

表 題 自然炎症を介した肝虚血再灌流障害の分子的機序の解明

副 題 NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to
hepatic ischemia-reperfusion injury independently of
inflammasomes

論文の区分 博士課程

著 者 名 井 上 賢 之

指導教員氏名 安 田 是 和 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
消化器疾患学 分野
消化器外科学

2015年1月9日 申請の学位論文

目次

略語一覧	3
第1章 はじめに	6
第2章 実験材料と方法	11
2-1. 使用動物	
2-2. 肝臓虚血再灌流モデルの作成	
2-3. 血清 alanine aminotransferase (ALT) 測定	
2-4. 組織学的解析	
2-5. アポトーシスの検出	
2-6. Real-time RT-PCR	
2-7. 肝臓への浸潤白血球の解析	
2-8. 骨髄移植モデルの作成	
2-9. 初代肝細胞の分離と培養	
2-10. 初代肝臓非実質細胞の分離と培養	
2-11. 初代培養細胞を使った低酸素実験	
2-12. 好中球の分離	
2-13. 好中球遊走実験	
2-14. ウェスタンブロット法	
2-15. 好中球細胞膜分画の調整	
2-16. [³⁵ S]GTPγS binding assay	
2-17. 低分子量 G 蛋白質 Rac1 活性の測定	

- 2-18. 細胞内カルシウム濃度の測定
- 2-19. アクチン重合の測定と定量化
- 2-20. 統計学的解析

第3章 結果 26

- 3-1. 肝虚血再灌流障害ではインフラマソーム非依存的に NLRP3 が関与している
- 3-2. NLRP3 欠損により炎症性サイトカインや活性酸素種の産生、アポトーシスの誘導が抑制される
- 3-3. NLRP3 欠損により虚血再灌流肝への好中球浸潤が抑制される
- 3-4. 骨髄由来細胞の NLRP3 だけでなく、非骨髄由来細胞の NLRP3 も病態形成に重要である
- 3-5. NLRP3 欠損マウス由来好中球ではケモカインに対する遊走能が低下している
- 3-6. NLRP3 は G 蛋白質共役受容体シグナル経路を介して好中球遊走能を制御する

第4章 考察 44

第5章 おわりに 50

謝辞 51

引用文献 52

略語一覽

ATP: adenosine triphosphate

NLRP1: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family
pyrin domain-containing 1

NLRP2: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family
pyrin domain-containing 2

NLRP6: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family
pyrin domain-containing 6

NLRC4: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family
CARD (caspase-associated recruitment domain) domain-containing 4

NLRP12: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family
pyrin domain-containing 12

AIM2: absent in melanoma 2

IFI16: Interferon, Gamma-Inducible Protein 16

IL-1 β : interleukin-1 beta

WT: wild type

PBS: phosphate buffered saline

Real-time RT-PCR: real-time reverse transcription polymerase chain reaction

RNA: ribonucleic acid

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

Il1b: interleukin-1 beta

Il6: interleukin-6

Tnfa: tumor necrosis factor alfa

Ifng: interferon gamma

Ccl2: chemokine (C-C motif) ligand 2

= monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)

Cxcr1: chemokine (C-X-C motif) receptor 1

Cxcr2: chemokine (C-X-C motif) receptor 2

Actb: beta actin

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

PVDF: polyvinylidene difluoride

HRP: horseradish peroxidase

GTP: guanosine triphosphate

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

BMT: bone marrow transplantation

NPCs: non parenchymal cells

CXCL1: chemokine (C-X-C motif) ligand 1

= keratinocyte-derived chemokine (KC)

CXCL2: chemokine (C-X-C motif) ligand 2

= macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2)

Rac1G12V: *Rac1* を構成するアミノ酸のうち 12 番目のグリシン (G) がバリン (V) に変化したタンパク質

Rac1S17N: *Rac1* を構成するアミノ酸のうち 17 番目のセリン (S) がアスパラギン (N) に変化したタンパク質

Dock2: dedicator of cytokinesis 2

HMGB-1: high mobility group box 1

TLR-4: toll-like receptor 4

TLR-9: toll-like receptor 9

IL-1R1: interleukin-1 receptor 1

第1章 はじめに

近年、悪性新生物による死亡が28.8%と死因別死亡数の中で最大を占めている(1)。肝細胞癌・胆管細胞癌を初めとする原発性肝癌や大腸癌の肝転移病変においても、肝切除・肝移植といった外科治療により根治を目指すことが可能である。加えて肝移植は、先天性肝疾患児の救命においては唯一の治療法ともなりうる。しかし、切除・移植ともにその手技のため、一過性の肝循環遮断とその後の血液供給再開による虚血再灌流障害を伴い、ダメージの程度により術後重症肝不全に陥ることもあり臨床上解決すべき重要課題である。転移性肝腫瘍等、背景肝が正常患者での肝不全発症はまれであるが、肝細胞癌などウイルス性肝硬変が存在する場合は1%程度、背景に黄疸を伴う胆管癌や胆管細胞癌は9.5~15%との報告もある(2)。肝切除では術中の出血コントロールのため肝実質への血流遮断を目的とするPringle法を用いているが、肝硬変等障害肝に対するPringle法はできるだけ短時間であることが望まれる。しかし手術全体における出血コントロールというメリットと虚血再灌流障害というデメリットを勘案した際、そのメリットを優先し重症な虚血再灌流障害を起こさないよう遮断時間を短時間に設定しPringle法を使用しているのが実情である。更には、虚血再灌流障害は、手術だけでなく、外傷、出血性ショック、敗血症、鬱血性心不全や呼吸不全による全身性の血液灌流低下、低酸素状態なども原因となり得るため、多くの疾患と密接に関連した病態でもある。虚血再灌流障害は臓器に内在する免疫細胞や血球細胞が病態形成に重要な役割を担っており、細胞間の複雑な炎症性カスケードが働いている。これらの機序の解明が、外科手術成績、そして患者の予後向上のためには必須である。

肝臓虚血再灌流障害の病態は、肝実質障害後の炎症性サイトカインとケ

モカインの放出を起点とし、虚血組織に好中球主体の白血球浸潤が誘導される炎症反応といえる(3)。虚血自体は、細胞代謝障害を引き起こす局所的な反応であり、結果としてグリコーゲンの消費、酸素供給の消失と ATP の枯渇を来とし、初期の肝細胞死を誘導する。虚血状態に続いて起こる再灌流刺激は、炎症細胞浸潤や活性酸素種産生などの著明な炎症免疫反応を引き起こし、肝実質障害を更に増悪させる(4) (図 1)。

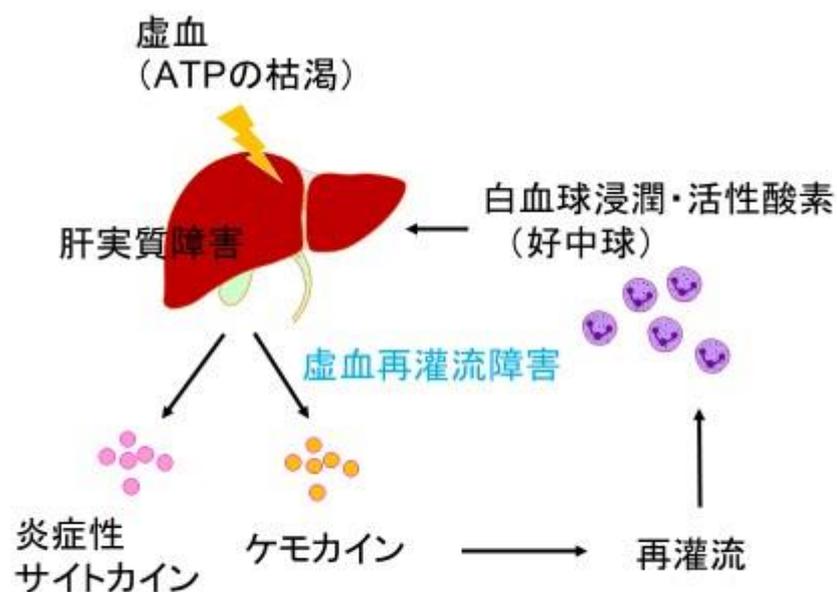


図 1 肝臓虚血再灌流障害機序の模式図

実際のところ、循環血液中の好中球を消失させたり、ケモカインに対する中和抗体を用いると肝臓虚血再灌流障害を軽減できることが実験で示されている(5)。しかしながら、虚血再灌流障害においてどのような刺激が炎症反応を惹起しているのかその機序は不明な点も多い。

最近の研究から、細胞質内に存在するインフラマソームと呼ばれる蛋白複合体が病原体非存在下での炎症反応で主要な役割を担っていることが報告されてきている(6)(7)。代表的なインフラマソームとして NLRP1、NLRP2、NLRP3、NLRP6、NLRC4、NLRP12、AIM2、IFI16 等が知られているが(8)、中でも無菌性の炎症反応で特に重要であり、近年最もよく研究されているインフラマソームとして nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) インフラマソームがあげられる。NLRP3 インフラマソームは、センサー分子 NLRP3 の他に、アダプター分子 apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) を介して、caspase-1 を誘導し、その活性化を促す働きがある。caspase-1 はインターロイキン-1 β (IL-1 β) 変換酵素としての機能を持ち、その働きによって IL-1 β 前駆体を酵素切断処理し、成熟型を産生し分泌する。放出された IL-1 β がその後の炎症を増悪させ、組織障害形成へとつながる (図 2)。NLRP3 蛋白は唯一 NLRP3 インフラマソームにのみ存在するが、ASC、caspase-1 は他のインフラマソームにも存在している (図 3)。

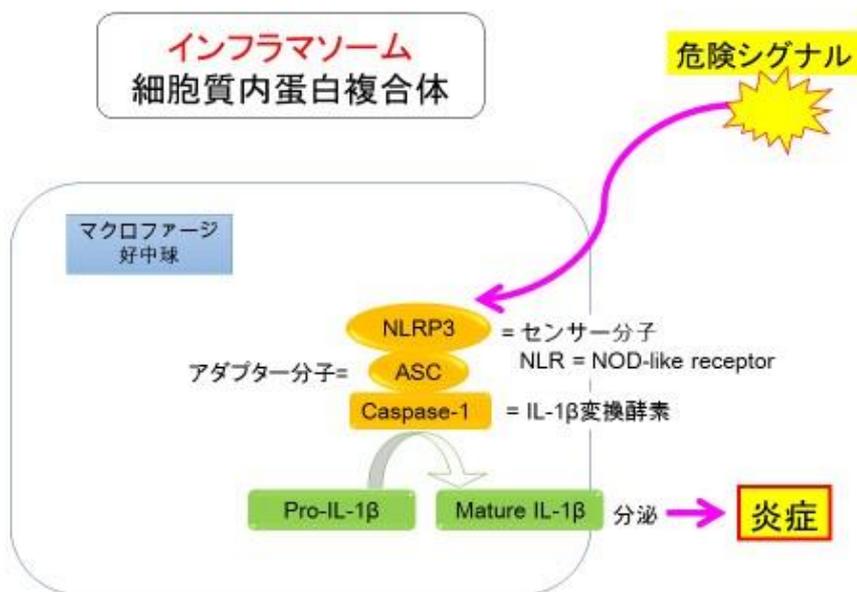


図2 インフラマソームを構成する分子とその役割

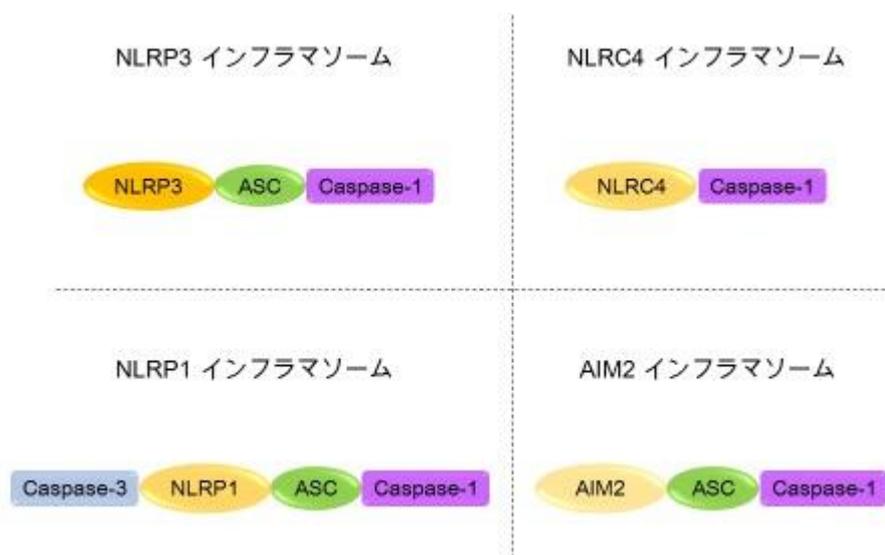


図3 NLRP3 インフラマソーム以外の代表的なインフラマソームアダプター分子ASCを有するものも有しないものも存在する。

近年、他疾患モデルにおけるインフラマソームの重要性が報告されており(9)(10)(11)、特に ASC 欠損 ($-/-$ と表記) や Casp1 $^{-/-}$ マウス (caspase-1 の遺伝子表記) を用いた心臓の虚血再灌流モデルでは、心臓線維芽細胞の持つインフラマソームが初期炎症に重要であることが示されている(9)。肝臓内には Kupffer 細胞を初めとする常在性の免疫細胞が存在し、また虚血再灌流後の肝臓にも浸潤白血球が多数認められる。そこで本研究では、再灌流後の炎症反応においてこれら免疫細胞の持つインフラマソームが重要な役割を担っているとの仮説を立て、検証を行った。仮説を証明するため、インフラマソーム構成分子である NLRP3、ASC、caspase-1 それぞれの欠損マウスを用い、肝臓虚血再灌流実験を行った。結果は、驚いたことに、ASC $^{-/-}$ 、Casp1 $^{-/-}$ マウスでは野生型 (WT) と変わりなかったが、NLRP3 $^{-/-}$ マウスでのみ虚血再灌流後の肝障害が抑制されるという結果が得られた。更に、NLRP3 は、分子複合体であるインフラマソームとは独立して好中球の遊走を制御し虚血再灌流障害の病態に関与していることがわかった。本論文では、研究の成果を下記の第 1 章から第 5 章に分けて解説している。第 1 章“はじめに”に続き、第 2 章“実験材料と手法”、第 3 章に得られた“結果”、第 4 章に“考察”、第 5 章に“おわりに”という 5 部構成となっている。

第2章 実験材料と方法

2-1. 使用動物

本研究におけるすべての実験は、自治医科大学実験動物規程に則って行われた。C57BL/6J (WT) マウスは日本 SLC より購入した。NLRP3^{-/-}マウスは Dr. Vishva M. Dixit (Genentech, CA) の好意により提供され、実験に使用した(12)。ASC^{-/-}マウス、Casp1^{-/-}マウス、IL-1β^{-/-}マウスは、詳細は省略するが以前の報告に記載された方法で作成され(13) (14) (15) (16)、少なくとも 12 世代以上は C57BL/6J マウスとバッククロスを行った。すべてのマウスは C57BL/6J の遺伝的背景を有しており、8-12 週齢の個体を実験に用いた。

2-2. 肝臓虚血再灌流障害モデルの作成

マウスは、イソフルランによる吸入全身麻酔下に手術を行った(17)。四肢を牽引しコルクボードの上に固定、除毛した後、70%エタノールで腹部を消毒した。剣状突起から約 3cm の長さで腹部正中切開を置き、牽引器具で腹壁を頭側と左右に牽引した。腸の乾燥を避けるため、生理食塩水で濡らしたキムワイプを利用し腸表面を覆って保湿した。マウス背側に 2.5ml 注射シリンジ外套を入れ、腹部を手前に持ち上げた。小網を切開、肝右葉、尾状葉を足側に圧排し、肝臓容積の 70%にあたる正中葉、左外側葉へと灌流する門脈、肝動脈、胆管を露出させた。肝実質、後大静脈の

損傷をさけるようにステンレス製血管クリップ (Fine Science Tools, CA) を用いて、門脈、肝動脈、胆管をクランプした。腸管の鬱血がないことを確認し、腹部を簡易閉腹した後、イソフルラン麻醉箱にマウスを移動した。虚血終了後、マウスを麻醉箱から取り出して血管クリップを外し、再灌流を開始した。連続縫合にて腹部を閉鎖し、飼育ケージにマウスを戻し、自然に麻醉から覚醒するのを待った。Sham 手術群は、腹部を正中切開し、クランプ予定部位の露出までの操作のみを行った。手術を施行したマウスは、設定した時間ごとに血液、虚血に陥った肝臓を採取し解析に用いた。

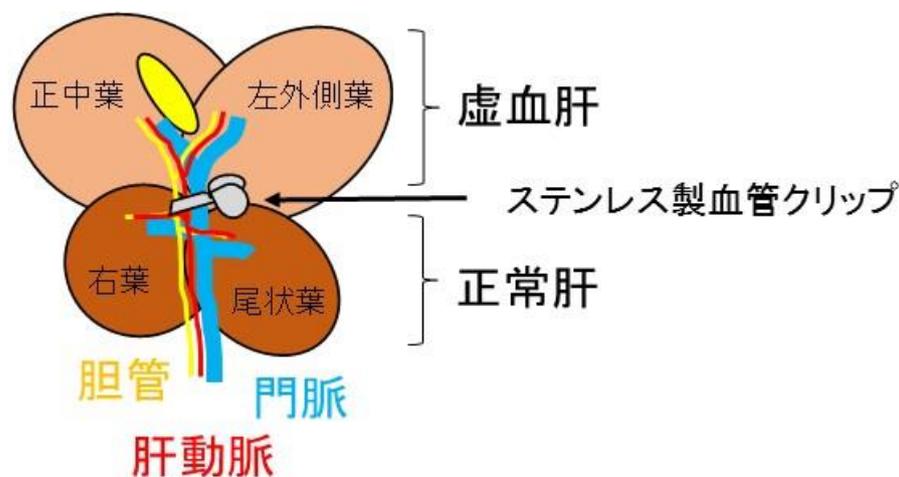


図3 手術時のマウス肝臓展開図

全肝臓容積の70%が虚血になるようにクリップをかけている。

まず本研究における最適な虚血時間を検討するために、それぞれ15分、30分、45分、60分、75分虚血モデルを作成し、血清ALT値を経時的に測定した。結果、60分虚血が最適と判断し、以後の実験は60分虚血モデルにて検討していく方針とした(図4)。

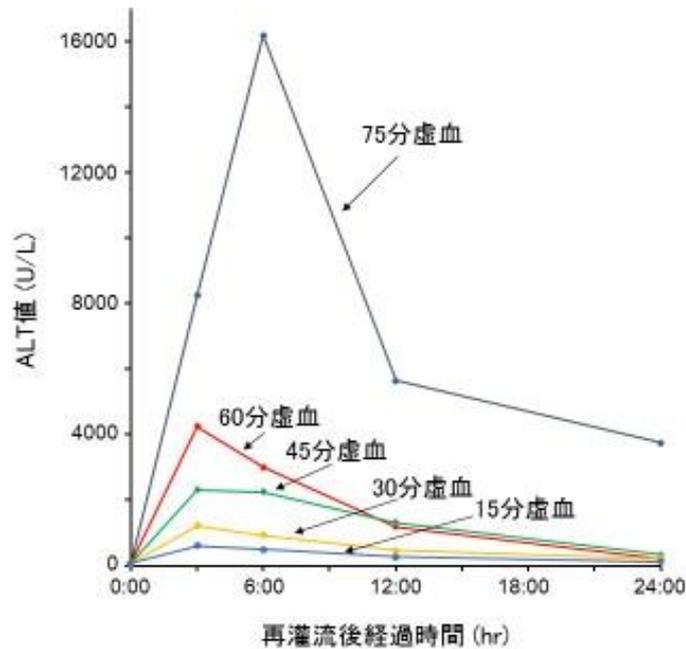


図4 本研究における最適虚血時間検討実験結果

2-3. 血清 alanine aminotransferase (ALT) 測定

マウスより採血した血液を遠心し、血清を分離した。得られた血清を ALT 測定用のスライドに滴下し、Fuji-drychem (Fuji Film, Japan) を用いて測定した。

2-4. 組織学的解析

虚血再灌流手術を行った個体は、採血の後、生理食塩水を門脈より注入

し、肝臓の灌流脱血処理を行った。肝臓を取り出し、10%中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemical, Japan) 、もしくはブアン固定液 (Muto Pure Chemical, Japan) で24時間固定後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄、エタノール脱水、キシレン浸透を経て、パラフィンブロックに包埋した。肝臓サンプルより4 μ m厚の切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色法にて組織を評価し、肝障害部位の定量化を行った。免疫組織学的解析では、酸化ストレスに対する抗体として4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE; clone HNEJ-2; Japan Institute for the Control of Aging, Nikken, SEIL, Japan)と8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG; clone N45.1; Nikken SEIL) を用いた。抗4-HNE抗体、抗8-OHdG抗体はマウス由来の抗体であり、バックグラウンドの染色低減を計るため二次抗体以降の処理はM.O.M. Immunodetection Kit (Vector Laboratories, CA) を用い、diaminobenzidine (DAB) 法にて発色させた。免疫染色スライドはヘマトキシリンを用いて対比染色を、また陰性対象としてコントロールIgGを用いた検討も行い何も染色されないことを確認した。肝臓に集簇した好中球は、naphthol AS-D chloroacetate esterase staining kit (Muto Pure Chemical) を用いて染色した。各種染色スライドは、デジタル顕微鏡 (FSX-100; Olympus, Japan) を用いて撮影し解析を行った。

2-5. アポトーシスの検出

肝臓内のアポトーシス細胞の同定には、terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法を用いたIn situ Apoptosis Detection Kit (Takara Bio, Japan) を使用した。ホルマリン固定サンプル薄

切標本を染色し、陽性細胞を顕微鏡下に数え、定量化を行った。

2-6. Real-time RT-PCR

凍結保存しておいた肝臓サンプルから ISOGEN (Nippon Gene, Japan) を用いて、総 RNA を抽出した。NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC, MA) を用い RNA 濃度を測定した後、2 μ g 分を Superscript VILO™ cDNA Synthesis Kit (life technologies, MD) を用い cDNA に逆転写した。cDNA は SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio, Japan) を用いて、20 μ l 系で増幅反応を行った。内部標準 (β -actin を使用) に対して目的とするメッセンジャーRNA (mRNA) の比を $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて算出し、その値を各サンプル間で比較、解析した。

逆転写反応条件：4°C1分 → 25°C10分 → 42°C60分 → 85°C5分
→ 4°C1分

増幅反応条件：95°C30秒×1サイクル → (95°C5秒、60°C30秒)×40サイクル

<プライマー配列>

Nlrp3: Forward primer 5'-CGAGACCTCTGGGAAAAAGCT-3'

Reverse primer 5'-GCATACCATAGAGGAATGTGATGTACA-3'

Asc: Forward primer 5'-GCTGAGCAGCTGCAAACGAC-3'

Reverse primer 5'-ACTTCTGTGACCCTGGCAATGAG-3'

Il1b: Forward primer 5'-TGAAGTTGACGGACCCCAA-3'

Reverse primer 5'-TGATGTGCTGCTGTGAGATT-3'

Il6: Forward primer 5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'
Reverse primer 5'-CACGATTTCCCAGAGAACATGTG-3'

Tnfa: Forward primer 5'-CCCCAAAGGGATGAGAAGTTC-3'
Reverse primer 5'-GCTTGTCACTCGAATTTTGAGAA-3'

Ifng: Forward primer 5'-AGCAACAGCAAGCGCAAAA-3'
Reverse primer 5'-CTGGACCTGTGGGTTGTTGA-3'

Ccl2: Forward primer 5'-GGCTCAGCCAGATGCAGTTAAC-3'
Reverse primer 5'-GCCTACTCATTGGGATCATCTTG-3'

Cxcr1: Forward primer 5'-ACCCAGCTGGTGCCTCAGATC-3'
Reverse primer 5'-CCTGCCTGTTGGTTATTGGA ACTCTC-3'

Cxcr2: Forward primer 5'-CGTCGTAGAACTACTGCAGGATTAAG-3'
Reverse primer 5'-GGTTCTCTGAGTGGCATGGGAC-3'

Actb: Forward primer 5'-CCTGAGCGCAAGTACTCTGTGT-3'
Reverse primer 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'

2-7. 肝臓への浸潤白血球の解析

肝臓サンプルは、生理食塩水による灌流脱血処理の後、摘出し、プラスチックディッシュ内でハサミを用い細断した。70 μ mのセルストレイナーで組織を濾し、0.1% bovine serum albumin (BSA; Wako) 入りPBSで3回洗浄した。低張性のACK bufferで溶血処理の後、70 μ mセルストレイナーでもう一度組織を濾し、洗浄処理を行い、細胞懸濁液を準備した。Fcレセプターをブロックするために、2.4G2 hybridoma細胞の培養上清を添加し、室

温で10分間反応させた。それぞれfluorescein isothiocyanate (FITC) ラベル抗CD45R抗体 (eBioscience, CA) 、 phycoerythrin (PE) ラベル抗Gr-1抗体 (Miltenyi Biotec, Germany) 、 FITCラベル抗F4/80抗体 (eBioscience) 、 PEラベル抗CD11b抗体 (eBioscience) 、 FITCラベル抗CXCR1抗体 (Biorbyt, Cambridge) 、 PerCP/Cy5.5ラベル抗CXCR2抗体 (Biolegend, CA) を用いて目的細胞ごとに二重染色を行った。FACS Calibur (Becton Dickinson, NJ) システムでフローサイトメトリーを行い、生細胞をカウントした。解析にはCellQuest software version 3.3 (Becton Dickinson) を用いた。(陰性対照としてコントロールIgGを用い、非特異的な染色を除外した。)

< 試薬の組成 >

ACK buffer : NH₄Cl 155mM, KHCO₃ 1.0mM, EDTA 0.01mM

2-8. 骨髄移植モデルの作成

マウスの大腿骨と腓骨を取り出し、キムワイプで毛、皮膚、筋肉を除去した後、Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma) 入り Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Wako, Japan) に室温で10分間浸し殺菌した。下肢骨の両端を切除し、PBSでフラッシュし骨髄細胞を回収した。赤血球は低張性のACK bufferを加え溶血させた。その後PBSで2回洗浄し、細胞懸濁液を準備した。6週齢のレシピエントマウスを準備し、移植前に9 Gyのガンマ線全身照射を行った後、頸静脈より 2×10^6 cellsの骨髄細胞を移植した。またこの方法の有効性は、green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスを用いた予備検討にて確認しており、移植8週後の末梢

血細胞では 90%以上が GFP 陽性細胞であることをフローサイトメトリー法にて確認できている(9) (10)。このプロトコールに従い、計 6 種類の骨髄移植モデルを作成した。

<ドナー>	<レシピエント>	<キメラマウスの表記>
Wild type	Wild type	BMT ^(WT to WT) ,
Wild type	NLRP3 ^{-/-}	BMT ^(WT to NLRP3^{-/-}) ,
NLRP3 ^{-/-}	Wild type	BMT ^(NLRP3^{-/-} to WT) ,
NLRP3 ^{-/-}	NLRP3 ^{-/-}	BMT ^(NLRP3^{-/-} to NLRP3^{-/-}) ,
Wild type	ASC ^{-/-}	BMT ^(WT to ASC^{-/-}) ,
ASC ^{-/-}	Wild type	BMT ^(ASC^{-/-} to WT)

2-9. 初代肝細胞の分離と培養

肝細胞の分離は 2 段階コラゲナーゼ灌流法にて行った。全身麻酔下のマウスを開腹し、門脈を露出した。24 ゲージサーフロー針で門脈を穿刺し、血液の逆流を確認した後、灌流用のチューブを連結した。後大静脈をハサミで切離し、血液のドレナージルートを確認した後、第一灌流液 (37°C) で 5 分間灌流し脱血した。それに続いて 0.05% コラゲナーゼ (Wako) 、0.005% トリプシン阻害剤 (Wako) を含む第二灌流液 (37°C) で 10 分間灌流した後、消化された肝臓を取り出し、プラスチックディッシュに内で丁寧に分散させた。70µm のセルストレイナーにて未消化組織を取り除き、DMEM を用い 30g、2 分、室温で 3 回洗浄した。最後に DMEM で細胞懸濁液を作成し、トリパンブルー染色を行い生細胞数を計測した。分離した肝細胞はコラーゲンコートディッシュに播種し、10%

fetal bovine serum (FBS; MP biomedical, CA) 、1 μ M dexamethasone、1 μ M insulin 入り DMEM で培養した。培養開始7時間後に FBS 無しの DMEM に液交換を行い実験に使用した。

< 試薬の組成 >

第一灌流液 : Hank's Balanced Salt Solution (Life Technologies) +0.5M EGTA+25mM HEPES

第二灌流液 : DMEM (Sigma) +15mM HEPES + Antibiotic Antimycotic Solution + 0.05% コラゲナーゼ (Wako) + 0.005% トリプシン阻害剤 (Wako)

2-10. 初代肝臓非実質細胞の分離と培養

非実質細胞は肝細胞と同様の手法で細胞懸濁液を準備した。懸濁液は、スターラーを用いて 37°C、15 分間ビーカー内で更に消化・分散させた。30g、2 分、室温の低速遠心にて肝細胞を取り除いた後、28% Nycodenz (Axis-Shield, Scotland) を用いた密度勾配遠心法 (1400g、20 分、4°C) にて、上清より非実質細胞を精製した。非実質細胞は 10% FBS 入り DMEM にて培養し実験に使用した。

2-11. 初代培養細胞を使った低酸素実験

Aneropac (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) システムを用い密閉アクリルボックス内を低酸素環境にした上で培養細胞実験を行った(18)。Aneropac

による低酸素環境を確認するために、低酸素下の培養上清中酸素分圧を StatProfile Critical Care Xpress (Nova Biomedical, MA) を用いて測定した。通常酸素濃度下での酸素分圧は 173.2 ± 2.0 mmHgであったが、低酸素下では 42.5 ± 7.3 mmHgと低下していた。(n=4, p<0.01)

2-12. 好中球の分離

好中球は、マウスの腹腔内に9%カゼインナトリウム (Sigma) を2回注射 (2回目は1回目の12時間後)し、その3時間後に腹腔内をPBSで洗浄することにより細胞を得た。赤血球は低張性ACK bufferで溶血させ、0.1% BSA入りRPMI1640 (Sigma) 溶液に懸濁し、実験に使用した。

2-13. 好中球遊走実験

24ウェルプレートを用いた、transwell migration assay法にて好中球の遊走能を評価した。Upper chamberには孔径 $3\mu\text{m}$ のpolycarbonate membrane (BD Biosciences) を使用した。Upper chamberに 1×10^6 cellsの好中球を播種し、lower chamberには好中球遊走作用を持つkeratinocyte-derived chemokine (KC; Peprotech, NJ) を $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 濃度で添加したRPMI1640溶液を入れ、 37°C 、1時間反応させた。Lower chamberに遊走した細胞は、回収した後、フローサイトメトリー法とギムザ染色にて解析した。

2-14. ウェスタンブロット法

肝細胞、非実質細胞での NLRP3、ASC の発現はウェスタンブロット法にて確認した。細胞を調整し、lysis buffer で細胞溶解液を作成、溶液中の蛋白は、SDS-PAGE にて分離し、PVDF メンブレンにブロットした。5% skim milkにて室温、1時間ブロッキングした後、抗NLRP3抗体 (mouse monoclonal; clone Cryo-2; Enzo Life Sciences) 、抗ASC抗体 (rabbit polyclonal; Enzo Life Sciences) 、抗 β -actin抗体 (mouse monoclonal; clone AC-15; Sigma) の各1次抗体で室温、1時間インキュベートした。洗浄の後、各1次抗体に対するHRP付き2次抗体を室温、1時間インキュベートした。バンドは、Western BLoT Quant HRP Substrate (Takara Bio, Japan) を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 mini (GE healthcare Life Sciences, NJ) で撮影した。

<試薬の組成>

Lysis buffer : 1% Nonident-P40, 150mM NaCl, 50mM Tris pH8.0, protease inhibitor cocktail (Sigma) 1/100 use, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100nM sodium orthovanadate, 20mM β -glycerophosphate, 1mM sodium fluoride

2-15. 好中球細胞膜分画の調整

単離した好中球を PBS で洗浄した後、低張性溶液に懸濁し細胞を膨化させた。21 ゲージ針を付けた 10ml シリンジを用いて、吸引/排液を 5 回繰り返して、細胞を破碎した。細胞破碎液を 450g、5 分、4°C で遠心し核を

取り除き、細胞膜分画を含む上清は、別の新しいチューブに移した。膜分画は、100,000g、40分、4°Cで遠心し、ペレットとして回収した。低張性溶液でペレットを洗浄した後、27ゲージ針を付けた1mlシリンジを用いて懸濁溶液に溶解した。

<試薬の組成>

低張性溶液：20mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail 1/100 use

懸濁溶液：20mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail 1/100 use

2-16. [³⁵S]GTPγS binding assay

G 蛋白質共役受容体 (G protein coupled receptor; GPCR) は、7回膜貫通型ケモカイン受容体部分と細胞膜内の3量体G蛋白質部分で構成されている。3量体G蛋白質のGαサブユニットにGTPが結合するためには、必ず細胞外からのサイトカイン刺激が必要である(19)。GPCRを含む好中球膜分画をサイトカインで刺激した際の[³⁵S]GTPγS結合を観察するため、はじめに膜分画(10μg)を含むreaction bufferをKC(10ng/ml)で30秒間刺激した。続いて、5μMになるよう[³⁵S]GTPγSを加え、GTP結合反応を開始させた。目的とする時間が経過した後、各ポイントで反応溶液を引き抜き、GTPが結合した膜分画をGF/B Glass Microfiber Filters (GE Healthcare Life Sciences)で濾過して蛋白を回収し、最後にwash bufferでフィルターを洗浄した。膜分画蛋白に結合した[³⁵S]GTPγSの放射能をシンチレーション

ンカウンターで測定し、GTP γ S の結合量を推測した。

< 試薬の組成 >

Reaction buffer : 20mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA

Wash buffer : 20mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 25mM MgCl₂

2-17. 低分子量 G 蛋白質 Rac1 活性の測定

活性化型Rac1の検出には、p21 activated kinase I (PAK) という蛋白質の p21 binding domain (PBD) ドメインに活性化型Rac1が結合する性質を利用したRac1 Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, CO) を用いた。好中球を1.5mlチューブに分注した後、37°Cに保温しながら、KC (10ng/ml) で刺激した。各反応時間の後、lysis bufferを加え、細胞の溶解と同時に反応を停止させた。18000g、5分、4°Cで遠心の後、上清を回収した。上清900 μ lに活性化型Rac1結合能を有するPAK-PBDビーズ10 μ gを加え、4°C、1時間、回転させながらインキュベーションした。遠心、wash bufferで洗浄を繰り返し、最後に得られたビーズに2xLaemmli sample bufferを加え、95°C煮沸処理を行いビーズから結合蛋白を溶出させた。回収された活性化型Rac1蛋白は、抗Rac1抗体 (mouse monoclonal; Cytoskeleton, CO) を用いてウェスタンブロット法で検出した。

< 試薬の組成 >

Lysis buffer : 50mM Tris pH7.5, 10mM MgCl₂, 0.5M NaCl, 2% Igepal

Wash buffer : 25mM Tris pH7.5, 30mM MgCl₂, 40mM NaCl

2×Laemmli sample buffer : 125mM Tris pH6.8, 20% glycerol, 4% SDS,

0.005% bromophenol blue, 5% beta-mercaptoethanol

<略語の説明>

PAK-PBD protein motif : 活性化型Racが特異的に結合するアミノ酸配列

PAK : p21 activated kinase I (cdc42やRacのeffector protein)

PBD : p21 binding domain (cdc42/Rac interactive binding regionとも呼ばれる)

2-18. 細胞内カルシウム濃度の測定

好中球の細胞内カルシウム濃度は、2波長励起型のFura-2プローブを用いて測定した(20)。Fura-2蛋白は、カルシウムイオン濃度が高くなると340 nm 励起の蛍光強度が上昇し、380 nm 励起の蛍光強度が低下する特性を持っているため、その蛍光強度比 ($R = F_{ex.340nm} / F_{ex.380nm}$) をとると既知のカルシウムイオン濃度と対応づけることができる。ディッシュに播種した好中球をKC (10ng/ml) で刺激し、カルシウムイオン濃度の変化をcooled charge-coupled device camera で撮影し、Aquacosmos system (Hamamatsu Photonics, Japan) を用いて解析した。

2-19. アクチン重合の測定と定量化

ケモカインによる遊走刺激を受けた細胞は、最終的にアクチン線維の重

合を起し、各部位に遊走していく。好中球刺激時のアクチン重合度を測定するため、KC (10ng/ml) で刺激された好中球を、FoxP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec) を用いて、固定と膜透過処理を施行した。アクチン線維 (F-actin) の染色には、Acti-stain 488 fluorescent phalloidin (Cytoskeleton) を使用し、フローサイトメトリー法にて解析し、画像は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-10i; Olympus, Japan) で撮影した。

2-20. 統計学的解析

データは、平均値±標準誤差で表示した。2 群間の比較には独立 t 検定を、多群間比較には一元配置分散分析法と post hoc test (多重比較検定；事後比較) を用いた。統計学的有意差は、p 値 < 0.05 とした。

第3章 結果

3-1. 肝虚血再灌流障害ではインフラマソーム非依存的に NLRP3 が関与している

WT マウスに 70% 部分肝虚血再灌流 (虚血時間 60 分) モデルを作成したところ、NLRP3 mRNA 発現の有意な増加を認め (図 5A)、NLRP3 インフラマソームの関与が示唆された。そこで、WT マウスに加え、NLRP3、ASC、caspase-1 の各欠損マウスを用いて同モデルを作成し解析した。WT マウスと比較して、NLRP3^{-/-}マウスでは肝障害の程度を示す血清 ALT 値が有意に抑制されていたが、他のインフラマソーム構成分子である ASC^{-/-}および Casp1^{-/-}マウスでは、血清 ALT 値に有意な差を認めなかった (図 5B)。次に、再灌流後肝組織を HE 染色して肝障害面積を測定したところ、血清 ALT 値と同様に NLRP3^{-/-}マウスでのみ、WT マウスと比較して有意に抑制されていた (図 5C)。インフラマソームは IL-1 β 産生を制御することから、肝組織中 IL-1 β 濃度も測定したが、NLRP3^{-/-}マウスでは有意な低値を示したが、ASC^{-/-}および Casp1^{-/-}マウスでは IL-1 β の産生が抑制されなかった (図 5D)。さらに、IL-1 β ^{-/-}マウスを用いて同モデルを作成したところ、肝障害が劇的に抑制されていた (図 5E)。これらの結果より、肝虚血再灌流障害では、NLRP3 がインフラマソームとは独立してその病態に寄与しており、同時にインフラマソーム非依存性の IL-1 β 産生を介した炎症反応が重要であることが示唆された。

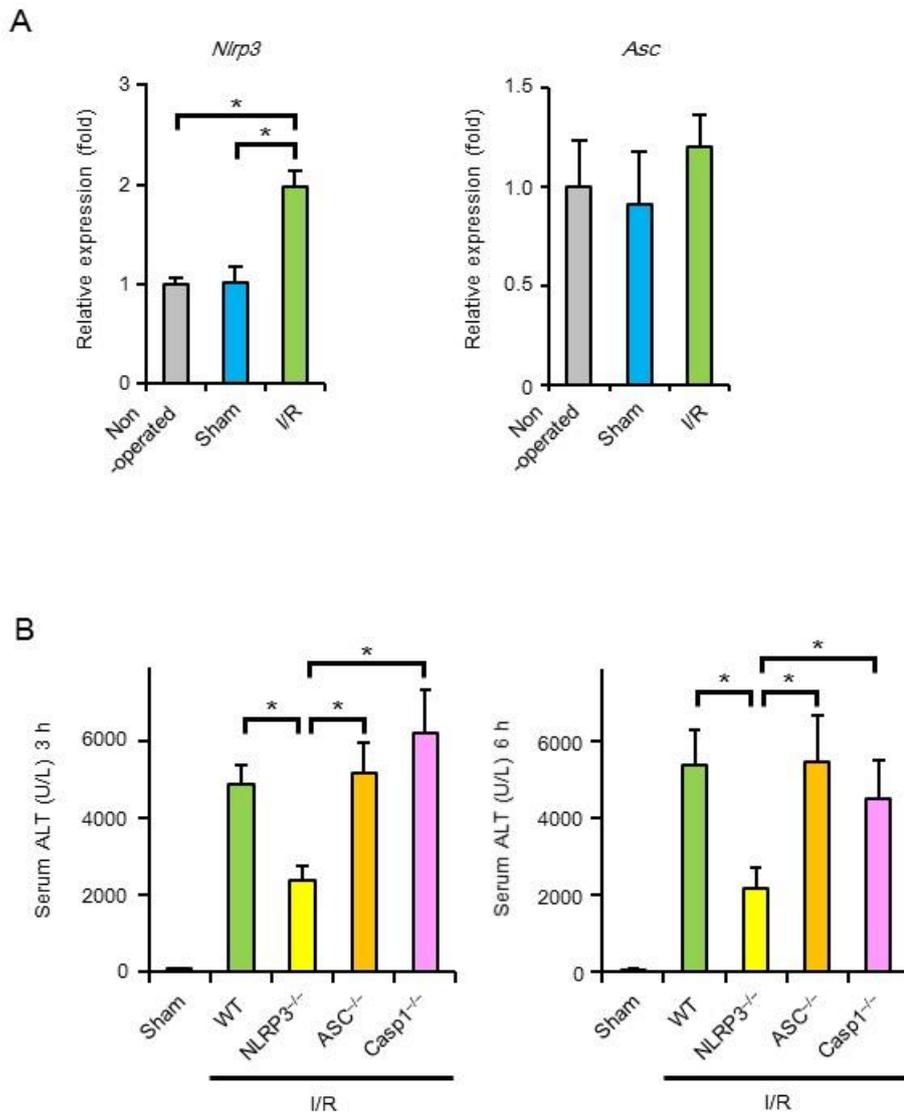
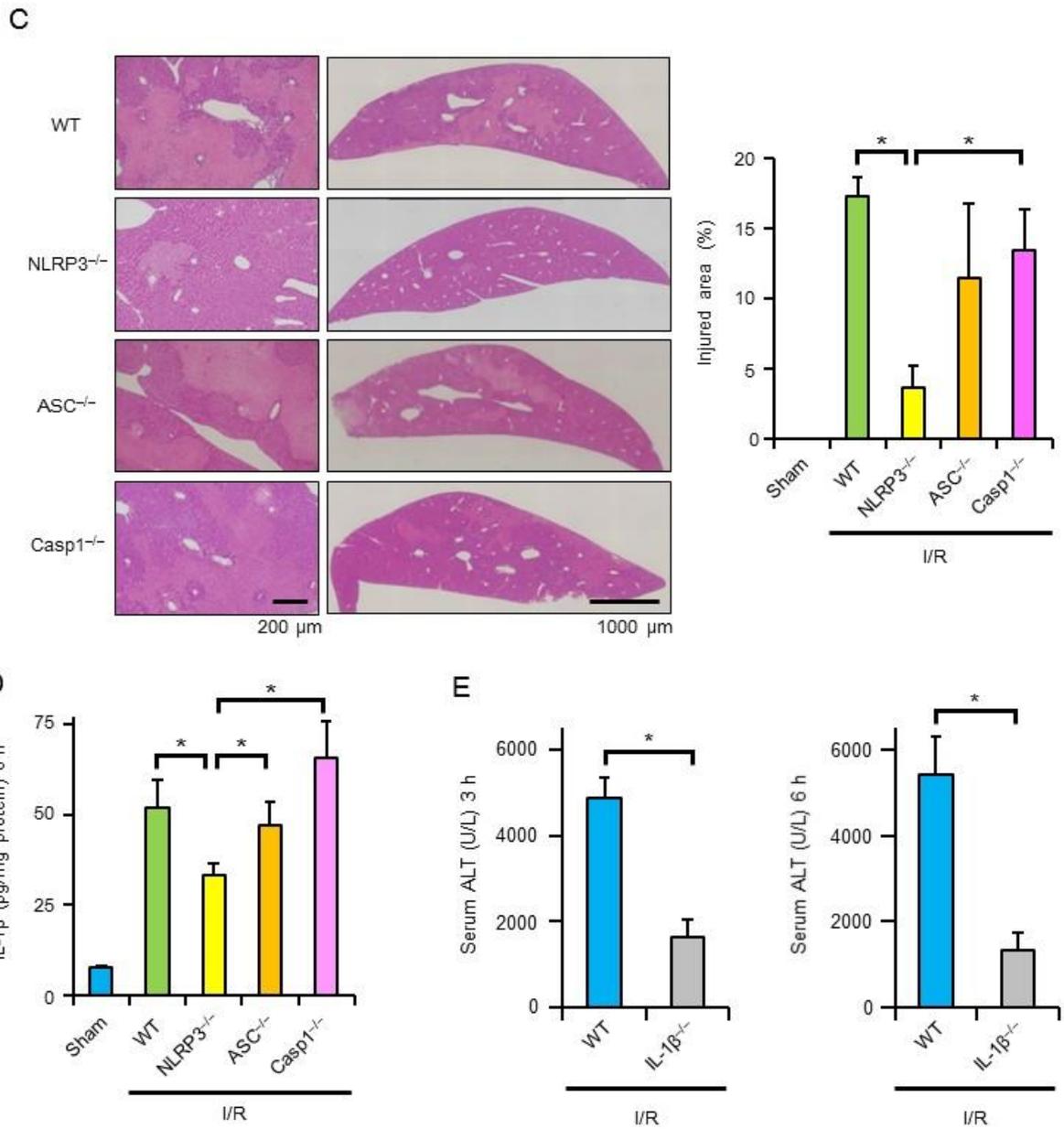


図5 肝臓虚血再灌流障害における NLRP3 の役割

A: Real-time RT-PCR 法を用い、再灌流 3 時間後肝臓サンプルでの各種 mRNA 発現を検討した。(n=4)

B: 再灌流 3 時間後、6 時間後の血清 ALT 値を測定した。(n=7-10)



C: HE 染色を行い、再灌流 6 時間後の肝障害面積を定量化した。 (n=5)

D: ELISA 法にて再灌流 6 時間後の肝組織中 IL-1 β 濃度を測定した。

(n=7-10)

E: 再灌流 3 時間後、6 時間後の血清 ALT 値を測定した。 (n=7-10)

データは平均値 \pm 標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3-2. NLRP3 欠損により炎症性サイトカインや活性酸素種の産生、アポトーシスの誘導が抑制される

Real-time RT-PCR 法を用いて、炎症性サイトカインの mRNA 発現を測定したところ、WT マウスと比較して、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、IL-1 β や IL-6、CCL2 の発現が低下していた (図 6A-E)。また、虚血再灌流障害はアポトーシスやネクローシスなどの細胞死を誘導する活性酸素種を産生することから(3, 21)、その産生を 4-HNE および 8-OHdG といった酸化ストレスマーカーの免疫組織化学染色で、アポトーシスを TUNEL 染色で評価したところ、WT マウスと比較して NLRP3^{-/-}マウスでは、活性酸素種およびアポトーシスともに減少していた (図 7A-C)。

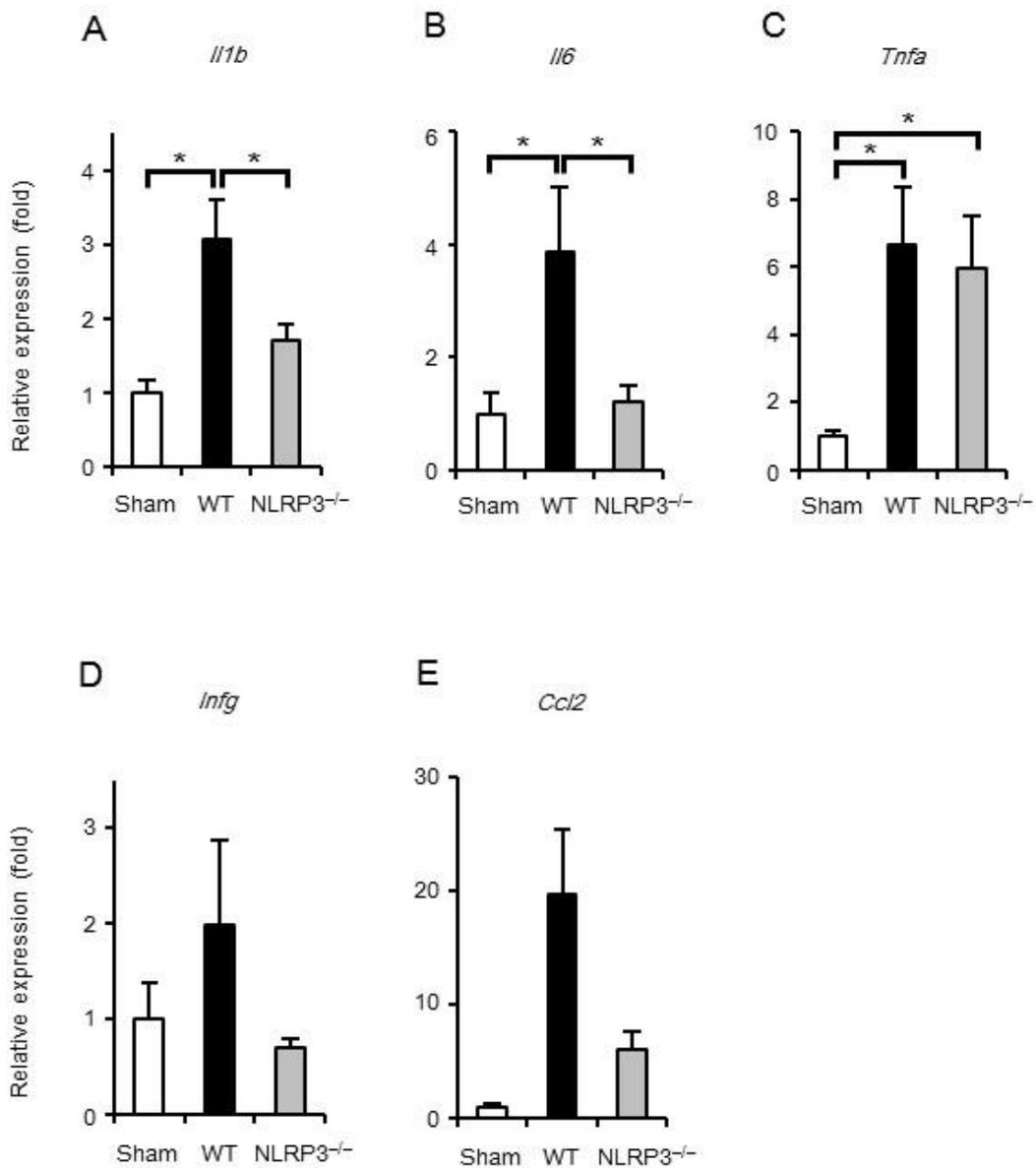


図 6 炎症性サイトカイン発現

Real-time RT-CR 法を用い、再灌流 3 時間後肝臓サンプルでの各種 mRNA 発現を検討した。(n=4)

A: *Il1b*, B: *Il6*, C: *Tnfa*, D: *Infg*, E: *Ccl2*。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

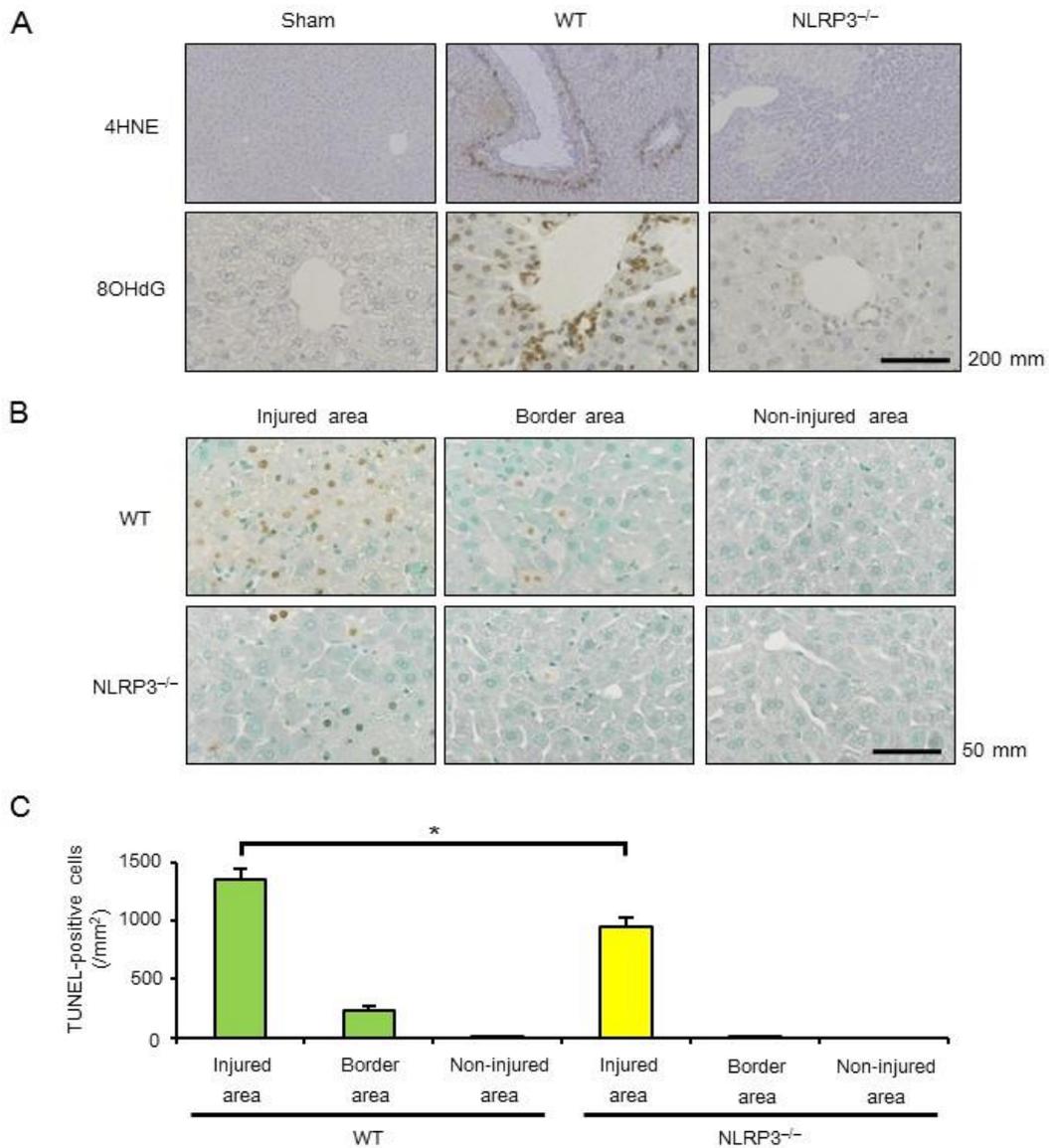


図7 活性酸素種産生とアポトーシス

A: 酸化ストレスマーカーである 4-HNE と 8-OHdG の免疫染色を行い、再灌流後 6 時間のサンプルでの酸化ストレスを検討した。

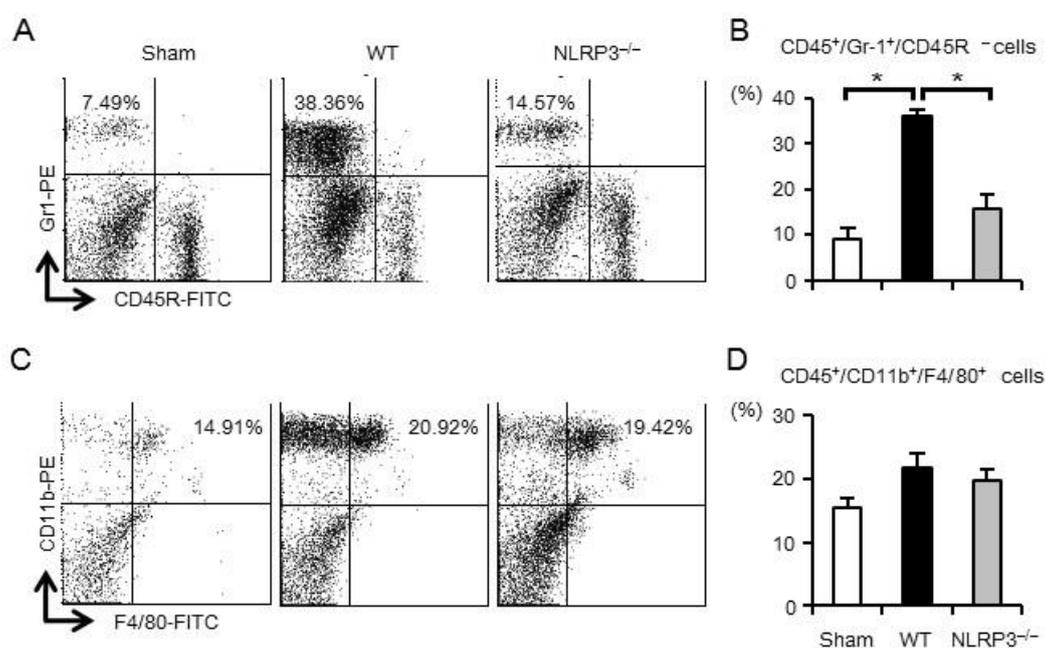
B: TUNEL 法を用いて再灌流後 24 時間のサンプルを染色した。

C: TUNEL 陽性細胞を計測し、定量化した。 (n=4)

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3-3. NLRP3 欠損により虚血再灌流肝への好中球浸潤が抑制される

虚血再灌流後肝への炎症細胞浸潤を検討するため、フローサイトメトリー法を用いて、好中球・マクロファージの評価を行った。再灌流後、WTマウスで増加していた浸潤好中球は、NLRP3^{-/-}マウスで有意に減少していた (図 8A, B)。NLRP3^{-/-}マウスでの好中球減少は、naphthol AS-D chloroacetate esterase 染色でも確認した (図 8E)。一方、浸潤マクロファージに関しては、WT と NLRP3 欠損マウスとの間で有意な差を認めなかった (図 8C, D)。



E

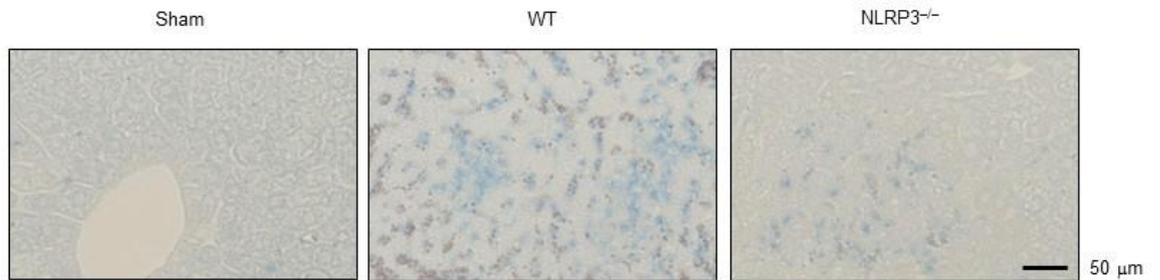


図 8 再灌流後肝臓への炎症性細胞浸潤

再灌流後 3 時間後の肝臓より細胞を分離し、フローサイトメトリー法にて各種炎症性細胞の比率を測定した。

A: 浸潤好中球の代表的プロット図 ($CD45^+/Gr-1^+/CD46R^-$)

B: 好中球比率の平均値 (n=3)

C: 浸潤マクロファージの代表的プロット図 ($CD45^+/CD11b^+/F4/80^+$)

D: マクロファージ比率の平均値 (n=3)

E: naphthol AS-D chloroacetate esterase 法による浸潤好中球染色

青色に染色された細胞が好中球を表している

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

3-4. 骨髄由来細胞の NLRP3 だけでなく、非骨髄由来細胞の NLRP3 も病態形成に重要である

NLRP3^{-/-}マウスでの障害軽減メカニズムを検討するため、マウス初代肝細胞と初代非実質細胞を分離し、ウェスタンブロット法にて NLRP3 と ASC の蛋白発現を確認した。非実質細胞では NLRP3 と ASC 蛋白の発現を認めたが、肝細胞では検出できなかった (図 9A)。また初代肝細胞とマウス肝細胞 cell line である Hepa1-6 細胞を低酸素環境下で培養したサンプルも検討したが、NLRP3、ASC とともに発現を確認できなかった (図 9B)。これらの所見から、肝細胞に存在する NLRP3 の役割は非常に限定的なものと推測された。

NLRP3は主に非実質細胞内に存在するという結果から、骨髄由来細胞の役割を検討するため、方法のごとく6種類の骨髄移植モデル (BMT) を作成することとした(9)。BMT^(WT to WT), BMT^(WT to NLRP3^{-/-}), BMT^(NLRP3^{-/-} to WT), BMT^(NLRP3^{-/-} to NLRP3^{-/-}), BMT^(WT to ASC^{-/-}), and BMT^(ASC^{-/-} to WT)。BMTマウスに虚血再灌流手術を行ってみると、BMT^(NLRP3^{-/-} to WT), BMT^(NLRP3^{-/-} to NLRP3^{-/-}) マウスにて血清ALTとHE染色による肝障害度が有意に抑制されていた (図9C, D)。しかし肝障害は、BMT^(WT to NLRP3^{-/-}) マウスでも軽減されるという結果が得られ、骨髄由来細胞の持つNLRP3だけではなく、非骨髄由来細胞のNLRP3も重要であることがわかった。

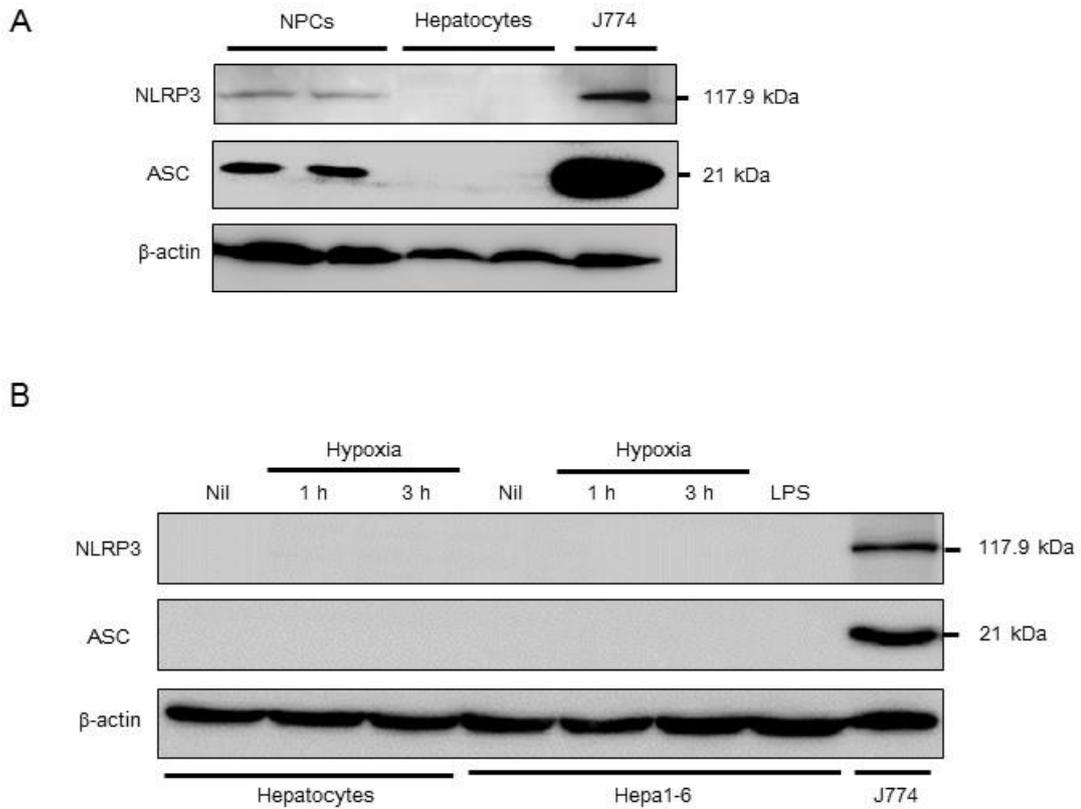
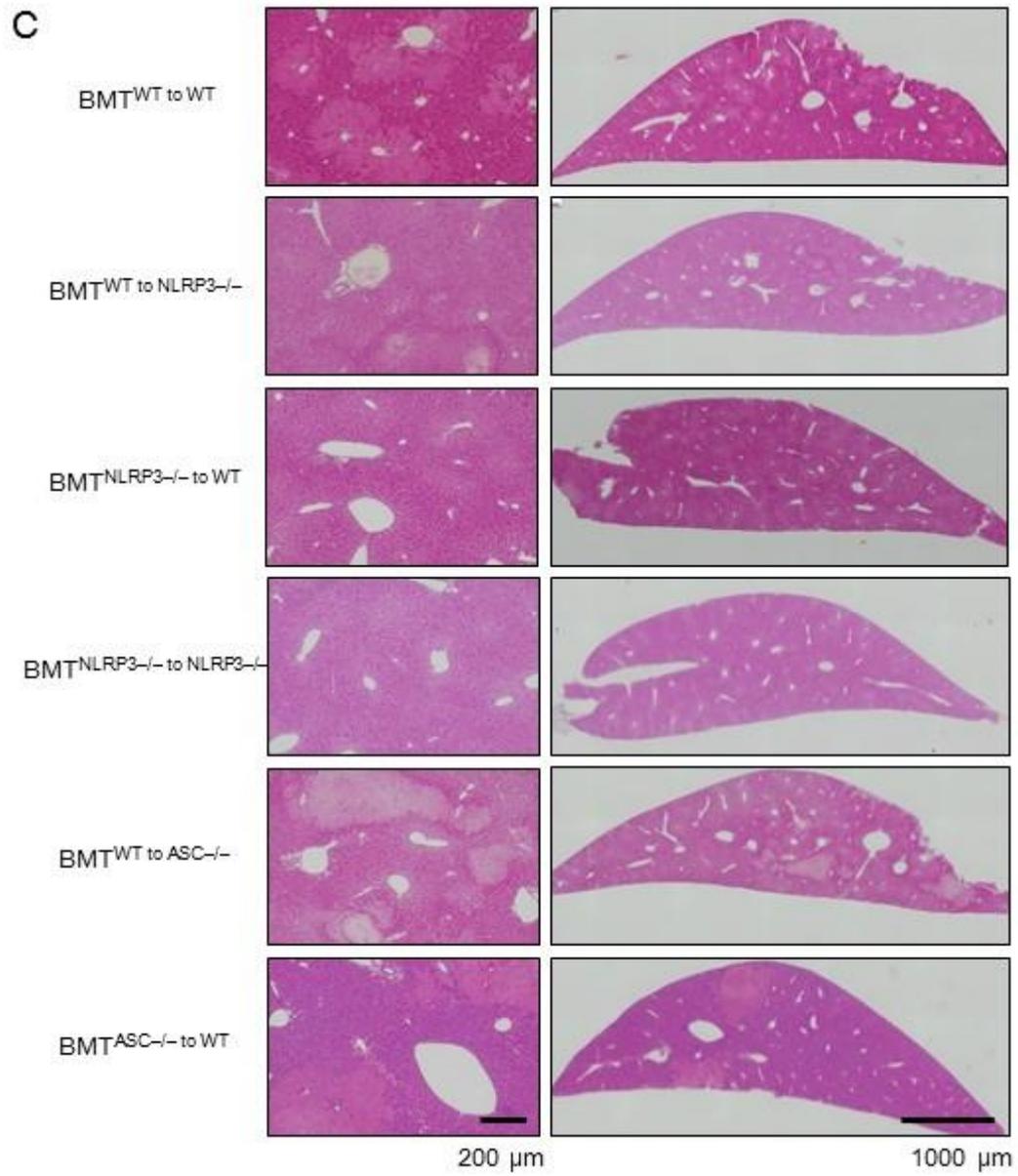
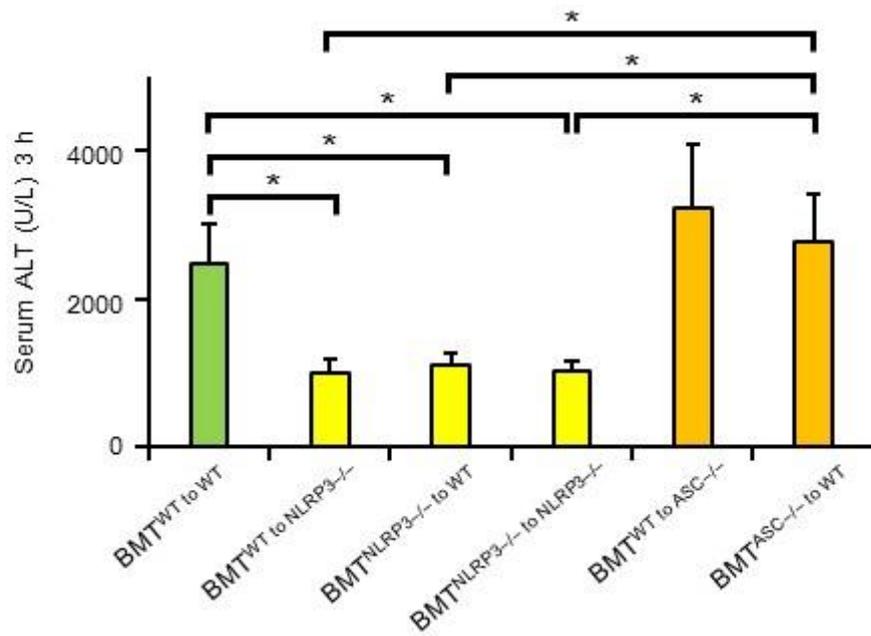


図9 肝臓虚血再灌流障害における骨髄由来細胞の役割

- A:** WT の肝臓より非実質細胞 (NPCs) 、肝細胞 (hepatocyte) を分離し、細胞溶解液を作成、ウェスタンブロッティング法にて NLRP3、ASC、 β -actin の発現を検討した。マウスマクロファージ cell line である J774 細胞は、NLRP3、ASC の陽性コントロールとして用いた。
- B:** 肝細胞と肝細胞 cell line である Hepa1-6 細胞を低酸素環境下で培養したサンプルでも NLRP3、ASC、 β -actin の発現を検討した。



D



C and D: 各種骨髄移植モデルを作成し、移植後 8 週間経過した後、虚血再灌流手術を行った。肝臓、血清は再灌流 3 時間後にサンプリングした。

C: 肝臓 HE 染色像の代表的強拡大と弱拡大写真

D: 各種マウスの血清 ALT 値 (n=7-8)

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3-5. NLRP3 欠損マウス由来好中球ではケモカインに対する遊走能が低下している

NLRP3^{-/-}マウスでは、好中球浸潤が有意に抑制されていたことから、NLRP3^{-/-}マウス由来の好中球が WT マウス由来の好中球と異なった特徴があると推測した。まずカゼインナトリウム投与によって得られる腹腔内滲出好中球の比率を比較したが、WT と NLRP3^{-/-}マウスで同等であった (図 10A)。肝臓虚血再灌流障害においては浸潤好中球の存在が肝細胞障害を起こす原因の一つと報告されている(3)。そこで、採取した好中球と初代肝細胞との低酸素環境下共培養システムを作成し、好中球の持つ肝細胞に対する傷害能を検討したが、WT と NLRP3^{-/-}好中球とで有意な差を認めなかった (図 10B)。また、好中球は傷害組織から産生される KC (CXCL1) や MIP-2 (CXCL2) といったケモカインによって遊走が誘導されて組織に浸潤していくことから、好中球の持つ KC に対する遊走能を検討したところ、WT と比較して NLRP3^{-/-}好中球では遊走能が有意に低下していることが明らかとなった (図 10C-E)。

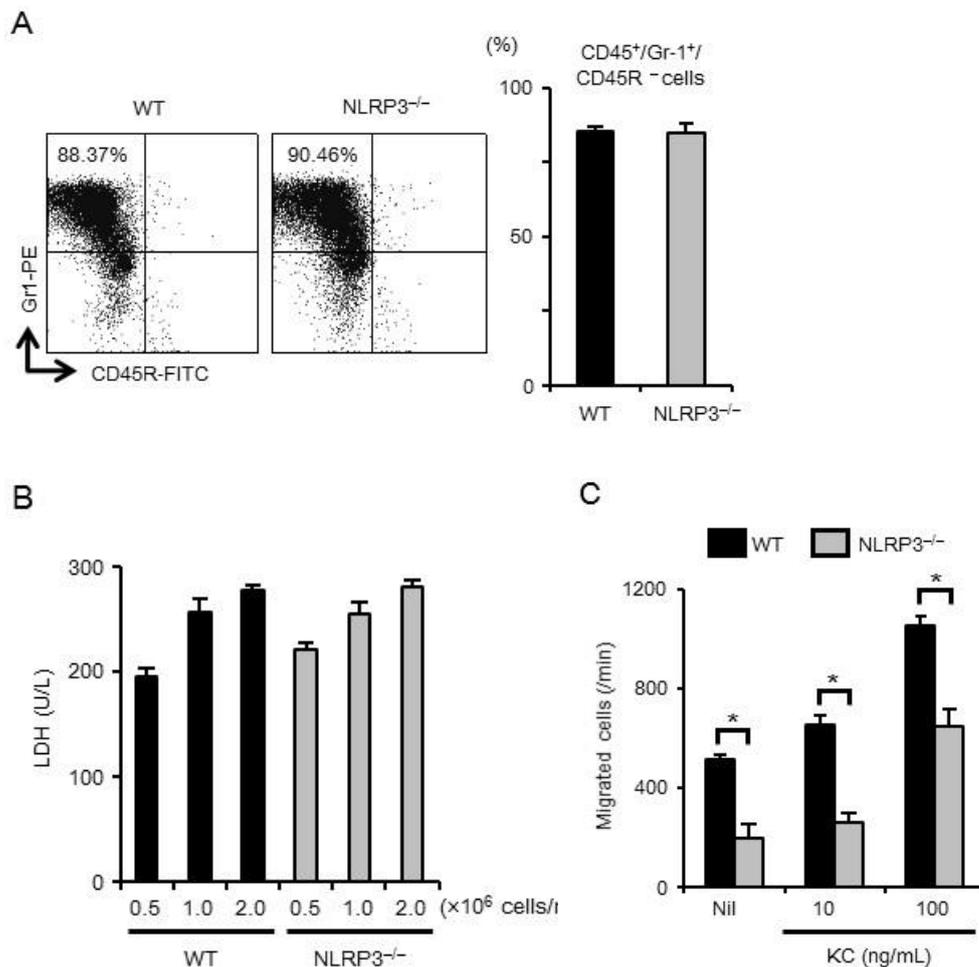
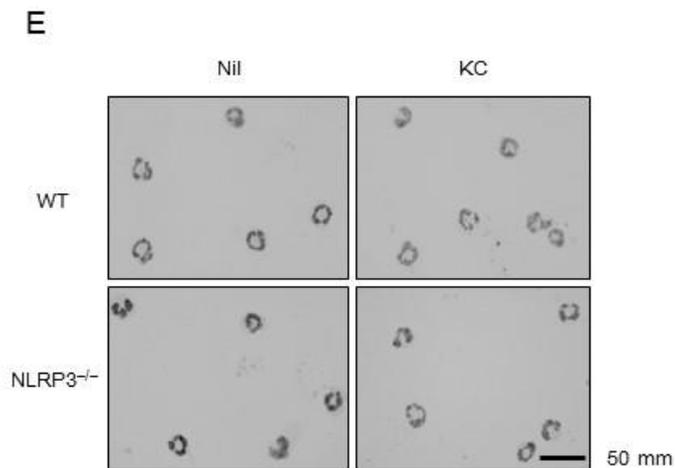
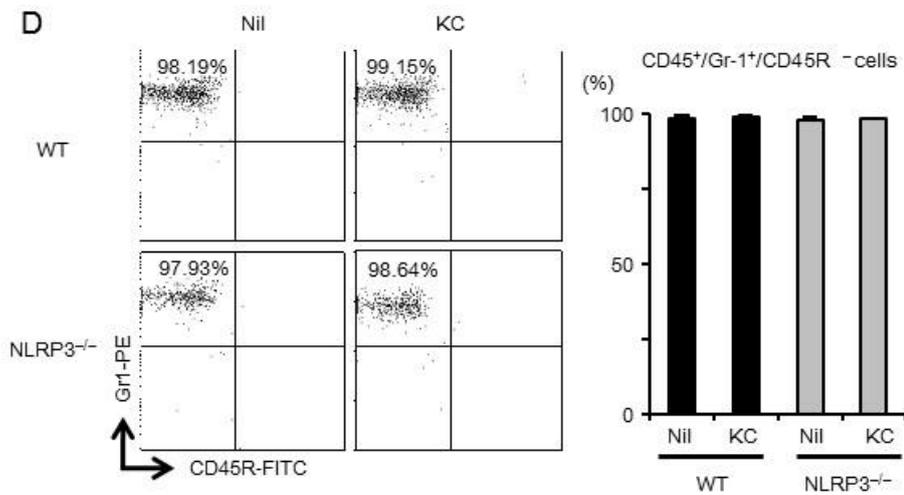


図 10 好中球遊走能

A: WT と NLRP3^{-/-}マウスよりカゼインナトリウム誘導性腹腔細胞を採取し、その好中球比率をフローサイトメトリー法を用いて比較した。代表的プロット図 (左) と平均値 (右) を示した。 (n=3)

B: WT 初代肝細胞と各種腹腔由来好中球を低酸素条件下で共培養した。上清中の LDH を測定することにより、肝細胞障害度を推測した。 (n=3)

C: modified Boyden chamber transwell migration assay 法を用いて、サイトカイン KC (10 ng/ml, 100 ng/ml) に対する好中球遊走能を測定した。遊走細胞数はフローサイトメトリー法を用いてカウントした。 (n=4)



D: KC に反応し、Lower chamber に移動してきた好中球の純度をフローサイトメトリー法を用いて測定した。代表的プロット図 (左) と平均値 (右) を示した。 (n=4)

E: Lower chamber に移動してきた好中球の代表的 Giemsa 染色を示した。データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3-6. NLRP3 は G 蛋白質共役受容体シグナル経路を介して好中球遊走能を制御する

さらに、詳細な分子機序を検討するため、KC の受容体である G 蛋白質共役受容体の CXCR1 と CXCR2 の細胞表面発現をフローサイトメトリー法で検討したが、有意な差を認めなかった (図 11A)。しかし、好中球膜分画を精製し、KC 刺激時の 3 量体 G 蛋白質に結合する [³⁵S]GTP γ S 量を測定したところ、NLRP3^{-/-}好中球由来の膜分画において GTP γ S 結合能が有意に低く、ケモカインを介した細胞遊走のシグナル伝達経路が抑制されていることがわかった (図 11B)。さらに、このシグナル経路の下流にあるカルシウムイオンの流入 (図 11C, D)、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化 (図 11E)、アクチン重合 (図 11F) といった現象も NLRP3^{-/-}マウス由来の好中球で抑制されていることを確認した。

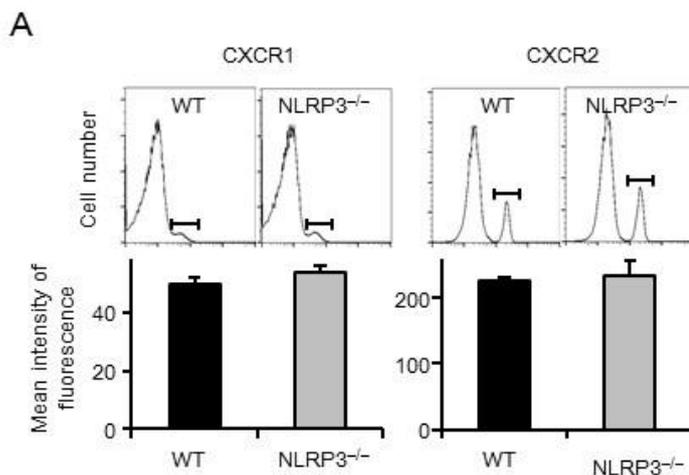
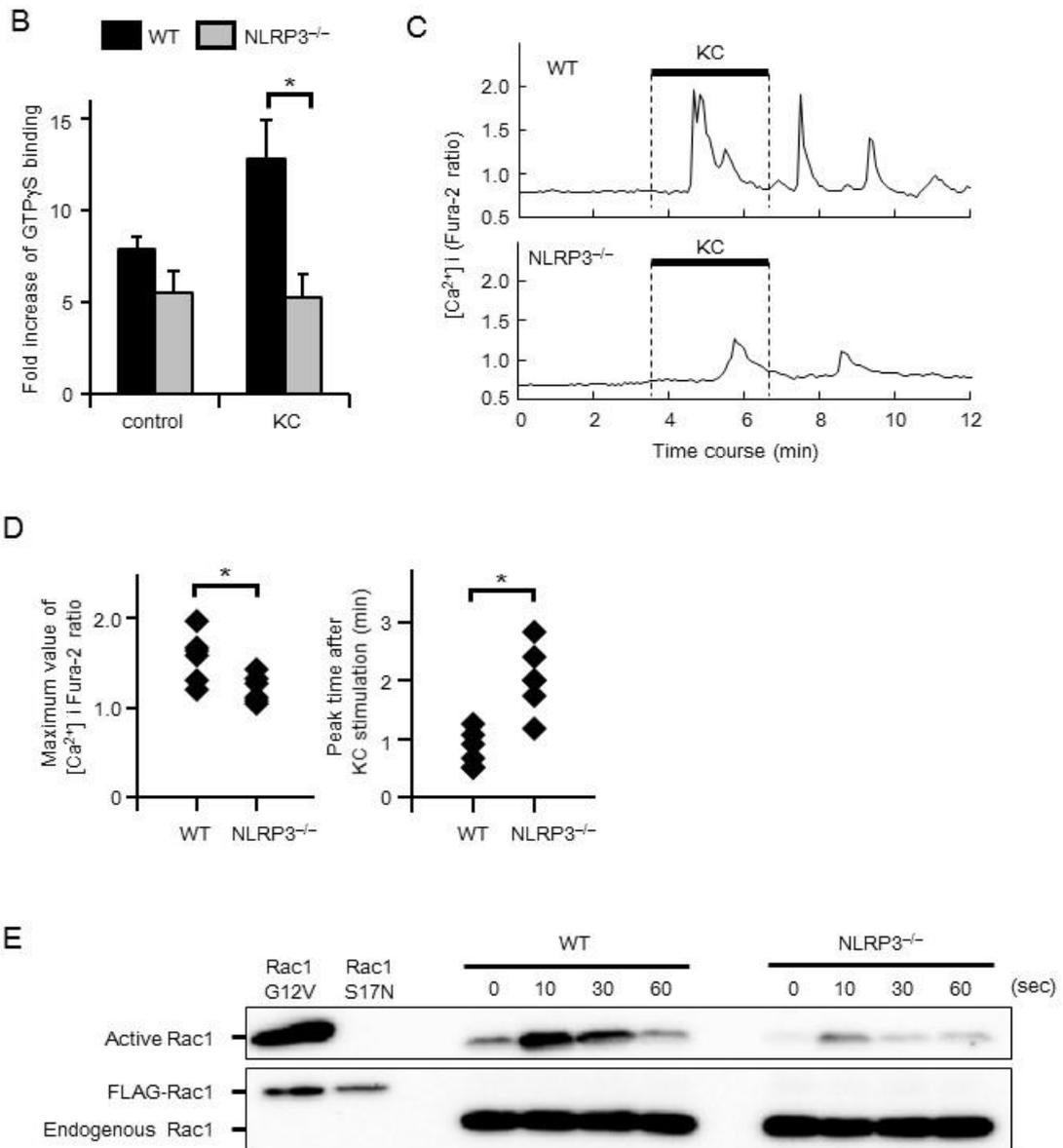
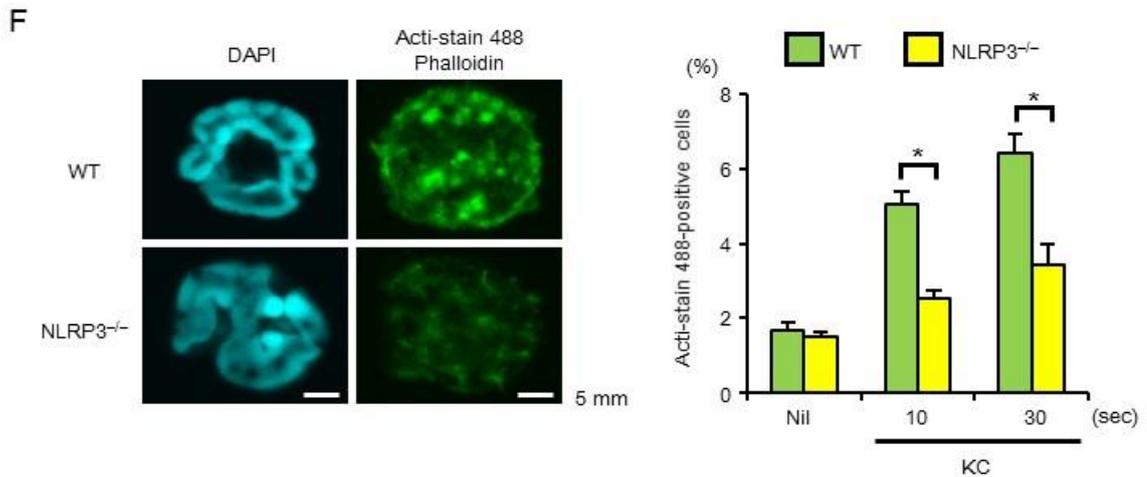


図 11 NLRP3^{-/-}マウスにおける好中球機能

A: フローサイトメトリー法を用い、好中球表面のケモカイン受容体 CXCR1、CXCR2 発現を検討した。(n=3)





B: シンチレーションカウンターを用いて KC 刺激 5 分後の好中球膜分画に対する [³⁵S]GTPγS 結合能を測定した。 (n=3)

C: 2 波長励起型の Fura-2 蛍光プローブを用いて、KC 刺激に対する好中球内カルシウムイオン濃度の変化を測定した。

D: C で得られたグラフから細胞内カルシウムイオン濃度の最大値 (左) と、KC 刺激後にピーク値を迎えるまでの時間 (右) を計測し、プロットした。 (n=5)

E: 各好中球を 0 秒、10 秒、30 秒、60 秒間刺激した後、細胞溶解液を作成し、pull-down assay 法で活性化型 Rac1 を検出した。活性化型 Rac1 の陽性コントロールとして恒常的活性化型変異体 Rac1G12V を、また陰性コントロールとして恒常的非活性化型変異体 Rac1S17N を用いた。

F: KC 刺激によるアクチン重合を Acti-stain 488 phalloidin を用いて染色した。共焦点レーザー顕微鏡画像 (左) と、フローサイトメトリー法による定量化 (右) を示した。 (n=3)

データは平均値±標準誤差で表示し、p<0.05 を有意差ありとした。

第4章 考察

この研究で得られた結果をまとめると、下記のようなになる。①虚血再灌流刺激により NLRP3 の発現が上昇する、②ASC^{-/-}マウス、Casp1^{-/-}マウスでは WT と同等であったが、NLRP3^{-/-}マウスでのみ虚血再灌流後の肝障害改善を認めた、③NLRP3^{-/-}マウスでは、肝臓への好中球浸潤、炎症性サイトカイン発現、活性酸素種産生や TUNEL 陽性細胞数の低下を認めた、④骨髄移植モデルでの解析により、骨髄由来細胞のみでなく、非骨髄由来細胞の持つ NLRP3 も重要な働きをしていた、⑤細胞実験から、G 蛋白質共役受容体を KC 刺激した際の GTP 結合能力は NLRP3^{-/-}好中球で低く抑えられていた、⑥NLRP3^{-/-}好中球では、KC 刺激による細胞内カルシウムの上昇、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化、アクチン線維の重合化が抑えられることにより、好中球遊走能の低下を引き起こしていた。つまり、NLRP3 はケモカインシグナル経路を介して好中球機能を制御することにより、肝臓虚血再灌流障害の病態生理に深く関与していることがわかった。特に重要なのは、この NLRP3 の持つ作用は、インフラマソームとは独立した機能であるという点である (図 12)。

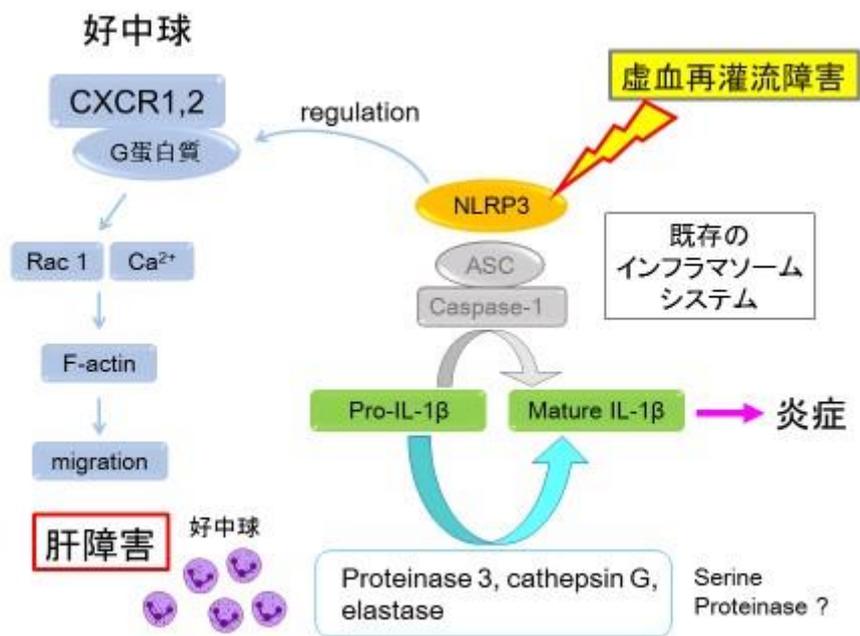


図 12 インフラマソームとは独立した NLRP3 による好中球遊走能制御機序

これまでに肝臓以外の臓器において虚血再灌流障害に対するインフラマソームの関与が報告されているが(6) (22)、肝臓においてどのようにインフラマソームが誘導されるか未だ不明である。本研究では、肝臓の虚血再灌流後に起こる無菌性炎症にはインフラマソームが関与しているとの仮説を立て研究を開始した。しかし驚くべきことに、 $ASC^{-/-}$ マウス、 $Casp1^{-/-}$ マウスでは WT と同等であったが、 $NLRP3^{-/-}$ マウスでのみ虚血再灌流後肝障害の改善が認められた。インフラマソームの定義は、caspase-1 を活性化させる分子プラットフォームであることより、この $NLRP3^{-/-}$ マウスで認められた現象は、インフラマソームとは独立した、NLRP3 独自の働きによるものと言える。

近年、インフラマソーム構成分子としての役割とは別の ASC や NLRP3

が持つ独自の作用も報告されてきている。例として、Ippagunta らは、ASC はインフラマソームとは独立し、Dock2 の発現を介してリンパ球の遊走と樹状細胞の抗原取り込みを制御し獲得免疫反応に寄与していると報告している(23)。Taxman らは、MAP キナーゼの活性化やケモカインの誘導というインフラマソームとは独立した ASC の機能についても報告している(24)。本研究と同様の結果は、腎臓の虚血再灌流モデルを使った実験で Shigeoka らが報告している(25)。腎臓でも肝臓同様、ASC^{-/-}マウス、Casp1^{-/-}マウスでは WT と同等であったが、NLRP3^{-/-}マウスでのみ虚血再灌流後の腎障害改善を認めており、腎虚血再灌流障害の病態には、NLRP3 依存、インフラマソーム非依存経路が重要であると結論づけている。本研究においても、NLRP3 の持つインフラマソーム非依存性の新しい機能が示されており、特に好中球の持つ NLRP3 が虚血再灌流障害に重要であるというデータが得られている。

肝臓虚血再灌流後の炎症反応とそれに続く組織障害形成過程で特に重要な働きをしているのが好中球である(3) (26)。虚血再灌流刺激により、肝実質から KC 等ケモカイン分泌が誘導され、組織中に好中球が浸潤していく。浸潤好中球は、大量の活性酸素種や炎症性サイトカインを産生し、組織障害を増悪させる。炎症性サイトカインである IL-1 β と IL-1 受容体によるシグナル伝達系は、血管内皮の接着分子発現誘導に重要であり(27)、インフラマソームの活性化は好中球の遊走に大きな影響を及ぼしている可能性がある。しかしながら本研究では、NLRP3^{-/-}マウスでのみ肝障害と肝臓への好中球集積が劇的に抑制されていた。NLRP3^{-/-}好中球では、3 量体 G 蛋白質の活性化、細胞内カルシウムの上昇、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化、アクチン線維の重合化、そして細胞の遊走というケモカイン刺激による一連のシグナル伝達経路が抑制されていた。これらの所見は、NLRP3

欠損マウスで観察された肝障害抑制メカニズムの分子機序を説明するものと考えられる。

ごく最近、Kamo らも ASC^{-/-}マウスを用いた肝臓虚血再灌流障害モデルについて報告している(28)。この報告では、ASC^{-/-}マウスでは炎症、肝障害ともに抑えられており、その機序として ASC を介したインフラマソーム活性化と IL-1 β 産生が重要であると述べている。産生された IL-1 β により HMGB-1 が誘導され、更にその HMGB-1 が TLR-4 を刺激し炎症反応を促進するという、インフラマソームの関与とその下流の経路を示している。更に Huang らは、NLRP3^{-/-}と Casp1^{-/-}マウスを用いた実験を行い、両マウスともに虚血再灌流障害が抑制されたと報告している。Huang らによると再灌流後肝障害にはインフラマソームの活性化が重要であり、それには障害肝より放出された細胞外ヒストンがエンドソームに取り込まれ、エンドソーム内の TLR-9 を介してミトコンドリア由来の活性酸素を産生、インフラマソームを活性化させるためとしている(29)。本研究とこれらの報告とでは結果の不一致がある。明確な理由はわからないが、本研究を含むその他の報告群(17) (30)と Kamo らの研究では、障害モデル作成時のプロトコールに違いがあり、本研究などで虚血時間を 60 分に設定しているのに対し、Kamo らは 90 分としていることで、より肝臓への侵襲は強いものと考えられる。虚血再灌流モデルでのインフラマソームの機能は、肝障害の重症度とその炎症反応の程度に依存している可能性がある。

Weglinski, Kamo らは、本研究との相違について、室温等小さな環境の変化が肝臓虚血再灌流モデルの肝障害に影響を及ぼすため、同一の実験者、同一の実験環境等、常に安定した条件下で実験を行う必要があると述べている(31)。彼らはまた、虚血再灌流障害で作動する様々な TLR やインフラマソーム構成分子は、虚血再灌流の各ステージ、各細胞内でそれぞれ異なる

っているのではないかというアイデアも提示している(31)。

IL-1 β という炎症性サイトカインが一般的な炎症反応において重要であることは疑いようのないことだが、肝臓虚血再灌流障害における役割は未だ一定の見解を得ていない。Kato らは、WT と IL-1R1^{-/-}マウスとで血清 ALT 値に差は無く、肝障害形成における IL-1 β の役割は限定的と報告している(32)。それとは逆に、Tan らは、虚血再灌流後の肝臓では IL-1 β の発現が上昇しており、IL-1R1^{-/-}、IL-1 受容体拮抗薬 Anakinra を用いた検討で、肝障害、炎症、好中球浸潤等の改善を認めたと報告している(26)。本研究での IL-1 β ^{-/-}マウスを用いた実験では肝障害の抑制という結果が得られ、これまでの結果も考え合わせると、インフラマソーム非依存的な IL-1 β による炎症反応が重要であると推測された。好中球における IL-1 β 産生機構については、好中球エラスターゼやプロテイナーゼ 3 等の好中球由来セリンプロテアーゼが主要な働きをしており、caspase-1 の作用は非常に少ないとする報告もある(33) (34) (35) (36)。Guma らは、Casp1^{-/-}マウスから分離した好中球でも IL-1 β プロセッシングが認められると報告しており(34)、Menzel らは、外傷性出血性ショックモデルでは、caspase-1 を欠損させても肝障害や炎症反応に対し保護的に作用しなかったと報告している(37)。肝虚血再灌流障害におけるインフラマソームと IL-1 β の役割は、まだまだ不明な点も多く、今後の研究結果が待たれる。

本研究で行った骨髄移植モデルでの検討からは、骨髄由来細胞 (好中球など) の持つ NLRP3 のみならず、肝臓に存在する非骨髄由来細胞の持つ NLRP3 も虚血再灌流病態に重要であることがわかった。Watanabe らは、NLRP3 や ASC といったインフラマソーム構成分子は肝臓星細胞内にも存在し、肝臓線維化の制御に寄与していると報告している(38)。星細胞を初めとする種々の非実質細胞も虚血再灌流病態に関与していることが推測さ

れるが、これ支持するデータとして、Kawaguchiらは、心臓の虚血再灌流モデルにおいては心臓線維芽細胞内インフラマソームの活性化が重要であると報告している(9)。また実験手技上の限界も影響している可能性がある。本研究で用いた手法では、骨髄抑制状態を得るためマウスに9Gyのガンマ線全身照射を行っている。しかし肝臓に内在する肥満細胞やKupffer細胞などは放射線にある程度の耐性を持っており、照射後も残存細胞を少なからず認めるとの報告もある(39)(40)。これらの細胞の持つNLRP3やASCの影響を完全に除くことができないことも骨髄移植モデル実験において考慮しておくべき部分である。

第5章 おわりに

本研究により、好中球浸潤を主体とする肝臓虚血再灌流障害において、NLRP3はケモカイン誘導性の好中球シグナル伝達を制御していることが明らかとなった。この制御機構は、ASCやcaspase-1といったインフラマソームとしての働きとは独立した、これまでに知られていない知見であり、虚血再灌流後の肝臓における無菌性炎症を説明する新たなメカニズムの一つと考えられる。

NLRP3の重要な機能は明らかになったが、実際にNLRP3がどのような分子と直接結合し、3量体G蛋白質シグナル伝達を修飾しているかというところまでは検討を進めることができなかった。シグナル伝達の鍵となる分子を阻害する、またはNLRP3に結合する分子を免疫沈降法などによって探索するなどの方法により、ASC以外のNLRP3結合蛋白、NLRP3独自の機構を詳細に検討していくことは、今後の研究分野として非常に興味深いテーマと考えられる。個々のインフラマソーム構成分子独自の働きを解明していくことは、無菌性炎症疾患研究の新たな側面を切り開き、新しい治療標的の発見につながると期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、厳しくも丁寧なご指導を頂いた自治医科大学大学院消化器外科学分野 安田是和教授、自治医科大学大学院炎症・免疫研究部 高橋将文教授に深く感謝致します。

また詳細な実験方法の習得や研究アイデアの議論等日々の研究生活を支えて下さった自治医科大学消化器外科学教室、自治医科大学炎症・免疫研究部スタッフの皆様にも心より御礼申し上げます。

引用文献

1. 厚生労働省. 平成 25 年 (2013) 人口動態統計. 2014.
2. 嶋田紘、渡會伸治. 肝再生と肝不全 拡大肝切除術の確立を目指して. 2006.
3. Jaeschke, H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 290: G1083-G1088. 2006.
4. Zhai, Y., R. W. Busuttil, and J. W. Kupiec-Weglinski. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11: 1563-1569. 2011.
5. Martinez-Mier, G., L. H. Toledo-Pereyra, J. E. McDuffie, R. L. Warner, and P. A. Ward. Neutrophil depletion and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *Journal of Investigative Surgery* 14: 99-107. 2001.
6. Davis, B. K., H. Wen, and J. P. Y. Ting. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. In *Annual Review of Immunology, Vol 29*. W. E. Paul, D. R. Littman, and W. M. Yokoyama, eds. 707-735. 2011.
7. Takahashi, M. Role of the Inflammasome in Myocardial Infarction. *Trends in Cardiovascular Medicine* 21: 37-41. 2011.
8. Strowig, T., J. Henao-Mejia, E. Elinav, and R. Flavell. Inflammasomes in

- health and disease. *Nature* 481: 278-286. 2012.
9. Kawaguchi, M., M. Takahashi, T. Hata, Y. Kashima, F. Usui, H. Morimoto, A. Izawa, Y. Takahashi, J. Masumoto, J. Koyama, M. Hongo, T. Noda, J. Nakayama, J. Sagara, S. i. Taniguchi, and U. Ikeda. Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 123: 594-+. 2011.
 10. Yajima, N., M. Takahashi, H. Morimoto, Y. Shiba, Y. Takahashi, J. Masumoto, H. Ise, J. Sagara, J. Nakayama, S. i. Taniguchi, and U. Ikeda. Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation* 117: 3079-3087. 2008.
 11. Usui, F., K. Shirasuna, H. Kimura, K. Tatsumi, A. Kawashima, T. Karasawa, S. Hida, J. Sagara, S. i. Taniguchi, and M. Takahashi. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425: 162-168. 2012.
 12. Lamkanfi, M., J. L. Mueller, A. C. Vitari, S. Misaghi, A. Fedorova, K. Deshayes, W. P. Lee, H. M. Hoffman, and V. M. Dixit. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *Journal of Cell Biology* 187: 61-70. 2009.
 13. Yamamoto, M., K. Yaginuma, H. Tsutsui, J. Sagara, X. Guan, E. Seki, K. Yasuda, S. Akira, K. Nakanishi, T. Noda, and S. Taniguchi. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes to Cells* 9: 1055-1067. 2004.
 14. Horai, R., M. Asano, K. Sudo, H. Kanuka, M. Suzuki, M. Nishihara, M.

- Takahashi, and Y. Iwakura. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta, IL-1 alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *Journal of Experimental Medicine* 187: 1463-1475. 1998.
15. Kuida, K., J. A. Lippke, G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, M. S. S. Su, and R. A. Flavell. ALTERED CYTOKINE EXPORT AND APOPTOSIS IN MICE DEFICIENT IN INTERLEUKIN-1-BETA CONVERTING-ENZYME. *Science* 267: 2000-2003. 1995.
 16. Tsutsui, H., N. Kayagaki, K. Kuida, H. Nakano, N. Hayashi, K. Takeda, K. Matsui, S. Kashiwamura, T. Hada, S. Akira, H. Yagita, H. Okamura, and K. Nakanishi. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* 11: 359-367. 1999.
 17. Abe, Y., I. N. Hines, G. Zibari, K. Pavlick, L. Gray, Y. Kitagawa, and M. B. Grisham. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 46: 1-7. 2009.
 18. Morimoto, H., M. Takahashi, A. Izawa, H. Ise, M. Hongo, P. E. Kolattukudy, and U. Ikeda. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circulation Research* 99: 891-899. 2006.
 19. Filardo, E., J. Quinn, Y. Pang, C. Graeber, S. Shaw, J. Dong, and P. Thomas. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148: 3236-3245. 2007.

20. Dezaki, K., B. Damdindorj, H. Sone, O. Dyachok, A. Tengholm, E. Gylfe, T. Kurashina, M. Yoshida, M. Kakei, and T. Yada. Ghrelin Attenuates cAMP-PKA Signaling to Evoke Insulinostatic Cascade in Islet beta-Cells. *Diabetes* 60: 2315-2324. 2011.
21. Teoh, N. C. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26: 180-187. 2011.
22. Chen, G. Y., and G. Nunez. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology* 10: 826-837. 2010.
23. Ippagunta, S. K., R. K. S. Malireddi, P. J. Shaw, G. A. Neale, L. Vande Walle, D. R. Green, Y. Fukui, M. Lamkanfi, and T.-D. Kanneganti. The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. *Nature Immunology* 12: 1010-U1122. 2011.
24. Taxman, D. J., E. A. Holley-Guthrie, M. T.-H. Huang, C. B. Moore, D. T. Bergstralh, I. C. Allen, Y. Lei, D. Gris, and J. P.-Y. Ting. The NLR Adaptor ASC/PYCARD Regulates DUSP10, Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK), and Chemokine Induction Independent of the Inflammasome. *Journal of Biological Chemistry* 286: 19605-19616. 2011.
25. Shigeoka, A. A., J. L. Mueller, A. Kambo, J. C. Mathison, A. J. King, W. F. Hall, J. d. S. Correia, R. J. Ulevitch, H. M. Hoffman, and D. B. McKay. An Inflammasome-Independent Role for Epithelial-Expressed Nlrp3 in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Immunology* 185: 6277-6285. 2010.
26. Tan, Z., R. Jiang, X. Wang, Y. Wang, L. Lu, Q. Liu, S. G. Zheng, B. Sun,

- and B. Ryffel. ROR γ 1⁻ neutrophils play a critical role in hepatic ischemiareperfusion injury. *Journal of Molecular Cell Biology* 5: 143-146. 2013.
27. Garlanda, C., C. A. Dinarello, and A. Mantovani. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 39: 1003-1018. 2013.
 28. Kamo, N., B. Ke, A. A. Ghaffari, X.-d. Shen, R. W. Busuttil, G. Cheng, and J. W. Kupiec-Weglinski. ASC/Caspase-1/IL-1 beta Signaling Triggers Inflammatory Responses by Promoting HMGB1 Induction in Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Hepatology* 58: 351-362. 2013.
 29. Huang, H., H.-W. Chen, J. Evankovich, W. Yan, B. R. Rosborough, G. W. Nace, Q. Ding, P. Loughran, D. Beer-Stolz, T. R. Billiar, C. T. Esmon, and A. Tsung. Histones Activate the NLRP3 Inflammasome in Kupffer Cells during Sterile Inflammatory Liver Injury. *Journal of Immunology* 191: 2665-2679. 2013.
 30. Kuboki, S., T. Shin, N. Huber, T. Eismann, E. Galloway, R. Schuster, J. Blanchard, M. J. Edwards, and A. B. Lentsch. Hepatocyte signaling through CXC chemokine receptor-2 is detrimental to liver recovery after ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology* 48: 1213-1223. 2008.
 31. Kupiec-Weglinski, J. W., and N. Kamo. Reply: To PMID 23408710. *Hepatology* 58: 2212-2213. 2013.
 32. Kato, A., C. Gabay, T. Okaya, and A. B. Lentsch. Specific role of interleukin-1 in hepatic neutrophil recruitment after ischemia/reperfusion. *American Journal of Pathology* 161: 1797-1803. 2002.
 33. Karmakar, M., Y. Sun, A. G. Hise, A. Rietsch, and E. Pearlman. Cutting Edge: IL-1 beta Processing during *Pseudomonas aeruginosa* Infection Is

- Mediated by Neutrophil Serine Proteases and Is Independent of NLRC4 and Caspase-1. *Journal of Immunology* 189: 4231-4235. 2012.
34. Guma, M., L. Ronacher, R. Liu-Bryan, S. Takai, M. Karin, and M. Corr. Caspase 1-Independent Activation of Interleukin-1 beta in Neutrophil-Predominant Inflammation. *Arthritis and Rheumatism* 60: 3642-3650. 2009.
35. Coeshott, C., C. Ohnemus, A. Pilyavskaya, S. Ross, M. Wieczorek, H. Kroona, A. H. Leimer, and J. Cheronis. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1 beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 6261-6266. 1999.
36. Joosten, L. A. B., M. G. Netea, G. Fantuzzi, M. I. Koenders, M. M. A. Helsen, H. Sparrer, C. T. Pham, J. W. M. van der Meer, C. A. Dinarello, and W. B. van den Berg. Inflammatory Arthritis in Caspase 1 Gene-Deficient Mice Contribution of Proteinase 3 to Caspase 1-Independent Production of Bioactive Interleukin-1 beta. *Arthritis and Rheumatism* 60: 3651-3662. 2009.
37. Menzel, C. L., Q. Sun, P. A. Loughran, H.-C. Pape, T. R. Billiar, and M. J. Scott. Caspase-1 Is Hepatoprotective during Trauma and Hemorrhagic Shock by Reducing Liver Injury and Inflammation. *Molecular Medicine* 17: 1031-1038. 2011.
38. Watanabe, A., M. A. Sohail, D. A. Gomes, A. Hashmi, J. Nagata, F. S. Sutterwala, S. Mahmood, M. N. Jhandier, Y. Shi, R. A. Flavell, and W. Z. Mehal. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*

296: G1248-G1257. 2009.

39. Soule, B. P., J. M. Brown, N. M. Kushnir-Sukhov, N. L. Simone, J. B. Mitchell, and D. D. Metcalfe. Effects of gamma radiation on Fc epsilon RI and TLR-Mediated mast cell activation. *Journal of Immunology* 179: 3276-3286. 2007.
40. Klein, I., J. C. Cornejo, N. K. Polakos, B. John, S. A. Wuensch, D. J. Topham, R. H. Pierce, and I. N. Crispe. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 110: 4077-4085. 2007.