

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17973

研究課題名（和文）IL-27およびIL-27関連分子を標的とした脳梗塞における脳保護療法の創出

研究課題名（英文）Creation of cerebroprotective therapy in cerebral infarction by targeting IL-27 and IL-27-related molecules

研究代表者

古川 隆（Furukawa, Takashi）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60869832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、脳梗塞におけるIL-27の作用機序の解明および創薬である。このため、まずノックアウトマウスを用いて、脳梗塞モデルマウスにおける脳梗塞の範囲や炎症性サイトカインの発現を調べた。野生型マウスに比べ、IL-27ノックアウトマウスで、脳梗塞24時間後の脳梗塞体積は減少した。また、炎症性サイトカインの発現も減少した。脳梗塞急性期においては、IL-27の発現を抑制することで脳保護作用が得られる可能性がある。今後、投与方法など含め実験を継続していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脳梗塞の炎症のメカニズムが解明されつつあるが、脳梗塞に対する有効な治療薬の開発は十分ではない。今後、脳梗塞患者の数は高齢化に伴い増加する見込みであり、脳梗塞患者に有効な新しい治療の創出が急務である。サイトカインの一つであるIL-27は、脳保護作用を有するサイトカインとして報告されているが、脳梗塞におけるIL-27の詳細な作用機序についてはいまだ明らかになっていない。本研究では脳梗塞におけるIL-27の作用の一部を確認することができた。引き続き実験を継続し、IL-27およびIL-27関連分子を標的とした脳梗塞の新規治療薬の創出を目指す。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the mechanism of action of IL-27 in cerebral infarction and drug discovery. To this end, we first examined the extent of cerebral infarction and expression of inflammatory cytokines in a mouse model of cerebral infarction using knockout mice. Compared to wild-type mice, the volume of cerebral infarction 24 hours after infarction was reduced in IL-27 knockout mice. The expression of inflammatory cytokines was also reduced. In the acute phase of cerebral infarction, suppression of IL-27 expression may provide brain protection. We plan to continue experiments including the method of administration.

研究分野：脳神経外科

キーワード：IL-27 脳梗塞モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中(脳血管障害)は、日本の死因の第3位、寝たきりの原因の第1位を占め、高齢化社会に伴って今後患者数の増加が危惧されている。脳卒中のうち約7割は脳梗塞が占めている。脳血管の高度狭窄、閉塞または血行力学的な要因による虚血によって脳組織が虚血壊死に陥ることによって炎症が惹起される。脳梗塞に対する新規治療薬の開発は以前より行われているが、有効な治療薬の開発はいまだに十分ではない状況である。脳梗塞の炎症にかかわる特徴的な分子とその関与機序を明らかにし、それを標的とした有効な治療を創出することは重要な課題である。

脳細胞の虚血壊死に伴う自己組織由来の炎症惹起因子(DAMPs)の放出によって炎症が引き起こされる。ミクログリア、マクロファージ、T細胞は脳梗塞巣で炎症性因子を産生して、高速体積の拡大、神経症状の悪化を引き起こす(Shichita, *Folia Pharmacol. Jpn.* 2018)(図1)。脳梗塞の急性炎症では、自然免疫がかかわっている。マクロファージ、好中球から産生される炎症性サイトカインであるIL-23が $\gamma\delta$ T細胞に作用することで、さらに別の炎症性サイトカインであるIL-17が産生され炎症が進行する。IL-23はDAMPsによってTLR2とTLR4が活性化されて産生誘導されたものである。

IL-27は、p40様サブユニット Epstein-Barr Virus-induced gene 3(EBI-3)と p35様ユニット p28からなり、IL-12,23と同様に活性化した樹状細胞から分泌され、ナイーブCD4陽性T細胞の増殖を促し、またIL-12とともにTh1細胞の分化を誘導する。この作用に加え、免疫抑制作用も有していることがすでに明らかになっている(Yoshida, *Jpn. J. Clin. Immunol.* 2009)(図2)。IL-27受容体は、IL-12受容体 β 2鎖と相同性を持つWSX-1分子、および β 1鎖に相当するIL-6受容体のシグナル伝達コンポーネントであるgp130から構成されている。脳梗塞におけるIL-27の作用機序に関する詳細な機序の解明はいまだなされていないのが現状である。しかしながら、*in vitro*でLPS刺激でのミクログリアに対するIL-27の作用として、IL-27がIL-23により誘発された炎症性サイトカインを抑制する効果や、神経保護因子を産生する働きが示唆されている(Kawanokuchi et al., *Clinical and Experimental Neuroimmunology.* 2013)。また、脳出血時ではあるが、IL-27の作用として、好中球からのラクトフェリンの産生を促し炎症誘発性因子の発生を抑制する働きが示唆されており(Zhao et al., *nature communications.* 2017)、脳梗塞においても同様の作用効果が期待される。

脳梗塞においてIL-27の作用機序についてはいまだ未解明のままであるが、以上の背景やこれまでの報告により、脳梗塞におけるIL27の免疫機構を解明することで、脳梗塞に対する新たな治療創出に結びつく可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究ではIL27もしくはその関連分子を標的とした有効な脳梗塞治療薬の創出を目指す。そのため、(A)脳梗塞におけるIL-27の作用機序の解明、(B)rIL-27の投与による作用機序の解明および治療標的としての有用性の検証、が必要であると考えます。

3. 研究の方法

(A)脳梗塞時におけるIL-27の作用機序の解明

IL-27 p28 ノックアウトマウス(KO)群、IL-27 EBI3 ノックアウトマウス群、IL-27 WSX1 ノックアウトマウス群、対照群(WT)の4群で脳梗塞モデルを作成し比較検討する。脳梗塞モデルは中大脳動脈一時遮断(遮断時間60分)を行い作製する。血流遮断後の再灌流から目的とする期間で24時間毎に神経症状の評価を行った後、マウスを安楽死させる。摘出標本でMAP2染色を行い、脳梗塞の範囲を計測し比較検討する。

各摘出標本に対して、qRT-PCRやELISAで、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-9、IL-17、IL-23、TGF β などのmRNA発現やたんぱく質の安定性を評価する

脳梗塞時のIL-27受容体のシグナル伝達を評価する。炎症作用、抗炎症作用、神経保護因子産生に働く各シグナル伝達の機序を明らかにする。

IL-27p28 レポーターマウスを用いて、脳梗塞時にIL-27の発現を、脳、リンパ節、脾臓などから標本を採取し、免疫組織化学染色で評価する。同時に脳標本において、IL-27の発現を示す細胞を免疫組織化学染色およびフローサイトメトリーを用いて同定し、抽出する。抽出した細胞に対してシングルセル解析を行い、IL-27発現を調整する遺伝子群を評価する。

(B)rIL-27の投与による作用機序の解明および治療標的としての有用性の検証

IL-27関連遺伝子のノックアウトマウスにrIL-27を投与した群と対照群で脳梗塞モデルを作成し、摘出標本でMAP2染色を行い、脳梗塞の範囲を計測し比較検討する。

各摘出標本に対して、qRT-PCRやELISAで、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-3、MMP-9、IL-17、IL-23、TGF β などのmRNA発現やたんぱく質の安定性に変化がないか比較検討する。

また、rIL-27の投与方法(動注、静注、髄注、経口)および投与時期・期間・投与量による変化がないか確認を行う。

4. 研究成果

まず IL-27 p28 ノックアウトマウスを用いて脳梗塞モデルを作製した。繁殖に難渋したため、ノックアウトマウス群は IL-27 p28 ノックアウトマウスのみで作製し、対照群と比較した。脳梗塞モデル作製の成功率を高めるため、レーザー血流計(OMEGAFLOW, OMEGAWAVE Inc, Japan)を導入し、中大脳動脈遮断時の血流が遮断前の 20%以下のものを対象とした。脳梗塞モデル作製後 24 時間後に脳を摘出した。

(A) 脳梗塞時における IL-27 の作用機序の解明

脳梗塞モデルマウスより摘出した脳を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、ブレインスライサーを用いて 1mm 厚で作製し、免疫組織化学染色の MAP2 染色で非染色域を梗塞巣とし評価した。対照群と比べ IL-27 p28KO 群で、脳梗塞後 24 時間後では統計学的有意に梗塞体積が低下した(図 1)。

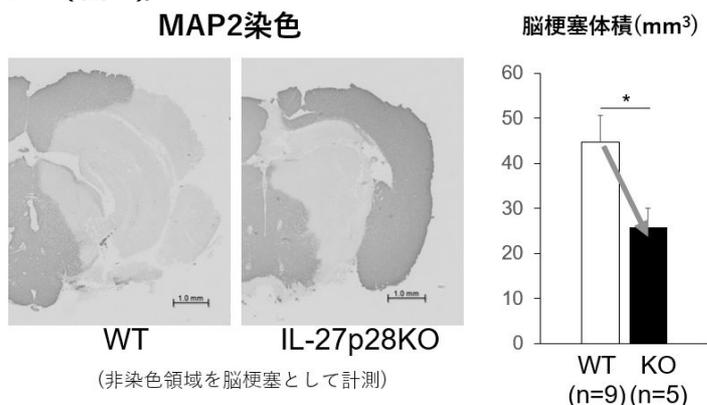


図 1. 脳梗塞 24 時間後の脳梗塞体積。WT 群 n=9, IL-27p28KO 群 n=5 での比較。(* $P<0.05$)

各群で、qRT-PCR を用いて、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、TNF- α の mRNA 発現を評価した。IL-27 p28 ノックアウトマウス群で炎症性サイトカインは統計学的有意に低下した(図 2)。また、フローサイトメトリーを用いて、脳梗塞時の炎症細胞の細胞分画を評価したところ、IL-27 p28 ノックアウトマウス群で、脳梗塞内へ浸潤するマクロファージ、好中球が減少した。さらに、各群のミクログリアの活性化マーカーを確認したところ、MHCclass2 の発現が IL-27 p28 ノックアウトマウス群で低下した(図 3)。

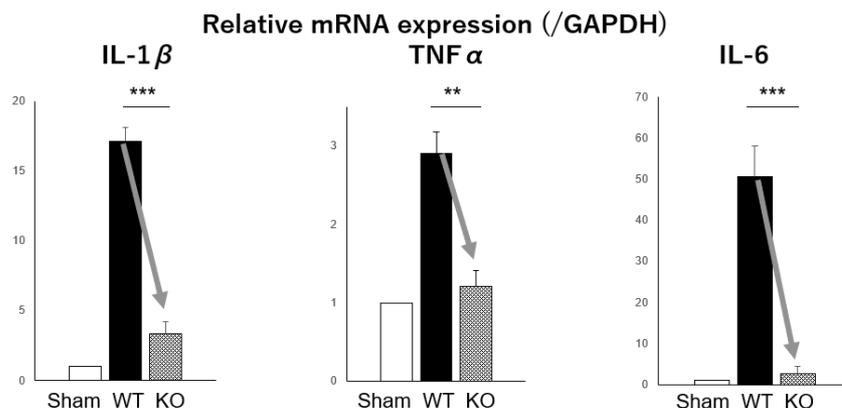


図 2. WT 群、IL-27p28KO 群での脳梗塞 24 時間後の炎症性サイトカインの mRNA 発現。(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.)

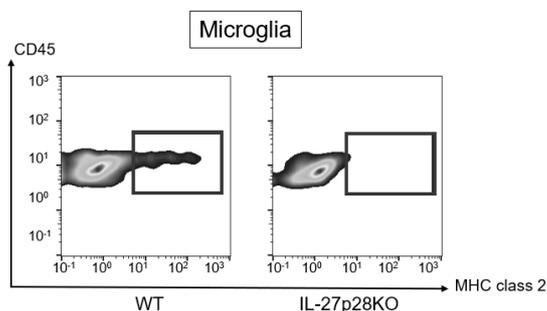


図 3. WT 群、IL-27p28KO 群での脳梗塞 24 時間後のミクログリアにおける MHCclass2 の発現。フローサイトメトリーでの評価。

シグナル伝達については研究期間内に十分な評価を行うことができなかった。

IL-27p28 レポーターマウスを用いて脳梗塞モデルを作製したが、免疫組織化学染色やフローサイトメトリーで IL-27 の同定は困難であった。

(B)rlIL-27 および中和抗体を尾静脈より脳梗塞作製直後に投与し、脳梗塞体積を評価したが、統計学的には差がなかった。期間内に投与方法の十分な評価を行うことができなかった。

【考察と今後の展望】

本研究によって、脳梗塞急性期における IL-27 の関与が示唆された。IL-27 p28 ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、脳梗塞 24 時間後の体積が縮小し、炎症性サイトカインの発現も減少した。脳梗塞急性期において IL-27 は脳保護作用を有する可能性があり、IL-27 を抑制することで、脳保護作用が期待できると考える。

IL-27 p28 ノックアウトマウス以外の IL-27 ノックアウトマウスでの評価や、治療薬としての有用性については今回の研究期間で十分な検討が行えず、今後より詳細に評価していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川隆
2. 発表標題 マウス脳梗塞モデルにおけるIL-27の免疫学的作用機序
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川隆
2. 発表標題 超急性期脳梗塞モデルマウスで IL-27の欠損により脳梗塞体積は減少する
3. 学会等名 STROKE2022
4. 発表年 2021年～2022年

〔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
---------	---------