

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09022

研究課題名（和文）反復性軽度外傷性脳損傷の白質初期病変解明

研究課題名（英文）Elucidation of Early White Matter Lesions in Repetitive Mild Traumatic Brain Injury

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：rmTBI早期では、白質の損傷によりグリア細胞を活性化させ、白質の回復を阻止し、高次脳機能障害を引き起こすと考えられる。in vivoとin vitro両方の実験で、活性化したグリアがオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）の維持と分化を抑制したが、インフラマソーム不活化するASCKOグリアにはそのOPCに対する抑制作用が見られなかった。rmTBI後24週目で、ASCKOマウスのCTE発症率はWTマウスより少ないことを確認した。以上の結果から、rmTBI後早期でインフラマソームを介した神経炎症を抑制することにより白質損傷の回復を促進し、高次脳機能障害の改善とCTE発症リスクの軽減することを検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反復性軽度外傷性脳損傷（rmTBI）による高次脳機能障害と続発する慢性外傷性脳症（CTE）が大きな社会問題となっているが、その経過は未だに不明である。我々の研究では、rmTBI後インフラマソームを介して活性化したグリア細胞が損傷した白質の回復を遅らせて、高次脳機能障害を引き起こし、さらに神経変性疾患へのリスクを高めることを確認した。我々の研究結果は、今後rmTBIに対して新たな治療法開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：We showed that inflammasome mediated glia cell activation after repetitive mild traumatic brain injury (rmTBI) caused chronic damage of white matter, increased the risk of developing neurodegenerative diseases. Both in vivo and in vitro experiments confirmed that activated glial cells inhibited the maintenance and differentiation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs). However, this inhibitory effect on OPCs was not observed in inflammasome-inactivated ASCKO glial cells. At 24 weeks post-rmTBI, the incidence of chronic traumatic encephalopathy (CTE) was significantly reduced in ASCKO mice compared to WT mice. These results suggest that suppressing neuroinflammation mediated by the inflammasome in the early stages following rmTBI can promote the recovery of white matter damage, improve higher-order brain dysfunction, and reduce the risk of developing CTE.

研究分野：軽度外傷性脳損傷

キーワード：軽度外傷性脳損傷 インフラマソーム 白質損傷 慢性外傷性脳症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 反復性軽度外傷性脳損傷 (rmTBI) を受けると、数週間から数ヶ月間に高次脳機能障害が見られ、それから数年から数十年後、Tau タンパク質沈着を特徴とする進行性の脳変性疾患 慢性外傷性脳症 (Chronic Traumatic Encephalopathy, CTE) に発展する例が多く報告されている。PET で CTE 症状を示す元 NFL 選手の脳を調べた結果、Tau タンパクの蓄積が脳内の複数部位で確認されたが、A の沈着は対照群と比較して有意な差がなかった[1]。TBI 患者脳内の Tau タンパク蓄積量を PET で調べた結果、白質の Tau 蓄積量が多いほど、精神症状が重度となる傾向が見られる[2]。rmTBI モデルマウスを用いた研究では、rmTBI 後 24 時間目から損傷した軸索に Cis p-tau が発現し始め、6 か月後には全脳に Cis p-tau が発現するとともに神経変性ならびに CTE 症状が見られた。これらの症状は Cis p-tau 抗体の投与で改善された[3]。要するに rmTBI により損傷を受けた軸索に Tau タンパクが沈着し神経変性が惹起され CTE 発症に至ると考えられるが、詳細な経過は未だに不明である。

(2) mTBI は頭部にもたらされる物理的エネルギーによって引き起こされた急性の脳損傷であると定義される。脳がゆすぶられると、灰白質より剛性の高い白質の方が先に変形し、損傷が生じる[4]。rmTBI による神経炎症に伴うグリア細胞活性化が白質の二次損傷を促進するのみならず、オリゴデンドロサイトの再生やシナプスの可塑性にも深く関わっている[5]。これまで複数の研究チームが、神経炎症を抑制することにより外傷性脳損傷 (TBI) 動物モデルの行動試験結果が改善されることを報告している。しかしながら rmTBI 初期では、神経細胞の変性より白質の損傷と神経炎症が目立ち、高次脳機能障害が時間と共に進展する。rmTBI 初期に神経炎症を抑えて損傷白質の修復を誘導すれば、高次脳機能障害と CTE への進展を阻止できる可能性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

細胞の脆弱性という観点より、髄鞘を作るオリゴデンドロサイトが mTBI の損傷を受けやすいと考えられている。破壊された髄鞘が OPC の分化により修復され軸索へのサポートが回復すると、機能障害も改善されると予測できる。rmTBI 後の神経炎症による白質二次損傷は、損傷範囲の拡大やオリゴデンドロサイト再生阻害を介して白質の回復を遅延させる。実際 rmTBI 患者では、脳内の脱髄が報告されており、それは動物実験でも確認されている。繰り返し物理的損傷を受ける脳では、白質変性の慢性化とグリア細胞活性の常態化が高次脳機能障害の発症と進展さらには神経細胞の変性に繋がると考えられている。そこで本研究では、rmTBI による白質損傷においてオリゴデンドロサイトの変性と再生が、神経炎症特に活性化グリア細胞とどのように関与するかを詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物

本実験には 12 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) 反復性軽度外傷性脳損傷 (rmTBI) 動物モデルの作成

我々は Kane MJ, et al の方法を用いて mTBI マウスモデルを作製した[6]。各マウスに 1 日 1 回、5 日間で合計 5 回 mTBI 損傷を与えた (rmTBI 群)。一部の動物ではコントロール群 (Sham 群) として麻酔のみを行い、錘の落下を実施しなかった。

(3) マウスの活動性と空間認知能力の評価

rmTBI 後 1, 4 週目と 2 4 週目に Open field 試験を実施した。60cmx60cm 四方の亚克力箱に 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。半径 100cm の円形プールに高さ 20 cm 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 2 cm 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。

(4) ミクログリア (Mic) とオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の共培養

ミクログリア (Mic) とオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) は新生胎児マウスの脳から分離し [7]、5%CO₂、37 °C インキュベーターで 1 週間培養した後、インサイダーを用いて共培養した。共培養 2 日目、Nigericin(1ug/ml)を投与した 24 時間後、培地と細胞を別々に収集して、ELISA とウェスタンブロットング用に供した。

(5) 免疫組織化学染色とウェスタンブロットング

Open field test 又は Morris water maze test が行われた後マウスを深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定してから脳を摘出した。後固定した脳組織をパラフィン包埋後に、薄切して免疫組織化学染色用に供した。

ウェスタンブロットング：マウスを安楽死させた後、脳を取り出しホモジナイザーと cell lysis buffer を用いて、タンパク質を抽出しウェスタンブロットングを行った。

(6) 統計解析

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) Wild type littermate (WT) に比べ rmTBI 後 ASC knockout mice (KO) の自発運動亢進が軽減され、空間認知障害が改善された。

rmTBI 後 7, 28 と 144 日目に Openfield Test 試験を実施した。rmTBI 後 7 日目から、Sham 群に比べると、WT マウス rmTBI 群の自発運動が有意に増加したが、ASC KO マウス rmTBI 群の自発運動が増加傾向を見えたが、Sham 群との有意差は見られなかった。空間認知能力を検討するため、rmTBI 後 2 8 日目に Morris water maze test を行った。その結果、Sham 群に比べると、全 rmTBI 群の escape latency は増加したが、rmTBI 群の中で、WT マウスにより、ASC KO マウスの escape latency は有意に短縮された。

(2) rmTBI を受けたマウスの大脳白質(脳梁と内包)に活性化したミクログリアを確認できた。WT マウスに比べ、KO マウスの白質に集まったミクログリアが有意に減少した。

免疫染色で rmTBI 後脳内白質に活性化されたミクログリア細胞を確認した。白質に集まったミクログリアの程度を Relative Optical Density (ROD) を用いて確認した (図 1)。

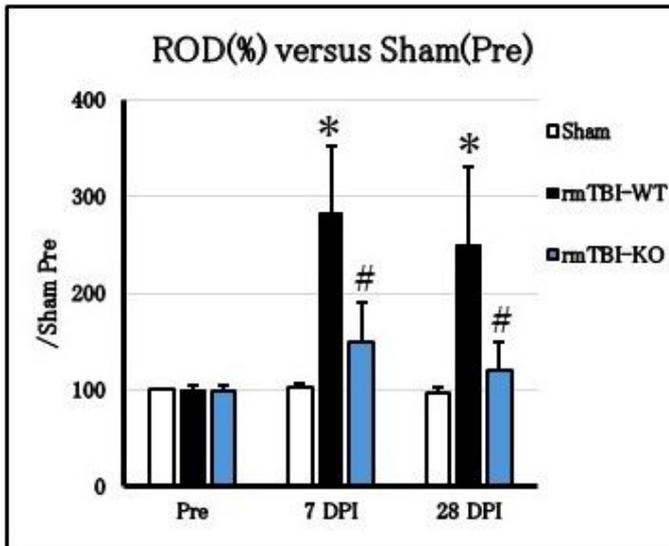


図1 . rmTBI 後マウス脳白質に iba-1 免疫染色強度の比較。

Anti-iba1 抗体を用いて、ミクログリアの状態を確認した。脳白質にある iba-1 陽性構造を ROD で表現した結果、Sham 群に比べ rmTBI-WT 群のマウス脳白質にある iba1 陽性構造が有意に増加した(図2 ; * : $P < 0.05$)。一方、rmTBI-KO 群のマウス脳梁と内包にある iba1 陽性構造が mTBI-WT 群により有意に減少した(図2 ; # : $P < 0.05$)。

(3) Nigericin の投与により WT ミクログリアがオリゴデンドロサイト前駆細胞の維持と分化を抑制したが、ASC KO ミクログリアが Nigericin の投与により、共培養したオリゴデンドロサイト前駆細胞への影響がなかった。

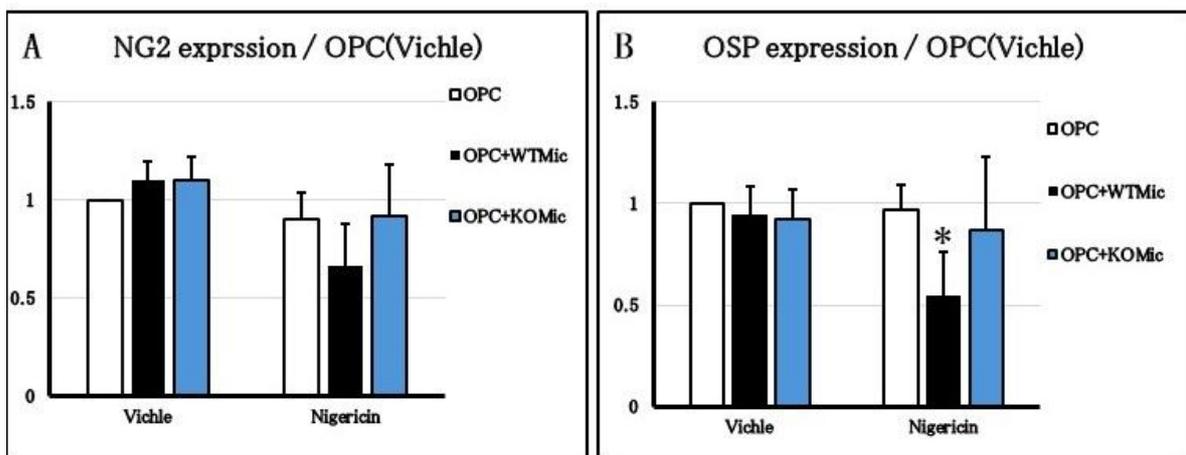


図2 . Nigericin が OPC と Mic の共培養に対する影響。

インサイダーを用いた Mic と OPC 共培養 2 日目で、Nigericin(1ug/ml)を投与した 24 時間後、細胞を収集して、ウェスタンブロッティングで調べた。

OPC のマーカー-NG2 の変化 : Mic との共培養が NG2 の発現に有意の変化が見られなかった。Nigericin の投与により、WTMic と共培養する OPC の NG2 発現が減少傾向見られたが、有意差はなかった(図2A)。

オリゴデンドロサイトのマーカー-OSP の変化 : Mic との共培養が OSP の発現に有意の変化は見られなかった。Nigericin 投与により、WTMic と共培養する OPC の OSP 発現は有意に低かったが、KOMic と共培養する OPC の OSP 発現は有意な変化はみられなかった(図2B ; * : $P < 0.05$)。

(4) rmTBI 後 24 週目で、WT マウスに比べて、ASC KO マウスの CTE 発症率が減少した。

rmTBI 後 24 週目に Openfield test を実施した後、マウス脳内の Phospho-Tau の発現をウェスタンブロッティングで調べた。Sham 群に比べると、1 自発運動が増加したと 2 Phospho-Tau の発現

が増加した二つの条件を満たしたマウスのみを CTE 発症と考えた。その結果、24 週目まで生存した rmTBI 群のマウスでは、WT マウス全 8 匹が CTE 発症に対し、KO マウスでは 12 匹の中 5 匹しか発症しなかった。

(5) 結語

我々の前研究(18K08920)で、ASC のノックアウトによりインフラマソームが不活性化され、rmTBI 後の脳内炎症を抑制することによって、高次脳機能障害が改善されたことを検証した。我々今回 rmTBI 後 7 日目で白質に活性化したミクログリアが集まることを確認したから、rmTBI 後の白質損傷が脳内炎症を引き起こしたと考えた。rmTBI 後 24 週目で、ASCKO マウスの CTE 発症率は WT マウスより明らかに減少した。さらに、in vitro の共培養実験で、インフラマソーム活性化されたミクログリアがオリゴデンドロサイト前駆細胞の維持と分化を抑制したが、インフラマソーム不活性化されたミクログリアはその抑制作用が見られなかった。以上の結果から、rmTBI により早期の白質損傷がグリア細胞を活性化させ、神経炎症を引き起こし、白質損傷の回復を阻止し、白質損傷の慢性化により神経変性疾患へ発展させると考えられる。ASC のノックアウトによりインフラマソームが不活性化され、rmTBI 後の脳内炎症を抑制することによって、白質損傷の回復を促進し、高次脳機能障害の改善とともに、CTE 発症を防ぐことも明らかになった。

(引用文献)

- [1] Stern Robert A.ほか, 「Tau Positron-Emission Tomography in Former National Football League Players」, *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, no. 18, pp. 1716-1725, 5月 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1900757.
- [2] K. Takahata ほか, 「PET-detectable tau pathology correlates with long-term neuropsychiatric outcomes in patients with traumatic brain injury」, *Brain J. Neurol.*, vol. 142, no. 10, pp. 3265-3279, 10月 2019, doi: 10.1093/brain/awz238.
- [3] A. Kondo ほか, 「Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy」, *Nature*, vol. 523, no. 7561, pp. 431-436, 7月 2015, doi: 10.1038/nature14658.
- [4] Nishimoto T.と Mochizuki Y., 「Relationship between tissue damage and compression strain by stain methods」, *Trans. JSME Jpn.*, vol. 81, no. 822, pp. 13-00729-13-00729, 2015, doi: 10.1299/transjsme.13-00729.
- [5] G. E. Tyzack ほか, 「Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression」, *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 4294, 7月 2014, doi: 10.1038/ncomms5294.
- [6] M. J. Kane, M. Angoa-Pérez, D. I. Briggs, D. C. Viano, C. W. Kreipke と D. M. Kuhn, 「A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury」, *J. Neurosci. Methods*, vol. 203, no. 1, pp. 41-49, 1月 2012, doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.09.003.
- [7] R. W. O'Meara, S. D. Ryan, H. Colognato と R. Kothary, 「Derivation of Enriched Oligodendrocyte Cultures and Oligodendrocyte/Neuron Myelinating Co-cultures from Post-natal Murine Tissues」, *J. Vis. Exp.*, no. 54, p. 3324, 8月 2011, doi: 10.3791/3324.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 朱 鵬翔	4. 巻 55(10)
2. 論文標題 反復性軽度外傷性脳損傷後に見られるインフラマソーム関連機構を介した神経障害の新機序。	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 108-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阪中 雅広 (sakanaka masahiro) (60170601)	愛媛大学・医学部・研究員 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関