

氏 名	白 石 康 幸
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 593 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	NLRP3 インフラマソームのアダプタータンパク質である ASC の欠損はマウス脊髄損傷後の運動機能回復を高める
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 間 藤 卓 (委 員) 准教授 森 田 光 哉 准教授 佐 藤 正 章

論文内容の要旨

1 研究目的

脊髄損傷は、運動麻痺や感覚障害、神経障害性疼痛、神経性排尿障害など広範囲な身体機能障害を生じ、重篤な後遺障害を残す。しかし、脊髄損傷に推奨される薬物治療はない。

脊髄損傷の病態生理には、機械的損傷による一次損傷と生体反応により組織障害が拡大する二次損傷がある。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る。一次損傷の重症度は外力の強さにより決定されるが、二次損傷は受傷後数週間以内に適切な治療介入があれば重症度を軽減できる可能性がある。

病原体の非存在下で生じる無菌性炎症に、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り注目を集めている。NLRP3 インフラマソームは、Nod 様受容体である Nod-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3)、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細胞質内の蛋白質複合体であり、強力な炎症性サイトカイン IL1- β を活性型に変換して炎症惹起に関与する。

近年、様々な中枢神経障害における NLRP3 インフラマソームの重要な役割が示されている。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分子である ASC が脊髄損傷の二次損傷に与える影響について検証した。

2 研究方法

野生型 (WT) マウスと ASC 欠損 (ASC^{-/-}) マウスを用いて脊髄損傷モデルを作成した。

損傷脊髄における NLRP3 インフラマソーム関連タンパク質の発現を確認するために、WT マウスの脊髄損傷 24 時間後と Sham 手術 24 時間後の脊髄標本を用いてウェスタンブロット法を行った。また、ASC タンパク質の局在を調べるために、WT マウスの脊髄損傷 24 時間後の脊髄切片の二重免疫蛍光染色を行った。

次に、WT マウスと ASC^{-/-} マウスの脊髄損傷 24 時間後の脊髄標本を用いて、Real time RT-PCR を行

い、炎症性サイトカインIL-1 β のmRNA発現を比較した。

WTマウスとASC^{-/-}マウスの脊髄損傷後42日間の運動機能の測定と脊髄損傷42日後の脊髄の組織学的解析を行い、ASCの欠損が脊髄損傷後の二次損傷に与える影響について検証した。

最後に、WTマウスとASC^{-/-}マウスを用いた骨髄移植（BMT）実験を行い、骨髄由来細胞が脊髄損傷の二次損傷に与える影響について検証した。

3 研究成果

ウェスタンブロット分析の結果、Sham手術と比べ脊髄損傷後の脊髄ではNLRP3、ASC、およびIL-1 β の蛋白質発現が増加した。WTマウスの脊髄損傷24時間後の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。

Real time RT-PCR分析の結果、ASC^{-/-}マウスはWTマウスと比較して炎症性サイトカインIL-1 β のmRNA発現は有意に減少した。

ASC^{-/-}マウスとWTマウスの脊髄損傷後42日間の運動機能を比較した結果、ASC^{-/-}マウスの方が有意に運動機能が改善した。脊髄損傷42日後の脊髄標本の組織学的解析の結果、ASC^{-/-}マウスの方が線維性瘢痕組織の面積が減少した。

骨髄移植実験では、BMT（WT \rightarrow ASC^{-/-}）マウスとBMT（WT \rightarrow WT）マウスの運動機能の比較の結果、BMT（WT \rightarrow 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。BMT（ASC^{-/-} \rightarrow WT）マウスとBMT（WT \rightarrow WT）マウスの運動機能の比較の結果、BMT（ASC^{-/-} \rightarrow WT）マウスの方が有意に良好なBMSスコアを脊髄損傷後7日目から21日目に認めた。

4 考察

損傷脊髄のASCタンパク質の発現は、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す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しており、これらの細胞でASCが発現していることは論理的である。しかし、免疫機能とは関係のないニューロンやオリゴデンドロサイトでASCタンパク質が発現しており、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が関与していることを示唆している。

ASC^{-/-}マウスでは、炎症性サイトカインIL-1 β のmRNA発現が減少し、脊髄損傷後の運動機能が改善した。この結果より、ASCは脊髄損傷の二次損傷の進行に重要な役割を果たすことが示された。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、骨髄由来マクロファージ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ていることを示唆している。また脊髄常在細胞の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の欠損により脊髄常在細胞のミクログリアの機能変化が生じた可能性を示唆している。

5 結論

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内で増加している可能性が示され、ASC 欠損により IL-1 β の mRNA 発現は減少し、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が脊髄損傷の二次損傷において重要な役割を果たすことが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文において、筆者は、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インフラマソームのアダプター蛋白質である ASC の役割を調べた。

本研究により、

- 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 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促進され、また炎症性サイトカインである IL-1 β の mRNA 発現が有意に低下することが判明したこと。
- 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差をもって改善することが明らかとなったこと。

などが明らかとなった。

これらの結果は、意義深く、特に ASC に依存する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おり、二度にわたる審査により、当初指摘されていた、考察において仮説に仮説を重ねる、屋上屋を架す論理展開は改善され、修正論文においては実験によって見出された事実とそこから導き出される適切な考察が展開されている。

ASC に依存する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は、今後これをコントロールする手法が開発できれば、脊髄損傷後の治療、特に後遺症の軽減および回復に大いに貢献することが可能となる。

以上の事から、本研究によりあらたに見出された知見は貴重な成果であり、科学・医学の発展に寄与するところが大きい。

最終試験の結果の要旨

本論文において、筆者は、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インフラマソームのアダプター蛋白質である ASC の役割を調べた。

本研究により、

- 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 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促進され、また炎症性サイトカインである IL-1

β の mRNA 発現が有意に低下することが判明したこと。

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差をもって改善することが明らかとなったこと。

などが明らかとなった。

これらの結果は、意義深く、特に ASC に依存する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おり、修正論文においては実験によって見出された事実とそこから導き出される適切な考察が展開されている。

ASC に依存する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は、今後これをコントロールする手法が開発できれば、脊髄損傷後の治療、特に後遺症の軽減および回復に大いに貢献することが可能となる。以上のことから、本研究によりあらたに見出された知見は貴重な成果であり、科学・医学の発展に寄与するところが大である。

また博士学位論文審査委員会にて行ったプレゼンと試問では、研究成果について理論的且つ内容が容易に理解できる構成でプレゼンテーションを行い、種々の質問に対して的確な判断で審査委員の納得が得られる説明を行い、研究への熱意も感じられた。よって申請者が自立して研究活動を行うに十分な能力と学識を有すると判断された。以上を総合し、本論文の審査ならびに最終試問の結果から、博士(医学)の学位を授与することを適当と認めた。