

## インフラマソームを中心とした末梢炎症がうつ病を引き起こす機序解明と新規治療戦略の模索

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】

これまで、末梢炎症と中枢炎症は互いに独立したものと考えられてきた。特に脳内は血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) により守られた immune privileged organ とされてきた。しかしながら、近年その概念が崩れつつあり、末梢炎症が中枢神経の炎症へ波及する可能性が指摘されている。グラム陰性桿菌感染などにより産生されたリポポリサッカライド (LPS) が末梢炎症としてインフラマソームの活性を誘導し、IL1 $\beta$  や IL18 などのサイトカイン産生を経て、末梢炎症が引き起こされる。その数時間後、脳内に存在するミクログリアでも同様のインフラマソームの活性が誘導されることが先行研究で示されているが、原因として血液脳関門の破綻の可能性が指摘されている。しかしながら、末梢炎症から中枢炎症へ波及する機序については、経時的变化を含め、明らかとなっていない。我々は炎症性サイトカインであるインターロイキン 18 (IL-18) の欠損下では海馬機能不全となり、うつ病様行動変化を呈する事を発見した (Yamanishi K et al, 2019)。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末梢炎症が脳内炎症、精神疾患を発症する機序については明らかとなっていない。

### 【目 的】

そこで本研究は、急性ストレス起因による炎症や末梢炎症起因による炎症が血液脳関門の透過性やバリア機能、ミクログリアの活性への影響、中枢神経の炎症、作用を IL18 を含むインフラマソームを中心に明らかにすることを目的とする。

### 【方 法】

本研究はマウスを使用した In vivo 実験を中心に行った。

〈使用マウス〉

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。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 (承認番号: #28041, #19-030, #22-027)。

〈Stress の種類〉

急性ストレス負荷として 6 時間の拘束処置、その後 18 時間の休息期間を経て、行動実験などを行った。

末梢炎症負荷として、LPS を 2.5 mg/kg を腹腔内投与し、24 時間後、14 日後に行動実験などを行った。

〈行動解析〉

行動解析として、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。

〈採材〉

マウスは、上記ストレス負荷後、安楽死処置を行い、血液、海馬を採材し、液体窒素に入れ冷凍、解析まで -80°C で保管した。

〈RNA Sequencing〉

ISOGEN kit (cat. no. 311-02501, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて海馬の RNA 精製を行い、RNA Sequencing を行った。SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (Illumina K.K., Tokyo, Japan)

を用いて解析を行った。

<RT-qPCR>

SYBR Green Real-Time PCR Master Mix: One-step qPCR kit (Toyobo Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、行った。

< Western blotting >

先行研究と同様の手法を用いて Western blotting を行った。(Yamanishi K et al. 2019)

<ELISA>

血清中の IL18、コルチコステロンはそれぞれ以下のキットを用いて行った。Enzo Life Sciences, Inc. (cat. no. ADI-900-097; Farmingdale, NY, USA)、Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (cat no. 7625; Nagoya, Aichi, Japan)。

< Immunofluorescence staining >

先行研究と同様の手法を用いて Immunofluorescence staining を行った。(Yamanishi K et al. 2021)染色は、Ki67、Doublecortin、IBA1、GFAP の 4 遺伝子を染色した。

## 【結 果】

- 1) IL18 欠損マウスにおいて急性ストレス後、強制水泳試験、尾懸垂試験において、活動量の増加がみられ、不安用行動変化が観察された。IL18 欠損マウスにストレスを負荷した群では海馬において *IL1β*、*IL6*、*Tnfa* の発現の上昇が観察され、さらにミクログリアの増加、活性型への形態変化、アストロサイトの増加も観察された。これらの変化は野生型マウスでは観察されなかった。急性ストレス負荷にて、血清コルチコステロンの上昇を認めたが、IL18 欠損マウスは野生型に比べさらなる上昇を認めた。
- 2) 野生型マウスにおいて LPS を腹腔内投与を行うことで、24 時間後、14 日後でともに強制水泳試験、尾懸垂試験で活動性の低下を認めており、抑うつ様行動変化が観察された。

## 【考 察】

- 1) 急性ストレス負荷をマウスに行うことで脳内炎症が惹起されたが、IL18 が欠損することで *IL1β* などその他のサイトカイン発現の上昇がみられ、インフラマソームの活性、およびその下流のシグナル制御に異常を呈していることが明らかとなった。IL18 が脳内炎症を調整する重要な因子である可能性が示された。
- 2) 野生型で末梢炎症誘発におけるうつモデルの検証が確認された。引き続き、IL18 欠損マウスを使用し、検証するとともに直接的なメカニズムの解明を続けていく。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

IL18 は精神・身体ストレスに対する調整因子として重要な役割を担っている可能性を明らかにした。これは現代社会におけるハラスメント、喪失体験など突然のストレスに対して、IL18 が重要な役割を担っていることにつながると予想され、Translational な治療応用が十分に期待される内容になる。

## 【参考・引用文献】

Kyosuke Yamanishi, Nobutaka Doe, Keiichiro Mukai, Kaoru Ikubo, Takuya Hashimoto, Noriko Uwa, Miho Sumida, Yosif El-Darawish, Naomi Gamachi, Wen Li, Sachi Kuwahara-Otani, Seishi Maeda, Yuko Watanabe, Tetsu Hayakawa, Hiromichi Yamanishi, Tomohiro Matsuyama, Hideshi Yagi, Haruki Okamura, and Hisato Matsunaga, Interleukin-18-deficient mice develop hippocampal abnormalities related to possible depressive-like behaviors, *Neuroscience*,;408:147-160. 2019

Kyosuke Yamanishi, Masahiro Miyauchi, Keiichiro Mukai, Takuya Hashimoto, Noriko Uwa, Hitomi Seino, Wen Li, Naomi Gamachi, Masaki Hata, Sachi Kuwahara-Otani, Seishi Maeda, Yuko Watanabe, Hiromichi Yamanishi, Hideshi Yagi, Haruki

Okamura, Hisato Matsunaga, 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

Kyosuke Yamanishi, Nobutaka Doe, Keiichiro Mukai, Takuya Hashimoto, Naomi Gamachi, Masaki Hata, Yuko Watanabe, Chiaki Yamanishi, Hideshi Yagi, Haruki Okamura, Hisato Matsunaga, Acute stress induces severe neural inflammation and overactivation of glucocorticoid signaling in interleukin-18-deficient mice, *Transl Psychiatry.* 2022 Sep 23;12(1):404.