

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 干 野 晃 嗣

## 学 位 論 文 題 名

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)

### 【背景と目的】

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-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の関連が強く示唆されている。しかし、脳内 IL-1 $\beta$  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-1 $\beta$  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-1 $\beta$  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-1 $\beta$ がマウス海馬シナプス可塑性におよぼす影響

#### 【方法と結果】

4-6 週齢の C57BL/6J マウスを使用し、厚さ 300 $\mu$ m 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) を導出し、安定した後にマウス由来組み換え IL-1 $\beta$  (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-1 $\beta$  投与により有意に LTP が抑制されたが (CA1:  $138.4 \pm 6.2\%$  vs.  $119.1 \pm 3.8\%$ ,  $P < 0.05$ , CA3:  $160.9 \pm 7.4\%$  vs.  $134.3 \pm 9.1\%$ ,  $P < 0.05$ )、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 ( $155.0 \pm 15.6\%$  vs.  $161.2 \pm 19.8\%$ ,  $P > 0.05$ )。

#### 【考察】

本実験で、IL-1 $\beta$  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-1 $\beta$  (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 も抑制するとして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-1 $\beta$  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-1 $\beta$  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る効果

#### 【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ミノサイクリン (MINO) の海馬 LTP への作用を検討するために、マウスを盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: 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 ( $196.7 \pm 10.8\%$  vs.  $149.1 \pm 2.6\%$ ,  $P < 0.05$ )、sham 群と同程度にまで回復した。続いて、IL-1 $\beta$  が CLP マウスのシナプス可塑性に与える影響と、MINO と IL-1 $\beta$  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 ( $206.7 \pm 12.4\%$  vs.  $157.8 \pm 8.2\%$ ,  $P < 0.05$ )、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。MINO は抗菌効果のみならず、小膠細胞の活性化を抑制することで海馬の IL-1 $\beta$  を低下させる抗炎症効果を持つとされる。これまで敗血症モデル動物に対する MINO 投与が病的行動を改善することは報告されてきたが、今回の実験でシナプス可塑性の改善効果も併せ持つことが確認された。

#### 【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。