

表 題 NLPP3 インフラマソームのアダプタータンパク質である
ASC の欠損はマウス脊髄損傷後の運動機能回復を高める

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 白 石 康 幸

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
地域医療学系専攻
精神・神経・筋骨格疾患学
整形外科学

2020 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

	ページ
1. はじめに	1
2. 実験材料と方法	4
2-1. 使用動物	
2-2. 脊髄圧挫損傷モデルの作成	
2-3. 運動機能の測定	
2-4. 免疫組織学的解析	
2-5. ウェスタンブロット法	
2-6. Real time RT-PCR	
2-7. 骨髄移植モデルの作成	
2-8. 統計学的解析	
3. 結果	10
3-1. 脊髄損傷部位では ASC タンパク質の発現が増加する	
3-2. ASC ^{-/-} マウスでは脊髄損傷後の IL-1 β の mRNA 発現が減少する	
3-3. ASC 欠損は脊髄損傷後の運動機能回復を高める	
3-4. 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	21
5. おわりに	25

謝辭	• • • • •	26
----	-----------	----

参考文献	• • • • •	27
------	-----------	----

1. はじめに

脊髄損傷は、外傷などで脊髄実質が損傷することにより損傷部以下の運動・感覚・自律神経系の麻痺を呈する疾患である。世界では、外傷性脊髄損傷の新規発生が 28 万人を超えると推定されている[1]。集学的治療が進歩し、脊髄損傷患者の生命予後は飛躍的に向上しているが、現在脊髄損傷の治療として推奨される薬物はない[2]。

脊髄損傷の病態生理は一次損傷と二次損傷の二つの段階に分けられる[3, 4]。一次損傷とは受傷外力による物理的な損傷であり、二次損傷とは損傷部位の周囲に損傷が拡大していく非物理的な損傷である(図 1)。二次損傷のメカニズムには、出血、虚血、浮腫、酸化ストレス、イオン不均衡、小胞体ストレス、神経炎症などの一連の病理学的事象が含まれている[5]。一次損傷の重症度は脊髄に加わる外力の強さによって決定されるが、二次損傷のメカニズムは受傷後数週間以内に最適な介入があれば重症度を軽減できる可能性がある[6]。

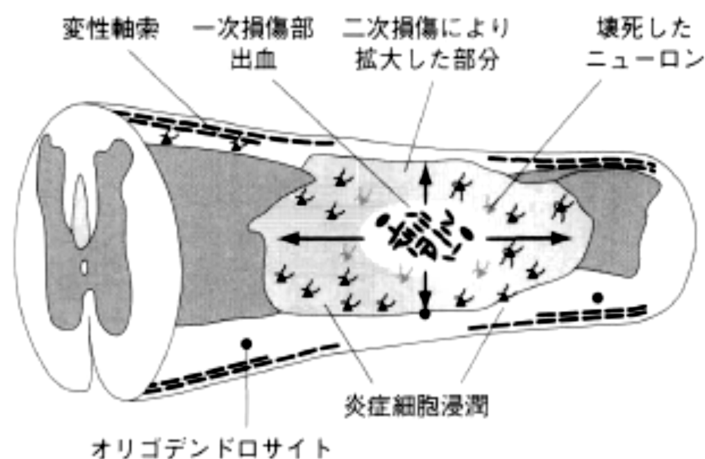


図 1 脊髄の二次損傷の模式図 (文献 7 より引用)

病原体の非存在下で生じる炎症は無菌性炎症と呼ばれ、近年注目を集めている。この無菌性炎症に、自然炎症経路の一つである NLRP3 インフラマソームが関与することが明らかになってきた。NLRP3 インフラマソームは細胞質内のタンパク複合体であり、炎症性サイトカインのインターロイキン (IL) -1β を活性型に変換し、プログラム細胞死の一つであるパイロトーシスを引き起こす [8-11]。NLRP3 インフラマソームは 3 つの構成分子からなり、パターン認識受傷体の Nod 様受容体 (NLR) である NLR family pyrin domain-containing 3 (NLR3)、アダプター分子である Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)、および Caspase-1 によって構成される (図 2)。NLRP3 インフラマソームは Caspase-1 を活性化することにより、IL-1 β の前駆体 (pro-IL-1 β) を切断して成熟型 IL-1 β へと変換し、それを細胞外に分泌することで炎症を惹起する。細胞外 ATP、ヒアルロン酸、尿酸結晶、アミロイドなどの危険信号により、この NLRP3 インフラマソームが形成される。NLRP3 インフラマソームは、痛風、偽痛風、アスベスト肺、珪肺、アルツハイマー病、メタボリック症候群、2 型糖尿病といった非感染性疾患において重要な役割をもつことが明らかになっている [8-10]。

近年、さまざまな中枢神経系障害における NLRP3 インフラマソームの重要な役割が示されている [12]。ただし、脊髄損傷後の二次損傷における NLRP3 インフラマソームの役割は完全には明らかになっていない。そこで、遺伝子操作されたマウスを用いて、NLRP3 インフラマソーム形成のアダプタータンパク質である ASC が二次損傷プロセスに与える影響について検証した。

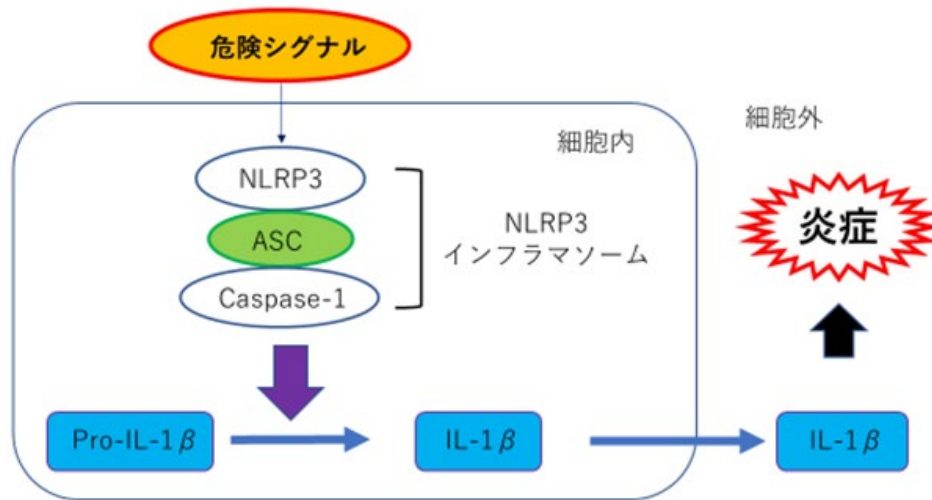


図2 NLRP3 インフラマソームの模式図

NLRP3 インフラマソームは Caspase-1 を活性化することにより、IL-1 β の前駆体 (pro-IL-1 β) を成熟型の IL-1 β にプロセッシングする。細胞外に分泌された IL-1 β は炎症を惹起する。

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施行した。実験動物として、C57BL/6J（野生型：wild-type (WT)）マウスは日本 SLC より購入した。ASC 欠損マウス（ASC^{-/-}マウス）は、谷口俊一郎先生（信州大学）の好意により提供され、実験に使用した[13]。

2-2. 脊髄圧挫損傷モデルの作成

マウスは 8-10 週齢の雌性マウスを使用した。イソフルランを使用してマウスに全身麻酔を行い、第 10 胸椎の椎弓切除を実施した。その後、Infinite Horizons impactor (Infinite Horizon, L.L.C., Lexington, KY, USA) (図 3) を使用して 60kdy の力で脊髄正中を圧挫して、脊髄圧挫損傷モデルを作成した。

Sham 手術では第 10 胸椎の椎弓切除のみ行い、脊髄圧挫損傷は行わなかった。



図 3. Infinite Horizons impactor

2-3. 運動機能の測定

運動機能の測定には Basso Mouse Scale (BMS) を用いた。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用いられている[14]。マウスのグループの種類を知らない 2 人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記録した。

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. 免疫組織学的解析

脊髄損傷後のマウスにイソフルランで麻酔を行い、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 10mlと4%パラホルムアルデヒド10mlを心臓内に注入して灌流を行った。脊髄を採取し、4%パラホルムアルデヒドで2時間固定した後、PBSに一晩浸した。翌日に組織を30%ショ糖に48時間浸し、脊髄損傷部を中心に5mmのブロックにしてから、OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) に埋没して凍結した。横断面 (厚さ10 μ m) または縦断面 (厚さ20 μ m) で連続した凍結切片を作成した。切片を0.3% Triton-Xで透過処理し、0.1Mリン酸緩衝液中の2%正常ウシ血清アルブミンでブロックし、一次抗体と4°Cで一晩インキュベートした。PBSですすいだ後、二次抗体 (Alexa 488, 594) と室温で1時間インキュベートし、DAPIを含むVECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で封入した。画像分析は蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence Co.) を使用して行った。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) を使用した。

使用した一次抗体は以下の通りである。

(抗体)	(製造元)
Anti-ASC/TMS1, Human (Rabbit)	proteintech
Anti-GFAP, mouse monoclonal	abcam
Anti-CD11b/c, mouse monoclonal	abcam
Anti-Ibal, mouse monoclonal	abcam
Anti-NeuN, mouse monoclonal	MILLIPORE
Anti-MOG (D-10), Human (Mouse)	SANTA CRUZE

2-5. ウェスタンブロット法

Control（椎弓切除のみの sham 手術）と脊髄損傷後の WT マウスの脊髄における NLRP3、ASC、Caspase-1、および IL-1 β の発現をウェスタンブロット法で確認した。sham 手術 24 時間後と脊髄損傷 24 時間後の WT マウスにイソフルランで麻酔を行い、脊髄の 5mm ブロック（損傷中心から ± 2.5 mm）を採取し、RIPA バッファーを用いてタンパク質を抽出した。10%および 12%SDS ゲルを使用した電気泳動によって溶液中のタンパク質を分離し、PVDF メンブレンに転写した。5% skim milk で 1 時間ブロッキングした後に、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β に対する各一次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。TBST（トリス緩衝生理食塩水 Tween20）で洗浄した後、メンブレンを二次抗体と室温で 1 時間インキュベートした。化学発光させたバンド強度の検出は、Quantity One ソフトウェア（Bio-Rad、Hercules、CA、USA）を使用して分析した。 β -アクチンをコントロールとして使用した。

2-6. Real time RT-PCR

脊髄損傷 24 時間後の WT マウスと ASC^{-/-}マウスにイソフルランで麻酔を行い、脊髄損傷部を含む脊髄の 5mm ブロックを採取した。ISOGEN（Nippon Gene co., Ltd., 富山）を使用して採取した脊髄ブロックより総 RNA を抽出した。cDNA 逆

転写酵素キット (Cat No. 4368813; Applied Biosystems) を使用して逆転写を行い、cDNA を合成した。Step One Plus Real Time PCR instrument (Applied Biosystems) を用いて、標準曲線やコンピューター断層撮影法を使用して、mRNA の相対量を計算した。マウスの β アクチン mRNA をコントロールとして使用した。

2-7. 骨髄移植モデルの作成

ドナーマウスの大腿骨と脛骨を取り出し、皮膚、毛、筋肉を除去した。大腿骨と脛骨の両端を切除し、PBS を急速注入することで WT マウスと $ASC^{-/-}$ マウスの骨髄細胞を採取した。赤血球は低張の ACK buffer を加えて溶血させた。骨髄細胞を PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を準備した。8 週齢のレシピエントマウス (WT マウスと $ASC^{-/-}$ マウス) に移植前に総線量 9.5Gy のガンマ線全身照射を行い、その後に頸静脈に注射して骨髄細胞 (2×10^6 cells) を移植した。

このプロトコルを使用して、以下のような計 3 種類の骨髄移植マウスを作成した。

(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
WT	$ASC^{-/-}$	BMT (WT→ $ASC^{-/-}$) マウス
$ASC^{-/-}$	WT	BMT ($ASC^{-/-}$ →WT) マウス

2-8. 統計学的解析

すべての結果データは平均値±標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で表記した。独立 2 群間の比較には t 検定を使用し、多群間の比較には一元配置分散分析を行い、事後比較には Turkey あるいは Games-Howell の方法を使用した。統計解析には、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., USA) を使用した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 脊髄損傷部位では ASC タンパク質の発現が増加する

脊髄の二次損傷に NLRP3 インフラマソームが実際に関与するかどうかを損傷した脊髄を用いてインフラマソーム関連タンパク質の発現を確認した。脊髄損傷 24 時間後に採取した WT マウスの脊髄標本を用いてウェスタンブロット分析を行った。対照は椎弓切除のみの手術 (sham 手術) 24 時間後の脊髄標本とした。分析の結果、NLRP3、ASC、および IL-1 β のタンパク質発現は sham 手術と比べ、脊髄損傷 24 時間後で増加した (図 4)。

また、脊髄損傷部位での ASC タンパク質の局在を調べるために、脊髄損傷 24 時間後に採取した WT マウスの脊髄切片を用いて二重免疫蛍光染色を行った。二重免疫蛍光染色の結果、ASC タンパク質の発現は NeuN (ニューロン)、CD11b (ミクログリア/マクロファージ)、GFAP (アストロサイト)、および MOG (オリゴデンドロサイト) の細胞成分に局在している可能性が示された (図 5)。

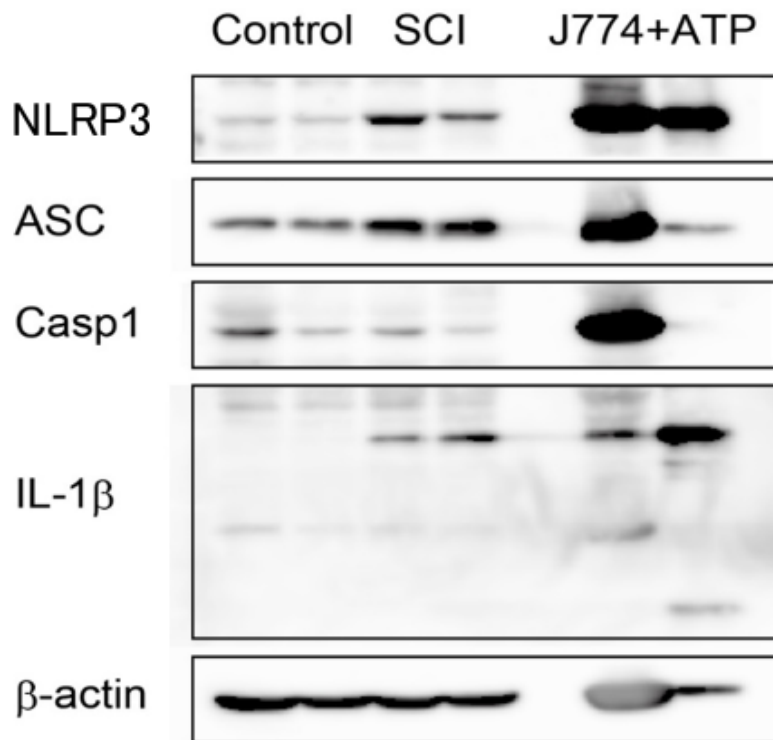


図 4. 脊髄損傷後のインフラマソーム関連タンパク質の発現

インフラマソーム関連分子に対する特異的抗体でプローブされたウェスタンブロットである。Control（第 1・2 列、sham 手術 24 時間後）と SCI（第 3・4 列、脊髄損傷 24 時間後）の WT マウスより脊髄を採取して分析した。アデノシン三リン酸 (ATP) で刺激した J774 マウスマクロファージを陽性コントロール（第 5・6 列）として使用した。β-アクトニンレベルをタンパク質負荷に対するコントロールとして使用した。sham 手術と比べ SCI では NLRP3、ASC、IL-1β のタンパク質発現は増加した。また SCI では陽性コントロールと比べ NLRP3 と IL-1β のタンパク質発現は弱かったが、ASC のタンパク質発現は強かった。

SCI は Spinal cord injury、NLRP3 は Nod like receptor (NLR) family pyrin domain-containing 3、ASC は Apoptosis-associated speck-like protein

containing a caspase recruitment domain、および Casp-1 は Caspase-1 の略語である。

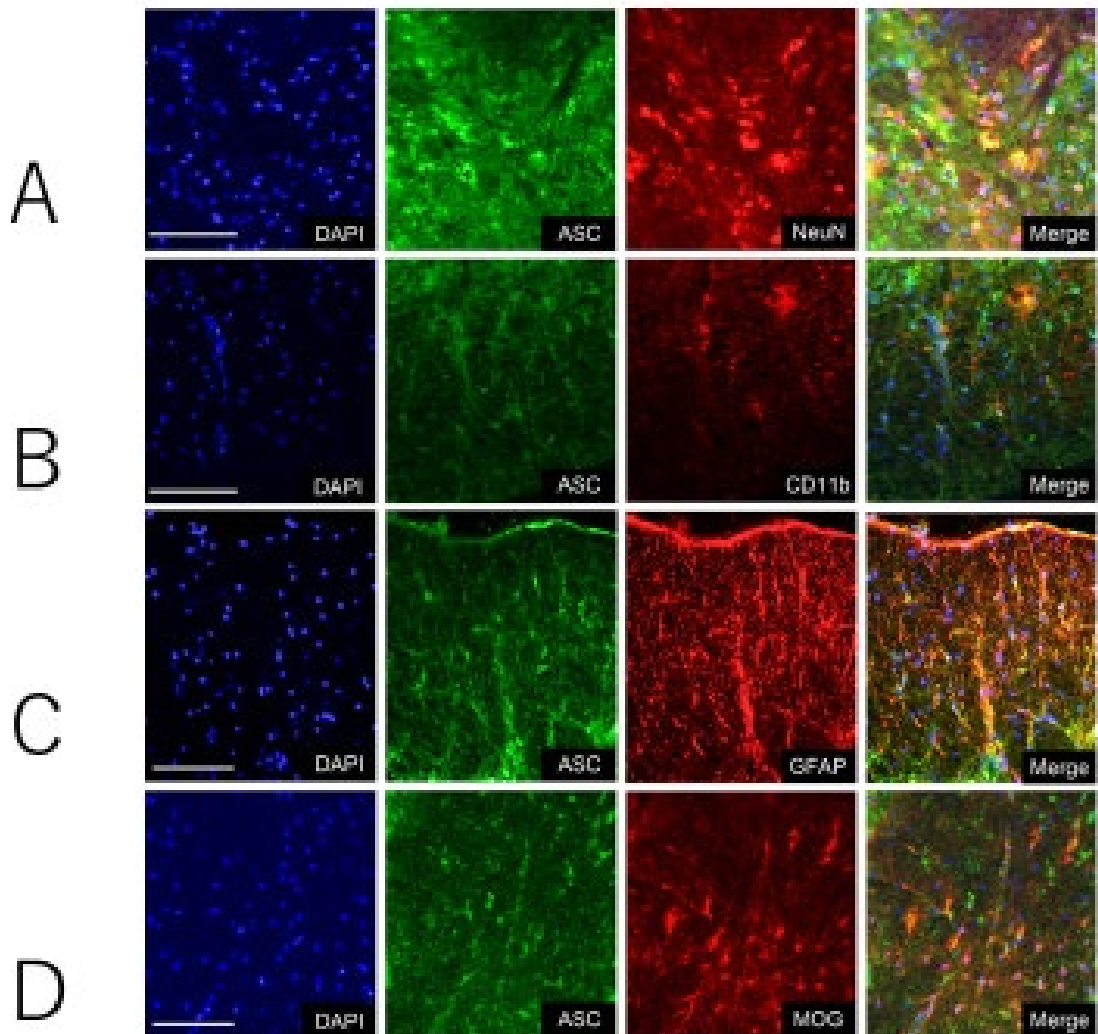


図 5. 損傷脊髄における ASC タンパク質の局在

ASC タンパク質の細胞局在を蛍光抗体法で確認した。上から 1 段目 (A) は ASC と NeuN、2 段目 (B) は ASC と CD11b、3 段目 (C) は ASC と GFAP、4 段目 (D) は ASC と MOG の二重免疫染色像である。ASC タンパク質と NeuN タンパク質、CD11b

タンパク質、GFAP タンパク質、および MOG タンパク質の多くが共発現した。

スケールバーは 100 μ m を示す。

NenN は Neuronal nuclei、CD11b は Clusters of differentiation 11b、GFAP は Glial fibrillary acidic protein、MOG は Myelin-oligodendrocyte glycoprotein の略語である。

3-2. $ASC^{-/-}$ マウスでは脊髄損傷後の IL-1 β の mRNA 発現が減少する

NLRP 3 インフラマソームのアダプタータンパク質である ASC を発現しない $ASC^{-/-}$ マウスを用いて、脊髄損傷後に炎症性サイトカイン IL-1 β の mRNA の発現を確認した。脊髄損傷 24 時間後の脊髄標本を用いて、 $ASC^{-/-}$ マウス (n = 4) と WT マウス (n = 4) の NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β の mRNA 発現を比較した。

Real time RT-PCR 分析の結果、 $ASC^{-/-}$ マウスは WT マウスと比較して、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β の mRNA 発現が有意に減少した (図 6)。

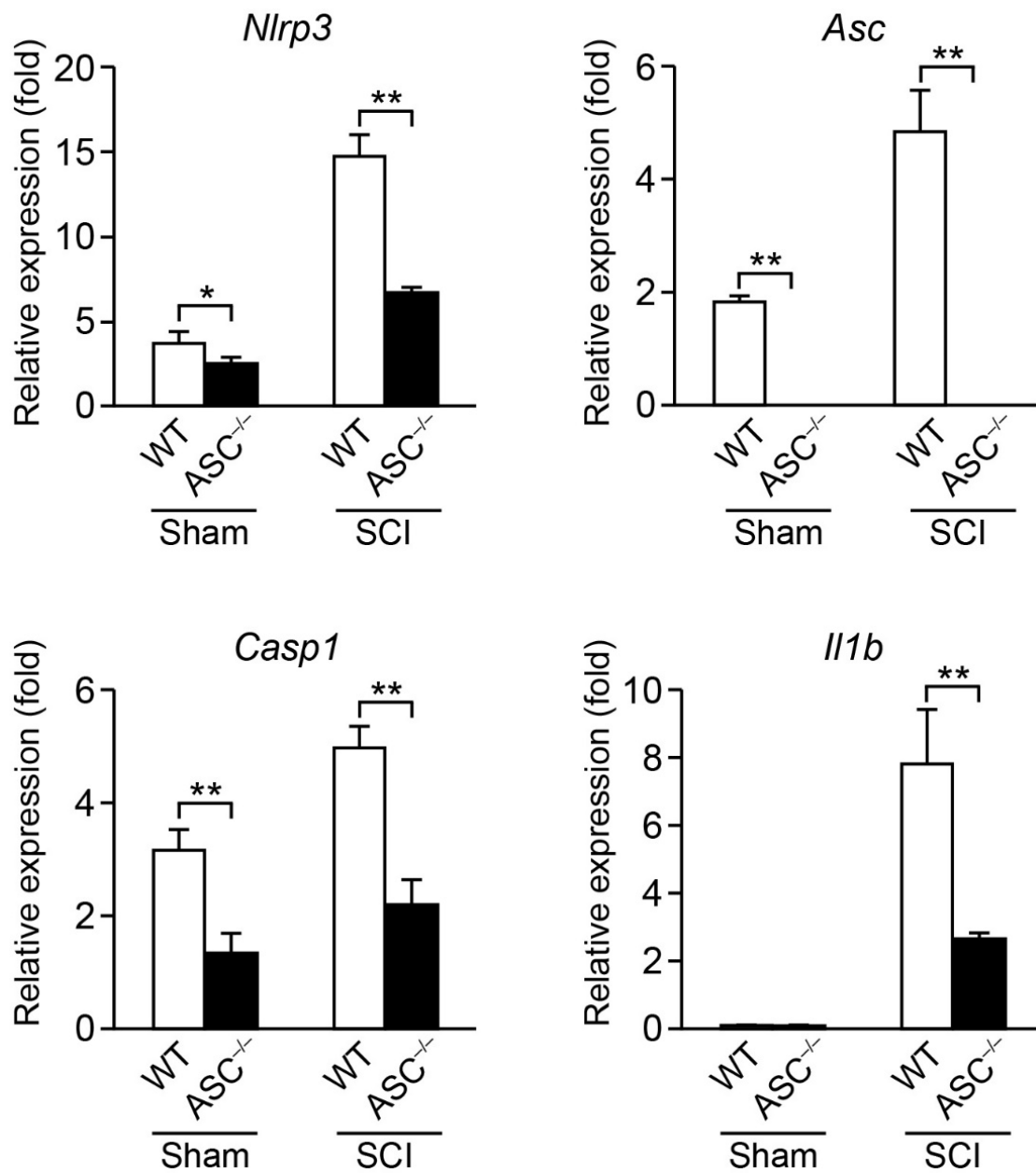


図 6. 脊髄損傷後の ASC^{-/-}マウスにおける NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β の mRNA 発現の比較

脊髄損傷 24 時間後の ASC^{-/-}マウス (n=4) と WT マウス (n=4) において、脊髄損傷後の NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β の mRNA 発現を確認した。SCI は sham と比べ、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β の mRNA 発現はそれぞれ増加した。SCI

においては、ASC^{-/-}マウスはWTマウスに比べ、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β の mRNA 発現は有意に減少した。統計処理は対応なしの t 検定で行った。★は P<0.05 であり、★★は P<0.01 である。

3-3. ASC 欠損は脊髄損傷後の運動機能回復を高める

NLRP3 インフラマソームのアダプタータンパク質である ASC を発現しない ASC^{-/-}マウスを用いて、ASC 欠損が脊髄損傷後の運動機能回復に与える影響について検証した。ASC^{-/-}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、ASC^{-/-}マウスの BMS スコアは損傷後 7 日目以降で有意に改善した (図 7A)。

治癒過程で生じる線維性瘢痕の影響を確認するため二重免疫蛍光染色で線維性瘢痕組織の面積を確認した。脊髄損傷 42 日後の二重免疫蛍光染色の結果、ASC^{-/-}マウスはWTマウスと比較して線維性瘢痕組織の面積が減少した(図 7B)。ASC^{-/-}マウス (n=4) は WT マウス (n=4) の線維性瘢痕組織の立体解析を比較した結果、ASC^{-/-}マウスの方が損傷中心部と頭側 250 μ m において線維性瘢痕組織の面積が有意に減少した (図 7C)。

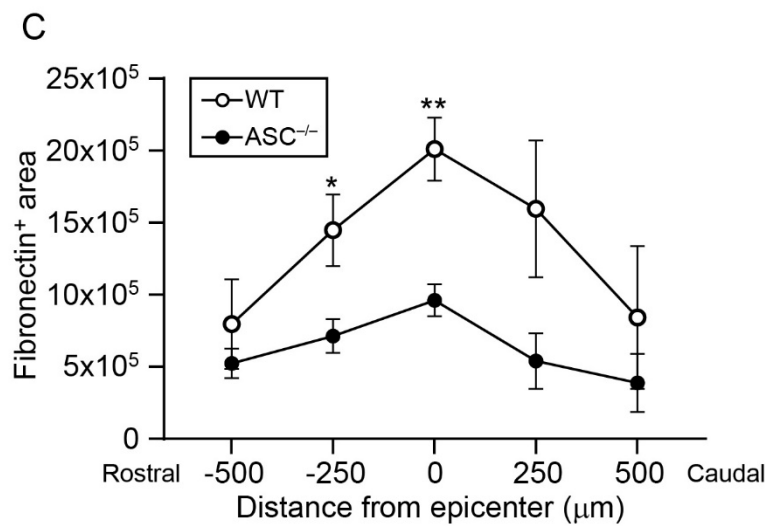
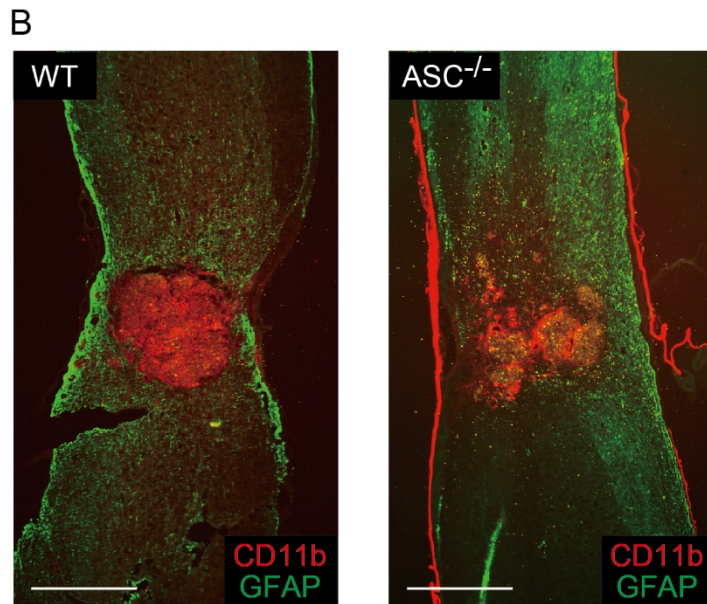
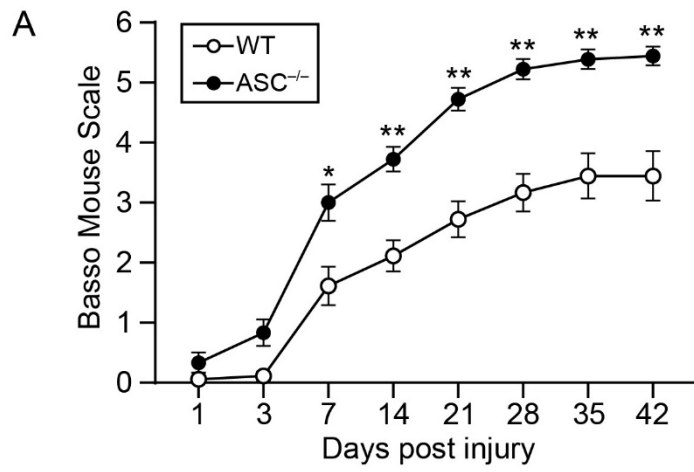


図 7. ASC 欠損はマウスの脊髄損傷後の運動機能回復を高める

- (A) BMS で測定した脊髄損傷後の後肢運動機能を、ASC^{-/-}マウス (n=8) と WT マウス (n=8) で比較した。統計処理は post-hoc Bonferroni test で行った。★は P<0.05 であり、★★は P<0.01 である。
- (B) 脊髄損傷 42 日後の線維性瘢痕組織像を ASC^{-/-}マウスと WT マウスで比較した。ASC^{-/-}マウスは WT マウスと比べて線維性瘢痕組織の面積が減少した。また、ASC^{-/-}マウスでは CD11b は損傷部位に散在する他に外膜に強く発現している。一方 WT マウスでは CD11b は損傷部位に塊のように集約し、損傷部位の外膜に GFAP が強く発現している。
- (C) B の線維性瘢痕組織の立体解析を、ASC^{-/-}マウス (n=4) と WT マウス (n=4) で比較した。損傷部位中心と 250 μ m 頭側では有意な差を認めた。統計処理は対応なしの t 検定で行った。★は P<0.05 であり、★★は P<0.01 である。

3-4. 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

ASC タンパク質の発現抑制が NLRP3 インフラマソームの形成に影響を与え、IL-1 β を介した二次損傷を軽減する可能性が考えられる。そこで骨髄抑制マウスに ASC タンパク質を発現できない骨髄細胞を移植することで、ASC タンパク質が脊髄損傷後の運動機能回復に与える影響を検証した。WT マウスの骨髄細胞を ASC^{-/-}マウスに骨髄移植した BMT (WT \rightarrow ASC^{-/-}) マウス (n=8)、ASC^{-/-}マウスの骨髄細胞を WT マウスに骨髄移植した BMT (ASC^{-/-} \rightarrow WT) マウス (n=8)、および

WT マウスの骨髄細胞を WT マウスに骨髄移植した BMT (WT→WT) マウス (n=8) を使用した。BMT (WT→ASC^{-/-}) マウスと BMT (WT→WT) マウスを比較した結果、BMT (WT→ASC^{-/-}) マウスの方が有意に良好な BMS スコアであり、脊髄損傷後 7 日目以降は 28 日目を除き、群間に有意差を認めた (図 8A)。同様に、BMT (ASC^{-/-}→WT) マウスは、BMT (WT→WT) マウスよりも有意に良好な BMS スコアを脊髄損傷後 7 日目から 21 日目に認めた。(図 8B)。

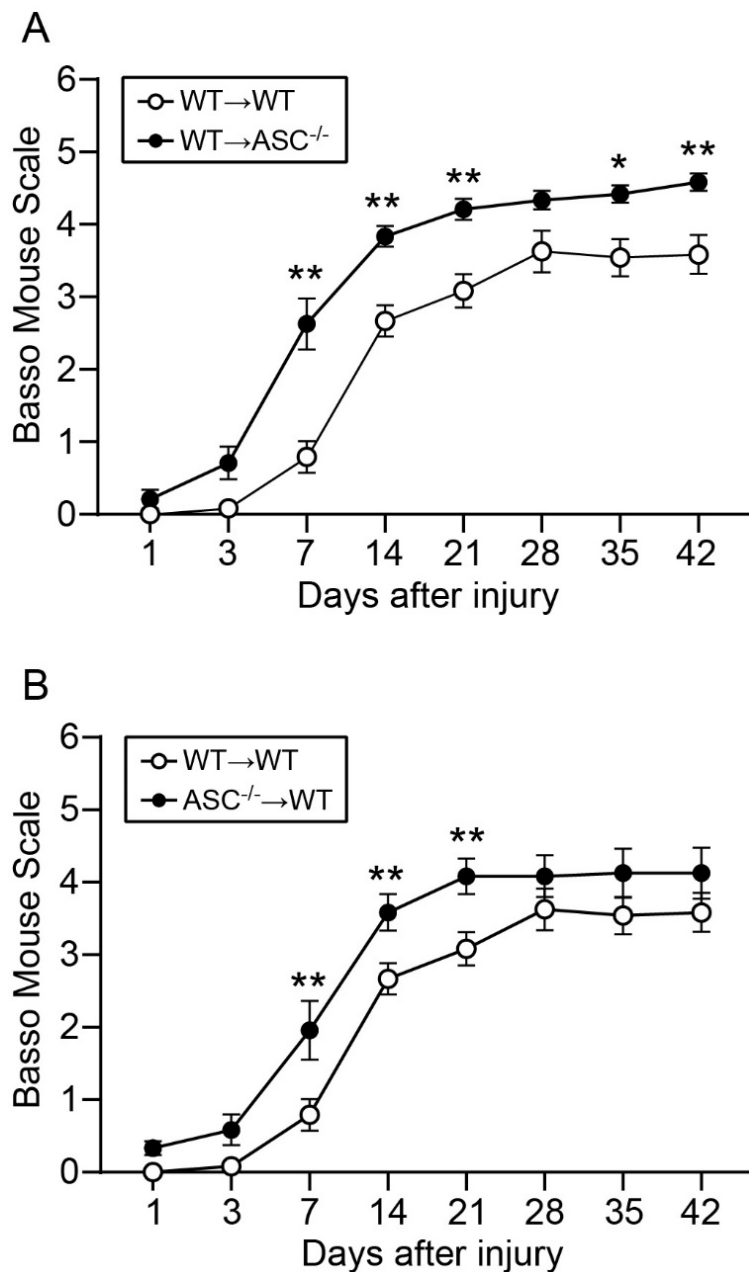


図 8. 骨髄移植マウスの脊髄損傷後の運動機能回復

- (A) BMT (WT→ASC^{-/-}) マウス (n=8) と BMT (WT→WT) マウス (n=8) で、BMS による運動機能を比較した。脊髄損傷から 3 日目までは群間に差を認めないが、28 日目以外は 7 日目以降の群間に有意差を認めた。
- (B) BMT (ASC^{-/-}→WT) マウス (n=8) と BMT (WT→WT) マウス (n=8) で、

BMS による運動機能を比較した。脊髄損傷から 3 日目までと 28 日目から 42 日目までは群間に差を認めないが、7 日目から 21 日目までは群間に差を認めた。

統計処理は post-hoc Bonferroni test で行った。★は $P<0.05$ であり、★
★は $P<0.01$ である。

4. 考察

本研究では、ASC^{-/-}マウスを使用して脊髄損傷の二次損傷メカニズムにおける NLRP3 インフラマソームのアダプタータンパク質である ASC の役割を調べた。本研究の主要な発見は、1) 脊髄損傷後の NeuN (ニューロン)、CD11b (ミクログリア/マクロファージ)、GFAP (アストロサイト)、MOG (オリゴデンドロサイト) の細胞成分で ASC タンパク質が発現している可能性が示されたこと、2) ASC 欠損により脊髄損傷後の運動機能回復が高まり、炎症性サイトカイン IL-1 β の mRNA 発現が有意に低下することが分かったこと、3) 骨髄由来細胞の ASC 欠損により一過性ではあるが脊髄損傷後の運動機能が有意に改善することが分かったこと、である。これらの結果は、ASC に依存する NLRP3 インフラマソームの形成が脊髄損傷後の二次損傷に重要な役割を果たすことを示している。

以前の報告と一致して、損傷脊髄において NLRP3 インフラマソーム関連タンパク質の NLRP3、ASC、IL-1 β の増加が確認された[15, 16]。損傷脊髄の免疫組織学的解析では、ASC タンパク質の発現がニューロン、ミクログリア/マクロファージ、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの細胞成分に局在している可能性が示された。ミクログリア/マクロファージおよびアストロサイトは内因性および外因性の傷害に対する先天性免疫応答に不可欠な役割を果たすことを考えると、これらの細胞における ASC の発現は論理的である[17]。しかし、一般的には免疫機能と関係のないニューロンやオリゴデンドロサイトの細胞成分に ASC タンパク質の発現が局在する可能性が示された。この結果は、脊髄損傷の二次損傷に NLRP3 インフラマソームを介したプログラム細胞死であるパイロトー

シスの関与が示唆される。実際、パイロトーシスは、パーキンソン病やアルツハイマー病、多発性硬化症などのさまざまな神経変性疾患における神経細胞死のメカニズムに関与していることが示唆されている[18, 19]。さらに、McKenzie らによる最近の報告[20]では、マウスの多発性硬化症モデルにおいてインフラマソームを介したパイロトーシスが、炎症性脱髄の主要なメカニズムとして作用することが実証された。脊髄損傷後のニューロンやオリゴデンドロサイトで増加するインフラマソーム関連タンパク質の役割を明らかにするために、今後さらなる研究が必要である。

本研究では、ASC が欠損した損傷脊髄において炎症性サイトカイン IL-1 β の mRNA 発現が有意に減少した。IL-1 β は、Th1 細胞の反応を促進する炎症誘発作用において中心的な役割を果たすため[21, 22]、ASC の欠損は脊髄損傷後の炎症カスケードを効果的に抑制する可能性がある。これらの所見と一致して、ASC^{-/-} マウスは WT マウスと比較して後肢運動機能が有意に改善され、脊髄損傷部の炎症性瘢痕病変が有意に減少した。これらの結果は、ASC が脊髄損傷後の二次損傷の進行に重要な役割を果たすことを示している。

損傷部位に浸潤する血液由来の免疫細胞は、脊髄損傷後の二次損傷の調節に重要な役割を果たしていることが実証されている[23, 24]。多くの研究が、骨髄由来マクロファージの役割に焦点を当てており、役割によって M1 型と M2 型に大別されている。古典的に活性化された炎症性ミクログリア/マクロファージ (M1) と活性化された抗炎症性マクロファージ (M2) である[24]。今回の骨髄移植実験では、骨髄由来細胞の ASC 欠損により脊髄損傷後に一過性であるが有意に運動機能が改善した。この結果は、M1 マクロファージを含む免疫細胞が、二次損傷の初期段階で ASC 依存性の NLRP3 インフラマソーム形成を介して、損

傷部位周辺の脊髄組織に有害な影響を与えることを示唆している。しかし、神経炎症プロセスは再生過程をサポートする点では有益であるが、局所炎症経路を増幅する点で有害であるため、両刃の剣として機能する[25]。脊髄損傷後の運動機能回復に対する骨髄由来細胞の浸潤の影響を判断するには、より詳細な分析が必要である。

BMT (WT→ASC^{-/-}) マウスと BMT (WT→WT) マウスの脊髄損傷後の運動機能回復の比較では、脊髄常在細胞の ASC 欠損により脊髄損傷後に有意に運動機能が改善した。この結果は ASC タンパク質が脊髄常在細胞のミクログリアで発現しており、ASC 欠損により常在ミクログリアの機能に変化が生じた可能性が示唆される。さらに、損傷脊髄のニューロン、オリゴデンドロサイトの細胞成分に ASC タンパク質が発現している可能性が示されており、ASC 欠損は NLRP3 インフラマソームを介した細胞死の抑制を通じて、神経細胞の生存を助けている可能性も示唆される。脊髄損傷後の二次損傷メカニズムにおけるパイロトーシスの役割を調べるためには、さらなる研究が必要である。

いくつかの研究は、NLRP3 インフラマソームの構成分子を調節することが脊髄損傷の新しい治療戦略になりうることを示している。de Rivero Vaccari らは、抗 ASC 中和抗体の投与により、ラットの脊髄損傷後に有意な組織保護と機能改善がもたらされることを実証している。私たちが知る限りでは、ASC の薬理学的阻害剤の報告はない。Jiang らは、NLRP3 阻害剤がマウスの脊髄損傷後の解剖学的損傷を軽減し、運動機能回復を高めることを示している[26]。NLRP3 および Caspase-1 の阻害剤は脊髄損傷後の治療薬の候補となりうる[27]。

我々の研究結果では、脊髄常在細胞における NLRP3 インフラマソーム活性の調節の重要性が示されており、ASC を標的にした効果的な治療戦略を開発するた

めには薬物輸送システムは重要な因子となりうる。

結論として、ASC タンパク質の発現は脊髄損傷後のニューロン、ミクログリア/マクロファージ、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトの細胞で増加している可能性が示され、ASC 欠損により炎症性サイトカイン IL-1 β の mRNA 発現は有意に減少し、マウスの脊髄損傷後の運動機能は有意に改善することが示された。また骨髄由来細胞や脊髄常在細胞における ASC 依存性の NLRP3 インフラマソームの形成は、脊髄損傷の二次損傷メカニズムにおいて重要な役割を果たすことが示された。

5. おわりに

本研究により、ASC 依存性の NLRP3 インフラマソーム形成が脊髄損傷の二次損傷のメカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが示された。

しかし、ASC 以外のインフラマソーム構成分子である NLRP3 および Caspase-1 の役割や NLRP3 インフラマソームを介したパイロトーシスの役割についてはさらなる研究が必要である。NLRP3 インフラマソームの研究が進むことにより、脊髄損傷の二次損傷に対する新しい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、ご指導を頂いた自治医科大学整形外科学 竹下克志教授、自治医科大学分子病態治療研究センター炎症・免疫研究部 高橋将文教授、自治医科大学学生化学講座病態生化学部門 大森司教授に深く感謝致します。

また研究生生活を支えて下さった自治医科大学整形外科学教室、自治医科大学分子病態治療研究センター炎症・免疫研究部、自治医科大学学生化学講座病態生化学部門の皆様に並々ならぬご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Kumar, R., Lim, J., Mekary, RA., Rattani, A., Dewan, MC., Sharif, SY., Osorio-Fonseca, E., Park, KB., Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. *World Neurosurg.* 113: 345-363, 2018.
2. Hurlbert, R.J., Hadley, MN., Walters, BC., Aarabi, B., Dhall, SS., Gelb, DE., Rozzelle, CJ., Ryken, TC., Theodore, N., Pharmacological therapy for acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 76: 71-83, 2015.
3. Tator, C.H. and M.G. Fehlings, Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 75: 15-26, 1991.
4. Dusart, I. and M.E. Schwab, Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci,* 6: 712-24, 1994.
5. Alizadeh, A., S.M. Dyck, and S. Karimi-Abdolrezaee, Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol.* 10: 282, 2019.
6. Oyinbo, C.A., Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 71: 281-99, 2011.
7. 岡田誠司, 中村雅也, 岡野栄之. 【サイトカインの多彩な機能と臨床応用 免疫・造血・代謝・発生・神経の調節機構と疾患治療への最新アプローチ】 脊髄損傷とサイトカイン. *実験医学*, 23, 3157-3163, 2005.
8. Davis, BK., Wen, H., Ting, JP., The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 29: 707-735, 2011.
9. Chen, GY., Nunez, G., Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 10: 826-837, 2010.
10. Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J., The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 27: 229-265, 2009.
11. Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R., Nunez, G., The

- inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 10: 241-7, 2009.
12. Mortezaee, K., Khanlarkhani, N., Beyer, C., Zendedel, A., Inflammasome: Its role in traumatic brain and spinal cord injury. *J Cell Physiol*, 233: 5160-5169, 2018.
 13. Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., Kashima, Y., Usui, F., Morimoto, H., Izawa, A., Takahashi, Y., Masumoto, J., Koyama, J., Hongo, M., Noda, T., Nakayama, J., Sagara, J., Taniguchi, S., and Ikeda, U., Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 123: 594-604, 2011.
 14. Basso, D.M., 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: 635-59, 2006.
 15. de Rivero Vaccari, J.P., Lotocki, G., Marcillo, AE., Dietrich, WD., Keane, RW., A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury. *J Neurosci*, 28: 3404-14, 2008.
 16. Yanagisawa, S., Katoh, H., Imai, T., Nomura, S., Watanabe, M., The relationship between inflammasomes and the endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord. *Neurosci Lett*, 705: 54-59, 2019.
 17. de Rivero Vaccari, J.P., Bastien, D., Yurcisin, G., Pineau, I., Dietrich, WD., De Koninck, Y., Keane, RW., Lacroix, S., P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J Neurosci*, 32: 3058-66, 2012.
 18. Lin, W.P., Xiong, GP., Lin, Q., Chen, XW., Zhang, LQ., Shi, JX., Ke, QF., Lin, JH., Heme oxygenase-1 promotes neuron survival through down-regulation of neuronal NLRP1 expression after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*, 13: 52, 2016.
 19. Voet, S., Srinivasan, S., Lamkanfi, M., van Loo, G., Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO MOL MED*, 11: 10248, 2019.
 20. McKenzie, B.A., Mamik, MK., Saito, LB., Boghoozian, R., Monaco, MC., Major, EO., Lu, JQ., Branton, WG., Power C., Caspase-1 inhibition

- prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: 6065–6074, 2018.
21. Bhat, R.V., DiRocco, R., Marcy, VR., Flood, DG., Zhu, Y., Dobrzanski, P., Siman, R., Scott, R., Contreras, PC., Miller, M., Increased expression of IL-1beta converting enzyme in hippocampus after ischemia: selective localization in microglia. *J Neurosci*, 16: 4146–54, 1996.
 22. Dinarello, C.A., Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*, 201: 1355–9, 2005.
 23. Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallieres, N., Lessard, M., Janelle, ME., Vernoux, N., Trebbly, ME., Fuehrmann, T., Shoichet, MS., Lacroix, S., Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat Commun*, 10: 518, 2019.
 24. Kong, X. and J. Gao, Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *J Cell Mol Med*, 21: 941–954, 2017.
 25. Zendedel, A., Monnink, F., Hassanzadeh, G., Zaminy, A., Ansar, MM., Habib, P., Slowik, A., Kipp, M., Beyer, C., Estrogen Attenuates Local Inflammasome Expression and Activation after Spinal Cord Injury. *Mol Neurobiol*, 55: 1364–1375, 2018.
 26. Jiang, W., li, M., He, F., Zhou, S., Zhu, L., Targeting the NLRP3 inflammasome to attenuate spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation*, 14: 207, 2017.
 27. Zahid, A., Li, B., Kombe, AJK., Jin, T., Tao, J., Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol*, 10: 2538, 2019.