

# 学位論文の要旨

## **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)

March, 2022

(2022 年 3 月)

Hiroyasu Komiya

古宮 裕泰

**Department of Neurology and Stroke Medicine**

**Yokohama City University Graduate School of Medicine**

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 神経内科学・脳卒中医学

**(Doctoral Supervisor : Fumiaki Tanaka, Professor)**

( 指導教員 : 田中 章景 教授 )

## 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)

<https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-021-00785-8>

### 【序論】

神経変性疾患は、進行性に神経細胞の形態や機能が障害され、それに基づく神経症状を発現する疾患の総称である。代表的な神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、進行性かつ不可逆な運動神経細胞の変性・脱落により運動機能が著しく障害される難病である。ALS の疾患病態として、従来は神経細胞自体の機能不全や細胞死が注目されてきたが、近年、発生過程で全身に分布し各臓器の自然免疫と恒常性のセンサーを担う単球系細胞が、神経系の恒常性破綻に伴って活性化や浸潤を来すことで、疾患が重篤化することが判明しつつある。本研究では、単球系細胞のなかでも、恒常的に中枢神経内に存在するミクログリアに注目した。我々はこれまでに活性化ミクログリアからネガティブフィードバック因子として放出されるサイトカインである Interleukin-19 (IL-19) を同定し (Horiuchi. et al., 2015), 各種神経疾患との関係を示唆する知見を得ていたが、IL-19 の神経変性疾患病態における関与については不明であった。そこで、ALS モデルマウスであるヒト superoxide dismutase1 G93A 変異トランスジェニックマウス (SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウス) と IL-19 欠損マウス (IL-19<sup>-/-</sup>マウス) を交配し、その運動機能、生存期間、病態・病理を解析することで、ALS の病態形成における IL-19 の役割の解明をめざした。

### 【実験材料と方法】

まず ALS モデルマウスである SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスの病変部位である腰髄と初代培養ミクログリアから RNA を抽出、complementary DNA (cDNA) を作成し、IL-19 遺伝子発現量の経時的変化を解析した。次に SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスと IL-19<sup>-/-</sup>マウスを交配することで、IL-19<sup>-/-</sup>/SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスを作成し、10 週から 25 週前後の雌マウスにおいて、生存期間、体重に加え、Wire hang test, Rotarod test で運動機能を経時的に評価した。さらに、SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスと IL-19<sup>-/-</sup>/SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスを、病初期 (12 週), 病中期 (16 週), 病後期 (20 週), 病末期 (24 週~26 週) に分け組織学的解析を行った。病期毎に腰髄のパラフィン、凍結切片を作成し、Nissle 染色, 免疫染色を行った。また同マウスの病変部位の腰髄とグリア初代培養 (ミクログリア, アストロサイト) から RNA を抽出、cDNA を作成し、神経傷害因子、神経保護因子の遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR 法で測定した。(承認番号: F-A-19-032)

## 【結果】

SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスの腰髄と初代培養ミクログリアでは、病勢進行に伴った IL-19 mRNA 発現増加を認めた。IL-19<sup>-/-</sup>/SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスは、SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスに比べ、生存期間に有意差は認めなかったが (173 日 vs 178 日, n = 30), 有意な運動機能の改善を認めた。運動機能改善を認めた週齢の腰髄では、神経傷害性ミクログリアマーカーである CD68 陽性ミクログリアの減少と神経保護性ミクログリアマーカーである Arginase1 陽性ミクログリアの増加が生じていることを明らかにした。また、Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor (GDNF), Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) の発現増加も認められた。さらに、IL-19<sup>-/-</sup>/SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウス由来の初代培養ミクログリア, アストロサイトでは、SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスに比べ、TNF- $\alpha$  の産生増加と、それに伴うアストロサイト由来の GDNF 発現の増加を認めた。

## 【考察】

本研究では、活性化ミクログリアからネガティブフィードバック因子として放出される抗炎症性サイトカイン IL-19 について、神経変性疾患の病態形成における役割を解析した。通常、抗炎症性サイトカインとして作用することの多い IL-19 を欠損させると、神経炎症の惹起により病態が悪化することを予測していたが、当初の予測に反し、ALS モデルマウスである SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスでは運動機能が改善することが明らかになった。本研究では IL-19<sup>-/-</sup>/SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウス由来の初代培養ミクログリア, アストロサイト, さらに腰髄において、SOD1<sup>G93A</sup> Tg マウスに比べ、炎症性サイトカインとして知られる TNF- $\alpha$  の有意な産生増加を認めた。既報告においても、TNF- $\alpha$  の受容体である TNF- $\alpha$  受容体 type 1 の欠損が、ALS モデルマウスの生存期間の短縮や、運動神経の減少に関与するとの報告がある (Brambilla et al., 2016)。これは TNF- $\alpha$  受容体を介した TNF- $\alpha$  シグナルが ALS に保護的に働いてくことを示唆している。本研究においても、IL-19 欠損は、ミクログリアのフェノタイプ変化に加え、炎症性サイトカインと考えられる TNF- $\alpha$  の上昇により、結果的に神経保護因子である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ている可能性が考えられた。

## 引用文献

- Brambilla, L., Guidotti, G., Martorana, F., Iyer, A. M., Aronica, E., Valori, C. F., & Rossi, D. (2016). Disruption of the astrocytic TNFR1-GDNF axis accelerates motor neuron degeneration and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, *25*(14), 3080-3095.
- Horiuchi., Parajuli, B., Wang, Y., Azuma, Y. T., Mizuno, T., Takeuchi, H., & Suzumura, A. (2015). Interleukin-19 acts as a negative autocrine regulator of activated microglia. *PLoS One*, *10*(3), e0118640.

## 論文目録

### I 主論文

Ablation of interleukin-19 improves motor function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.

Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Suzuki K, Ogasawara A, Takahashi K, Azuma YT, Doi H, Tanaka F.

Mol Brain. 2021 Apr 30;14(1):74.

### II 副論文

CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice.

Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Hatooka Y, Takahashi K, Katsumoto A, Kubota S, Nakamura H, Kunii M, Tada M, Doi H, Tanaka F.

Mol Brain. 2020 Apr 29;13(1):64.

### III 参考論文

Interleukin-19 Abrogates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Attenuating Antigen-Presenting Cell Activation.

Horiuchi H, Parajuli B, Komiya H, Ogawa Y, Jin S, Takahashi K, Azuma YT, Tanaka F, Suzumura A, Takeuchi H.

Front Immunol. 2021 Mar 11; 12: 615898.