

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20342

研究課題名(和文) 脳虚血におけるインフラマソームを介した自然炎症の関与

研究課題名(英文) Investigation of the inflammasomes' effects on the innate inflammatory response during brain ischemia

研究代表者

朱 鵬翔 (zhu, pengxiang)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40380216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血や脳外傷などの一次損傷に続発する炎症反応が損傷を悪化させることが知られている。インフラマソームは病原微生物感染のみならず、細胞内物質などの内因子にも活性化され、炎症を引き起こす。ASCはインフラマソーム活性化の鍵である。そこで本研究ではASC KOマウスを用いて、インフラマソームが脳虚血や軽度外傷性脳損傷(MTBI)に及ぼす影響を検討した。その結果、ASC KOマウスでは、虚血後の脳内TNF とIL-1 の増加が有意に抑えられた。更にMTBI後の脳内TNF とIL-1 の増加が有意に抑えられ、空間認知障害が改善された。インフラマソームの活性化抑制は神経損傷を軽減することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Inflammasomes can be activated not only by extracorporeal pathogens like virus and bacterium, but also by the internal factors including intracellular matrix to induce inflammation during neurodegeneration. ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) is a key component to activate inflammasomes. We investigated the effects of knock out of ASC on the severity of ischemic brain damage and traumatic brain injury. Compared to wild type, targeted disruption of ASC significantly suppressed increases in TNF and IL-1 within the ischemic brain, and showed a tendency of less infarct volume after ischemia. Furthermore, this disruption significantly precluded increases in TNF and IL-1 within the brain subjected to mild traumatic injury and attenuated space-navigation disability after mild traumatic brain injury (MTBI). These findings suggest that the inhibition of inflammasomes' activation can ameliorate the secondary neurodegeneration after brain ischemia or MTBI.

研究分野：救急医療、脳外科。

キーワード：インフラマソーム 軽度外傷性脳損傷(MTBI) 高次脳機能障害 IL-1 TNF

1. 研究開始当初の背景

一般的に炎症は生体に侵入する病原微生物を排除して生体の恒常性を維持するための反応として起こることが多いが、最近になって外部からの病原微生物のみならず元来生体に存在する内因性成分にも反応して炎症が生じることが明らかになってきた。より具体的には、通常なら細胞内に留まっている特定の細胞成分が放出されると、それを体内のセンサーが感知し、炎症反応が引き起こされることがわかってきた。このような炎症反応は、細菌やウイルスの成分が引き起こす感染性の「炎症」と区別して、非感染性の「自然炎症」と呼ばれている。インフラマソームは炎症の要となる細胞内タンパク質複合体であり、caspase-1 を活性化し、IL-1、IL-18 の分泌を誘導することが知られている (Cell.132(5):818-31.2008)。インフラマソームは、細菌やウイルスなどの病原微生物感染だけでなく、痛風における尿酸塩結晶、Alzheimer 病におけるアミロイド、細胞壊死後に放出される DNA など様々な内因性物質によっても活性化されることがわかってきた (Nature.452(7183):103-7.2008)。

2. 研究の目的

インフラマソームは細胞壊死後に放出される DNA などの内因性物質により活性化され自然炎症を誘発するが、インフラマソームの過剰反応が様々な炎症性疾患を惹起するといわれている (Riv Biol.102(3):365-84.2009)。近年脳虚血の病態に炎症が関与することという報告が見受けられるので、本研究では、インフラマソーム活性化の鍵となるアダプタータンパク質 ASC をノックアウトしたマウスを用いて虚血性脳血管障害と外傷性脳損傷の病態にインフラマソームが関与するかどうかを検討することにした。

3. 研究の方法

(1) 動物

本実験には 16 週齢の ASC knockout mice (homo

type) とその wild type littermate を用いた。実験動物を一定の明暗サイクル及び温度 (22 ± 1) 条件下で飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行われた。

(2) 脳虚血動物モデルの作成

吸入麻酔下でナイロン栓子法によりマウスの右中大脳動脈起始部を 60 分間閉塞させた後再灌流させた。虚血中及び再灌流後 1 時間は直腸温を 37.0 ± 0.2 に保った。その後麻酔から覚醒していることを確認後、マウスを飼育ケージに戻した。

一部の動物ではコントロール群として偽手術 (頸部皮膚の正中切開は行うが、中大脳動脈の閉塞は行わない) を実施した。

(3) TTC 染色

再灌流 24 時間後に深麻酔下で断頭し、1 mm 幅の脳スライスを作製した後、2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) にて 30 分間染色した。その後、脳スライスを 4% paraformaldehyde 液にて一晩固定した。TTC 染色後の脳スライス画像を取り込み、梗塞病巣体積を算出した。

(4) 軽度外傷性脳損傷 (MTBI) 動物モデルの作成

Kane MJ, et al の方法 (J Neurosci Methods. 203:41-9.2012) を用いて MTBI マウスモデルを作製した。吸入麻酔下で 100 グラムの錘を 1 メートルの高度からマウスの頭部に自由落下させることにより脳損傷を与えた。その後麻酔から覚醒していることを確認後、マウスを飼育ケージに戻した。同じマウスに一日一回、五日間で合計五回錘の落下により損傷を与えた。一部の動物ではコントロール群として麻酔のみをかけたが、錘の落下を実施しなかった。

(5) マウスの活動性と空間認知能力の評価

MTBI 後 1, 4 週目に Open field 試験を実施した。60cmx60cm 四方のアクリル箱に 60 分間

マウスを入れ環境に順化させた。そして引き続き 20 分間マウスの活動性を 5cm 間隔で配置した赤外線センサーにて計測した。空間認知能力を検討するために、MTBI 後 4 週目に Morris water maze test を行った。直径 100cm の円形プールに高さ 20cm まで水を入れた後、一か所にプラットフォーム（逃避台）を水面下 2cm に設置した。プールに入れられたマウスが逃避台に到達するまでの時間（escape latency）を計測した。

(6) ELISA

虚血再灌流 24 時間後にマウスを安楽死させ、脳を取出して、虚血中心部組織 (ischemic core, IC) と虚血周囲部組織 (Peri-ischemia, Peri) を分別した。ELISA キットを用いて、脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した。MTBI 後 4 週目にマウスを安楽死させ、全脳を取り出した。その後 ELISA キットを用いて、脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した。

(7) 初代神経細胞とミクログリアの共培養。初代神経細胞は E17 のマウス胎児脳から分離した。ミクログリアは出生後 24 時間以内の新生仔マウスの脳から分離した。GasPak™ pouch anaerobic system を用いて、4 日間培養した神経細胞に 6 時間の低酸素ストレスを負荷した。その後前記の神経細胞とカルチャーインサートに入れたミクログリアを共培養した。24 時間後、LDH assay による神経細胞生存率算出及び ELISA による培地中炎症因子濃度測定を実施した。

(8) 統計解析

2 群の実験データを比較する場合は Student T 検定を行い、それ以外の実験データを統計解析する場合は One way 又は Two way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test を用いた。p 値が 0.05 未満を有意とした。全てのデータは mean ± SD にて表記した。

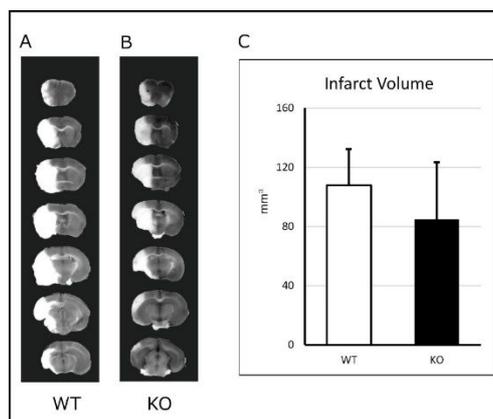
4. 研究成果

(1) ASC KO により脳虚血後に脳内の炎症

因子が変動

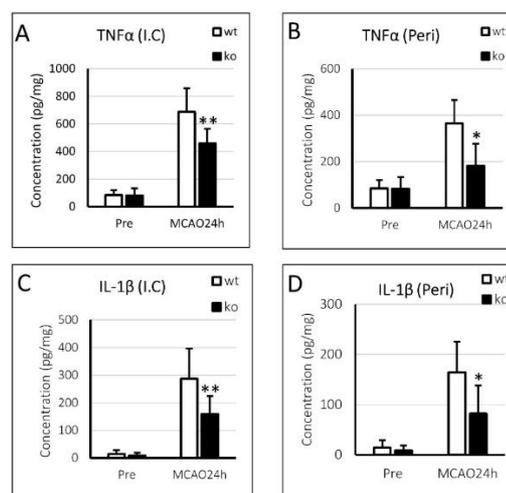
ASC knockout mice (KO) とその wild type littermate (WT) に対して 1 時間の中大脳動脈閉塞後再灌流を行い、血流再開後 24 時間目に脳梗塞病巣体積を TTC 染色を用いて計測した。その結果、WT に比して KO では脳梗塞体積が減少する傾向を示したが、有意差は見られなかった (図 1A, B, C)。

図 1 脳虚血再灌流後の脳梗塞病巣体積測定



虚血再灌流後の脳内炎症因子濃度に ASC ノックアウトが及ぼす影響を調べるため、虚血部位の TNF と IL-1 の濃度を測定した (図 2)。

図 2 虚血再灌流後の脳内組織における炎症因子濃度



炎症因子 TNF の変化：虚血前 (Pre) に比して、脳虚血再灌流後 24 時間 (MCAO24h) で、KO マウスと WT マウスの虚血中心部 (ischemic core, I.C) と虚血周囲部 (Peri) の TNF 濃度が上昇したが、KO マウスの方が WT マウス

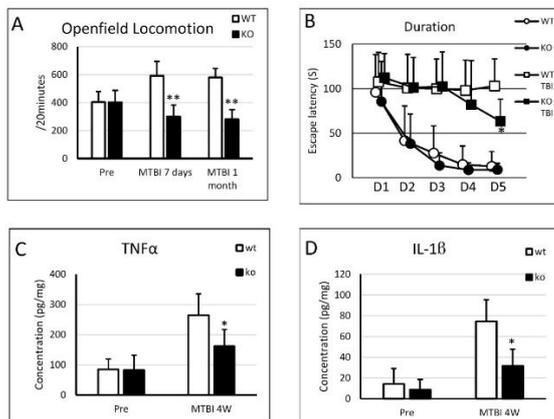
よりその程度は有意に低かった(図 2A,B; * : P<0.01、* : P<0.05)。

IL-1 の変化: 虚血前 (Pre) に比して、虚血後 24 時間 (MCAO24h) で、KO マウスと WT マウスの虚血中心部 (ischemia core, I.C) と虚血周囲部 (Peri) の IL-1 濃度が上昇したが、KO マウスの方が WT マウスよりその程度は有意に低かった(図 2C,D; ** : P<0.01、* : P<0.05)。

(2) ASC KO により軽度外傷性脳損傷後の活動性と空間認知障害が改善

MTBI 後 7 日目と 4 週目に Open field 試験を実施した。その結果、WT マウスに比して、KO マウスは MTBI 後 7 日目 (MTBI 7 days) と 4 週目 (MTBI 1month) で自発運動の増加が有意に抑制された(図 3A、** : P<0.01)。空間認知能力を検討するために、MTBI 後 4 週目に Morris water maze test を行った。その結果、訓練五日目 (D5) で、逃避台に辿り着く時間 (escape latency) は、KO マウスの方が、WT マウスより有意に短縮した(図 3B、* : P<0.05)。MTBI 後脳内の炎症因子濃度をしらべた結果、MTBI 後 4 週目 (MTBI 4W) で、WT マウスに比べて、KO マウス脳内の TNF と IL-1 の濃度が有意に低かった(図 3C,D; * : P<0.05)。

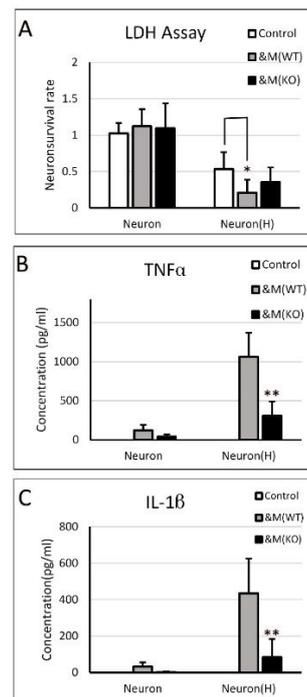
図 3 .MTBI 後の活動性と空間認知障害と脳内炎症因子の変化



(3) 低酸素負荷を与えられた培養神経細胞に対する ASC KO ミクログリアの影響

カルチャーインサートを用いて、神経細胞とミクログリアの共培養を行った。正常神経細胞 (Neuron) では、WT 又は KO ミクログリアとの共培養が神経細胞の生存率に影響を与えなかった。6 時間の低酸素ストレスを負荷された神経細胞 (Neuron(H)) の場合には、WT ミクログリアとの共培養 (&M(WT)) が神経細胞の生存率が有意に減少したが、KO ミクログリアとの共培養 (&M(KO)) が神経細胞の生存率に有意な影響を与えなかった(図 4A、* : P<0.05)。培地中の炎症因子の濃度を調べた結果、WT 又は KO ミクログリアを正常神経細胞 (Neuron) と共培養した場合には、培地中の TNF と IL-1 濃度に有意な差が見られなかった。低酸素ストレスを負荷された神経細胞 (Neuron(H)) の場合には、WT 又は KO ミクログリアとの共培養で培地中の TNF と IL-1 濃度を増加したが、WT ミクログリアとの共培養 (&M(WT)) と比較して、KO ミクログリアとの共培養 (&M(KO)) で培地中の TNF と IL-1 濃度が有意に低下した(図 4B,C、** : P<0.01)。

図 4 . ミクログリアとの共培養により神経細胞生存率と炎症因子が変化



(4) 結語

インフラマソーム活性化の鍵となるアダプタータンパク質 ASC をノックアウトした(KO)マウスでは、中大脳動脈閉塞再灌流 24 時間後の脳梗塞体積は、野生型(WT)に比して減少傾向が見られた。虚血中心部とその周囲の脳組織内の TNF と IL-1 の濃度は、WT に比して KO の方が有意に低かった。軽度外傷性脳損傷(MTBI)の場合では、KO マウスが WT マウスに比較して有意な空間認知障害の改善を示した。MTBI 後 4 週目で、WT マウスに比べて KO マウス脳内の TNF と IL-1 の濃度が有意に低かった。更に、in vitro の研究で、KO ミクログリアと共培養した低酸素負荷後初代神経細胞の生存率は、WT ミクログリアと共培養した場合に比して、有意に高かった。培地中の TNF と IL-1 濃度は、KO ミクログリアと共培養した場合より、WT ミクログリアと共培養したほうが有意に高かった。以上の研究成果から、(1)脳が損傷を受けた後の炎症因子の濃度が、インフラマソームの活性と関連していること、(2)ASC のノックアウトによりインフラマソームの活性化を抑制することで、脳内炎症因子の発現を減少せしめ、高次神経機能障害を改善できることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Zhu P, Samukawa K, Fujita H, Kato H, Sakanaka M: Oral Administration of Red Ginseng Extract Promotes Neurorestoration after Compressive Spinal Cord Injury in Rats. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017;1265464 (2017). 査読有り .doi: 10.1155/2017/1265464

[学会発表](計 2 件)

1. 朱 鵬翔: Oral Administration of Red Ginseng Extract Promotes Neurorestoration after Compressive Spinal Cord Injury in Rats. 第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会(2017)

2. 朱 鵬翔: Targeted disruption of organic cation transporter 3 (OCT3) ameliorates ischemic brain damage through modulating histamine and regulatory T cells. 日本解剖学会第 70 回中国四国支部学術集会(2015)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

朱 鵬翔 (Ju , Pensyan)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40380216

(2)研究分担者

()

..

研究者番号：

()

..

研究者番号：

()

..

研究者番号：

()

..

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()