

Mini Review

インターロイキン-17Aによる大脳皮質内ミクログリア活性化と局在への影響—IL-17Aによる大脳皮質構築異常とASD発現機構の理解を目指して—

佐々木哲也^{1,2)}, 鮑培毅^{1,2)}, 高田拓弥^{1,3)}, 武井陽介^{1,2)}

抄録: 妊娠中のウイルス感染は、仔のASD発症リスクを上昇させる。ウイルス感染時にTh17細胞が産生するインターロイキン(IL)-17AがASD病態生理の責任分子であることが示唆されている。私たちはIL-17Aをマウス脳室内に直接投与し、ミクログリアへの影響を調査した。IL-17Aに曝されたミクログリアは活性化し、帯状回皮質の脳室面に局在していた。本研究は、免疫分子IL-17AがASDの原因となる大脳皮質構築異常を引き起こすメカニズム理解の手がかりを与える。

日本生物学的精神医学会誌 31 (3) : 154-158, 2020

Key words : autism spectrum disorder, CD68, cerebral cortex, IL-17A, microglia

はじめに

自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder : ASD) は①コミュニケーションの障害および②限定された反復的な行動様式 (常同行動) によって特徴づけられる発達障害であり、しばしば認知機能の障害を伴う²³⁾。アメリカ疾病予防管理センターの最近の調査によると、59人に1人がASDであると推定されている。特別教育の必要性や医療費など、ASDによる社会経済への負担は大きい^{9, 18)}。現在のところ明確なバイオマーカーが存在せず、ASDの発症・病態メカニズム解明と治療法の確立が求められている。

これまでに複数の原因がASDの発症に関与することが知られている。ASDリスク遺伝子の多くはシナプス機能や転写調節、クロマチンリモデリング

に参与していることが先行研究により示されている²⁾。しかし、単一遺伝子の変異で病因・病態を説明できるASDは限られており、複数遺伝子の変異と胎児期の環境要因との相互作用によって、ASDの神経回路異常が生じると考えられている。

ASDの要因の一つに、母体免疫活性化 (maternal immune activation : MIA) がある。MIAは細菌やウイルス感染によって母体免疫が活性化される炎症反応である。妊娠中のウイルス感染が仔のASD発症確率を上昇させることが疫学調査と動物モデルにおいて報告されている^{8, 17, 24)}。MIAにより誘導された免疫分子が胎盤を通過し、胎児脳のASD病態が形成されることが考えられる¹²⁾。母体の全身性の免疫反応を伴う子癇前症に曝露された胎児でASD発症リスクが増加することが示唆されている²²⁾。

近年、ASDの発症にTh17およびインターロイキ

受理日 : 2020年6月15日

Effects of IL-17A on activation and localization of microglia in murine cerebral cortex — Aiming to understand cortical abnormalities and ASD pathogenesis by IL-17A —

1) 国立大学法人筑波大学医学医療系 解剖学・神経科学研究室 (〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1) Tetsuya Sasaki, Peiyi Bao, Takuya Takada, Yosuke Takei : Department of Anatomy and Neuroscience, Faculty of Medicine, University of Tsukuba. 1-1-1, Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577, Japan

2) 国立大学法人筑波大学大学院 人間総合科学学術院 ニューロサイエンス学位プログラム (〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1) Tetsuya Sasaki, Peiyi Bao, Yosuke Takei : PhD Program of Neurosciences, Degree Program of Comprehensive Human Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba. 1-1-1, Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577, Japan

3) 国立大学法人筑波大学医学群医学類 (〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1) Takuya Takada : Faculty of Medicine, University of Tsukuba. 1-1-1, Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577, Japan

【佐々木哲也 E-mail : tsasaki@md.tsukuba.ac.jp】

【武井陽介 E-mail : ytakei@md.tsukuba.ac.jp】

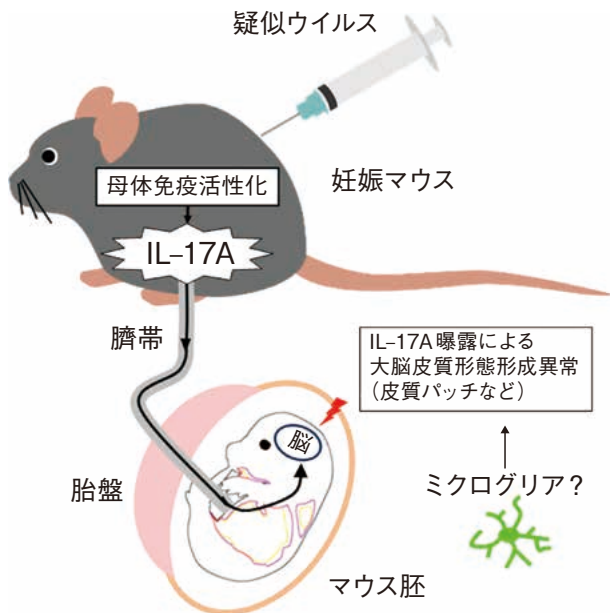


図1 母体免疫活性化 (MIA) における IL-17A サイトカインシグナルと ASD 病態

妊娠マウスにウイルスを模した2本鎖RNA合成ペプチドである poly (I:C) を投与して MIA を誘導する。母体血清中の IL-17A 濃度が上昇し、胎盤を通して胎仔に作用する。IL-17A に曝露された胎仔脳の大脳皮質構築異常が生じ、ASD の表現型につながると考えられる。(文献3を元に作成)

ン (interleukin:IL) -17A の関与が示されている (図1)。IL-17A 産生細胞として同定された CD4⁺ヘルパー T 細胞の一つであるヘルパー T 細胞 17 (Th17) は腸に特に多く局在する⁵⁾。ASD 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¹⁾。MIA モデルマウスでは疑似ウイルス感染時に母体 IL-17A 産生が誘導されるが、抗 IL-17A 抗体の投与や Th17 産生に寄与する腸内細菌 (セグメント細菌) を欠損させることにより、仔の ASD 様脳構造および行動の異常がレスキューされる^{3, 7)}。これらの結果は、MIA を原因とする ASD において IL-17A がその発症と病態形成に寄与する可能性を示している。MIA モデルマウスでは、社会行動の異常、常同行動の増加、大脳皮質パッチ形成など ASD 病態に非常に近い表現型が報告されている^{3, 26)}。しかし、IL-17A が胎仔脳のどの細胞種に作用し ASD 病態につながるのかはわかっていない。本稿は、当研究室から発表された論文 “Intraventricular IL-17A administration activates microglia and alters their localization in the mouse embryo cerebral cortex¹⁹⁾” の内容を Mini Review として紹介するものである。

1. IL-17A 脳室内投与によるミクログリアへの影響

IL-17A は炎症性サイトカインの一つであり、IL-17A ~ F の 6 分子からなる IL-17 ファミリーに属する。IL-17A は IL-17RA と IL-17RC の複合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、サイトカイン・ケモカインの発現や好中球の遊走など炎症応答を惹起させる⁶⁾。中枢神経系では、ミクログリアが IL-17RA を発現していることが報告されている^{4, 10)}。IL-17A/IL-17RA シグナルとミクログリアとの関係を解析した先行研究の多くは *in vitro* であり、IL-17A が *in vivo* の神経発達過程において、ミクログリアにどのような影響を与えるかは不明である。

筆者らは、IL-17A を産生する Th17 細胞の分化に必要な分子である RORγt (レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γt) を過剰発現するマウスを用いて恒常的 IL-17A 上昇の中枢神経系への影響を調べており^{21, 25)}、これまでに成体の RORγt Tg マウスの海馬では、ミクログリアの密度と活性状態が低下していることを見いだしている (Sasaki et al, *in revision*, doi : 10.21203/rs.3.rs-23233/vi)。IL-17A の持続的高値は、免疫システムの抑制系を刺激している可能性がある。

本研究では、IL-17A が発生中の脳のミクログリアにどのような影響を与えるかを直接調べるため、ニューロン産生時期である胚性 14 日 (E14) のマウス胎仔側脳室に IL-17A recombinant protein を投与した (図2)¹⁹⁾。胚性 18 日 (E18) で胎仔脳を取り出し、脳切片を作成して大脳皮質内のミクログリアの数と分布を Iba1 抗体を用いて検討した。その結果、生理食塩水投与群と比較して IL-17A を投与した大脳皮質では、Iba1 陽性ミクログリア総数は変化しなかったが、外側 (一次体性感覚野) よりも内側 (帯状回皮質) に多数確認された。それらの Iba1 陽性ミクログリアは大脳皮質内部よりも脳室帯・脳室下帯に多く分布しており、細胞体が大きく、突起が短い形態を示した。またこれらの細胞は、貪食活性 (菌やその他の固形物を取り込む作用) を示すマーカー分子である CD68 (LAMP ファミリーに属する I 型膜貫通糖タンパクで主にリソソームやエンドソームに局在する) を高発現しており、活性状態にあることがわかった。

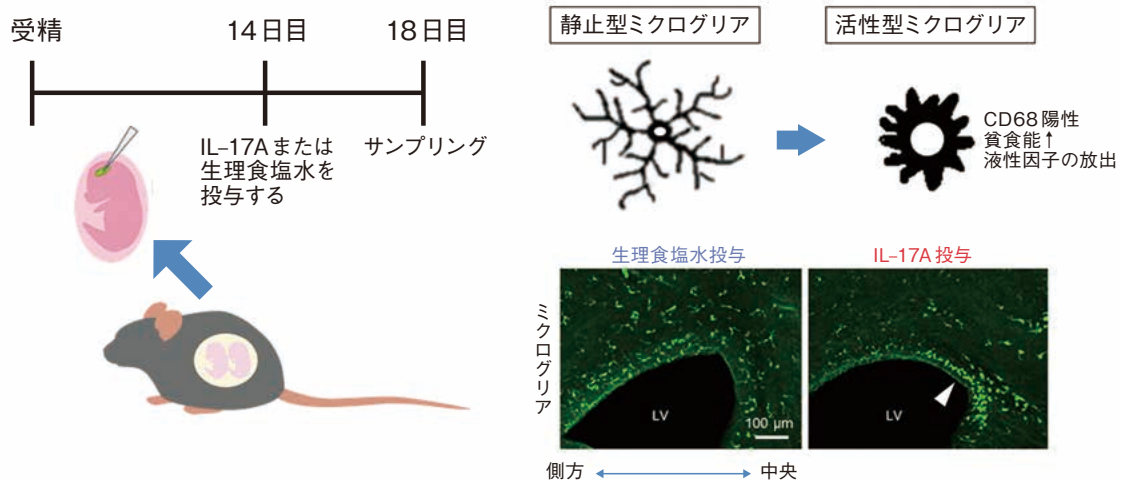


図2 IL-17A投与により活性化したミクログリアが帯状回皮質の脳室側に分布する

(A) 実験の概略。胚発生14日目のマウス胎仔の脳室にIL-17Aまたは生理食塩水を投与する。胚発生18日目に胎仔マウス脳をサンプリングし、抗Iba1抗体を用いてミクログリアの分布を調べた。(B) ミクログリアは普段は細胞体が小さく細かく分岐した突起をもっている。活性化すると突起が短くなり、細胞体が大きくなる。貪食作用のためCD68を多く発現するようになる。(C) IL-17A投与により活性化したミクログリアが大脳皮質の帯状回皮質の脳室付近に多数分布する様子が観察された(矢頭)。LV:側脳室(文献19より引用改変)

2. まとめ

ASD患者の脳内では、炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6, IFN- γ)やケモカイン(IL-8)の増加がみられ、弱い炎症状態にあることが示唆されている¹¹⁾。また、MIAによる行動異常にミクログリアの活性化が関与しており、貪食関連分子や細胞運動関連分子の発現プロファイルの変化が起こることが示されている¹³⁾。またMIAマウスの行動異常は、ミノサイクリンやルテオリン投与によるミクログリア活性化の抑制により改善する^{13, 16)}。これらの知見は、MIAがマウス胎児脳におけるミクログリア活性化状態を変化させ、炎症を介した神経回路異常を引き起こしている可能性を示唆している。

本研究では、IL-17Aの脳室内投与は体性感覚野および帯状回のミクログリア数を変化させなかったが、CD68陽性の活性化ミクログリアの割合を増加させた。この結果はE14におけるIL-17A投与がミクログリアを活性化させ、貪食能を向上させたことを示している。ミクログリアの活性化はしばしば細胞増殖を伴う。細胞増殖を伴わない活性化が認められたという点は、IL-17Aのミクログリアへの作用を考えるうえで興味深い。

ミクログリアの大脳皮質への侵入は、軟膜、脳室膜、脈絡叢からの3つの経路がある¹⁴⁾。ミクログリアは皮質の髄膜側・脳室側で観察されるが、脳室帯では活性化型ミクログリアが多く存在する¹⁵⁾。この活性化型ミクログリアは神経前駆細胞を貪食し、

ニューロン数を調節する役割を果たす。IL-17A投与群では、帯状回皮質の脳室帯・脳室下帯におけるCD68陽性ミクログリアが多かった。このことから、異所性に分布する活性化型ミクログリアにより神経前駆細胞が過剰に貪食され、ASDにみられる大脳皮質形態形成異常[例:皮質パッチや興奮性・抑制性バランスの乱れ^{3, 20)}]が引き起こされる可能性を筆者らは想定している。ただし、本研究はIL-17A投与のミクログリアに対する影響をE18においてのみ検討しているため、IL-17Aによるミクログリアの動態および活性化に対する影響は、今後経時的に追跡し検討する必要がある。現在、IL-17受容体の中枢神経系の発生・発達に伴う発現変化も含めて、詳細な解析を計画している。

おわりに

本研究は、筑波大学医学医療系の大塚優江さんに技術的なサポートをいただいた。本研究の一部は、先進医薬研究振興財団、内藤記念科学振興財団、武田科学振興財団、基礎生物学研究所・共同利用研究(Nos. 19-509; 20-507)のサポートの下で行われた。佐々木は、新学術領域「マルチスケール脳」(<http://multiscale-brain.umin.ne.jp/>)のサポートを受けている。すべての動物実験は国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程に従って行われた。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Al-Ayadhi LY and Mostafa GA (2012) Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *J Neuroinflammation*, 9 : 158.
- 2) Bourgeron T (2015) From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Neurosci*, 16 (9) : 551-563.
- 3) Choi GB, Yim YS, Wong H, et al (2016) The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351 (6276) : 933-939.
- 4) Das Sarma J, Ciric B, Marek R, et al (2009) Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*, 6 : 14.
- 5) Dong C (2008) TH17 cells in development : an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*, 8 (5) : 337-348.
- 6) Gaffen SL (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*, 9 (8) : 556-567.
- 7) Kim S, Kim H, Yim YS, et al (2017) Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*, 549 (7673) : 528-532.
- 8) Kuzniewicz MW, Wi S, Qian Y, et al (2014) Prevalence and neonatal factors associated with autism spectrum disorders in preterm infants. *J Pediatr*, 164 (1) : 20-25.
- 9) Lavelle TA, Weinstein MC, Newhouse JP, et al (2014) Economic burden of childhood autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 133 (3) : e520-529.
- 10) Li Q, Cheng Z, Zhou L, et al (2019) Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron*, 101 (2) : 207-23 e10.
- 11) Li X, Chauhan A, Sheikh AM, et al (2009) Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J neuroimmunol*, 207 (1-2) : 111-116.
- 12) Lombardo MV, Moon HM, Su J, et al (2018) Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*, 23 (4) : 1001-1013.
- 13) Mattei D, Ivanov A, Ferrai C, et al (2017) Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Transl Psychiatry*, 7 (5) : e1120.
- 14) Menassa DA and Gomez-Nicola D (2018) Microglial Dynamics During Human Brain Development. *Front Immunol*, 9 : 1014.
- 15) Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide AL, et al (2007) Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, 66 (5) : 372-382.
- 16) Parker-Athill E, Luo D, Bailey A, et al (2009) Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism. *J Neuroimmunol*, 217 (1-2) : 20-27.
- 17) Patterson PH (2011) Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol Med*, 17 (7) : 389-394.
- 18) Roddy A and O'Neill C (2019) The economic costs and its predictors for childhood autism spectrum disorders in Ireland : How is the burden distributed? *Autism*, 23 (5) : 1106-1118.
- 19) Sasaki T, Tome S and Takei Y (2020) Intraventricular IL-17A administration activates microglia and alters their localization in the mouse embryo cerebral cortex. *Mol Brain*, 13 : 93.
- 20) Stoner R, Chow ML, Boyle MP, et al (2014) Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *N Engl J Med*, 370 (13) : 1209-1219.
- 21) Tome S, Sasaki T, Takahashi S, et al (2019) Elevated maternal retinoic acid-related orphan receptor-gamma enhances the effect of polyinosinic-polycytidylic acid in inducing fetal loss. *Exp Anim*, 68 (4) : 491-497.
- 22) Walker CK, Krakowiak P, Baker A, et al (2015) Pre-eclampsia, placental insufficiency, and autism spectrum disorder or developmental delay. *JAMA pediatr*, 169 (2) : 154-162.
- 23) Wiggins LD, Rice CE, Barger B, et al (2019) DSM-5 criteria for autism spectrum disorder maximizes diagnostic sensitivity and specificity in preschool children. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 54 (6) : 693-701.
- 24) Yockey LJ and Iwasaki A (2018) Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity*, 49 (3) : 397-412.
- 25) Yoh K, Morito N, Ojima M, et al (2012) Overexpression of RORgamma under control of the CD2 promoter induces polyclonal plasmacytosis and autoanti-

body production in transgenic mice. *Eur J Immunol*,
42 (8) : 1999–2009.
26) Reed MD, Yim YS, Wimmer RD, et al (2020) IL-

17a promotes sociability in mouse models of neuro-
developmental disorders. *Nature*, 577 (7789) , 249–
253.

■ ABSTRACT

**Effects of IL-17A on activation and localization of microglia in murine cerebral cortex
— Aiming to understand cortical abnormalities and ASD pathogenesis by IL-17A —**

Tetsuya Sasaki^{1,2)}, Peiyi Bao^{1,2)}, Takuya Takada^{1,3)}, Yosuke Takei^{1,2)}

- 1) *Department of Anatomy and Neuroscience, Faculty of Medicine, University of Tsukuba*
- 2) *PhD Program of Neurosciences, Degree Program of Comprehensive Human Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba*
- 3) *Faculty of Medicine, University of Tsukuba*

Viral infection during pregnancy has been suggested to increase probability of autism spectrum disorder in offspring. This phenomenon has been modeled in rodents subjected to maternal immune activation (MIA). Previous studies showed that maternal T helper 17 cells and the effector cytokine interleukin-17A (IL-17A) play a central role in MIA-induced behavioral abnormalities and cortical dysgenesis called cortical patch in offspring. However, it is unclear how IL-17A acts on fetal brain cells to cause ASD pathologies. To assess the effect of IL-17A on cortical development, we performed direct administration of IL-17A into lateral ventricles of fetal mouse brain. We analyzed injected brain focusing on microglia, which express IL-17A receptors. We found that IL-17A activated microglia and altered their localization in the cerebral cortex. Our data suggest that IL-17A activates cortical microglia, which could lead to a series of ASD-related brain pathology, including excessive phagocytosis of neural progenitor cells in the ventricular zone.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 31 (3) : 154–158, 2020)
