

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861383

研究課題名(和文) 遅発性脊髄障害にToll様受容体は関与しているか？

研究課題名(英文) Toll-like receptor might be involved into delayed onset paraplegia

研究代表者

野口 信弘 (NOGUCHI, Nobuhiro)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80457671

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)：マウス脊髄虚血後遅発性対麻痺モデルを用いTLR4、TLR2、MyD88そしてTRIFに関するそれぞれが遅発性麻痺に関与しているかを遺伝子改変マウス(ノックアウトマウス)を用いて検討した。その結果、TLR2ノックアウトマウス、TRIFノックアウトマウスでは遅発性麻痺の発症を認めなかったが、TLR4ノックアウトマウスとMyD88ノックアウトマウスでは遅発性麻痺を発症しなかった。このことからマウス脊髄虚血後遅発性対麻痺にはTLR4とMyD88が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether TLR4, TLR2, MyD88 or TRIF might be associated with onset of delayed paraplegia after spinal cord ischemia in mice. In our results, either TLR2 KO- or TRIF KO-mice could not show delayed paraplegia. In contrast, both TLR4 KO- and MyD88 KO-mice displayed delayed paraplegia after spinal cord ischemia. These results suggested that either TLR4 or MyD88 should be necessary in onset of delayed paraplegia after spinal cord ischemia.

研究分野：麻酔科学

キーワード：Toll様受容体 遅発性脊髄障害 脊髄虚血

1. 研究開始当初の背景

胸部下行大動脈手術において虚血性脊髄障害は未だに解決できない術後合併症である。最近では、血管内治療によりその発症率は多少低下してきたが、一方で血管内治療では遅発性対麻痺の割合が多くなり、その病態生理に関する基礎研究が注目されている。ところが、遅発性対麻痺を再現できる動物モデルはウサギのみであり、分子生物学的に病態生理を解明する有力な手段である遺伝子改変技術を駆使した研究は国内のみならず国外でも行われておらず、未だその病態生理解明には至っていないのが現状であった。2011年に当教室では遺伝子改変可能なマウスにおいて脊髄虚血後遅発性対麻痺モデルを作成し、遺伝子改変技術を利用することでその病態生理に“Caspase3を介したアポトーシスの関与”を証明した(Stroke 2011;42:2302)。さらに遅発性麻痺の発症時(虚血後48時間)にマイクログリアの集積が著明(図1)であること見出し、遅発性脊髄障害の病態生理における免疫反応の関与に着目した。そこで、遅発性脊髄障害と免疫反応との関連を検討する目的で、虚血後の脊髄における炎症性サイトカインの変化について実験を行った。その結果、遅発性対麻痺の発症前から、脊髄における炎症性サイトカイン(TNF、IL-6、IL-1)の発現が急増する現象を見出した(図2)。

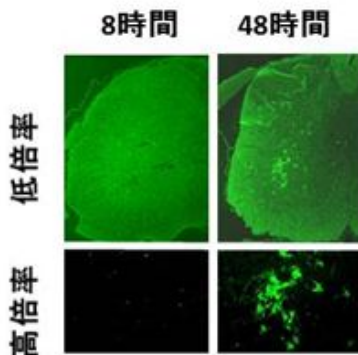


図1. 脊髄虚血後のマイクログリア集積

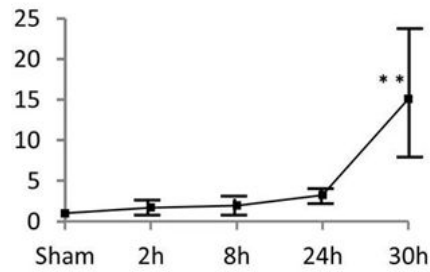


図2. 脊髄におけるIL-6発現(RT-PCR)

この一連の研究成果を踏まえ、炎症性サイトカインを惹起するカスケードと遅発性脊髄障害との関連に着目した。中枢神経系におけるマイクログリア活性化や炎症性サイトカイン発現に関して、種々の病原体を感知して自然免疫を作動させるTLRが注目されており、TLR(特にTLR2、TLR4)とこの下流シグナルは、生体防御のみならず中枢神経疾患にも大きく関与していることが報告されている(PNAS 2007;104:13798)。これらのことから、遅発性脊髄障害と炎症性サイトカインの関連についての研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

近年、神経変性疾患においても、自然免疫に重要なToll Like Receptor (TLR)がその病態に大きく関与していると報告されている。本研究では、我々の開発したマウスモデルを用い遅発性対麻痺とTLRならびにその下流シグナルの関与を、病理組織学的、分子生物学的アプローチならびに遺伝子改変マウスを用いることにより解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス遅発性脊髄障害モデル作成

イソフルラン全身麻酔人工呼吸下に弓部大動脈を一時的に遮断するモデルを用いた。(Kakinohana M, et al. Stroke 2011;42:2302)

(2) マウス大動脈遮断脊髄虚血後の各種

サイトカインの脊髄内 mRNA の経時的変化

マウス脊髄虚血後 2、6、8、24、48 そして 72 時間に犠殺し、脊髄を採取し直ちに液体窒素で冷凍保存する。その後、凍結脊髄サンプルから RNA を抽出し、その後プライマー-DNA、逆転写酵素により first-strand cDNA を合成する (TLR2、TLR4、TNF、IL-1、IL6、IL10)。この cDNA をテンプレートとして蛍光プローブを用いて Q-PCR を行った。

(3) TLR を含むその下流シグナル分子の影

この遅発性対麻痺は TLR4 系シグナルに依存的な病態なのか (TLR2 は関与していないのか否か)、MyD88 以下の過程によるアポトーシスなのかあるいは Trif 以下の過程に誘発されるアポトーシスなのか、について明らかにする。そのために、TLR2 ノックアウト、TLR4 ノックアウト、MyD88 ノックアウト、Trif ノックアウトマウスに脊髄虚血侵襲を与え、その後の神経学的予後ならびに組織学的予後を評価した。

4. 研究成果

(1) マウス脊髄虚血モデル作成

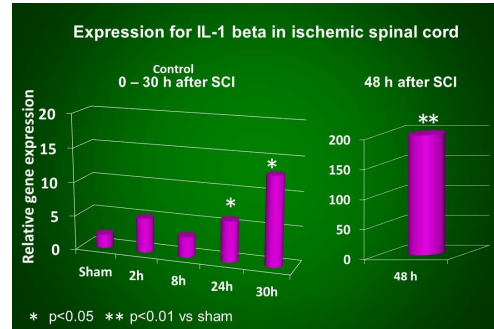
マウス弓部大動脈を 5 分間に遮断し脊髄虚血侵襲を与えた。



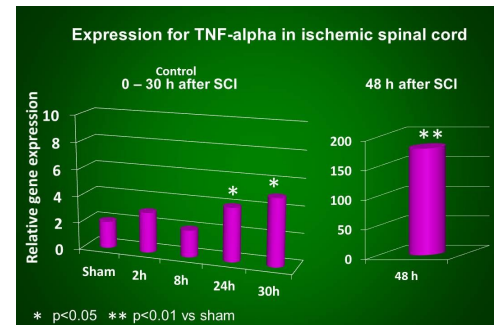
(図 3)

(2) 大動脈遮断脊髄虚血後の各種サイト

カインの脊髄内 mRNA の経時的変化
脊髄虚血後経時的に炎症性サイトカインの mRNA 発現変化を計測した。その結果、IL-6 (図 4)、TNF (図 5) ならびに IL-1 が虚血後 24 時間以降に上昇し、48 時間目には 50 倍程度増加していた。



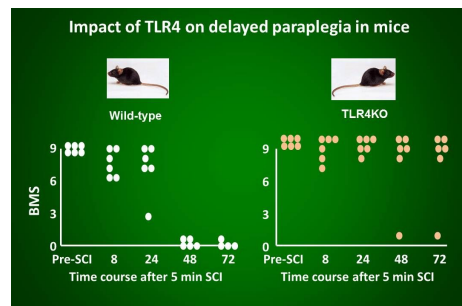
(図 4)



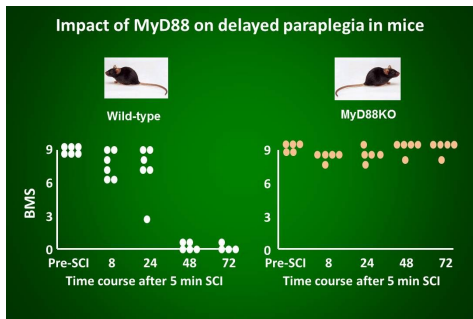
(図 5)

(3) 各種ノックアウトマウスの遅発性脊髄障害発生

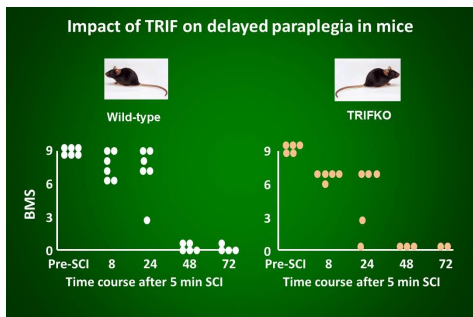
TLR4 ノックアウトマウスでは、5 分間の脊髄虚血後に遅発性対麻痺を発症しなかった (図 6)。また、MyD88 ノックアウトマウスでも同様に遅発性対麻痺を発症しなかった (図 7)。しかしながら、TRIF ノックアウトマウスでは遅発性対麻痺を発症した (図 8)。



(図 6)

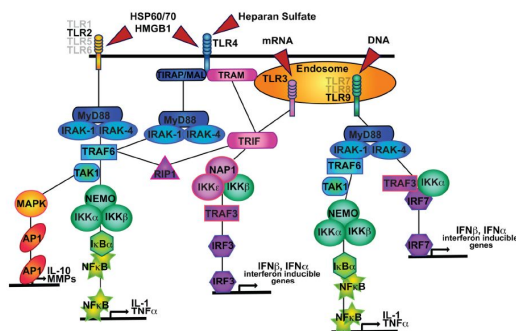


(図 7)



(図 8)

これらの結果から、脊髄虚血後のマウス遅発性対麻痺の発症には、TLR4 - MyD88 の経路が関与することが明らかとなった。TLR4-MyD88の下流にはNF- κ Bの核内移行ならびに炎症性サイトカイン mRNA 発現がある。(図 9)



(図 9)

炎症性サイトカインは、神経組織内では神経細胞に作用し、アポトーシスを誘導することが知られている。したがって、脊髄虚血後のマウス遅発性対麻痺の発症には、虚血侵襲により TLR4 を刺激する何らかの Ligand (HSP70、HMGB1、DNA、RNA など) が

神経細胞から放出され、その後 MyD88 を介して NF- κ B が核内に移行し、炎症性サイトカインを大量に産生することで、神経細胞がアポトーシスを発症すると考えられる。(図 10)



(図 10)

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 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 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
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

野口信弘 NOGUCHI, Nobuhiro)
琉球大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80457671

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：