駆細胞の生存や移動を促進する<sup>30)</sup>こと、が分かっている。したがって、SCF は大脳皮質神経細胞の発生や生存、性質を調節する環境因子の有力候補と考えられる。しかし、発達過程の大脳皮質における SCF の具体的な役割については不明である。そこで、本章ではタンパク質微量注入法を用いて胎仔の脳室内へ SCF を注入し、大脳皮質前駆細胞に及ぼす影響を調べた。

### 2-1. 発達中の大脳皮質における SCF とその受容体 *c-kit* の発現

各発達段階 (E13.5, E14.5, E15.5) の大脳皮質における SCF と受容体 *c-kit* の mRNA 発現を RT-PCR 法により検討したところ、すべてのステージで発現していた。次に、胎生期の大脳皮質に発現している *c-kit* について SCF シグナルの伝達能を検討した。E13.5 の胚から切出した大脳皮質を、SCF を含む培地（最終濃度 100 ng/ml）で 30 分から 6 時間培養し、SCF/*c-kit* のシグナルを細胞内に伝達する分子の一つである Akt のリン酸化を調べた。Akt のリン酸化の上昇は SCF 添加 30 分、1 時間後に観察されたが、2 時間後には添加前のレベルまで低下した。これらの結果より、機能的な *c-kit* が E13.5 の大脳皮質に発現しており、Akt のリン酸化を介して SCF のシグナルを伝達することが明

らかとなった。

### 2-2. SCF による大脳皮質異所性細胞塊の形成

大脳皮質神経細胞層の構築に及ぼす SCF の影響を調べた。SCF (10 ng/胚) を E13.5 のマウス胎仔の側脳室に注入し、神経細胞の移動と定着がほぼ完了する生後 6 日齢 (P6) まで通常飼育した。次いで脳を摘出し、組織化学的解析を行った。SCF 投与群の大脳皮質では、解析を行った 15 匹のうち 12 匹に脳室周囲灰白質、6 匹に辺縁帯、4 匹に側脳室などの様々な部位に異所性に細胞の集積が観察された。これら異所性細胞塊の出現は大脳皮質体性感覚野に集中して認められた。より高用量の SCF (20 ng) を投与した場合は、より顕著な変化が認められた。すなわち、誕生時に、直径 2 mm にも及ぶ異所性細胞塊が頭蓋骨を貫通して形成された。このような巨大細胞塊が形成されると腹部は大きく膨れ上がり、生後 2 日以上生存することができなかった。次に、10 ng の SCF を投与したとき大脳皮質の脳室周囲灰白質と辺縁帯に形成された異所性細胞塊を構成する細胞種を免疫染色法により検討した。細胞塊が形成される場所に関係なく、細胞塊の中心部には神経細胞が多く、その周囲をアストロサイトが覆う様に分布していることが明らかとなった。次に、細胞塊を構成する神経細胞のサブタイプを調べるため、辺縁帯に細胞塊が存在する大脳皮質について抗 orthologue of the Drosophila cut gene (Cux1; 第 II-IV 層神経細胞のマーカー) 抗体、抗 chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) -interacting protein 2 (CTIP2; 第 V 層神経細胞のマーカー) 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、コントロールマウス (SCF 無投与群) の大脳皮質では、

Cux1 陽性細胞の多くは第 II 層から IV 層に分布し、辺縁帯および深層ではほとんど観察されなかったが、CTIP2 陽性細胞の多くは第 V 層と第 VI 層に分布し、特に第 V 層では大型の、第 VI 層では小型の陽性細胞が認められた。一方、SCF が辺縁帯内に誘導した異所性細胞塊には、非常に多くの Cux1 陽性細胞と多くの CTIP2 陽性細胞が混在していた。これらの結果から、SCF により誘導される異所性細胞塊は、形成場所によらず、多くの神経細胞からなり、上層と深層の神経細胞を含むことが明らかとなった。

### 2-3. 神経幹細胞/神経前駆細胞の発達と移動に及ぼす SCF の影響

SCF による細胞塊形成のメカニズムを明らかにするため、まず大脳皮質前駆細胞の発達に及ぼす SCF 投与の影響を調べた。胎生 11 から 17 日のマウスの大脳皮質脳室帯では、神経幹細胞から中間神経前駆細胞を経て神経細胞が生成される。中間神経前駆細胞は、分裂能が 1-3 回と限られており、娘細胞として神経細胞のみを生成する。

これらの 3 タイプの細胞、すなわち神経幹細胞、中間神経前駆細胞、神経細胞は SRY-box containing gene 2 (Sox2)、T-brain gene 2 (Tbr2)、 $\beta$ III-tubulin (Tuj1) をそれぞれ特異的に発現することが知られている。そこで E13.5 の大脳皮質で観察すると、Sox2 陽性細胞は脳室帯 (VZ) に、Tbr2 陽性細胞は傍脳室帯 (subventricular zone, SVZ) に存在していた。神経発生が終わりに近づくにつれて、神経幹細胞、神経前駆細胞の数は減少する。たとえば、E17.5 の大脳皮質では、Sox2 陽性細胞は中間層 (intermediate zone, IZ) に散在するのみで VZ にはほとんど分布していなかった。また、E13.5 のステージと比べると、SVZ に局在する

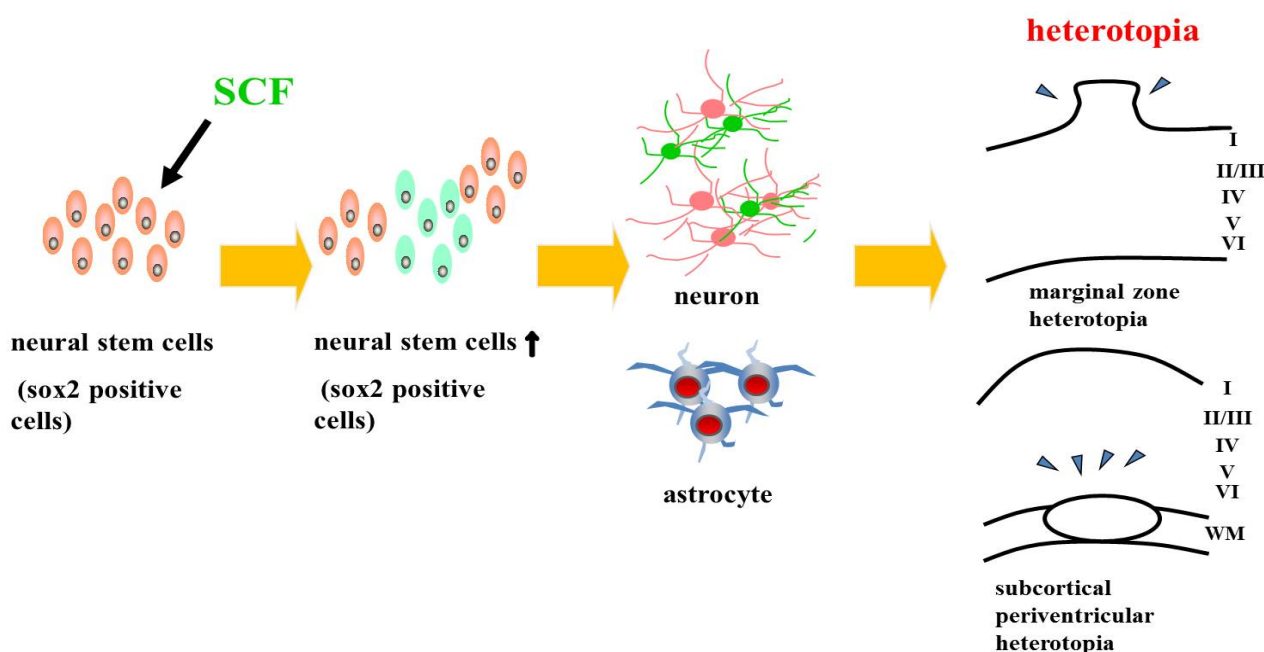


Fig. 3. SCF induced ectopic accumulation of cortical cells. The arrowheads indicate the edge of each area of heterotopia.



Tbr2 陽性細胞が減少していた。SCF を投与すると大脳皮質では、VZ に局在する Sox2 陽性神経幹細胞が増加したが、Tbr2 陽性細胞の数や分布には影響は認められなかった。SCF は造血幹細胞の増殖や自己複製を促進することが知られており<sup>31)</sup>、今回の結果と併せて考えると、SCF は大脳皮質前駆細胞に対しても増殖、自己複製を促進し、生成する神経細胞の数を増加させる可能性がある (Fig.3)。

SCF は、培養大脳皮質神経細胞<sup>30)</sup>や造血幹細胞<sup>27)</sup>に対して誘因因子 (ケモアトラクタント) としても働くことが知られている。したがって、SCF の増殖促進作用によって増加した Sox2 陽性細胞が、SCF の誘因作用によって局所に集積した結果である可能性がある。そこで確認のため、高用量の SCF (20 ng) を胎仔脳室内に注入し、1 日後の変化を調べたところ、多くの Sox2 陽性細胞及び Tbr2 陽性細胞が SCF の注入部位に近い前頭部の大脳皮質に偏って存在し、後頭部にはほとんど分布しないことが明らかとなった。すなわち、大脳皮質前駆細胞の集積が SCF によって誘導されていることが示唆された。投与量を 10 ng に減らした場合は、Sox2 陽性細胞の分布の偏りは認められなかったが、程度の軽い細胞分布の偏りが注入部位付近で認められた。これらの結果から、SCF は大脳皮質前駆細胞の増殖を促進するばかりでなくケモアトラクタント効果として作用し、結果として異所性細胞塊の形成を引き起こすと考えられた。

以上、SCF の投与により大脳皮質の様々な部位で異所性の神経系細胞の集積が起こることを明らかにした (Fig.3)。大脳皮質前駆細胞の増殖を促進し、細胞挙動を変化させることで、異所性細胞塊の形成に関与する可能性を見出した。SCF による細胞塊形成機序の解明には更なる研究が必要であるが、本 SCF 誘導性マウスモデルは、難治性てんかん患者の大脳皮質細胞塊形成機序を理解する上で、有用なツールになると考えられる。

### 3. 妊娠期の免疫賦活化が仔の大脳皮質神経細胞の特性に及ぼす影響

統合失調症や自閉症では、多数の遺伝的要因と何らかの環境因子が複雑に絡み合っており、病態形成に結びつくと考えられている。感染は環境要因のひとつであり、妊娠中に感染症に罹った母体から誕生した子は精神疾患のリスクが高くなる<sup>5)</sup>。また、ウイルスに類似する構造を持つ化合物や、lipopolysaccharide (LPS) などの炎症反応を引き起こす免疫賦活化剤を妊娠動物に投与すると、出生した仔が精神疾患で見られる異常行動に類似の行動を示すことが複数のグループから報告された。一連のモデル動物を用いたこれらの研究成果から、感染症によって母体・胎児の免疫系が賦活化されると、胎児脳の発達に影響を及ぼし、子の精神活

動に長期的な異常を引き起こすという仮説が提唱されている<sup>32)</sup>。しかし、異常行動の基盤となる病態脳の形成機序についてはほとんど明らかにされていない。特に、統合失調症や自閉症患者では、大脳皮質における解剖学的、機能的異常が見出されており、認知機能障害や異常行動との相関性について繰り返し議論されている<sup>7)</sup>が、胎生期免疫賦活モデル動物の大脳皮質について発達過程を直接調べた報告はない。

哺乳類の大脳皮質は 6 層構造からなり、それぞれの層には遺伝子発現、形態、軸索投射パターンに類似した神経細胞が整然と配置されている<sup>9,10)</sup>。これらの層に固有の特徴を持つ神経細胞は、背側終脳の脳室帯に存在する共通の前駆細胞 (大脳皮質前駆細胞) から生成され、そのつど、髄膜直下まで移動して皮質板内に定着するため、早生まれの細胞ほど深層に、遅生まれの細胞ほど上層に配置される<sup>19,33)</sup>。神経細胞の定着位置や遺伝子発現プロファイルに基づき、生後の大脳皮質の発達過程で機能的な神経回路が形成される<sup>34,35,36,37)</sup>。したがって、大脳皮質神経細胞層の構築のわずかな乱れが大脳皮質の機能的失調に結びつくことが予想される。

合成二本鎖 RNA である polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid (Poly I:C) は、妊娠マウスに投与すると、ウイルス感染後の急性期の免疫賦活化に類似した状況を作り出し<sup>38,39)</sup>、仔の成熟後に精神疾患を誘発させるとされる異常行動を引き起こすことが多数報告されている<sup>40,41,42)</sup>。そこで、胎生期に Poly I:C を暴露されたマウスの大脳皮質を神経科学的に解析した。

#### 3-1. 母体への Poly I:C 投与により誘導される仔の行動異常

C57BL/6<sup>41)</sup>あるいは BALB/c<sup>40)</sup>などの近交系マウスについては、胎生期に Poly I:C を暴露されると、成熟後に行動異常を生じることが多数報告されているが、交雑系マウスを用いた研究はない。そこで、動物の遺伝的背景の違いが異常行動の発現に及ぼす影響を確かめるため、交雑系の ddY マウスを用いて同様の実験を行った。妊娠 9.5 日目のマウスに Poly I:C あるいは対照として vehicle を単回投与し、誕生した仔が成熟した後、いくつかの行動実験を行った。これ以後、胎生 9.5 日齢において、Poly I:C を暴露されたマウスを Poly I:C-E9.5 マウス (群) と表記する。行動実験の結果から、近交系のマウスを用いたこれまでの研究と一致して、成体の Poly I:C-E9.5 マウスは、統合失調症や自閉症の指標となる不安行動の増大や社会性の低下を示した。

#### 3-2. 胎生期 Poly I:C 暴露が大脳皮質上層神経細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

妊娠期における免疫賦活化が大脳皮質の神経細胞層構

築に及ぼす影響を明らかにするために、P10 の Poly I:C-E9.5 群の脳皮質各層に特異的な遺伝子の発現を免疫組織化学的に解析した。それらの発現分布から判断すると、脳皮質神経細胞層の構造には Poly I:C-E9.5 群と対照群との間に大きな差は認められなかった。また、P10 と P8W の脳皮質をニッスル染色により解析したところ、全層の神経細胞数、各層を構成する神経細胞の割合、脳皮質全体の厚さには Poly I:C 暴露の影響は認められなかった。しかし、Poly I:C-E9.5 群の第 I-IV 層において、Cux1 陽性細胞 (Cux1<sup>+</sup>)、brain-specific homeobox/POU domain protein (Brn) 1 陽性細胞 (Brn1<sup>+</sup>) および Cux1<sup>+</sup>かつ Brn1<sup>+</sup>の細胞 (Cux1<sup>+</sup>/Brn1<sup>+</sup>細胞) は、それぞれ約 25、15、25%減少していた。詳細な検討の結果、これらの陽性細胞数の減少は、第 II/III 層における Cux1<sup>+</sup>/Brn1<sup>+</sup> 細胞の選択的減少に起因すると考えられた。一方、脳皮質深層における Tbr1、Ctip2、Forkhead box p2 (FoxP2) 陽性細胞の割合は対照群と Poly I:C-E9.5 群の間でほぼ同等であった。したがって、Poly I:C-E9.5 群の脳皮質では、神経細胞の割合や密度には異常がないが、上層神経細胞としての遺伝子発現プロファイルの獲得が不完全である可能性が示唆された。

### 3-3. Poly I:C 投与によるシナプス発達の変化

胎生期 Poly I:C 暴露マウスの病態を裏付ける神経科学的な変化を捉えるため、8 週齢の Poly I:C-E9.5 マウス脳皮質の神経シナプスを免疫組織化学的に解析した。まず、プレシナプス、抑制性シナプスにそれぞれ特異的に分布するシナプトフィジン、glutamic acid decarboxylase-67 (GAD67; GABA 合成酵素) を特異的に認識する抗体を用いて免疫染色を行い、脳皮質第 II/III 層の陽性小斑数を計測した。その結果、単位面積当たりのシナプトフィジン陽性小斑数、GAD67 陽性小斑数には差がなかったが、神経細胞体を取り囲むように存在するシナプス小斑の数は対照群と比較して Poly I:C-E9.5 群ではシナプトフィジン陽性小斑がおおよそ 30%、GAD67 陽性小斑がおおよそ 40%減少していた。次に、Golgi 染色を用いて、脳皮質体性感覚野の第 III 層錐体細胞の樹状突起スパインの密度を調べた。Poly I:C-E9.5 群の第 III 層神経細胞のスパイン密度は対照群と比較しておおよそ 20% 増加していた。これらの結果から Poly I:C-E9.5 では、興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランスが変化することが、病態脳形成に関与している可能性が示唆された。以上、妊娠期の免疫賦活化が仔の脳皮質上層神経細胞の遺伝子発現やシナプス形成に影響を与えることを明らかにした。このような神経細胞の生物学的変化は、脳皮質神経回路の発達と成熟に影響を及ぼし、異常行動や精神疾患の基盤となる病態脳の形成に関与すると考えられる。

## 4. 妊娠期の免疫賦活化が仔の脳皮質神経細胞層の構築に及ぼす影響

次に、胎生期免疫賦活化モデルの脳皮質神経細胞の生成メカニズムを詳細に検討した。

### 4-1. 胎生期 Poly I:C 暴露が脳皮質の神経細胞の配置に及ぼす影響

マウスの脳皮質では、生後 1 週間までに殆どの神経細胞が移動を終え、神経細胞層の組織構築が完了する<sup>43,44)</sup>。妊娠期の母体免疫賦活化が仔の脳皮質形成に及ぼす影響を解析するため、Poly I:C-E9.5 群あるいは対処群の E13.75、E14.75、E15.75、E16.75 に誕生する神経細胞を知チミジンアナログである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の単回投与で標識し、P10 脳皮質における BrdU 陽性細胞の分布を調べた。

対照群の脳皮質では、以前の報告<sup>43)</sup>と一致して、誕生日齢が早い細胞ほど深層に、遅いもののほど上層にそれぞれ分布していた。E13.75 に誕生した BrdU 標識細胞の分布は、対照群と Poly I:C-E9.5 群の間で違いはなかった。また、E14.75 から E16.75 までの期間に誕生した BrdU 陽性細胞は、両群ともに inside-out の法則に従って分布していたが、Poly I:C-E9.5 群では同じ誕生日齢で発生した BrdU 標識細胞が対照群よりも若干深層に多く定着していた。一方、E14.75 で誕生した BrdU 標識細胞の内、上層に定着した細胞は対照群と比較してわずかではあるが Poly I:C 群で有意に減少していた。さらに、E13.75 から E15.75 までの各誕生日齢で誕生した BrdU 標識細胞の数は、2 群間でほぼ同等であったが、E16.75 に発生した BrdU 標識細胞は、対照群と比べ、Poly I:C-E9.5 群で 24.1%増加しており(対照群: 45.5 ± 3.3 cells, Poly I:C-E9.5 群: 56.7 ± 2.8 cells; p<0.05)、これらのほとんどは第 II/III 層に位置していた。以上のことを考え合わせると、Poly I:C-E9.5 群では上層神経細胞層の形成がわずかに遅れるため、それを補うように神経発生の終盤では多くの神経細胞を生成するような機構が発動している可能性が示唆された。次に、胎生期の Poly I:C 暴露によって神経細胞のサブタイプへの分化がどのような影響を受けるかを調べるために、特定の誕生日齢 (E13.75、E15.75、E16.75) に BrdU 標識した細胞について、それらの遺伝子発現を P10 の脳皮質で調べた (Fig. 4)。E13.75 生まれの BrdU 標識細胞では、Cux1 または transducin-like enhancer of split 4 (Tle4) を発現している細胞がそれぞれ全体の 20% 存在したが、2 群間での差は認められなかった。E15.75 あるいは E16.75 に生まれた BrdU 標識細胞の多くは Brn1、Brn2 もしくは Cux1 のいずれかを発現していた。E15.75 に比べて、E16.75 生まれの BrdU 標識細胞では、Brn1、Brn2 を発現する細胞の比率は増加したが、Cux1 陽性細胞の比率は逆に減少した

(Table 1)。大脳皮質では通常第IV層神経細胞に続いて第II/III層神経細胞が生成されるので、誕生した日齢に依存して決定される遺伝子発現プロファイルは、Poly I:C-E9.5群では対照群よりも若干遅れて進行していることが示唆された (Table 1)。

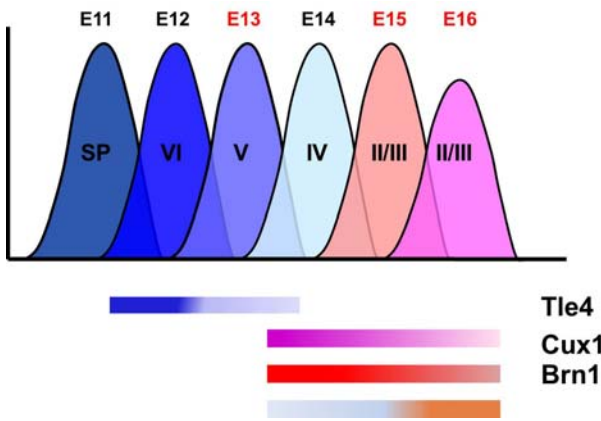


Fig. 4. Layer-specific neuronal phenotypes are sequentially generated from cortical progenitors.

Table 1. Gene expression profile of the cells with same birthday in the cerebral cortex of the P10 control and Poly I:C-E9.5

	Bm1 <sup>+</sup> /BrdU <sup>+</sup>	Bm2 <sup>+</sup> /BrdU <sup>+</sup>	Cux1 <sup>+</sup> /BrdU <sup>+</sup>	Tle4 <sup>+</sup> /BrdU <sup>+</sup>
E13.75	ND	ND	→	→
E13.75	↓	↓	→	ND
E13.75	↓	↓	↑	ND

ND: not determined, →: no change, ↑: increase, ↓: decrease

#### 4-2. 大脳皮質前駆細胞の細胞周期パラメータに及ぼす Poly I:C 暴露の影響

神経細胞の移動に対する妊娠期 Poly I:C 暴露の影響を検討するため、E13.75 あるいは E15.75 の妊娠マウス腹腔内に BrdU を単回投与し、E13.75 ではその 24 時間後から 48 時間まで、E15.75 ではその 24 時間後から 96 時間の間の BrdU 標識細胞の分布の変化を検討した。Poly I:C-E9.5 群の大脳皮質では、E15.75 に BrdU 標識された細胞の VZ から CP への 48 時間後の移動が対照群のそれと比較してわずかに遅れていた。しかし、BrdU 投与 60 時間後と 96 時間後の間では、2 群間の差が認められなかった。したがって、妊娠期 Poly I:C 暴露による VZ から CP へと向かう神経細胞の移動は、中期過程における数時間程度の遅れであり、しかも効果は一過性であることが示唆された。また、E13.75 に BrdU 標識された細胞の挙動には、2 群間で差がなかった。このように妊娠期 Poly I:C 暴露による神経細胞移動の遅延は一過性であり、影響はそれほど大きく

ないと考えられるため、Poly I:C-E9.5 マウス大脳皮質において上層神経細胞層の形成が遅れる理由は別にあるのではないかと考えられた。たとえば、VZ での大脳皮質前駆細胞の細胞周期の所要時間は、誕生する神経細胞の数と分布とに密接に関連することが明らかにされており<sup>45,46</sup>、大脳皮質前駆細胞の増殖の動態が Poly I:C-E9.5 群で変化している可能性がある。そこで、BrdU 蓄積ラベル法<sup>47</sup>を用いて E13.75 と E15.75 に誕生した大脳皮質前駆細胞の細胞周期の長さとして VZ における増殖細胞比率すなわち GF を算出した (Fig.5)。

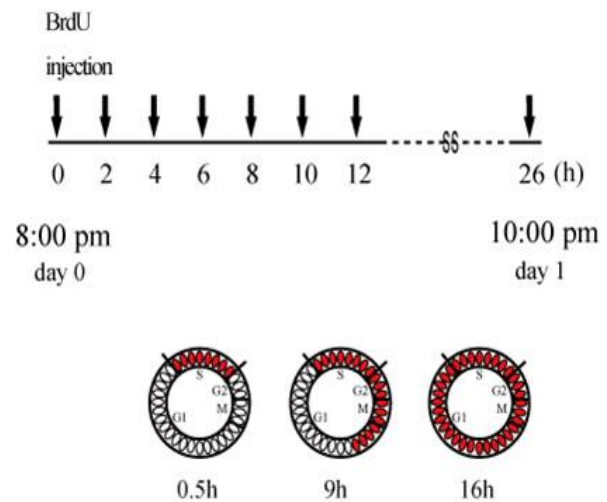


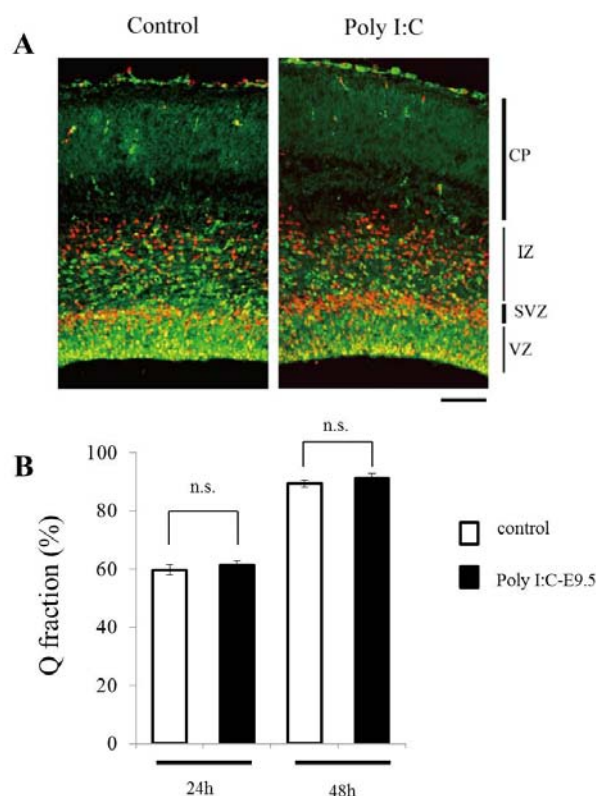
Fig. 5. Schematic illustration of the analysis of the cell-cycle parameters of VZ progenitors in the control and the Poly I:C-E9.5 animals by cumulative BrdU labeling, starting at 8:00 P.M. on E13 or E15.

VZ 内の総細胞数は発達とともに減少したが、測定期間内すなわち BrdU 投与後 2.5 時間から 26.5 時間における VZ 内の平均総細胞数は、発生ステージや Poly I:C 暴露の有無にかかわらず一定であった。E13.75 では、検討したすべての細胞周期パラメータについて、対照群と Poly I:C-E9.5 群との間で違いがなかった。一方、E15.75 では、Poly I:C-E9.5 群において細胞周期全体の所要時間である Tc が 2 時間短縮し、GF が 14 % 減少していた。さらに、BrdU を投与してから 30 分後に脳を摘出し、VZ 内の細胞の BrdU 取り込み能 (単位体積当たりの BrdU 陽性細胞数) を計数したところ、E15.5 では両群で差がないのに対し、E16.75 では Poly I:C-E9.5 群の BrdU 取り込み能は対照群の 77.3% に減少していた (E16.75 : 対照群  $48.3 \pm 2.7$ , Poly I:C-E9.5  $37.3 \pm 3.5$ ,  $p < 0.05$ ; E15.75 : 対照群  $59.1 \pm 2.3$ , Poly I:C-E9.5  $65.6 \pm 3.7$ ,  $p = 0.21$ , Student's *t*-test,  $n = 4$ )。これらの結果から、Poly I:C-E9.5 群の大脳皮質では、大脳皮質形成後期に徐々に増殖細胞の比率が減少していることが明らかとなった。

### 4-3. 大脳皮質神経細胞の生成プロセスに及ぼす Poly I:C の影響

本研究では、大脳皮質の神経幹細胞や中間神経前駆細胞を含めて VZ/SVZ に存在する細胞を大脳皮質前駆細胞と定義している。大脳皮質形成過程において神経細胞が新生される際には、大脳皮質の神経幹細胞は非対称性分裂をし、VZ で2つの異なる娘細胞を生み出す。1つは、神経幹細胞であり神経系を構成するすべての細胞（神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト）を生成する能力を持つ、もう1つは中間神経前駆細胞あるいは神経細胞である。正常の大脳皮質形成過程において、それぞれの娘細胞の生成比率、タイミング、場所は厳密に制御されている。中間神経前駆細胞は、脳室表面から離れ、SVZ から IZ を通って皮質板へと移動するが、SVZ から IZ で1~3回細胞分裂して神経細胞のみを生成する<sup>48,49</sup>。これらの3種すなわち神経幹細胞、中間神経前駆細胞に及ぼす影響を解析するため、E13.75 または E15.75 に BrdU を投与後、いくつかの時間点で胎仔脳を摘出し、免疫染色法により paired box gene 6 (Pax6)、Tbr2、Tuj1 の発現を調べることで、BrdU 標識細胞の発達を経時的に解析した。E13.75 における BrdU 標識細胞の発達依存的な遺伝子発現変化は、Poly I:C-E9.5 群と対照群で同等であった。一方、E15.75 における BrdU 標識細胞のその後の発達に伴う遺伝子発現変化については、Poly I:C-E9.5 群の Pax6 発現の低下が対照群のそれよりも早く進行した。すなわち、Pax6 陽性 BrdU 標識細胞の割合は、対照群と比較して BrdU 投与 24 時間後では 12%、36 時間後では 4.3% 少なかった。一方、BrdU 投与 48 時間後における Pax6 発現 BrdU 陽性細胞の割合は、対照群と同等であり、2 群間の差はなかった。Pax6 の発達に伴う発現低下は早期に進行していたが、BrdU 投与後の Tbr2 あるいは Tuj1 の発現変化には 2 群間の差がみられなかった。すなわち、BrdU 投与 24 時間後から 48 時間後の間に、Tbr2 陽性 BrdU 標識細胞の割合はおおよそ 65% 減少し、Tuj1 陽性 BrdU 標識細胞は 70% 増加しており、これらの変化は両群間で差がなかった。したがって、Pax6 遺伝子の初期の発現低下は、神経細胞の生成比率やタイミングの変化とは結びついていない可能性が示唆された。この仮説を検証するため、E15.75 で BrdU を投与し、24 時間後、48 時間後に BrdU 標識細胞のうち、Ki67 を発現していない細胞の比率を調べた。Ki67 は、細胞周期の G1 後期、S、M 又は G2 期を経過中の増殖細胞の核内に特異的に発現するタンパク質である<sup>50</sup>。したがって、Ki67 を発現していない細胞の比率は、細胞周期を離脱した細胞の比率 [quitting (Q) fraction] ということになる。Q fraction は、対照群と Poly I:C-E9.5 群のいずれも、BrdU 投与後 24 時間から 48 時間までの間におよそ 30% 増加し、増加率は違いが

なかった (Fig. 6)。以上の結果から、Poly I:C-E9.5 群の大脳皮質においては、E15.75 の神経幹細胞から誕生する神経細胞の数とそのタイミングは、対照群と違いがないと考えられた。一方、Poly I:C-E9.5 群の VZ における増殖細胞の BrdU 取り込み能は、E15.75 から E16.75 にかけて減少するが、E16.75 で BrdU を取り込んだ細胞から生成する神経細胞が増加していることを考え併せると、E15.75 生の大脳皮質前駆細胞における Pax6 遺伝子の早期発現低下が、娘前駆細胞 (E16.75 生) の性質に影響し、次の神経細胞の生成プロセスを修飾していると考えられる。



**Fig. 6. Effects of the Poly I:C-injection on the cell cycle kinetics of cortical progenitors.**

**A**, Tissue sections were double immunostained with anti-BrdU antibody (red) and the antibodies against Ki67 (green). Scale bar, 100µm. **B**, At 24 or 48 h after the BrdU injection on E15.75, sections were double immunostained with antibodies against Ki67 and BrdU. Note that the fraction of cells positive for BrdU only (BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup>; no longer dividing; Q fraction) was essentially the same in both control and Poly I:C-E9.5 cortices at 24 and 48 h after the BrdU incorporation (n=3-5 embryos from 2 litters at each time point). n.s.; no significance.

これらのことから、上層神経細胞の生成や機能的成熟過程における僅かな異常が、統合失調症や自閉症といった複雑な精神疾患の発症の要因になり得ることが示唆される。

## 5. 総括

精神疾患を含むどのような疾患の発症原因も突き詰め



て考えれば、遺伝的要因と環境的要因の2つに大別することができる。すなわち、多くの疾患では、遺伝的素因に基づく脆弱性を環境因子が打ち崩して発症に至る。当然ながら疾患によって2つの要因の寄与は異なるが、環境因子により誘導され、発症に結びつく変化を抑制できれば、予防あるいは治療につながるだろう。したがって、環境的な要因の寄与を解明することは治療への糸口をつかむことになる。本研究では、免疫系にかかわる環境因子が胎仔の大脳皮質神経細胞層の構築過程をわずかに修飾することによって、大脳皮質の機能失調にかかわる初期病変を作ること明らかにした。このような神経発生時における小さな変化が蓄積すること、あるいは遺伝的な素因と相互作用することによって変化がさらに増幅されて、病態脳の形成にかかわるのではないかと考えられる。本研究で得られた結果は、近年患者数が増加傾向にある自閉症などの発達障害や統合失調症の治療戦略を考える上で非常に重要な知見となると考えられる。

## 6. 謝辞

本研究の遂行に対し種々のご協力を賜りました分子生物学研究室諸氏に深甚なる謝意を表します。

## 7. 引用文献

- 1) 杉山登志郎 (2007) 「発達障害の子どもたち」講談社現代新書
- 2) Rosenberg R.E., Law J.K., Yenokyan G., McGready J., Kaufmann W.E., Law P.A., *Arch Pediatr Adolesc Med.* **163**, 907-914 (2009)
- 3) Geier D.A., Kern D.A., Geier M.R., *Acta Neurobiol Exp* **70**, 209-226 (2009)
- 4) Williams G., King J., Cunningham M., Stephan M., Kerr B., Hersh J.H., *Dev Med Child Neurol.* **43**, 202-206 (2001)
- 5) Brown A.S., *Schizophr. Bull.* **32**, 200-202. (2006)
- 6) Ellman L.M., and Susser E.S., *Neuron* **64**, 25-27 (2009)
- 7) Amaral D.G., Schuman C.M., Nordahl C.W., *Trends Neurosci* **31**, 137-145 (2008)
- 8) Freitag C.M., Luders E., Hulst H.E., Narr K.L., Thompson P.M., Toga A.W., Krick C., Konrad C., *Biol Psychiatry* **66**, 316-319. (2009)
- 9) Gilbert C.D., Kelly J.P., *J Comp Neurol* **163**, 81-105 (1975)
- 10) Gilbert C.D., Wiesel T.N., *Vision Res* **25**, 365-374 (1985)
- 11) Guerrini R., Dobyns W.B., Barkovich A.J. *Trends Neurosci* **31**, 154-162 (2008)
- 12) Fukumitsu H., Ohtsuka M., Murai R., Nakamura H., Itoh K., Furukawa S. *J Neurosci* **26**, 13218-13230 (2006)
- 13) Ohtsuka M., Fukumitsu H., Furukawa S. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 1144-1149 (2008)
- 14) Ohtsuka M., Fukumitsu H., Furukawa S. *J Neurosci Res* **87**, 301-330 (2009)
- 15) Pardo C.A., Vargas D.L., Zimmerman A.W. *Int. Rev. Psychiatry* **17**, 485-495 (2005)
- 16) Patterson P.H. *Behav Brain Res.* **204**, 313-321 (2009)
- 17) Taga T., Fukuda S. *Clin Rev Allergy Immunol.* **28**, 249-256. (2005)
- 18) Lopez-Bendito G., Cautinat A., Sanchez J.A., Bielle F., Flames N., Garratt A.N., Talmage D.A., Role L.W., Charnay P., Marin O., Garel S. *Cell* **125**, 127-142 (2006)
- 19) Angevine J.B. Jr., Sidman R.L. *Nature* **192**, 766-768 (1961)
- 20) Clark G.D. *Brain Dev* **26**, 351-362 (2004)
- 21) Guerrini R. *Epilepsia* **46**, 32-37 (2005)
- 22) Browne T.R., Holmes G.L. *N Engl J Med* **344**, 1145-1151 (2001)
- 23) Miller F.D., Gauthier A.S. *Neuron* **54**, 357-369 (2007)
- 24) Ashman L.K. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1037-1051 (1999).
- 25) Keshet E., Lyman S.D., Williams D.E., Anderson D.M., Jenkins N.A., Copeland N.G., Parada L.F. *EMBO J* **10**, 2425-2435 (1991)
- 26) Motro B., van der Kooy D., Rossant J., Reith A., Bernstein A. **113**, 1207-1221 (1991)
- 27) Ueda S., Mizuki M., Ikeda H., Tsujimura T., Matsumura I., Nakano K., Daino H., Honda Zi. Z., Sonoyama J., Shibayama H., Sugahara H., Machii T., Kanakura Y. *Blood* **99**, 3342-3349 (2002)
- 28) Witte O.N. *Cell* **63**, 5-6 (1990)
- 29) Krause D.S., Van Etten R.A. *N Engl J Med* **353**, 172-187 (2005)
- 30) Erlandsson A., Larsson J., Forsberg-Nilsson K. *Exp Cell Res* **301**, 201-210 (2004)
- 31) Ogawa M., Matsuzaki Y., Nishikawa S., Hayashi S., Kunisada T., Sudo T., Kina T., Nakauchi H., Nishikawa S. *J Exp Med* **174**, 63-71 (1991)
- 32) Meyer U., Feldon J., Fatemi S.H. *Neurosci Biobehav Rev* **33**, 1061-1079 (2009)
- 33) Rakic P. *Science* **183**, 425-427 (1974)
- 34) Molyneaux B.J., Arlotta P., Hirata T., Hibi M., Macklis J.D. *Neuron* **47**, 817-831 (2005)
- 35) Alcamo E.A., Chirivella L., Dautzenberg M., Dobrev G., Farinas I., Grosschedl R., McConnell S.K. *Neuron* **57**, 364-377 (2008)
- 36) Britanova O., de Juan Romero C., Cheung A., Kwan K.Y., Schwark M., Gyorgy A., Vogel T., Akopov S., Mitkovski M., Agoston D., Sestan N., Molnar Z., Tarabykin V. *Neuron* **57**, 378-392 (2008)
- 37) Cubelos B., Sebastian-Serrano A., Beccari L., Calcagnotto M.E., Cisneros E., Kim S., Dopazo A., Alvarez-Dolado M., Redondo J.M., Bovolenta P., Walsh C.A., Nieto M. *Neuron* **66**, 523-535 (2010)
- 38) Fortier M.E., Kent S., Ashdown H., Poole S., Boksa P., Luheshi G.N. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, 759-766 (2004)
- 39) Meyer U., Nyffeler M., Engler A., Urwyler A., Schedlowski M., Knuesel I., Yee B.K., Feldon J. *J Neurosci* **26**, 4752-4762 (2006)

- 40) Shi L., Fatemi S.H., Sidwell R.W., Patterson P.H. *J Neurosci* **23**, 297-302 (2003)
- 41) Smith S.E., Li J., Garbett K., Mirnics K., Patterson P.H. *J Neurosci* **27**, 10695-10702. (2007)
- 42) Zuckerman L., Rehavi M., Nachman R., Weiner *Neuropsychopharmacology* **28**, 1778-1789 (2003)
- 43) Caviness V.S. Jr. *Brain Res* **256**, 293-302 (1982)
- 44) Hevner R.F., Daza R.A., Englund C., Kohtz J., Fink A. *Neuroscience* **124**, 605-618 (2004)
- 45) Caviness V.S. Jr., Takahashi T., Nowakowski R.S. *Trends Neurosci* **18**, 379-383 (1995)
- 46) Tarui T., Takahashi T., Nowakowski R.S., Hayes N.L., Bhide P.G., Caviness V.S. *Cereb Cortex* **15**, 1343-1355 (2005)
- 47) Takahashi T., Nowakowski R.S., Caviness V.S., Jr. *J Neurosci* **15**, 6058-6068 (1995)
- 48) Englund C., Fink A., Lau C., Pham D., Daza R.A., Bulfone A., Kowalczyk T., Hevner R.F. *J Neurosci* **25**, 247-251 (2005)
- 49) Pontius A., Kowalczyk T., Englund C., Hevner R.F. *Dev Neurosci* **30**, 24-32 (2008)
- 50) Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. *Int J Cancer* **31**, 13-20 (1983)

## 8. 特記事項

本総説は、岐阜薬科大学博士論文（甲 127 号）の内容を中心にまとめたものである。