

発達期大脳皮質における IL-17 受容体の発現と ASD モデルにおけるその変化

神谷 沙羅 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 武井 陽介 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

精神疾患の原因と病態に免疫系の変調が関与しているという知見が集まっている。特にヘルパーT細胞17(Th17細胞)による免疫反応は、自閉スペクトラム症(ASD, 自閉症)、統合失調症、うつ病などの精神疾患の病態に関与することが多くの臨床研究から示唆されている。これらの疾患患者の大脳皮質ではニューロンの配列や層構造の異常、シナプス密度・形態変化などが認められ、その機能異常の基盤となっていると考えられる。しかし、免疫反応がどのような過程で神経系に器質的变化を引き起こすのか不明な点が多く、Th17細胞の寄与については理解が十分に進んでいない。

炎症性サイトカインのインターロイキン(interleukin; IL-)17A産生細胞であるTh17細胞は、腸管の粘膜固有層に多く存在しており、細菌や真菌の感染に対する防御反応、関節リウマチや多発性硬化症などの炎症性自己免疫疾患に関与する。IL-17Aは、IL-17RAとIL-17RCのヘテロ二量体からなる受容体に結合し、NFκB、MAPK、C/EBPを含む下流経路を活性化させ、標的細胞の炎症応答を誘導する。

自閉症は、コミュニケーションの障害や常同的行動パターンが見られ、3歳までに発症する発達障害である。自閉症の環境要因のひとつに母体免疫活性化(maternal immune activation; MIA)がある。MIAは細菌・ウイルス感染によって母体免疫が一過性に活性化される現象である。MIAにより母体内で誘導されたIL-17Aが胎盤を通過し、胎仔脳に作用してASD病態を引き起こす可能性が示されている。また自閉症患者では血中IL-17A濃度が上昇しており、IL-17Aレベルと重症度が相関することが報告されている。しかし、血中IL-17Aの慢性的高値が中枢神経系に対してどのような影響を与えるかは不明である。中枢神経系におけるIL-17Aとその受容体の分布は複数の研究グループから報告されているが、一貫性がなく、現在も議論が続いている。本研究では、①発達期におけるマウス脳の*Il17ra*と*Il17rc*のmRNA発現を*in situ* hybridization(ISH)により調査し、②それぞれの分子を発現している細胞種を検討した。さらに③MIA自閉症モデルの中枢神経系で両者の発現・分布の変化が観察されるのか検討を行った。

【実験方法】

(1) 動物と脳切片作製

本実験には、生後(Postnatal day; P)0, 7, 14, 21, 28, 35日目、成体のC57BL/6Jマウス *Mus musculus* を用いた。所属研究室の先行研究に従い、MIA自閉症モデルは、妊娠12.5日目の雌マウスに20 mg/kgのポリイノシン酸ポリシチジル酸[poly(I:C)]を投与し、生まれた仔を自閉症モデルとした。コントロール群にはPBSを投与した。

マウスを開胸し、1×PBSで脱血後、4% PFA/0.1MPBで灌流固定した。抜脳後、4% PFA/0.1MPB中で一晩浸漬固定した。スライディングミクロトームを使用して脳切片を作製した。

(2) *in situ* hybridization (ISH)

浮遊法でISHを行った。*Il17ra*と*Il17rc*のCDS内に2個ずつ(5'側と3'側)RNAプローブを設計した。シグナルを増強するため、

二つのプローブを混ぜて脳切片と反応させた。抗DIG抗体とNBT/BCIPでシグナルを検出した。

(3) 免疫組織化学染色

IL17受容体を発現する細胞種を同定するために、NeuN(ニューロン)、GFAP(アストロサイト)、IBA1(ミクログリア/マクロファージ)の抗体染色とISHの蛍光二重染色を行った。*mRNA*のシグナルはFastRed(赤色)で検出し、各細胞マーカーをAlexa488標識抗体(緑色)で検出した。

(4) 画像取得と統計解析

医学共通機器室に設置されているオールインワン型顕微鏡BZX-980 (keyence)で写真撮影し、Photoshop (Adobe)を用いて画像処理を行った。JMP (SAS institute)で統計解析を行った。

【結果と考察】

P0, P7, P14, P21(離乳期), P28, P35, 成体の脳で*Il17ra*と*Il17rc*mRNAの発現を調査した。P7以降は、*Il17ra*は大脳皮質V-VI層、特にVIa, VIb層に強く発現していた。調査した発達段階の中ではP14でISHシグナルが最も強く、成体にかけて低下していた。一方、*Il17rc*は調査したすべての発達段階においてII-VI層に分布していた。*Il17rc*は新生仔期(P0~P7)で発現が高く、成体にかけてシグナルが低下する傾向を示した。*Il17ra*, *Il17rc*ともに明確な領野特異性は示さず、大脳皮質全体に分布していることが確認された。

IL17受容体を発現する細胞種を同定するために、各種細胞マーカーとの二重染色を行った。*Il17ra*はNeuN陽性の第VI層ニューロンの約60%に発現していることがわかった。Iba1陽性ミクログリアやGFAP陽性アストロサイトの一部の集団にも発現が観察された。*Il17rc*は、中枢神経系に広く分布していることや、IL17RA以外の複数種のIL17受容体とも複合体を形成するという報告を合わせて考えると、細胞種特異性は低く、多様なIL17シグナル経路に関与するのかもしれない。現在、*Il17ra*が皮質-視床投射ニューロンに特異的に発現しているのか検討するとともに、*Il17ra*と*Il17rc*のdouble ISHを実施し、両者を共発現する細胞の同定を行っている。

MIA自閉症モデルマウスでは、コントロール群と比較して、*Il17rc*の発現レベルおよびその分布パターンに大きな変化は認められなかった。一方、*Il17ra*はP14で顕著な発現低下が観察された。*Il17ra*は、生後の神経回路再編成が盛んな新生仔期から乳児期にかけて発現が強く、成体にかけて発現レベルが低下することと、自閉症モデルで乳児期に*Il17ra*の発現低下が顕著であることから、自閉症の顕在化に関与している可能性がある。

本研究では、予想に反してIL-17A受容体がニューロンに発現していることが明らかになり、IL-17Aとその受容体の中枢神経系における機能を理解する最初の手がかりを得ることができた。今後は、IL-17Aが大脳皮質形態形成にどのような影響を与えるかを直接調べるため、胎仔側脳室にIL-17Aを投与する実験を計画している。