



Increased Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells in the Brain Exacerbate the Pathogenesis of Sepsis-Associated Encephalopathy and Sepsis-Induced Anxiety in Mice

森山, 直紀

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8773号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100489998>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Increased Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells in the Brain Exacerbate the Pathogenesis of Sepsis-Associated Encephalopathy and Sepsis-Induced Anxiety in Mice

脳内インターロイキン 17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の増加が
マウスにおける敗血症関連脳症および敗血症誘発性不安症の病態を悪化させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
災害・救急医学
(指導教員 : 小谷穰治教授)

森山 直紀

敗血症は、『感染に対する制御不能な宿主応答に起因した命を脅かす多臓器不全』として定義される。この疾患は、重症患者における多臓器不全の最も一般的な原因である。敗血症患者は、しばしばせん妄や昏睡などの神経症状を呈する。これらの神経症状は敗血症関連脳症 (SAE) が原因であると考えられている。SAE は患者の死亡率や長期予後との関連が示されているが、治療方法は確立されていない。

敗血症は非常に致死率の高い疾患であったが、医療の発展とともに劇的に救命率が改善され、現在では患者の長期予後が注目されている。近年の研究から、敗血症患者は退院後 2 年間で約半数しか社会復帰できていないことが分かった。また、多くの敗血症生存者が遷延する精神、認知、運動機能障害を患っていることが明らかになり、社会復帰を妨げている。これらの重篤な後遺症は、敗血症後症候群 (PSS) と呼ばれるが、発症機序も含めて不明点な点が多い。

敗血症モデルマウスの研究から、ミクログリアが SAE や精神障害の発症に関与することが明らかになってきた。Andonegui らは末梢血から浸潤した炎症性単球がミクログリアを活性化し、SAE の発症に関与することを報告した。また、Saito らは敗血症誘導後 1 週間目において、敗血症マウスの不安様行動が増悪していることを確認し、脳で T 細胞が増加することを示した。これらの結果は、敗血症後、脳での免疫細胞の活性化が SAE や精神障害の病態形成に関与することを示唆する。一方、健常マウスの恐怖刺激への応答に、髄膜由来の $\gamma\delta$ T 細胞が関与することが示された。脳に存在する $\gamma\delta$ T 細胞はインターロイキン (IL)-17 を産生するが、これを介して神経細胞と相互作用し、正常な恐怖刺激に対する反応を制御している。その一方で、過剰な IL-17 分泌は神経細胞の障害を誘導し、神経症状を悪化させることが示されている。しかし、敗血症下における $\gamma\delta$ T 細胞や IL-17 の動態は不明であり、SAE や精神障害の発症に関与するかは分かっていない。

そこで我々は、脳の $\gamma\delta$ T 細胞とそれに由来する IL-17 が急性期における SAE および敗血症に伴う精神障害の発症に関与するか検討した。

C57BL/6J マウスを一週間、馴化させた後、0.5 mg/g 体重の糞便懸濁液 (CS) を腹腔内投与することで敗血症を誘導した。まず、敗血症誘導後の脳における免疫細胞の分布および IL-17 mRNA レベルを経過時間的に解析した。次に、 $\gamma\delta$ T 細胞および IL-17 の敗血症重症度依存的な変化、最後に、 $\gamma\delta$ T 細胞および IL-17A を枯渇させた場合に敗血症マウスの不安様行動に及ぼす影響について解析した。

敗血症マウスの脳における免疫細胞の動態を調べたところ、敗血症誘導後すぐにミクログリアは増加し、少なくとも 30 日間は減少しなかった。単球と好中球数は敗血症誘導から 8 日目でピークに達した。この時、T 細胞の増加も認め、CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の数はほとんど変わらなかったが、 $\gamma\delta$ T 細胞は顕著に増加した。この細胞の増加は敗血症誘導から 15 日目まで認められ、その後、すみやかに減少に転じた。同時期において脳中の IL-17 mRNA レベルが増加していた一方、血中の IL-17A 濃度は敗血症誘導から 12 時間後でピークに達し、脳の動態とは異なっていた。

敗血症重症度依存的な $\gamma\delta$ T細胞の応答を解析するため、マウスを3群に分け、CSをそれぞれ0、0.2、0.5 mg/g体重投与した。敗血症誘導から8日目において脳中の $\gamma\delta$ T細胞は敗血症重症度に応じて増加し、また、IL-17産生型 $\gamma\delta$ T細胞（IL-17⁺ $\gamma\delta$ T細胞）の割合も増加した。 $\gamma\delta$ T細胞の成熟度を調べるためにC-C chemokine receptor (CCR) 6およびC-X-C chemokine receptor (CXCR) 6の発現を解析した。0 mg/g体重のCS投与群と比べて、敗血症マウスにおいてはCCR6陽性の $\gamma\delta$ T細胞の割合が重症度依存的に増加した。これは、敗血症により脳中でIL-17⁺ $\gamma\delta$ T細胞の成熟が亢進することを示唆する。これに伴い、脳中のIL-17のmRNAレベルも敗血症重症度依存的に増加していた。また、単球や好中球の割合、ミクログリアの活性化も増加傾向が認められた。よって、 $\gamma\delta$ T細胞はIL-17産生を亢進しSAEや敗血症に伴う精神障害の増悪に関与すると考えられた。

髄膜中の $\gamma\delta$ T細胞の動態を解析したところ、敗血症誘導から8日目に増加を認めた。また、この組織においてもIL-17⁺ $\gamma\delta$ T細胞は敗血症重症度依存的に増加し、CCR6とCXCR6の両方を発現していた。ただ、健常時においては脳とは異なり、髄膜中のIL-17⁺ $\gamma\delta$ T細胞の多くはCXCR6陰性であった。

最後に、行動試験により脳の $\gamma\delta$ T細胞およびIL-17Aが敗血症モデルマウスの不安様行動の増悪に関与するかを調べた。敗血症誘導から1日目の体重減少率により、各群の重症度を可能な限り平均化した。敗血症誘導から5日目以降、敗血症マウスに抗 $\gamma\delta$ TCR抗体（ α - $\gamma\delta$ TCR群）、抗IL-17A抗体（ α -IL-17A群）を投与し、対照にはIgGを投与した（IgG群）。敗血症マウスに強制遊泳試験とオープンフィールド試験を行った。強制遊泳試験では、IgG群と比較して、 α - $\gamma\delta$ TCR群の敗血症マウスは無動時間が有意に短く、 α -IL-17A群においても短縮する傾向が認められた。オープンフィールド試験では、IgG群と比較して、 α - $\gamma\delta$ TCR群は中央領域にいる時間が有意に長く、活動量および探索行動も顕著に多かった。 α -IL-17A群においても活動量および探索行動がIgG群と比較して顕著に多く、不安様行動の緩和が示唆された。これらの介入により、脳内のミクログリアの活性化と好中球および単球の浸潤を抑制する傾向が認められた。従って、脳の $\gamma\delta$ T細胞とIL-17Aは、単球と好中球の浸潤の促進とミクログリアの活性化を介して、SAEと敗血症に伴う不安様行動の増悪に寄与していることを示した。

多くの研究において、SAEやPSSの病態形成の中心がミクログリアであることが示されてきた。この細胞の活性化は、敗血症直後に起こる血液脳関門の機能不全により、末梢血から炎症性単球や好中球が浸潤することから始まる。今回、我々の敗血症モデルマウスにおいては脳でのIL-17⁺ $\gamma\delta$ T細胞は敗血症誘導から8～15日目に増加していた。よって、少なくとも急性期の血液脳関門の機能不全には関与しないと予測され、敗血症後の脳における $\gamma\delta$ T細胞とIL-17AはSAEやPSSの増悪に関与するという仮説と矛盾しない。過剰なIL-17は神経細胞死を誘導するのに加えて、好中球の遊走因子であることが知られる。先行研究と同様、敗血症誘導直後に単球や好中球の脳での増加は確認できたものの、我々の研究において、これらの増加のピークはやはり8日目であり、その後、時間経過と共に緩徐に減少す

ることが観察された。この結果は、8日目以降に脳に浸潤した単球や好中球がSAEの遷延に寄与した可能性を示した。

IL-17⁺γδT細胞が敗血症重症度依存的に増加し、成熟が亢進することが示された。*in vitro* の研究から、神経細胞死には成熟したγδT細胞由来のIL-17が必要であることが示されている。この結果は、敗血症マウスの行動試験において、いくつかの項目でα-IL-17A群と比較してα-γδTCR群の方が良好な不安様行動の回復を示したことを支持するものかもしれない。また、脳中のγδT細胞の成熟を抑制することは、神経細胞の保護につながることを示唆する。γδT細胞の成熟にToll-like receptor 4を介したミクログリア由来のIL-23が関与すること示されており、その活性化を抑制するミノサイクリンや阻害薬であるTAK-242は、PSSの予防や症状を緩和するための新たな治療ターゲットになると期待された。

敗血症下での髄膜におけるγδT細胞の挙動を解析した研究はほとんどない。我々の研究から、髄膜におけるγδT細胞の動態や成熟過程は脳と類似するものであった。また、敗血症誘導後のγδT細胞の割合は、末梢血や脾臓などでは変化が認められなかつたが、髄膜では有意に増加していた。これらの結果は、脳や髄膜のγδT細胞が細菌感染に対してより感受性が高いことを示唆している。γδT細胞は胎生期に特定の臓器にホーミングする。よって、敗血症において脳や髄膜におけるγδT細胞の増加方法を明らかにすることが重要である。

我々は、敗血症誘導後、脳に増加したIL-17⁺γδT細胞はSAEやPSSの増悪に寄与することを示した。敗血症患者における長期予後改善を目的とした治療方法への応用には、敗血症罹患直後に活性化するミクログリアと違い、治療開始まで時間的に余裕があるIL-17⁺γδT細胞をターゲットとした方が現実的かもしれない。敗血症下では、脳のCD4⁺ T細胞やCD8⁺ T細胞も変動するが、γδT細胞に比べて顕著な増減を認めなかつたため、本研究では詳細な検討はしなかつた。しかし、脳におけるγδT細胞数は両細胞に比べて著しく少ない。Th17細胞は、ヒトとマウスの両方において、IL-17を産生することでうつ症状を悪化させることが知られている。敗血症誘導から2週間目以降、IL-17⁺γδT細胞は劇的に減少することから、SAEやPSSの遷延にはTh17細胞が関与すると考えられる。今後、敗血症誘導後のTh17細胞の動態を解析するとともに、敗血症下の脳において、IL-17がどの細胞由来であるかを明らかにすることが重要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3344 号	氏名	森山 直紀
論文題目 Title of Dissertation	<p>Increased Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$T Cells in the Brain Exacerbate the Pathogenesis of Sepsis-Associated Encephalopathy and Sepsis-Induced Anxiety in Mice</p> <p>脳内インターロイキン 17 産生 $\gamma\delta$T 細胞の増加がマウスにおける敗血症関連脳症および敗血症誘発性不安症の病態を悪化させる</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 福本 巧 Chief Examiner</p> <p>副査 稲本 宏樹 Vice-examiner</p> <p>副査 藤岡 一路 Vice-examiner</p>		
(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)			

【目的】

敗血症患者はしばしばせん妄や昏睡などの神経症状を呈し、これらの神経症状は敗血症関連脳症 (SAE : Sepsis Associated Encephalopathy) が原因であると考えられている。近年、ミクログリアが SAE や精神障害の発症に関与することが明らかになってきた。また、健常マウスの恐怖刺激への応答に、髄膜由来の $\gamma\delta$ T 細胞とそれが産生する Interleukin (IL) -17 が関与することが示された。一方で、過剰な IL-17 分泌は神経細胞の障害を誘導し、神経症状を悪化させていることが示されている。しかし、敗血症下における $\gamma\delta$ T 細胞や IL-17 の動態は不明であり、SAE や精神障害の発症に関与するかは分かっていない。本研究では脳の $\gamma\delta$ T 細胞とそれに由来する IL-17 が急性期における SAE および敗血症に伴う精神障害の増悪に関与するかを検討した。

【方法と結果】

C57BL/6J マウスに糞便懸濁液 (CS : Cecal slurry) を腹腔内投与することで敗血症を誘導した。

1. 敗血症誘導後の脳における免疫細胞の分布および IL-17 mRNA レベル

敗血症誘導後の脳内に敗血症誘導後すぐにミクログリアは増加し、少なくとも 30 日間は減少しなかった。単球と好中球数は敗血症誘導から 8 日目でピークに達した。この時、T 細胞の増加も認め、CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の数はほとんど変わらなかったが、 $\gamma\delta$ T 細胞は顕著に増加した。この細胞の増加は敗血症誘導から 15 日目まで認められ、その後、すみやかに減少に転じた。同時期において脳中の IL-17 mRNA レベルが増加していた。

2. $\gamma\delta$ T 細胞および IL-17 の敗血症重症度依存的な変化

投与するCSの量を変えることで敗血症の重症度を変化させ、 $\gamma\delta$ T細胞の応答を解析した。敗血症誘導から8日目において脳中の $\gamma\delta$ T細胞は敗血症重症度依存的に増加し、また、IL-17産生型 $\gamma\delta$ T細胞 (IL-17⁺ $\gamma\delta$ T細胞) の割合も増加した。 $\gamma\delta$ T細胞の成熟度を調べるためにC-C chemokine receptor (CCR) 6およびC-X-C chemokine receptor (CXCR) 6の発現を解析したところ、CCR6陽性の $\gamma\delta$ T細胞の割合が重症度依存的に増加した。脳中のIL-17のmRNAレベルも敗血症重症度依存的に増加していた。また、単球や好中球の割合、ミクログリアの活性化も増加傾向が認められた。

3. $\gamma\delta$ T 細胞および IL-17A を枯渇させた場合に敗血症マウスの不安様行動に及ぼす影響

行動試験により脳の $\gamma\delta$ T細胞およびIL-17Aが敗血症モデルマウスの不安様行動の増悪に関与するかを検討した。敗血症誘導から5日目以降、敗血症マウスに抗 $\gamma\delta$ TCR抗体 (α - $\gamma\delta$ TCR群)、抗IL-17A抗体 (α -IL-17A群) を投与し、対照にはIgGを投与した (IgG群) のちに、強制遊泳試験とオープンフィールド試験を行った。その結果、いずれの試験でもIgG群と比較して、 α - $\gamma\delta$ TCR群と α -IL-17A群において不安様行動が緩和されることが示唆された。また、脳内のミクログリアの活性化と好中球および単球の浸潤を抑制する傾向が認められた。

【総括】

本研究で、敗血症モデルマウスの脳において、敗血症誘導から 8~15 日目に IL-17⁺γδT 細胞が増加していることが明らかになった。これは、敗血症後の脳における γδT 細胞と IL-17A が、SAE の増悪に関与するという仮説と矛盾しない。また、IL-17⁺γδT 細胞が敗血症重症度依存的に増加し、成熟が亢進することが示された。過去の研究から、神経細胞死には成熟した γδT 細胞由来の IL-17 が必要であることが示されており、敗血症の重症度があがることにより症状が悪化する可能性を示唆していると考える。敗血症マウスの行動試験において、α-γδTCR および α-IL-17A を、それぞれの抗体を投与することで枯渇させると、不安様行動が緩和されることが明らかになった。これらの結果から、脳内での γδT 細胞や IL-17 の増加を抑制する、あるいは γδT 細胞の成熟を抑制することは、神経細胞の保護すなわち SAE の予防または治療に繋がるものと考える。

本研究は、γδT 細胞および IL-17 が敗血症関連脳症あるいは敗血症に伴う神経障害に関与しているかを研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった敗血症誘導後の脳内の γδT 細胞の動態などを検討し、γδT 細胞や IL-17 が SAE の増悪に関与していることを明らかにした報告である。敗血症関連脳症の病態解明の一助となり、新規の治療対象となり得ることを示した点で、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。