

氏名	小林 基
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 504 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 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	ドキシソルビシン心筋傷害におけるインフラマソームの役割の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 三澤 吉雄 (委員) 教授 藤村 昭夫 教授 新保 昌久

論文内容の要旨

1 研究目的

ドキシソルビシン (Dox) は悪性リンパ腫や固形癌をはじめ、多くの悪性腫瘍に対して汎用されている薬剤であるが、重篤な副作用として心筋傷害が知られており、その使用は制限されている。Dox による心筋傷害は薬剤性心筋傷害の中でも、最も頻度が高く、また、一度心不全を発症すると、その予後は不良である。最近、Dox 心筋傷害に炎症が関与していることが報告されてきているが、その役割に関してはいまだ不明な点が多い。

近年、病原体が関与しない非感染性の炎症において、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。その中でも、特に無菌性炎症に重要である 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 Nod-like receptor に属する NLRP3 とアダプター分子である ASC、IL-1 β 変換酵素として知られるカスパーゼ 1 から構成され、特にマクロファージや好中球などの細胞で機能している。種々の危険シグナルによりインフラマソームが形成され、カスパーゼ 1 が活性化される。続いて、IL-1 β 前駆体がプロセッシングされ、成熟型 IL-1 β となり、細胞外に分泌され、炎症反応を引き起こされる。そこで、Dox 心筋傷害モデルにおいて、NLRP3 インフラマソームが炎症惹起および、心筋傷害に関与していると仮説を立て、本研究を行った。

2 研究方法

8~12 週齢雄マウスに Dox を腹腔内単回投与し、Dox 心筋傷害モデルを作製した。野生型 (WT) マウスと NLRP3 欠損 ($^{-/-}$ と表記) マウスおよび IL-1 β $^{-/-}$ マウスを用いて本モデルを作製し、心機能および心筋傷害を検証した。また、責任細胞を明らかにするため、骨髄移植マウスモデルを作成し検討した。In vivo の結果より、機序解明のため、マウスから採取した初代心筋細胞、初代マクロファージ細胞、初代骨髄細胞を用いて In vitro の実験を行った。次に、IL-10 を発現させたアデノ随伴ウイルスベクター (AAV; Adeno-associated virus vector) (AAV1-IL-10) による遺伝子導入モデルを作製し、Dox 投与後の心機能、心筋傷害を評価した。

3 研究成果

Dox を高用量 (20 mg/kg) で投与したところ、WT マウス、NLRP3 $^{-/-}$ マウス両群で心機能低下を

認めましたが、組織学的評価では NLRP3^{-/-}マウスで、より悪化傾向にあった。低用量 (15 mg/kg) で検討したところ、WT マウス、IL-1 β ^{-/-}マウスに比べ、NLRP3^{-/-}マウスで心収縮力の低下、心筋傷害の悪化を認めた。以後、低用量で検討を行った。

Dox 投与時の心臓の炎症細胞を、白血球とマクロファージのマーカーを用いて検討したが、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスで差を認めなかった。次に、心組織中のサイトカイン産生を測定したところ、NLRP3^{-/-}マウス心で、IL-10 の産生低下を認めた。Dox 心筋傷害の原因として知られているアポトーシスや酸化ストレスは、差を認めなかった。これより、心組織中の IL-10 産生低下が病態に寄与していると考えられた。IL-10 は、マクロファージ、Th2 細胞などからの産生が多く、これらの細胞の関与について検証するため、骨髄移植モデルを作製した。WT マウスに WT マウス骨髄細胞を移植した群および NLRP3^{-/-}マウスに WT マウス骨髄細胞を移植した群では心機能は保たれ、WT マウスに NLRP3^{-/-}マウス骨髄細胞を移植した群で、心機能の低下および心筋傷害の悪化を認めた。次に、心組織中の主な骨髄由来細胞であるマクロファージに着目し検討した。マクロファージでは、TLR (Toll-like receptor) を介した IL-10 産生機構が知られている。TLR4、2 のリガンドである LPS、Pam3CSK4 を用いて、IL-10 産生能を検討したところ、NLRP3^{-/-}のマクロファージおよび脾細胞で、著明な IL-10 の産生低下を認めた。マクロファージにおける IL-10 産生シグナルについて、ERK1/2、p38、NF- κ B、GSK3 β を検討したが、いずれも WT と NLRP3^{-/-}マクロファージに差を認めず、詳細な分子機序は明らかにできなかった。

NLRP3^{-/-}マクロファージにおける IL-10 の産生低下が心機能低下に寄与しているかを確認するために、IL-10 の遺伝子導入実験を行った。IL-10 を遺伝子導入後、Dox を投与したところ、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、心機能ならびに心筋傷害の改善を認めた。

以上より、NLRP3 が IL-10 の産生調節に関与しており、Dox 心筋傷害において、IL-1 β 非依存的に IL-10 の産生を介して保護的な役割を持つことが明らかとなった。

4 考察

本研究では、①NLRP3 欠損により、IL-1 β 非依存性に Dox 心筋傷害が悪化する、②Dox 投与時、WT と NLRP3^{-/-}マウスの心臓における炎症細胞には差を認めない、③Dox を投与した NLRP3^{-/-}マウスの心臓では WT マウスと比べて IL-10 が低下している、④骨髄由来細胞が Dox 心筋傷害に寄与している、⑤NLRP3^{-/-}マクロファージにおける IL-10 産生低下には ERK1/2、p38、NF- κ B、GSK3 β のいずれの経路も関与しない、⑥IL-10 遺伝子導入により NLRP3^{-/-}マウスの Dox 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示されている。しかし、Dox 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。そこで、NLRP3 インフラマソームが Dox 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 Dox 投与時、NLRP3^{-/-}マウスでは WT マウスよりも心筋傷害がより悪化するという結果であった。また、NLRP3^{-/-}マウスにおける心筋傷害の悪化は、IL-1 β 非依存的であった。これまで、好中球において、インフラマソームもしくは IL-1 β 非依存的な NLRP3 の働きが報告されている。マクロファージにおいては、細胞死に関与するという報告があるが、不明な点が多い。本研究では NLRP3 が、マクロファージにおいて IL-10 の産生に関与し、Dox 心筋傷害に保護的に作用していることを明らかにしたが、IL-10 産生能の違いについて詳細な機序を明らかにすることは

きなかった。最近、NLRP3がIL-4の転写因子として機能するという報告もあり、遺伝子転写レベルでの関与も考えられるが、更なる検討が必要である。IL-10の臨床応用としては、クローン病や乾癬に対しての報告があるが、その効果は、まだ一定の見解を得られてはいない。しかし、軽度の副作用はあるものの、投与中止に至るものはなく、投与量・手段などを考慮したうえで、Dox心筋傷害の発症予防に応用できる可能性がある。

5 結論

本研究では、マクロファージにおいてNLRP3が果たす役割、およびDox心筋傷害に対するマクロファージを介したIL-10の保護的な効果を明らかにした。本研究の結果より、Dox心筋傷害に対して、IL-10投与が予防・治療へと結びつく可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文標題“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”を学位申請者である、小林基氏から解説された。悪性リンパ腫等の治療に用いられるドキシソルビシンによる心筋障害のメカニズム解明を主目的とした研究である。2014年7月の第一次審査会においては、急性ドキシソルビシン心筋障害において、インフラマソームや血球細胞の関与が示唆された段階までの研究段階であった。

その後の研究により、本心筋障害においてはNLRP3インフラマソームがIL10の産生調節に関与している点、そしてそのIL-10がIL-1 β に非依存的に心筋の保護的役割を持つことが解明された。NLRP3インフラマソームがどのようなメカニズムでIL10の産生に関与しているかの解明までには至らなかったが、本心筋障害におけるIL-10の治療効果を期待させる研究内容であった。

最終試験の結果の要旨

抄録や本文内容自体に変更をきたすものではないが、図や図の説明などの一部の文字句に訂正すべき点があり、各委員からそれぞれ指摘を受け、訂正が求められた。後日、これらについては適正に修正がなされたことを確認した。説明姿勢も真摯で、委員からの質問にも丁寧にかつ適切に対応した。研究内容が急性毒性モデルを使用している点は、慢性経過で心筋障害を生じる臨床と異なるが、障害メカニズム解明への緒となる研究結果であることは疑い無いと判断できた。

心不全に関する臨床的質問事項にも適切に対応しており、循環器内科医としての臨床的背景から生まれた基礎研究の成果として高く評価することができる。

以上より、本論文は研究の方法や結論等が学位論文として十分な内容であり、申請者も学位取得に十分な資質を有していると判断した。