

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22952

研究課題名（和文）サイトカインストーム後脳症モデル動物を用いたIL-17制御による新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment by IL-17 regulation using an animal model of post-cytokine storm encephalopathy

研究代表者

宮嶋 久雄 (MIYAJIMA, Hisao)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：80874362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：急性呼吸窮迫症候群（ARDS）に伴うサイトカインストームが脳機能障害を引き起こすことが示唆されているが、その病態メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、ARDSに続発するサイトカインストーム後脳症を動物モデルにより再現し、血液脳関門の破綻に關与するIL-17に着目した病態解明を目的とし研究を行った。ARDSモデルマウスを確立し、ARDS発症急性期における血中IL-17の発現上昇と脳実質内での各種サイトカインの発現上昇、髄膜中のIL-17発現細胞の増加を見出した。これらの結果は、ARDS後の脳内炎症が脳全体で起こっていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、臨床医学的にARDS後の認知機能の低下が報告されてきた。しかし、低酸素血症などの要因が、脳機能障害の発症につながっている可能性もあり、ARDSに伴うサイトカインストーム後脳症の病態メカニズムはわかっていない。本研究では、ARDSマウスモデルにおいてもサイトカインストームと脳内炎症が起きていることを確認できた。現在は並体結合マウスを使用し、ARDSに伴うサイトカインストーム曝露後の脳機能障害の解析を進めている。今後これらの解析を進めることで、血液脳関門の破綻や脳内炎症のメカニズムを解明できれば、神経系の後遺症を改善する有用な治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Cytokine storms associated with acute respiratory distress syndrome (ARDS) have been suggested to cause brain dysfunction, but the pathological mechanism remains unclear. This study used an animal model of post-cytokine storm encephalopathy after ARDS. We focused on IL-17, which is involved in the disruption of the blood-brain barrier, to elucidate the pathophysiology of the disease. We established a mouse model of ARDS and found elevated expression of IL-17 in the blood and various cytokines in the brain parenchyma and increased IL-17-expressing cells in the meninges during the acute phase of ARDS. These results suggest that inflammation in the brain after ARDS occurs throughout the brain.

研究分野：神経免疫学

キーワード：脳症 サイトカインストーム ARDS サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は、細菌やウイルスによる感染症に起因する肺炎や敗血症等が原因で起こる重度の呼吸不全である。また ARDS 生存者の半数近くにおいて、認知機能障害等の脳機能障害が長期的に現れることが報告されているが、その発症メカニズムは未だ不明である。一方、重症感染症におけるサイトカインの関与は確立されており、ARDS 後の長期的な脳機能障害の原因の一つとして「サイトカインストーム」が強く示唆されている。過剰に産生されたサイトカインの作用が全身に及ぶと多臓器不全や血液脳関門 (BBB) の破綻を誘発し、脳機能障害を引き起こす (Sasanejad et al., *Critical Care*, 2019)。実際に、ARDS 関連疾患の患者の血液や脳脊髄液では、BBB の機能制御に重要なサイトカインである IL (インターロイキン) -17 の濃度が上昇していることも報告されている (Mahallawi et al., *Cytokine*, 2018)。慢性炎症が、うつ病を含めた様々な脳機能障害を誘発することも知られており (Dantzer et al., *Nat Rev Neurosci.*, 2008)、ARDS による脳機能障害も同様に脳内炎症が関与すると考えられる。しかし、ARDS に伴うサイトカインストーム後脳症 (脳機能障害) の病態やその治療のための標的分子などに関する詳細は未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、「ARDS の発症に伴うサイトカインストーム後脳症を動物モデルにより再現し、その病態を BBB の破綻に関与する IL-17 に着目して解明すること」を目的とした。ARDS の動物モデル作製は、LPS (Lipopolysaccharide) の気管内投与という簡便な方法が確立されており、多くの研究に利用されている。しかし、ARDS 発症マウスの多くが早期に死に至るため、長期的に生存を確認し、再現性良く神経系の後遺障害について検討した研究はない。この問題に対し、並体結合による血液循環を利用し、急性期のみ生存不可能なレベルのサイトカインストームに暴露させる環境を作ることで、その問題を克服する。本研究で、IL-17 シグナル経路の阻害により、BBB の破綻が抑制できれば、行動学的な異常や、中枢神経系の後遺症を改善できる可能性があり、大変有用な治療法の開発につながる。

## 3. 研究の方法

本研究では LPS 誘導肺損傷モデルマウスを作製し、ARDS に伴うサイトカインストームによる脳機能障害 (サイトカインストーム後脳症) における、サイトカインストームの影響を解析する。そして、血液脳関門 (BBB) の機能制御に重要な働きをもつ炎症性サイトカイン IL-17 のレポーターマウス及び IL-17 遺伝子欠損マウスを用いて、サイトカインストーム後脳症における IL-17 の役割の解明を目指し、研究を実施した。

野生型マウス及び遺伝子改変マウスの 6 から 10 週齢の雄マウスを使用し、LPS (対照群には生理食塩水) を気管内投与して ARDS を発症させ、LPS 投与後の各時点において種々の解析を行った。サイトカインの発現量変化や免疫細胞数及び種類の変化を検討するために、LPS 投与後の各時点で各種体液及び組織を採取し、組織学的解析や生化学的解析、遺伝子発現解析を行った。

また、異なる個体を皮下レベルで手術的に縫合することで、両個体の循環体液を混合して共有させる手法である並体結合を用いた。並体結合マウスの血液循環は、先行研究を参考にし、血中へのエバンスブルー (青色色素) やグルコースの投与、または遺伝子改変マウスを利用した方法により確認した。そして、モデルの確立を確認した後、14 日後に片側マウスのみ LPS を気管内投与して ARDS を発症させ、3 日後に各マウスを分離し、サイトカインストームに暴露された ARDS 非発症マウスを用いて種々の解析を行った。

## 4. 研究成果

まず初めに、LPS の気管内投与による ARDS モデルマウスを作製した。そして、ELISA 法により、血液中や気管支肺胞洗浄液中、肺組織における各種サイトカイン上昇を確認した。継時的な発現変化を調べた結果、血漿中 IL-17 の上昇は、急性期のみ起こることが明らかとなった。

次に、全身性のサイトカインの上昇が、脳にどのように影響するかについて、ARDS 急性期脳の各部位毎に解析を行った。IL-17 レポーターマウスを使用した免疫組織化学染色法による解析の結果、脳実質内で IL-17 発現細胞は観察されなかったが、髄膜中に存在する一部の細胞が IL-17 を発現し、分泌していることを見出した。

さらに、ELISA 法及び定量的 RT-PCR 法によるサイトカインと受容体の発現解析を行った。脳実質内での IL-17 の発現上昇は確認できなかったが、脳実質の全ての部位において、IL-17 受容体に加えて、IL-6 や IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  等の炎症性サイトカインの急激な発現上昇を認めた。これらの結果は、IL-17 シグナルの関与の可能性と ARDS 後の脳内炎症が脳全体で起こっていることを

示唆している。

また、ARDS 後のサイトカインストーム暴露を模した新規動物モデルの確立するために、並体結合を使用したマウスモデルを作製した。先行研究を参考にし、エバンスブルー（青色色素）やグルコースの静脈内投与、または遺伝子改変マウスを利用した免疫細胞の FACS 解析法により血液循環の確認を行った。現在は、並体結合で血液循環を共有させた後に、片側マウスのみ LPS を気管内投与して ARDS を発症させ、分離した ARDS 非発症マウスを用いて各種解析を行っている。

今後はこれまで得られた結果を基に、ARDS 発症後のマウス脳機能への影響を組織学的、行動学的に解析する。そして、ARDS 発症及び健常マウスの並体結合を利用した血液成分の共有による新規モデル動物においても検証し、サイトカインストームに曝露された ARDS 非発症マウスの脳機能の解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------