

## IL-18 を中心とした脳内炎症とうつ病の病態解明と治療法開発

山西恭輔

兵庫医科大学 精神神経免疫学講座・精神科神経科学講座

### 【研究の背景】

炎症性サイトカインであるインターロイキン 18(IL-18)はインターフェロン $\gamma$ を誘導する因子として発見された。しかしながら、IL-18 は免疫機能だけではなく、免疫以外の機能を持っているとして近年注目されてきた。癌を標的とした癌免疫療法(Ma Z et al 2016)やエネルギー代謝などである。具体的にはIL-18 欠損マウスは肥満、耐糖能低下、高インスリン血症、脂質異常症、最終的には非アルコール性脂肪肝炎に進展するといった内容である(Yamanishi K et al 2016, 2018, Natea M G, 2006)。また筆者は、IL-18 と中枢神経との関連においては、IL-18 欠損マウスは抑うつ様行動/学習・記憶力障害を呈するとの研究成果をまとめた(Yamanishi K et al. 2019)。現在までにIL-18 は中枢神経の機能維持において重要な役割を担っており、うつ病下で障害を受けた神経再生などを治療し、正常な中枢神経細胞を維持できる可能性が明らかとなっている。しかしながら、うつ病と免疫応答を中心とした脳内炎症との関わりについては、関連性の指摘はされているものの、明らかになっていない部分が多く、これらの病態解明がうつ病の機序解明だけでなく、治療へつなげるために求められる。

### 【目 的】

本研究課題では、うつ病と免疫応答を中心とした脳内炎症との関わりを明らかにするべく、先行研究の継続課題としてIL-18 の中枢神経細胞における影響の検討を始めた。先行研究では、IL-18 の欠損状態がどのような行動障害を呈するかといった表現型を主体に多角的な解析を行ったが、本研究ではIL-18 を中心とした免疫と中枢神経がどのような関連性を呈するかをより詳細に明らかにすることを目的とした。さらなる目的として、ストレス暴露下におけるIL-18 の中枢神経細胞の保護・維持機能の検討、脳内炎症と気分障害を中心とした精神障害の生物学的な関連性を明らかにすると共に、IL-18 のうつ病・うつ状態への治療応用の可能性を模索する事とした。

### 【方 法】

本研究は、細胞を用いた In vitro 実験と動物を使用した In vivo 実験、ヒトのサンプルを用いた Human Study を行うものである。

#### 〈In vitro 実験〉

ヒト中枢神経細胞株として使用されている Sh-sy5y を使用する。最初に Sh-sy5y に IL-18、IL-18 受容体の発現の有無を免疫染色、及び、Western blotting にて検証した。次に Sh-sy5y に IL-18 を付与し、IL-18 の投与量と投与期間による細胞への影響を検討した。投与量としては投与後、細胞の増殖能や生存を測定するために生細胞定量キット(MTS Cell Proliferation Colorimetric Assay Kit)を用いる。次に、ストレス負荷としてグルタミン酸を投与し、細胞生存能と投与量、投与後の時間の検討を行う。投与量は 0, 1, 10, 100ng/ml の濃度、投与後の時間としては投与後 24, 48, 72 時間で評価を行った。ストレス暴露の方法に関しては、グルタミン酸、Tnf $\alpha$  を付与した。Tnf $\alpha$  は 10, 20ng/ml、グルタミン酸は、20, 40, 80mM で投与後、24 時間で細胞生存率を評価した。

#### 〈In vivo 実験〉

IL-18 欠損マウス(*Il18<sup>-/-</sup>*) (C57Bl/6)の雄を使用し、コントロールとして Littermate C57Bl/6(*Il18<sup>+/+</sup>*)の雄を使用した。スト

レス処置として、急性ストレス負荷として 6 時間の拘束処置、慢性ストレス処置として社会的敗北ストレス処置を行う予定であったが、本研究期間中では急性ストレス負荷のみ行った。行動学的な評価方法として、強制水泳試験、尾懸垂試験、オープンフィールドテストを行った。機序解明として、Ki-67、Doublecortin に対する免疫染色による神経再生 (neurogenesis) の評価を行った。なお、本動物実験は、兵庫医科大学 動物実験委員会の承認を受けている (#28041, #19-030)。

〈Human Study〉

脳内における IL-18 の局在を確認するため、ヒトの前頭前野を使用し、IL-18 の発現を免疫染色にて確認した。ヒトの前頭前野は健常人、うつ病患者のサンプルを使用した。使用抗体は、中枢神経細胞のマーカーとして MAP2、IL-18 を使用した。なお、ヒトのサンプルは完全に匿名化された検体を購入したため、倫理委員会の承認は省略とした。

【結 果】

〈In vitro 実験〉

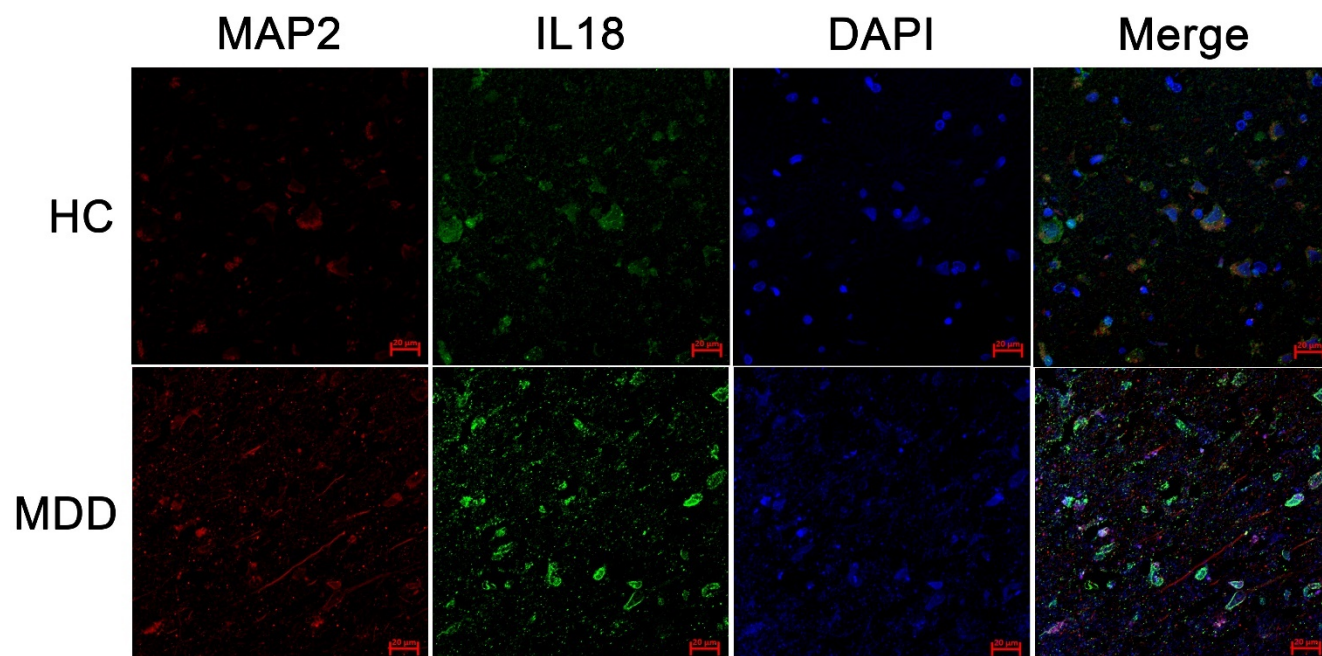
免疫染色、Western blotting にてポジティブコントロールを使用し、IL-18、IL-18 受容体の発現は確認された。IL-18 を Sh-sy5y に IL18 の投与量、投与後の時間に関わらず、投与による生存能に変化は見られなかった。ストレス処置として、グルタミン酸、Tnf $\alpha$  の投与を行ったが、先行研究と同様に濃度依存的に細胞障害性が確認された。なお、計画として、IL-18 の併用投与を行う計画であったが、ストレス処置に伴う先行研究の再現性を確認する段階で細胞にトラブルが発生し、再現性の確認が取れなかった。その検証を行ったところ、結果として購入した Sh-sy5y 細胞株に問題があったことが判明し、再購入することで先行研究との再現性が確認された。これらの理由から研究計画に遅れが生じた。

〈In vivo 実験〉

急性ストレスを負荷したところ、オープンフィールド試験において *Il18*<sup>-/-</sup>マウスにおいて活動量の亢進、尾懸垂試験において 2 分後に無動時間の短縮が見られた。また神経再生については、コントロール群については先行研究 (Yamanishi K 2019) と同様の結果が確認されたが、ストレスにおける差は確認されなかった。

〈Human Study〉

ヒトの前頭前野における結果を以下【図】に示す。健常人 (HC)、うつ病患者 (MDD) とそれぞれ IL18 と MAP2 が重なって染色された。



【考 察】

In vitro 実験の結果より、非免疫細胞である Sh-sy5y に炎症性サイトカインの IL-18 が内在性に存在していることが明らか

になった。さらに、IL-18 受容体も発現していたことから、IL-18 のシグナルが直接細胞内に入り、何らかのシグナル伝達が行われる可能性が示唆された。しかしながら、IL-18 そのものだけでは細胞障害性が認められなかったことから、単体での影響だけでなく、複数のシグナルが必要となる可能性も示唆された。本研究期間では上記に記載のトラブルが発生したため、遅れが生じ、ストレス負荷のみでの実験までしか遂行できなかったが、今後グルタミン酸などの細胞障害を引き起こす因子との併用による影響を検討していく必要がある。

また In vivo 実験より IL-18 が欠損した状態でのストレスに対する検討を行い、野生型には見られなかったストレスによる行動変化が見られた。今後さらなる機序解明を行っていく必要があるが、本研究では単回のストレスであり、評価も短期間後による評価のみであったため、長期的な観察も必要となってくる。

Human Study では、ヒトの中枢神経細胞でも健常人、うつ病患者で IL-18 の存在が確認された。現在精神と免疫との関連性に関しては、ミクログリアを中心とした脳内炎症の関与が指摘されているが、これらを介して、中枢神経細胞で IL-18 が何らかの免疫反応が起こっている可能性がある。これらの関与を明らかにするため、In vitro、In vivo でのさらなる検討が必要である。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究成果により炎症性サイトカインの 1 つである IL-18 が中枢神経細胞に存在していることが明らかとなり、うつ病を引き起こす脳内炎症からの機序解明の一つに貢献した。うつ病の病態としてのミクログリアを中心とした脳内炎症から炎症性サイトカインの存在は切り離さない存在であり、これらを標的とすることで機序解明だけでなく、治療標的にもなることが期待される。

### 【参考・引用文献】

Netea MG, Joosten LA, Lewis E, Jensen DR, Voshol PJ, Kullberg BJ, Tack CJ, van Krieken H, et al. (2006) Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat Med* 12:650-656.

Yamanishi K, Maeda S, Kuwahara-Otani S, Watanabe Y, Yoshida M, Ikubo K, Okuzaki D, El-Darawish Y, et al. (2016) Interleukin-18-deficient mice develop dyslipidemia resulting in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Transl Res* 173:101-114.e7.

Yamanishi K, Maeda S, Kuwahara-Otani S, Hashimoto T, Ikubo K, Mukai K, Nakasho K, Gamachi N, El-Darawish Y, Li W, et al. (2018) Deficiency in interleukin-18 promotes differentiation of brown adipose tissue resulting in fat accumulation despite dyslipidemia. *J Transl Med* 16: 314.

Yamanishi K, Doe N, Mukai K, Ikubo K, Hashimoto T, Uwa N, Sumida M, El-Darawish Y, Gamachi N, Li W, et al. (2019) Interleukin-18-deficient mice develop hippocampal abnormalities related to possible depressive-like behaviors. *Neuroscience* 408: 147-160.