

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 古宮 裕泰
学籍番号 176029

横浜市立大学大学院医学研究科学 神経内科学・脳卒中医学
(指導教員:田中 章景教授)

審 査 員

主 査	横浜市立大学大学院医学研究科 組織学	教授	大保 和之
副 査	横浜市立大学附属病院 遺伝子診療科	講師	宮武 聡子
副 査	横浜市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学	講師	清水 信行

博士の学位論文審査結果の要旨

Ablation of interleukin-19 improves motor function
in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis
(筋萎縮性側索硬化症モデルマウス病態における Interleukin-19 関与の検討)

学位論文の審査にあたり、審査冒頭で以下のように学位研究の要旨が説明された。申請者は上記表題について発表を行った。

【学位論文の概要】

【背景】申請者はこれまでに、ミクログリア活性化に伴い発現増加するサイトカインとし interleukin-19 (IL-19) を同定した。しかしながら筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における IL-19 の役割は未解明である。

【目的】ALS モデルマウス (SOD1G93A Tg マウス)、IL-19 欠損マウスを用いて、ALS 病態における IL-19 の機能解明をする。

【方法】SOD1G93A Tg マウスと、IL-19 欠損マウスを交配し、IL-19 KO/SOD1G93A Tg マウスを作成し生存期間、運動機能の解析を行った。また、同マウスの初代培養細胞と病変部位である腰髄を用い、各病期で免疫組織学的検討、さらには神経障害因子、神経保護因子の測定を行った。

【結果】

SOD1G93A Tg マウスの病変部位である腰髄では、病勢進行に伴った IL-19 mRNA 発現量の上昇を認めた。SOD1G93A Tg マウスと IL-19 KO/SOD1G93A Tg マウスの生存期間に変化は認めなかったが (173 日 vs 178 日、N=30)、IL-19 KO/SOD1G93A Tg 群で Rotarod 試験による有意な運動機能の改善を認めた。病理学的には、IL-19 欠損群の腰髄において、CD68 陽性ミクログリアの減少と Arginase1 陽性ミクログリアの上昇を認めた。また腰髄の定量 PCR では、TNF- α 、GDNF、Tgf- β 1 の上昇を認めた。初代培養ミクログリア、アストロサイトでは IL-19 欠損群で、TNF- α の上昇を認め、それに伴うアストロサイト由来の GDNF の上昇を認めた。IL-19 シグナリングの欠損は、ミクログリアのフェノタイプ変化、アストロサイト由来の GDNF 放出を増加させることで神経保護効果をもたらし、運動機能改善に寄与している可能性が考えられた。

【結論】IL-19 シグナリングの欠損が、ALS 病態改善につながる可能性がある。

【審査員からの質問内容】

主査 副査より以下の質疑応答が行われた。

副査 宮武審査員からの質問

1. 本実験では、SOD1G93A Tg マウスを使用しているが、ヒトの場合も、下肢に強い症状がでるのか。

→SOD1 遺伝子変異をともなう家族性 ALS では下肢からの発症が多いといわれている。しかし、SOD1 変異の種類により、必ずしも上位運動ニューロン徴候をともなわない症例の存在など、発症後の経過や罹病期間が異なっている。

2. ヒトの ALS において、脳脊髄液や腰髄などの検体で IL-19 が関与しているデータはあるのか

→本研究において、正常圧水頭症 3 例と、ALS 患者 3 例の脳脊髄液を使用し、IL-19 の ELISA 法による測定を試みた。ALS 患者検体において軽度の IL-19 上昇をみとめたが、少数例での検討であり、有意差はついていない。今後症例数を増やし検討していく予定である。

3. 本研究では IL-19 と中枢神経疾患モデルマウスの関与を検討した他実験と比較して、予想と反した結果が得られているが、どのように考察するか。

→本研究以外の実験系では、急性炎症を模したモデルマウスを使用している。一方、本研究では比較的慢性の炎症をきたす神経変性疾患モデルマウスを使用している。おそらく、急性炎症時と慢性炎症時における IL-19 の放出量には大きな差があるため、急性炎症モデルマウスにおける研究から想定された結果とは異なっていたと考えている。

4. ALS モデルマウスの病態修飾において、IL-19 はどれだけ主要な役割をはたしていると考えているか

→本研究では、運動機能の改善は認めたものの、生存期間の延長は認めていない。おそらく疾患修飾の一翼を担っているものとは考えるが、モデルマウスの生存期間を修飾する中核的役割を果たしているわけではないと考える。

5. 実際の治療応用はどう考えていくか

→IL-19 を欠損させることは実臨床では困難と考える。しかしながら IL-19 欠損にともない変動した、TNF- α や GDNF などを標的とした治療が臨床応用につながる可能性がある。

副査 清水審査員からの質問

1. IL-19 受容体の役割についてもう一度説明をしてください。

→IL-19は、その受容体である IL-20R1 と IL-20R2 のヘテロ二量体と結合した後、各種のシグナルを伝達するとされている。中枢神経系の全細胞において、IL-20R2 の発現が認められる一方で、IL-20R1 の発現はミクログリアにのみ認められることから、中枢神経系においてはミクログリアのみが IL-19 の機能的受容体を発現可能な細胞であると考えている。

2. IL-19 欠損マウスから作成した、ミクログリアからの IL-19 放出は完全でないことを確認したか。また IL-19 受容体については確認しているか。

→IL-19 欠損マウスから作成した初代培養ミクログリアにおいて、IL-19 が mRNA レベルで欠損していることを定量リアルタイム PCR により確認している。

また受容体については、IL-20R1 が病勢進行にともない SOD1Tg マウスの腰髄において発現増加することを確認している。一方 IL-20R2 は病初期から発現しており、病勢進行にともない発現レベルの変化をみとめないことを、定量リアルタイム PCR で確認をしている。

3. 腰髄の免疫染色で、IL-19 欠損群において神経細胞の残存を認める印象を受けるが、統計学上の有意差はつかなかったのか。病変部位の腰髄以外での検討は行ったのか。

→腰髄の病理学的検討では、神経細胞数に関して統計学的な有意差は認めなかった。また、頸髄においても、神経細胞数、グリオシスともに、2群間での統計学的な差は明らかでなかった。

4. ミクログリアの毒性転換にかかわる因子として、一般的に TNF- α は炎症性サイトカインとして働く可能性あるが、運動機能改善に働いた理由はどう考察するか。

→TNF- α の絶対量が関与していると考えている。初代培養を使った実験系においても TNF- α 刺激にともないアストロサイトからの GDNF の上昇をみとめた。しかしながら、TNF- α の濃度依存的に GDNF が上昇するわけではなく、ある濃度で GDNF の遺伝子発現量が頭打ちになった。つまり、TNF- α は少量であれば神経保護的に働くことで運動機能改善に寄与し、大量であれば一般に知られているように神経毒性因子として働く可能性があると考えている。

主査 大保より以下の質問が行われた。

1. ヒト髄液検体で使用した ALS は、家族性 ALS 症例か、孤発性 ALS どちらを使用したのか

→今回使用した髄液は孤発性 ALS3 例、疾患コントロールとして正常圧水頭症 3

例の髄液を使用した。ELISA 法で IL-19 を測定した。

2. ミクログリアは発生したときに、すでに不均一性があるのか、もともとはある程度均一な集団で、何らかの刺激によりヘテロな集団に分かれていくのか
→神経変性疾患モデルマウスにおけるシングルセル解析の結果から、脳内に存在するミクログリアの多様性が明らかになりつつある。次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析や一細胞解析といった技術革新により、アルツハイマー病モデルマウスなど、神経障害が認められる脳では disease-associated microglia (DAM) と呼ばれる、特殊な遺伝子発現プロファイルを示すミクログリア集団が現れることが明らかになっている。つまり、当初は比較的均一であった集団が、神経変性の進行にとともに、不均一な集団に変化している可能性があると考えている。

3. 神経傷害性ミクログリアや神経保護性ミクログリアのマーカーとして使用した、CD68 や Arginase1 を選択した理由について
→既報告において、神経傷害性ミクログリアのマーカーとして CD68、iNOS、IL-6、IL-1 β 、神経保護性ミクログリアのマーカーとして、Arginase1、CD206、Ym-1 などが知られているが、その中で免疫組織学的染色により評価、判断可能なものを選択した。

4. IL-19 の受容体とされる、IL-20R1 と IL-20R2 は単独でシグナルを伝えることができるのか、それとも両サブユニットが存在しないとシグナルを伝えることはできないのか。
→免疫系細胞には IL-20R2 の発現は認められるものの IL-20R1 は認められないとの報告が多い。しかしながら、IL-19 が直接免疫系細胞に作用を示す報告も数多くあることから、IL-20R2 のみでシグナル伝達が起こる可能性や IL-20R1/IL-20R2 以外の IL-19 受容体の存在も想定されている。

5. サイトカインの上昇を SOD1 Tg マウスの腰髄で検出しているが、それぞれのサイトカインはどの細胞から放出されているのか。
→今回は腰髄全体での定量リアルタイム PCR を行ったため、個々の細胞レベルでの確認はできていない。主査大保先生より、個々の細胞での発現量の *in situ* hybridization などでの確認を推奨いただいたため、今後、技術習得を含め実験を行っていくこととした。

また、博士号発表内容として、現段階までの患者サンプルの検索、FACS 解析の結果を、途中経過として含めることとした。この他にもいくつかの質疑が行われたが、いずれも適切な回答が得られた。

本研究は ALS モデルマウスにおいて IL-19 シグナルの欠損が、ミクログリアのフェノタイプ変化、アストロサイト由来の GDNF 放出を増加させることで神経保護効果をもたらし、運動機能改善に寄与していること示唆したものであり、学術的かつ臨床的に高く評価できる内容である。審査の結果、本研究は、横浜市立大学博士（医学）の学位(甲号)に値するものと判定された。