

大脳皮質における IL-17RA/RC 発現の時空間分布：精神疾患モデルを用いた神経免疫連関の検討

久保 明澄（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 (Debnath et al., 2014)。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 (Sanaka et al., 2024)。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 (Choi et al., 2016; Kubo et al., 2024)。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発生・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、それぞれの分子を発現している細胞種を検討した。②IL17RA タンパクの分布を免疫組織化学と免疫細胞染色法で調査した。さらに③MIA 自閉症モデルの大脳皮質で *Il17ra* と *Il17rc* 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、胚性(Embryonic day; E)14, 16, 18 日目、生後(Postnatal day; P)0, 7, 14, 21, 28, 35 日目、成体(P49)の C57BL/6J マウス *Mus musculus* を用いた。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。4% PFA/0.1MPB で灌流固定し、マイクロトームを使用して脳切片を作製した。

(2) *in situ* hybridization (ISH)

Il17ra と *Il17rc* の CDS 内に 2 個ずつ(5'側と 3'側)RNA プロンプを設計した。シグナルを増強するため、二つのプロンプ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 (IHC)

浮遊法で抗 IL17RA 抗体(abcam)を脳切片と反応させた。IL17

受容体を発現する細胞種を同定するために、DCX(未成熟ニューロン)、NeuN(ニューロン)、CTIP2(5層ニューロン)、TBR1(6層ニューロン)、GFAP(アストロサイト)、IBA1(ミクログリア/マクロファージ)の抗体染色を行った。

(4) 免疫細胞染色 (ICC)

E17 胎仔から海馬を取り出し、ニューロンの初代培養を行った。抗 IL17RA 抗体と α -tubulin, MAP2 との共染色を行った。

(5) 画像取得と統計解析

オールインワン型顕微鏡 BZX-980(keyence)、共焦点レーザー顕微鏡 SP8(Leica)で写真撮影し、Photoshop(Adobe), ImageJ で画像処理を行った。JMP(SAS institute)で統計解析を行った。

【結果と考察】

E14~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。調査した発生・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* は胎生中期~新生仔期(E14~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。成体では *Il17ra* は感覚野で強く発現していた。*Il17rc* は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。胎生期は、IL17RA は DCX 陽性の未成熟ニューロンに発現していた。生後発達期には *Il17ra* は NeuN 陽性の第 VI 層ニューロンの約 90% に発現しており、中でも TBR1 陽性の皮質-視床投射ニューロンに優先的に発現していることが確認された。*Il17rc* もニューロンに発現していた。*Il17ra* と *Il17rc* は、ミクログリアやアストロサイトでは発現が観察されなかった。*Il17rc* は、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、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* と *Il17rc* の double ISH を実施し、両者を共発現する細胞の同定を行うとともに、分散培養系を用いて IL17 受容体の細胞内局在について検討を進めている。

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、IL-17A 受容体が免疫系の細胞ではなく、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。