

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16589

研究課題名（和文）IL17に着目したくも膜下出血後、発作性交感神経過活動の病態解明と新規治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of paroxysmal sympathetic nerve hyperactivity after subarachnoid hemorrhage focusing on IL-17 signaling and development of new treatment methods

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：発作性交感神経過活動（PSH）は、くも膜下出血（SAH）直後の合併症の1つとして知られているがその詳細な病態メカニズムについては未だ明らかでない。本研究では、炎症性サイトカインIL-17に着目し、SAHにおけるIL-17分泌細胞の同定と、PSH発症機序の解明を目的とし研究を行った。脳実質、髄膜、血液、脳脊髄液中の各種サイトカインなどの発現量変化をELISA法や定量的RT-PCR法により検討した。そして、遺伝子改変マウスを用いて、免疫染色法による組織学的解析で、脳実質及び髄膜でのIL-17発現細胞の検討をした。また、PSH治療効果を検証するため新規IL-17抗体の作製を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、PSHはSAH等の脳損傷後の合併症として高頻度に発症することが報告されているが、PSHの病態メカニズムや異常神経回路に関する詳細は不明である。したがって、今後の研究成果によって、SAH後のPSHにおけるIL-17シグナルの関与とそのメカニズムを解明できれば、SAHのみならず、頭部外傷における脳損傷などのPSH予防・治療法開発にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Paroxysmal sympathetic hyperactivity (PSH) is known as one of the complications immediately after subarachnoid hemorrhage (SAH), but the detailed pathomechanism is still unclear. In this study, we focused on the inflammatory cytokine IL-17 to identify IL-17-secreting cells in SAH and to elucidate the pathogenesis of PSH. We investigated the expression levels of various cytokines in the brain parenchyma, meninges, blood, and cerebrospinal fluid by ELISA and quantitative RT-PCR. Then, using transgenic mice, we examined IL-17-expressing cells in the brain parenchyma and meninges by histological analysis using immunostaining methods. In addition, we developed a novel IL-17 antibody to validate the therapeutic effects of PSH.

研究分野：神経免疫学

キーワード：脳血管障害 くも膜下出血 サイトカイン 交感神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血 (Subarachnoid hemorrhage: SAH) のは、脳卒中の中でも死亡率が高い疾患であり、主に脳動脈瘤の破裂によるくも膜下腔への出血により、様々な脳機能障害を引き起こす。そして、SAH 直後の最も重要な合併症の 1 つが、発作性交感神経過活動 (Paroxysmal Sympathetic Hyperactivity: PSH) である。PSH は、SAH の発症に伴う内因性的のカテコラミンの過剰分泌により生じる交感神経の過緊張状態のことであり、SAH 患者の予後に大きく影響する。しかしながら、PSH は、カテコラミンストームや自律神経ストームなど様々な呼び方があることから、詳細な病態解明が進んでいない。

視床下部室傍核 (Paraventricular hypothalamic nucleus: PVN) は、内分泌系および自律神経系の中核制御を担っている神経核であり、脊髄や脳幹への軸索投射の主たる起始核である。近年、IL-6、TNF α などの炎症性サイトカインが PVN の神経細胞を介して、末梢の交感神経系を活性化することが報告されている。最近では、IL-17 が PVN を介して交感神経系を活性化することも報告されている。先行研究により、SAH 患者の脳脊髄液 (CSF) 中で、IL-17 濃度の上昇が報告されている。また、SAH モデルマウスにおいても、脳内の IL-17 濃度が上昇している。IL-17 は、Th17 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などにより分泌される炎症性サイトカインであり自己免疫疾患や炎症性疾患の病態に重要な役割を果たす。近年では、好中球、マクロファージ、ミクログリア、アストロサイトなども分泌する可能性があり、SAH 後の PSH を含む合併症の発症に、IL-17 が重要な役割を果たす可能性が高いと考えられる。しかしながら、くも膜下出血を契機にどのような病態メカニズムで PSH を起こすのか、詳細は不明であり、確実な予防と治療の方法がないため、新規治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、SAH モデル動物を使用し、IL-17 分泌細胞の同定と、交感神経系の中核である視床下部室傍核の活性化を介した PSH 発症機序の解明を目的とした。SAH 後の脳脊髄液や血液中では、炎症性サイトカイン IL-17 の濃度が上昇することが報告されているが、その詳しい役割は明らかとなっていない。そこで本研究では、PVN を介して交感神経系を活性化する働きなどを持つ IL-17 に着目し、IL-17 遺伝子改変マウスや新規抗 IL-17 抗体を用いて、SAH 後の PSH における IL-17 の機能解析を行う。

3. 研究の方法

本実験では、野生型マウスと IL-17 レポーターマウス及び IL-17 欠損マウスの 8 から 12 週齢の雄マウスを使用し、以下の実験を実施した。視交叉槽内への自家血投与を行い、SAH モデルマウスを作製した (Sabri M, Brain Res, 2009)。イソフルランによる吸入麻酔下で、マウス脳定位固定装置を用いて頭部を固定する。そして前頭皮の正中線を切開し、頭蓋骨を露出させ、歯科用ドリルにて頭蓋骨に孔を開け、定位マニピュレーターに固定した注射針を用いて、自家血 60 μ L を投与した後、切開した皮膚を縫合して閉創した。投与する自家血は、注射針で腹側尾動脈から、視交叉槽に投与する直前に採血したものを使用し、採血した血液と同量の生理食塩水を腹腔内投与した。その後、サンプル回収日 (SAH 後 0.5、1、2、3、7 日) まで経過観察を行った。

そして、サンプル回収日に、三種混合麻酔下で脳脊髄液 (大槽穿刺法) 及び血液 (心臓穿刺法) を回収し、生理食塩水による灌流を行った。その後、脳実質、髄膜、CSF 及び血液を採取し、各種サイトカインの発現量変化を ELISA 法及び定量的 RT-PCR 法により検討した。また、組織学的解析用には、生理食塩水による灌流の後、4% パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行った。そして、各種組織を採取し、免疫組織化学染色法により組織学的解析を行った。

4. 研究成果

まず、先行研究を参考に SAH モデルマウスの作製のための条件検討を行い、最適な SAH モデルの確立を行った。次に、脳実質、髄膜、血液、脳脊髄液中の各種サイトカインなどの発現量変化を ELISA 法や定量的 RT-PCR 法により検討した。また、免疫染色法による組織学的解析で、脳実質及び髄膜での IL-17 発現細胞の検討をした。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、共同研究により、本実

験に使用する IL-17 に対する新規抗体の作製を行った。すでに IL-17 蛋白の抽出は完了し、マウスへの免疫を行う予定である。

今後はこれまで得られた結果を基に、各組織における IL-17 とカテコラミン発現量の経時的変化を詳細に解析する。また、交感神経系の活動性変化に関して、テレメトリー装置を用いて、自由行動下でのマウスの心電図、体温、活動量を検討する。そして、調べた IL-17 の発現量変化に基づき、SAH 発症後の各時点における IL-17 分泌細胞を、IL-17 レポーターマウスと免疫染色法、フローサイトメトリーにより同定する。また、IL-17 欠損マウスや抗 IL-17 抗体を使用して、SAH における IL-17 シグナル経路の阻害による PSH 予防効果を検証していく予定である。また、IL-17 欠損マウスで SAH モデルを作製し、IL-17 欠損マウスまたは野生型マウス由来の血液を投与し、IL-17 およびカテコラミン発現量に違いがないか検討する。さらに、各種抗体や薬剤を用いて、IL-17 分泌細胞を薬理的に除去し、PSH 予防効果を検証する。また、PVN へのウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は確立されており、PVN における IL-17 シグナル経路の特異的な遮断が、IL-17 投与による PSH を抑制することが報告されている。したがって、IL-17 受容体に対する shRNA 発現 AAV ウイルスや IL-17 受容体の条件特異的欠損マウスを使用し、PVN 特異的な IL-17 シグナル伝達経路の遮断をし、PSH の改善効果を検証する予定である。そして、本研究が進展することで、SAH 後の PSH 予防・治療法開発に直結し、神経系と免疫系との細胞間コミュニケーションの解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujitani Masashi, Miyajima Hisao, Otani Yoshinori, Liu Xinlang	4. 巻 13
2. 論文標題 Maternal and Adult Interleukin-17A Exposure and Autism Spectrum Disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpsyt.2022.836181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------	---------