

東海大学大学院令和 2 年度博士論文

損傷脊髄における、
インフラマソーム構成タンパクの発現・
小胞体ストレス応答との関連

指導 渡辺 雅彦 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

柳澤 聖

- ・この学位申請論文は、Neuroscience Letters に掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- ・Neuroscience Letters に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

総括

【目的】 脊髄損傷後、オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）は増殖するが、その多くは分化することなく細胞死へ至る。その一因として、OPC が小胞体（ER）ストレスに対して脆弱であることが挙げられ、薬剤で ER ストレス応答能を増強すると OPC のアポトーシスは抑制され、成熟オリゴデンドロサイトに分化することをわれわれは報告してきた。近年、インフラマソームを介した細胞死が注目されており、他分野で ER ストレスによるインフラマソームの活性化が報告されている。脊髄損傷におけるインフラマソームの関連を調査するために、損傷脊髄におけるインフラマソーム構成タンパクの発現を調査した。

【方法】 10 週齢雌 SD ラットで IH-Impactor（LI 群：100kdyne，HI 群：200kdyne）を用いて胸髄圧挫損傷モデルを作成し、損傷後 1，3，7，14 日に脊髄を摘出し凍結切片を作成した。インフラマソーム構成タンパクのマーカー（NLRP3，ASC，Caspase-2）と各種細胞マ

ーカー（NG2, GFAP, NeuN）を用いて蛍光二重免疫染色を施行し、細胞種ごとのインフラマソーム構成タンパクの発現を比較検討した。

また損傷後 1, 3, 7, 14 日に損傷脊髄を損傷中心部から上下へ 2.5mm ずつの 5mm 部分を摘出し、インフラマソーム構成タンパクのマーカー（NLRP3, ASC, Caspase-2, TXNIP）を用いて、western blot を行なった。3 群間での NLRP3、caspase2、ASC、TXNIP の発現を、経時的に比較、検討した。

【結果】損傷後 1, 3, 7 日の OPC における NLRP3, ASC, Caspase-2 の発現率は、損傷群が非損傷群と比較し有意に高かった ($P < 0.01$)。また損傷後 1 日における OPC での NLRP3, ASC, Caspase-2 の発現率は、アストロサイトと比較して有意に高値を示した ($P < 0.01$)。損傷強度別の評価では、損傷後 1 日で OPC における ASC 発現率は HI 群が LI 群より有意に高かった ($P < 0.05$)。

Western Blot では、損傷群（LI 群、HI 群）における NLRP3 の発現は、sham 群に比べて、損傷後 1, 3, 7 日目において優位に高値を示した ($P < 0.01$)。caspase2, ASC の発現も、同様に、sham 群に比べて、損傷後 1, 3, 7 日目において優位に高値を示した ($P < 0.01$)。しかし LI 群と HI 群における比較では、両者に有意な差は認めなかった。TXNIP の発現は、損傷後 1 日目と 3 日目において、LI 群 HI 群の両群において、sham 群と比較し有意に高値を示した。7 日目と 1

4 日目には低値となった． LI 群と HI 群の間には有意な差はなかった．

【考察および結論】 損傷脊髄においてインフラマソーム構成タンパクの発現は、亢進していた． これはすでに報告されている結果と矛盾ない結果であった． 損傷強度による比較では、有意差はなかった． 損傷強度が大きくても、小さくても、インフラマソームは活性化されるものと考えている．

また、細胞種ごとの比較では、OPC ではインフラマソーム構成蛋白の発現が高く、アストロサイトでは発現が低値であった． 我々はこれまで、OPC は小胞体ストレス応答に対し、脆弱性があることを示してきたが、OPC はインフラマソームを介した細胞死に対しても脆弱性を有し、またアストロサイトはインフラマソームを介した細胞死に対しても抵抗性があることが示唆された． アストロサイトがインフラマソームを介した細胞死に対しても抵抗性があることは、アストロサイトが脊髄損傷後も生存し、グリア瘢痕を形成することと関連がある可能性がある． 脊髄損傷後の炎症反応を契機にアストロサイトがグリア瘢痕を形成することが報告されている． (F Leal 2011) しかし、アストロサイトにおいても、インフラマソーム構成蛋白の発現が全くないわけではなく、損傷後 3 日目には有意差をもって高値を示した． OPC と比較すれば少ないが、アスト

ロサイトにおいても、インフラマソームを介した細胞死は認められると考える。また、TXNIP は ER stress 経路とインフラマソーム経路の重要な接続因子であると考えられている。(Shin 2015,Zhou 2010) TXNIP は ER stress 経路の PERK と IRE1 α の経路で誘導され、NLRP3 インフラマソームを介して、caspase-1 を活性化し、IL-1 β を分泌し、pyroptosis を引き起す。(Oslowski 2013) 損傷初期の脊髄においても TXNIP 発現は亢進しており、脊髄損傷の場合においても ER stress 経路とインフラマソーム経路の関連性が示唆された。この結果は、脊髄損傷の 2 次損傷をターゲットとした治療においても、ER stress 経路を抑制するということは、インフラマソーム経路の細胞死も抑制できるという可能性も示唆していると考ええる。今後もさらなる検討が必要である。

研究の背景

本邦における脊髄損傷患者は 10 万人以上おり、年間 5000 人が受傷している 1)。以前は交通外傷や転落等の高エネルギー外傷での受傷の割合が高かったが、近年では高齢者の転倒などの軽微な外傷による受傷機転が増加しており、超高齢社会である本邦では、大きな問題となってきた。特に、頸髄高位での損傷が増加しており、四肢体幹の機能障害を来すことで著明な ADL 低下を引き起こしている。中枢神経系である脊髄

組織は、他の臓器と異なり再生能力が低く、この組織を再生・修復し、機能を改善させることは難しい。しかし、中枢神経系は、適切な環境が整えば再生することが示唆されており 2)、近年脊髄損傷に対する治療は、種々の幹細胞移植法や薬物療法、リハビリテーションなど様々な方法が研究されている 3)。骨髄間質細胞移植 4)や顆粒球コロニー刺激因子の投与 5)など一部の研究では臨床試験へと移行し、治療確立が現実味をおびてきている。われわれは、薬物療法による損傷脊髄に対する損傷軽減や修復、再生促進に着目し、研究をすすめている。

外傷性脊髄損傷は、物理的損傷による一次傷害と、その後、遅発性に起こる損傷部の拡大である二次傷害に大別される。二次傷害の一つがアポトーシスであり 6, 7)、特に、オリゴデンドロサイトのアポトーシスは損傷後数時間から数週後まで持続されると報告されており 6-9)、これが一次傷害から生存した軸索の脱髄進行に関連している 8, 10, 11)。また、損傷部周囲でオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cells : OPC) は増殖するものの、そのほとんどは成熟オリゴデンドロサイトへと分化することなくアポトーシスにより消失しその後の再髄鞘形成は得られない 12, 13)。この OPC アポトーシスの原因として、Fas リガンドを介した extrinsic pathway、ミトコンドリア異常を介した intrinsic pathway、小胞体

(endoplasmic reticulum : ER) ストレス経路があり 14)、多発性硬化症 15)、アルツハイマー病やパーキンソン病 16)で遅発性細胞死の要因として報告されている。

我々はこの小胞体ストレス経路に着目した。損傷脊髄内で細胞に組織アシドーシスや電解質恒常性の破綻といったストレスが加わると、小胞体内に異常蛋白(unfolded protein)が蓄積し、これが引き金となり小胞体内での小胞体ストレス経路が活性化し、最終的にアポトーシス促進的に働く C/EBP homologous transcription factor protein(CHOP)を介して細胞死へと至る。また、この小胞体ストレスに対し細胞保護的に働く小胞体シャペロン glucose-regulated protein 78 (GRP78)が知られている。OPC が小胞体ストレスにより CHOP と caspase-12 の発現を誘導し、Bax と Bcl-2 のバランスが変化を起こし、アポトーシスを起こすことが報告されている。また OPC のアポトーシスにより、再髄鞘化が阻害され、脊髄損傷のダメージが広がることも報告されている。

我々も、ラット脊髄損傷モデルを用いて、細胞種 (OPC、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ニューロン) ごとの脊髄損傷後の小胞体ストレス関連蛋白の発現を免疫組織学的に評価した。結果、OPC の GRP78 発現は他細胞種と比較して低く、また CHOP は対照的に発現が高いという結果であり、OPC の小胞体ストレス耐性が

他細胞種と比較して低く、そのことが2次損傷におけるOPCのアポトーシス、さらに脊髄損傷後の再髄鞘形成障害の一因となっている可能性が示唆された。

また、近年細菌感染の場で、マイクログリアやマクロファージの炎症性タンパク複合体インフラマソームの集積により、IL-1 β やIL-18の活性化、さらにこれらによるcaspase1,2の活性化に伴うミトコンドリアの傷害からのピロトーシスが着目されている。損傷脊髄においてもNLRP3を初めとするインフラマソーム集積が悪化因子であることが2015年に報告された。また同年Shinらは、細菌感染が起こるとER stressが活性化され、その下流でthioredoxin interacting protein (TXNIP)を介し、NLRP3とcaspase-2が反応し、インフラマソームが形成され、細胞死に至るということを報告した。2016年には脂肪肝の発生原因に小胞体ストレスにより活性化されたインフラマソームが関与していることが報告された。すなわち、損傷脊髄内においても小胞体ストレス応答とインフラマソームの相互作用が、損傷範囲の拡大と再髄鞘形成傷害に関与している可能性が示唆されるが、これまで検討されていない。我々は損傷脊髄における小胞体ストレス応答と、インフラマソームの相互作用を解明し、小胞体ストレス応答能増強の薬物療法の意義について、インフラマソーム発現の点からも明らかにすることを目的とした。

5. 考察と展望

近年、炎症反応の誘導に関する新たな経路として、インフラマソームを介した反応が注目されている (Martinon 2002, Kanneganti 2006b, Mariathasan 2006, Martinon 2006, Sutterwala 2007, Newman 2010, Rathinam 2010)。インフラマソームは、パターン認識受容体 (NLRPs), Caspase, ASC などから構成され、IL-1 β , IL-18 前駆体を切断・活性化し、細胞死 (pyroptosis) を引き起こす。(Song 2017, . Martinon 2002; Kanneganti 2006a, Fink 2008) 正常では、これらの構成分子は別々に存在するが、感染などの異常刺激により、集合してインフラマソームを形成し、活性化すると考えられている (Yatsiv 2002, Bossù 2010, Meissner 2010; Wilms 2010)。

インフラマソームの形成は病原微生物の感染によって誘導され、それに基づく炎症応答は多くの場合、感染防御に有効であり、インフラマソームは腸内細菌叢の制御および腸管上皮バリアの保護に働き、腸管の恒常性維持に寄与するとも考えられているが (Liston 2017, Song 2017), 一方、インフラマソームが示す負の側面も知られており、刺激因子の種類によっては、過剰なインフラマソーム形成が不適切かつ持続した炎症を惹起し、動脈硬化、痛風、2 型糖尿病、アルツハイマー病などの各種疾患の発症に関わることが報告さ

れている (de Zoete 2014, de Torre 2017, Song 2017, zhang 2016, Marina 2016)。NLRP3 インフラマソームにおける、最も重要な caspase は caspase1 である。Caspase1 は IL-1 β 、IL-18 前駆体を活性化し、pyroptosis を引き起こす。(Song 2017, Martinon 2002; Kanneganti 2006a; Fink 2008) 一方、ER stress 下においては、NLRP3 は caspase2 を活性化させ、ミトコンドリア機能障害を引き起こし、ミトコンドリアはミトコンドリア由来の損傷関連分子パターン (mtDAMP) を放出し、これはインフラマソームを活性化する (Iyer 2013; Nakahira 2011; Zhou 2011) インフラマソームが活性化されると caspase1 が活性化され、pyroptosis が引き起こされる (Bronner 2015)。すなわち、caspase2 は ER stress により活性化され、caspase1 の活動を調節していると考えられている。

今回の結果では、損傷脊髄においてインフラマソーム構成タンパクの発現は、亢進していた。これはすでに報告されている結果と矛盾ない結果であった。損傷強度による比較では、有意差はなかった。損傷強度が大きくても、小さくても、インフラマソームは活性化されるものと考えている。

また、細胞種ごとの比較では、OPC ではインフラマソーム構成蛋白の発現が高く、アストロサイトでは発現が低値であった。我々はこれまで、OPC は小胞体ストレス応答に対し、脆弱性があることを示してきたが、

OPC はインフラマソームを介した細胞死に対しても脆弱性を有し、またアストロサイトはインフラマソームを介した細胞死に対しても抵抗性があることが示唆された。アストロサイトがインフラマソームを介した細胞死に対しても抵抗性があることは、アストロサイトが脊髄損傷後も生存し、グリア瘢痕を形成することと関連がある可能性がある。脊髄損傷後の炎症反応を契機にアストロサイトがグリア瘢痕を形成することが報告されている。(F Leal 2011) しかし、アストロサイトにおいても、インフラマソーム構成蛋白の発現が全くないわけではなく、損傷後 3 日目には有意差をもって高値を示した。OPC と比較すれば少ないが、アストロサイトにおいても、インフラマソームを介した細胞死は認められると考える。また、TXNIP は ER stress 経路とインフラマソーム経路の重要な接続因子であると考えられている。(Shin 2015,Zhou 2010) TXNIP は ER stress 経路の PERK と IRE1 α の経路で誘導され、NLRP3 インフラマソームを介して、caspase-1 を活性化し、IL-1 β を分泌し、pyroptosis を引き起す。(Oslowski 2013) 損傷初期の脊髄においても TXNIP 発現は亢進しており、脊髄損傷の場においても ER stress 経路とインフラマソーム経路の関連性が示唆された。この結果は、脊髄損傷の 2 次損傷をターゲットとした治療においても、ER stress 経路を抑制するということは、インフラマソーム経路の細胞死も抑制できると

いう可能性も示唆していると考ええる。今後もさらなる検討が必要である。

結 論

脊髄損傷後の脊髄においても、インフラソーム構成蛋白の発現が亢進する。

インフラソーム構成蛋白は OPC で発現率が高く、アストロサイトで低く、脊髄損傷後の細胞死との関連が示唆される。

損傷脊髄で ER ストレスを介してインフラマソームが形成され、細胞死を引き起こす可能性がある。