

177. インフラマソームを中心とした脳内炎症の制御機構解明

山西 恭輔

兵庫医科大学 医学部 精神科神経科学講座

Key words : インフラマソーム, インターロイキン 18, 脳内炎症, ストレス, うつ病

緒言

人間にとってストレス状態は基本的に普遍的なものであり、しばしば深刻な問題を引き起こし、最終的には休職や退職につながることもある。実際、日常生活においてストレスのかかる状況は数多く存在する。また、極度のストレスは、適応障害や大うつ病性障害などの身体的だけでなく、精神疾患を引き起こす可能性があり、そのような患者さんは社会との関わりが失われることもある。したがって、日常生活においてストレスマネジメントは非常に重要である。

免疫系は、ストレスにより引き起こされる精神疾患、特に大うつ病性障害 (MDD) の発症に深く関与していると言われている。視床下部-下垂体-副腎 (HPA) Axis は、グルココルチコイドなどの様々なホルモンを介して免疫バランスを監視し調節している。しかし、ストレスは HPA Axis の過活動を誘発し、継続的なストレスは副腎皮質ホルモンへの抵抗性を増やし、過剰な炎症反応を引き起こすことで MDD 発症の重要な因子と指摘されている。以前のメタ解析では、MDD 患者において tumor necrosis factor-alpha (TNF α)、インターロイキン (IL) 6、IL18 の増加が見られた。さらに、MDD の動物モデルにおいて、海馬では、TNF α 、IL18 のレベルが対照群と比べ増加していた。したがって、これらの直接的な相互作用については明らかにされていないものの、ストレスおよびストレスによって引き起こされる精神症状は、免疫系と密接に関係している可能性がある。

IL18 は、1995 年にインターフェロン- γ を誘導する機能を持つ炎症性サイトカインとして発見された。IL18 は、18 kDa の活性型と 24 kDa の非活性型・前駆体の 2 つの型が存在する。前駆体の IL18 は、Caspase-1 によって代謝され、活性型に変換され、IL1 β とともにインフラマソームに重要な役割を担っている。我々は先行研究で、IL18 がエネルギー代謝やうつ病などの精神疾患と関連していることを発見した。神経機能に関しては、IL18 は脳の神経細胞に前駆体として存在し、その欠損により海馬の機能障害やうつ病様の表現型が生じることを報告している。このように、IL18 は免疫系だけでなく、神経機能やうつ病などの精神疾患表現型と密接に関係している。しかし、これまでは IL18 欠損下での海馬の機能評価のみであり、治療法については検討されていない。そこで本研究は IL18 を含むインフラマソームの脳内炎症への影響、及びストレスに対する反応性、制御機能を明らかにすることを目的とする。

なお、本研究成果の一部は原著論文として公開済みである。[1]

方法

1. 使用動物

野生型、及び IL18 欠損マウス (12 週齢) の雄を使用する。処置までは水と餌は自由に摂取可能とし、飼育環境は 22°C \pm 1 度、湿度 50~60% の環境で 12 時間ごとのサイクルとした (光は午前 8 時にオンとなる)。以下を含めた動物実験計画は、兵庫医科大学動物実験委員会の承認を得ている (承認番号:#28041、#19-030、#20-040)。

2. 急性ストレス処置

マウスは、急性ストレス処置として、午前 10 時より 6 時間の拘束処置を行った。ストレス処置後は速やかにホームケージに戻し、18 時間後より行動実験を開始した。

3. リポポリサッカライド (LPS) 投与

LPS は大腸菌 0127:B8 由来を使用した。LPS は 2.5 mg/kg 腹腔内投与し、投与後 24 時間、14 日間後の行動変化を観察した。

4. 行動試験

行動実験としてオープンフィールド試験、強制水泳試験、尾懸垂試験を行った。オープンフィールド試験は、一辺 45 cm の立方体の透明なオープンフィールドボックスにマウスを入れ、10 分間マウスの行動を録画した。その後、ビデオトラッキングシステムを使用し、距離を観察した。尾懸垂試験はマウスを地上より 30 cm 離れた地点にマウスをつるし、5 分間録画した。その後、無動時間を 1 分ごとに計測した。強制水泳試験は直径 18 cm のシリンダーに、深さ 25 cm まで 24~26°C の水を入れ、その中にマウスを入れる。その後、6 分間マウスを録画し、無動時間、水泳距離を、ビデオトラッキングシステムを使用し、計測した。

5. RT-qPCR

RNA 精製は ISOGEN キット 311-02501 (Wako) を使用し、プロトコールに沿って抽出を行った。RT-qPCR は SYBR Green Real-Time PCR Master Mix: One-step qPCR kit (Toyobo Co., Ltd.) を使用し、プロトコールに沿って行った。RT-qPCR は、QuantiStudio™ 12 K Flex system (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用した。

6. ウェスタンブロット法/蛍光免疫染色法

既に公開された論文と同様の方法を用いて行った [1]。

7. ELISA 法

マウス血清中の IL18、コルチコステロンを、ELISA キットを用いて測定した。使用したキットはそれぞれ、ADI-900-097 (Enzo Life Sciences Inc.)、7625 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) より購入し、それぞれプロトコールに従って計測を行った。

8. 検定法

全てのデータは平均値±SEM で表記している。検定は Sigmaplot Ver 1.1 (Systat Software Inc.) を使用した。行動実験は a repeated measures ANOVA にて検定し、その他は ANOVA で検定後、Holm-Sidak もしくは Tukey method で検定を行った。

結 果

1. 急性ストレス処置で IL18 欠損マウスでは活動量の亢進が見られた。

野生型マウスは拘束処置にて体重減少が見られたが、IL18 欠損マウスでは観察されなかった (図 1A)。オープンフィールド試験では、野生型マウスでは拘束処置で変化が見られなかったが、IL18 欠損マウスではストレス処置において活動量の低下が観察された。ただし、IL18 欠損マウスは無処置で活動量の亢進が見られた (図 1B)。一方で強制水泳試験、尾懸垂試験では野生型マウスではストレス処置で変化が観察されなかったのに対し、IL18 欠損マウスでは活動量の亢進が見られた (図 1C、D)。

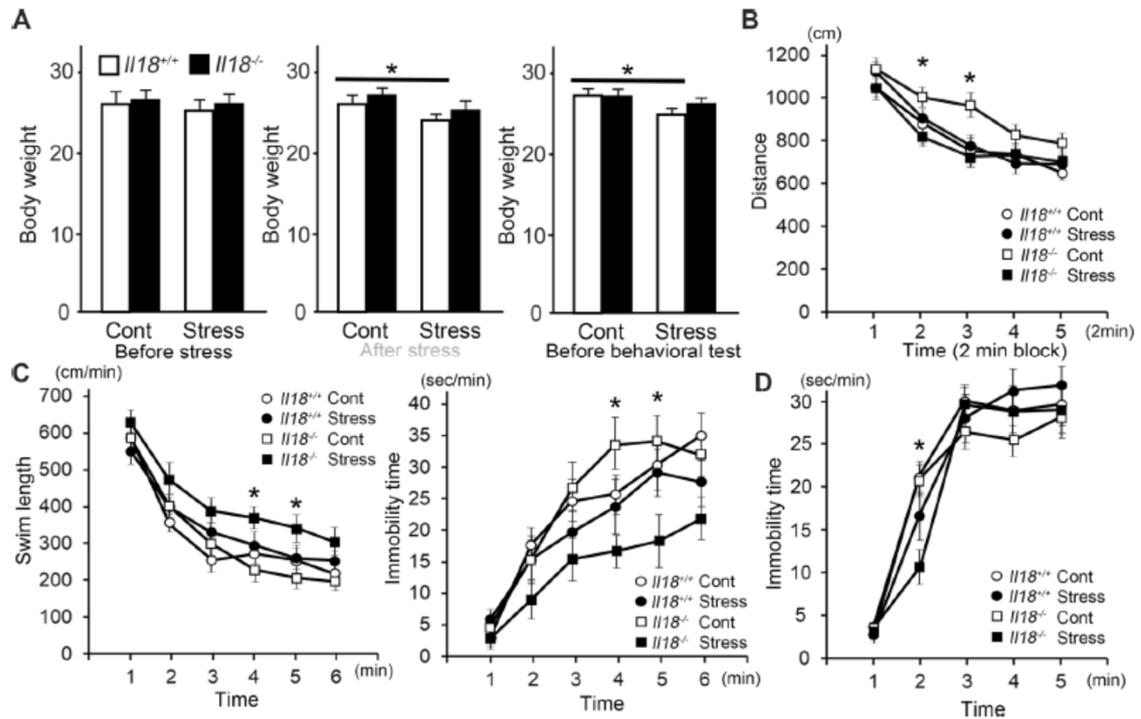


図 1. IL18 欠損マウスは急性ストレス処置で不安様行動が増加する

- A) ストレス前後、行動実験前のマウスの体重。
- B) オープンフィールド試験。
- C) 強制水泳試験。
- D) 尾懸垂試験

N=12, *p<0.05。

2. 海馬において、急性ストレス処置にて IL18 欠損マウスでは脳内炎症の長期化が確認された。

野生型マウスは急性ストレス処置後 18 時間経過後、脳内炎症は観察されなかった。しかしながら、IL18 欠損マウスではストレス処置後 18 時間経過後も脳内炎症が残存していた。海馬において、拘束処置を行った IL18 欠損マウスでは、IL1 β 、IL6、Tnf α の発現上昇が見られた (図 2A)。さらに脳内のマイクログリアにおいても IL18 欠損マウスでは拘束処置にて活性が観察された (図 2C)。IL18 については野生型において軽度の上昇傾向が観察された (図 2A、2B)。

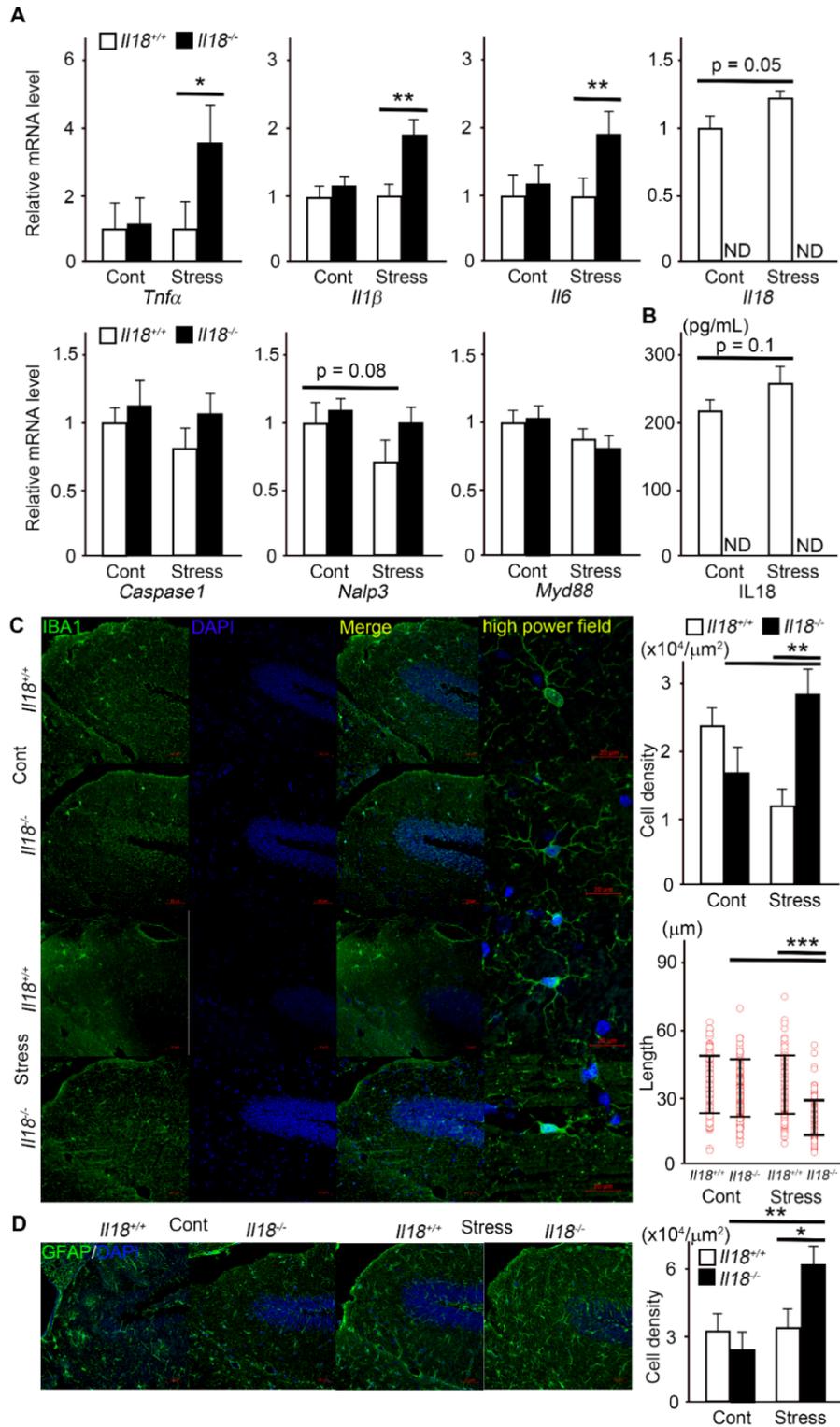


図 2. 中枢神経において、IL18 欠損マウスは脳内炎症が長期残存する

- A) インフラマソームに関連する遺伝子の RT-qPCR 結果。
 B) 血中の IL18。
 C) 蛍光免疫染色での脳内ミクログリア (Scale bar : 左 3 つは $50 \mu\text{m}$ 、右拡大図は $20 \mu\text{m}$)。
 D) 脳内のアストロサイト (Scale bar : $50 \mu\text{m}$)。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

3. 急性ストレス処置におけるグルココルチコイド経路と神経再生の評価

急性ストレス処置にて血中コルチコステロンの上昇は野生型、IL18 欠損マウスでも見られたが、IL18 欠損マウスではさらなる上昇を認めた (図 3A)。グルココルチコイド受容体のリン酸化に関しては、IL18 欠損マウスではストレス処置にて有意に上昇を認めた (図 3B)。さらに神経再生では元々IL18 欠損マウスは野生型マウスと比べ、減少しているが、急性ストレス処理にさらに Ki67 陽性細胞数の減少を認めた (図 3C)。

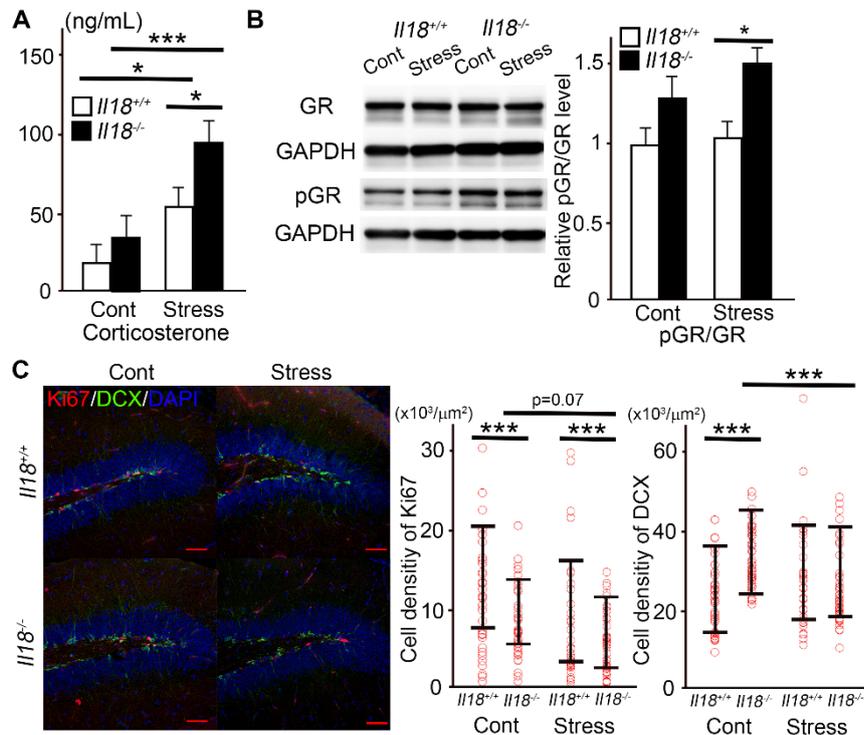


図 3. 急性ストレス処置におけるグルココルチコイドシグナルと神経再生の評価

- A) 血中のグルココルチコイド濃度。
 - B) 海馬におけるグルココルチコイド受容体。
 - C) 神経再生の評価 (Scale bar : 50 μ m)。
- *p<0.05、***p<0.001。

考 察

免疫因子である IL18 が欠損していると急性ストレスにより惹起される脳内炎症が持続し、ストレス反応性の行動異常につながる可能性が示唆された。IL18 が欠損することでストレスにより IL1β などインフラマソームを構成する因子がさらに上昇し、結果として脳内炎症をより持続させる結果となった。本研究からは IL18 がインフラマソームを調整しうる重要な因子であり、結果として脳内炎症の調整につながる可能性が示唆された。ストレスにより惹起される脳内炎症の抑制には IL18 が必要であることやインフラマソームの調整や抑制を含めたさらなる機序解明や治療応用の可能性の模索が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、兵庫医科大学リハビリテーション学部の土江伸誉講師、兵庫医科大学医学部精神科神経科学の岡村宣孝研究生、精神神経免疫学の秦正樹博士研究員、蒲池直美実験補助である。また、本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Yamanishi K, Doe N, Mukai K, Hashimoto T, Gamachi N, Hata M, Watanabe Y, Yamanishi C, Yagi H, Okamura H, Matsunaga H. Acute stress induces severe neural inflammation and overactivation of glucocorticoid signaling in interleukin-18-deficient mice, *Transl Psychiatry*. 2022 Sep 23;12 (1) :404. PMID: 36151082 doi: 10.1038/s41398-022-02175-7.