

表 題 ドキシソルビシン心筋障害におけるインフラマソームの役割の解明

副 題 NLRP3 Regulates Interleukin-10 Production and Contributes to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity Independently of Interleukin-1 $\beta$

論文の区分 博士課程

著 者 名 小林 基

担当指導教員氏名 高橋 将文 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系  
血液・免疫疾患学  
炎症免疫学

2016年1月8日申請の学位論文

## 目次

ページ

略語一覧	3
第1章 はじめに	6
第2章 実験材料と方法	9
2-1. 使用動物および動物モデルの作成	
2-2. 心臓超音波検査	
2-3. 組織学的解析	
2-4. 血漿 CK、CK-MB、LDH 測定	
2-5. Real-time RT-PCR 法	
2-6. フローサイトメトリー法	
2-7. ELISA 法	
2-8. 骨髄移植モデルの作成	
2-9. 細胞培養	
2-10. LDH の測定	
2-11. ウェスタンブロット法	
2-12. 免疫細胞染色法	
2-13. アポトーシスの検出	
2-14. マウス骨髄由来細胞の採取およびマクロファージへの分化	
2-15. 統計学的解析	
第3章 結果	20
3-1. 高用量ドキソルビシン心筋傷害	
3-2. NLRP3 <sup>-/-</sup> マウスにおけるドキソルビシン心筋傷害	

3-3.	アポトーシスおよび酸化ストレス	
3-4.	ドキソルビシン投与による心組織中の細胞浸潤およびサイトカイン 発現	
3-5.	骨髄移植モデルにおけるドキソルビシン心筋傷害	
3-6.	マクロファージにおけるドキソルビシン添加による IL-1 $\beta$ 産生能の評価	
3-7.	マクロファージにおける TLR 刺激による IL-10 産生能の評価	
3-8.	マクロファージにおける TLR 刺激による IL-10 産生経路の検討	
3-9.	IL-10 遺伝子導入によるドキソルビシン心筋傷害への影響	
第 4 章	考察	41
第 5 章	おわりに	47
	謝辞	48
	引用文献	49

## 略語一覽

AAV: adeno-associated virus

ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

ATP: adenosine triphosphate

APC: allophycocyanin

Arg1: arginase-1

BMDM: bone marrow-derived macrophages

BMT: bone marrow transplantation

BSA: bovine serum albumin

BTK: Bruton's tyrosine kinase

Bnp: brain natriuretic peptide

CK-MB: creatine kinase-myocardial band

CPK: creatine phospho kinase

DAB: diaminobenzidine substrate

DHE: dihydroethidium

EF: ejection fraction

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FCS: fetal calf serum

FITC: fluorescein isothiocyanate

%FS: % fractional shortening

GFP: green fluorescent protein

GSK3 $\beta$ : glycogen synthase kinase 3 $\beta$

Gapdh: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HE: Hematoxylin-Eosin

HMGB1: high-mobility group box 1

HRP: horseradish peroxidase

IL-10: interleukin-10

IL-1 $\beta$ : interleukin-1 beta

iNos: induced nitric oxide synthase

LDH: lactate dehydrogenase

LPS: lipopolysaccharide

LV: left ventricle

LVEDD: LV end-diastolic diameter

LVESD: LV end-systolic diameter

NLR: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor

NLRP3: NLR family pyrin domain-containing 3

PBS: phosphate-Buffered Saline

PE: phycoerythrin

PVDF: polyvinylidene difluoride

Pam3CSK4: Pam3CysSerLys4

RIPA: radio-immunoprecipitation Assay

ROS: reactive oxygen species

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TdT: dUTP-terminal transferase

Tlr: Toll-like receptor

Tnfa: tumor necrosis factor alfa

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

WT: wild-type

## 第1章 はじめに

心不全は、日常診療においてありふれた病態であり、本邦の患者数は100万人を超え、今後も増加していくと考えられている<sup>1</sup>。様々な薬物による治療介入や非薬物療法などが試みられてきてが、いまなお、年間死亡率は3~9%と高く、再入院率は7~40%とされており、治療による十分な効果が認められているとは言い難い。また、薬物や非薬物療法に伴う医療資源の消費や医療費などの医療問題に及ぼす影響も重要な課題であり、心不全病態のより詳細な機序解明、新規治療法の開発が急務となっている。心不全の原因疾患は虚血性心疾患、心筋症、弁膜症、不整脈など多岐にわたるが、重要な原因の一つに薬物に起因するものがある。多くの薬物が心筋傷害を生じうるが、アントラサイクリン系のドキソルビシンやチロシンキナーゼ阻害薬であるトラスツズマブなどの抗悪性腫瘍薬において、生じやすいことが知られている<sup>2,3</sup>。その中でも、ドキソルビシンによる心筋傷害は最も頻度が高く<sup>4</sup>、確立した治療法がないのが現状である。ドキソルビシンは、悪性リンパ腫や肺癌、胃癌・直腸癌をはじめとする消化器癌、乳癌、骨軟部腫瘍、小児悪性固形腫瘍など、多くの悪性腫瘍に対して汎用されている薬物である。しかしながら、重篤な副作用として、心機能低下や心筋傷害、それに続く心不全などが知られており、その使用は制限されている。ドキソルビシン心筋傷害は投与後2~3日以内に発症する急性傷害と最終投与後30日から長期にわたるものでは6~10年経過後に発症する慢性傷害が知られている<sup>5</sup>。その頻度は、報告によって様々であるが、急性傷害については1~11%、慢性傷害は累積容量依存的に発症し、投与量が600 mg/m<sup>2</sup>を超えると、発症率は36%にも及ぶとされている<sup>6-8</sup>。ドキソルビシン心筋傷害の機序としては、ROS産生、アポトーシス誘導によるものなどが報告されており、また、近年では炎

症が関与していることが示唆されているが<sup>9-11</sup>、いまだ不明な点も多い。

最近、細菌が関与しない非感染性疾患における炎症、いわゆる無菌性炎症に細胞質内の蛋白複合体であるインフラマソームが重要な役割を担っていることが明らかとなってきた<sup>12</sup>。インフラマソームは、痛風や2型糖尿病、アスペクト肺など、病原体が関与しない様々な病態において、その重要性が明らかとなっており、心血管疾患においても重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>12-16</sup>。インフラマソームの中で、特に無菌性炎症において重要な役割を担っているものとして、NLRP3 インフラマソームがある。NLRP3 インフラマソームはパターン認識受容体であるNLRP3の他に、アダプター分子であるASC、IL-1 $\beta$  変換酵素としても知られているカスパーゼ1から構成される。NLRP3 インフラマソームは、主にマクロファージや好中球などの細胞で機能していることが知られているが、心臓の虚血再灌流モデルでは心臓線維芽細胞の持つNLRP3 インフラマソームが初期の炎症において重要であることが示され、炎症に果たす幅広い役割が示唆されている<sup>17</sup>。ROS や、尿酸結晶、コレステロール結晶、細胞外 ATP などの危険信号により、NLRP3 インフラマソームが形成されると、カスパーゼ1の活性化を介して、IL-1 $\beta$  前駆体が切断される。IL-1 $\beta$  前駆体は切断されることで成熟型へと変換され、成熟型IL-1 $\beta$  が細胞外に分泌されることによって炎症が惹起される (図 1)。ドキソルビシン投与後の心臓においては、炎症細胞浸潤や炎症性サイトカインの増加など、炎症の関与も示唆されている。このことから、本研究ではドキソルビシン心筋傷害にNLRP3 インフラマソームが関与していると考え、この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 およびIL-1 $\beta$  の欠損 (<sup>-/-</sup>と表記) マウスを用いて、ドキソルビシン誘発性心筋傷害モデルを作製し検討を行った。



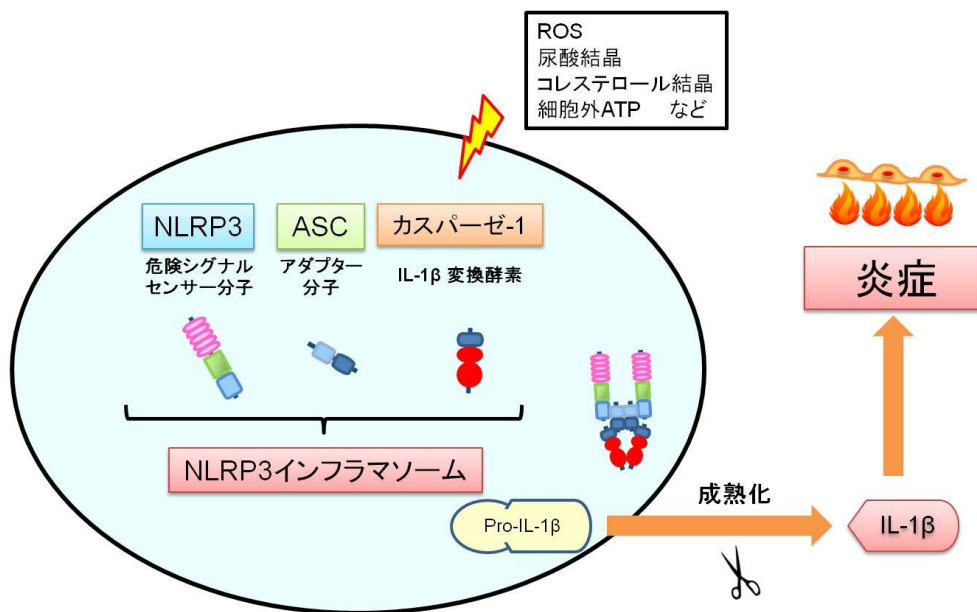


図 1. NLRP3 インフラマソーム

ROS や尿酸結晶、コレステロール結晶、細胞外 ATP などの危険信号により NLRP3、ASC、カスパーゼ 1 が会合し、NLRP3 インフラマソームを形成する。この蛋白複合体により、カスパーゼ 1 が活性型となり、Pro-IL-1 $\beta$  を切断する。NLRP3 インフラマソームによって成熟化した IL-1 $\beta$  が、細胞外に分泌され、炎症が惹起される。

## 第2章 実験材料と方法

### 2-1. 使用動物および動物モデルの作成

本研究における全ての動物実験は自治医科大学動物実験規定（平成22年規定第51号）に則って施行した。実験動物としては、C57BL/6J（野生型：WT：SLC, Japan）、NLRP3<sup>-/-</sup>マウス（Dr. Vishva M. Dixit（Genentech）の好意により提供）、IL-1β<sup>-/-</sup>マウス（Dr. 岩倉（東京理科大学）の好意により提供）を用いた。NLRP3<sup>-/-</sup>マウスおよびIL-1β<sup>-/-</sup>マウスは、以前の報告に記載された方法に従い作成され<sup>18</sup>、<sup>19</sup>、12世代以上C57BL/6Jマウスとバッククロスを行った。マウスは温度、湿度および明暗時間（それぞれ12時間をサイクルとした）を一定とした環境下において、自由飲水・自由摂食下で飼育し、8~12週齢の個体（雄）を実験に用いた。

腹腔内にドキシソルビシン（Adryacin; Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Japanより提供）を単回投与することでドキシソルビシン誘発性急性心筋傷害モデル（以下、ドキシソルビシン心筋傷害モデル）を作成し<sup>20</sup>、コントロール群は生理食塩水を投与した。

### 2-2. 心臓超音波検査

小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo2100（VisualSonics Inc., Canada）を用いて心臓超音波検査を施行した<sup>17</sup>。マウスをイソフルランによる吸入全身麻酔下に、仰臥位にした。四肢を牽引し、固定テーブルに固定し、胸部を除毛したのち30MHzのプローブを用いて施行した。乳頭筋レベルにおいて心臓左室（LV）短軸像を描出し、Mモード画像を取得した。得られたMモード画像より、左室拡張期末期径（LVEDD）、左室収縮期末期径（LVESD）を計測し、

イメージングシステム内の解析ソフトウェア（VS-11948）を用いて左室内径短縮率（%FS）、左室収縮率（EF）を算出した。

### 2-3. 組織学的解析

マウスを安楽死させ、0.9%生理食塩水を用いて灌流脱血処理を行った後に心臓を採取した。採取した心臓を O.C.T. compound（Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Japan）中に包埋した後、ドライアイス上で凍結し、新鮮凍結サンプルを作製した。4  $\mu\text{m}$  に薄切した切片を用いて、HE 染色を行い、組織評価を行った。免疫組織化学染色は新鮮凍結し、4  $\mu\text{m}$  に薄切した組織標本を用いて以下のようにポリマー法で行った。1% 過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼブロックを行った後、5% goat serum および 0.2% TritonX（Pharmacia Biotech Inc., USA）により室温下 1 時間の非特異反応のブロッキングを行った。4°Cで一晩、一次抗体と反応させた後、洗浄し、HistofineSimple Stain MAX PO 第一抗体（Nichirei Bioscience Inc., Japan）を室温下、1 時間反応させた。その後、DAB kit（Vector Laboratories Inc., USA）で DAB 発色させ、Hematoxylin で対比染色を行い、脱色・透徹後、封入した。同じ動物種の IgG（Vector Laboratories Inc., USA）を一次抗体の代わりに反応させたものを陰性コントロール（isotype control）として用いた。免疫組織化学染色に用いた一次抗体は以下の通りである。

抗体名	製造メーカー
Rat anti-mouse CD45 monoclonal Ab	BD Biosceinces, USA
Rat anti-mouse CD68 monoclonal Ab	AbD Serotec, UK

#### 2-4. 血漿中 CK、CK-MB、LDH 測定

マウスの後大静脈より採血した血液を遠心し、血漿を分離した。得られた血漿を、それぞれ、CK、CK-MB、LDH 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。

#### 2-5. Real-time RT-PCR 法

心組織より ISOGEN (Nippon Gene, Japan) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC, USA) を用いて RNA 濃度を測定し、2 $\mu$ g 分を逆転写酵素 (Superscript VILO cDNA Synthesis Kit:Life Technologies, USA) を用いて以下の反応条件により相補的 DNA (cDNA) を作製した。

逆転写反応条件：25 $^{\circ}$ C 10 分 $\rightarrow$ 42 $^{\circ}$ C 60 分 $\rightarrow$ 85 $^{\circ}$ C 5 分

cDNA を作製後、Takara TP 960 PCR Thermal Cycler Dice Detection System (Takara Bio Inc., Japan) を用いて以下の反応条件により Real-time RT-PCR 解析を行った。

増幅反応条件：95 $^{\circ}$ C 30 秒 $\times$ 1 サイクル $\rightarrow$  (95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒)  $\times$ 40 サイクル

プライマー配列は以下のものを用いた。

遺伝子名	Forward	Reverse
<i>Arg1</i>	5'-ACAAGACAGGGCTCCTTTCA-3'	5'-AGCAAGCCAAGGTAAAGCC-3'
<i>Bnp</i>	5'-CTGAAGGTGCTGTCCAGAT-3'	5'-GTTCTTTTGTGAGGCCTTGG-3'
<i>Gapdh</i>	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	5'-TTCGTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'
<i>Il10</i>	5'-GTTGCCAAGCCTTATCGGGAA-3'	5'-CCAGGAATTCAAATGCTCCT-3'
<i>Il1b</i>	5'-TGAAGTTGACGGACCCAAA-3'	5'-TGATGTGCTGCTGTGAGATT-3'
<i>iNos</i>	5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3'	5'-GAAGCGTTTCGGGATCTGAA-3'
<i>Tlr2</i>	5'-TGGAGACGCCAGCTCTGGCTCA-3'	5'-CAGCTTAAAGGGCGGGTCAGAG-3'

<i>Tlr4</i>	5'-AGTGGGTCAAGGAACAGAAGCA-3'	5'-CTTTACCAGCTCATTCTCACC-3'
<i>Tnfa</i>	5'-CCCCAAAGGGATGAGAAGTTC-3'	5'-GCTTGTCCTCGAATTTTGAGAA-3'

発現量は SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., Japan) を用いたインターカレーション法にて測定し、*Gapdh* を内部標準として標準曲線を用いて定量した後、各サンプル間で比較、検討を行った。

## 2-6. フローサイトメトリー法

心臓における炎症細胞についてフローサイトメトリー法を用いて評価を行った<sup>21</sup>。ドキシソルビシン投与 5 日目のマウスを安楽死させ、心臓を採取した。ヘパリンおよび 1% FCS を添加した PBS 中で細かく刻んだ後に 250 G、5 分間の遠心を行い、上清を除去した。コラゲナーゼ type I (2 mg/mL) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)、ディスパーゼ (1 mg/kg) (Sanko junyaku Co., Ltd., Japan) および DNase (Worthington Biochemical corporation, USA) の混合液中で 37°C、30 分攪拌を行った。その後、洗浄・遠心を 3 度繰り返し試行し、ACK lysing buffer を用いて溶血させ、赤血球を取り除いた。洗浄後、細胞浮遊液を得て、以下の抗体と反応させ、FACSCalibur (BD Biosciences, USA) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。陰性コントロールとして、ホスト・標識が一致した isotype control IgG を用いた。

抗体名	製造メーカー
APC-conjugated anti-CD45	eBioscience, San Diego, USA
FITC-conjugated anti-F4/80	eBioscience, San Diego, USA
PE-conjugated anti-CD11b	eBioscience, San Diego, USA

PE-conjugated anti-Ly6G	eBioscience, San Diego, USA
FITC-conjugated anti-CD45R	eBioscience, San Diego, USA
PE-conjugated anti-CD3	eBioscience, San Diego, USA
FITC-conjugated anti-CD19	eBioscience, San Diego, USA
PE-conjugated anti-CD4	eBioscience, San Diego, USA
FITC-conjugated anti-CD8	eBioscience, San Diego, USA

## 2-7. ELISA 法

培養上清中の mouse IL-1 $\beta$ 、mouse TNF- $\alpha$ 、mouse IL-10、human IL-10 濃度はサンドイッチ法による各 ELISA キット (mouse IL-1 $\beta$  (Mouse IL-1/IL-1F2 DuoSet, No. DY401; R&D Systems, USA)、mouse TNF- $\alpha$  (Mouse TNF- $\alpha$  DuoSet, No. DY410; R&D Systems, USA)、mouse IL-10 (Mouse IL-10 DuoSet, No. DY417; R&D Systems, USA) を用いて測定した。まず、各サイトカインに対する固相用抗体をプレートに 4°C 一晩吸着させた。次に、1% BSA 溶液により室温下 1 時間ブロッキングを行った後、培養上清サンプルと各種標準溶液を室温で 3 時間反応させ、洗浄を行った。次いで、一次抗体を室温で 3 時間反応させ、洗浄し、ストレプトアビジン-HRP 溶液を反応させた。その後、基質反応液 (R&D Systems, USA) を使用し、発色させ、2N 硫酸を用いて反応停止後、450 nm の吸光度を測定し、標準溶液を基準として濃度を算出した。

## 2-8. 骨髄移植 (BMT) モデルの作成

ドナー細胞の調製として、マウスを安楽死させた後、大腿骨および脛骨を取り出し、キムワイプで周囲の筋肉、腱などを鈍的に剥離した。氷冷中の PBS へ浸した後、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。その後、ACK lysing Buffer を用いて溶血させ PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を調整した。レシピエントマウスとして 6 週齢のマウスを用いた。移植前に 4.5 Gy 照射の後、3 時間後に、さらに 4.5 Gy を照射し、計 9.0 Gy の  $\gamma$  線全身照射を行った。ドナー細胞としてレシピエントマウス 1 匹あたり  $2 \times 10^6$  個の骨髄細胞を頸静脈より注入し、移植を行った。この骨髄移植モデルについては、GFP トランスジェニックマウスを用いた予備検討にて検討しており、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ができている<sup>17,22</sup>。このプロトコールに則って、以下の 3 種類の骨髄移植モデルを作製した。

ドナー	レシピエント	キメラマウスの表記
WT	WT	BMT <sup>(WT to WT)</sup>
WT	NLRP3 <sup>-/-</sup>	BMT <sup>(WT to NLRP3<sup>-/-</sup>)</sup>
NLRP3 <sup>-/-</sup>	WT	BMT <sup>(NLRP3<sup>-/-</sup> to WT)</sup>

## 2-9. 細胞培養

以前の報告をもとに<sup>17</sup>、初代心筋細胞の採取を行った。生後 1~2 日の新生仔より心臓を採取し、3~4 分割した後に 0.05% トリプシン (Invitrogen, USA) 溶液に浸漬し 37°C で 10 分間振盪した。振盪後、FCS 入りのメディウムを添加し、反

応を停止させた後、遠心し、上清を除去した。その後、0.08% コラゲナーゼ P (Roche, Germany) 溶液を加え 37°C 10 分間浸透し、心筋細胞を含む上清を氷冷中のチューブ内へ回収した。コラゲナーゼによる操作を 5 回繰り返す、回収した上清および最後に残った組織片を 70  $\mu\text{m}$  のセルストレイナーでろ過した細胞懸濁液を、遠心、回収した。上清を除去し、細胞懸濁液を調整した後、0.1% のゼラチンでコーティングした細胞培養ディッシュへ播種した。37°C で 2 時間インキュベートした後に、心筋細胞を含む上清を回収し、別の培養ディッシュへ播種し、37°C、5% 二酸化炭素濃度下で培養した。採取 2 日後に培地を交換し、その後は隔日に培地交換を行い採取 6~7 日目に実験に使用した。

チオグリコレート誘導性マウス腹腔マクロファージ (以下、腹腔マクロファージ) は以下のように採取した。まず、2 mL の 4% Brewer Modified Thioglycollate Medium (BD Biosciences, USA) をマウスに腹腔内投与した。72 時間後にマウスを安楽死させ、腹腔内に 4°C の PBS を注入し、腹腔内液を回収し、腹腔マクロファージを得た。RPMI1640 培地 (Life Technologies, USA) を用いて、37°C、5% 二酸化炭素濃度下で培養した。IL-10 産生刺激剤として、LPS (Sigma, USA)、Pam3CysSerLys4 ( Pam3CSK4 ) (Life Technologies, USA) を、各種シグナル経路の阻害のために、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) 阻害剤として LFM A-13 (Cayman chemical company, USA)、PCI32765 (AdooQ Bioscience, USA)、GSK3 $\beta$  阻害剤として SB216763 (Cayman chemical company, USA) を使用した。

脾細胞は、まず、マウスより脾臓を採取し、氷冷中の PBS へ静置した。次に、26G のシリンジを用いて、脾臓内へ PBS を 1 mL 添加後、切り込みを入れ、70  $\mu\text{m}$  のセルストレイナー上で押しつぶし、脾細胞を抽出した。抽出した懸濁液を遠心・洗浄し、ACK lysing buffer を用いて溶血させた後、PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を調製した。



## 2-10. LDH の測定

薬物投与による細胞傷害性を、LDH 活性を指標として細胞毒性検出 kit (Roche, Germany) を用いて測定を行った。Reagent A および Reagent B を混合し、反応混合液を作製した。次に 96 well プレートに測定サンプルを 50  $\mu$ L ずつ滴下し、反応混合液をサンプルと等量ずつ滴下した後、室温暗所にて 30 分静置した。静置の後、プレートリーダーで 492 nm の波長の吸光度を測定し、以下の式を用いて細胞傷害度を評価した。

$$\text{細胞傷害 (\%)} = \frac{\text{測定値} - \text{低コントロール}}{\text{高コントロール} - \text{低コントロール}} \times 100$$

低コントロール：自然に放出される LDH (未刺激サンプル)

高コントロール：最大に放出される LDH

(TritonX-100 を最終濃度 1% となるように加えたサンプル)

## 2-11. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法を用いて<sup>17,22</sup>、IkB $\alpha$ 、ERK1/2、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2)、p38、リン酸化 p38 (p-p38) の蛋白質発現を解析した。腹腔マクロファージから RIPA buffer を用いて細胞溶解液を作製し、laemmli サンプルバッファーに調節した後、SDS-PAGE を行った。分離後、PVDF メンブレンにブロットし、2% カゼイン TBS にて室温下で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体を 4°C で一晩反応させ、洗浄の後、HRP 標識二次抗体を室温、1 時間反応させた。Western BLoT HRP chemiluminescent Substrate (Takara Bio Inc., Japan) を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 Mini (GE healthcare Life

Sciences, USA) で撮影した。使用した一次抗体は以下の通りである。

抗体名	製造メーカー
Rabbit anti-mouse IκBα	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
Rabbit anti-mouse ERK1/2	Promega Corporation, USA
Rabbit anti-mouse phospho-ERK1/2	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Rabbit anti-mouse p38	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Rabbit anti-mouse phospho-p38	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Mouse anti-mouse NLRP3/NALP3 (Cryo-2)	R&D Systems, USA
Mouse anti-mouse β-actin (Clone AC-15)	Sigma, St.Louis, USA

## 2-12. 免疫細胞染色法

腹腔マクロファージを 8well ガラスチャンバーへ播種し、37°C、5%二酸化炭素濃度下で 24 時間培養した。次に、LPS 刺激を 100 ng/mL の濃度で行い 30 分間インキュベートした後、上清を除去し、10% 中性緩衝ホルマリンで室温下 10 分間固定を行った。透過処理の後、3% BSA を含む PBS でブロッキングを行い、一次抗体を 4°C で一晩反応させ、洗浄後、二次抗体を室温下 1 時間反応させ、DAPI で各染色を行い、VECTASHIELD で封入した。共焦点蛍光顕微鏡 FV-10 i (Olympus, Japan) を用いて撮影を行った。

一次抗体および二次抗体は以下の通りである。

一次抗体名	製造メーカー
Rabbit anti-mouse p65 polyclonal Ab	Santa cruz biotechnology, Inc., USA
二次抗体名	製造メーカー
Alexa Fluor 488 Gout anti-rabbit IgG	Life Technologies, USA

## 2-13. アポトーシスの検出

心組織中のアポトーシス細胞の検出は、In situ Apoptosis Detection Kit (Takara Bio, Inc., Japan) を使用した TUNEL 法で行った。新鮮凍結サンプルを 4  $\mu\text{m}$  に薄切した後、10% 中性ホルマリンで 10 分間固定し、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のプロテイナーゼ K を 5 分間反応させた。3% 過酸化水素水に 5 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼブロックを行った。フルオレセイン標識 TdT 混合反応液を 37°C で 90 分間反応させた後、HRP 標識された抗 FITC 抗体を 30 分間反応させ、DAB substrate kit (Vector laboratories, Inc., USA) で DAB 発色させた。次に、メチルグリーンで対比染色を行い、脱水・透徹後に封入し、顕微鏡下に陽性細胞を数え、定量化を行った。

## 2-14. マウス骨髄由来細胞 (BMDM) の採取およびマクロファージへの分化

以前の報告をもとに<sup>23</sup>、マウスの骨髄細胞を採取した。骨髄移植モデル作成と同様に、マウス大腿骨および脛骨より骨髄細胞を回収した。その後、ACK lysing Buffer を用いて溶血させ PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を調製した。骨髄細胞をマクロファージへ分化誘導させるため、L929 細胞培養上清を 15% になるよう調製し、37°C、5% 二酸化炭素濃度下で培養を行った。採取 3 日後、5 日後に同じく 15% L929 培養上清調整培地を交換し、採取 7 日後に各々 LPS 10 ng/mL、IL-4 20 ng/mL を添加し 24 時間培養し M1、M2 マクロファージへの分化誘導を行った。M1 マクロファージマーカーとして iNOS、M2 マクロファージマーカーとして Arg-1 の mRNA 発現を確認した。また、未処置のものを M0 マクロファージ

として用いた。

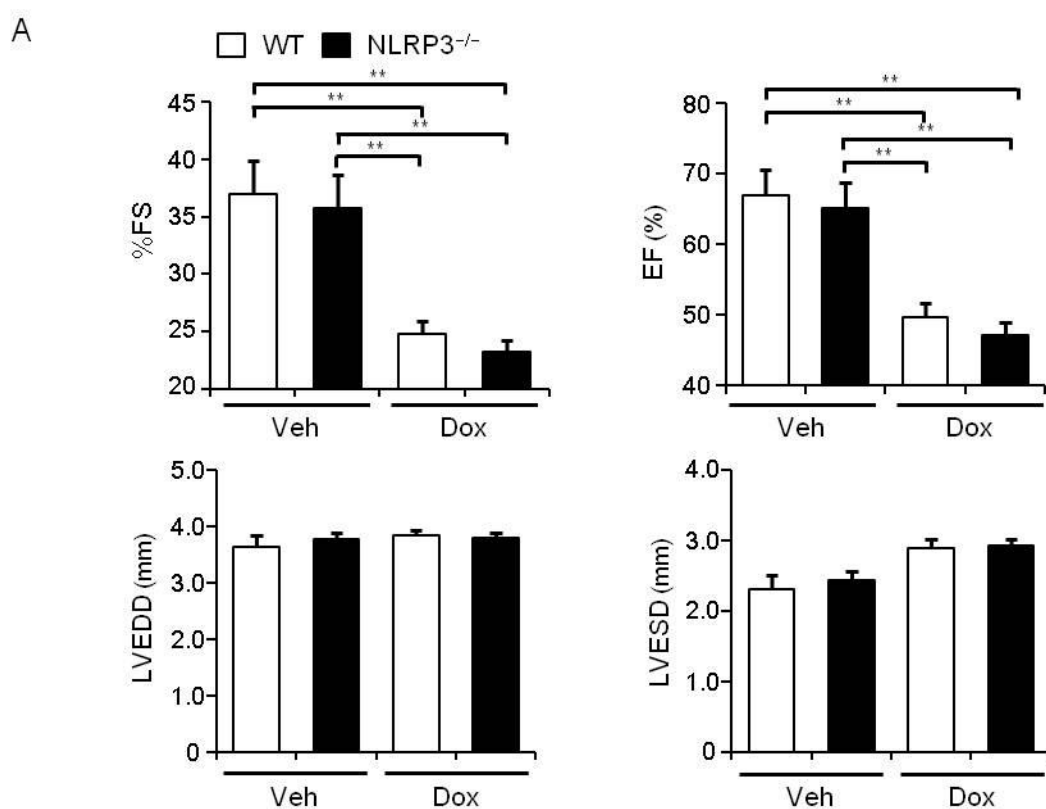
## 2-15. 統計学的解析

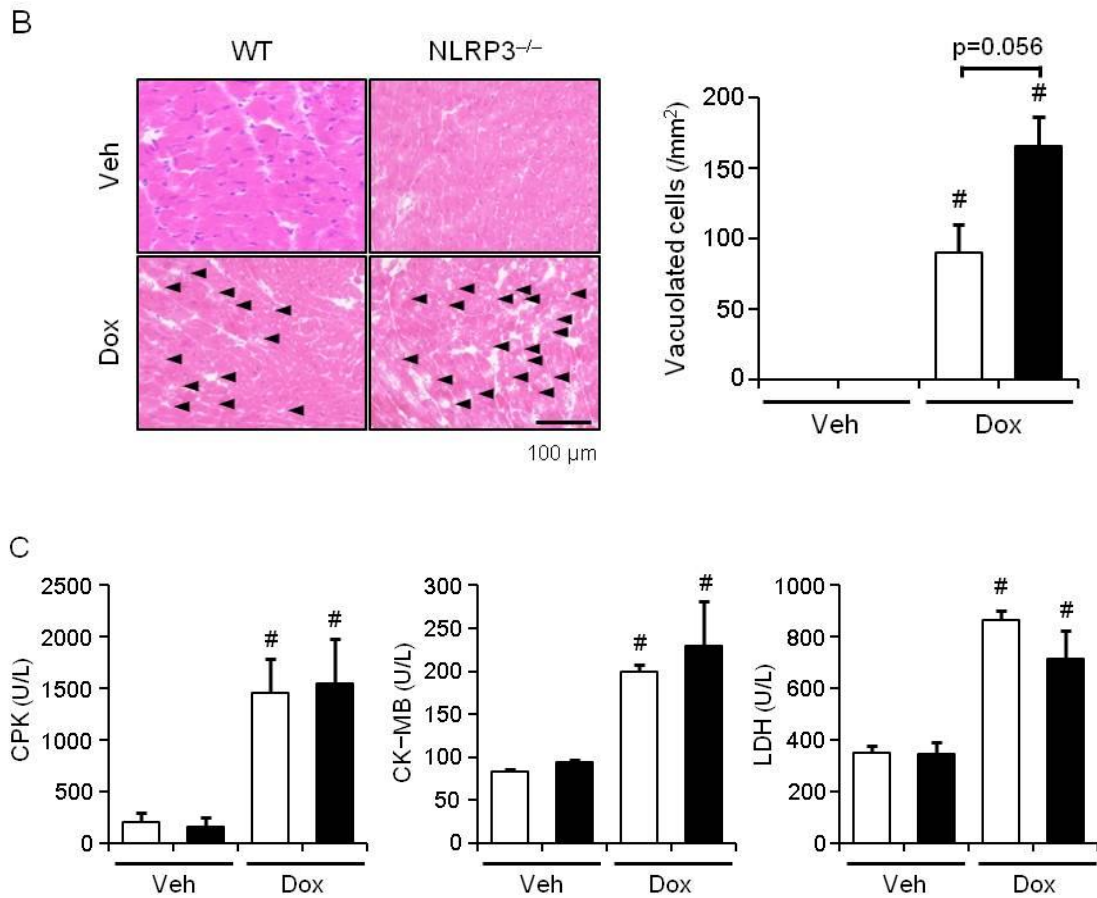
データは、平均値±標準誤差で表示した。多群間比較には一元配置分散分析法と post hoc test (Tukey-Kramer 法による多重比較検定；事後比較) を用いた。統計学的有意差は、 $p$  値 $<0.05$  とした。

### 第3章 結果

#### 3-1. 高用量ドキソルビシン心筋傷害

ドキソルビシン心筋傷害を生じさせるため、以前の報告に従い<sup>24, 25</sup>、高用量 (20 mg/kg) でドキソルビシンの腹腔内単回投与を行った。投与後5日目に心臓超音波検査を施行したところ、WTマウス、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの両群で同様の心収縮力 (%FS、EF) 低下が認められた (図 2A)。組織学的評価を行ったところ、ドキソルビシン投与による心筋傷害の特徴の一つとされる心筋細胞の空胞化<sup>26</sup> が認められたが、WTマウスに比べ、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでより増加傾向にあった (図 2B)。心筋傷害の指標とされる血中のCPK、CK-MB、LDHはドキソルビシン投与により上昇を認めたが、WTマウスとNLRP3<sup>-/-</sup>マウスの間に差を認めなかった (図 2C)。





## 図2. 高用量ドキソルビシン心筋傷害

ドキソルビシンを WT マウス、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスに 20 mg/kg、腹腔内単回投与を行い、投与 5 日目に心機能評価を施行後、心臓、血液を採取した。

A：心臓超音波検査にて、心収縮力の指標である%FS、EF、左室内腔拡張末期径（LVEDD）および収縮末期径（LVESD）を評価した（n=3）。

B：採取した心臓組織に対して HE 染色を施行し、空胞化細胞を計測した（n=3）。

C：採取した血液から血漿を抽出し、CPK、CK-MB、LDH を測定した（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、 $p < 0.01$  を\*\*で表した。また、WT Veh 群と比較し、ドキソルビシン投与群に有意差を認めたものを#（#； $p < 0.05$ ）で表した。

### 3-2. NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおけるドキシソルビシン心筋傷害

ドキシソルビシンを高用量で投与した際、WT マウスと比較して、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスで組織学的に増悪を認めたため、低用量による評価を行うこととした。ドキシソルビシンを低用量 (15 mg/kg) で投与し、投与 5 日後に心臓超音波検査を行った。高用量で投与した時と異なり、WT マウスでは、コントロール群と比較して心収縮力の低下は認めなかった。一方、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでは著明な心収縮力の低下を認めた (図 3A、B)。また、IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>マウスを用いた検討を行ったところ、WT マウスと同様に心収縮力の低下は認めなかった。

HE 染色による組織学的評価を行ったところ、心臓超音波検査の結果と一致して、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおいて、空胞化心筋細胞数が有意に上昇していた (図 3C)。また、心筋傷害の指標である血中の CPK、CK-MB、LDH や心筋中の脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の遺伝子発現も同様に NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意な上昇を認めた (図 3D-E)。これらの結果から、NLRP3 を欠損させることにより、ドキシソルビシン心筋傷害が悪化し、この病態は、IL-1 $\beta$  非依存的な NLRP3 の働きによるものと考えられた。

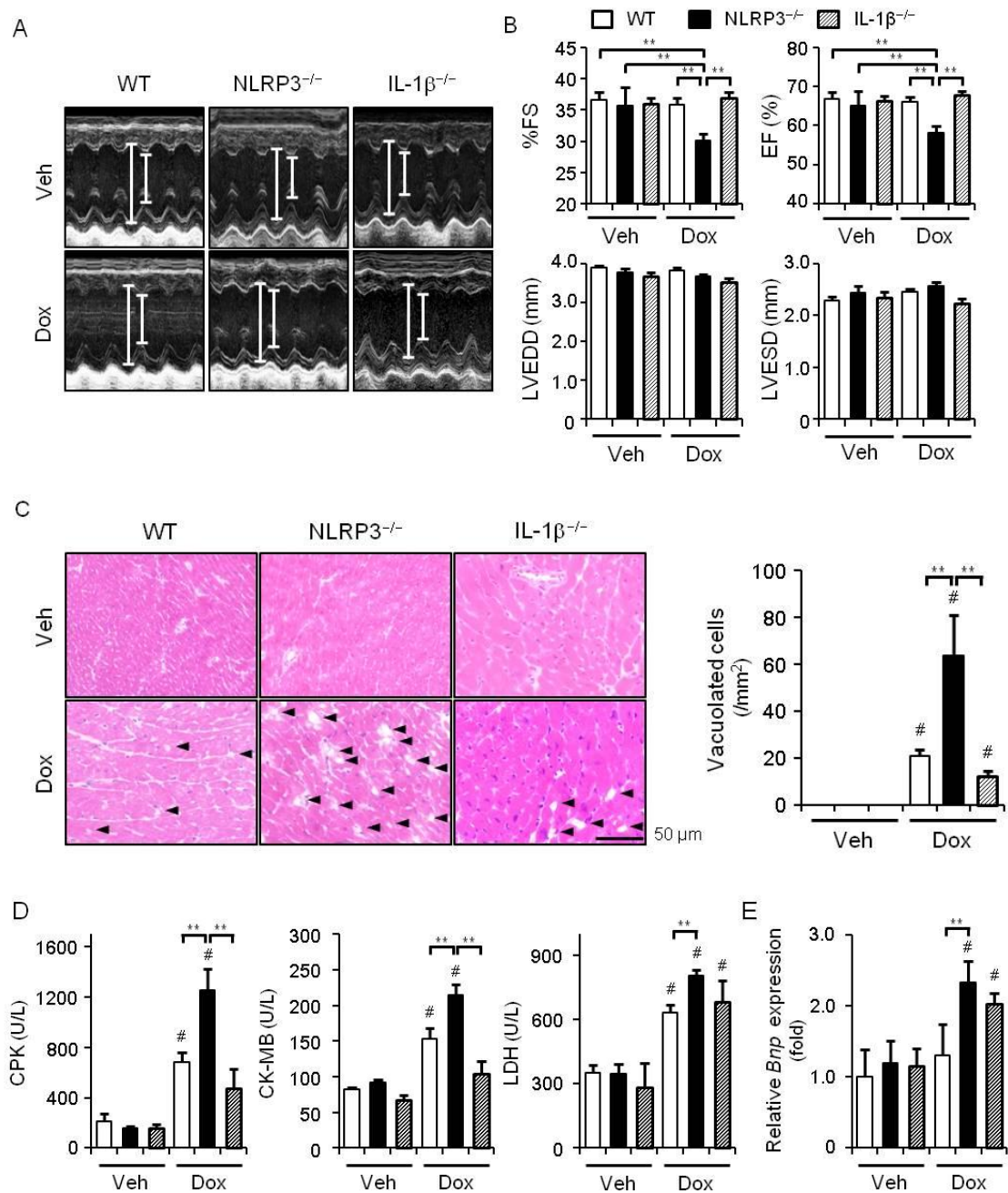


図3. ドキソルビシン心筋傷害は NLRP3<sup>-/-</sup>マウスで悪化する

WT マウス、NLRP3<sup>-/-</sup>マウス、IL-1β<sup>-/-</sup>マウスに対して、ドキソルビシンを 15 mg/kg、腹腔内単回投与を行い、投与 5 日目に心機能評価を施行後、心臓、血液を採取した。

A : 心臓超音波検査にて、%FS、EF、LVEDD および LVESD を評価した (n=9-10)。

B : 採取した心臓組織に対して HE 染色を施行し、空胞化細胞数を計測し定量化を行った (n=4)。

C : 採取した血液から血漿を抽出し、CPK、CK-MB、LDH を測定した (n=4)。



D : Real-time RT-PCR 法により心組織における BNP mRNA 発現を測定した (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、 $p<0.01$  を\*\*で表した。また、WT Veh 群と比較し、ドキソルビシン投与群に有意差を認めたものを# (# ;  $p<0.05$ ) で表した。

### 3-3. アポトーシスおよび酸化ストレス

ドキソルビシン心筋傷害の機序として、ROS やアポトーシスが知られており<sup>6</sup>、これらについて検討を行った。ドキソルビシン投与後 5 日目の心組織を用いて TUNEL 染色を行ったところ、ドキソルビシン投与によってアポトーシス陽性細胞はわずかに増加傾向を示すものの、WT と NLRP3<sup>-/-</sup>マウス間に明らかな差を認めなかった (図 4A)。また、Real-time RT-PCR 法を用いてアポトーシス関連遺伝子である Bax、Bcl-2 の mRNA 発現の検討を行ったが、いずれも WT と NLRP3<sup>-/-</sup>マウス間に差を認めなかった (図 4B)。次に、ROS を評価するために、ドキソルビシン投与後 5 日目の心組織の DHE 染色を行ったが、ドキソルビシンによる ROS の増加は認めるものの、WT と NLRP3<sup>-/-</sup>マウス間では有意な差を認めなかった (図 4C)。

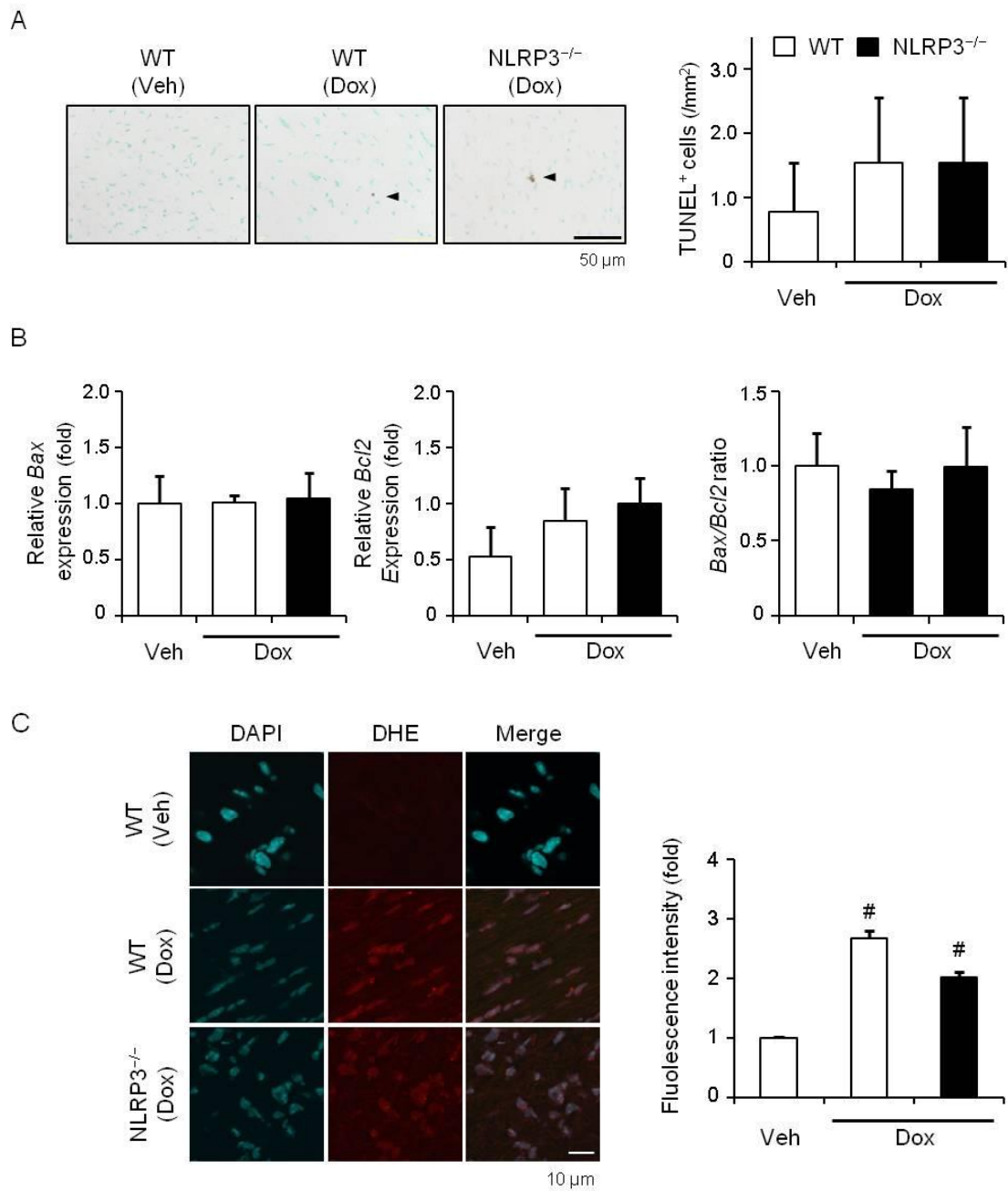


図 4. ドキソルビシン投与時アポトーシスと酸化ストレスには差を認めない  
 ドキソルビシン投与 5 日目の心臓を採取し、アポトーシスおよび酸化ストレスについて評価を行った。

A : TUNEL 染色によりアポトーシス陽性細胞数を評価し、定量化した (n=4)。

B : Real-time RT-PCR 法により心組織中における Bax、Bcl-2 の発現を検討した (n=4)。

C : 酸化ストレスマーカーである DHE による免疫染色を行い、単位面積当たりの蛍光度を測定し定量化を行った (n=4)。

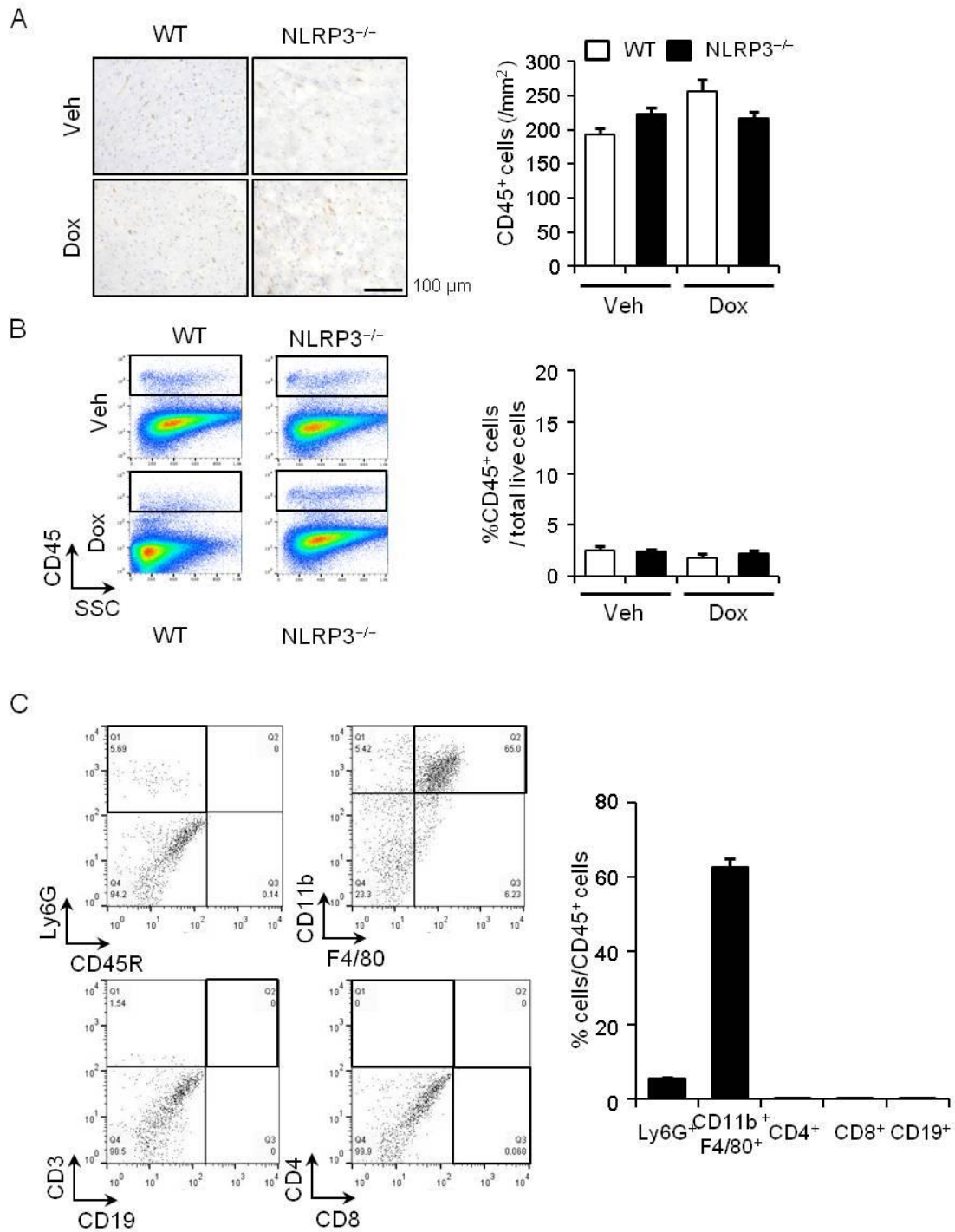
WT Veh 群と比較し、ドキシソルビシン投与群に有意差を認めたものを# (#; p<0.05) で表した。

### 3-4. ドキシソルビシン投与による心組織中の細胞浸潤およびサイトカイン発現

近年、炎症が心不全の発症および進展において、重要な因子であることが知られてきている<sup>27,28</sup>。そこで、ドキシソルビシン投与時の心臓における炎症の役割について検討した。白血球細胞浸潤を白血球細胞のマーカーである CD45 を用いて、免疫組織化学染色およびフローサイトメトリー法により評価したが、心臓における生細胞中の CD45 陽性細胞数は WT マウスと NLRP3<sup>-/-</sup>マウス間に差を認めなかった (図 5A-B)。心臓にはマクロファージが常在しており、心筋における炎症に重要な役割を果たすことが示されている<sup>29</sup>。そこで、心臓における炎症細胞をフローサイトメトリー法により評価したところ、マクロファージ (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) が多くを占めており、好中球 (Ly6G<sup>+</sup>) や T リンパ球 (CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>)、B リンパ球 (CD19<sup>+</sup>) は少数であった (図 5C)。このことから、ドキシソルビシン投与時の心臓の炎症には、マクロファージの関与が大きいと考えられた。そこで、心臓マクロファージの評価を免疫組織化学染色 (CD68<sup>+</sup>) およびフローサイトメトリー (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) で行ったが、WT マウスと NLRP3<sup>-/-</sup>マウス間に差を認めなかった (図 5D-E)。

次に、ドキシソルビシン投与による心組織中の炎症性サイトカインの発現への影響を ELISA 法により検討した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  には差を認めなかったが、IL-10 の上昇が NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおいて、抑制されていた (図 5F)。ドキシソルビシン投与によって、心臓における炎症細胞数の増加は生じなかったが、抗炎症作用や免疫抑制作用を持つ IL-10 の産生が NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでは低下していた。これ

らの結果より、この IL-10 の産生量の違いがドキシソルビシン投与時の NLRP3<sup>-/-</sup> マウス心機能低下の原因である可能性が考えられた。



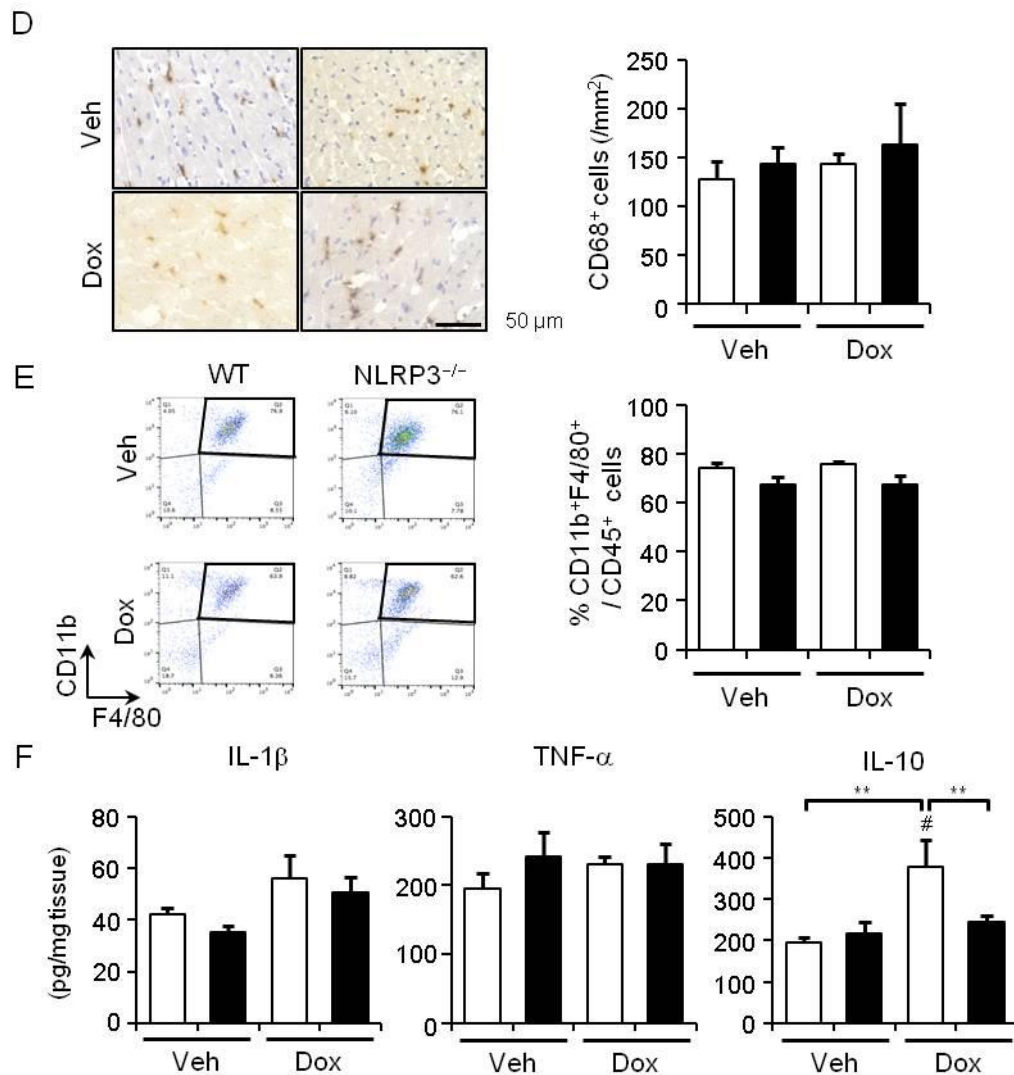


図 5. NLRP3 欠損により、心組織中の炎症細胞数は変わらないが、IL-10 産生が減少する  
ドキシソルビシン 15mg/kg 投与 5 日目の心臓を採取し、免疫染色法および、フローサイトメ  
トリー法にて、炎症細胞数を評価した。ELISA 法により、心組織中におけるサイトカイン  
産生について評価を行った。

A : CD45 の免疫染色を行い、白血球細胞数を検討した (n=4-5)。

B : 心組織中の生細胞における CD45 陽性細胞数の割合をフローサイトメトリー法によって  
評価した (n=4)。

C : 未刺激の WT マウス心における骨髓由来細胞についてフローサイトメトリー法により検  
討した (n=4)。

D : CD68 の免疫染色を行いマクロファージの浸潤について検討した (n=4-5)。

E : 心組織中の CD45 陽性細胞におけるマクロファージの割合を F4/80、CD11b によりフロ

ーサイトメトリー法を用いて評価した (n=4)。

F : ELISA 法により、心組織中の IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10 を測定した (n=4)。

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、p<0.01 を\*\*で表した。

また、WT Veh 群と比較し、ドキシソルビシン投与群に有意差を認めたものを# (# ; p<0.05) で表した。

### 3-5. 骨髄移植モデルにおけるドキシソルビシン心筋傷害

主な IL-10 の産生源としてマクロファージや Th2 細胞などが知られている<sup>30</sup>。そこで、ドキシソルビシン心筋傷害の責任細胞を明らかにするために骨髄移植モデルを作製し、ドキシソルビシン心筋傷害を誘導した。WT マウス由来の骨髄細胞を WT マウスへ移植した群 (BMT<sup>WT to WT</sup>)、WT マウス由来の骨髄細胞を NLRP3<sup>-/-</sup>マウスへ移植した群 (BMT<sup>WT to NLRP3<sup>-/-</sup></sup>) では、心機能の低下は認められなかったが、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの骨髄細胞を WT マウスへ移植した群 (BMT<sup>NLRP3<sup>-/-</sup> to WT</sup>) においてのみ、心機能の低下が確認された (図 6A,B)。HE 染色による組織学的評価では、心臓超音波検査の結果と同様に、BMT<sup>NLRP3<sup>-/-</sup> to WT</sup> 群において、有意な空胞化細胞数の増加を認めた (図 6C)。血漿中の CK、CK-MB も BMT<sup>NLRP3<sup>-/-</sup> to WT</sup> 群において有意な上昇を認めた (図 6D)。これらの結果より、本検討における責任細胞としては、心筋細胞などではなく、マクロファージをはじめとする骨髄由来細胞が重要であると考えられた。また、心筋細胞の初代培養細胞を用いてドキシソルビシンによる細胞傷害性を確認したところ、WT マウスと NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの間に有意差を認めなかった (図 6E)。

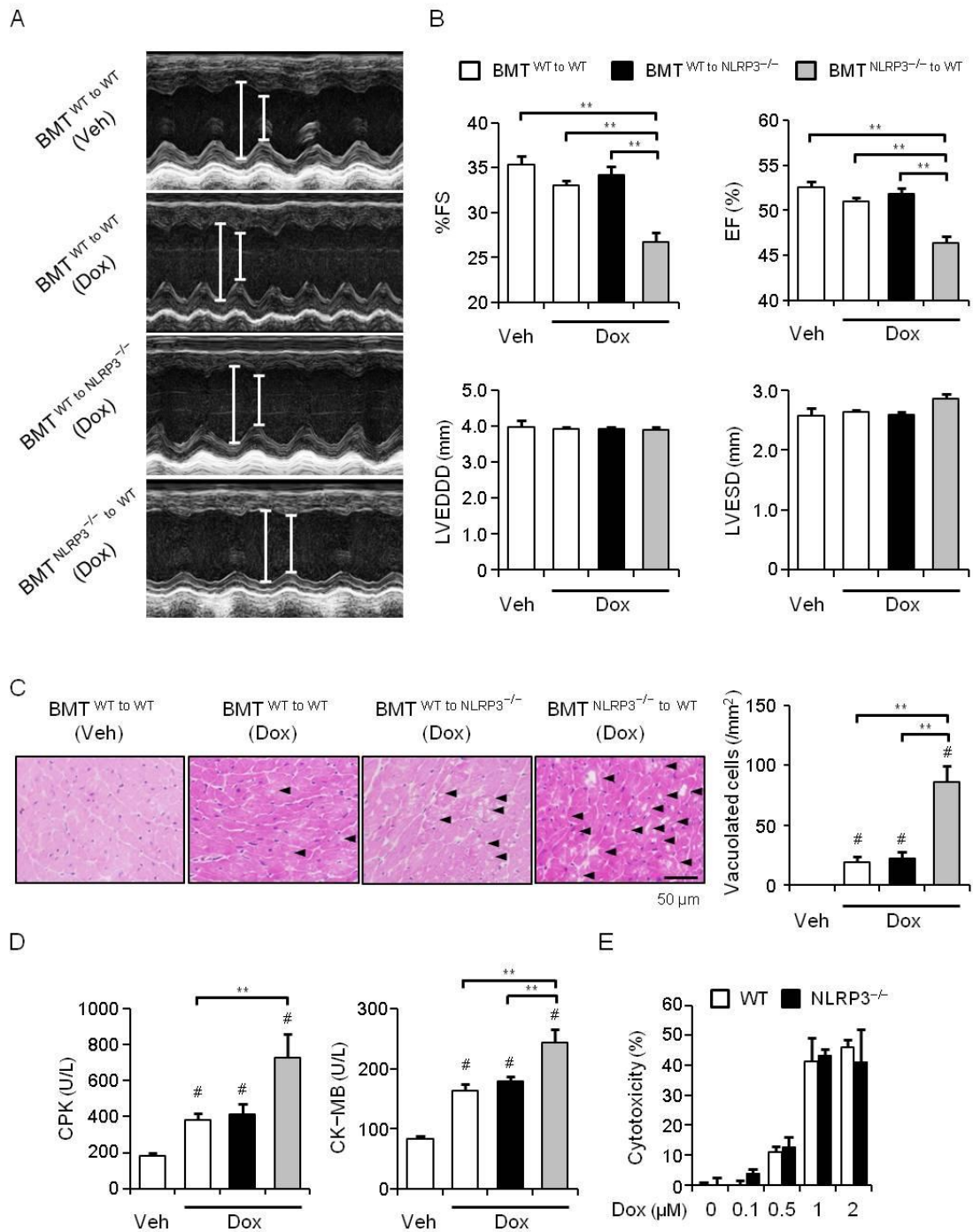


図 6. NLRP3<sup>-/-</sup>マウス由来の骨髄細胞がドキソルビシン投与時心機能低下の主因である骨髄移植モデルとして、WT マウス由来骨髄細胞を WT へ移植した群 (BMT<sup>WT to WT</sup>)、WT マウス由来骨髄細胞を NLRP3<sup>-/-</sup>マウスへ移植した群 (BMT<sup>WT to NLRP3<sup>-/-</sup></sup>)、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの骨髄細胞を WT マウスへ移植した群 (BMT<sup>NLRP3<sup>-/-</sup> to WT</sup>) の 3 群を作製し、ドキソルビシンを 15 mg/kg、腹腔内単回投与し、投与 5 日目に心機能評価を施行後、心臓、血液を採取し

た。

A-B：心臓超音波検査にて、%FS、EF、LVEDD および LVESD を評価した (n=6-10)。

C：採取した心臓組織に対して HE 染色を施行し、空胞化細胞数を計測した (n=4)。

D：採取した血液から血漿を抽出し、CPK、CK-MB を測定した (n=5)。

E：WT マウス、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの新生仔より採取した初代マウス心筋細胞に対して、ドキシソルビシンを添加し、細胞傷害性として上清中の LDH 活性を、評価した (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、p<0.01 を\*\*で表した。また、WT Veh 群と比較し、ドキシソルビシン投与群に有意差を認めたものを# (# ; p<0.05) で表した。

### 3-6. ドキシソルビシン添加によるマクロファージでの IL-1 $\beta$ 産生能

心組織においてはマクロファージが主な骨髄由来細胞であるが、マクロファージには、主に炎症の誘導や悪化に寄与するといわれる M1 マクロファージ、抗炎症応答や組織再生、線維化などに寄与すると考えられる M2 マクロファージがあるとされている<sup>31</sup>。また、心臓における常在性のマクロファージは高血圧ラットモデルを用いた実験<sup>32</sup>や cryoinjury による心筋傷害時<sup>33</sup>において保護的な効果を有することが報告されている。まず、マクロファージに対するドキシソルビシンの効果を検討するために、各々のマクロファージにおける IL-1 $\beta$  産生能を評価した。骨髄細胞をマクロファージへと分化させ、さらに LPS により分化させたマクロファージを M1 マクロファージ、IL-4 を添加し分化させたマクロファージを M2 マクロファージ、いずれも処置していないものを M0 マクロファージとして使用した。分化誘導がなされているかを、M1 マクロファージの代表的なマーカーである iNOS、M2 マクロファージのマーカーである Arg1 の発現により確認した (図 7A)。WT の BMDM にドキシソルビシンを添加することにより、IL-1 $\beta$  の上昇が認められ、NLRP3<sup>-/-</sup>マウス由来 BMDM では産生量が低下するという報告があり<sup>34</sup>、同様の検討を行った。ドキシソルビシンによる IL-1 $\beta$  の上昇は特に



M1 マクロファージで強く認められたが、WT と NLRP3<sup>-/-</sup> の BMDM 間に差を認めなかった (図 7B)。

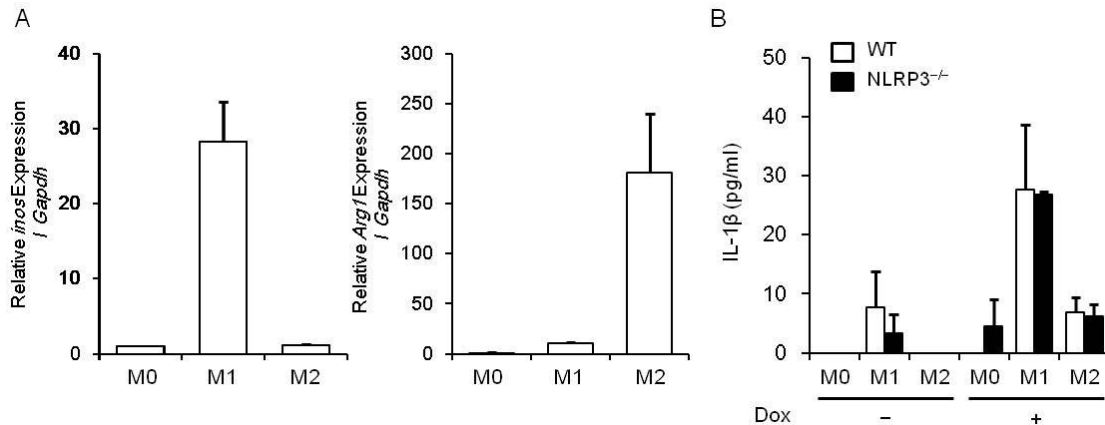


図 7. ドキソルビシン添加による IL-1 $\beta$  産生は WT と NLRP3<sup>-/-</sup> マウスのマクロファージ間に差を認めない

マウスの骨髄細胞を採取し、L929 培養上清調整培地を用いてマクロファージへと分化させた。採取 7 日後に LPS、IL-4 を添加し M1 および M2 マクロファージへ分化誘導を行った。A : iNOS (M1 マクロファージマーカー)、Arg1 (M2 マクロファージマーカー) の mRNA 発現を Real-time RT-PCR 法により確認した (n=4)。

B : M1、M2 マクロファージに対して、LPS (10 ng/mL、24 h) の前処置を行い、ドキソルビシン (2  $\mu$ M) を添加し、24 時間後の上清中の IL-1 $\beta$  を ELISA 法により検討した (n=3)。

### 3-7. マクロファージにおける TLR 刺激による IL-10 産生能の評価

ドキソルビシンを投与することにより、血中の TNF- $\alpha$  や IL-10 が上昇することが知られている。また、IL-10 は心筋傷害へ与える詳細な機序は明らかではないが、抗炎症作用などによる保護的な作用をもつと考えられている<sup>35,36</sup>。そこで、NLRP3<sup>-/-</sup> マウスにおけるドキソルビシン投与時の IL-10 の低下が心機能低下に関与しているのではないかと考えた。IL-10 は抗炎症作用や免疫抑制作用など様々な機能を有しており、心臓においても虚血再灌流時に保護的な作用を有す

ることが知られている<sup>37,38</sup>。IL-10は主に、マクロファージやTh2細胞などの細胞より産生される<sup>30</sup>。心組織中では常在マクロファージが多数存在しており、本検討においては、常在マクロファージが重要な役割を担っていると考え、マクロファージにおけるIL-10産生能について評価を行った。マクロファージでは、TLR2やTLR4を介してIL-10を産生することが知られており<sup>30</sup>、TLR2、TLR4の欠損マウスではドキシソルビシン投与による心筋傷害が軽減したという報告がある<sup>25,39</sup>。そこで、TLR4のリガンドであるLPSをWTマウスから採取した腹腔内マクロファージに対して添加したところ、上清中のIL-10の産生を認めた。一方、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスから採取した腹腔内マクロファージではIL-10産生量が著明に低下していた(図8A)。また、TLR2のリガンドであるPam3CSK4を用いて、IL-10産生能の検討を行ったところ、LPS投与時と同様にNLRP3<sup>-/-</sup>腹腔内マクロファージでIL-10の産生が低下していた(図8B)。TLR4、TLR2の発現自体による影響を検討するために、心組織中におけるTLR4およびTLR2の発現を確認したところ、WTマウスとNLRP3<sup>-/-</sup>マウス間に差を認めなかった(図8C-D)。また、マクロファージにおけるIL-10のmRNA発現を確認したところ、NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージで低下を認めた(図8E)。さらに、脾細胞を用いて検討したところ、腹腔内マクロファージの結果と同様にNLRP3<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞においてIL-10の産生が低下していた(図8F-G)。これらの結果より、NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージおよび脾細胞ではTLR2、TLR4を介したIL-10産生が低下していることが明らかとなった。

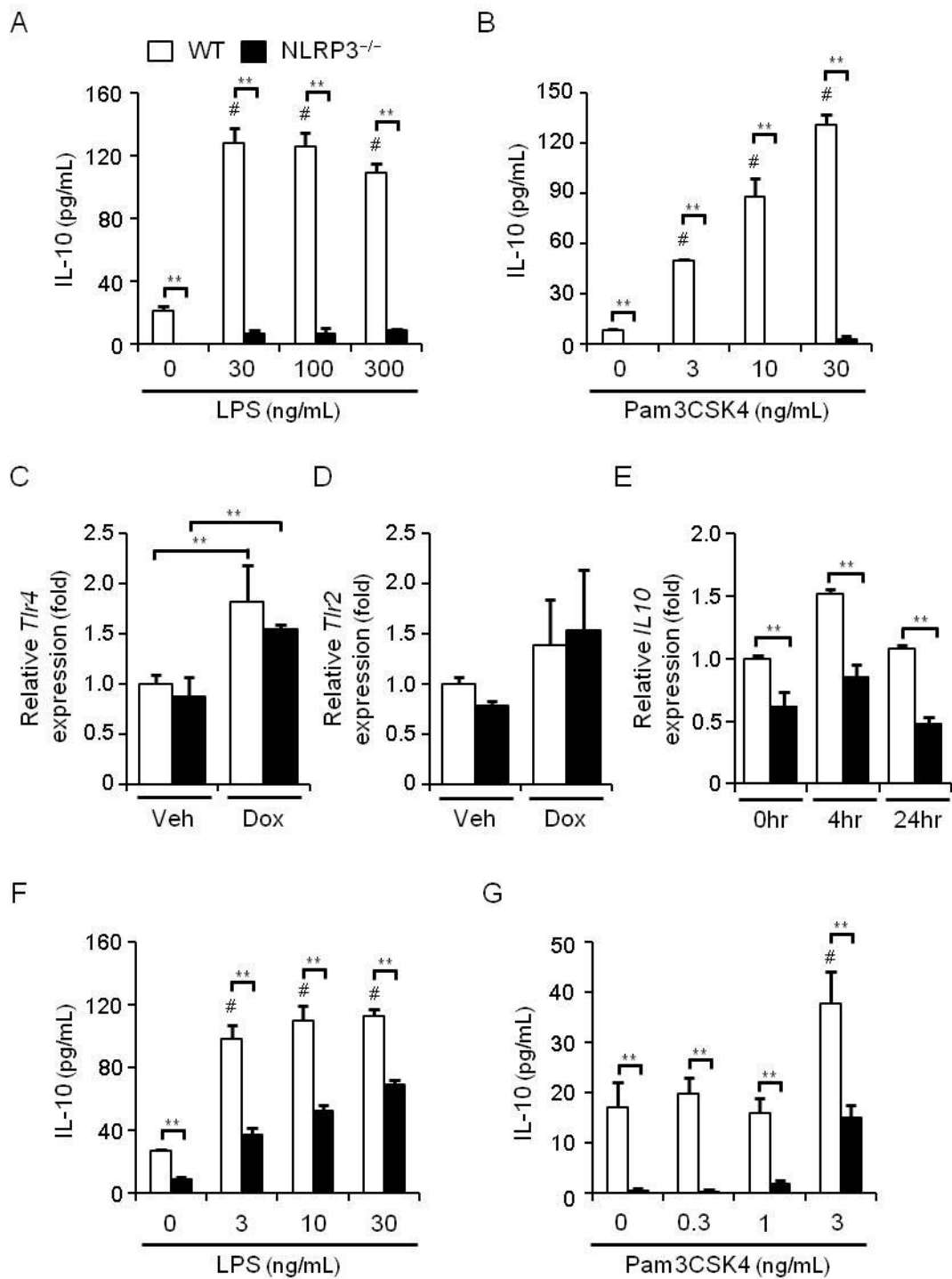


図 8. NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージ、脾細胞では IL-10 産生能が低下している  
 腹腔内マクロファージおよび脾細胞に LPS、Pam3CSK4 を添加し、上清中の IL-10 産生を評価した。ドキシソルビシン投与 5 日目の心組織中の TLR2、TLR4 の mRNA 発現および、腹腔

内マクロファージにおける IL-10 の mRNA 発現を確認した。

A, B : 腹腔内マクロファージに対して LPS (B)、Pam3CSK4 (C) を添加した際の上清中の IL-10 を ELISA 法にて検討した (n=4)。

C-D : Real-time RT-PCR 法により心組織中における TLR4、TLR2 の mRNA 発現を検討した (n=4)。

E : Real-time RT-PCR 法により LPS を添加した際の IL-10 の mRNA 発現を経時的に検討した (n=4)。

F, G : 脾細胞に対して LPS (B)、Pam3CSK4 (C) を添加した際の上清中の IL-10 を ELISA 法にて検討した (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、 $p<0.01$  を\*\*で表した。また、WT コントロール群と比較し、ドキシソルビシン投与群に有意差を認めたものを# (# ;  $p<0.05$ ) で表した。

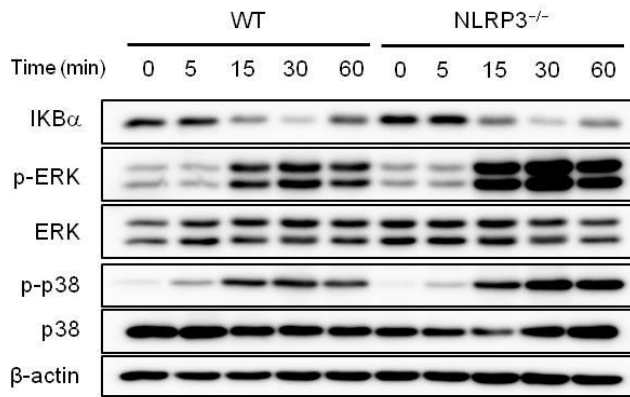
### 3-8. マクロファージにおける TLR 刺激による IL-10 産生経路の検討

次に、WT マクロファージと NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージにおいて IL-10 産生能が異なる機序について検討を行った。マクロファージにおける TLR を介した IL-10 産生刺激シグナル経路としては主に ERK1/2<sup>40</sup>、p38<sup>41-43</sup>、NF- $\kappa$ B<sup>44</sup> が知られている。マクロファージへの LPS 刺激時におけるこれらの経路について、ウェスタンブロット法で確認したところ、いずれの経路においても WT と NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージ間には差を認めなかった (図 9A)。また、NF- $\kappa$ B 経路については活性化時に p65 の核内移行が認められるため、こちらについても、検討を行ったが、明らかな差を認めなかった (図 9B)。IL-10 産生刺激シグナル経路には差を認めなかったため、次に、IL-10 産生抑制シグナル経路として知られている GSK3 $\beta$ <sup>45</sup> について検討を行った。腹腔内マクロファージに対して GSK3 $\beta$  の阻害薬である SB216763 (Cayman chemical company, USA) を前処置し、LPS 刺激を行ったところ、WT において、これまで報告されているように<sup>46, 47</sup>、IL-10 の産生上昇を認めた。また、NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージでも、同様に IL-10 の産生上昇

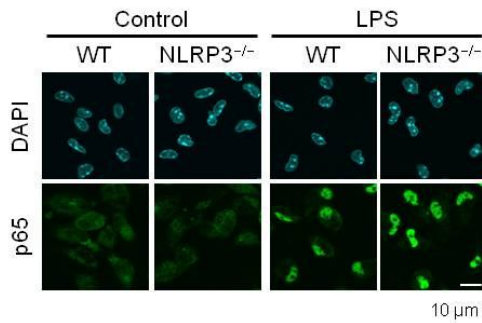
を認めたが、その産生量は、WT マクロファージと同等レベルまでには上昇しなかった (図 9C)。これらより、NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージにおける IL-10 産生低下には ERK1/2、p38、NF-κB、GSK3β 経路は関与しないと考えられた。

近年、無 γ グロブリン血症の責任遺伝子として知られるブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) が、NLRP3 インフラマソームの活性化に関与していることが報告された<sup>48</sup>。これまでに、BTK が欠損している CBA/N マウスでは、IL-10 が低下していることが知られている<sup>49,50</sup>。そこで、BTK が NLRP3 と相互に作用することによって、IL-10 産生に関与しているかについて検証を行った。腹腔内マクロファージに対して、まず、BTK の阻害薬である LFM A-13 (Cayman chemical company, USA)、PCI 32765 (AdooQ Bioscience, USA) を前処置し、次いで、LPS 刺激を加え、上清中の IL-10 を測定した。結果は WT マウスより採取した腹腔内マクロファージと NLRP3<sup>-/-</sup>マウスより採取した腹腔内マクロファージで差を認めなかった (図 9D)。また、BTK 欠損マクロファージにおける IL-10 産生低下の機序として、NF-κB 経路の活性化が減弱していることが知られている<sup>50</sup>。そこで、BTK を阻害した際の NF-κB 経路について、ウェスタンブロット法で確認した。BTK を阻害することにより、NF-κB 経路の活性化が抑制されたが、こちらも、WT と NLRP3<sup>-/-</sup>に差を認めなかった (図 9E)。これらより、NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージにおける IL-10 産生能低下の機序として、BTK も関与していないことが明らかとなった。

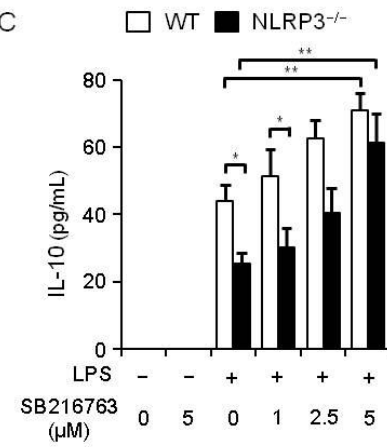
A



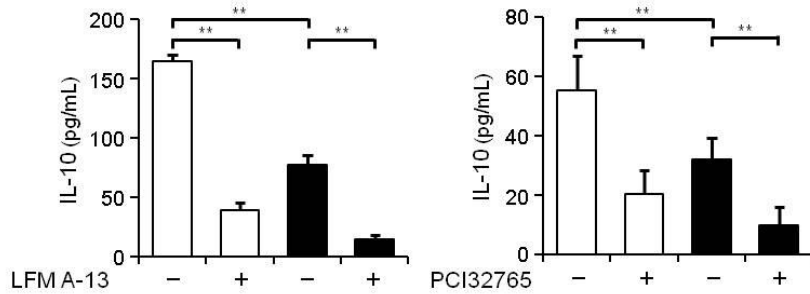
B



C



D



E

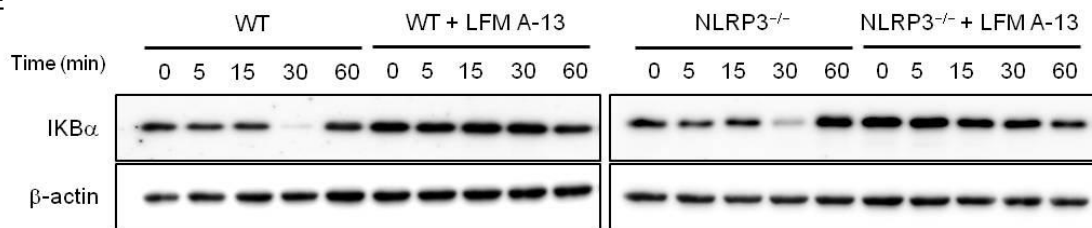


図 9. NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージの IL-10 産生能低下には ERK1/2、p-38、NF-κB、GSK3β 経路は関与しない

LPS 添加時の腹腔内マクロファージにおける IL-10 産生シグナル経路について評価した。

A : LPS (100 ng/mL) を投与した際、細胞内における IκBα、ERK1/2、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2)、p38 およびリン酸化 p38 (p-p38) の蛋白発現の経時的変化をウェスタンブロット法を用いて検出した。

B : LPS 刺激 (100 ng/mL, 30 分) による、p-65 の核内移行を蛍光免疫染色法にて評価した。

C : GSK3β の阻害薬である SB216763 を 1 時間前に前処置し、LPS 刺激 (100 ng/mL) を行い、24 時間後の上清中の IL-10 を ELISA 法にて検討した (n=4)。

D : BTK の阻害剤である LFM A-13 および PCI32765 を LPS 投与 1 時間前に前処置し、LPS 投与 24 時間後の上清中の IL-10 を ELISA 法にて検討した (n=4)。

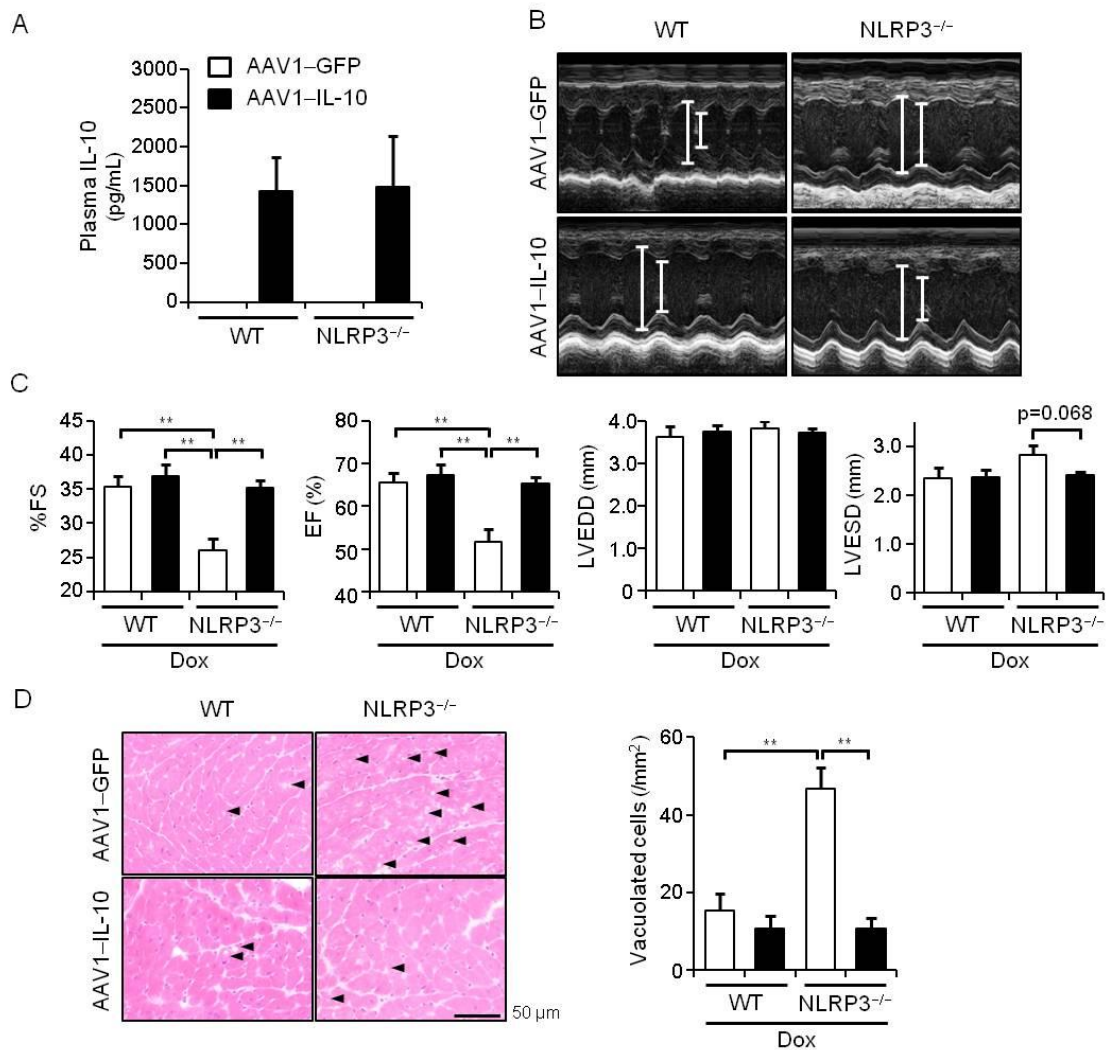
E : LFM A-13 を LPS 投与 1 時間前に前処置後、LPS 刺激 (100 ng/mL) した際の IκBα の発現をウェスタンブロット法にて検出した。

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、p<0.05 を\*、p<0.01 を\*\*で表した。

### 3-9. IL-10 遺伝子導入によるドキシソルビシン心筋傷害への影響

これまでの結果より、ドキシソルビシン投与時、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおいて心筋傷害が増悪する原因として、NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージにおける IL-10 の産生低下が考えられた。そこで、実際に IL-10 投与によりドキシソルビシン心筋傷害が改善するかを確かめるために、IL-10 遺伝子導入モデルを用いた検討を行った。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターをドキシソルビシン投与 2 週間前に腓腹筋に筋注射し、遺伝子導入を行った。AAV ベクター投与 14 日後の血漿中 IL-10 を評価したところ、IL-10 遺伝子導入群 (AAV1-IL-10) で IL-10 の産生上昇が確認された (図 10A)。コントロールとして、GFP を遺伝子導入し (AAV1-GFP) 評価した。これらの遺伝子を導入したマウスに対して、ドキシソルビシンを 15 mg/kg で投与し、投与 5 日目の心機能を評価したところ、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおいて認められたドキシソルビシンによる心機能低下が IL-10 遺伝子導入により改善した (図 10B-C)。

HE 染色による組織学的評価では、心臓超音波検査の結果と同様に、 $NLRP3^{-/-}$ マウスにおいて悪化した空胞化細胞数の減少が認められた(図 10D)。血漿中の CPK、CK-MB、LDH (図 9E) および心組織中の BNP mRNA 発現 (図 10F) についても同様に IL-10 を過剰発現させた群において有意な改善が得られた。これらの結果より、IL-10 の産生低下が  $NLRP3^{-/-}$ マウスにおけるドキシソルビシン心筋傷害悪化の主たる要因であることが示唆された。





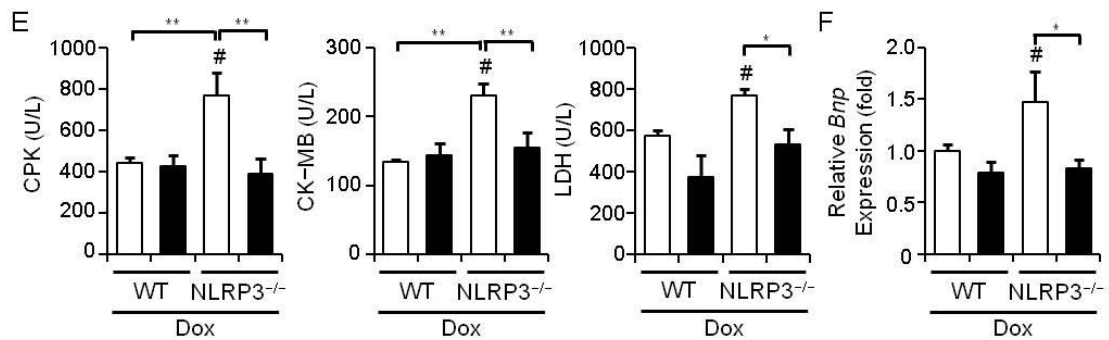


図 10. IL-10 により NLRP3<sup>-/-</sup>マウスのドキソルビシン心筋傷害は改善する

AAV ベクターを用いた IL-10 遺伝子導入モデルに対してドキソルビシンを 15 mg/kg、腹腔内単回投与を行い、投与 5 日目に心機能評価を施行後、心臓、血液を採取した。

A : IL-10-AAV ベクター導入 14 日後の血漿中 IL-10 を ELISA 法にて測定した (n=8-9)。

B-C : 心臓超音波検査にて、%FS、EF、LVEDD および LVESD を評価した (n=8-9)。

D : 採取した心臓組織に対して HE 染色を施行し、空胞化細胞数を計測した (n=4)。

E : 採取した血液から血漿を抽出し、CPK、CK-MB、LDH を測定した (n=8-9)。

F : Real-time RT-PCR 法により心組織における BNP mRNA 発現を検討した (n=5)。

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、p<0.05 を\*、p<0.01 を\*\*で表した。また、WT GFP 群と比較し、ドキソルビシン投与群に有意差を認めたものを# (# ; p<0.05) で表した。

## 第4章 考察

本研究では、①NLRP3 欠損により、IL-1 $\beta$  非依存性にドキソルビシン心筋傷害が悪化する、②WT マウス と NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの心臓においてはマクロファージが骨髄由来細胞の多くを占めるが、ドキソルビシン投与後の白血球、マクロファージ数には差を認めない、③ドキソルビシンを投与した心臓では WT マウス と NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおいて、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  には差を認めず、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスで IL-10 が低下している、④骨髄移植モデルの解析により、骨髄由来細胞がドキソルビシン心筋傷害に寄与している、⑤NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージでは IL-10 産生が低下しているが、ERK1/2、p38、NF- $\kappa$ B、GSK3 $\beta$  のいずれの経路も関与していない、⑥AAV による IL-10 遺伝子導入により NLRP3<sup>-/-</sup>マウスで認められたドキソルビシン心筋傷害が改善することを明らかにした。

近年、NLRP3 インフラマソームが心血管疾患において、重要な役割を果たすことが明らかとなってきた<sup>13</sup>。しかし、ドキソルビシン心筋傷害における NLRP3 インフラマソームの役割は不明である。本研究では、NLRP3 インフラマソームがドキソルビシン心筋傷害に関与しているという仮説をたて、検証を行った。しかし、予想に反して NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでは WT マウスよりもドキソルビシン心筋傷害がより悪化するという結果であった。また、IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>マウスでは、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスで生じた心機能低下を認めなかった。この結果より、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおけるドキソルビシン心筋傷害の悪化は、IL-1 $\beta$  非依存的であり、NLRP3 独自の機能によるものと考えられた。NLRP3 は、近年、インフラマソームの構成分子としての働き以外に、独立した作用を有することが報告されてきている。Shigeoka らは腎臓の虚血再灌流モデルを用いて、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスではインフラマソーム非依存的に腎障害が軽減することを報告している<sup>51</sup>。当研究室の

Inoue ら<sup>52</sup>は、肝臓の虚血再灌流モデルを用いた実験を行い、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでは、インフラマソーム非依存的な NLRP3 独自の機能である好中球遊走能の低下により、虚血再灌流後の肝障害が軽減したとしている。また、当研究室の Mizushina ら<sup>53</sup>は、肺の高酸素誘導性傷害モデルを用いた実験において、高酸素曝露時に WT マウスと比べて NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの方が、より致死的になりやすく、その原因として IL-1 $\beta$  非依存的な NLRP3 独自の好中球の機能が重要であることを示している。Nathan ら<sup>54</sup>は、アンギオテンシン II を負荷した際の心線維化に着目し、心臓の線維芽細胞における NLRP3 がインフラマソームおよび IL-1 $\beta$  とは独立した経路で心線維化を抑制していると報告している。マクロファージにおける NLRP3 の独自の機能としては、Wong ら<sup>55</sup>が結核菌を用いて、NLRP3 がマクロファージにおいて、カスパーゼ 1 依存的およびカスパーゼ 1 非依存的な細胞死に関与していることを報告しているが、マクロファージにおける NLRP3 独自の機能に関しては不明な点が多く、本研究の成果は、マクロファージにおける NLRP3 の新たな機能解明につながる可能性が考えられた。

ドキシソルビシンによる心筋傷害の機序としては、ROS 産生、アポトーシス誘導、炎症など<sup>9, 10, 56</sup>が知られている。しかしながら、本研究では WT マウス と NLRP3<sup>-/-</sup>マウス間に、いずれも有意な差を認めず、炎症の評価として、ドキシソルビシン投与時の白血球、マクロファージ数についても検討を行ったが、差を認めなかった。WT と NLRP3<sup>-/-</sup>マウスで異なる点として、ドキシソルビシン投与時、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの心臓において、IL-10 の産生低下を認めた。IL-10 は、抗炎症作用や免疫抑制作用、アポトーシスの阻害など、幅広い作用を持つサイトカインである<sup>57, 58</sup>。IL-10 はドキシソルビシン投与時の血中において上昇することが報告されており<sup>35, 36</sup>、これらの報告では、詳細な機序は明らかではないが、抗炎症作用を介した心保護作用が推定されている。また、イソプロテレノールや大

動脈縮窄による心不全モデルにおいて、IL-10<sup>-/-</sup>マウスでは心不全が増悪し、IL-10 を全身的に投与することにより、心筋肥大や心機能、心不全の改善を認めたという報告<sup>59</sup>がある。Yang ら<sup>60</sup>の心虚血再灌流モデルを用いた検討では、IL-10<sup>-/-</sup>マウスで心筋梗塞サイズおよび死亡率が増悪したという報告もあり、IL-10 が心不全に対する新たな治療のターゲットとなる可能性がある。IL-10 を産生する細胞は、多岐にわたるが、主要な産生細胞として、マクロファージや Th2 細胞などがある<sup>30</sup>。本研究では、骨髄移植モデルの検討により、NLRP3<sup>-/-</sup>マウス心で認めた IL-10 の低下は、骨髄由来細胞が主たる要因であることが明らかとなった。心臓に常在する骨髄由来細胞としては、マクロファージが多数存在している。心筋梗塞による虚血時には保護的な作用を有する M2 マクロファージの要素を持つ細胞が多く存在することが報告されている<sup>61</sup>。マクロファージには、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 などの炎症性サイトカインや ROS などを産生し、Th1 型の免疫反応を誘導する M1 マクロファージ、組織修復や血管新生、免疫抑制機能などを持つ M2 マクロファージが知られている。Sauter らは、NLRP3<sup>-/-</sup>マウス由来の BMDM ではドキシソルビシン刺激時に IL-1 $\beta$  の分泌がインフラマソーム依存的に低下すると報告している<sup>34</sup>。本研究においても、M1、M2 マクロファージに対するドキシソルビシンによる IL-1 $\beta$  産生能を評価したが、WT マウス と NLRP3<sup>-/-</sup>マウスから採取した BMDM に、IL-1 $\beta$  の産生量には違いは認めなかった。この相反する結果の原因は不明であるが、本研究と Sauter らの報告ではドキシソルビシンの投与量に相違がある。本研究では予備検討結果から、ドキシソルビシンを 2  $\mu$ M で投与した。一方、Sauter らは 2.5~100  $\mu$ M と、より高用量で投与しており、この相違が結果に影響した可能性がある。ドキシソルビシン投与量による反応の相違についても詳細な解析が必要と考えられた。

マクロファージにおいては、TLR を介した IL-10 産生シグナル経路として

ERK1/2、p38、NF- $\kappa$ B および GSK3 $\beta$  が知られている<sup>30</sup>。TLR2 や TLR4 の欠損マウスを用いた検討ではドキシソルビシンによる心筋傷害が軽減するという報告がある<sup>24, 39, 62, 63</sup>。本研究においても、マクロファージにおいて、TLR 刺激を介した IL-10 の産生能に差が認められ、各々の経路について検討したが、いずれの経路においても、WT マクロファージと NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージの間に差を認めなかった。既存の経路を介さない IL-10 産生機序に違いがあることが予想されたが、NLRP3 がどのような機序により IL-10 産生を調節しているのか、詳細な機序を明らかにすることは出来なかった。NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージでは、未刺激の状態においても IL-10 の遺伝子発現が低下していた。最近では、病原体センサーとは異なる役割として、NLRP3 が IL-4 のプロモーター領域に結合し、転写因子として機能しているという報告もあり<sup>64</sup>、遺伝子転写レベルでの調節などに関わっている可能性があるが、今後、更なる検討が必要と考えられる。

これまで、ドキシソルビシン心筋傷害については、心筋細胞を主体とした検討が多くなされているが、本研究から、骨髄由来細胞を介したドキシソルビシン心筋傷害への新たな介入の可能性が考えられた。Tomita ら<sup>65</sup> はドキシソルビシン心筋傷害モデルで、ドキシソルビシンによる心筋傷害早期における骨髄由来細胞が心筋細胞傷害、ミトコンドリア傷害および死亡率の改善に寄与していることを示している。また、Ishida らは<sup>66</sup> 骨髄由来細胞の中でも、単核球を骨髄移植することにより、ドキシソルビシン心筋傷害が改善したと報告している。本研究や、これらの報告からも、骨髄由来細胞、とりわけ単核球/マクロファージがドキシソルビシン心筋傷害に対して保護的な作用をもち、ドキシソルビシン心筋傷害に対する新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

実際の臨床の場における IL-10 による治療としては、古くは炎症性腸疾患であるクローン病に対して試みられたものがある<sup>67</sup>。これによると、recombinant

IL-10 を 0.5~25 mg/kg の用量で 7 日間連続投与した際に、重篤な副作用の出現なく、病状を寛解状態へと改善した。一方で、4 µg/kg を隔日、12 週間もしくは 8 µg/kg を週 2 日、12 週間の皮下投与を行った検討では、有意な改善を認めなかったとの報告もあり<sup>68</sup>、一定の見解は得られていない。また、乾癬患者に対して、recombinant IL-10 を投与した際に、効果発現期間などに差はあるものの、皮膚所見の改善を認めたという報告もなされている<sup>69-71</sup>。これらの臨床研究における IL-10 投与による副作用としては、一過性の好中球や単球の増加、リンパ球減少、血小板減少などがあるが<sup>72</sup>、いずれも許容範囲であるとされている。しかし、IL-10 には、免疫抑制作用など、病勢や全身状態によっては、必ずしも生体にとって有益ではない作用も知られており、また、臨床においては、必ずしも一定の効果を得られているわけではない。このため、投与に当たっては、病因、易感染性などの全身状態や、投与量、投与手段なども含め、慎重な検討が必要と考えられるが、今後、ドキソルビシン心筋傷害に対する新たな予防法や治療法となる可能性がある。

これまでに Marchetti らが NLRP3 インフラマソームを薬物的に阻害することによってドキソルビシン心筋傷害が軽減したという本検討とは異なる結果を報告している<sup>73</sup>。明確な理由は不明であるが、Marchetti らと本研究では実験条件に相違がある。①本研究は C57BL/6J マウスを用いたが、この報告では ICR マウスを使用していた。②ドキソルビシン心筋傷害はドキソルビシンの投与量や投与期間によって異なることが知られている<sup>39,74</sup>。本検討では、15mg/kg、単回投与を行い、5 日目に心機能評価などを行った。一方、Marchetti らは 10 mg/kg、単回投与後 10 日目に心機能評価を行っており、ドキソルビシンの投与量および投与後期間が異なっていた。③Marchetti らは、NLRP3 を遺伝子的に欠損させているのではなく、ミトコンドリアの ATP 感受性カリウムチャネル阻害薬である

グリブライド類似薬による阻害を行っていた。いずれにせよ、ドキソルビシン心筋傷害における NLRP3 の役割については、今後さらなる解析が必要と考えられた。

本研究により、マクロファージにおける NLRP3 が IL-10 産生を介してドキソルビシン心筋傷害を改善することが明らかとなった (図 11)。詳細な機序の解明により、IL-10 および NLRP3 を標的としたドキソルビシン心筋傷害に対する安全な予防法・治療法の開発につながると考えられる。

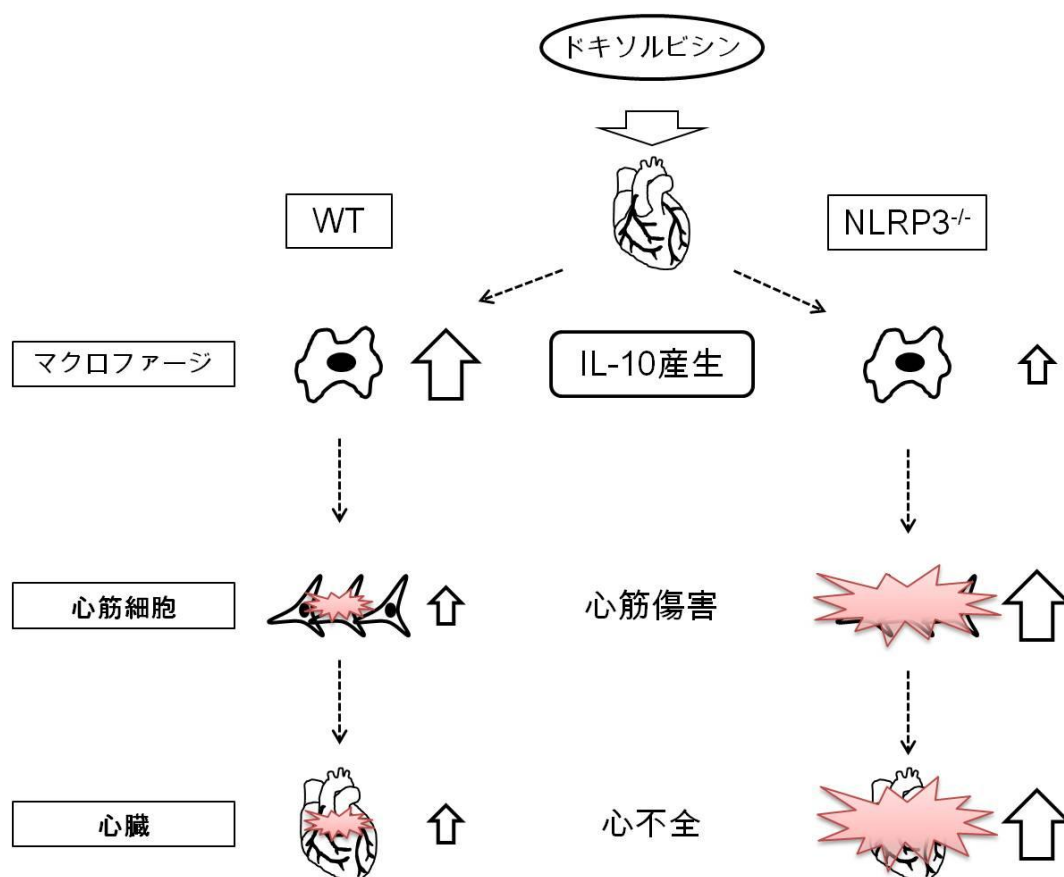


図 11. NLRP3 が IL-10 産生を介してドキソルビシン心筋傷害に保護的に働く  
NLRP3<sup>-/-</sup>マクロファージでは TLR 刺激による IL-10 産生が低下している。ドキソルビシン投与時、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでは、マクロファージにおける IL-10 産生低下により心筋傷害が悪化し、心不全が増悪する。

## 第5章 おわりに

本研究では、マクロファージの NLRP3 が IL-10 産生に寄与していること、ドキシソルビシン心筋傷害に対する IL-10 の保護的な効果を明らかにした。このことより、実臨床においても、ドキシソルビシンを投与する患者において、IL-10 を前処置しておくことにより、ドキシソルビシン心筋症の発症を予防できる可能性が考えられた。



## 謝辞

本研究を計画、遂行するにあたり、丁寧かつ熱心にご指導いただきました、炎症・免疫研究部教授 高橋将文先生に心より感謝いたします。

また、日常の実験に際し、思考過程から実験手技に至るまで様々な御指導、御協力をいただきました炎症・免疫研究部の皆様に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Okura Y, Ramadan MM, Ohno Y, Mitsuma W, Tanaka K, Ito M, Suzuki K, Tanabe N, Kodama M, Aizawa Y. Impending epidemic: Future projection of heart failure in japan to the year 2055. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*;72:489-491. 2008
2. Shah S, Nohria A. Advanced heart failure due to cancer therapy. *Current cardiology reports*;17:16. 2015
3. Senkus E, Jassem J. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer treatment reviews*;37:300-311. 2011
4. Lotrionte M, Biondi-Zoccai G, Abbate A, Lanzetta G, D'Ascenzo F, Malavasi V, Peruzzi M, Frati G, Palazzoni G. Review and meta-analysis of incidence and clinical predictors of anthracycline cardiotoxicity. *The American journal of cardiology*;112:1980-1984. 2013
5. 友池 仁, 和泉 徹, 今泉 勉, 鎌倉 史, 許 俊, 白石 公, 筒井 裕, 富永 隆, 永井 良, 天木 誠, 伊東 春, 猪又 孝, 加藤 誠, 神崎 秀, 北村 惣, 砂川 賢, 北風 政, 絹川 弘, 絹川 真, 窪菌 琢, 田ノ上 禎, 田原 宣, 長山 雅, 西村 隆, 野口 暉, 長谷川 拓, 宮本 恵, 関 庚, 吉川 勉, 山岸 正, 日本循環器学会. 循環器病の診断と治療に関するガイドライン(2009-2010 年度合同研究班報告) 拡張型心筋症ならびに関連する二次性心筋症の診療に関するガイドライン. *循環器病の診断と治療に関するガイドライン*;2011:3-79. 2012
6. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in cardiovascular diseases*;49:330-352. 2007
7. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*;52:1213-1225. 2012
8. 新井 昌. 【心筋症・心筋炎 基礎と臨床の最前線 2010】 知っておきたい二次性心筋症 薬剤性心筋症. *総合臨床*;59:1815-1820. 2010
9. Skladanowski A, Konopa J. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochemical pharmacology*;46:375-382. 1993
10. Anand S, Verma H, Kumar L, Singh N. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia lymphocytes by hydroxyurea and adriamycin. *Cancer*

- letters*;88:101-105. 1995
11. Hadi N, Yousif NG, Al-amran FG, Huntei NK, Mohammad BI, Ali SJ. Vitamin e and telmisartan attenuates doxorubicin induced cardiac injury in rat through down regulation of inflammatory response. *BMC cardiovascular disorders*;12:63. 2012
  12. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome nlrs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology*;29:707-735. 2011
  13. Takahashi M. Nlrp3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *International heart journal*;55:101-105. 2014
  14. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology*;13:397-411. 2013
  15. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature reviews. Immunology*;10:826-837. 2010
  16. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annual review of immunology*;27:229-265. 2009
  17. 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, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*;123:594-604. 2011
  18. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, Dixit VM. Glyburide inhibits the cryopyrin/nalp3 inflammasome. *The Journal of cell biology*;187:61-70. 2009
  19. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*;267:2000-2003. 1995
  20. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Khai NC, Maruyama R, Ogino A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation*;113:535-543. 2006
  21. Komada T, Usui F, Shirasuna K, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Kusano E, Takahashi M. Asc in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury after unilateral ureteral obstruction. *The American journal of pathology*;184:1287-1298. 2014
  22. Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H,

- Sagara J, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. 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
23. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*;Chapter 14:Unit 14 11. 2008
  24. Riad A, Bien S, Gratz M, Escher F, Westermann D, Heimesaat MM, Bereswill S, Krieg T, Felix SB, Schultheiss HP, Kroemer HK, Tschöpe C. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *European journal of heart failure*;10:233-243. 2008
  25. Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. *Circulation*;110:2869-2874. 2004
  26. Aversano RC, Boor PJ. Histochemical alterations of acute and chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Journal of molecular and cellular cardiology*;15:543-553. 1983
  27. Van Tassel BW, Raleigh JM, Abbate A. Targeting interleukin-1 in heart failure and inflammatory heart disease. *Current heart failure reports*;12:33-41. 2015
  28. Braunwald E. Heart failure. *JACC. Heart failure*;1:1-20. 2013
  29. Pinto AR, Paolicelli R, Salimova E, Gospocic J, Slonimsky E, Bilbao-Cortes D, Godwin JW, Rosenthal NA. An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PloS one*;7:e36814. 2012
  30. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of il-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology*;10:170-181. 2010
  31. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: Balance, tolerance, and diversity. *Current opinion in immunology*;22:231-237. 2010
  32. Zandbergen HR, Sharma UC, Gupta S, Verjans JW, van den Borne S, Pokharel S, van Brakel T, Duijvestijn A, van Rooijen N, Maessen JG, Reutelingsperger C, Pinto YM, Narula J, Hofstra L. Macrophage depletion in hypertensive rats accelerates development of cardiomyopathy. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*;14:68-75. 2009
  33. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American journal of*

- pathology*;170:818-829. 2007
34. Sauter KA, Wood LJ, Wong J, Iordanov M, Magun BE. Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1beta through activation of the nlrp3 inflammasome. *Cancer biology & therapy*;11:1008-1016. 2011
  35. Lin MC, Yin MC. Preventive effects of ellagic acid against doxorubicin-induced cardio-toxicity in mice. *Cardiovascular toxicology*;13:185-193. 2013
  36. Teng LL, Shao L, Zhao YT, Yu X, Zhang DF, Zhang H. The beneficial effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats. *The Journal of international medical research*;38:940-948. 2010
  37. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Il-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *Journal of immunology*;165:2798-2808. 2000
  38. Manukyan MC, Alvernaz CH, Poynter JA, Wang Y, Brewster BD, Weil BR, Abarbanell AM, Herrmann JL, Crowe BJ, Keck AC, Meldrum DR. Interleukin-10 protects the ischemic heart from reperfusion injury via the stat3 pathway. *Surgery*;150:231-239. 2011
  39. Ma Y, Zhang X, Bao H, Mi S, Cai W, Yan H, Wang Q, Wang Z, Yan J, Fan GC, Lindsey ML, Hu Z. Toll-like receptor (tlr) 2 and tlr4 differentially regulate doxorubicin induced cardiomyopathy in mice. *PloS one*;7:e40763. 2012
  40. Lucas M, Zhang X, Prasanna V, Mosser DM. Erk activation following macrophage fcgammaR ligation leads to chromatin modifications at the il-10 locus. *Journal of immunology*;175:469-477. 2005
  41. Ma W, Lim W, Gee K, Aucoin S, Nandan D, Kozlowski M, Diaz-Mitoma F, Kumar A. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *The Journal of biological chemistry*;276:13664-13674. 2001
  42. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. Il-33 amplifies both th1- and th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive th2 cells, iNKT and NK cells. *International immunology*;20:1019-1030. 2008
  43. Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, Hoffmann A, Montminy M, Karin M. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--creb and nf-kappaB as key regulators. *Immunity*;23:319-329. 2005

44. Kanters E, Pasparakis M, Gijbels MJ, Vergouwe MN, Partouns-Hendriks I, Fijneman RJ, Clausen BE, Forster I, Kockx MM, Rajewsky K, Kraal G, Hofker MH, de Winther MP. Inhibition of nf-kappab activation in macrophages increases atherosclerosis in ldl receptor-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*;112:1176-1185. 2003
45. Hu X, Paik PK, Chen J, Yarilina A, Kockeritz L, Lu TT, Woodgett JR, Ivashkiv LB. Ifn-gamma suppresses il-10 production and synergizes with tlr2 by regulating gsk3 and creb/ap-1 proteins. *Immunity*;24:563-574. 2006
46. Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S, Koyasu S. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood*;112:635-643. 2008
47. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology*;6:777-784. 2005
48. Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, Morita R. Bruton's tyrosine kinase is essential for nlrp3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nature communications*;6:7360. 2015
49. Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N. Il-10 is a negative regulatory factor of caws-vasculitis in cba/j mice as assessed by comparison with bruton's tyrosine kinase-deficient cba/n mice. *Journal of immunology*;183:3417-3424. 2009
50. Schmidt NW, Thieu VT, Mann BA, Ahyi AN, Kaplan MH. Bruton's tyrosine kinase is required for tlr-induced il-10 production. *Journal of immunology*;177:7203-7210. 2006
51. Shigeoka AA, Mueller JL, Kambo A, Mathison JC, King AJ, Hall WF, Correia Jda S, Ulevitch RJ, Hoffman HM, McKay DB. An inflammasome-independent role for epithelial-expressed nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of immunology*;185:6277-6285. 2010
52. Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Dezaki K, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Iwakura Y, Tsutsui H, Taniguchi S, Yanagisawa K, Yada T, Yasuda Y, Takahashi M. Nlrp3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *Journal of immunology*;192:4342-4351. 2014
53. Mizushina Y, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Kobayashi M, Komada T, Inoue Y, Mato N, Yamasawa H, Latz E, Iwakura Y,

- Kasahara T, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi M. Nlrp3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through stat3 protein signaling independent of interleukin-1beta. *The Journal of biological chemistry*;290:5065-5077. 2015
54. Bracey NA, Gershkovich B, Chun J, Vilaysane A, Meijndert HC, Wright JR, Jr., Fedak PW, Beck PL, Muruve DA, Duff HJ. Mitochondrial nlrp3 protein induces reactive oxygen species to promote smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *The Journal of biological chemistry*;289:19571-19584. 2014
  55. Wong KW, Jacobs WR, Jr. Critical role for nlrp3 in necrotic death triggered by mycobacterium tuberculosis. *Cellular microbiology*;13:1371-1384. 2011
  56. Guo R, Wu K, Chen J, Mo L, Hua X, Zheng D, Chen P, Chen G, Xu W, Feng J. Exogenous hydrogen sulfide protects against doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity by inhibiting p38mapk/nfkappab pathway in h9c2 cardiac cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*;32:1668-1680. 2013
  57. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of il-10 in immunity and cancer. *Cancer letters*;367:103-107. 2015
  58. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of il-10 or its antagonists in human disease. *Immunological reviews*;223:114-131. 2008
  59. Verma SK, Krishnamurthy P, Barefield D, Singh N, Gupta R, Lambers E, Thal M, Mackie A, Hoxha E, Ramirez V, Qin G, Sadayappan S, Ghosh AK, Kishore R. Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor-kappab. *Circulation*;126:418-429. 2012
  60. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*;101:1019-1026. 2000
  61. Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovascular research*;102:240-248. 2014
  62. Krysko DV, Kaczmarek A, Krysko O, Heyndrickx L, Woznicki J, Bogaert P, Cauwels A, Takahashi N, Magez S, Bachert C, Vandenabeele P. Tlr-2 and tlr-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell death and differentiation*;18:1316-1325. 2011

63. Kast RE, Foley KF, Focosi D. Doxorubicin cardiomyopathy via tlr-2 stimulation: Potential for prevention using current anti-retroviral inhibitors such as ritonavir and nelfinavir. *Hematological oncology*;25:96-97. 2007
64. Bruchard M, Rebe C, Derangere V, Togbe D, Ryffel B, Boidot R, Humblin E, Hamman A, Chalmin F, Berger H, Chevriaux A, Limagne E, Apetoh L, Vegran F, Ghiringhelli F. The receptor nlrp3 is a transcriptional regulator of th2 differentiation. *Nature immunology*;16:859-870. 2015
65. Tomita S, Ishida M, Nakatani T, Fukuhara S, Hisashi Y, Ohtsu Y, Suga M, Yutani C, Yagihara T, Yamada K, Kitamura S. Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*;23:577-584. 2004
66. Ishida M, Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Hamamoto M, Nagaya N, Ohtsu Y, Suga M, Yutani C, Yagihara T, Yamada K, Kitamura S. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*;23:436-445. 2004
67. van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory crohn's disease. Crohn's disease study group. *Gastroenterology*;113:383-389. 1997
68. Colombel JF, Rutgeerts P, Malchow H, Jacyna M, Nielsen OH, Rask-Madsen J, Van Deventer S, Ferguson A, Desreumaux P, Forbes A, Geboes K, Melani L, Cohard M. Interleukin 10 (tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of crohn's disease. *Gut*;49:42-46. 2001
69. Friedrich M, Docke WD, Klein A, Philipp S, Volk HD, Sterry W, Asadullah K. Immunomodulation by interleukin-10 therapy decreases the incidence of relapse and prolongs the relapse-free interval in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*;118:672-677. 2002
70. Docke WD, Asadullah K, Belbe G, Ebeling M, Hoflich C, Friedrich M, Sterry W, Volk HD. Comprehensive biomarker monitoring in cytokine therapy: Heterogeneous, time-dependent, and persisting immune effects of interleukin-10 application in psoriasis. *Journal of leukocyte biology*;85:582-593. 2009
71. Kimball AB, Kawamura T, Tejura K, Boss C, Hancox AR, Vogel JC, Steinberg



- SM, Turner ML, Blauvelt A. Clinical and immunologic assessment of patients with psoriasis in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial using recombinant human interleukin 10. *Archives of dermatology*;138:1341-1346. 2002
72. Huhn RD, Radwanski E, O'Connell SM, Sturgill MG, Clarke L, Cody RP, Affrime MB, Cutler DL. Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Blood*;87:699-705. 1996
73. Marchetti C, Toldo S, Chojnacki J, Mezzaroma E, Liu K, Salloum FN, Nordio A, Carbone S, Mauro AG, Das A, Zalavadia AA, Halquist MS, Federici M, Van Tassell BW, Zhang S, Abbate A. Pharmacologic inhibition of the nlrp3 inflammasome preserves cardiac function after ischemic and nonischemic injury in the mouse. *Journal of cardiovascular pharmacology*;66:1-8. 2015
74. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Ogino A, Maruyama R, Nakagawa M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Granulocyte colony-stimulating factor improves left ventricular function of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*;87:440-455. 2007