

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16663

研究課題名（和文）脊髄損傷後の2次損傷における炎症増幅因子I B の役割

研究課題名（英文）Conditional deletion of I β in hematopoietic cells promotes functional recovery after spinal cord injury in mice

研究代表者

白石 康幸（Shiraishi, Yasuyuki）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50646338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：マウス脊髄損傷モデルを用いてI B の欠損が脊髄損傷後の二次損傷に与える影響を検証した。脊髄損傷後の後肢運動機能はKOマウス群で有意に改善した。脊髄中および白血球中のNfkbizのmRNA発現量は脊髄損傷後12時間をピークに上昇し、その後、緩やかに減少することが確認された。脊髄損傷後12時間の脊髄中では、IL-4、IL-10のmRNA発現量がKO群で有意に高く、骨髄移植実験では、KO骨髄を放射線照射したWTマウスに移植した群のスコアが有意に良好であった。I B の欠損は、炎症反応のバランスを抗炎症方向、組織再生方向にシフトさせることで、脊髄損傷後の運動機能回復を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I B- と脊髄損傷についての報告はなく、本研究は新規性の高い研究であったと考える。本研究では、血液細胞におけるI B の欠損は、炎症反応のバランスを抗炎症方向、組織再生方向にシフトさせることで、脊髄損傷後の運動機能回復を促進することが示唆された。生体内でのI B の働きは未だ十分に解明されていないが、今後I B に対する研究がさらに進むことにより、細胞内のmRNA発現を抑制するsiRNAのような核酸医薬品をはじめとした、血液中のI B をターゲットとした脊髄損傷に対する新たな治療法が開発されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of I β expressed in hematopoietic cells on the progression of secondary damage and functional recovery after SCI. We used conditional I β -knockout mice (Mx1-Cre;Nfkbizfl/f) to examine the role of I β in hematopoietic cells after SCI. Recovery of open-field locomotor performance was evaluated until 42 days post-injury. Expression patterns of inflammatory cytokines and chemokines were examined by quantitative real-time PCR or proteome array analysis. Bone marrow transplantation was also performed. Mx1-Cre;Nfkbizfl/fl mice showed significantly improved locomotor function compared with wild-type (WT) mice. Compared with WT mice, Mx1-Cre;Nfkbizfl/fl mice had significantly increased mRNA expression of interleukin (IL)-4 and IL-10 in the injured spinal cord. Transplantation of bone marrow cells from Mx1-Cre;Nfkbizfl/fl mice into WT mice improved functional recovery after SCI compared with control mice.

研究分野：整形外科

キーワード：I B- 脊髄損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後に生じる炎症反応は、二次損傷の病態に重要な役割を果たしており、一次損傷がトリガーとなり、NF- κ B 経路、MAPK 経路、JAK/STAT 経路、NLRP3 インフラマソームなど種々のシグナル経路を介して、ミクログリアやアストロサイトなどの脊髄中の免疫細胞が活性化される。そして、活性化された免疫細胞が IL-1、IL-6、TNF- α 、CCL2/MCP-1 などの炎症性サイトカイン/ケモカインの発現を促進し、脊髄中のミクログリア、アストロサイトをはじめ、好中球、単球/マクロファージ、リンパ球などの血液由来の細胞が損傷部位に浸潤する。これらの免疫細胞や血球細胞の相互作用によって、さらに炎症反応が促進され、神経細胞のアポトーシスや組織変性が増悪する。一次損傷の重症度は受傷外力の強さで規定されてしまうが、炎症に伴う二次損傷は、受傷後数週間以内の時期に適切に治療介入されることで、重症度を軽減できる可能性がある。この二次損傷に関与する種々の因子については、マウスなどを用いた動物実験で過去に様々な研究がなされており、脊髄損傷における二次損傷の重要性を示す研究や、ここを制御することで期待できる機能回復についての研究は数多く存在する。

2. 研究の目的

I κ B (遺伝子名 Nfkbiz)は、近年報告された新しい I κ B ファミリーの転写因子で、NF- κ B の作用により誘導され、NF- κ B のターゲット遺伝子や二次的なサイトカインの発現を制御するタンパク質である。I κ B は広く全身に発現しており、未刺激の状態ではその発現量は少ないものの、IL-1 受容体や Toll 様受容体を介した刺激により急速に活性化される。I κ B は、血液中の免疫細胞では炎症作用を有するとの報告がある一方で、I κ B の欠損マウスがシェーグレン症候群や重度のアトピー性皮膚炎などの炎症性疾患を発症したとの報告もあり、I κ B の生理学的な役割は未だ十分に解明されていない。同様に、脊髄損傷後の二次損傷と I κ B の関連についても過去に報告はなく、その役割は明らかにされていない。そこで、本研究では、脊髄の二次損傷に重要な血液細胞中の I κ B が、脊髄損傷後の二次損傷に関与し、脊髄損傷後の機能回復に何らかの影響を与える、という仮説の元、マウス脊髄損傷モデルを用いて、血液における I κ B の欠損が脊髄損傷後の二次損傷に与える役割を検証した。

3. 研究の方法

使用動物

実験動物として、野生型マウスは C57BL/6J(野生型: wild-type(WT))を使用した。遺伝子改変マウスについては、コンディショナルノックアウトの原理として広く使用されている Cre/loxP システムを利用し、Mx1-Cre マウスと Nfkbiz の両端に loxP 配列をもつ Nfkbiz^{fl/fl} マウスから Mx1-Cre; Nfkbiz^{fl/fl} マウスを作成した。このマウスに polyinosinic-polycytidylic acid(poly(I:C))を 1 回 300 mg、計 3 回腹腔内投与し、2-4 週間後に血液中の DNA を PCR で解析して Nfkbiz の欠損を確認した(コンディショナルノックアウト)。

マウス脊髄圧挫損傷モデルの作成

マウスは 8-10 週齢の雌性マウスのみを使用した。イソフルランを用いた全身麻酔下にマウスの背部を展開し、第 10 胸椎の椎弓切除を行った。その後、Infinite Horizons impactor (Infinite Horizons, L.L.C., Lexington, KY, USA)を使用して 60 kdyn の力で脊髄正中を圧挫して、マウス脊髄圧挫損傷モデルを作成した。Sham 手術では同様の椎弓切除のみを行い、脊髄圧挫損傷は行わなかった。

運動機能評価

脊髄損傷後の運動機能評価には Basso Mouse Scale (BMS)を用いた。BMS は脊髄損傷後の 1、3、7、14、21、28、35、42 日目に評価した。

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、脊髄および白血球中の総 RNA を抽出した。PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio, Shiga, Japan)で総 RNA を cDNA に逆転写した後、TaqMan Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて、IL-1、IL-4、IL-6、IL-10、CCL2、TNF- α 、I κ B の mRNA 発現量を測定した。それぞれの mRNA 発現量は、Sham 手術を行った WT マウス(n=3)の脊髄および白血球中の数値を基準として評価した。

免疫組織学的解析

脊髄損傷後 42 日目のマウス脊髄を採取し、0.3%正常ウシ血清アルブミンで 200 倍に希釈した一次抗体 (anti-rabbit Fibronectin Polyclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA)、二次抗体 (anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 594, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて癒痕組織の免疫染色を行った。画像分析には蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) を使用し、蛍光陽性領域の定量的測定には画像分析ソフトウェア (VH-H1A5; Keyence, Osaka, Japan) を使用した。

In situ ハイブリダイゼーション (ISH)

脊髄中での I B タンパク質の局在を明らかにするために、I B 抗体を用いて免疫組織化学染色を試みたが、可視化することは困難であった。そこで、ISH で mRNA 発現を検証した。ISH は、脊髄圧挫損傷のない WT マウスの脊髄と、脊髄圧挫損傷後 1 日目の WT マウスの脊髄に対してそれぞれ行った。

骨髄移植実験 (BMT)

BMT には 8 週齢の WT マウスおよび Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスを使用した。8 週齢のレシピエントマウス (WT マウス) に 9.5Gy のガンマ線全身照射を行い、その後頸静脈を介して骨髄細胞 (2 × 10⁶ cells) を移植した。移植後 8 週で血液を採取し、血液中の DNA を PCR で解析して骨髄細胞の生着を確認した。このプロトコルで、以下の 2 種類の骨髄移植マウスモデルを作成した。

(ドナー)	(レシピエント)	(骨髄移植マウスの表記)
WT	WT	BMT (WT WT) マウス
Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl	WT	BMT (Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl WT) マウス

4. 研究成果

血液細胞における I B の欠損が脊髄損傷後の運動機能回復に与える影響

Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウス (n = 8) と WT マウス (n = 8) の脊髄損傷後の後肢運動機能を比較した結果、BMS は Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスで有意に高く、事後解析では脊髄損傷後 14 日目以降で両群間に有意差が認められた。これにより、血液細胞における I B の欠損は脊髄損傷後の運動機能回復を促進することが示された。

脊髄損傷後 42 日目の脊髄における線維性癒痕組織の面積の計測

Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスでは WT マウスと比較して線維性癒痕組織の面積が減少し、Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウス (n=4) と WT マウス (n=4) の比較では、損傷中心部における線維性癒痕組織の面積は Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスで有意に少なかった。

脊髄損傷後の Nfkbiz の mRNA 発現量の経時的な変化

qRT-PCR では、脊髄中および白血球中の Nfkbiz の mRNA 発現量は脊髄損傷後 12 時間をピークに上昇し、その後、緩やかに減少することが確認された。脊髄中では脊髄損傷後 0.5 日目、1 日目のポイントで、白血球中ではすべてのポイントで、Nfkbiz の mRNA 発現量は WT マウスに比べて Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスで有意に低かった。

ISH の所見

ISH では、脊髄損傷がない脊髄では特に発現を認めない一方、脊髄損傷後 1 日目の脊髄では複数の陽性細胞を認め、核内に細胞特異的な発色が確認された。発色が見られた細胞は、白質および灰白質中のマクロファージ様の細胞であった。

脊髄損傷後の各種炎症性サイトカイン/ケモカインの発現量

脊髄損傷後 0.5 日目、1 日目の脊髄中での炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現量を両群間で比較検討した。qRT-PCR の結果、Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスでは抗炎症性サイトカインである IL-4、IL-10 の mRNA 発現量が WT マウスに比べて有意に高く、プロテインアレイでは、GM-CSF、CCL11 のタンパク質レベルが Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスで有意に高かった。

骨髄移植実験

骨髄移植実験では、WT マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植した BMT (WT WT) マウスと Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植した BMT (Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl WT) マウスを使用した。これらで脊髄損傷後の後肢運動機能を比較した結果、BMS は BMT (Mx-1-Cre; Nfkbizf1/fl WT) マウスで有意に損傷後の機能回復が高かった。

まとめ

本研究では、血液細胞における I B の欠損は、炎症反応のバランスを抗炎症方向、組織再生方向にシフトさせることで、脊髄損傷後の運動機能回復を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------