

表 題 脊髄損傷後の運動機能回復における血球細胞由来 IκBζ の役割

論文の区分 博士課程

著 者 名 滝 直也

担当指導教員氏名 竹下 克志 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
専攻 地域医療学系  
専攻分野 精神・神経・筋骨格疾患学  
専攻科 整形外科学

2024年1月10日申請の学位論文

## 目次

1. はじめに.....	2
2. 実験材料と方法.....	3
2.1. 使用動物	
2.2. マウス脊髄圧挫損傷モデルの作成	
2.3. 運動機能評価	
2.4. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	
2.5. 免疫組織学的解析	
2.6. <i>In situ</i> ハイブリダイゼーション (ISH)	
2.7. 骨髄移植実験 (BMT)	
2.8. 統計学的解析	
3. 結果.....	8
3.1. コンディショナルノックアウトの確認	
3.2. 血液細胞における $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損は脊髄損傷後の運動機能回復を促進する	
3.3. 血球細胞における $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損は脊髄損傷後の瘢痕組織形成を抑制する	
3.4. 脊髄損傷後の脊髄および白血球中では <i>Nfkbiz</i> の mRNA 発現量が増加する	
3.5. 脊髄損傷後の <i>Nfkbiz</i> の mRNA はマクロファージ様細胞の核内に発現する	
3.6. 血液細胞 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損により脊髄損傷後の IL-4, IL-10 の mRNA 発現量が増加する	
3.7. $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損により脊髄損傷後の GM-CSF, CCL11 のタンパク質レベルが増加する	
3.8. 骨髄由来細胞は脊髄損傷後の運動機能回復に影響を与える	
4. 考察.....	17
5. おわりに.....	19
謝辞.....	20
参考文献.....	21

## 1. はじめに

外傷に伴う脊髄損傷は、損傷部以下での運動・感覚・自律神経障害や中枢性神経障害性疼痛を呈する重篤な疾患で、高度な機能障害を来す(1). 脊髄損傷の病態生理は、一次損傷と二次損傷の 2 つの段階に分けられる(2). 一次損傷とは、脊髄に対する直接的な受傷外力で物理的な損傷であるのに対し、二次損傷は、一次損傷後の数週から数か月にわたって生じる損傷部位周囲への二次的な組織障害の波及であり、この非物理的な傷害により受傷後の症状はさらに増悪する. 二次損傷のメカニズムは様々で、出血、虚血、浮腫、酸化ストレス、イオン不均衡、神経炎症などの、種々の一連の病理学的な事象が関与している(2, 3).

中でも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- $\kappa$ 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(4, 5). そして、活性化された免疫細胞が IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 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(3, 5, 6). 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(7).

I $\kappa$ B $\zeta$ (遺伝子名 *Nfkbiz*)は、近年報告された新しい I $\kappa$ B ファミリーの転写因子で、NF- $\kappa$ B の作用により誘導され、NF- $\kappa$ 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(8). I $\kappa$ B $\zeta$  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(9). I $\kappa$ B $\zeta$  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が、一方、I $\kappa$ B $\zeta$  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 $\kappa$ B $\zeta$  の生理学的な役割は未だ十分に解明されていない(10-14). 同様に、脊髄損傷後の二次損傷と I $\kappa$ B $\zeta$  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 $\kappa$ B $\zeta$  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 $\kappa$ B $\zeta$  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.

## 2. 実験材料と方法

### 2.1. 使用動物

本研究におけるすべての動物実験は、自治医科大学実験動物規定に従い実施した。実験動物として、野生型マウスは C57BL/6J(野生型: wild-type(WT))を日本 SLC より購入した。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<sup>fl/fl</sup>* マウスから *Mx1-Cre; Nfkbiz<sup>fl/fl</sup>* マウスを作成した(14, 15)。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)(12)。

### 2.2. 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。これは、雄性マウスでは脊髄損傷後に尿閉となり、尿路感染症の合併が高率に生じるためである。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(16)。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。脊髄損傷後の後療法は、過去の報告に基づき行った(17)。

### 2.3. 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(16)。BMS はマウスの後肢運動機能を 0-9 点で評価するツールとして広く利用されており、マウスのグループがブラインド化された 2 人の評価者が個々にオープンフィールドのマウスを 4 分間観察し、BMS ガイドラインに従って後肢運動機能をスコアリングした。BMS は脊髄損傷後の 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 日目に評価した。

### 2.4. 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 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, CCL2, TNF- $\alpha$ , I $\kappa$ B $\zeta$  の mRNA 発現量を測定した。Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)には THUNDERBIRD Probe qPCR Mix もしくは THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan)を使用した。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. 使用したプライマーの詳細を以下に示す(表 1).

表 1. qRT-PCR に使用した各種プライマーの詳細

Real time qPCR		For THUNDERBIRD Probe qPCR	
Target Gene		TaqMan Gene Expression Assay No.	
<i>Nfkbiz</i> <i>Il1b</i> <i>Il4</i> <i>Il6</i> <i>Il10</i> <i>Ccl2</i> <i>Tnf</i>		Mm00600522_m1	
		Mm00469460_m1	
		Mm00445259_m1	
		Mm99999064_m1	
		Mm00439616_m1	
		Mm00441242_m1	
		Mm00443258_m1	
Real time qPCR		For THUNDERBIRD SYBR qPCR	
Target Gene		Sequence	
<i>Hprt1</i>	F	5'- GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG -3'	
	R	5'- GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC -3'	
<i>Il1b</i>	F	5'-GCAACTGTTCTTGAAGTCAACT -3'	
	R	5'- ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT -3'	
Genotyping			
Target Gene		Sequence	
<i>Nfkbiz</i>	F1	5'- GCAAATATTCCCCAGGACCAG -3'	
	R	5'- GTCTTCACAGCAGGTTATTCACG -3'	
	F3	5'- TCAGTGCCAGGTGCGTCTGAG -3'	

## 2.5. 免疫組織学的解析

脊髄損傷後 42 日目のマウスにイソフルランで全身麻酔を行い、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 10 ml と 4%パラホルムアルデヒド (4% PFA) 10 ml を心臓内に注入して灌流を行った。脊髄を採取し、4%PFA に 2 時間、その後 30%スクロース液に 48 時間浸漬させた後、脊髄損傷部を中心に 5 mm のブロックにしてから、OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) に浸透させ凍結した。そして、凍結ブロックを縦断面 (厚さ 20  $\mu$ m) または横断面 (厚さ 10  $\mu$ m) で薄切して連続した凍結切片を作成した。切片を 0.1% Triton-X で透過処理し、0.1 M リン酸緩衝液中の 3%正常ウシ血清アルブミンで 30 分間ブロックしてから、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) を滴下して 4°Cで一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、二次抗体 (anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 594, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を滴下して室温で 1 時間インキュベートし、VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入した。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。

## 2.6. *In situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

パラフィン包埋した脊髄を 6  $\mu$ m に薄切し, ISH Reagent Kit (Genostaff, Tokyo, Japan) を用いて ISH を行った. 脱パラフィン処理の後, 10% 中性緩衝ホルマリン, 0.2% 塩酸, Proteinase K (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて前処理を行い, プローブを G-Hybo-L (Genostaff, Tokyo, Japan) で 250ng/ml に希釈して 60°C に一晩静置した (表 2). その後, 切片を 0.5 $\times$ G-Wash を含む 50% ホルムアミドおよび 0.1% Tween 20 を含む Tris-buffered saline で洗浄し, Anti-digoxigenin-AP (Roche, Basel, Switzerland) を抗体希釈液で 2000 倍に希釈して, 室温で 1 時間インキュベートすることでブロッキングを行った. NBT/BCIP Solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) で発色させ, 対比染色には Kernechtrot Stain Solution (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) を使用した. 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.

表 2. ISH に使用したプローブ配列

Target gene: <i>Nfkbiz</i> ; Sequence position: 650-1179
5'AGGCCCTTTCAAGGTGTTTCGCGTGAAGAACTCGGTGAAGGAGCTCCTGCTACACAT CCGAAGCAACAAGCAGAAGGCTTCCGGCCAGCCCGTGGATGAGTTTAAGACACAGAG TGTGAACATTGAGCAGCTGACAGACCTGAAGAGTGCAGTGTCCGCAGTGGGGAAAAG AAAGGGACCCGATCCTCTGTCCGATGGACCGGTTTGCAAGAGGCCAGCTCTGTTGCCT TCTCACTTCGTGACATCACCGCAAACGCCTACACCTGGGGAGAGCATGGAAGATGTTC GCCACAGCGAATCCAAGCTGGATAGCAGCGCTGCCCTGCTTCAGAATATTATAAACAT CAAGAATGAGTGCAACCCAGTTTCACTAAACACTGTTTCAGGTTAGCTGGATGAGCCCC ACGGTTCCCCAGAACTCGCCAAGAGACCAGTGCCAGGATTTCCATGGAGGCCAGGCC TTCTCTCCACCTCAGAAATACCAACCGTTCCAAGTCAGTGGCTCTCCACAGATGATGG ACCAGGCGTCAA-3'

## 2.7. 骨髄移植実験 (BMT)

BMT には 8 週齢の WT マウスおよび Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスを使用した。ドナーマウスの大腿骨と脛骨を取り出し、骨髄内に PBS を注入して WT マウス, Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスの骨髄細胞を採取した。溶血バッファーを加えて赤血球を溶血させ、全体を PBS で 2 回洗浄することで骨髄細胞の懸濁液を準備した。レシピエントマウスはすべて 8 週齢の WT マウスを用いた。移植前に総線量 9.5Gy のガンマ線全身照射を行い、その後に頸静脈を介して骨髄細胞 ( $2 \times 10^6$  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; <i>Nfkbiz</i> <sup>fl/fl</sup>	WT	BMT (Mx-1-Cre; <i>Nfkbiz</i> <sup>fl/fl</sup> →WT)マウス

## 2.8. 統計学的解析

特に記載のない限り、結果データは平均値±標準偏差で表記した。独立 2 群間の比較には対応のない *t* 検定を、BMS の比較には分散分析 (ANOVA) を使用し、事後解析には Bonferroni の方法を用いた。統計解析には、統計ソフトウェア (IBM SPSS Statistics Version 25.0, IBM corp., Armonk, NY, USA) を使用し、 $P < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。

### 3. 結果

#### 3.1. コンディショナルノックアウトの確認

6 週齢の Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>f/f</sup> 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 で解析した. アガロースゲル電気泳動にて, poly(I:C)投与前に見られていた flox バンドが消失することを確認し, これにより血液中で *Nfkbiz* が欠損したことを確認した(図 1).

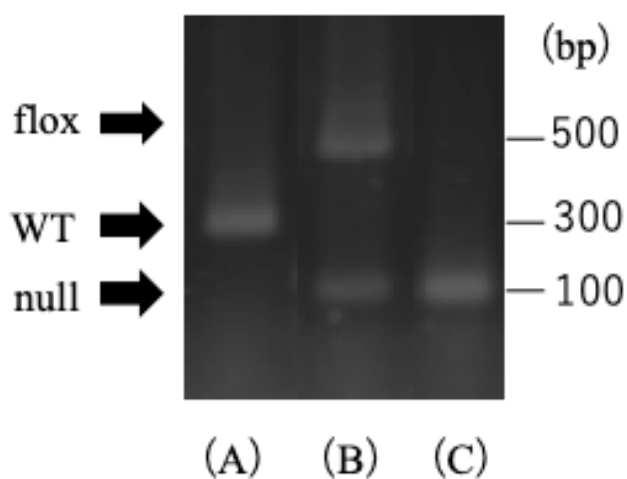


図 1. 2%アガロースゲルを使用した DNA(白血球)の電気泳動

(A) WT マウス

(B) poly(I:C)投与前の Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>f/f</sup> マウス

(C) poly(I:C)投与後の Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>f/f</sup> マウス

### 3.2. 血液細胞における $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損は脊髄損傷後の運動機能回復を促進する

はじめに、血液細胞における  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  の欠損が脊髄損傷後の運動機能回復に与える影響を検証した。Mx-1-Cre;  $\text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  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;  $\text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  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 (図 2)。

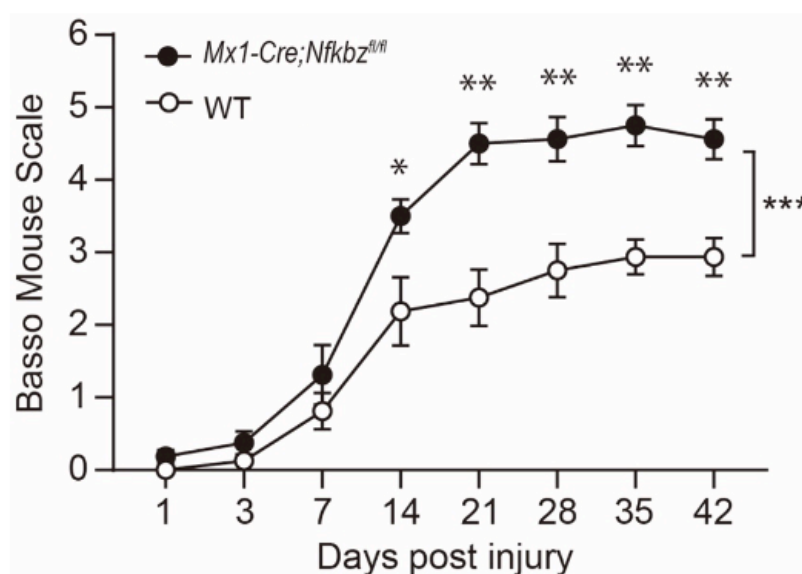


図 2. 脊髄損傷後の運動機能回復

Mx-1-Cre;  $\text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  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 BMS で比較した. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.3. 血球細胞における $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損は脊髄損傷後の瘢痕組織形成を抑制する

治癒過程で生じる線維性瘢痕の影響を確認するために, fibronectin 抗体を用いて, 脊髄損傷後 42 日目の脊髄における線維性瘢痕組織の面積を計測した. その結果,  $\text{Mx-1-Cre}; \text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  マウスでは WT マウスと比較して線維性瘢痕組織の面積が減少し,  $\text{Mx-1-Cre}; \text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  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瘢痕組織の面積は  $\text{Mx-1-Cre}; \text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  マウスで有意に少なかった (図 3).

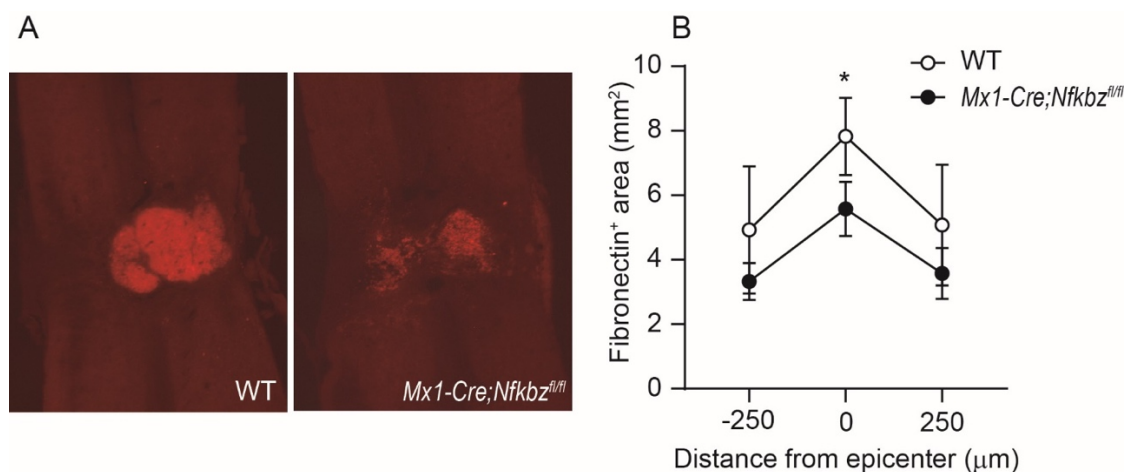


図 3. 組織学的解析

(A) Fibronectin 抗体を用いた脊髄損傷後 42 日目の脊髄縦断面の免疫染色(赤).

(B)  $\text{Mx-1-Cre}; \text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  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瘢痕組織の面積に有意差を認めた.  $*P < 0.05$ .

### 3.4. 脊髄損傷後の脊髄および白血球中では *Nfkbiz* の mRNA 発現量が増加する

次に、脊髄損傷後の *Nfkbiz* の mRNA 発現量の経時的な変化を検討した。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 (図 4)。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 *Mx1-Cre; Nfkbiz<sup>fl/fl</sup>* マウスで有意に低かった。脊髄中における *Mx1-Cre; Nfkbiz<sup>fl/fl</sup>* マウスでの *Nfkbiz* の mRNA 発現量の増加は、遺伝子がノックアウトされていない血球以外での発現の変化を示しており、両群における mRNA の発現量差は、WT マウスでは脊髄損傷後に一時的に血球由来の遺伝子発現が高まるためと考えられた。

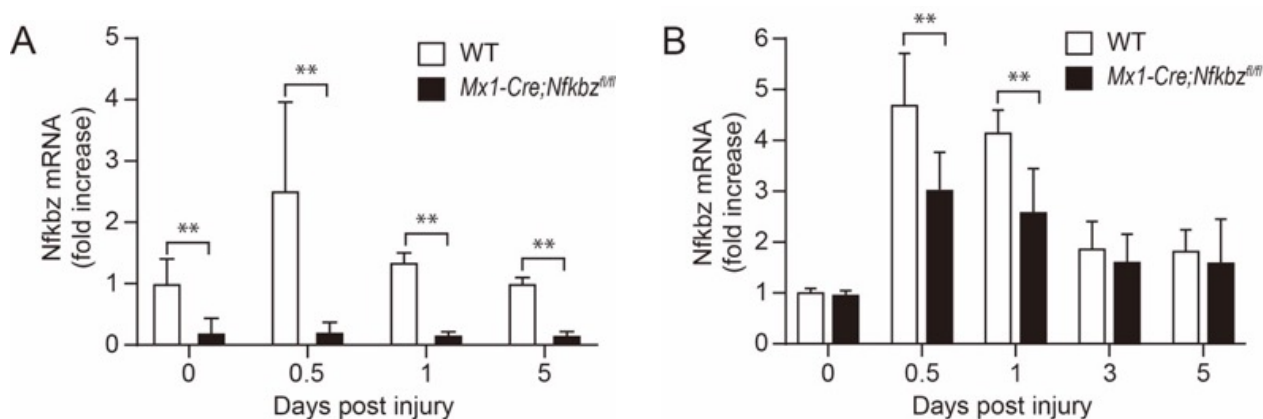


図 4. *Nfkbiz* の mRNA 発現量

白血球中(A), 脊髄中 (B)における *Nfkbiz* の mRNA 発現量を定量 RT-PCR で測定した。

\*\* $P < 0.01$ . (n = 5)

### 3.5. 脊髄損傷後の *Nfkbiz* の mRNA はマクロファージ様細胞の核内に発現する

脊髄中での I $\kappa$ B $\zeta$  タンパク質の局在を明らかにするために、I $\kappa$ B $\zeta$  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 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 (図 5B, 5C)。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 (図 5D, 5E)。

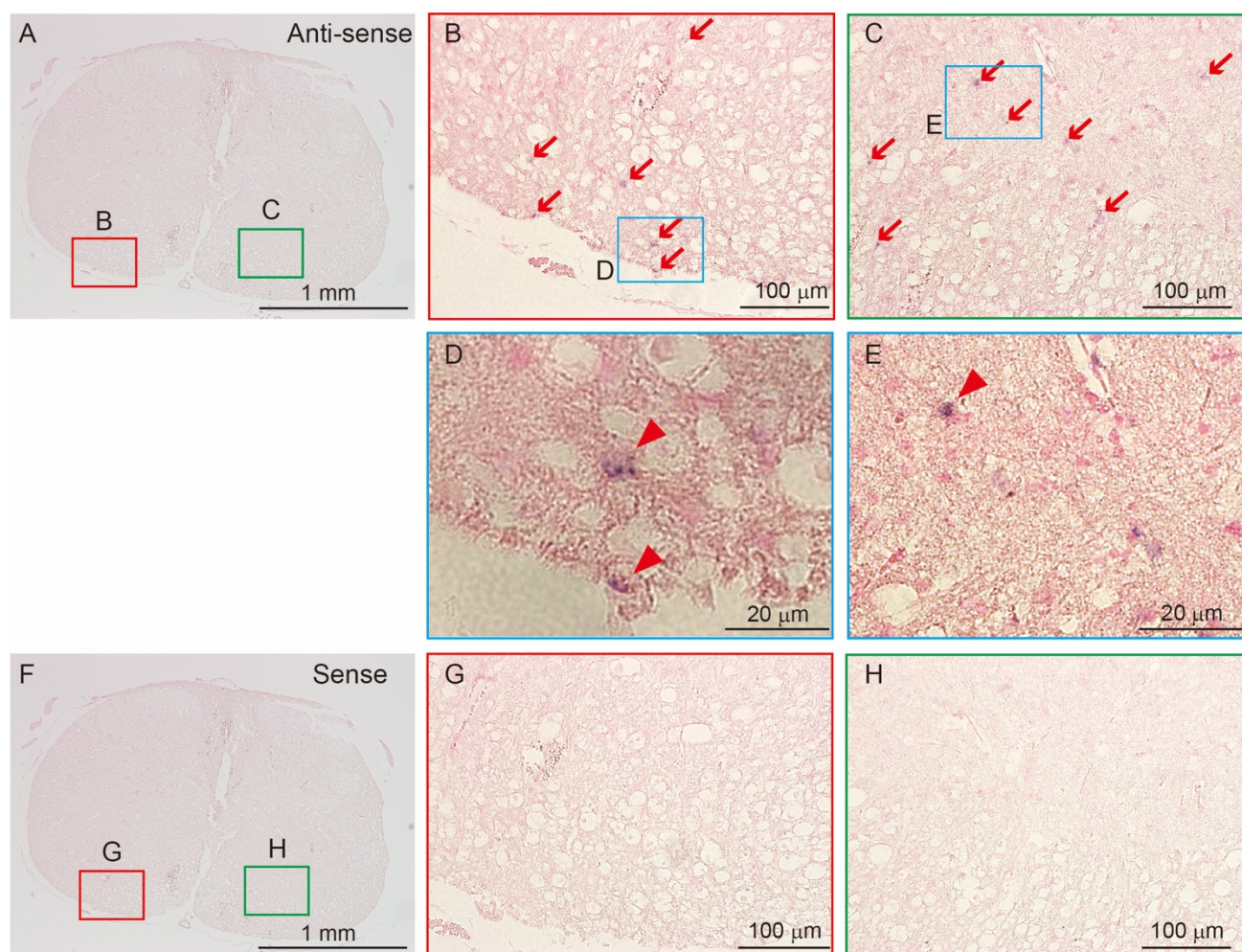


図 5. WT マウスの脊髄における In situ ハイブリダイゼーション

(A)は脊髄圧挫損傷後 1 日目の脊髄横断面。

(B), (C) A の拡大像。

(D), (E) B, C の拡大像。

(F), (G), (H) センスプローブを用いたハイブリダイゼーション(ネガティブコントロール)

### 3.6. 血液細胞 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の欠損により脊髄損傷後の IL-4, IL-10 の mRNA 発現量が増加する

次に、脊髄損傷後 0.5 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; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> 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かった (図 6)。

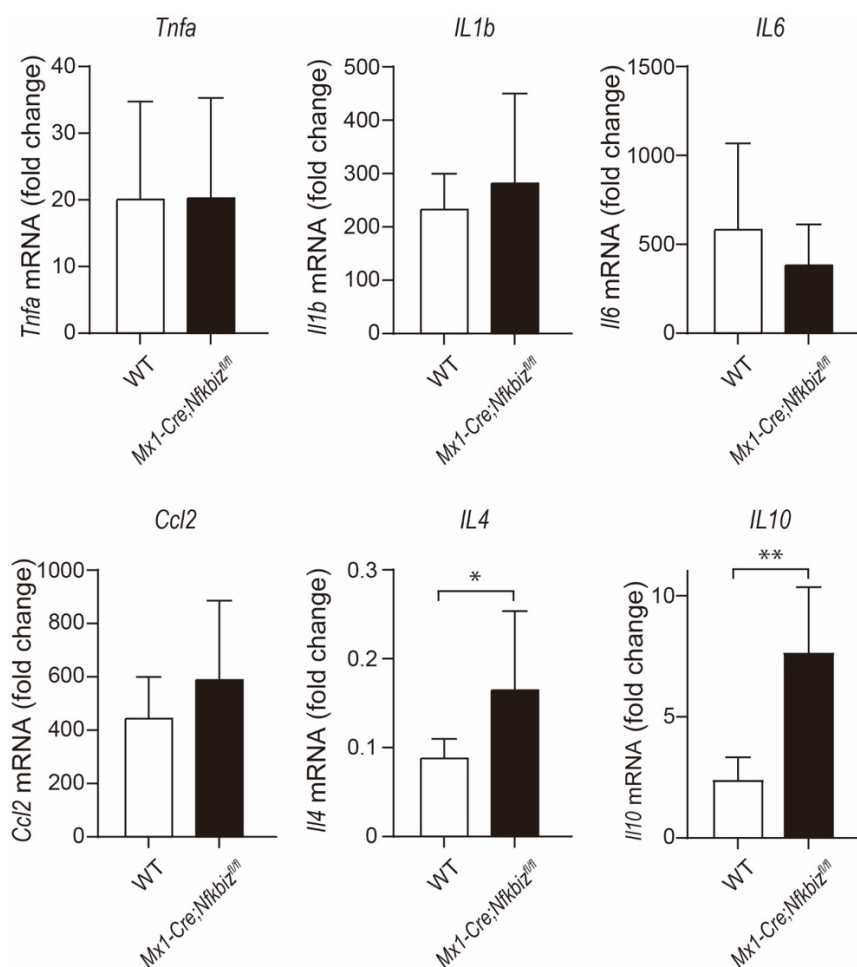


図 6. 脊髄のサイトカイン mRNA に対する定量 RT-PCR

脊髄損傷後 0.5 日目の脊髄中での各種炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA を、Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスと WT マウスとで比較した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . (n = 6)

### 3.7. I $\kappa$ B $\zeta$ の欠損により脊髄損傷後の GM-CSF, CCL11 のタンパク質レベルが増加する

プロテインアレイを用いて、脊髄損傷後 1 日目の脊髄中における 40 種類の炎症性サイトカイン/ケモカインのタンパク質を定量化した。Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスと WT マウスの比較では、GM-CSF, CCL11 のタンパク質レベルが Mx-1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスで有意に高かった (図 7)。

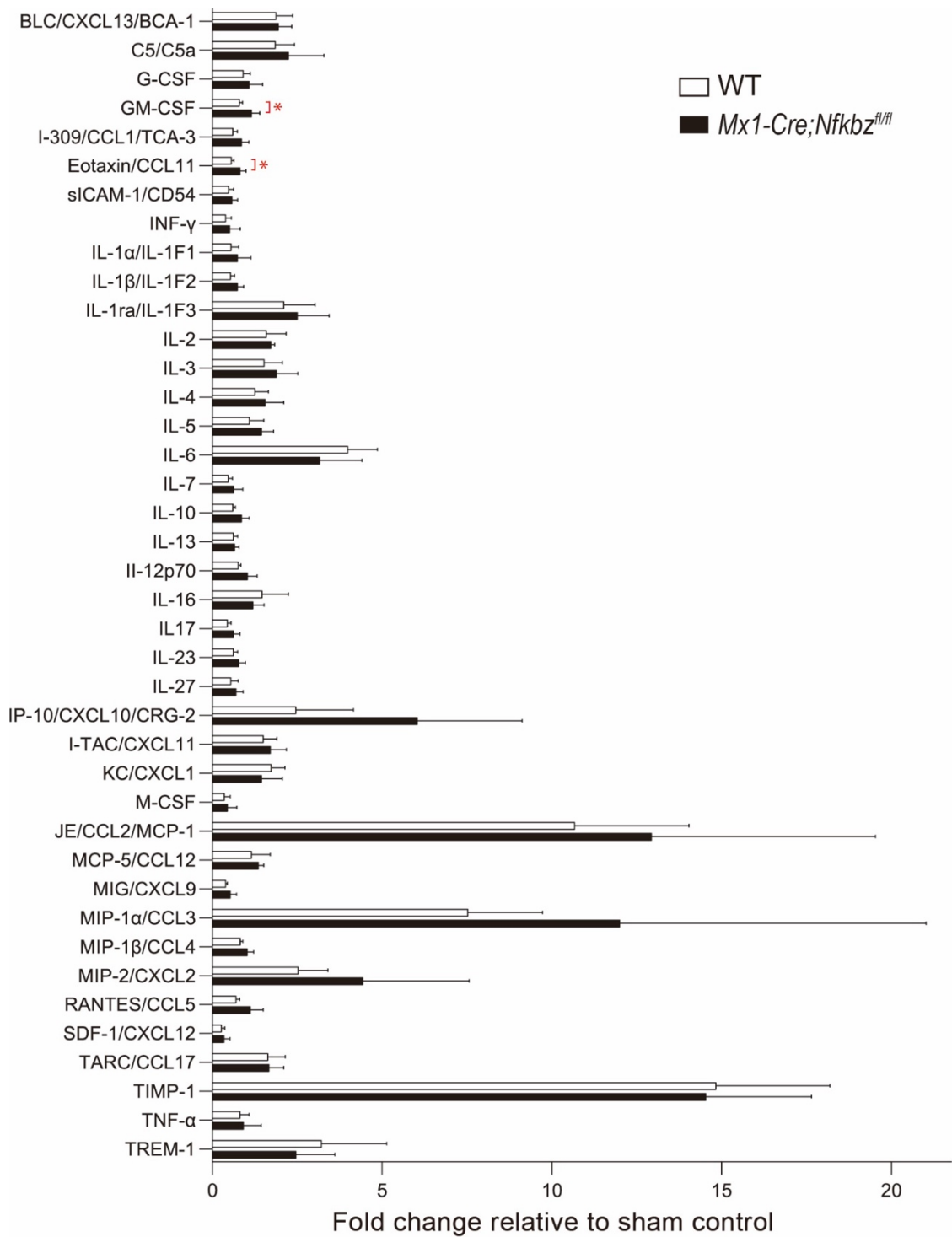


図 7. 脊髄のサイトカイン・ケモカインに対するプロテインアレイ

脊髄損傷後 1 日の段階で、脊髄中の 40 種類の炎症性サイトカイン/ケモカインを定量化した。\* $P < 0.05$ . (n = 4)

### 3.8. 骨髄由来細胞は脊髄損傷後の運動機能回復に影響を与える

Mx1-Cre は、腸管上皮細胞、間葉系幹細胞、血管周囲細胞など、血液細胞以外でも発現しており、これら非血液細胞由来の  $\text{IkB}\zeta$  欠損の影響を除外するために骨髄移植実験を行った。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 Mx1-Cre;  $\text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$  マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植した BMT (Mx1-Cre;  $\text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$ →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 (Mx1-Cre;  $\text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$ →WT) マウスで有意に損傷後の機能回復が高かった (図 8)。

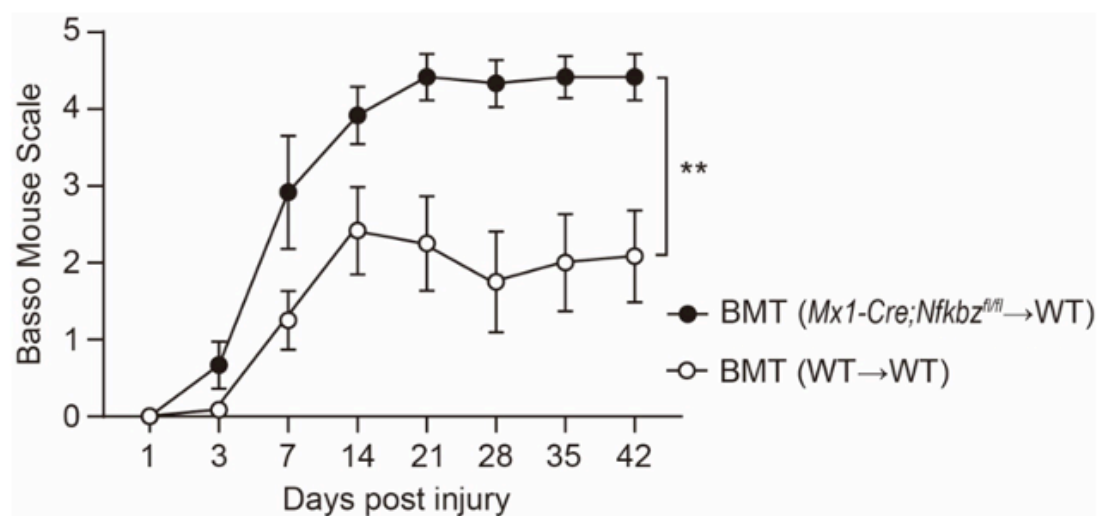


図 8. 骨髄移植マウスの脊髄損傷後の運動機能回復

BMT(Mx1-Cre;  $\text{Nfkbiz}^{\text{fl/fl}}$ →WT)マウス(n=6)と BMT(WT→WT)マウス(n=6)の脊髄損傷後の後肢運動機能を BMS で比較した. \*\* $P < 0.01$ .

#### 4. 考察

I $\kappa$ B $\zeta$  は、近年報告された新しい I $\kappa$ B ファミリーの 1 つである(8). 細胞質に存在する古典的な I $\kappa$ B ファミリーとは異なり, I $\kappa$ B $\zeta$  は核内で働く転写因子として, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , CCL2, IFN- $\gamma$ , IL17A, GM-CSF などの NF- $\kappa$ 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している(9). I $\kappa$ B $\zeta$  は広く全身に発現し, 生理学的にも双方向性の作用を有していることから, 炎症反応および炎症性疾患に関わる I $\kappa$ B $\zeta$  の役割は非常に大きいと考えられる(9). 本研究では, 血液細胞における I $\kappa$ B $\zeta$  が脊髄損傷後の病態にどのように関与しているかを, コンディショナルノックアウトマウスを用いて検証し, 脊髄損傷後の運動機能回復は, WT マウスに比べて Mx1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスで有意に良好であることが確認された. この結果から, 血液細胞における I $\kappa$ B $\zeta$  は脊髄損傷後の二次損傷からの回復を抑制する転写因子であることが示唆された.

Mx1-Cre システムは, 造血幹細胞に対する遺伝子組み替え技術であり, 血液学の実験においては最も一般的な手法である. Mx1 は, Myxovirus Resistance-1 遺伝子の略で, インターフェロンにより強く誘導される抗ウイルス遺伝子として知られている. Mx1 プロモーターにより制御される Cre リコンビナーゼは, ウイルス感染を模した polyinosinic-polycytidylic acid(poly(I:C))によって活性化され, 主に造血幹細胞が遺伝子組み替えのターゲットとなるが, 腸管上皮細胞, 間葉系幹細胞, 血管周囲細胞など, 血液細胞以外の Mx1 発現細胞にもその効果は作用する(15, 18). 本研究では, これら非血液細胞由来の I $\kappa$ B $\zeta$  欠損の影響を除外するために骨髄移植実験を行った. その結果, コントロールに比べて, Mx1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスの骨髄細胞を WT マウスに移植した BMT(Mx1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup>→WT)マウスの BMS が有意に高い結果であることが確認され, 脊髄損傷後の機能回復に対しては血液中の I $\kappa$ B $\zeta$  欠損が保護的な作用をもたらすことが示された.

脊髄損傷では, 一次損傷により血液脊髄関門の破綻が生じ, その結果, 末梢血液中の免疫細胞が損傷部位に浸潤する. 好中球浸潤は脊髄損傷後 1 日目を, マクロファージ浸潤は脊髄損傷後 7 日目をピークに認められ, リンパ球浸潤のピークはさらにその後とされる(6). 血液由来の免疫細胞が脊髄損傷後の二次損傷に与える影響は様々で, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 などの炎症性サイトカインは, 神経細胞のアポトーシスや脱髄を惹起する作用を持ち, 二次損傷を増悪させる方向に働く(4). 一方で, 一部の免疫細胞には, 抗炎症性サイトカインや神経栄養因子を分泌することで組織修復を促す作用があり, これらは二次損傷を軽減させる方向に働く(6). 末梢血液中の免疫細胞におけるこれら相反する反応には, 大きく 2 種類のマクロファージ(M1 マクロファージ, M2 マクロファージ)が関与している(19). 炎症性サイトカインを強く発現する M1 マクロファージと, IL-4 や IL-13 の刺激によって誘導され, 抗炎症性サイトカインを分泌することで炎症反応の抑制や組織修復などに関わる M2 マクロファージのバランスが神経再生に影響を与えるとされている(20). 本研究では, 脊髄損傷後 12 時間の脊髄において, Mx1-Cre; *Nfkbiz*<sup>fl/fl</sup> マウスの IL-4, IL-10 の mRNA 発現量が WT マウスに比べて有意に高い結果であった. IL-4, IL-10 は, いずれも種々の炎症性疾患に対して抗炎症作用を有する Th2 サイトカインであり, これら抗炎症性サイトカインは M2 マクロファージ

ジを活性化させることで組織修復、軸索再生を促し、脊髄損傷後の運動機能回復を促進する(21-23). 炎症性サイトカインの mRNA 発現量については両群間で有意差は見られなかったが、脊髄損傷後に Mx-1-Cre; *Nfkbiz<sup>fl/fl</sup>* マウスでは抗炎症性サイトカインの産生が増加しており、血液細胞における I $\kappa$ B $\zeta$  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、その結果、二次損傷が軽減したと考えられた。

プロテインアレイでは、脊髄損傷後 1 日目の脊髄中における GM-CSF, CCL11 のタンパク質レベルが Mx-1-Cre; *Nfkbiz<sup>fl/fl</sup>* マウスで有意に高い結果であった。GM-CSF は強力な造血成長因子であり、骨髄における幹細胞の増殖を促進する一方で、白血球のアポトーシスを抑制する作用を持つ。脊髄損傷との関連については、過去にラットを用いた研究で、GM-CSF が神経細胞のアポトーシスおよびグリア瘢痕の形成を抑制し、脊髄損傷後の機能回復を促進したとの報告があり、脊髄損傷に対しては保護的に働くサイトカインとされている(24, 25). CCL11(別名: eotaxin-1)は好酸球遊走因子であり、喘息、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患などのアレルギー疾患との関連が報告されている(26). 一方で、虚血性脳損傷に対しては、CCL11 は神経前駆細胞の増殖および遊走能を高め、神経再生を促進するとの報告もある(27). さらに、ラットを用いた動物実験では、実験的自己免疫性脳脊髄炎に耐性をもつラットでは脊髄中の CCL11 の発現量が増加していたと報告されている(28). これらを踏まえると、血液細胞における I $\kappa$ B $\zeta$  の欠損により、脊髄損傷部位では組織修復や神経再生を高めるサイトカインの分泌が促進された可能性がある。

本研究では、今後解明しなければならない種々の課題が残っている。本研究では I $\kappa$ B $\zeta$  が発現している細胞の種類が同定できていない。I $\kappa$ B $\zeta$  は、過去の報告で Western blotting によっても検出が可能な抗体を用いても免疫染色での検出ができなかった。これは、I $\kappa$ B $\zeta$  が転写因子であり、細胞内ではタンパク質が 3 次元構造をとるためと考えられる。今後は、I $\kappa$ B $\zeta$  に適した免疫染色や他の手法を用いて、I $\kappa$ B $\zeta$  発現細胞を特定する追加実験が必要と思われる。次に、抗炎症性サイトカインの mRNA 発現量が増加した機序が不明である。過去の論文では、*in vitro* の研究で、培養したマクロファージから産生される I $\kappa$ B $\zeta$  依存性の IL-10 が報告されている(29). 本研究では、I $\kappa$ B $\zeta$  の欠損により脊髄中の IL-10 の mRNA 発現量は増加しており、*ex vivo* と *in vivo* での結果の乖離を説明しうる研究が求められる。最後に、本研究では脊髄損傷後 0.5 日目、1 日目のみで炎症性サイトカイン/ケモカインを測定したのみであり、時間軸での発現評価まではできていない。今後の研究では、経時的な炎症性サイトカインの詳細な評価が必要と思われる。

## 5. おわりに

本研究では、血液細胞における I $\kappa$ B $\zeta$  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 $\kappa$ B $\zeta$  の働きは未だ十分に解明されていないが、今後 I $\kappa$ B $\zeta$  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 $\kappa$ B $\zeta$  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。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり，指導教官として終始多大なご指導を賜りました自治医科大学整形外科学講座 竹下 克志 教授，木村 敦 教授，自治医科大学生化学講座病態生化学部門 大森 司 教授に心から感謝申し上げます．

また研究生生活を支えてくださった自治医科大学整形外科学教室，自治医科大学生化学講座病態生化学部門の皆様には日頃から並々ならぬご尽力をいただきました．この場を借りて心より御礼申し上げます．

## 参考文献

1. Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 60:202-213, 2009.
2. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75:15-26, 1991.
3. Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6:712-724, 1994.
4. Freyermuth-Trujillo X, Segura-Urbe JJ, Salgado-Ceballos H, Orozco-Barrios CE, Coyoy-Salgado A. Inflammation: A Target for Treatment in Spinal Cord Injury. *Cells* 11, 2022.
5. Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron* 87:47-62, 2015.
6. Hellenbrand DJ, Quinn CM, Piper ZJ, Morehouse CN, Fixel JA, Hanna AS. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. *J Neuroinflammation* 18:284, 2021.
7. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71:281-299, 2011.
8. Yamazaki S, Muta T, Takeshige K. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem* 276:27657-27662, 2001.
9. Feng Y, Chen Z, Xu Y, Han Y, Jia X, Wang Z, Zhang N, Lv W. The central inflammatory regulator IkB $\zeta$ : induction, regulation and physiological functions. *Front Immunol* 14:1188253, 2023.
10. Hildebrand DG, Alexander E, Hörber S, Lehle S, Obermayer K, Münck NA, Rothfuss O, Frick JS, Morimatsu M, Schmitz I, Roth J, Ehrchen JM, Essmann F, Schulze-Osthoff K. IkB $\zeta$  is a transcriptional key regulator of CCL2/MCP-1. *J Immunol* 190:4812-4820, 2013.
11. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K, Akira S. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* 430:218-222, 2004.
12. Ohto-Ozaki H, Hayakawa M, Kamoshita N, Maruyama T, Tominaga SI, Ohmori T. Induction of IkB $\zeta$  Augments Cytokine and Chemokine Production by IL-33 in Mast Cells. *J Immunol* 204:2033-2042, 2020.
13. Shiina T, Konno A, Oonuma T, Kitamura H, Imaoka K, Takeda N, Todokoro K, Morimatsu M. Targeted disruption of MAIL, a nuclear IkappaB protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem* 279:55493-55498, 2004.
14. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushima S, Aiba S, Akira S, Ono M, Kaisho T, Muta T. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkB- $\zeta$  signaling pathway in epithelial cells

- induces Sjögren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity* 38:450-460, 2013.
15. Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269:1427-1429, 1995.
  16. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 23:635-659, 2006.
  17. Kimura A, Hsu M, Seldin M, Verkman AS, Scharfman HE, Binder DK. Protective role of aquaporin-4 water channels after contusion spinal cord injury. *Ann Neurol* 67:794-801, 2010.
  18. Joseph C, Quach JM, Walkley CR, Lane SW, Lo Celso C, Purton LE. Deciphering hematopoietic stem cells in their niches: a critical appraisal of genetic models, lineage tracing, and imaging strategies. *Cell Stem Cell* 13:520-533, 2013.
  19. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 29:13435-13444, 2009.
  20. Park J, Decker JT, Margul DJ, Smith DR, Cummings BJ, Anderson AJ, Shea LD. Local Immunomodulation with Anti-inflammatory Cytokine-Encoding Lentivirus Enhances Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Mol Ther* 26:1756-1770, 2018.
  21. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35, 2003.
  22. Francos-Quijorna I, Amo-Aparicio J, Martinez-Muriana A, López-Vales R. IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *Glia* 64:2079-2092, 2016.
  23. Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Caminiti R, Bramanti P, Cappelani A, Cuzzocrea S. Absence of endogenous interleukin-10 enhances secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. *J Neurochem* 108:1360-1372, 2009.
  24. Ha Y, Park HS, Park CW, Yoon SH, Park SR, Hyun DK, Kim EY, Park HC. Synthes Award for Resident Research on Spinal Cord and Spinal Column Injury: granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) prevents apoptosis and improves functional outcome in experimental spinal cord contusion injury. *Clin Neurosurg* 52:341-347, 2005.
  25. Huang X, Kim JM, Kong TH, Park SR, Ha Y, Kim MH, Park H, Yoon SH, Park HC, Park JO, Min BH, Choi BH. GM-CSF inhibits glial scar formation and shows long-term protective effect after spinal cord injury. *J Neurol Sci* 277:87-97, 2009.
  26. Amerio P, Frezzolini A, Feliciani C, Verdolini R, Teofoli P, De Pità O, Puddu P. Eotaxins and CCR3 receptor in inflammatory and allergic skin diseases: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2:81-94, 2003.
  27. Wang F, Baba N, Shen Y, Yamashita T, Tsuru E, Tsuda M, Maeda N, Sagara Y. CCL11 promotes migration and proliferation of mouse neural progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* 8:26, 2017.
  28. Adzemovic MZ, Öckinger J, Zeitelhofer M, Hochmeister S, Beyeen AD, Paulson A, Gillett A, Thessen Hedreul M, Covacu R, Lassmann H, Olsson T, Jagodic M. Expression of Ccl11

associates with immune response modulation and protection against neuroinflammation in rats. *PLoS One* 7:e39794, 2012.

29. Hörber S, Hildebrand DG, Lieb WS, Lorscheid S, Hailfinger S, Schulze-Osthoff K, Essmann F. The Atypical Inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\zeta$ , Controls Macrophage Interleukin-10 Expression. *J Biol Chem* 291:12851-12861, 2016.