

「精神免疫に着目した精神疾患と免疫ネットワーク機構の解明」

兵庫医科大学 医学部 精神科神経科学 山西 恭輔

1 研究の背景と目的

近年、精神疾患の患者数は増加傾向にあり、中でも気分障害患者数は2019年には100万人以上に増加していると言われている(2019年患者調査、厚生労働省発表)。精神疾患の発症機序については、モノアミン仮説など様々な仮説が提唱されているが具体的には明らかになっていない。

免疫と精神疾患の関わりについては、以前より指摘されている。例えば、うつ病患者では血中のIL6やTnf $\alpha$ の上昇がメタ解析からも明らかとなっている。しかし、免疫と精神疾患の直接的な関わり、その機序については依然として明らかとなっていない。

IL18は、1995年にインターフェロン- $\gamma$ 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、18kDaの活性型と24kDa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によって切断され、活性型に変換され、IL1 $\beta$ とともにインフラマソームの構成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。具体的には炎症性サイトカインであるインターロイキン18(IL18)の欠損下では海馬機能不全となり、うつ病様行動変化、認知機能障害を呈する事を発見した(Yamanishi K et al. 2019)。これからインフラマソームを構成するIL18が精神症状の発症に重要な役割を担っており、免疫と精神症状、精神疾患を関連していることが明らかとなった。また前頭前野において中枢神経細胞にIL18が発現していることが明らかになっており、免疫担当細胞以外でのIL18が何らかの役割を担っていることを示唆している(Yamanishi K et al. 2021)。しかしながら、IL18を含めたインフラマソームと脳内のミクログリアなどの免疫担当細胞、中枢神経細胞との直接的な関係性については明らかになっていない。そこで本研究は、炎症の初期に反応するインフラマソームを中心に、末梢炎症から脳内炎症へ波及し、中枢神経細胞を介して精神疾患を発症する機序の解明を目的とした。

2 研究方法・研究内容

1. 使用動物

野生型、及びIL18KO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 $^{\circ}$ 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, #22-027AG、23-019AG)。

2. 使用細胞株

マウスの血管内皮細胞株として、b.end3 cellを使用した(CRL-2299, ATCC社)。b.end3細胞株にLPS(大腸菌0127:B8由来(Sigma))を投与し、24時間後に細胞を回収した。

3. リポポリサッカライド(LPS)投与(マウス)

LPSは大腸菌0127:B8由来(Sigma)を使用した。LPSは2.5mg/Kg腹腔内投与し、投与後24時間、14日間後、28日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. CCK-8 Assay

血管内皮細胞の LPS による生存率を計測するため、CCK-8 Assay を用いて評価した。CCK-8 Assay Kit は販売元のプロトコールに沿って使用した(CK04-05, DOJINDO Laboratories, Kumamoto, Japan)。96 well plate に  $5.0 \times 10^3$  の細胞株に巻き、LPS を 10, 100, 1000, 10000 ng/ml の濃度で投与し、24 時間後に解析を行った。IL18 については 1, 10, 100 ng/ml の濃度で投与し、24 時間後に解析を行った。

#### 6. ウェスタンブロット法

既に公開された論文と同様の方法を用いて行った(Yamanishi K et al. 2022)。簡単に述べると、サンプルを Laemmli サンプルバッファー中で 95°C、5 分間インキュベートし、10%-20%ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ポリフッ化ビニリデン膜 (Hybond-P, Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) に転写した。一次抗体は以下の通り : Occludin(#91131, CST)、ZO-1(21773-1-AP, ProteinTech)。ローディングコントロールとして b-actin (cat.#4970, CST) を使用した。すべての membrane を 0.1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水中の 5% スキムミルクでブロックし、一次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。その後、membrane を HRP 標識二次抗体 (#NA9340V および #RPN1025; GE Healthcare, Amersham, UK) とインキュベートした。抗体反応は LAS-4010 フォトイメージアナライザー (富士写真フイルム株式会社、東京、日本) で可視化した。特定のタンパク質バンドの密度は ImageJ ソフトウェア (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>、バージョン 1.6) を用いて解析し、結果はローディングコントロールレベルに対して normalize した。

#### 7. 検定法

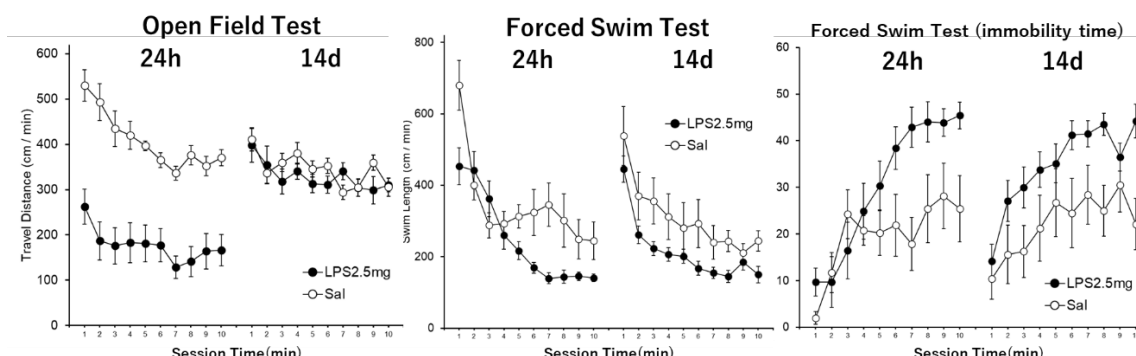
全てのデータは平均値±SEM で表記している。検定は Sigmaplot(Ver 1.1, Systat Software Inc., USA)を使用した。結果は 2 群比較は Student-t 検定もしくは、mann-whitney U 検定、多群比較は ANOVA にて検定し、その他は ANOVA で検定後、Holm-Sidak もしくは Tukey method で検定を行った。

### 3 研究成果

#### 1. LPS 誘導に伴う抑うつ様行動変化は 2 週間継続する。

野生型マウスに LPS を単回投与し、24 時間後、14 日後に行ったオープンフィールド試験、強制水泳試験の結果を図 1 に示す。24 時間後は、野生型マウスにおいて、オープンフィールド試験結果から自発行動量の低下が認められ、いわゆる Sickness behavior が観察された。14 日後にはオープンフィールド試験の結果からは自発行動量は生理食塩水投与群と差がなくなった。一方で、強制水泳試験の結果からは、野生型

マウスにおいて、24 時間後だけでなく 14 日後においても水泳距離の減少、無動時間の延長が認められ、単回の LPS 投与で抑うつ様行動変化が 14 日間継続する事が明らかとなった。

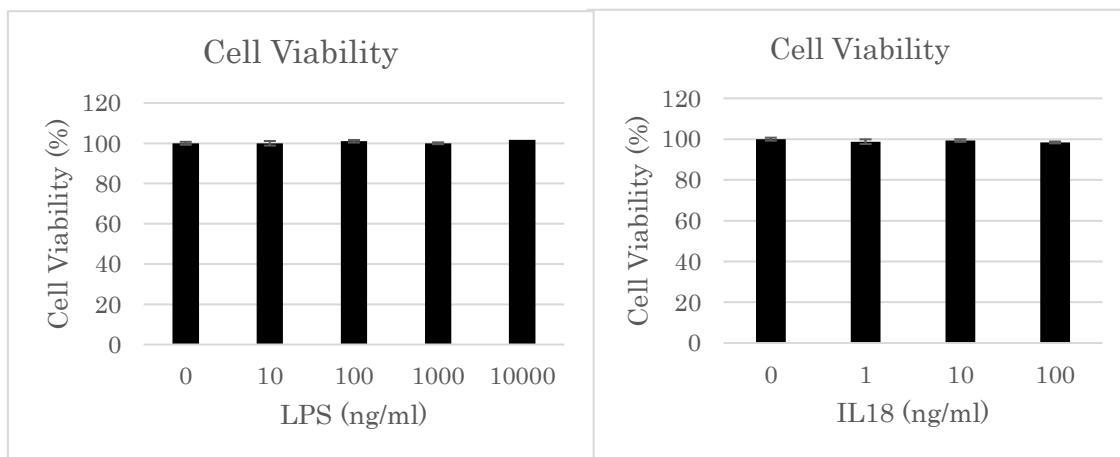


【図 1】 LPS 投与後の行動試験結果

2. 血管内皮細胞株において、LPS 刺激による変化に IL18 の影響はない。

血管内皮細胞株に様々な濃度の LPS と IL18 を投与し、血管内皮細胞の生存率を比較した。その結果を図 2 に示す。LPS 投与により血管内皮細胞の生存率に影響はなく、マウスの生体においても、LPS 刺激で一時的な変化はある可能性はあるが、血管内皮細胞死が誘導される可能性は低い事が示唆された。そのため、LPS による 14 日後の行動変化については血管内皮細胞の一過性の機能低下の可能性もあるが、単回の脳内への刺激が精神症状の継続的な残存に影響する事が明らかになった。

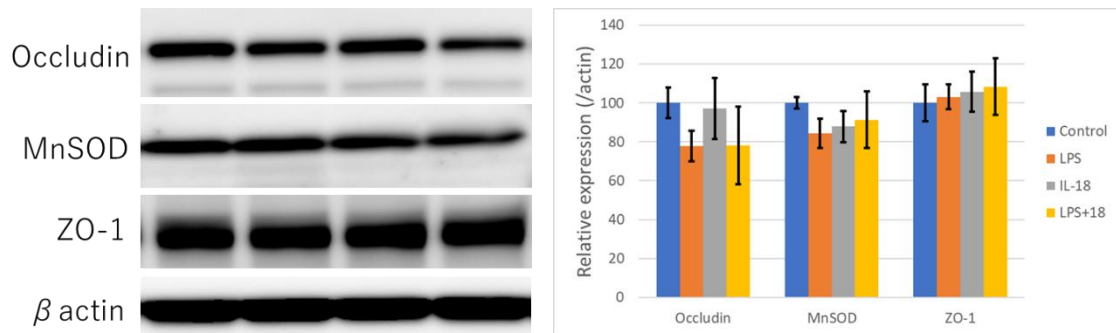
また血管内皮細胞を構成するタンパクを比較した結果を図 3 に示す。その結果、LPS 刺激でほとんど差が観察されなかった。今回の結果からは血管内皮細胞株において、LPS 刺激による影響はほとんど観察されなかった。



【図 2】 LPS 及び IL18 投与における血管内皮細胞への影響

4 生活や産業への貢献および波及効果

申請者は、別の疾患ではあるが、IL18 の治療応用化を目指して、治験の準備を行っている (Ma Z et al. 2016)。本研究成果は、精神疾患と免疫ネットワークを明らかにする第 1 段階であり、末梢炎症が中枢炎症へと波及し、精神疾患、精神症状を呈するネットワーク機構を明らかにするために、血液脳関門に着目している。また、既に治験が始まっている IL18 を含めた内容であり、もしこの IL18 を含めた炎症を



【図3】 LPS 及び IL18 投与における血管関連タンパク発現の比較

制御することで精神症状が改善、もしくは予防することが出来れば、臨床応用化も容易に可能であると思われる。精神疾患の治療薬は、現在世界中で開発されているが、いずれも従来の機序を改良したものばかりであり、免疫に着目したものは存在しない。本研究が進めば、世界中から注目されるだけでなく、新しい治療薬開発につながり、患者さんへと還元が可能となる。本研究はまだ課題が多く残されており、今後脳内のミクログリアがどう中枢神経細胞へ作用するか、どのようなシグナル経路を通るか、といった事の解明が求められる。

【参考文献・引用文献】

1. Zhifeng Ma et al, Augmentation of Immune Checkpoint Cancer Immunotherapy with IL-18. *Clinical Cancer Research*, 2016 Jun 15; 22(12):2969-80.
2. Kyosuke Yamanishi et al, Interleukin-18-deficient mice develop hippocampal abnormalities related to possible depressive-like behaviors, *Neuroscience*, 2019 Jun 1;408:147-160.
3. Kyosuke Yamanishi et al, Analysis of genes linked to depressive-like behaviors in interleukin-18-deficient mice: Gene expression profiles in the brain, *Biomedical Reports*, 2019 2020 Jan;12(1):3-10.
4. Kyosuke Yamanishi et al. Exploring Molecular Mechanisms Involved in the Development of the Depression-Like Phenotype in Interleukin-18-Deficient Mice, *Biomed Res Int*. 2021 Oct 18;2021:9975865
5. Kyosuke Yamanishi et al, Acute stress induces severe neural inflammation and overactivation of glucocorticoid signaling in interleukin-18-deficient mice, *Translational Psychiatry*, 2022 Sep 23;12(1):404.