

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08920

研究課題名(和文)軽度外傷性脳損傷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)The involvement of inflammasomes in 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は軽度外傷性脳損傷(MTBI)に帰因する高次脳機能障害が脳内自然炎症の抑制で改善されることを確認した。自然炎症の要であるインフラマソームの構成タンパク質ASCをノックアウトすると、MTBIモデルマウス脳内の炎症因子発現とグリア細胞活性化が抑制され、MTBI後の自発運動亢進と空間認知障害が改善された。更に、MTBI後6ヶ月でASCノックアウトマウス脳内Phospho-tauの増加がワイルドタイプ(WT)マウスと比較して有意に抑えられた。慢性外傷性脳症(CTE)の発症はMTBI後に起こる神経炎症の長期化に関連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

軽度外傷性脳損傷(MTBI)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、脳内自然炎症反応を抑制することによって、MTBIモデルマウスの高次脳機能障害症状が改善された。更に約6ヶ月間の長期実験で、MTBIモデルマウス脳内のタウタンパク質の蓄積量が自然炎症の抑制により減少した。これらの結果より、MTBIによる高次脳機能障害と続発する慢性外傷性脳症(CTE)が脳内神経炎症と関連することが明らかになった。本研究成果は、今後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 the inhibition of innate immunity reactions improved executive function disorders caused by mild traumatic brain injury (MTBI) in mice. As the dominant multiprotein oligomers in the innate immune system, inflammasomes consists of NLRP3, ASC and procaspase-1. Knock-out of ASC disturbs the function of inflammasomes, inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of glial cells in the brain of MTBI mice model. ASC knock-out mice reduced hyperlocomotion and improved spatial cognition dysfunction after MTBI when compared with wild type mice. A less Phospho-tau expression in ASC knock-out mice than in WT mice at 6 months after MTBI indicates that the onset of chronic traumatic encephalopathy (CTE) is relevant to chronic inflammatory reactions caused by MTBI in mice.

研究分野：神経損傷、救急医療

キーワード：軽度外傷性脳損傷(mTBI) inflammasomes ASC 慢性外傷脳症(CTE)

1. 研究開始当初の背景

外傷性脳損傷の中でも、受傷時の意識障害が軽度である場合は、軽度外傷性脳損傷(Mild Traumatic Brain Injury, MTBI)として区別される。MTBIの症状としては記憶障害、注意障害、社会的行動障害などの高次脳機能障害が目立ちやすい。病理解剖のデータとMTBI動物モデルを用いた研究では、軸索の変性、Microgliosis、Astroglisisと微小管結合蛋白タウ(Tau)の凝集、蓄積病変が報告されている(Brain. 136;43-64.2013; Mol Cell Neurosci.66:91-98.2015)。すなわち、MTBIの場合には、神経細胞の変性より神経炎症が目立ち、高次脳機能障害が時間と共に進展する。以上のことより、炎症反応に伴うグリア細胞活性化が高次脳機能障害の原因の一つと考えられる。インフラマソーム(Inflammasomes)は尿酸塩結晶や壊死細胞のDNAといった内在工作質により活性化され所謂自然炎症を惹起することで知られており、インフラマソームの過剰反応の結果として、様々な炎症性疾患が発症する可能性が示唆されている。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異常が改善されることを報告しているが、軽度外傷性脳損傷(MTBI)により生じた高次脳機能障害とインフラマソームを介した脳内自然炎症の関係はまだ解明されていない。

2. 研究の目的

ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)はインフラマソームの構成タンパク質で、インフラマソームの機能に不可欠な部分である。ASCをノックアウトすることによりインフラマソームの働きが抑制されて、炎症因子の分泌と脳内グリア細胞の活性化が抑えられると考えられる。本研究ではASCノックアウト(ASC KO)マウスとWild type(WT)マウスを用いて、MTBIマウスモデルの高次脳機能障害に及ぼすインフラマソームの影響を詳細に検討する事を目的とする。

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) 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。各マウスに一日一回、五日間で合計五回錘の落下(MTBIx5群)もしくは10日間で合計10回錘の落下(MTBIx10群)により損傷を与えた。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

MTBI後1,4週目と2,4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。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) ELISA とウェスタンブロッティング

Open field test 又は Morris water maze test が行われた後にマウスを安楽死させ、全脳を取出して、ELISA キットを用いて、脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した。さらにウェスタンブロッティングによって、脳内 NG2 と Phospho-tau の発現を確認した。

(5) 免疫組織化学染色と Luxol fast blue 染色

Open field test 又は Morris water maze test が行われた後に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、薄切して染色用に供した。

免疫組織化学染色：脳組織切片を脱パラフィン処理し、抗原賦活化処理後、10% normal goat serum にて 30 分間ブロッキングした。一次抗体 (抗 GFAP、抗 Iba-1) を切片に加えて反応させた後、VECTASTAIN ABC キットを用いて発色させ、光学顕微鏡で観察、撮影した。

Luxol fast blue 染色：脳組織切片を脱パラフィン処理後、LFB 染色液に一晩反応させ、炭酸リチウム水溶液に浸して、分別させた後、封入して、光学顕微鏡で観察、撮影した。

(7) 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) に比べて、MTBI 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。

MTBI 後 1、4 週目と 2 4 週目に Open field test 試験を実施した。その結果、MTBI 後 1 週目から、Sham 群に比して、MTBI を受けた WT マウス (MTBIx5 WT 群、MTBIx10 WT 群) の自発運動が有意に増加したが、MTBI の回数による自発運動の差は見られなかった。MTBI 後 1 週目で、MTBI を受けた ASC KO マウス (MTBIx5 KO 群、MTBIx10 KO 群) の自発運動が WT マウスと比較して有意に減少した。MTBI を受けた ASC KO マウスと Sham 群の自発運動には有意差が見られなかった。空間認知能力を検討するため、MTBI 後 4 週目に Morris water maze test を行った。その結果、訓練 2 日目から、逃避台に辿りつく時間 (escape latency) は、MTBI を受けた全てのマウスが Sham 群より長かった。訓練五日目で、WT マウスより、KO マウスの escape latency は有意に短縮された。

(2) WT マウスに比べて、MTBI 後 ASC KO マウスの脳内炎症因子の発現増加が抑制された。ELISA キットを用いて、MTBI 後の脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した (図 1)。

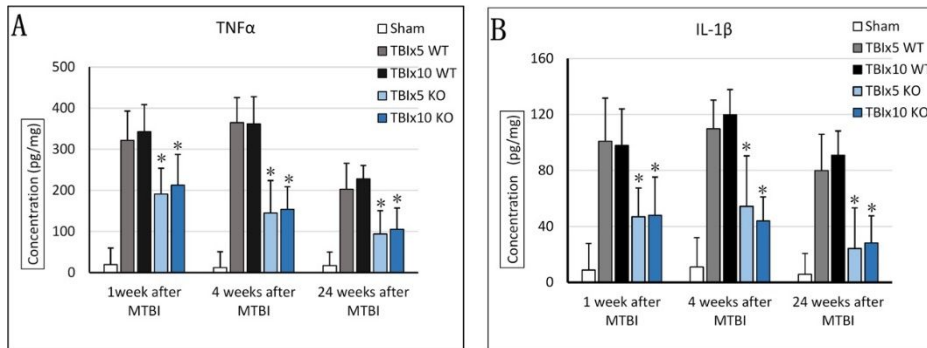


図1. MTBI 後脳内炎症因子の変化
TNF の変化 : Sham 群に比べて、MTBI 後マウス脳内の

TNF の濃度が明らかに上昇したが、KO マウスが MTBI 後 1 週目(1 week after MTBI)から 24 週目 (24weeks after MTBI)まで WT マウスよりその程度は有意に低かった (図 1A ; * : P<0.05)

IL-1 の変化 : Sham 群に比べて、MTBI 後マウス脳内の IL-1 の濃度が明らかに上昇したが、KO マウスが MTBI 後 1 週目(1 week after MTBI)から 24 週目 (24weeks after MTBI)まで WT マウスよりその程度は有意に低かった (図 1B ; * : P<0.05)

(3)WT マウスに比べて、MTBI 後 ASC KO マウス脳内のグリア細胞の活性化が抑制された。

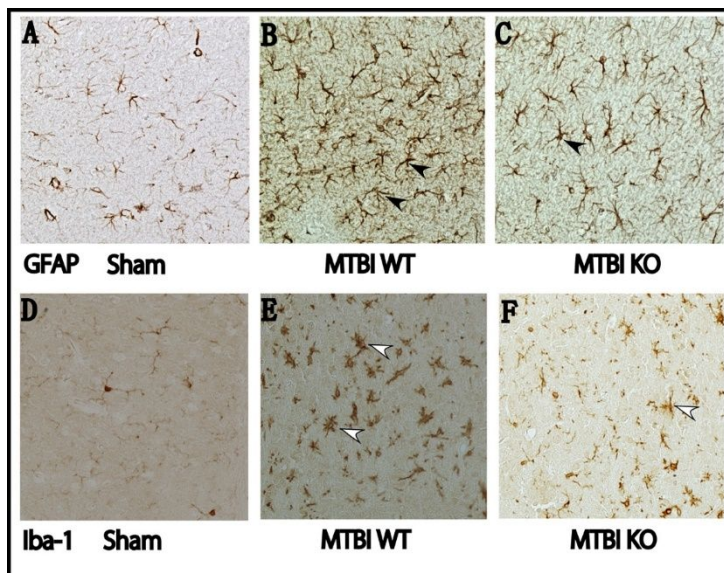


図2. MTBI 後脳内のグリア細胞の変化。

Astrocyte : Anti-GFAP 抗体を用いて、Astrocytes の状態を確認した。Sham 群(図 2A)に比べて、MTBI を受けたマウス脳内では活性化された Astrocytes が数多く確認できたが、KO マウスの方 (MTBI KO) が WT マウス (MTBI WT) より、Astrocytes の活性化が明らかに抑制された

(図 2B,C, 黒い矢頭 : Activated Astrocytes)

Microglia : Anti-Iba-1 抗体を用いて、Microglia の状態を確認した。Sham 群(図 2D)に比べて、MTBI を受けたマウス脳内では Amoeboid microglia が数多く確認できたが、KO マウスの方 (MTBI KO) が WT マウス (MTBI WT) より、Amoeboid microglia の数が明らかに少なかった (図 2E,F, 白い矢頭 : Amoeboid microglia)

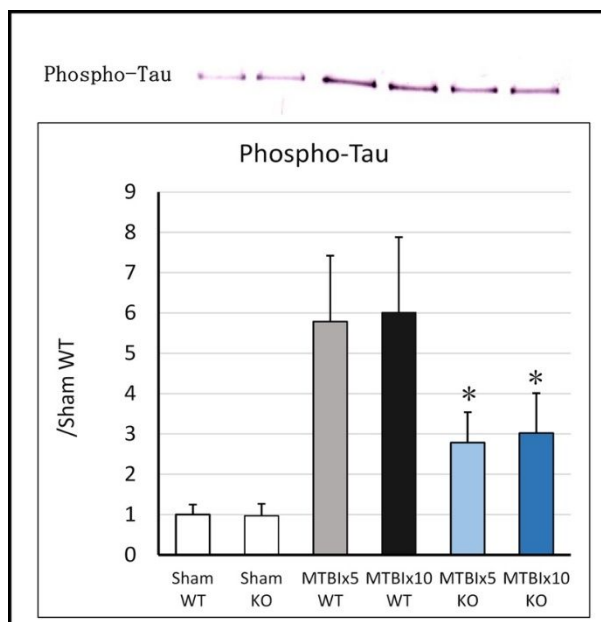
(4) MTBI を受けたマウスの脳内白質損傷を確認できた。WT マウスに比べて、KO マウス白質損傷区域の Oligodendrocyte 前駆細胞マーカー NG2 の発現が有意に増強された。

MTBI 後 4 週目で、Luxol fast blue 染色によりマウス脳内白質を観察した所、MTBI を受けた WT マウスと KO マウスの白質損傷区域が確認された。その白質損傷区域を調べた結果、

Oligodendrocyte 前駆細胞マーカーNG2 の発現が、KO マウス (MTBI KO 群) の方で WT マウス (MTBI WT 群) より有意に増加した。

(5) MTBI 後 2 4 週目で、WT マウスに比べて、KO マウスの脳内 Phospho-Tau の発現増加が有意に減少した。

図 3 . MTBI 後 2 4 週目、脳内 Phospho-Tau の発現変化



MTBI 後 24 週目にマウス脳内の Phospho-Tau の発現をウェスタンブロッティングで調べた。その結果、sham マウスに比べて、MTBI モデルマウスの脳内 Phospho-Tau の発現が有意に増加した。WT マウスに比べて、KO マウスの脳内 Phospho-Tau の発現増加が有意に軽減された (図 3、* : P<0.05)

(5) 結語

軽度外傷性脳損傷 (MTBI) 実験において、ASC KO マウスは、WT マウスに比べて、MTBI 後一週目から自発活動の亢進が有意に抑制された。更に ASC KO マウスでは空間認知障害の改善も見られた。脳内炎症因子

の発現を調べた結果、MTBI 後一週目から、ASC KO マウス脳内 TNF と IL-1 濃度が WT マウスに比して有意に低かった。更に WT マウスに比べて、MTBI 後 ASC KO マウス脳内のグリア細胞の活性化が抑制され、Oligodendrocyte 前駆細胞マーカーNG2 の発現が増強された。MTBI 後 24 週目で、WT マウスに比べて、KO マウスの脳内 Phospho-Tau の発現増加が有意に減少した。以上の結果から、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、MTBI 後脳内の炎症因子の発現とグリア細胞の活性化が抑制され、損傷した白質の回復が促進され、高次脳機能障害が改善されたと考えられる。更に、MTBI 後 ASC KO マウス脳内 Phospho-Tau の増加が抑えられたことから、脳内炎症の抑制が CTE の発症を防ぐことも明らかになった。(引用文献)

McKee AC, Stern RA, et al. The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. Brain. 2013 Jan;136(Pt 1):43-64. doi: 10.1093/brain/aws307.

Brody DL, Benetatos J, et al. The pathophysiology of repetitive concussive traumatic brain injury in experimental models; new developments and open questions. Mol Cell Neurosci. 2015 May;66(Pt B):91-8. doi: 10.1016/j.mcn.2015.02.005.

Kane MJ, et al. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. J Neurosci Methods. 2012 Jan 15;203(1):41-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.09.003..

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Zhu Pengxiang, Sakanaka Masahiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Effects of Red Ginseng on Neural Injuries with Reference to the Molecular Mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J	6. 最初と最後の頁 116 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/j2020009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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
---------	---------