The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Inhibition of IL-17A promotes ependymal cell proliferation and motor recovery after spinal cord injury
Author(s)	宮嶋, 久雄
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76626
rights	Reproduced with permission from Springer Nature
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

Inhibition of IL-17A promotes ependymal cell proliferation and motor recovery after spinal cord injury

IL-17A の阻害は脊髄損傷後の上衣細胞の増殖と運動機能回復を促進する

大阪大学大学院 生命機能研究科 分子神経科学講座

32A15045　宮嶋 久雄

指導教員 医学系研究科　山下 俊英 教授

2020 年 3 月修了

Abstract

When a spinal cord is damaged due, for example, to traffic accidents or sports accidents, neurotransmission between the brain and the body is seriously impaired. As a result, the motor system, sensory system, and autonomic nervous system are disrupted. In mammals, although the spontaneous tissue recovery is sometimes observed after spinal cord injury (SCI), the extent of functional recovery is usually not sufficient. In this study, we assessed the mechanism of restoration of neuronal network by neural stem cells after SCI. Recent studies have suggested that ependymal cells (ECs), located in the central canal of the spinal cord, act as neural stem cells and contribute to tissue repair after SCI, although the molecular mechanism remained unknown. I hypothesized that interleukin (IL)-17A, an inflammatory cytokine upregulated in the injured area, would be involved in the activation process of ECs.

Expression analysis revealed that IL-17A was upregulated in the injured spinal cord, and IL-17 receptor A was expressed in ECs. Furthermore, the inhibition of IL-17A function in the injured area promoted the recovery of motor function and proliferation of ECs. Next, I examined whether IL-17A affected the proliferation of ECs by neurosphere assay, and found that IL-17A inhibited the proliferation of ECs. Then, to test the effect of IL-17 signaling on ECs in vivo, I performed functional assessment of SCI mouse with ECs-specific genetic ablation of IL-17RA, and found that in these mice, recovery of motor function was enhanced and the expression of neurotrophic factor was increased after SCI. These results suggest that IL-17A in ECs inhibits proliferation of ECs and motor recovery after SCI. Thus, I elucidated the role of ECs in functional recovery after SCI.

要旨

交通事故やスポーツ事故などにより脊髄が損傷を受けると、脳と体の情報伝達が著しく障害され、運動機能や感覚機能、自律神経の機能が喪失する。これら脊髄損傷後の機能障害の自然回復は限定的なものであることが知られており、脊髄損傷後の神経機能を十分に回復させる新規治療法の開発が求められている。本研究では脊髄損傷後の炎症反応と内在性の神経幹細胞との関連に着目し、組織修復メカニズムの解明を行った。近年、脊髄中心管に内在する上衣細胞が神経幹細胞として働き、脊髄損傷後の組織修復に寄与すること示唆されてきたが、その詳細な分子機構は分かっていない。今回私は、損傷部で発現が高まる主要な炎症性サイトカインである IL-17A が、上衣細胞の活性化機構に関与すると仮説を立て、その検証を行った。

発現解析により脊髄損傷後に損傷部で IL-17A の発現量が上昇すること、更に IL-17 受容体 A が脊髄中心管上衣細胞で発現していることを見出したことから、IL-17A シグナルが上衣細胞に影響を与えている可能性が示唆された。また、ニューロスフィア法を用いて、IL-17A が上衣細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、in vivo における機能を解析するため、脊髄損傷モデルマウスを用いて上衣細胞特異的な IL-17A シグナルの阻害実験を行い、これにより上衣細胞の増殖及び脊髄損傷後の運動機能障害からの回復が促進されることを示した。これらの結果は、IL-17A が脊髄損傷後の上衣細胞の増殖制御において抑制的に働くことを示唆している。本研究成果は、脊髄損傷病態における免疫系による上衣細胞の新たな増殖制御メカニズムを解明したものであり、脊髄損傷の新規治療法の開発につながる重要な知見である。

目次

要旨	・・・・・	1 - 2
序論	・・・・・	4 - 10
実験材料および方法	・・・・・	11 - 22
結果	・・・・・	23 - 44
考察	・・・・・	45 - 52
参考文献	・・・・・	53 - 58
謝辞	・・・・・	59
業績	・・・・・	60 - 61

序論

１．脊髄損傷

脊髄は中枢神経系の構成要素であり、脊柱管の中を通って末梢に軸索を伸ばす。脳からの指令を末梢に伝える遠心性線維、末梢からの情報を脳に伝える求心性線維の双方の伝導路となっている。遠心性線維には運動神経、自律神経があり、求心性線維には感覚神経が通っている。

交通事故や転落事故、スポーツ事故などにより脊髄が損傷を受けると、脊髄中の神経線維が分断される。脳と末梢の情報伝達が著しく障害され、損傷箇所より遠位の運動機能や感覚機能、自律神経の機能が喪失する[1]。これまでの脊髄損傷の疫学調査により、我が国には脊髄損傷患者が 10 万人以上おり、新たに年間 4,000-5,000 人が受傷していることが報告されている。しかしながら、現在のところ損傷した脊髄を完全に再生させる治療法はない。このような背景から、脊髄損傷後の神経機能を回復させる新規治療法の開発が求められている。

２．脊髄損傷後の軸索再生

中枢神経系は末梢神経系とは異なり、損傷を受けた神経軸索は極めて再生しにくい。この原因として、損傷後の中枢神経細胞を取り巻く環境が再生に適していないこと、ヒトなどの哺乳類の中枢神経は再生力が低いことが知られている[2]。神経回路の再編には、これらの微小環境を整え、神経軸索の伸長を促進させる必要があると考えられている。

脊髄損傷後には、免疫システムにより、損傷部で激しい炎症反応が引き起こされる。炎症反応には、末梢から浸潤して炎症を引き起こす好酸球やリンパ球、マクロファージ等の炎症細胞が関与することが知られている[3]。これらの炎症

細胞は、損傷部に残存する死細胞や破壊された髄鞘（ミエリン）の除去を担っている。一方で、様々な炎症性サイトカイン等を放出し、神経細胞やグリア細胞を傷害し、脊髄損傷後の組織修復を阻害していることが報告されている[4]。

また、脊髄損傷後、アストロサイトを始めとしたグリア細胞が活性化して損傷箇所を取り囲むように局在する。これを「グリア性瘢痕」と呼び、脊髄損傷の急性炎症を抑制する役割がある一方で、軸索の再生を阻害する一因であると考えられてきた[5-7]。しかし、近年の遺伝子組み換えマウスを用いた研究で、アストロサイトによるグリア性瘢痕の形成が、軸索再生を補助することが報告された[8]。したがって、グリア性瘢痕が軸索再生にとって有害なのか有益なのかについては議論の余地がある。

損傷部脊髄の微小環境においては種々の軸索再生阻害因子が存在し、中枢神経系の回路の再編を困難にしていることが明らかとなってきている。しかしながら、上述したような脊髄損傷後の炎症反応やグリア性瘢痕形成が、各種の神経細胞やグリア細胞に与える影響に関しては、詳細な分子メカニズムの解明は不十分である。そこで、本研究では、軸索再生制御に関与する環境要因として、特に免疫システムによる「炎症反応」に着目した。

３．脊髄損傷における免疫系の役割

先述のように、脊髄損傷で物理的な傷害を受けることにより、患部では強力な炎症が生じる。これは内在するグリア細胞の活性化や、血液脳関門が破綻したことによる末梢の免疫系細胞の浸潤に起因する[3]。これらのグリア細胞や浸潤してきた免疫系細胞は炎症性サイトカインを放出し、損傷を免れた神経細胞を死滅させて組織を傷害する。一方で、これらの免疫系細胞の中には、抗炎症性サイトカインを産生して組織修復に働くものもある[4]。以上の知見から、脊髄損傷後の

免疫システムは組織傷害と組織修復という二面性をもつことが示唆され、免疫系細胞による炎症と抗炎症のバランスを制御することが脊髄損傷後の炎症、組織傷害を抑制するために重要であると考えられている。炎症性サイトカインは細胞死を招くのみでなく、様々な生理作用を有する[9]。例えば、代表的な炎症性サイトカインであるInterleukin-17A(IL-17A)は炎症を惹起して自己免疫疾患の発症に深く関与する一方で、細胞増殖の制御や血管新生、好中球の誘導など多彩な機能を持つ[10]。また、IL-17A は神経幹細胞の増殖を抑制することが、細胞培養実験と遺伝子組み換えマウスの研究から明らかとなっている[11, 12]。

以上より、炎症性サイトカインは神経系に対しても大きな影響をもつと考えられるが、脊髄損傷後の組織修復過程に免疫システムがどのように関わっているのかについての詳細な分子メカニズムは解明されていない。そこで本研究では、代表的な炎症性サイトカインの一つであるIL-17A に着目した。

４．IL-17A と神経疾患

IL-17（IL-17A）は、分子量約 30kD のペプチドからなるホモ二量体の糖タンパク質であり、IL-17（IL-17A）、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E（IL-25）、IL-17F の 6 つのサブファミリーが存在している。主に活性化 T 細胞などにより産生される炎症誘発性のサイトカインであり、上皮細胞や神経幹細胞、好中球やマクロファージに作用して、炎症反応や細胞増殖、細胞遊走に関与することが報告されている[13]。これらの作用機序により、IL-17A は多発性硬化症や関節リウマチ等の自己免疫疾患や炎症性疾患、アレルギー反応において重要な働きを持つことが知られている[14]。さらに、細菌感染防御においても重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。このように、IL-17A は様々な疾患に関与することが報告されている。

また、これまでの研究から、神経疾患においても IL-17A が病態形成に関与することが明らかとなってきた。IL-17A は、脳損傷に伴う炎症反応に関与し、組織障害を促進することや[15]、パーキンソン病において、IL-17A が神経炎症や神経変性を引き起こすことで、神経細胞死を引き起こすことが示唆されている[16]。さらに、妊娠時の IL-17A を介した炎症反応が、胎児の脳の発達障害を引き起こし、子供の自閉症様症状を誘発することが報告されている[17]。一方で、神経発達障害モデルマウスにおいて、炎症により分泌される IL-17A が、社会性に関わる体性感覚野異顆粒層（SIDZ）の神経の過剰な興奮を抑制することで、社会性を促進することも報告されている[18]。また、脊髄損傷病態においては、先行研究により、IL-17 欠損マウスでは脊髄損傷後の組織修復及び運動機能回復が促進されることが示唆されている[19]。しかし、詳しい作用機序や分子メカニズム等、脊髄損傷病態における IL-17A の役割は不明のままである。

このように、IL-17A は様々な神経疾患に関与することが報告されている。しかしながら、その作用機序は病態が形成された組織や環境要因等に依存しており、それぞれの病態における IL-17A の作用及び分子メカニズムの解明が疾患治療のためには必要である。

５．脊髄損傷後の組織修復

不完全な脊髄損傷の際は、限定的な自然回復がもたらされることが知られている[20, 21]。この自然回復には軸索再生のみでなく、様々なメカニズムが関与する。主な例として、損傷箇所を避けた代償性の神経回路の形成[22]、内在性の神経幹細胞が損傷を受けた組織を補完[23, 24, 25]、オリゴデンドロサイトによる損傷を受けた神経の再ミエリン化[26]などがある。したがって、脊髄損傷後の機能回復を促すような治療法の開発のためには、グリア細胞や神経幹細胞が脊髄損傷

後の解剖学的および機能的回復にどのように関与しているかを詳細に解明することが重要である。

近年の脊髄損傷治療に関する研究により、神経幹細胞を応用した再生医療の開発が進められてきた。神経幹細胞とは、自己複製能を持ち、神経細胞やグリア細胞への分化能を持つ組織幹細胞である。特に脊髄損傷治療では、iPS 細胞（人工多能性幹細胞）や ES 細胞（胚性幹細胞）由来の神経幹細胞を応用した細胞移植治療に関する研究が盛んに進められている [27]。細胞移植治療は、主に 2 つの目的を目指して行われている。1 つ目は、失われた神経細胞を補填するために、神経幹細胞から神経細胞への分化を促し、神経回路の再生を目指すことである。2 つ目は、オリゴデンドロサイト等の神経細胞以外の細胞を移植することで、損傷部の微小環境を神経再生に適した環境に整えたりすることである。しかし、神経幹細胞移植は、移植する細胞の安定性や組織への生着性など技術的な問題も多い。また、脊髄損傷に対する細胞移植療法は侵襲的で、かつ薬物輸送の観点から治療には困難がつきまとう。

そこで、本研究では、内在性の神経幹細胞による組織修復に着目した。脊髄損傷後に神経幹細胞は増殖し、グリア細胞などに分化することで損傷部の組織修復に寄与するが、神経幹細胞による組織修復メカニズムには未だ不明な点も多く残っている。したがって、脊髄損傷病態における内在性の神経幹細胞の活動を制御する分子メカニズムの解明を目指した。

６．神経幹細胞としての上衣細胞

近年の研究により、脊髄中心管に存在する上衣細胞が、脊髄損傷後の組織修復に関与することが明らかとなってきた [23, 24, 25]。上衣細胞は脳室や中心管の壁を形作る上皮細胞の 1 つであり、多数の運動性繊毛を持ち、生理条件下では脳脊髄

液の循環や脳脊髄液-脳実質間の物質輸送に関与している[28]。その一方で、脊髄損傷後には活性化し、強い増殖能を持つことが報告された[23,24]。さらに、上衣細胞のレポーターマウスを用いた研究で、上衣細胞は脊髄損傷後に増殖し、アストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化することが明らかとなった。これらの知見から、上衣細胞は脊髄損傷後に神経幹細胞としての機能を持つことが示唆された。上衣細胞から分化したアストロサイトは、グリア性瘢痕を形成しているアストロサイトとは異なる細胞群であることが明らかとなっており、神経栄養因子や細胞外マトリックスを産生することで軸索の伸長や組織の修復に寄与すると考えられている[29]。また、オリゴデンドロサイトは再ミエリン化に携わる。実際、上衣細胞の増殖を阻害すると脊髄損傷の組織傷害が増悪することが報告されている[25]。しかし、その増殖、分化制御メカニズムや組織修復への寄与などは未だ不明な点が多い。また、脊髄損傷後の自然回復は限定的であることから、生理的な上衣細胞の増殖では機能回復には不十分であると推察される。そこで、上衣細胞の増殖を亢進させることができれば、神経機能の回復を促進できると考えた。

７．本研究の目的

本研究では、脊髄損傷後の免疫システムが組織修復過程にどのような影響を与えるのかという観点から研究を開始した。組織修復には、上衣細胞による修復機構が寄与すると考えられているが、上衣細胞の増殖制御機構は未だ不明な点が多い。そこで、上衣細胞の増殖制御に関与する候補因子として、炎症性サイトカインである IL-17A に着目した。IL-17A は炎症性サイトカインとして、様々な神経疾患に関与することが報告されている。また、免疫細胞等が産生する IL-17A をはじめとした種々のサイトカインは神経幹細胞に様々な影響を与えることが

知られている。これらの事実から、脊髄損傷後に神経幹細胞として働き、上皮細胞の一つである上衣細胞の増殖制御に IL-17A が関与すると推察し、その可能性を検証した。そして、脊髄損傷モデルマウスを用いて、脊髄損傷病態における IL-17A が上衣細胞に与える影響の解明を目的に研究を行った。

本研究では、発現解析から IL-17A シグナルが上衣細胞の増殖制御に関与することを示唆する結果を得た。さらに、細胞培養実験により、IL-17A は上衣細胞の増殖を抑制することを明らかにした。そして、脊髄損傷モデルマウスを用いて IL-17A の機能阻害実験を行い、組織修復と運動機能回復への影響を検討した。その結果、IL-17A が脊髄損傷後の上衣細胞の増殖制御に抑制的に働くことが示唆された。

実験材料および方法

実験動物

8 週齢の C57BL/6J 雌マウスを日本エスエルシー及び紀和実験動物より購入した。FoxJ1-CreERT^2（上衣細胞特異的に CreERT^2 が発現）を組み込んだ遺伝子組み換えマウス及び R26RtdTomato マウスは、Karolinska Institute の Jonas Frisén 教授より供与を受けた。Il17ra$^{fl/fl}$ マウス(possess loxP sites flanking exons 2-3 of IL-17ra)（Stock No:031000 |Il17ra^{fl}）は、The Jackson Laboratory より購入した。マウスは大阪大学医学部附属動物実験施設にて飼育した。すべての動物実験は大阪大学大学院医学系研究科動物実験規程を遵守し、動物の個体数や苦痛は最小限に止めて行った。

Genotyping

マウスの尾（約 5 mm）を 700 μL の Lysis buffer に浸し、 55 °C で尾が溶けるまでインキュベートした。Lysis buffer の組成は以下の通りである。

・1M Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 mL
・3M NaCl	3.3 mL
・0.5M EDTA	2.5 mL
・10% SDS	1 mL
・Proteinase K (10 mg/mL)	1 : 200 (final ; 50μg/mL)
・DDW	40.7 mL

尾が全て溶けた後、15,000 rpm で 10 分間遠心した。上清 500 μL を別のチューブに移し、700 μL のイソプロピルアルコールを加えて転倒混和した。室温で 10 分間静置した後、15,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、1 mL の 70% エ

タノールを加え、15,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を除去し、DNA ペレットを 10 分間風乾させた。最後に DDW 100 μL を加え、ボルテックス処理により DNA を溶かした。その後、この DNA サンプルを KOD-FX neo (TOYOBO)を用いて PCR し、アガロースゲル電気泳動により目的遺伝子のバンドサイズを確認した。使用したプライマーおよび PCR 条件は以下の通りである。

Gene	Primer sequence 5'→3'
Tomato-1	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA
Tomato-2	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC
Tomato-3	GGCATTAAAGCAGCGTATCC
Tomato-4	CTGTTCCTGTACGGCATGG
FoxJ1-F	GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC
FoxJ1-R	TCGACCAGTTTAGTTACCC
IL-17RA flox -F	GCCTCCAAGTCTAGCTTTGCT
IL-17RA flox -R	CCTGAGAGCGGTTCACACAG

94 ℃　2 minutes
98 ℃　10 seconds
61 ℃　30 seconds　×35 サイクル
68 ℃　30 seconds
4　℃　forever

タモキシフェン投与

37℃で一晩振盪することで、タモキシフェン（Sigma-Aldrich）を 20 mg / ml の濃度でコーン油に溶解した。成体マウスの場合、タモキシフェン/コーン油 100 μL を 1 日 1 回 5 日間投与した。その後、クリアランス期間を 5 日間設けてから実験に使用した。

脊髄損傷モデルマウスの作製

8-12週齢の雌のマウスに3種混合麻酔（ドミトール（0.3 mg/kg, Zenoaq, Fukushima, Japan）,ドルミカム（4 mg/kg, Astellas, Tokyo, Japan）, ベトルファー

ル（5 mg/kg, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan））を腹腔内投与して、麻酔をかけた。背部を剃毛した後、胸部背側を正中皮膚切開し、脊椎レベルT9/T10で椎弓切除して脊髄を露出させた。身体を固定し、専用のデバイス(Infinite Horizons Impactor; PrecisionSystems&Instrumentation) を用いて60 kilodynesの力で脊髄に圧挫を加えた。筋肉層と皮膚層を縫合し、再びケージに戻して飼育した。偽手術したマウス（Sham群）として、椎弓切除して脊髄の露出のみを行ったマウスを用意した。術後1日から14日にかけて1日1回導尿を行った。

<u>IL-17A 中和抗体の機能確認</u>

10 cm ディッシュに 80 %コンフルエントになるように播種しておいた NIH3T3 細胞 (ATCC)に、それぞれ rIL-17A 又は Vehicle を 100 ng/mL と IL-17A 中和抗体（Anti-Mouse IL-17A,　eBioscience, #16-7173）を加え、37 °C、5% CO_2 で 48 時間培養した。その後、採材した培養上清中に含まれる IL-6 の含有量の測定を行った。IL-6 の測定には LEGENDplex^{TM} Mouse Inflammation panel (Biolegend)で行った。方法はデータシートに従い、測定には BD FACS Verse フローサイトメーターを用いた。解析は Flow Jo ソフトウェア(Treestar)で行った。

<u>IL-17A中和抗体の投与</u>

C57BL/6Jマウスに脊髄損傷を施した直後に、対照マウスIgG (Sigma-Aldrich, I5381) 又は抗IL-17A抗体 (eBioscience, 16-7173) を充填した浸透圧ミニポンプ（10μg /100 μL溶液、0.5 μL/h、7日間送達、#1007D; Alzet Corp, Cupertino, CA, USA）を各マウスに埋め込んだ。ミニポンプはマウスの背中の皮下に留置し、ミニポンプの出口に接続されたシリコンゴムチューブを損傷部位に置いた。脊髄損傷後7日及び8週に渡って行動学的解析を行った後に採材した。

Total RNA の抽出

Sham 群、脊髄損傷群の各時点（損傷後 1 日、3 日、7 日、14 日、28 日、42 日）より、損傷部を中心に 5 mm の脊髄を採材した。それぞれ 1 mL の Trizol reagent（Thermo Fisher Scientific）を加えた後、均質化した。5 分間室温にてインキュベートし、0.2 mL のクロロホルムを加えて振盪させた後、3 分間室温にてインキュベートした。その後 12,000×g、4 °C で 15 分間遠心し、RNA 含有の上部水層を採材した。水層を新しいチューブに移した後、0.5 mL のイソプロピルアルコールを加えて RNA を沈殿させ、室温で 10 分間インキュベートし、12,000×g、4 °C で 10 分間遠心した。上清を除去し、0.5 mL の 75% エタノール（DEPC 処理水）で 1 回洗浄（12,000×g、4 °C で 5 分間遠心）した。同様に上清を除去し、1 mL の 75% エタノール（DEPC 処理水）を加え、ボルテックス処理を行い、7,500×g、4 °C で 5 分間遠心した。その後、上清をできるだけ除去し、RNA ペレットを 10 分間風乾させた。最後に、RNase free 水を 30 μL 加え RNA を採材した。

定量的 PCR（Real-time qPCR）

精製した RNA は PrimeScript^{TM}II High Fidelity RT-PCR Kit (R023A, Takara)を使用して、同量の RNA を逆転写反応させた。mRNA の発現は QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System（Applied Biosystem）を用いて Real-Time PCR を行い確認した。サンプルの調整は Power SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystem）を用いた（PCR 条件：95°C 20 seconds 後、95°C -3 seconds と 60°C -30 seconds を 40 サイクル行った）。計測された Ct 値から GAPDH を内在性コントロールとした ΔΔCt 法で相対定量の算出を行った。各サンプルの測定値は、コントロール群の平均値を 1 として、相対値を算出した。先行研究を参考し[30]、本研究で用いたプライマーは、以下の通りである。

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
IL-17A	TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA	CTTTCCCTCCGCATTGACAC
IL-17RA	CATCAGCGAGCTAATGTCACA	AGCGTGTCTCAAACAGTCATTTA
TNFR2	GCCCAGGTTGTCTTGACACC	CACAGCACATCTGAGCCTTCC
TGFβR1	TCTGCATTGCACTTATGCTGA	AAAGGGCGATCTAGTGATGGA
GAPDH	GGCAAATTCAACGGCACA	GTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG
NGF	ACTTCCAGGCCCATGGTACAATCT	TTGATGTCCGTGGCTGTGGTCTTA
NT-3	ACTACGGCAACAGAGACGCTACAA	ATAGCGTTTCCTCCGTGGTGATGT
NT-4/5	TGCGTCAGTACTTCTTCGAGACGC	TAGCCTTGCATTCTGAGAGCCAGT
BDNF	TGGCAGTGCAGGAGGAATTTCTGA	GCAGAAGGCCTAAGCAACTTGACA
GDNF	AGAATTCCAGAGGGAAAGGTCGCA	TCCTCCTTGGTTTCGTAGCCCAAA
CNTF	TACCAGTGGCAAGCACTGATCGTT	GGCAAAGGCAGAAACTTGGAGCAT
IGF-1	TGGCACTCTGCTTGCTCACCTTTA	TTGGTCCACACACGAACTGAAGAG
LIF	TGCCAATGGGACAGAGAAGACCAA	TACTTGTTGCACAGACGGCAAAGC
TGF-β1	GTGGCCAGATCCTGTCCAAACTAA	CATTAGCACGCGGGTGACTTCTTT
VEGF-A	TATTGCCGTCCAATTGAGACCCTG	GCACACAGGACGGCTTGAAGATATAC
PDGF-A	ATTCCCGCAGTTTGCAAGACCA	CCAGATCAAGAAGTTGGCCGATGT
CNPase	AGAAGTACCACAACGGCACCAAGA	TGTCATCGAGCACAAGAACCCTGA
GFAP	ACCGCTTTGCTAGCTACATCGAGA	TGGTAAACGTCAGCCAGTTTGGTG
EGF	TTTCATCCTTTGCCTGGTTGTGCC	AAATTTCCCAGAGCCTAAGAGCCC
bFGF	TTCAAGGATCCCAAGCGGCTCTA	TGTGGGTCGCTCTTCTCCC

各遺伝子の略称における正式名称は以下の通り。

腫瘍壊死因子（TNF: Tumor Necrosis Factor）、トランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1 ： Transforming Growth Factor）、GAPDH （Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）、神経成長因子（NGF：Nerve Growth Factor）、ニューロトロフィン 3（NT3 : Neurotrophin 3）、ニューロトロフィン 4/5（NT4/5 : Neurotrophin 4/5）、脳由来神経栄養因子（BDNF：Brain-Derived Neurotrophic Factor）、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF：Glial cell line Derived Neurotrophic Factor）、毛様体神経栄養因子（CNTF : Ciliary Neurotrophic Factor）、インシュリン様成長因子-1（IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1）、白血病阻止因子（LIF : Leukemia Inhibitory Factor）、血管内皮細胞増殖因子-A（VEGF-A：Vascular Endothelial Growth Factor）、血小板由来成長因子-A（PDGF-A：Platelet-Derived Growth Factor-A）、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein）、CNPase（2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase）、上皮成長因子（EGF：Epidermal Growth Factor）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF：basic Fibroblast Growth Factor）。

行動試験

後肢運動機能の評価法には、Basso Mouse Scale (BMS) test [31]、Beam walk test[32, 33]を用いて評価した。

・**BMS test**

脊髄損傷前（Pre）、脊髄損傷 1、3、7、14、21、28、35、42、49、56 日後のスコアを評価した。オープンフィールド内でマウス後肢の運動を 2 分間観察し、先行研究の方法に従って、以下のスコアを用いて評価した。

9 点: しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調は大抵にあり、足先をついて離すとき平行で、体幹は常に安定し、尾は常に上がっている。

8 点; しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調は大抵にあり、足先をついて離す時平行で、体幹はやや不安定である。あるいは、しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調は大抵にあり、足先をついて離すとき平行で、体幹は正常に安定であるが、尾を下げるか上下に揺らす。

7 点: しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調は大抵にあり、足先をつく時平行だが、離すときに回転する。あるいは、しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調は大抵にあり、足先をついて離す時平行で、体幹は非常に不安定である。

6 点: しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調はまれにあり、足先をつく時に平行である。あるいは、しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調は大抵にあり、足先をついて離すときに回転する。

5 点: しばしば（50%以上）または常に足裏をついて歩むが前後肢の協調はない。あるいは、しばしばまたは常に足裏をついて歩み、前後肢の協調はまれにあり、足先をついて離す時に回転する。

4 点: 時々（50%以下）足裏をついて歩む。

3 点: 体重を支えることに関係なく足裏をつく。あるいは足裏はつかないが肢背側で歩む。

2 点: 足首が少し動く（可動域の 50%以上）。

1 点: 足首が少し動く（可動域の 50%以下）。

0 点: 足首が動かない。

・**Beam walk test**

運動障害の重症度を評価するために、ビーム歩行試験の修正版を採用した[32, 33]。狭い木製の梁（幅：1.4 cm、長さ：100 cm、地面からの高さ：15 cm）を使用し、先行研究を参考に以下の通りスコアを決定した[34]。1 回の試験あたり 3 回ビームを渡らせ、その平均値を算出した。脊髄損傷 14、21、28、35、42、49 および 56 日後のスコアを評価した。

8 点：スリップせずに両方の後肢を使って梁を横断する。

7 点：スリップが 1 回以下のみで横断する。

6 点：50％を超えるステップで梁上を横断する。

5 点：1 本の後肢で、50％を超えるステップで梁を横断。

4 点：梁上に少なくとも一度は重量支持ステップを有する。

3 点：後肢を引きずって這う、または後肢を漕ぐように動かす。

2 点：掃引せずに後肢を引っ張る、または横行することはできないが、体重を支えながら後肢を置くことによって 5 秒間以上バランスを維持する。

1 点：後肢を梁に乗せずに横断する、または横断することはできないが後肢を梁に乗せずに 5 秒間以上バランスを維持する。

0 点：5 秒以内に落下する、または後肢が動かない。

免疫組織化学染色

25 mL の 4% PFA/PBS で、マウスを経心的に灌流固定した。脊髄を取り出し、4% PFA/PBS、4 °C で一晩後固定を行った。続いて 20% スクロース/PBS、30% スクロース/PBS をそれぞれ 4°C でサンプルが沈むまで浸透させた。そして、組織を OCT compound に包埋し、凍結標本を作製した。クライオスタットを使用し、損傷部位を中心に、冠状方向に厚さ 20 または 30 µm、矢状方向に 20 µm の凍結薄層切片を作製した。切片を MAS コート済みのスライドガラスに貼り付けて乾燥させた後、PBS で洗浄し、3% Normal donkey serum 含有 TBST（0.1% Triton X-100/PBS）または 3% Normal goat serum 含有 TBST（0.1% Triton X-100/PBS）により室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、ブロッキンング溶液に希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、ブロッキング溶液に希釈した二次抗体を室温遮光下で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、Fluorescent mounting medium（Dako, Carpinteria, CA, USA）を用いて封入した。使用した抗体及び希釈濃度は以下の通りである。一次抗体: goat anti-IL-17RA 抗体（1:50; R&D Systems）、rabbit anti-IL17RA 抗体（1:100; Bioss）、rabbit anti-Ki67 抗体（1:200; Abcam）、mouse anti-GFAP 抗体 （G-A-5, 1:1000; Sigma Aldrich）、rabbit anti-5-HT(Serotonin)抗体（1:2000; Immunostar）、rabbit anti-Iba1 抗体（1:1000; Wako）、rabbit anti-PDGFRβ 抗体（1:1000; Abcam）、二次抗体: Alexa Fluor 568 donkey anti-goat IgG (H+L)（1:500; Invitrogen）、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)（1:500; Invitrogen）、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L)（1:500; Invitrogen）、Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (H+L)（1:500; Invitrogen）、Alexa Fluor 647 Streptavidin（1:400; Invitrogen）。核染色には 4′,6-diamidino-2-phenylindole（DAPI, 1 µg/ml）を用いた。観察、撮影には蛍光顕微鏡（Olympus BX53, 44FL）および 共焦点レーザー顕微鏡（Olympus,FV1200, FV3000）を使用した。組織切片における蛍光強度

の定量は、Image J software (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA) を使用して解析した。

BDA投与による順行性皮質脊髄路神経の標識

脊髄損傷後 28 または 42 日目において、マウスを麻酔し、ステレオタキシス上に頭部を固定した。ドリルで両大脳皮質運動野上の頭蓋骨を注意深く取り除いた。その後、大脳皮質運動野後肢領域より脊髄に投射する皮質脊髄路を標識するため、順行性トレーサーである 10％BDA (Biotinylated dextran amine)溶液（10,000 MW、Thermo Fisher Scientific）を、マイクロシリンジに取り付けたガラス毛細管で大脳運動皮質の後肢領域（ブレグマからの座標：後方 0.5 mm /外側 0.5 mm、後方 0.5 mm / 1.0 mm 横、1.0 mm 後部/0.5 mm 横、1.0 mm ポスト/1.0 mm 横、深さ 0.5 mm、それぞれ 0.5μL。）に注入した。BDA 注射から 14 日後、マウスを 4% PFA/PBS で経心的に灌流固定し、脊髄サンプルを採材した。

神経軸索の定量

BDAで標識した皮質脊髄路（CST）の神経軸索及び、抗5-ヒドロキシトリプタミン（5-HT）抗体で染色したセロトニン作動性毛幹（5-HT）脊髄軸索密度を評価した。BDAを注射した2週間後（脊髄損傷6週及び8週間後）に脊髄を採材し、損傷中心部から吻側・尾側それぞれ3 mmまで、冠状方向に厚さ20 μmの連続凍結薄層切片を採取しBDA陽性軸索及び5-HT陽性軸索を観察した。

CST軸索の定量では、皮質脊髄路から発芽し、脊髄灰白質へ投射するBDA陽性軸索のみを定量した。また、マウスの個体間でのBDAの標識効率の違いを補正するため、CSTの発芽は、損傷中心部から3 mm吻側のBDA陽性軸索の割合を基準とし、損傷中心部からの各部位と比較して、定量的に評価した。

5-HT陽性軸索の発芽は、脊髄中心管を中心とした一辺750 μm四方の領域内における、5-HT陽性軸索の軸索密度を定量することで評価した。また、CST軸索の定量と同様に、マウスの個体間での5-HTの標識効率の違いを補正するため、損傷部位から3 mm吻側の5-HT陽性軸索の割合を基準として定量化した。

上衣細胞の細胞増殖の検討

上衣細胞の細胞増殖は脊髄中心管上衣細胞層における Ki67 陽性細胞数を計測した。損傷部中心より頭側において、冠状方向に厚さ 30 μm の凍結薄層切片を連続的に 30 枚採取し、1 切片あたりの細胞数を算出し、定量化した。Ki67 陽性細胞数の計測を行う際、上衣細胞の指標として脊髄中心管上の DAPI と共局在していることを確認した。

フローサイトメトリー（**FACS**）

以下の操作は細胞の状態を保つために氷上で行った。マウスに麻酔をし、氷冷した PBS で経心的に灌流をして脱血させた。脊髄を摘出し、メスで組織を細かく刻んだ後、Collagenase D (Roche, 1 mg/mL in PBS + 2.5 mM $CaCl_2$) 溶液 4 mL に懸濁して 37 °C で 30 分間インキュベートした。ピペッティングで細胞をよく懸濁し、PBS で 15 mL にメスアップした後、1,500 rpm で 3 分間遠心した。PBS で洗浄後、70 μm cell strainer（BD Falcon）に通し、1,500 rpm で 3 分間遠心した。 上清を除去した後、30% Percoll (GE ヘルスケア) 4 mL に懸濁した。パスツールピペットで 70% percoll 4 mL を 30% percoll の下に注ぎ、2,000 rpm で 30 分間遠心した。上層のミエリンを除去し、30%-70%の中間層から細胞懸濁液を 3 mL 採材した。10 mL の PBS を加えて希釈し、よく転倒混和した後に遠心した。遠心後得られたペレットをサンプルとして用いた。細胞を PMA (100 ng/mL, Sigma-

Aldrich), ionomycin (750 ng/mL, Calbiochem), brefeldin A (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) で 4 時間刺激した。Fixation/permealization kits (BD Bioscience)で処理を行った後、以下の蛍光標識抗体を 100 μL の Wash buffer に 100 倍希釈でそれぞれ加え、遮光して氷上で 30 分間インキュベートした。PE anti-IL-17A (BD Pharmingen)、FITC anti-CD11b、APC anti-Ly6G、APC/Cy7 anti-CD4、PerCP/Cy5.5 anti-CD45、Brilliant Violet 421 anti-CD4、FITC anti-CD4、APC anti-CD3、PerCP anti-CD19、Brilliant Violet 421 anti-CD45、FITC anti-γδTCR、PerCP anti-CD11b、FITC anti-CD8a (Biolegends)。フローサイトメトリーには FACS Canto II (BD Biosciences)を使用し、FACS DIVA software (BD Biosciences)で解析を行った。

レーザーマイクロダイセクション（Laser microdissection; LMD）

脊髄損傷 3 日後、7 日後、のマウスに麻酔をかけた後、氷冷した PBS で経心的に灌流を行った。損傷部の脊髄を採材し、optimal cutting temperature（OCT）compound （Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA）に包埋し、液体窒素で十分に冷やしたイソペンタンを用いて凍結させた。損傷部を中心に、冠状方向に厚さ 30 μm の凍結薄層切片を連続的に 40 枚採取し、フォイル付きスライド（Leica：11505158）に張り付けて乾燥させた。4 °C で冷やした 100% エタノールに 3 分間、DEPC-DDW に 3 分間浸した。0.05% トルイジンブルーに 1 分間浸し、DEPC-DDW で 2 分間の洗浄を 2 回行った後、ドライヤーで 5 分間乾燥させた。そして、Laser microdissection (LMD7000, Leica Mirosystems)で必要箇所を切断し、PCR チューブの蓋（RNA 抽出 buffer 入り）に細胞を採材した。RNA 抽出後、RNAeasy Plus Mini Kit（QIAGEN）を用いて RNA の精製を行った。精製した RNA は PrimeScript^{TM}II High Fidelity RT-PCR Kit (R023A, Takara)を使用し、逆転写反応を行った。その後、定量的 PCR で遺伝子発現量の解析を行った。

ニューロスフィア法

マウスに麻酔をかけた後、氷冷した PBS で経心的に灌流を行った。脊髄を摘出し、メスで組織を細かく刻んだ後、1 mL の Papain (0.1 mg/mL, Worthington)含有 PBS を加え、37 °C で 30 分間振盪した。9 mL の HBSS を加え、ピペッティングにより細胞をよく懸濁し、70 μm cell strainer（BD Falcon）に通し、1,500 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去した後、10 mL の 0.9 M sucrose/ 0.5× HBSS を加え、ピペッティングにより細胞をよく懸濁し、800×g で 10 分間遠心した。上清を除去し、10 mL の Neurobasal medium (Life Technologies)を加え、1,500 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去した後、B-27 (Life Technologies)、bFGF (10 ng/mL, Peprotech)、EGF(10 ng/mL, Peprotech)、penicillin-streptomycin (Life Technologies) 、そして rIL-17A (50 or 25 ng/mL, R&D systems)又は vehicle を加えた Neurobasal medium 8 mL 中に再懸濁した。6 well ディッシュに 4 mL/well になるよう細胞を播種し、37°C、5% CO_2 で 11 日間培養した。形成された全てのニューロスフィアの直径を測定し、その平均値を一つのサンプル値とした。ニューロスフィアの観察及びサイズ測定は蛍光顕微鏡 BZ-9000（Keyence）を使用した。

統計

全ての図は平均値 ± 標準誤差（SEM）を示した。行動評価における有意差検定は反復測定二元配置分散分析（two-way repeated measure ANOVA）により、*post hoc* Bonferroni test を行った。その他の実験における有意差検定は二元配置分散分析（two-way ANOVA）又は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）により、*post hoc* Tukey-Kramer test 及び *post hoc* Bonferroni test 、Student’s *t* test、Mann–Whitney U test を行った。危険率は 5 %で有意差を検定した。

結果

1. 損傷部脊髄での IL-17A の阻害は、脊髄損傷後の運動機能回復を促進する

まず初めに、脊髄損傷後の損傷部脊髄における IL-17A の発現を調べた。本研究では、マウスの第 9-10 胸髄を圧挫傷させた脊髄損傷モデルを作製し、胸椎を除外して脊髄の露出のみを施したマウスを偽手術（Sham）群として使用した。Sham 群と脊髄損傷後 1、3、7、14、28 日後の脊髄損傷部からそれぞれ RNA を抽出し、定量的 PCR により IL-17A の発現量を検討した。その結果、損傷後には IL-17A の発現量の増加が認められた（Figure 1A）。特に脊髄損傷後 7 日目以降において、IL-17A の発現量が顕著に増加していた。

さらに IL-17A 発現細胞を特定するため、損傷後の脊髄から免疫系細胞を採材してフローサイトメトリーを行った。脊髄損傷 7 日後の損傷部脊髄を採材し、IL-17A を産生している免疫細胞を同定した。その結果、γδT 細胞が、IL-17A を多く産生していることが明らかとなった。（Figure supplement 1）。予想に反して、CD4+T 細胞や CD8+T 細胞からの IL-17A の産生は少なかった。

IL-17 欠損マウスを用いた先行研究から、IL-17A は脊髄損傷後の組織障害に働き、機能回復を阻害していることが示唆されている [19]。そこで、脊髄損傷部の IL-17A の機能を阻害することにより、損傷後の運動機能回復が強く促されると考え、その可能性の検討を行った。脊髄損傷を施した成体マウスの背部の皮下に浸透圧ミニポンプを留置し、損傷後 7 日間の IL-17A 中和抗体の局所投与を行った。その後、運動機能解析及び組織学的解析を行った。本研究の脊髄損傷モデルの作成においては、コントロール群と Il-17A 中和抗体投与群の間での、損傷の強さや深さにおいては大きな違いは観察されなかった（Figure 1B, C）。

また初めに、IL-17A 中和抗体が真に IL-17A を阻害できているのかを確認し

た。先行研究より、線維芽細胞を IL-17A で刺激すると IL-6 を放出することが知られている[35]。そこで、NIH3T3 細胞（マウス線維芽細胞の細胞株）に rIL-17A と IL-17A 中和抗体を加えて培養し、培養上清中に放出された IL-6 の量を測定した（Figure 1D）。その結果、rIL-17 を加えることで IL-6 の産生を誘導できたが、中和抗体存在下では IL-6 の産生が抑制された。このことから、本実験で使用した IL-17A 中和抗体は IL-17A を阻害できていることが示された。

次に、IL-17A 中和抗体投与が脊髄損傷後の運動機能回復を促進するのかどうか検討した。脊髄損傷後 8 週に渡って、運動機能評価法である Basso mouse scale (BMS) test、Beam walking test を実施した（Figure 1E）。その結果、コントロール群と比べて、IL-17A 中和抗体投与マウスでは、脊髄損傷後の機能回復が有意に促進された（Figure 1F, G）。どちらのマウス群においても、脊髄損傷後に後肢の運動機能が著しく障害されたが、慢性期にかけての機能回復の程度は、IL-17A 中和抗体投与マウスの方が促進されていた。

これらの結果から、先行研究と同様に、損傷部脊髄で発現上昇する IL-17A は、運動機能回復を抑制する働きを持つことが示唆された。そこで、IL-17A 中和抗体投与が損傷部を構成する細胞に与える影響を調べるために、組織学的解析を行った。

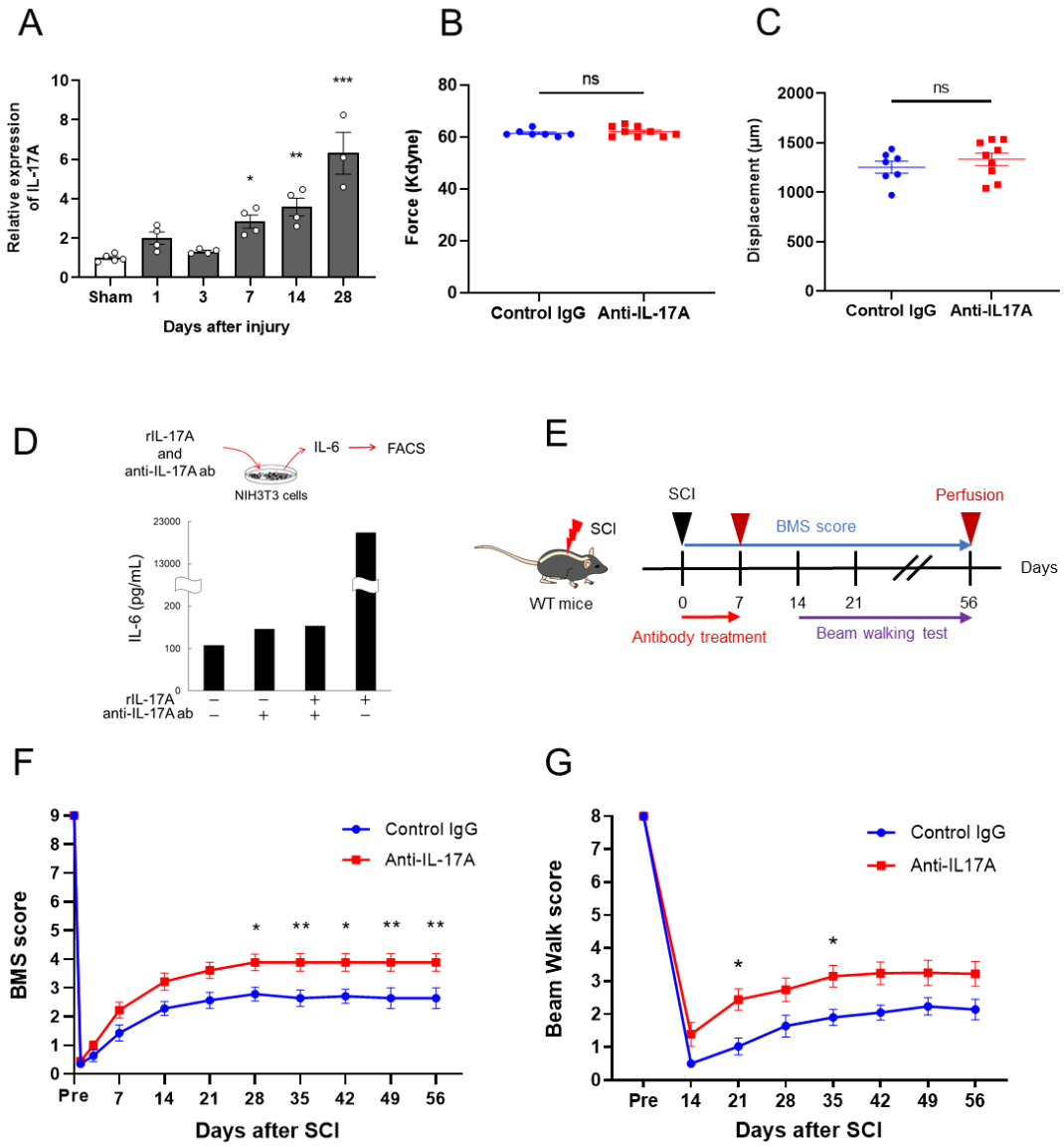


Figure 1. IL-17A 中和抗体投与により、脊髄損傷後の運動機能回復が促進される

(A) Sham 群、脊髄損傷 1、 3、 7、 14、 28 日後における脊髄損傷部の IL-17A の mRNA 発現量を定量した。(B) 脊髄損傷で脊髄に与えられた圧力（kilodynes）の値。グループ間で統計的な差がないことを示している（Control IgG = 61.43, Anti-IL-17A = 62.00, P = 0.5118）。(C) 脊髄損傷時の脊髄表面からインパクター先端の作動距離（深さ）（μm）。グループ間で統計的な差がないことを示している（Control IgG = 1253, Anti-IL-17A = 1332, P = 0.3898）。(D) 使用した IL-17A 中和

抗体による IL-17A 阻害効果の検討。NIH3T3 細胞に rIL-17A と IL-17A 中和抗体を加えて 2 日間培養し、放出される IL-6 量を測定した。中和抗体の投与により、IL-6 の放出量が大幅に抑制された(n = 1)。(E) 実験のタイムコース。脊髄損傷後 7 日間にわたって、浸透圧ミニポンプにより IL-17A 中和抗体を局所投与した。その後 56 日にわたって運動機能の評価を行った。(F) BMS スコア及び(G) Beam walking スコアの経時的変化。(A) n = 3-5, (B), (C), (F), (G) Control IgG: n = 7, Anti-IL-17A: n = 9, ns : non-significant, mean ± SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001; (A): one-way ANOVA, Tukey-Kramer posthoc test, (B), (C): Student's t test, (F), (G): two-way repeated measure ANOVA, Bonferroni post-hoc test。

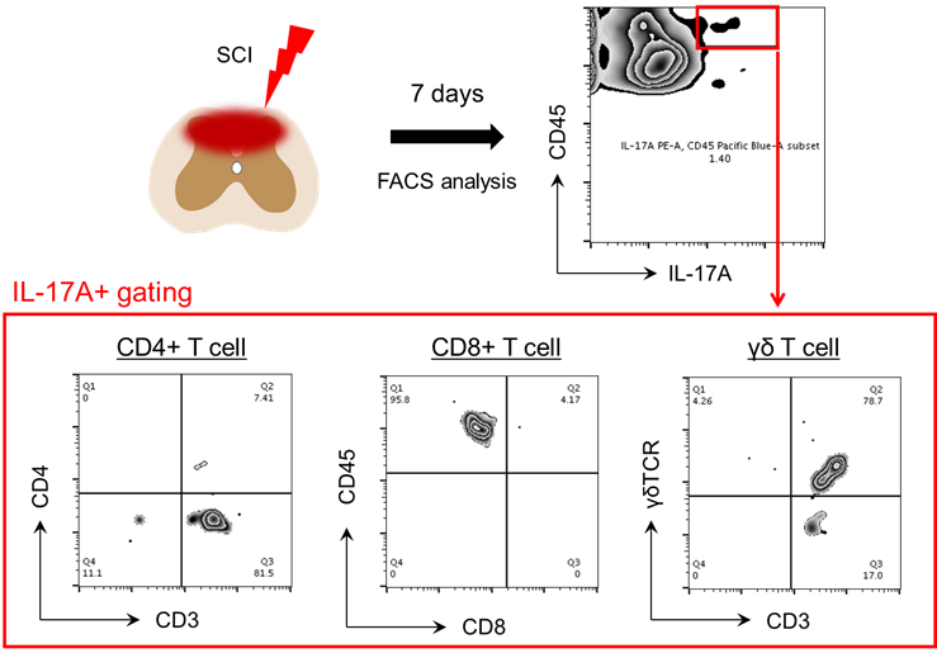


Figure supplement 1. フローサイトメトリーによる **IL-17A** 発現細胞の検討

脊髄損傷 7 日後の脊髄から免疫系細胞を採材し、CD45 (leukocytes)、CD3 (T cell)、CD4 (helper T cells)、CD8 (cytotoxic T cells)、γδTCR (γδT cells)、IL-17A 抗体で標識後フローサイトメーターにより解析を行った。

２．IL-17A の阻害は、神経軸索の発芽と中心管周辺細胞の増殖を促進する

IL-17A 中和抗体投与群マウスでは運動機能回復が促進されたことから、IL-17A が神経回路網の回復に関与していると仮説を立て、その検証を行った。皮質脊髄路（CST）は、主に運動ニューロンの軸索で構成され、運動動作の制御に重要な働きを持つ神経回路であり、この経路を主に皮質運動野から脊髄へと運動ニューロンが走行している。また脊髄損傷後、損傷を免れた軸索から発芽が起こり、神経回路の再形成をすることで神経機能の回復に寄与することが報告されている[36]。したがって、神経回路網の再編において、発芽は重要な要因の一つであると考えられている。

そこで、ビオチン-デキストランアミン（BDA）を感覚運動皮質に注入することにより、下行皮質脊髄路（CST）の軸索発芽を調べた（Figure 2A, B）。脊髄損傷 6 週後に BDA を注射し、その 2 週間後（脊髄損傷 8 週間後）に脊髄を採材した。損傷中心部から吻側・尾側それぞれ 3mm まで連続横断切片を採材し、BDA 陽性軸索を観察した。メイン CST から灰白質に伸びる BDA 陽性軸索のみを定量した。CST の発芽は、損傷部位から 3mm 吻側の BDA 陽性軸索の割合を基準として、損傷中心部からの各部位と比較して、定量的に評価した。いずれの群のマウスでも、損傷部の尾側で BDA 陽性軸索は検出されなかった。この結果は、病変は下行 CST の軸索を完全に切断したことを示している。一方で、IL-17A 抗体処置群では、SCI 後の損傷部位への吻側 CST の軸索発芽を有意に増強していることが観察された（Figure 2A, B）。また、縫線核脊髄路のセロトニン作動性神経軸索が運動機能に寄与することが知られている[37]。そこで、脊髄損傷 8 週間後に脊髄を採材し、抗 5-ヒドロキシトリプタミン（5-HT）抗体を用いた免疫染色法により、下行性セロトニン作動性毛幹脊髄軸索密度を評価した。BDA で標識された CST の評価方法と同様に、損傷部位から 3mm 吻側の

5-HT 陽性軸索の割合を基準として定量的に評価した。その結果、コントロール群よりも IL-17A 中和抗体処置マウスにおいて、損傷部位の吻側の脊髄でより多くの 5-HT 陽性軸索が観察された（Figure 2C, D）。以上の結果は、IL-17A 中和抗体投与が脊髄損傷後の軸索の発芽を促進することを示唆している。

また本研究では、損傷後に発芽する神経軸索の密度は、中心管付近で増加している傾向が観察された。一方、先行研究から IL-17A の発現は、脊髄損傷後に中心管付近の灰白質においても増加することが示唆されている[38]。そこで、脊髄損傷後に発現増加する IL-17A は中心管付近の細胞へ影響を与えていると推察し、その検証を行った。細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体を用いて、中心管周辺細胞の増殖能を評価した。その結果、抗 IL-17A 抗体で処置をしたマウス群では、コントロール群よりも抗 Ki67 抗体で染色される上衣細胞の数が増加する傾向が認められた（Figure 2E, F）。これらの結果から、IL-17A が上衣細胞に対して影響を与えていることが示唆された。

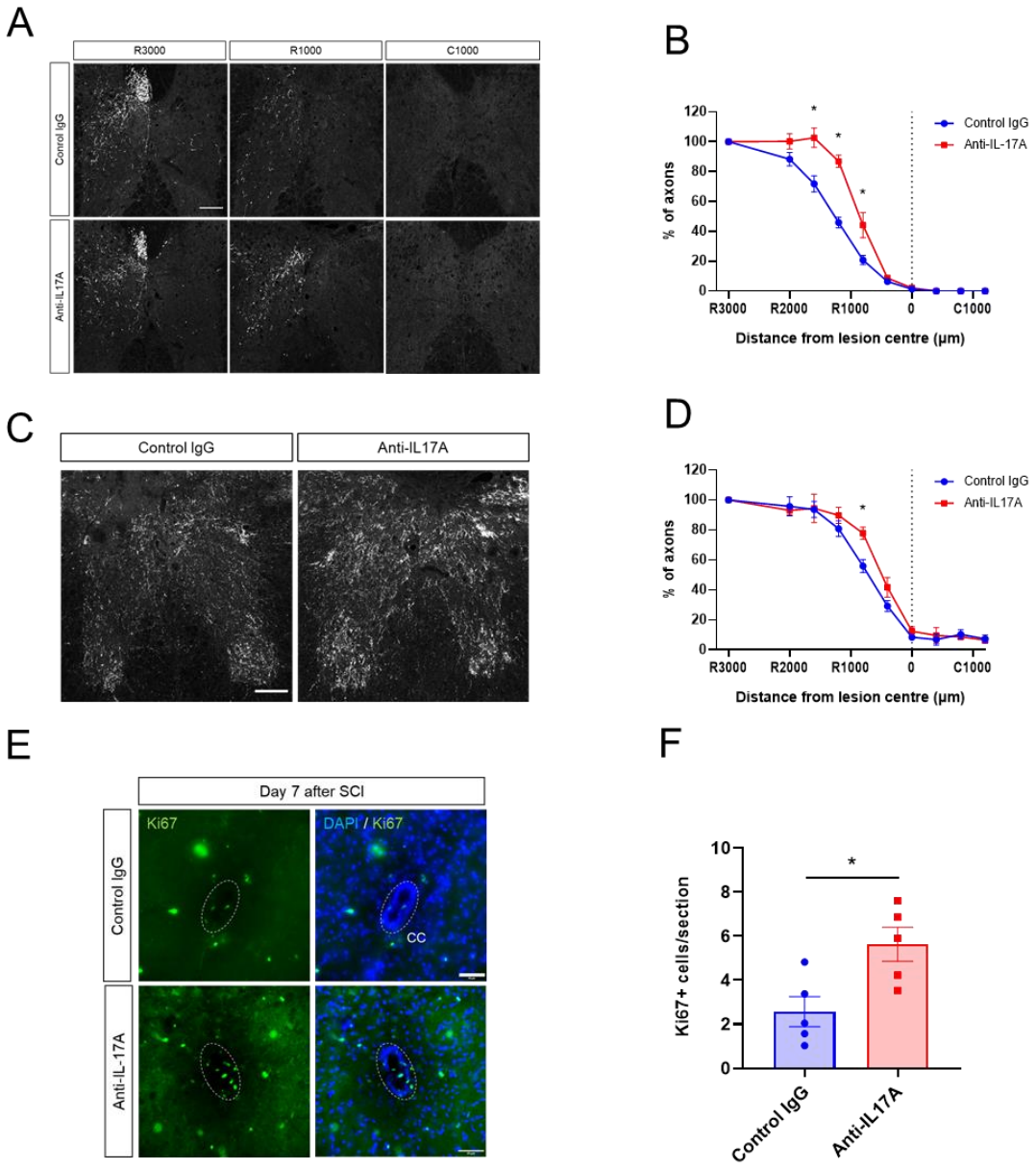


Figure 2. IL-17A の阻害は神経軸索の発芽と中心管周辺細胞の増殖を促進する

(A) BDA で標識された皮質脊髄路（CST）からの神経軸索（白）の免疫染色像。コントロール群（上段）と IL-17A 中和抗体投与群（下段）における、損傷中心部から吻側 3000 μm (R3000)及び 800 μm (R800)、尾側 1000 μm (C1000)付近の脊髄断面。Scale bar, 100 μm (B) 損傷中心部から各部位における CST 軸索の数は、吻側 3 mm に存在する軸索の総数の割合として算出した。(C) 5-HT (白)による免

疫染色像。コントロール群（左）と IL-17A 中和抗体投与群（右）における、損傷中心部から吻側 800 µm (R800)付近の脊髄断面。Scale bar, 100 µm (D) 損傷中心部から各部位における 5-HT 軸索の数は、吻側 3 mm に存在する軸索の総数の割合として算出した。(E) 脊髄損傷 7 日後の脊髄中心管上衣細胞における、Ki67（緑）と DAPI（青）による免疫染色像。IL-17A 中和抗体の投与により、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性の上衣細胞数が増加している傾向が観察された。白破線は中心管（Central Canal; CC）を示している。Scale bar, 50 µm. (F) Ki67 陽性の上衣細胞数の定量。中心管における、DAPI と Ki67 を共発現している細胞数を測定した。それぞれの個体で、厚さ 30 µm の切片 20 枚以上を測定に使用した。mean ± SEM , *$p < 0.05$, (B), (D); n = 4, mean ± SEM, Mann–Whitney U test (F); n = 5, mean ± SEM, Student's *t* test。

3. IL-17RA(Interleukin-17 Receptor A)は脊髄中心管上衣細胞で発現する

IL-17A シグナルの上衣細胞への関与明らかにするために、上衣細胞における IL-17 受容体 A（IL-17RA）の発現を確認した。上衣細胞特異的に $CreERT^2$ が発現する遺伝子組換えマウスである $FoxJ1CreERT^2$::R26RtdTomato マウスを使い、Cre 依存的に上衣細胞で tdTomato を発現させ、上衣細胞における IL-17RA の発現を調べた（Figure 3A）。この遺伝子改変マウスにタモキシフェン投与を与えると、成体脊髄においては、脊髄中心管上衣細胞特異的に tdTomato が発現することが先行研究により示されている[23, 24]。成体マウスにタモキシフェンを投与し、Cre 依存的な遺伝子組み換えを引き起こすと、確かに脊髄中心管上衣細胞で tdTomato の発現が確認できた。次に、損傷した脊髄切片を抗 IL-17RA 抗体を用いて、免疫組織染色した。その結果、脊髄中心管上衣細胞で IL-17RA の発現が観察された（Figure 3B）。さらに、脊髄損傷後の脊髄中心管上衣細胞における IL-

17RA の遺伝子発現量解析を行った。脊髄損傷 3 日後に脊髄組織を採材した後に脊髄切片を作製し、レーザーマイクロダイセクション法により、損傷部の脊髄から中心管に局在する上衣細胞を単離した（Figure supplement 2A）。その後、単離した上衣細胞から RNA を抽出し、定量的 PCR により IL-17RA (Interleukin-17 Receptor A)の発現を定量した。その結果、IL-17RA の発現の増加傾向が認められた（Figure supplement 2B）。これらの結果から、IL-17A シグナルが脊髄損傷後の上衣細胞による組織修復に関与していることが示唆された。そこで、IL-17A が上衣細胞の増殖能へ影響を与えている可能性を検討した。

まず、脊髄損傷後の上衣細胞の増殖能の経時的変化を検討した。野生型マウスに脊髄損傷を施し、Sham 群と脊髄損傷後 1、3、7、14、28 日後の損傷部脊髄を採材した。そして、細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体を用いて、損傷中心部から吻側 1mm 付近の Ki67 陽性の上衣細胞数の定量を行った。その結果、脊髄損傷後 3 日において増殖能が最も高くなり、その後は減弱していくことが明らかとなった（Figure 3C）。これらの結果と、損傷部における IL-17A の発現量が脊髄損傷後 7 日以降に上昇していることから、IL-17A が上衣細胞の増殖能へ影響を与えていることが示唆された。

さらに、損傷中心部の上衣細胞由来の細胞の増殖能を調べるため、FoxJ1CreERT^2::R26RtdTomato マウスを用いて、IL-17A 中和抗体投与が、脊髄損傷後の上衣細胞由来細胞へ与える影響を調べた（Figure 3D）。脊髄損傷後 8 週後に脊髄を採材し、tdTomato 陽性細胞の領域を定量した結果、コントロール群と比べて、IL-17A 中和抗体投与群では、上衣細胞由来の tdTomato 陽性細胞数が、顕著に増大していることが明らかとなった（Figure 3E, F）。特に、吻側において上衣細胞の増殖が促進されることが明らかとなった。以上の結果から、IL-17A が脊髄損傷後の上衣細胞の増殖を抑制していることが示唆された。

また、損傷後の増殖した上衣細胞の分化能の検討も行った。上衣細胞由来細胞の一部は脊髄損傷後に、限定的ではあるが、GFAP 陽性のアストロサイトや Olig2 陽性のオリゴデンドロサイトに分化することが知られている [24, 25, 39]。しかし、IL-17A 中和抗体投与が上衣細胞の分化能に与える影響に関して、免疫染色法による組織学的解析では、明確な違いは観察できなかった（Figure supplement 3）。

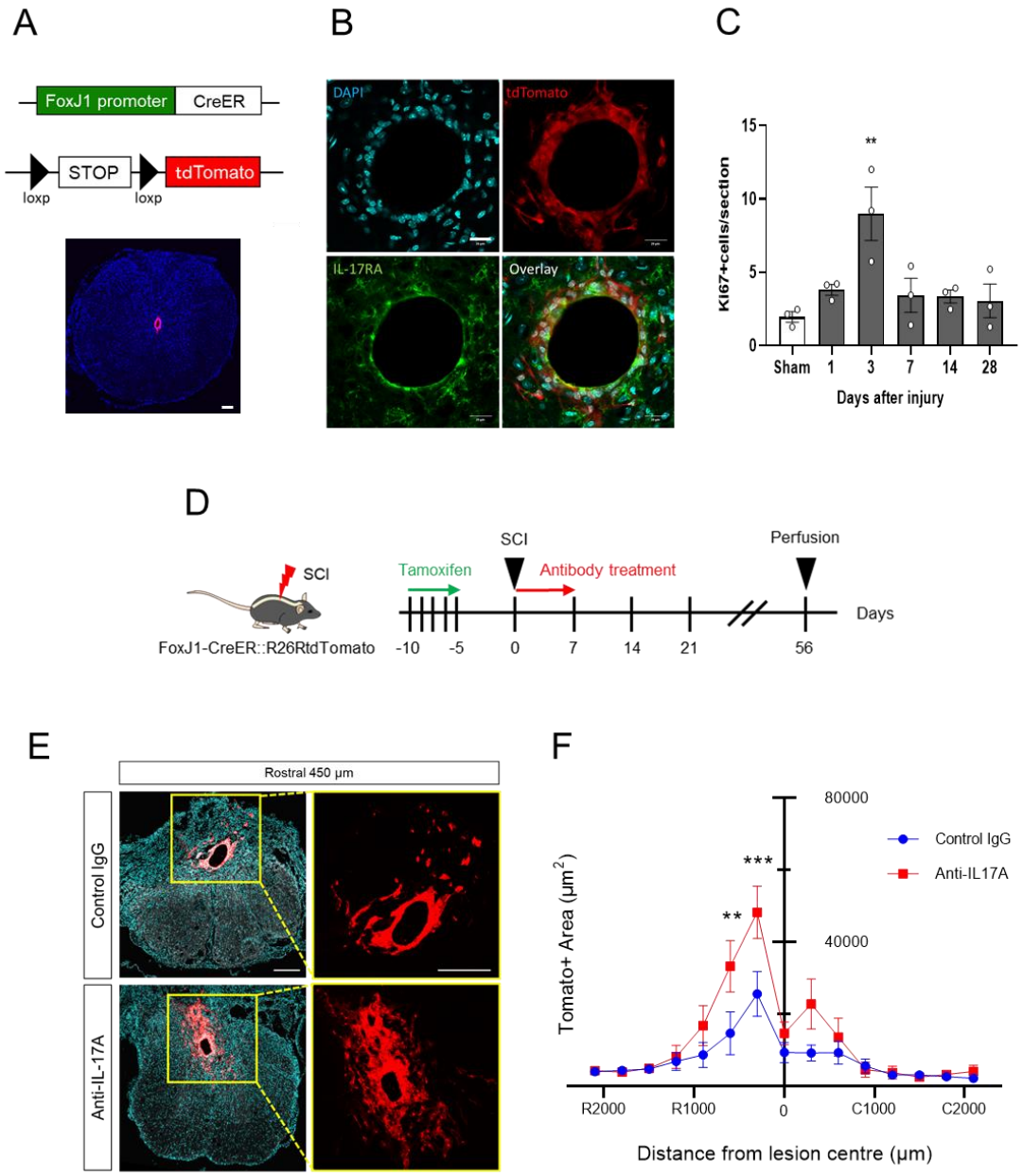


Figure 3. IL-1７RA は脊髄中心管上衣細胞で発現する

(A) 上衣細胞特異的に CreERT^2 が発現する遺伝子組換えマウスである FoxJ1-CreERT^2 マウスを使い、Cre 依存的に上衣細胞で tdTomato を発現させた。(B) 脊髄損傷後の脊髄中心管上衣細胞における IL-17RA（緑）、tdTomato（赤；上衣細胞）、DAPI（青；核）の共染色像。Scale bar, 20 µm. (C) Sham 群並びに脊髄損傷後の各時点での脊髄中心管上衣細胞における増殖性細胞数の定量。DAPI 及び細胞増殖マーカーである Ki67 陽性の上衣細胞数を定量した。(n = 3, mean ± SEM, $^{**}p < 0.01$, one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-hoc test)。(D) 実験のタイムコース。脊髄損傷後 7 日間にわたって、浸透圧ミニポンプにより IL-17A 中和抗体を局所投与した。その後 56 日目に脊髄を採材した。(E) DAPI（青：核）と tdTomao（赤：上衣細胞由来の細胞）及び 5-HT（白：セロトニン作動性神経線維）で染色された、損傷中心部から吻側 450 µm (R450)の脊髄断面。Scale bar, 100 µm. (F) tdTommato 陽性の上衣細胞由来細胞が占める面積の定量。損傷中心部から吻側及び尾側へ 300 µm 間隔の脊髄切片を定量した。(Control IgG: n = 5, Anti-IL-17A: n = 4, mean ± SEM, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test)。

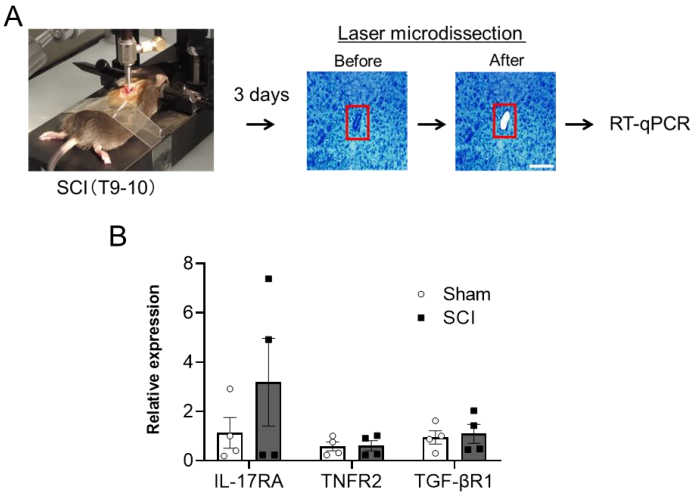


Figure supplement 2. LMD による炎症関連分子の受容体の発現検討

(A) レーザーマイクロダイセクション法（LMD）により、脊髄中心管上衣細胞を単離した。Scale bar, 50 µm. (B) 損傷 3 日後の脊髄から LMD で採取した上衣細胞における、炎症性サイトカイン受容体 (IL-17RA、TNFR2、TGF-βR)の mRNA の発現量を定量した (n = 4, mean ± SEM)。

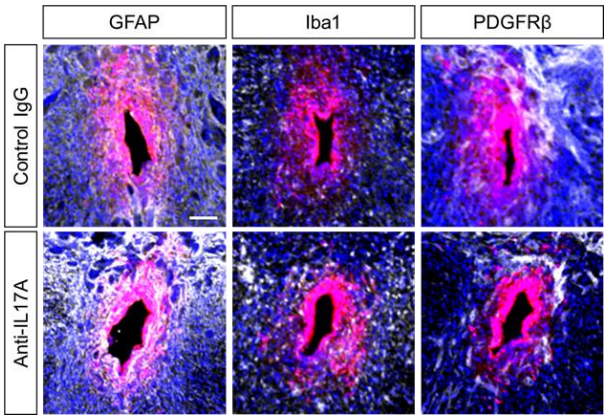


Figure supplement 3. IL-17A 阻害が上衣細胞の分化能へ与える影響の検討

損傷 56 日後の脊髄損傷部における、DAPI（青）及び上衣細胞由来の細胞（赤）と、各種細胞マーカー（白）である GFAP（アストロサイト）、Iba1（ミクログリア）、PDGFRβ（ペリサイト）の免疫染色像。2 群間で明確な差は観察されなかった。

４. IL-17A は上衣細胞由来ニューロスフェアの増殖を抑制する

IL-17A による上衣細胞の増殖に対する影響を *in vitro* で検討した。先行研究により、成体脊髄の細胞分散液を、無血清培地に成長因子のみを加えた条件下で培養すると、上衣細胞由来のニューロスフェアが形成されることが報告されている [23, 24]。そこで、FoxJ1CreERT^2::R26RtdTomato マウスを使い、形成されるニューロスフェアが上衣細胞由来であるかどうか確認した。FoxJ1CreERT^2::R26RtdTomato マウスの脊髄から、ニューロスフェアを作成した（Figure 4A）結果、ニューロスフェアを構成している細胞は、ほとんどが tdTomato 陽性細胞で構成されており、上衣細胞由来の細胞からニューロスフェアが形成されることが確認できた（Figure 4B）。そこで、IL-17A が上衣細胞の増殖に及ぼす影響を検討するため、この実験系を用いて、IL-17A 存在下で上衣細胞からニューロスフェアを作製して、その直径を計測した（Figure 4A）。その結果、IL-17A 存在下ではニューロスフェアの直径が有意に小さく計測された（Figure 4C, D）。この結果は、in vitro においても、IL-17A は上衣細胞の増殖を抑制していることを示唆している。

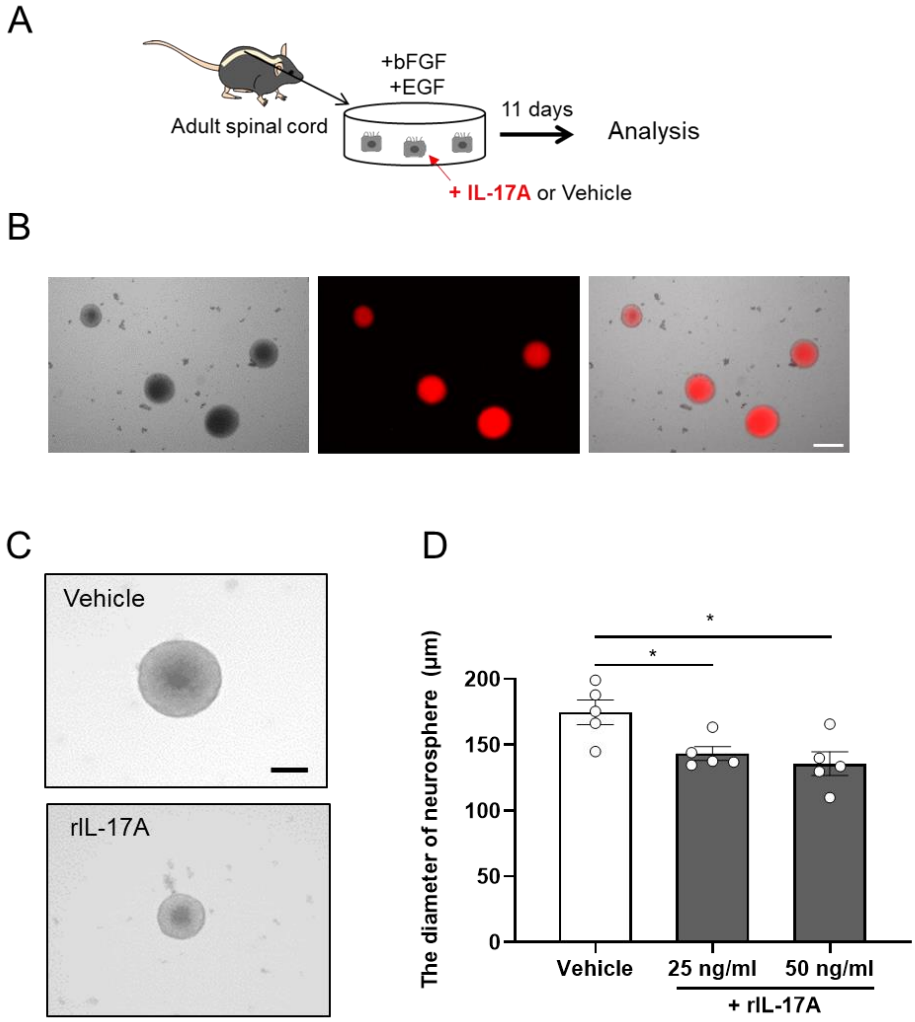


Figure 4. IL-17A が上衣細胞の増殖能に与える影響の in vitro での検討

(A) ニューロスフェア法の概略図。成体マウスから脊髄を摘出し、無血清培地に bFGF と EGF を添加した培養液に、rIL-17A 又は Vehicle を添加し、11 日間培養することでニューロスフェアを作製した。(B) FoxJ1CreERT^2::R26RtdTomato マウスの脊髄からニューロスフェアを作製した 位相差像（左）と蛍光画像（中）の重ね合わせ画像（右）。Scale bar, 100 μm (C) rIL-17A の添加の有無条件下における、ニューロスフェアの位相差像。Scale bar, 100 μm (D) ニューロスフェアの直径を計測して増殖能を評価した (n = 5, mean ± SEM, *p < 0.05, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test)。

5. 上衣細胞特異的な IL-17A シグナル阻害は脊髄損傷後の機能回復を促進する

脊髄損傷後の損傷部での IL-17A の阻害は、上衣細胞の増殖能及び運動機能回復を促進していることを示唆した（Figure 1-3）。しかしながら、浸透圧ミニポンプを用いた IL-17A 中和抗体の投与は、上衣細胞以外の他の細胞への影響を除外することはできない。そこで、脊髄損傷後における IL-17A の上衣細胞に対する機能を解明するため、上衣細胞特異的に IL-17A のシグナルを阻害した。上衣細胞特異的に IL-17RA を欠損させるため、Cre-loxP システムを用いた。IL-17ra $^{fl/fl}$ マウスを FoxJ1-CreERT^{2} マウスと交配させることで、上衣細胞特異的に IL-17RA を欠損させた（Cre+）マウスを作製した（Figure 5A）。そして、このマウスに脊髄損傷をさせた後、組織学的解析及び運動機能回復の解析を行った（Figure 5B）。タモキシフェンは、毒性を持っており、神経系の発生に大きな影響を与えることが報告されている [40]。本研究では、コントロール群としては、littermate の Cre 遺伝子を持たない（Cre-）マウスを用い、全てのマウスにタモキシフェンの投与を行った。IL-17RA の欠損効率を確認するため、免疫組織化学染色により、脊髄中心管上衣細胞における IL-17RA の発現量を検討した。その結果、IL-17RA 欠損マウス群では、コントロール群と比べて有意に IL-17RA の発現が減少していることが観察できた（Figure 5C）。また、2 群間では、損傷の強さや深さにおいては大きな違いは観察されなかった（Figure 5D, E）。

次に、上衣細胞での IL-17RA の欠損が脊髄損傷後の運動機能回復に与える影響を調べた。脊髄損傷後 6 週間にわたって、後肢の運動機能の評価した結果、IL-17RA 欠損マウスでは後肢の運動機能が有意に回復した（Figure 5F, G）。IL-17A 中和抗体の投与実験と同様、本研究の脊髄挫傷モデルでは、脊髄損傷 4 週以降は運動機能回復があまり観察されなかった。

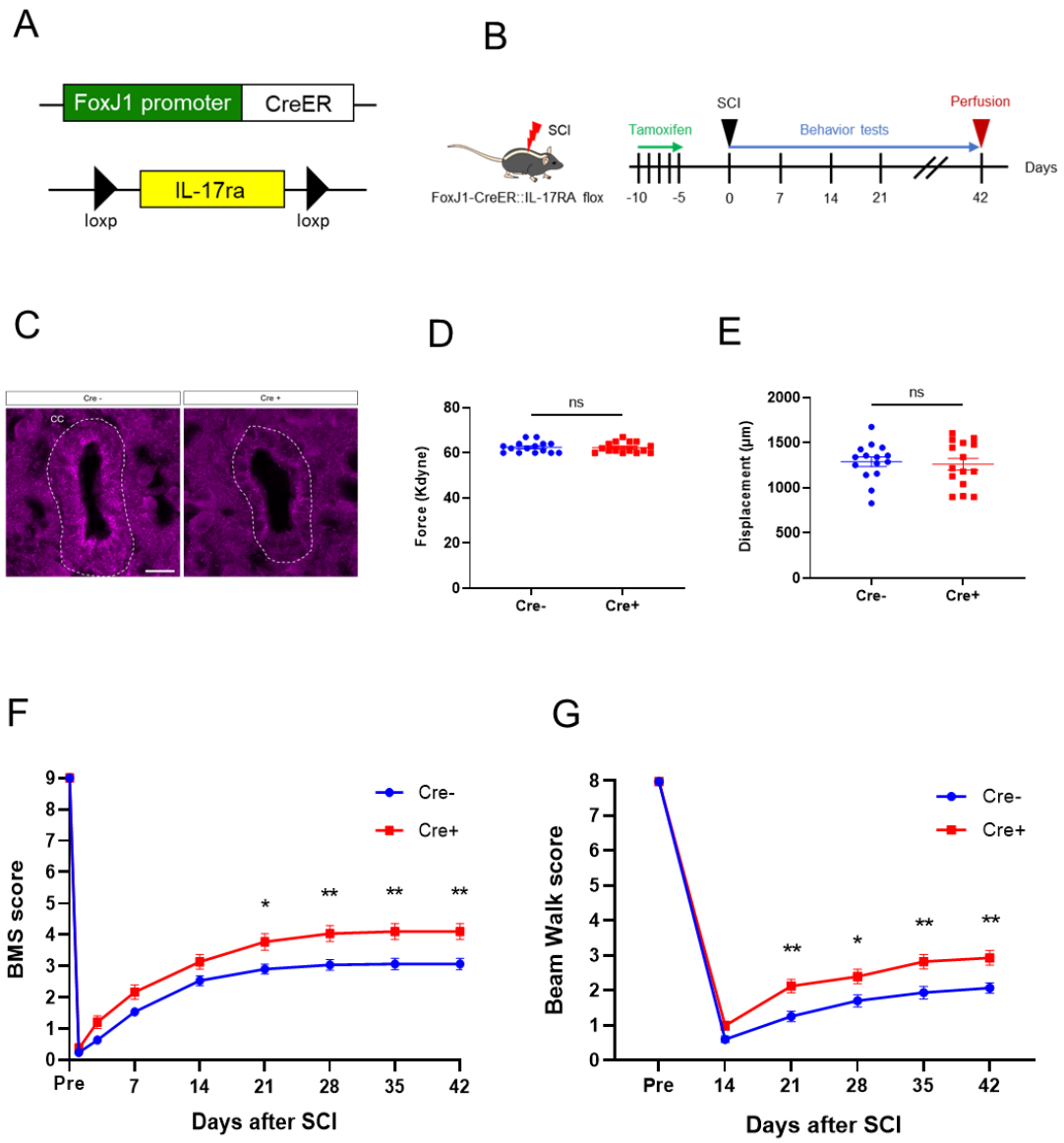


Figure 5. 上衣細胞特異的な IL-17A シグナル阻害により、脊髄損傷後の運動機能回復が促進される

(A) 上衣細胞特異的に CreERT^2 が発現する遺伝子組換えマウスである FoxJ1-CreERT^2 マウスを使い、Cre 依存的に上衣細胞で IL-17RA を欠損させた。(B) 実験のタイムコース。5 日間タモキシフェンを投与し、5 日間のクリアランス期間の後、脊髄損傷を施し、損傷後 42 日目に脊髄サンプルを採材した。(C) コント

ロール（Cre- ; 左）と IL-17RA 欠損（Cre+ ; 右）マウスの脊髄中心管上衣細胞における、IL-17RA(マゼンタ)による免疫染色像。Cre-loxP 部位特異的組換えにより、上衣細胞での IL-17RA の発現量が減少する。Scale bar, 20 μm (D) 脊髄損傷で脊髄に与えられた圧力(kilodynes)の値。グループ間で統計的な差がないことを示している（Cre- = 62.47, Cre+ = 62.33, P = 0.8786 ）。(E) 脊髄損傷で脊髄表面からインパクター先端の作動距離（深さ）（μm）。グループ間で統計的な差がないことを示している（Cre- = 1289, Cre+ = 1261, P = 0.7391）。(F) BMS スコア及び(G) Beam walking スコアの経時的変化。n = 15, ns: non-significant, mean ± SEM, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$; (D), (E): Student's *t* test, (F), (G): two-way repeated measure ANOVA, Bonferroni post-hoc test。

また、IL-17A 中和抗体実験と同様に、脊髄損傷後の神経軸索の発芽への影響を評価するために、CST 神経軸索 (BDA) 及びセロトニン作動性神経軸索 (5-HT)の組織学的解析を行った。脊髄損傷 6 週後に脊髄を採材し、BDA 陽性軸索及び 5-HT 陽性軸索の割合を定量した。その結果、コントロール群よりも IL-17RA 欠損マウス群の方が、有意に神経軸索の発芽が促進されていることが明らかとなった（Figure 6A-D）。興味深いことに、損傷部位の尾側での神経再生の変化は観察されなかったが、やはり損傷部位の吻側の脊髄でより多くの BDA 陽性線維及び 5-HT 陽性線維が観察された。これらの結果は、IL-17A が脊髄損傷後の上衣細胞による組織修復を抑制していることを示唆している。

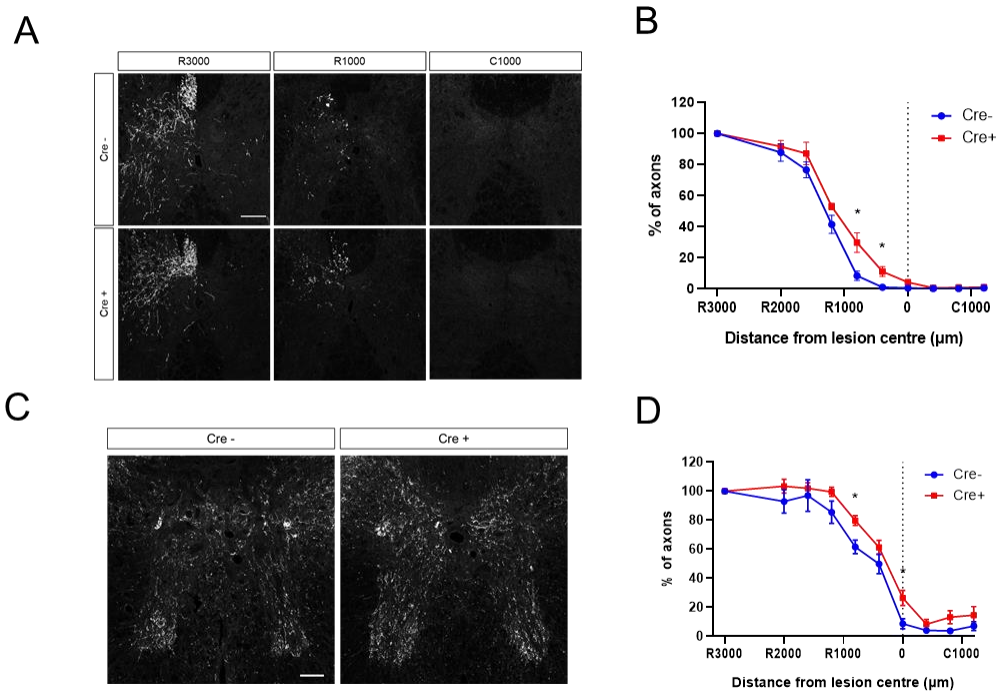


Figure 6. 上衣細胞特異的な IL-17A シグナル阻害は神経軸索の発芽を促進する

(A) BDA で標識された皮質脊髄路（CST）からの神経軸索（白）の免疫染色像。コントロールマウス（上段）と IL-17RA 欠損マウス（下段）における、損傷中心部から吻側 3000 μm (R3000)及び 800 μm (R800)、尾側 1000 μm (C1000)付近の脊髄断面。Scale bar, 100 μm. (B) 脊髄損傷病変中心から様々な距離にある CST 軸索の数は、吻側 3 mm に存在する軸索の総数の割合として算出した。(C) 5-HT (白)による免疫染色像。コントロールマウス（左）と IL-17RA 欠損マウス（右）における、損傷中心部から吻側 800 μm (R800)付近の脊髄断面。Scale bar, 100 μm. (D) 脊髄損傷病変中心から様々な距離にある 5-HT 軸索の数は、吻側 3 mm に存在する軸索の総数の割合として算出した。(B), (D): n = 5, mean ± SEM, *$p < 0.05$, Mann–Whitney U test。

6. 上衣細胞特異的な IL-17A シグナルの阻害により、脊髄損傷後の損傷部における神経栄養因子の発現が上昇する

先行研究により、損傷部の脊髄において、上衣細胞由来のグリア細胞が、神経栄養因子である CNTF (ciliary neurotrophic factor)や HGF (hepatocyte growth factor)、IGF-1 (insulin-like growth factor-1)、TGF-β1 (transforming growth factor–β1)などを産生することが報告されている [25]。脳損傷や脊髄損傷の組織修復には神経栄養因子の産生が必要とされる [41-44]。これらの事実は、上衣細胞が神経栄養因子の産生を介して脊髄損傷後の組織修復を促進することを示唆している。

そこで、上衣細胞特異的な IL-17A シグナル阻害が、脊髄損傷後の損傷部における神経栄養因子の発現量に影響を与えるのかどうか検討した。神経栄養因子の発現変動をより詳しく調べるために、脊髄損傷 2 週、4 週、6 週後に損傷部脊髄を採材し、定量的 PCR 法により神経栄養因子の発現量を検討した。その結果、コントロール群と比べて、IL-17A 中和抗体処置群では、CNTF や TGF-β1 等、いくつかの神経栄養因子の遺伝子発現量が有意に増加していた（Figure 7, Figure supplement 4）。この結果は、先行研究の結果と同様に、上衣細胞からの神経栄養因子の産生が、脊髄損傷後の組織修復に寄与している可能性を示唆している。

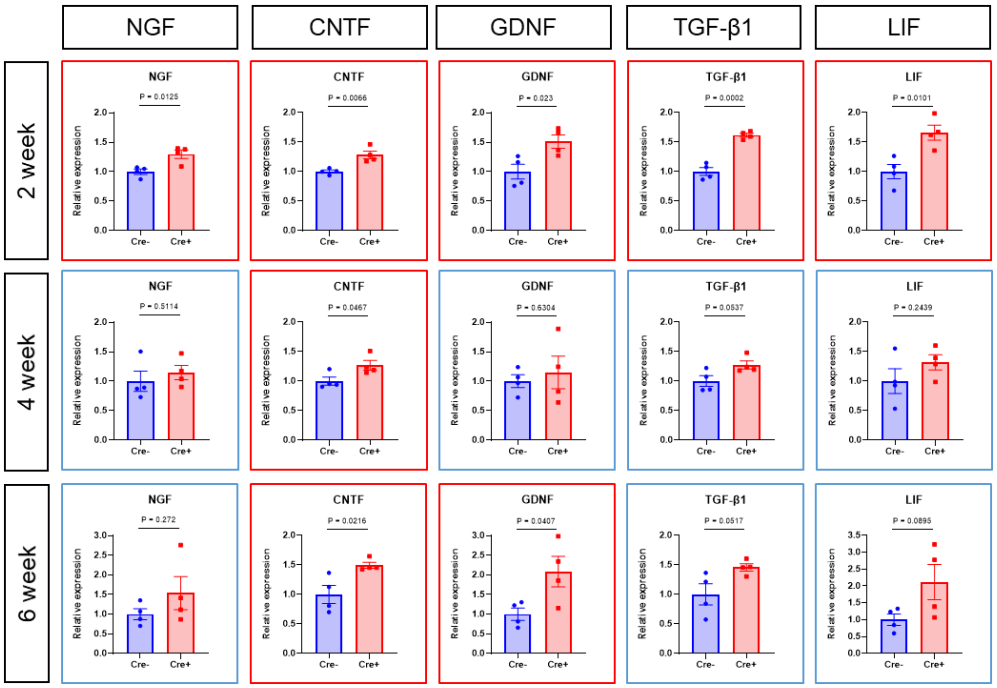
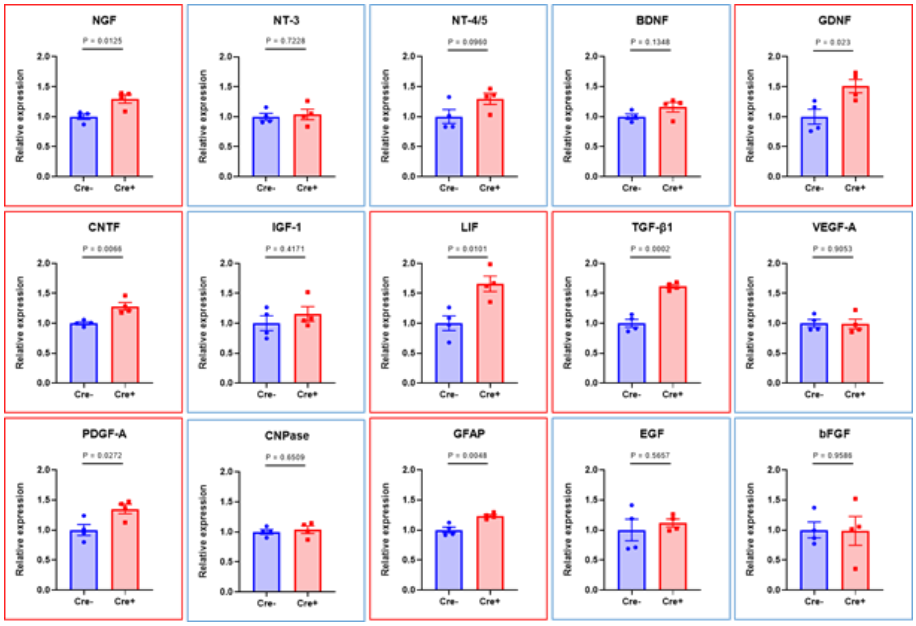


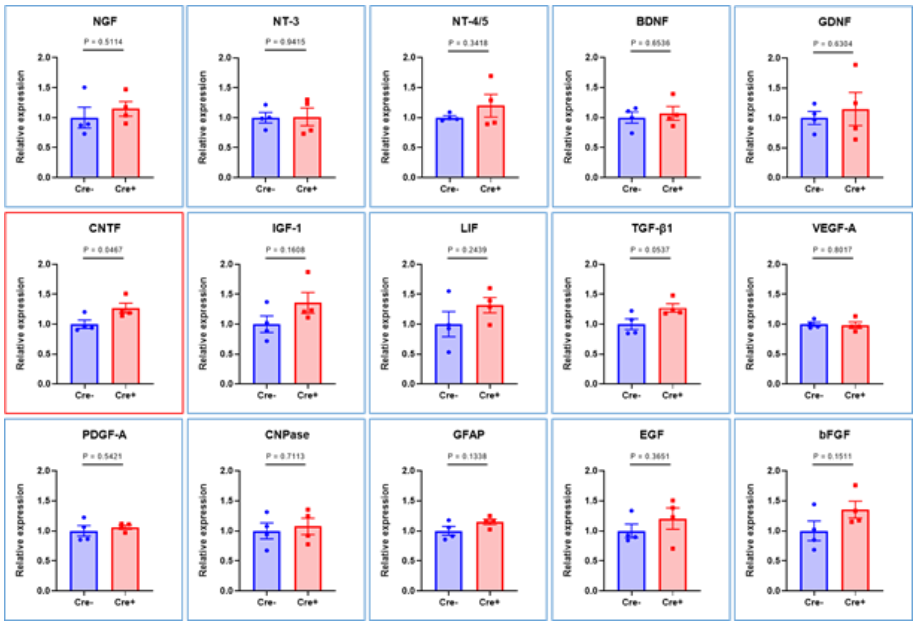
Figure 7.　損傷部における神経栄養因子の発現変化の検討

脊髄損傷 2、4、6 週後における脊髄損傷部の神経栄養因子の mRNA を定量した。本研究で調べた神経栄養因子で特に発現が上昇する傾向を示した分子のまとめ。上衣細胞特異的な IL-17A シグナルの阻害により、脊髄損傷後の損傷部において、一部の神経栄養因子の発現が上昇する傾向が観察された。赤枠は、2 つのグループ間で統計的有意差がある（$p < 0.05$）分子を表している（n = 4, mean ± SEM, Student's t test）。

脊髄損傷２週間後



脊髄損傷４週間後



脊髄損傷 6 週間後

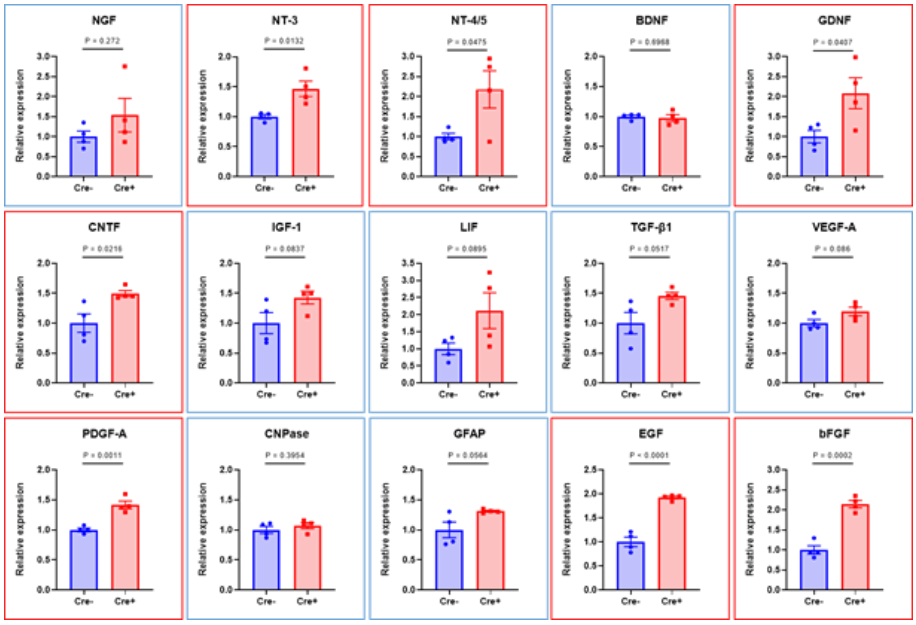


Figure supplement 4. 損傷部における神経栄養因子の発現変動

脊髄損傷 2、4、6 週後における脊髄損傷部の神経栄養因子の mRNA を定量した。本研究で調べた、15 分子に関しての発現変動のまとめ。上衣細胞特異的な IL-17A シグナルの阻害により、脊髄損傷後の損傷部において、一部の神経栄養因子等の発現が上昇する傾向が観察された。赤枠は、2 つのグループ間で統計的有意差がある（$p < 0.05$）分子を表している（n = 4、mean ± SEM、Student’s t test）。

考察

1.　IL-17A の発現量変化と上衣細胞への影響について

本研究は、脊髄損傷病態における脊髄中心管上衣細胞による組織修復メカニズムの解明を目的に、炎症と上衣細胞の相互連関という観点から研究を行った。炎症性シグナルの関与を想定し、炎症性サイトカインの一つである IL-17A に着目した。定量的 PCR により、損傷部の脊髄において脊髄損傷後 IL-17A の発現が上昇し、慢性期では発現量がより多いことが明らかとなった（Figure 1A）。一方、脊髄損傷後の上衣細胞の増殖能の経時変化を調べたところ、先行研究の結果と同様、損傷部付近の上衣細胞の増殖能は、損傷後 3 日目に最大となり、その後減弱することが明らかとなった（Figure 3C）。さらに、IL-17A 受容体の発現解析を行い、脊髄損傷後の中心管上衣細胞において IL-17RA が発現していることを明らかにした（Figure 3B）。これらの結果から、IL-17 シグナルが上衣細胞に影響を与えていることが示唆される。

では、IL-17A を産生する免疫細胞は具体的にどの細胞であろうか。今回損傷 7 日後に行った解析では、IL-17A 発現細胞の多くが γδT 細胞であることを見出した（Figure supplement 1）。しかしながら、損傷後の他のタイムポイントでは IL-17A 発現細胞の検討ができていない。　多くの先行研究により、脊髄損傷後に浸潤してくる免疫系細胞の種類は、損傷の急性期と慢性期で異なることが明らかとなっている[45]。また、アストロサイトやミクログリア、オリゴデンドロサイト等のグリア細胞も IL-17A を発現していることが報告されている[46-49]。今回の検討で IL-17A の発現量が急性期と慢性期で大きく異なるのは、損傷の急性期と慢性期に浸潤してくる免役系細胞の違いや、損傷部を構成する細胞の変化によるものであると考えられ、IL-17A 発現細胞の経時的な解析が必要である。さらに

本研究では免疫細胞以外のグリア細胞等の IL-17A 産生細胞の発現量変化に関して調べられておらず、これらを含めた更なる詳細な IL-17A 発現細胞の特定を行う必要がある。

２．IL-17A 中和抗体投与が上衣細胞に与える効果について

本研究では、脊髄損傷における IL-17A を阻害するために、IL-17A 中和抗体の損傷部への局所投与を行った。野生型マウス及びレポーターマウスを用いて、脊髄損傷後の上衣細胞の増殖能の評価を行った結果、IL-17A 中和抗体投与により上衣細胞の増殖能が促進されることが明らかとなった（Figure 2E, F 及び Figure 3E, F）。興味深いことに、脊髄損傷後の上衣細胞の増殖は尾側よりも吻側の方で促進されていた。脊髄損傷後の上衣細胞の増殖は、損傷の深さが中心管まで達した場合に顕著な変化が観察されており、損傷の程度に依存することが示唆されている[39]。また、脱髄疾患モデルマウスや多発性硬化症モデルマウスを使った実験においては、上衣細胞の増殖能変化が起きないことが報告されている[50]。これらの結果は、重度の脊髄損傷等の何らかの物理的な刺激や、血液脳関門の崩壊に起因する、漏出した脳脊髄液や血液成分に含まれる物質が、上衣細胞の増殖制御に重要な働きを持つことを示唆している。本研究で原因分子の一つとして同定した IL-17A は、脊髄損傷後に損傷部での発現が増加し、上衣細胞の増殖制御に働くことが明らかとなったことから、この仮説を支持する一因であると言える。

また、本研究における運動機能評価テストの結果から、IL-17A 中和抗体投与マウス群では、コントロール群と比べて、運動機能回復が促進されることが明らかとなった（Figure 1F, G）。また、神経軸索の発芽を評価するために、CST（皮質脊髄路）神経軸索及びセロトニン作動性（5-HT）神経軸索の定量を行ったところ、IL-17A 中和抗体投与群では、損傷中心部から吻側の神経軸索の発芽が促さ

れていることが明らかとなった（Figure 2A-D）。一方で、損傷中心部より尾側においては、神経軸索の発芽に関して有意な差は観察されなかった。IL-17A 中和抗体投与実験から得られたこれらの結果は、上衣細胞が脊髄損傷後の神経回路の修復を促進させる働きを持つことを示唆している。そして、上衣細胞の増殖及び神経軸索の発芽が吻側で顕著に観察されたことから、脊髄損傷後の組織修復における上衣細胞の寄与が、損傷中心部の吻側で行われている可能性が考えられる。また、先行研究により、脊髄損傷後に上衣細胞が最も活発に増殖している部位が経時的に変化していることが示唆されている[50]。したがって、上衣細胞の増殖能は、時空間的に制御されていると考えられる。これは、損傷部を構成している細胞や分子等の微小環境による影響が要因であると推測される。しかしながら、本研究では IL-17A 中和抗体の投与時期及び上衣細胞の増殖能に関して、詳しい経時変化は調べられておらず、今後更なる検討が必要である。

先行研究のレポーターマウスを用いた実験により、脊髄損傷後に上衣細胞由来の細胞の一部は、アストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化することが報告されている[24, 25, 39]。そこで、本研究でも同様に、IL-17A 中和抗体投与後に増殖する上衣細胞の分化に関して、フェイトマッピング実験を行ったが、IL-17A 中和抗体投与群とコントロール群の間で、明確な差異は観察されなかった（Figure supplement 3）。本研究で用いたレポーター遺伝子の *tdTomato* は非常に強い蛍光強度を有した赤色蛍光タンパク質であり、フェイトマッピング実験において幅広く利用されている。しかしながら、tdTomato での上衣細胞の標識は可能ではあったが、増殖した上衣細胞の蛍光強度が予想以上に強すぎたため、顕微鏡下での個々の細胞の細かな形態観察が困難であった。したがって、今後は異なるレポーターマウスを使い解析を行う必要がある。また、上衣細胞由来の細胞に特異的な分子マーカーが未だに同定できていない点も分化能評価を難しくし

ている原因である。先行研究において、アストロサイトマーカーである GFAP（glial fibrillary acidic protein）や ALDH1L1（aldehyde dehydrogenase 1 family member L1）、オリゴデンドロサイトマーカーである Olig2（oligodendrocyte transcription factor 2）抗体を用いた免疫染色から、アストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化が示された[24,25,39]。しかしながら、その割合は非常に少数（全体の数パーセント）であり、大多数の細胞に関しては、詳しい特徴や性質は未だ分かっていない。本研究においても、脊髄損傷後に増殖した細胞は多く観察されたが、免疫染色法では分子マーカーの同定を行うことができなかった。したがって、今後は RNA シーケンスやシングルセル解析等の手法を用いて、上衣細胞由来細胞の性質の検討を行う予定である。

３．培養実験における IL-17A が上衣細胞に与える影響について

IL-17A は発生期の脳や成体の海馬に存在する神経幹細胞の増殖を抑制することが知られており[10-12]、神経幹細胞としての機能を持つ上衣細胞に対しても同様の作用を及ぼしていると予想し、ニューロスフィア法による培養実験を行ったところ、IL-17A が上衣細胞の増殖を抑制することが示された（Figure 4C, D）。本研究では、上衣細胞の増殖能を評価するに留まっており、IL-17A が上衣細胞の分化に影響する可能性についても、今後検討する必要がある。上衣細胞由来のニューロスフィアからは、アストロサイトやオリゴデンドロサイト、ニューロンへと分化することが知られているが[23,24]、IL-17A が神経幹細胞の増殖を阻害し、アストロサイトやオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を抑制するということが報告されている[11]。これらの事実から、脊髄損傷後に観察される上衣細胞のアストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化が IL-17A によって抑制されている可能性も考えられるため、今後検討を行いたい。

４．上衣細胞特異的な IL-17A シグナルの阻害の効果について

浸透圧ミニポンプによる、IL-17A 中和抗体の投与は、上衣細細胞以外の損傷部に存在する各種のグリア細胞や神経細胞にも影響を与えていると考えられる。そこで本研究では、IL-17RA（受容体）を上衣細胞特異的に欠損させたマウスを用いて、上衣細胞特異的な IL-17A シグナルの阻害が、運動機能回復と組織修復に与える影響について検討した。その結果、IL-17A 中和抗体実験と同様に、上衣細胞特異的な IL-17 シグナル阻害によっても有意な運動機能の回復がみられることが明らかとなった（Figure 5F, G）。また、神経軸索の発芽に関しても、IL-17RA 欠損マウスの方がより促進されることが明らかとなった（Figure 6A-D）。浸透圧ポンプによる中和抗体投与は損傷後 7 日間で作用が途絶えるのに対し、Cre-loxP 部位特異的組換えによる条件的遺伝子ノックアウトは長期間作用が持続することから、損傷後 7 日目以降の IL-17A を阻害することも機能回復には重要である可能性がある。損傷部における IL-17A の発現量は、脊髄損傷 7 日後以降に増加していた（Figure 1A）ことからも、亜急性期から慢性期における IL-17A の詳細な役割の解明も今後の課題の一つと考えている。

５．上衣細胞と神経栄養因子の増加の相関関係について

脊髄損傷後、損傷部にはグリア瘢痕が形成される。グリア瘢痕は、過剰な炎症を抑制して組織を保護する役割がある一方で、神経細胞の軸索再生を阻害することが知られている [51, 52]。特にグリア瘢痕を形成するアストロサイトに高発現する CSPG (Chondroitin sulphate proteoglycans)は強力な軸索伸長阻害効果を有することが知られているが [53, 54]、上衣細胞から分化したアストロサイトは CSPG を産生しないことが示されている [23]。むしろ上衣細胞由来のアストロサイトはフィブロネクチンやラミニンなどの細胞外マトリックスを産生して組織修復に寄

与しているとされ[23]、グリア瘢痕を形成するアストロサイトとは異なり、軸索伸長を阻害することはないと考えられる。一方、脊髄損傷後の神経回路の再編には神経栄養因子の産生が必要とされる[41-44]が、損傷部の脊髄においては、上衣細胞由来のグリア細胞が神経栄養因子を産生すると考えられている[25]。本研究では IL-17A シグナルの阻害が、CST 神経軸索及びセロトニン作動性（5-HT）神経軸索の発芽を促すことを明らかにした（Figure 2A-D 及び Figure 6A-D）。さらに、IL-17A シグナルを上衣細胞特異的に阻害した場合の、損傷部における神経栄養因子の mRNA 発現量を検討し、全体として神経栄養因子の発現が増加する傾向が観察された（Figure 7 及び Figure supplement 4）。特に、グリア性瘢痕の形成期である脊髄損傷 2 週間後、運動機能回復に有意差が出る慢性期である脊髄損傷 6 週間後の時点において、神経栄養因子の発現が上昇する傾向が観察された。これらの結果は、脊髄損傷後の瘢痕形成や神経栄養因子の産生に寄与する上衣細胞の増殖が、IL-17A のシグナルにより制御され、軸索再生や運動機能回復に寄与している可能性を示唆している。しかしながら、本研究での遺伝子発現解析は広範な損傷部組織を使用しており、上衣細胞特異的な発現解析は出来ていない。また、先行研究で関与が示された細胞外マトリックスの解析についての検討は行っていない。したがって、今後はそれらの分子について、組織学的な解析や、遺伝子発現の定量解析を行う予定である。

６．今後の展望

本研究では、脊髄損傷モデルマウスを用いて、脊髄損傷後の上衣細胞による組織修復メカニズムの解明を目指し、IL-17A シグナルの関与を見出した。しかし、上衣細胞による組織修復メカニズムは、未だ十分に解明されていない。上衣細胞が持つ神経幹細胞としての機能はヒトと他の脊椎動物では異なることも明らか

となってきた。細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体を用いた組織学的解析により、ゼブラフィッシュや爬虫類、げっ歯類やマカクサル等の哺乳類において、脊髄中心管上衣細胞が増殖することが示されている[55]。一方で、成人のヒトにおいては、脊髄中心管上衣層での増殖細胞が存在しないことも報告されている[56]。これは、成人のヒト脊髄中心管腔は閉塞しており、脊髄中心管の構造や細胞の性質が他の動物種と異なることに起因すると考えられている。また、ヒトの試料を用いた研究はデータが少なく、献体の年齢や受傷した時期が不均一であるため比較検討が難しい。上衣細胞の幹細胞能は、加齢によって減少することも最近の研究により明らかとなっている[57]。さらに、本研究で示したように、脊髄損傷後の上衣細胞の増殖能は急性期が最も高い（Figure 3C）。したがって、ヒト上衣細胞が幹細胞能を持つかどうかは更なる検討が必要である。

本研究を通して、脊髄損傷後に損傷部に存在する IL-17A が上衣細胞の増殖を制御することで、脊髄損傷後の組織修復を阻害していることが明らかになった（Figure 8）。これは、脊髄損傷後に IL-17A を阻害することで上衣細胞による組織修復を促進できる可能性を示唆する結果であり、学術的にも臨床的にも重要な知見であると考える。しかしながら、IL-17A の詳細な組織修復阻害機構や軸索再生への影響など更なる検討を要するものも多く、今後の研究課題である。

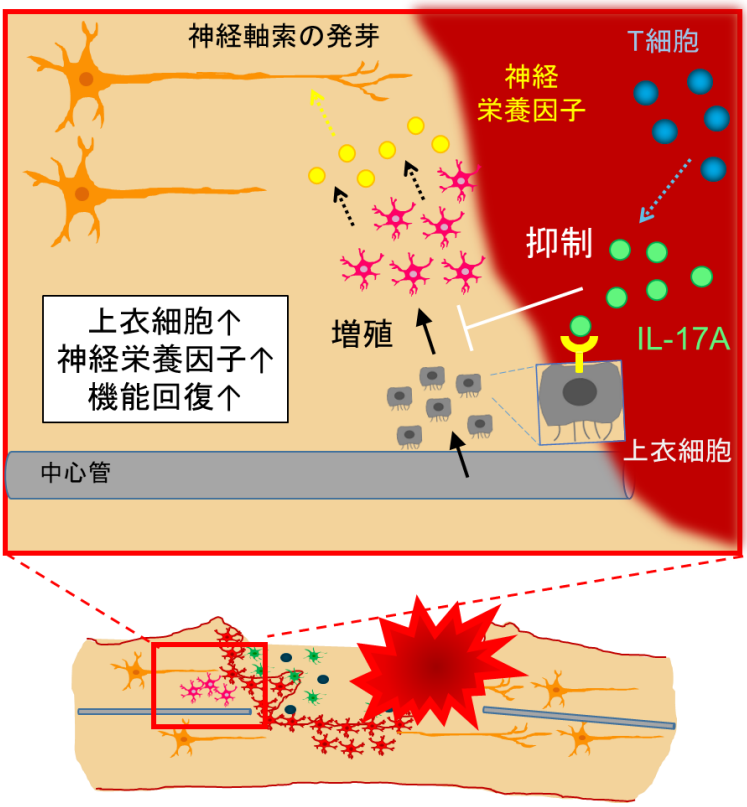


Figure 8. IL-17A による脊髄損傷後の上衣細胞の増殖制御メカニズム

脊髄損傷により、血液脳関門が破綻し、末梢から γδT 細胞など多くの免疫細胞が損傷部にする。これらの免疫細胞や内在しているグリア細胞等から産生された IL-17A が、脊髄損傷後の上衣細胞の増殖を抑制している。脊髄損傷後に増殖する上衣細胞は、神経栄養因子を産生すること等で損傷部の微小環境を改善し、損傷後の神経軸索の発芽を促進させることで神経機能回復に働くと推察される。

参考文献

1. Thuret, S., Moon, L. D., Gage, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 628-643 (2006).
2. Afshari, F.T., Kappagantula, S., Fawcett, J.W. Extrinsic and intrinsic factors controlling axonal regeneration after spinal cord injury. *Expert Rev. Mol. Med. 11*, 1-19 (2009).
3. Anwar, M. A., Al Shehabi, T. S., Eid, A. H. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury. *Front. Cell Neurosci*. 10:98 (2016).
4. Kigerl, K. A. *et al.* Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 29, 13435-13444 (2009).
5. Yiu G and He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 7, 617-627 (2006).
6. Brambilla, R. *et al.* Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med.* 202, 145-156 (2005).
7. Menet, V. *et al.* Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc. Natl. Sci. USA.* 100, 8999-9004 (2003).
8. Anderson, M. A. *et al.* Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature.* 532, 195-200 (2016).
9. Kokaia, Z., Martino, G., Schwartz, M., Lindvall, O. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? *Nat Neurosci*. 15, 1078-1087

(2012).

10. Yang, B. *et al.* The role of interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis, and metastasis. *Mediators inflamm.* 2014:623759 (2014).
11. Li, Z. *et al.* Inhibitory effect of IL-17 on neural stem cell proliferation and neural cell differentiation. *BMC Immunol.* 14:20 (2013).
12. Liu, Q. *et al.* Interleukin-17 inhibits adult hippocampal neurogenesis. *Sci. Rep.* 4:7554 (2014).
13. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 34, 149-162 (2011).
14. Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev.* 226, 57-79 (2008).
15. Shichita, T. *et al*. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med*. 15(8):946-50 (2009).
16. Bolte, A. C., Lukens, J. R. Th17 Cells in Parkinson's Disease: The Bane of the Midbrain. *Cell Stem Cell*. 23(1):5-6(2018).
17. Choi, G. B. *et al.* The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science.* 351(6276):933-9 (2018).
18. Reed, M. D. *et al.* IL-17a promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Nature.* 577(7789):249-253 (2020).
19. Hill, F., Kim, C. F., Gorrie, C. A., Moalem-Taylor, G. Interleukin-17 deficiency improves locomotor recovery and tissue sparing after spinal cord contusion injury in mice. *Neurosci Lett.* 487(3):363-7 (2011).
20. Marino, R. J., Ditunno, J. F. Jr., Donovan, W. H., Maynard, F, Jr. Neurologic recovery

after traumatic spinal cord injury: data from the Model Spinal Cord Injury Systems. *Arch Phys Med Rehabil.* 80, 1391-1396 (1999)

21. Rosenzweig *et al.* Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury. *Nat. Neurosci.* 13, 1505-1510 (2010).
22. Courtine, G. *et al.* Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat. Med.* 14, 69-74 (2008).
23. Meletis, K. *et al.* Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 6, e182 (2008).
24. Barnabé-Heider, F. *et al.* Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell.* 7, 470-482 (2010).
25. Sabelström, H. *et al.* Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342, 637-640 (2013).
26. Salgado-Ceballos, H. et al. Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 782, 126-135 (1998).
27. Harrop, J. S. *et al*. Evaluation of clinical experience using cell-based therapies in patients with spinal cord injury: a systematic review. *J Neurosurg Spine.* 17(1 Suppl):230-46 (2012).
28. Ohata, S., Alvarez-Buylla, A. Planar organization of multicilliated Ependymal (E1) cells in the brain ventricular epithelium. *Trends Neurosci.* 39, 543-551.
29. Stenudd, M., Sabelström, H., Frisén, J. Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol.* 72, 235-237.
30. Hawryluk, G. W. *et al*. In vitro characterization of trophic factor expression in neural precursor cells. *Stem Cells Dev.* 21(3):432-47 (2012).
31. Ung, R. V., *et al.* Spontaneous recovery of hindlimb movement in completely spinal

cord transected mice: a comparison of assessment methods and conditions. *Spinal cord.* 45, 367-379 (2007).

32. Metz, G. A. *et al.* Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.* 883,165–177 (2000)
33. Hill, R.L. *et al*. Anatomical and functional outcomes following a precise, graded, dorsal laceration spinal cord injury in C57BL/6 mice. *J.Neurotrauma* 26,1–15 (2009)
34. Nakamura, Y. *et al.* Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regen- eration or locomotor recovery after spinal cord injury. *J. Biol. Chem.* 286, 1876–1883 (2011).
35. Yao, Z. *et al*. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3, 811-821 (1995).
36. Tuszynski, M. H. & Steward, O. Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS. *Neuron*. 74, 777-791 (2012).
37. Perrin, F. E., Noristani, H. N. Serotonergic mechanisms in spinal cord injury. *Exp Neurol.* 318:174-191 (2019).
38. Zong S. *et al*. The role of IL-17 promotes spinal cord neuroinflammation via activation of the transcription factor STAT3 after spinal cord injury in the rat. *Mediators Inflamm.* 2014:786947 (2014).
39. Ren Y. *et al*. Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. *Sci Rep*. 7:41122 (2017).
40. Lee C. M. *et al*. Single cell transcriptomic analysis revealed long-lasting adverse effects of prenatal tamoxifen administration on neurogenesis in prenatal and adult brains. *bioRxiv.* (2019).

41. Nieto-Sampedro, M. *et al.* Brain injury causes a time-dependent increase in neuronotrophic activity at the lesion site. *Science.* 217, 860-861, (1982).

42. Hawryluk, G. W., *et al*. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 21, 2222-2238 (2012).

43. Kitamura, K. *et al.* Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 85, 2332-42, (2007).

44. Tripathi, R. B., McTigue, D. M. Chronically increased ciliary neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 expression after spinal contusion in rats. *J Comp Neurol*. 510, 129-144 (2008).

45. Plemel, J. R., Wee Yong, V., Stirling, D. P. Immune modulatory therapies for spinal cord injury--past, present and future. *Exp. Neurol*. 258, 91-104, (2014).

46. Li, G. Z. *et al*. Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand J Immunol*. 62(5):481-6 (2005).

47. Miljkovic, D. *et al*. Astrocytes stimulate interleukin-17 and interferon-gamma production in vitro. *J Neurosci Res*. 85(16):3598-606 (2007).

48. Tzartos, J. S. *et al*. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 172(1):146-55 (2007).

49. Kawanokuchi J. *et al.* Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol.* 194(1-2):54-61 (2008).

50. Lacroix, S. *et al*. Central canal ependymal cells proliferate extensively in response to traumatic spinal cord injury but not demyelinating lesions. *PLoS One*. 9(1):e85916 (2014).

51. Rolls, A., Shechter, R., Schwartz, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci*. 10, 235-241 (2009).

52. Yuan, Y. M., He, C. The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull*. 29, 421-435 (2013).

53. Busch, S. A., Silver, J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 17, 120–127 (2007).

54. McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., Silver, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 11, 3398–3411 (1991).

55. Becker, C. G. *et al.* The spinal ependymal zone as a source of endogenous repair cells across vertebrates. Prog Neurobiol. 170:67-80 (2018).

56. Paniagua-Torija, B. *et al.* Cells in the adult human spinal cord ependymal region do not proliferate after injury. *J Pathol.* 246(4):415-421 (2018).

57. Li, X. *et al.* Regenerative Potential of Ependymal Cells for Spinal Cord Injuries Over Time. EBioMedicine. 3:55-65 (2016).

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲賜りました大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学講座の山下俊英教授に心から謝意を表します。

研究者としての思考や研究生活における心得の指南、研究を進める上での御助言を頂きました糸数隆秀特任准教授、ならびに田辺章悟特任助教に心より御礼申し上げます。

本研究に際し、FoxJ1-CreERT^2 マウスのご提供及びご協力を賜りました島根大学医学部解剖学講座（神経科学部門）の藤谷昌司教授、ならびに Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute の Jonas Frisén 博士に感謝の意を表します。

また、本研究に対しご助言を賜りました大阪大学大学院生命機能研究科心生物学研究室の八木健教授、生命機能研究科細胞分子神経生物学研究室の山本亘彦教授、ならびに医学系研究科神経機能形態学講座の佐藤真教授に重ねて御礼申し上げます。

そして、研究における技術的指導だけでなく、諸事にわたり御指導、御協力を頂きました分子神経科学教室内の諸先生方、諸先輩方に深く感謝致します。

最後になりましたが、大学院生生活を支えてくれました、家族と友人に心より感謝申し上げます。

業績

【学術論文】

1. Tanabe, S., Saitoh, S., Miyajima, H., Itokazu, T. and Yamashita, T. (2019) Microglia suppress the secondary progression of autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 67, 1694-1704.　(I performed flow cytometry and histological analysis)

2. Miyajima, H., Itokazu, T., Tanabe, S., Yamashita, T.：Inhibition of IL-17A promotes ependymal cell proliferation and motor recovery after spinal cord injury.（投稿準備中）

【学会発表】

国際学会発表

1. Miyajima, H. Tanabe, S. Fujitani, M. Yamashita, T., Inhibition of IL-17A promotes tissue repair by ependymal cells after spinal cord injury. Neuroscience 2018, San Diego, U.S.A, (2018.11.6) (Poster presentation)

2. Miyajima, H., Tanabe, S., Fujitani, M., Itokazu, T., Yamashita, T., The influence of immune cells on neural stem cells in spinal cord injury, The 8th NIF Winter School on Advanced Immunology, Singapore (2019.1.21-22) (Poster & Oral presentation)

国内学会発表

1. Miyajima, H., Tanabe, S., Yamashita, T.：The role of immune system on neural stem cell functions.　第 9 回若手合宿研究交流会，桜井（奈良）（2015.7.16）（ポスター発表）

2. 宮嶋久雄、田辺章悟、山下俊英：上衣細胞と IL-17A の中枢神経修復過程における機能解明. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜（2016.11.30）（ポスター発表）

3. 宮嶋久雄、田辺章悟、藤谷昌司、山下俊英：IL-17A による脊髄損傷後の組織修復阻害機構. 第 40 回日本神経科学大会, 千葉（2017.7.20）（ポスター発表）

4. 宮嶋久雄、田辺章悟、藤谷昌司、山下俊英：脊髄損傷後の上衣細胞における IL-17A の役割. 第 41 回日本神経科学大会, 神戸（2018.7.26）（ポスター発表）

5. 宮嶋久雄、田辺章悟、藤谷昌司、山下俊英：脊髄損傷後の上衣細胞による組織修復機構における IL-17A の与える影響. 第 11 回若手研究フォーラム, 吹田（2018.8.28）, （ポスター発表 / **ベストプレゼンテーション賞**）

6. Miyajima, H., Itokazu, T., Tanabe, S., Yamashita, T.：The effect of immune cells on neural stem cells in spinal cord injury. リエゾンラボ炎症シンポジウム, 札幌（2019.8.24）（口頭発表）

7. Miyajima, H., Itokazu, T., Tanabe, S., Yamashita, T.：IL-17A suppresses ependymal cell proliferation and motor recovery after spinal cord injury. 第 24 回グリア研究会, 東京（2019.11.30）（口頭発表）

8. 宮嶋久雄、糸数隆秀、田辺章悟、山下俊英：Effects of IL-17A on tissue repair by ependymal cells after spinal cord injury. 第４２回 日本分子生物学会年会 , 福岡（2019.12.4）（ポスター発表）