

氏名	井上賢之
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 472 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 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	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
論文審査委員	(委員長) 教授 吉尾 卓 (委員) 教授 磯田 憲夫 准教授 小宮根 真弓

論文内容の要旨

1 研究目的

肝臓の虚血再灌流障害は、肝切除・肝移植後の肝不全を引き起こす重大な原因である。特徴としては、虚血状態に陥った肝実質細胞から炎症性サイトカインやケモカインが放出され、それに続く血液の再灌流により虚血組織に好中球主体の白血球浸潤を起こす炎症免疫反応といえる。

近年、痛風や動脈硬化などの無菌性炎症において、自然免疫系細胞に形成されるインフラマソームと呼ばれる分子複合体が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。なかでも、パターン認識受容体の一つである Nod-like receptor に属する NLRP3 とアダプター分子 ASC、そして caspase-1 とで構成される NLRP3 インフラマソームが無菌性炎症に関与することが示されている。細胞内環境の変化によりインフラマソーム形成が促進されると、IL-1 β 変換酵素として知られる caspase-1 が活性化し、IL-1 β 前駆体が切断されて成熟型 IL-1 β となり、分泌され炎症反応が引き起こされる。そこで、肝虚血再灌流モデルにおいても、NLRP3 インフラマソームが炎症反応惹起と、その後の組織障害に関与しているとの仮説を立て、本研究を行った。

2 研究方法と研究成果

野生型 (WT) マウスに 70% 部分肝虚血再灌流モデル (虚血時間 60 分) を作成したところ、NLRP3 mRNA 発現の有意な増加を認め、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 ($-/-$ で表記) 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 $-/-$ マウスでは肝障害度を示す血清 ALT 値、加えて HE 染色による肝障害部面積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、有意な差を認めなかった。インフラマソームは IL-1 β 産生機構として重要であることから肝組織中の IL-1 β 濃度を測定した結果、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 の産生が抑制されていなかった。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。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。

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。一方、浸潤マクロファージに関しては、WT と NLRP3^{-/-}マウスとの間で有意な差を認めなかった。NLRP3^{-/-}マウスでは、好中球浸潤が有意に抑制していたことから、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を持つと推測した。そこで、WT と NLRP3^{-/-}マウスから好中球を採取し、低酸素環境下で初代肝細胞との共培養を試みたが、WT と NLRP3^{-/-}好中球で肝細胞に対する傷害能に差を認めなかった。また、好中球は障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誘導され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。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 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。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。加えて、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、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化、アクチン重合といった現象も NLRP3^{-/-}マウス由来の好中球で抑制されていた。

3 考察

虚血再灌流障害において炎症が重要な役割を果たしていることは明らかであるが、肝虚血再灌流において、どのようにしてこの無菌性炎症が惹起されているかはわかっていない。本研究では、無菌性炎症とそれに続く肝障害がインフラマソームを介しているとの仮説を立てて検討を行った。インフラマソームの定義は caspase-1 を活性化する分子プラットフォームであるが caspase-1 およびその上流の ASC の欠損では肝障害が抑制されず、NLRP3 および IL-1 β の欠損により肝障害が抑制されることを見出した。この所見は、NLRP3 がインフラマソームとは独立して肝虚血再灌流障害に寄与していることを示唆している。一方、虚血再灌流肝における IL-1 β 濃度の測定では、NLRP3 欠損では IL-1 β が抑制されるが、ASC や caspase-1 の欠損では抑制されないことも明らかとなった。つまり、これらの結果から、NLRP3 が関与するインフラマソーム非依存性の IL-1 β 産生機構が重要であることが示唆された。さらに本研究によって、NLRP3 がケモカイン刺激に対する好中球遊走を制御するという、NLRP3 の持つインフラマソームとは独立した新たな機能も明らかとした。IL-1 β 前駆体を切断して成熟型 IL-1 β を産生する酵素として、好中球由来のプロテイナーゼ 3 (proteinase 3) やエラスターゼ (elastase) が知られている。本研究の結果を総合的に考えると、NLRP3 が欠損した好中球では虚血再灌流肝への遊走と浸潤が抑制されるため、好中球からの IL-1 β 切断酵素分泌が減少、最終的に成熟型 IL-1 β 産生が低下することで、その後の炎症反応と肝障害が軽減すると考えられた。

4 結論

本研究では、これまでに知られていなかったインフラマソームとは独立した NLRP3 の新たな機能を明らかにしたとともに、好中球が関与する疾患における NLRP3 の治療標的としての可能性が

示された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、肝臓虚血再灌流障害の発症機序にインフラマソームが関与しているとの仮説を立て、インフラマソームの NPLR3 は肝臓虚血再灌流障害には関与しているが、インフラマソームの他の構成分子である ASC と Caspase-1 は関与していない、つまりインフラマソームとは独立した機能で NPLR3 からケモカインシグナル経路を介した好中球機能の制御により肝臓虚血再灌流障害が出現していることを突き止めたことに大きな意義がある。その結果と考察が主要論文(英文)として既に *Journal of Immunology* (Current impact factor 5.36) にパブリッシュされている。これらの内容を日本語論文としてまとめたものが本学位論文であり、その内容、結果、考察は、斬新かつ独創的で、十分学位に値するものと三審査委員一致で評価された。

最終試験の結果の要旨

試問における発表内容は、論文内容をさらに詳細に説明するものであり、研究内容に対する理解が一層深まる発表であった。試問時に各審査委員から数カ所の疑問点や改善点(試問では臨床における肝臓虚血再灌流障害・インフラマソームの基礎的知識について判り易く説明されたが、本学位論文「第1章はじめに」では平易に説明されていないので図等を追加して初学者にも判りやすく記載して欲しい、実験における虚血時間を60分間とした理由等)が呈示された。実験における虚血時間を60分間とした理由に関してはその場で納得できる説明が申請者よりなされた。この様に審査委員からは軽微な質問で、研究成果そのものに対する懸念は全くなかった。その後速やかに修正論文が提出され、修正論文審査を各々の三審査委員で行い、指摘された点は全て修正が行われ、初学者にもわかりやすい内容となっていると評価されたため、これをもって最終的に合格の判定となった。