

表 題 マウス高濃度酸素暴露急性肺傷害モデルにおける NLRP3 の役割の解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 水品 佳子

担当指導教員氏名 杉山 幸比古 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
循環器・呼吸器疾患学
呼吸器内科学

2016 年 1 月 8 日申請の学位論文

目次

| | ページ |
|--|-----|
| 略語一覧 | 2 |
| 1. はじめに | 4 |
| 2. 実験材料と方法 | 7 |
| 2-1. 使用動物 | |
| 2-2. 実験モデル作製 | |
| 2-3. BALF の解析 | |
| 2-4. Real-time RT-PCR | |
| 2-5. Western blot 法 | |
| 2-6. MMP-9 測定 | |
| 2-7. 組織学的検討 | |
| 2-8. アポトーシスの検出 | |
| 2-9. 肺組織 wet/dry 比の算出と BALF 蛋白濃度の測定 | |
| 2-10. IL-1 β の測定 | |
| 2-11. フローサイトメトリー | |
| 2-12. 細胞培養 | |
| 2-13. 好中球遊走能の解析 | |
| 2-14. 共培養実験 | |
| 2-15. Adoptive transfer | |
| 2-16. 統計解析 | |
| 3. 結果 | 17 |
| 3-1. 高濃度酸素環境下におけるマウスの生存解析 | |
| 3-2. 高濃度酸素暴露による肺傷害の解析 | |
| 3-3. 肺組織への炎症細胞浸潤の評価 | |
| 3-4. 肺組織 mRNA 発現解析 | |
| 3-5. 肺組織における MMP-9 および Bcl-2 発現解析 | |
| 3-6. 肺組織のアポトーシス | |
| 3-7. 肺組織における Stat3 発現解析 | |
| 3-8. 肺胞上皮細胞における Stat3 発現解析 | |
| 3-9. NLRP3 ^{-/-} 好中球およびマクロファージの機能解析 | |
| 4. 考察 | 36 |
| 5. 今後の課題 | 42 |
| 6. おわりに | 44 |
| 7. 謝辞 | 45 |
| 8. 参考文献 | 46 |

略語一覽

| 略語 | 名称 |
|-------------------------------|--|
| ALI | acute lung injury |
| APC | allophycocyanin |
| ARDS | acute respiratory distress syndrome |
| ASC | apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain |
| BALF | bronchoalveolar lavage fluid |
| BMDMs | bone marrow-derived macrophages |
| BSA | bovine serum albumin |
| CCL2 | chemokine (C-C motif) ligand 2 |
| CXCL1 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 |
| cDNA | complementary DNA |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| FBS | fetal bovine serum |
| FITC | fluorescein isothiocyanate |
| HALI | hyperoxic acute lung injury |
| HE | Hematoxyline-Eosin |
| 4-HNE | 4-hydroxy-2-nonenal |
| HRP | horseradish peroxidase |
| IL-1β | interleukin-1 β |
| IL-6 | interleukin-6 |
| IL-13 | interleukin-13 |
| LIF | leukemia inhibitory factor |
| MMP-9 | matrix metalloproteinase-9 |
| NLRP3 | nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain containing 3 |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PDVF | polyvinylidene difluoride |
| PE | phycoerythrin |
| PINK1 | PTEN-induced putative kinase 1 |
| PTEN | phosphatase and tensin homolog |
| p-Stat3 | phosphorylated-Stat3 |
| RNA | ribonucleic acid |

| | |
|-----------------|--|
| RIPA | radio-immunoprecipitation assay |
| RT-PCR | reverse transcriptase-polymerase chain reaction |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SDS-PAGE | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis |
| SP-D | surfactant protein-D |
| Stat3 | signal transducer and activator of transcription 3 |
| TdT | terminal deoxynucleotidyl transferase |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP nick end labeling |
| WT | wild-type |

1. はじめに

酸素療法は、呼吸不全患者の治療に不可欠である。特に、急性肺傷害（acute lung injury: ALI）および急性呼吸窮迫症候群（acute respiratory distress syndrome: ARDS）の患者では重症呼吸不全を合併することから、高濃度酸素吸入療法を要する。一方、一定時間以上の高濃度酸素吸入はそれ自体が急性肺傷害を引き起こすことが報告されており、高濃度酸素暴露急性肺傷害（hyperoxic acute lung injury: HALI）と呼ばれている（図1）[1]。HALIの肺組織では、過剰な炎症反応や肺胞上皮・血管内皮細胞の傷害、血管透過性の亢進が生じる[1, 2]。マウス HALI モデルにおいて、ケモカインの抑制やケモカイン遺伝子の欠損が肺組織への炎症細胞浸潤を抑制し、高濃度酸素環境下でのマウスの生存期間を改善させることが報告されている[3]。一方、炎症細胞を欠損させたマウスを用いた実験でも、高濃度酸素暴露により HALI が誘導されることや[2]、肺組織の炎症反応の抑制と高濃度酸素環境下での生存期間の改善が必ずしも相関しない場合があることも報告されている[4]。これらの報告は、HALIの病態が複雑かつ多数の因子に影響されていることを示唆しており、その詳細な病態機序については現在でも不明である。

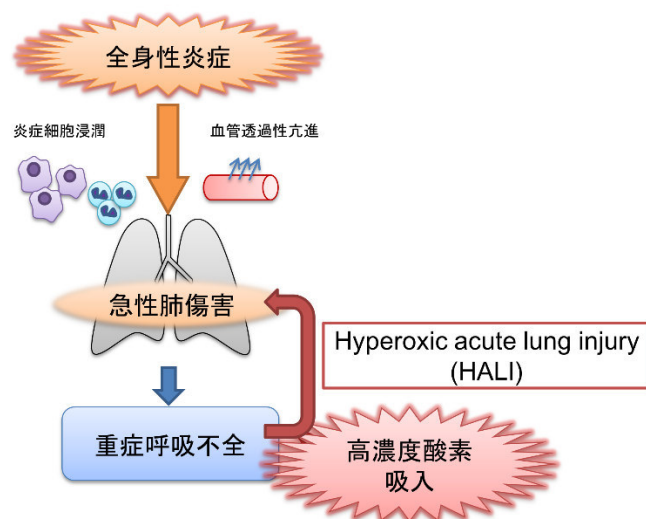


図1. 高濃度酸素暴露急性肺傷害の模式図

病原体の非存在下に生じる炎症は無菌性炎症と呼ばれ、近年注目を集めている。この無菌性炎症に NLRP3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain containing 3, NALP3 あるいは cryopyrin とも呼ばれる) インフラマソーム (inflammasome) が関与することがわかってきた。インフラマソームは細胞質内の蛋白複合体で、強力な炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) の産生を制御している[5, 6]。NLRP3 インフラマソームは、NLRP3、アダプター分子である apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)、IL-1 β 変換酵素である caspase-1 から構成され、caspase-1 を活性化することにより IL-1 β 前駆体 (pro-IL-1 β) を成熟型 IL-1 β へとプロセッシングして炎症を惹起する。痛風や石綿肺、珪肺症において、尿酸結晶や石綿、シリカといった危険シグナルが、NLRP3 インフラマソームを活性化し無菌性炎症を誘導することが報告されている[7]。またアルツハイマー病やメタボリックシンドローム、2 型糖尿病の病態にも NLRP3 インフラマソームが関与することが示されている[6]。さらに私たちの研究室では、心臓虚血再灌流傷害、動脈硬化、血管傷害および慢性腎臓病に NLRP3 インフラマソームが関与していることを報告している[8-12]。HALI に関しては、Kolliputi らが、高濃度酸素暴露がマクロファージのセラミド産生を増加させ、それによって NLRP3 インフラマソームが活性化し、肺胞上皮細胞の透過性亢進が誘導されることを報告している[13, 14]。また、Fukumoto らが、NLRP3^{-/-}マウスでは、HALI モデルでの肺組織の炎症が軽減されることを報告している[15]。しかし、NLRP3 インフラマソームの HALI における役割は不明な点が多い。そこで本研究では、HALI における NLRP3 インフラマソームの役割を解明する目的で、NLRP3 欠損および IL-1 β 欠損マウスを用いて、高濃度酸素環境下での生存率に着目して解析・検討を行った (図 2)。

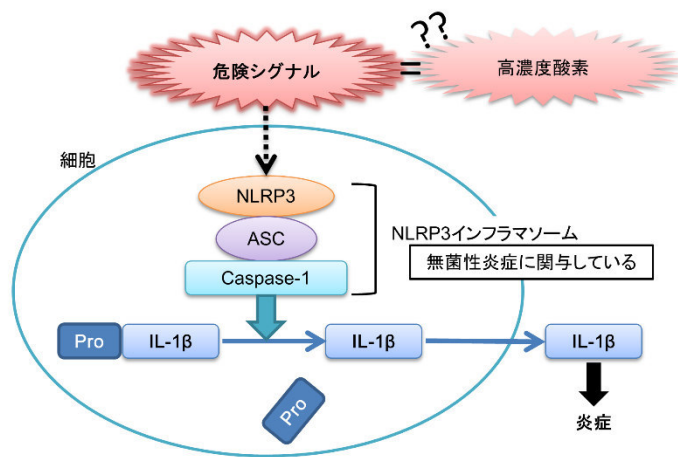


図 2. NLRP3 インフラマソームの模式図と本研究の仮説

2. 実験材料と方法

2-1. 使用動物

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）に従い施行した。

実験動物として C57BL/6J（野生型：wild-type (WT)）は日本 SLC より購入した。NLRP3 欠損マウス（NLRP3^{-/-}マウス）および IL-1 β 欠損マウス（IL-1 β ^{-/-}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 [16, 17]。NLRP3^{-/-}マウスおよび IL-1 β ^{-/-}マウスは 12 世代以上の戻し交配を行い、C57BL/6J 系バックグラウンドとして実験に用いた。

2-2. 実験モデル作製

8～14 週齢雌性マウスを使用した。プラスチック製酸素チャンバー（40×35×30 cm）内へ 90 % 酸素を 7 L/min で送気し、酸素チャンバー内でマウスを飼育した（図 3）。チャンバー内温度は 24～25℃に調節し、明暗時間（各 12 時間）を一定にした環境で、自由飲水・自由摂食下で飼育した。マウスの生存確認は 12 時間毎に行った。

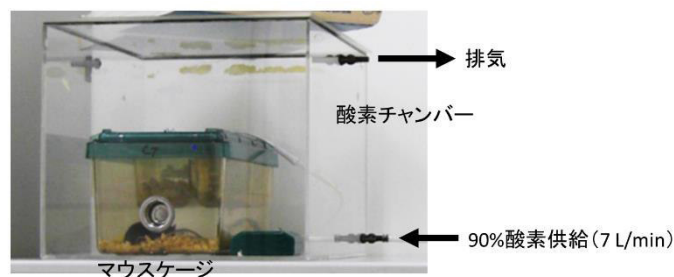


図 3. マウス HALI モデルの作成

予備検討として WT マウスを 90 % 酸素チャンバー内で飼育し、飼育後 24 時間、48 時間、72 時間の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid : BALF) 中の総細胞数、マクロファージおよび好中球の解析を行った (図 4A, B)。90 % 酸素暴露後 72 時間以降で総細胞数、マクロファージおよび好中球数はいずれも著大な増加を認めた。また胸部 CT で高濃度酸素暴露 72 時間より肺水腫が認められることを確認した (図 4C)。この結果より、90 % 酸素暴露 72 時間後のマウスよりサンプルを採取することとした。なお胸部 CT 撮影には Latheta LCT-200 (Hitachi Aloka Medical, Ltd., 東京) を用いた。

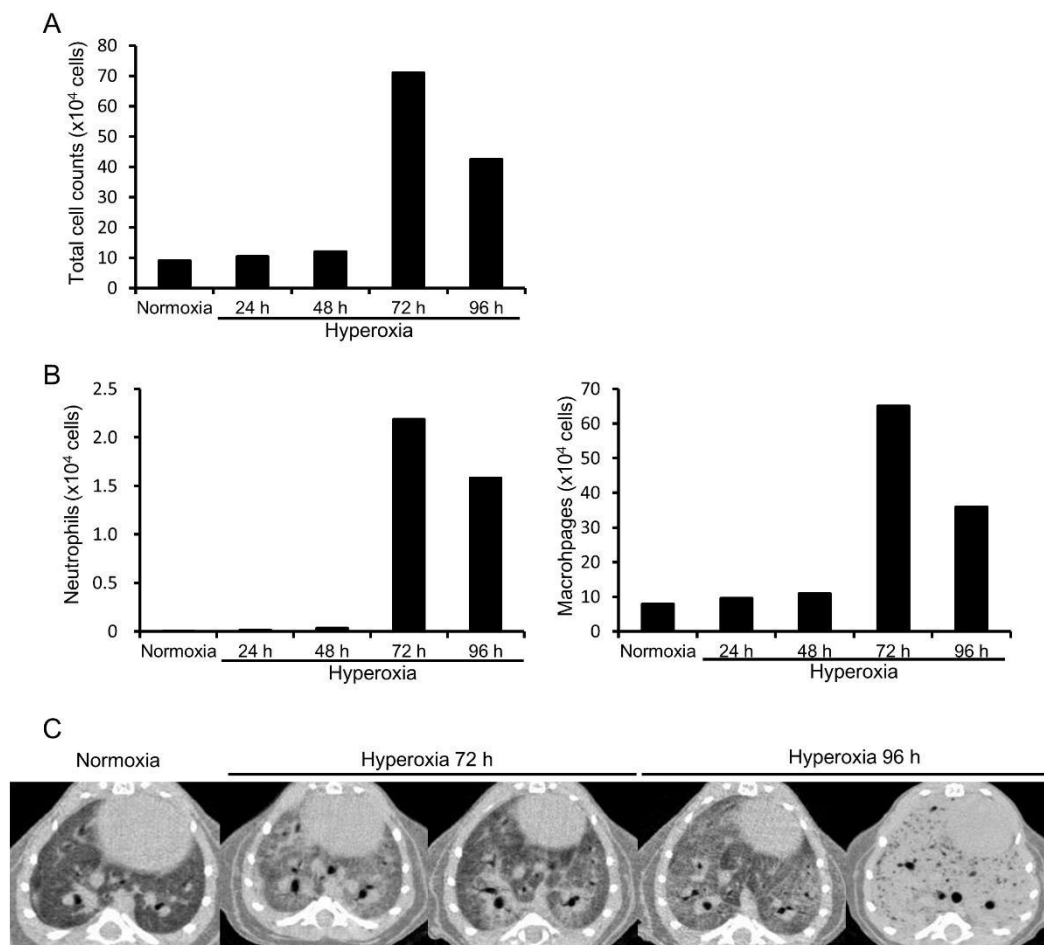


図 4. 本研究における最適酸素暴露時間検討結果

A-B. WT マウスを 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間高濃度酸素暴露させ BALF を回収した (各 n=2)。

A. 総細胞数

B. 細胞分画をフローサイトメトリーで解析した (CD11c⁺: 肺泡マクロファージ、Gr-1⁺/CD45R⁻: 好中球、各 n=2)。

C. 正常酸素濃度環境下および高濃度酸素暴露 72 時間、96 時間の WT マウスの胸部 CT を撮影した。

2-3. BALF の解析

イソフルラン吸入全身麻酔下にマウスの気管を露出し、18 G カテーテルをカニューレションした。カテーテルよりリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered

saline : PBS) 0.8 mL/回を注入し 4 回肺胞洗浄を行った。回収した BALF は 1000 rpm、10 分、4℃で遠心した。遠心後の上清は-30℃で保管し、その後の解析に使用した。沈殿した細胞成分は PBS で懸濁し、トリパンブルーで染色後に血球計算盤で総細胞数をカウントした。細胞分画はフローサイトメトリー法あるいはサイトスピン (800 rpm、8 分、22℃) 後に Diff-Quik 染色 (Sysmex, 神戸) を行い算出した。

2-4. Real-time RT-PCR

右心室より PBS で灌流・脱血後の肺組織より ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., 富山) で RNA を抽出し、Superscript VILO™ cDNA Synthesis Kit (life technologies, MD) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA は SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., 滋賀) を用い、Takara TP960 PCR Thermal Cycler Dice Detection System (Takara Bio Inc., 滋賀) で mRNA を検出した。mRNA の発現量の計算は検量線法を用い、18S rRNA に対する発現量の比として算出した。結果は正常酸素濃度環境下の WT マウスに対する割合で示した。

プライマー配列

| Gene | Forward | Reverse |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>Il1b</i> | 5'-TGAAGTTGACGGACCCCAA-3' | 5'-TGATGTGCTGCTGTGAGATT-3' |
| <i>Ccl2</i> | 5'-GGCTCAGCCAGATGCAGTTAAC-3' | 5'-GCCTACTCATTGGGATCATCTTG-3' |
| <i>Cxcl1</i> | 5'-GCTGGGATTACCTCAAGAA-3' | 5'-TCTCCGTTACTTGGGGACAC-3' |
| <i>Il6</i> | 5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3' | 5'-CACGATTTCCCAGAGAACATGTG-3' |
| <i>Lif</i> | 5'-ATTGTGCCCTTACTGCTGCTG-3' | 5'-GCCAGTTGATTCTTGATCTGGT-3' |
| <i>Mmp9</i> | 5'-CCTGGAATCAGACGACATCTTC-3' | 5'-TGGAAACTCACACGCCAGAA-3' |
| <i>Bax</i> | 5'-TTGCTGATGGCAACTTCAAC-3' | 5'-GATCAGCTCGGGCACTTTAG-3' |
| <i>Pink1</i> | 5'-GCTTGCCAATCCCTTCTATG-3' | 5'-CTCTCGCTGGAGCAGTGAC-3' |
| <i>Rn18s</i> (18S rRNA) | 5'-GTAACCCGTTGAACCATT-3' | 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' |

2-5. Western blot 法

右心室より PBS で灌流・脱血後の肺組織および培養細胞より RIPA バッファ―を用いて蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質は Laemmli サンプルバッファ―を加えて 95℃、5 分間処理し、SDS-PAGE で分離、PDVF 膜へ転写した。転写後の PDVF 膜を 2 % カゼインまたは 3 % bovine serum albumin (BSA) で室温、1 時間ブロッキングし、4℃、over night で各 1 次抗体をインキュベートした。

続いて各 1 次抗体に対する horseradish peroxidase (HRP) 付き 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、Western blot Quant HRP Substrate (Takara Bio Inc., 滋賀) で化学発光させ、Image Quant LAS 4000 mini (GE healthcare Life Sciences, NJ) を用いてバンドの検出を行った。 β -actin の発現量を内在性コントロールとして使用した。検出したバンドの定量化は Image J 1.47v (National Institutes of Health, Bethesda, MD) で行った。

使用抗体

| | 抗体 | 製造元 |
|-------|---------------------------------|--|
| 1 次抗体 | Stat3 | Cell Signaling Technology, Inc., MA |
| | phospho-Stat3 (p-Stat3, Tyr705) | Cell Signaling Technology, Inc., MA |
| | Bax | Cell Signaling Technology, Inc., MA |
| | Bcl-2 | Cell Signaling Technology, Inc., MA |
| | NLRP3 | R&D System |
| | β -actin | Sigma-Aldrich |
| 2 次抗体 | HRP-goat anti-mouse IgG | Invitrogen |
| | HRP-goat anti-rabbit IgG | Zymax Grade, Zymed Laboratories Inc., CA |

<試薬組成>

RIPA バッファ― : 20 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 1 % Triton X, 10 % glycerol, 1 % deoxycholic acid, 0.1 % SDS, 50 mM NaF, and 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

2-6. MMP-9 測定

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 蛋白濃度は、MMP-9 activity assay kit (QuikZyme Biosciences, Leiden, Netherlands) を用いて測定した。

2-7. 組織学的検討

肺組織は気管より 10 % ホルマリンを 1 mL 注入して固定し、パラフィン包埋した。肺組織切片は 5 μ m 厚で作成し Hematoxyline-Eosin (HE) 染色を行った。好中球浸潤の評価には、好中球エステラーゼを特異的に検出する naphthol AS-D chloroacetate esterase staining kit (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., 東京) を用いた。結果は顕微鏡 60 倍で無作為に抽出した 10 視野の陽性細胞数で示した。

免疫組織化学染色は、酸化ストレスのマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) および白血球のマーカーである CD45 の検出に用いた。脱パラフィン後の組織切片を Target Retrieval Solution (Dako, CA) で抗原賦活し、正常ヤギ血清でブロッキングを行った。その後 CD45 抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を 4°C、over night でインキュベートした。その後 Histofine Simple Stain Rat MAX PO (Nichirei Corporation, 東京) と反応させた。4-HNE 免疫組織化学染色については、抗原賦活後の組織切片を IgG blocking reagent (MOM Immunodetection Kit; Vector Laboratories) でブロッキングし、4-HNE 抗体 (clone HNEJ-2, Japan Institute for the Control of Aging, Nikken SEIL Co., 静岡) を 4°C、over night でインキュベートした。その後、ビオチン化 IgG 抗体および avidin-peroxidase (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories) と反応させた。いずれも DAB substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で検出を行い、対比染色にはヘマトキシリンを用いた。陰性コントロールとして、一次抗体の代わりにアイソタイプコントロール抗体 (Vector Laboratories) を用い、陽性細胞が存在しないことを確認した。染色した標本は顕微鏡 (FSX-100, Olympus, 東京) で解析した。無作為に抽出した複

数視野で 500 細胞をカウントし、そのうちの陽性細胞の割合を結果として示した。

2-8. アポトーシスの検出

アポトーシスの検出は TUNEL 染色および cleaved caspase-3 の免疫組織化学染色で行った。TUNEL 染色は In situ Apoptosis Detection Kit (Takara Bio, 滋賀) を用いて行った。

まず脱パラフィン後の組織切片を 1 mM EDTA、圧力鍋で 10 分間加熱処理した。TUNEL 染色では、加熱処理後の切片を 3 % H_2O_2 で内在性ペルオキシダーゼブロックし、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 酵素で 37°C、90 分間インキュベートした。cleaved caspase-3 免疫組織化学染色では、加熱処理後の切片を 1 % H_2O_2 で内在性ペルオキシダーゼブロックし、さらに正常ヤギ血清でブロッキングを行った後、cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., Boston, MA) を 4°C、over night でインキュベートした。その後 Histofine Simple Stain Rabbit MAX PO (Nichirei Corporation, Japan) と反応させ、DAB substrate kit で検出した。対比染色にはヘマトキシリンを用いた。標本は顕微鏡で検鏡し、無作為に抽出した複数視野で 500 細胞をカウントし、そのうちの陽性細胞の割合を結果として示した。

2-9. 肺組織 wet/dry 重量比の算出と BALF 蛋白濃度の測定

マウスより左肺を切除し wet weight として重量を測定した。その後 75°Cオーブンで 72 時間左肺を乾燥させ、その後 dry weight として重量を測定した。BALF 蛋白濃度は BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., MA) で測定した。

2-10. IL-1 β の測定

BALF 上清中の IL-1 β は、mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems) を用いて測定した。

2-11. フローサイトメトリー

BALF 中の細胞分画のフローサイトメトリーを行った。細胞は下記の抗体によって二重染色し、FACSCalibur および CellQuest software version 3.3 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて解析した。

非特異的な染色を除外するため、アイソタイプコントロール抗体を陰性コントロールとして使用した。

使用抗体

| APC (allophycocyanin) | FITC (fluorescein isothiocyanate) | PE (phycoerythrin) |
|--------------------------------|--|--|
| anti-CD45 (eBioscience) | anti-CD45R (eBioscience), anti-CD11c (BD Biosciences) | anti-Ly6G (BD Biosciences) anti-CD11b (eBioscience) |

2-12. 細胞培養

MLE 12 (murine lung epithelial cells) および MH-S (murine alveolar macrophages) 細胞株は American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。MLE 12 細胞は 10 % ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, glucose 1000 mg/L, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 大阪) で培養した。MH-S 細胞は 10 % FBS、0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) 含有 RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) で培養した。WT および NLRP3^{-/-}マウ

ス由来の不死化マウス骨髓由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages: BMDMs) は E. Latz (University of Bonn) の好意により提供され[18]、10 % FBS 含有 DMEM (glucose 4500 mg/L, Sigma-Aldrich) で培養した。

マウス肺由来初代肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージは以前の報告に従い分離・培養した[19, 20]。マウスの気管にカニューレーションを行い、PBS で肺胞洗浄し肺胞マクロファージを分離した。右心室より PBS を灌流させ脱血後に肺組織を摘出、collagenase type I (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 大阪)、dispase (Dispase II, Godo Shusei Co., Ltd., 東京) および DNase (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) で分解した。分解した細胞を培養ディッシュに播種し 30 分間インキュベートして、肺胞マクロファージを培養ディッシュに接着させ分離した。上清中の細胞を肺胞上皮細胞と判断し、回収、播種した。回収した肺胞上皮細胞に I 型コラーゲンおよびサーファクタントプロテイン C が発現していることを確認した。培養ディッシュに接着させた肺胞マクロファージと肺胞洗浄により回収した肺胞マクロファージを合わせて肺胞マクロファージとして使用した。

腹腔由来好中球は以前の報告に従い、9 % カゼインの腹腔内投与により好中球を誘導し回収した[21]。回収した好中球は 10 % FBS 含有 RPMI-1640 で培養した。

細胞の高濃度酸素暴露時は、インキュベーター内を 90 % 酸素および 5 % 二酸化炭素濃度で維持した。

2-13. 好中球遊走能の解析

好中球遊走能は 24-well 培養プレートで Transwell migration assay (3 μ m 孔ポリカーボネート膜、Corning, NY) を用いて解析した[21]。MLE 12 細胞の培養上清あるいは CXCL1 (KC, PeproTech Inc., NJ) を下層に加えた後、上層に 2×10^5 細胞の好中球を加え、37°C で 1 時間培養した。下層へ移動した好中球を回収し、フ

ローサイトメトリーを用いて細胞数をカウントした。

2-14. 共培養実験

分離共培養実験は 6-well 培養プレートで Transwell (0.4 μ m 孔ポリカーボネート膜、Corning, NY) を用いて行った。MLE 12 細胞 (1×10^6 細胞) を下層に播種し 24 時間培養後、上層へ MH-S 細胞 ($5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞) あるいは腹腔由来好中球 ($5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞) を加えて 8 時間培養した。その後下層の MLE 12 細胞より蛋白質を抽出した。接触共培養実験は 6-well 培養プレートを用いて行った。

2-15. Adoptive transfer

WT マウスおよび NLRP3^{-/-}マウスより、各々腹腔由来好中球を 2-12 に記載した方法で採取した。採取した好中球は頸静脈より 1×10^6 細胞/匹投与し、投与 5 時間後より高濃度酸素暴露を開始し、解析した。

2-16. 統計解析

データは IBM SPSS statistics Version 21 Software (IBM Japan Ltd., 東京) を用いて解析し、値は平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で記した。独立 2 群間の比較には *t* 検定を用い、多群間比較には一元配置分散分析を行い、事後比較には Tukey あるいは Games-Howell の方法を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

3. 結果

3-1. 高濃度酸素環境下におけるマウスの生存解析

最初に、WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスおよび IL-1 β ^{-/-}マウスを 90 % 酸素チャンバー内で飼育し、生存解析を行った。マウスを高濃度酸素濃度環境下で飼育すると、急性肺傷害が進行し死に至るが、当初の予測に反し、NLRP3^{-/-}マウスの生存期間は WT マウスと比較して有意に短縮していた（生存期間中央値：WT マウス 120 \pm 2.28 時間、NLRP3^{-/-}マウス 96 \pm 6.53 時間、 $p<0.01$ 、図 5A）。一方、WT マウスと IL-1 β マウスの生存期間に有意差を認めなかった（生存期間中央値：WT マウス 120 \pm 0.00 時間、IL-1 β ^{-/-}マウス 108 \pm 10.25 時間、図 5B）。

高濃度酸素暴露 72 時間後のマウスから採取した BALF 中の IL- β 濃度は、正常酸素濃度環境下のマウスと比較して有意な上昇は認めず、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスの間にも有意差を認めなかった（図 5C）。肺組織での *Il1b* mRNA 発現量は高濃度酸素暴露により有意に上昇したが、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスの間に有意差を認めなかった（図 5D）。

以上の結果より、NLRP3 が IL-1 β 非依存的に高濃度酸素環境下でのマウスの生存期間に関与している可能性が考えられた。

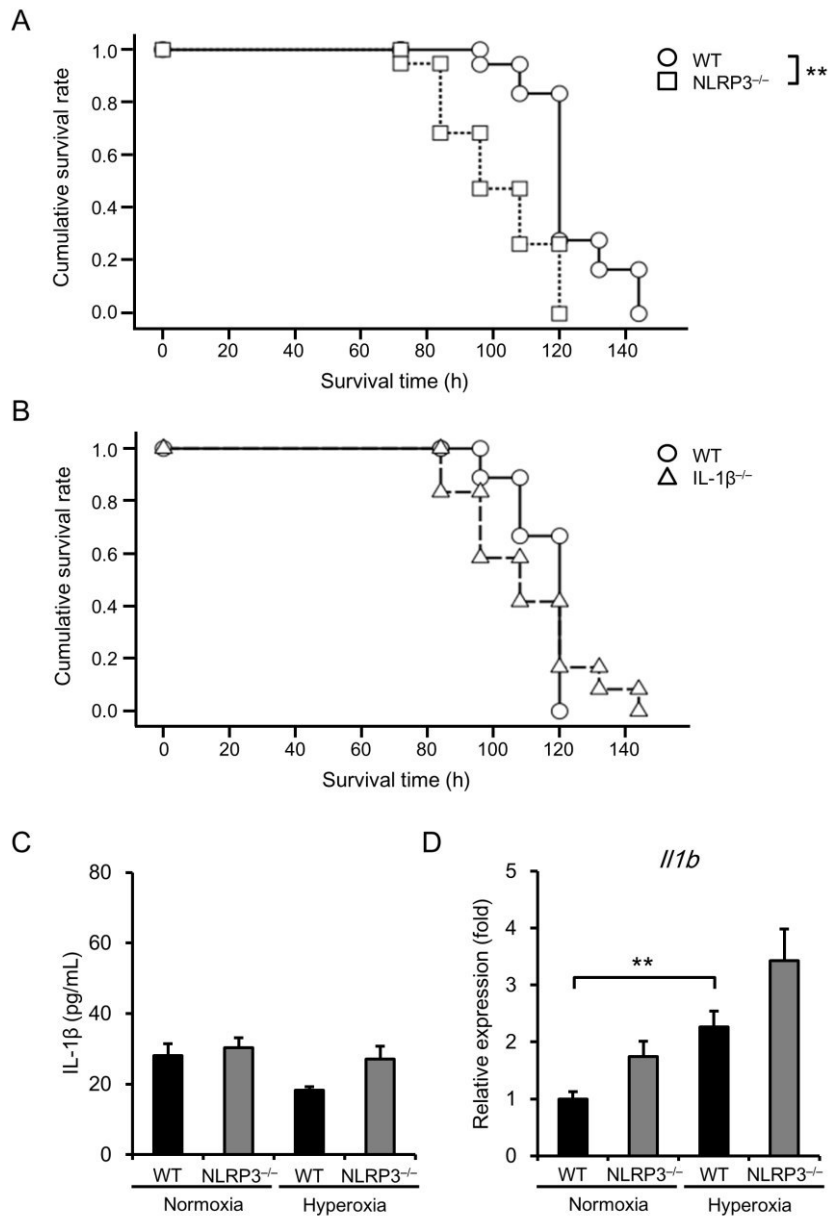


図 5. 高濃度酸素環境下でのマウス生存解析と IL-1β 産生

- A. 高濃度酸素環境下での WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスの生存解析を Kaplan-Meier 法で行った (各 n=18-19)。
- B. 高濃度酸素環境下での WT マウスと IL-1β^{-/-}マウスの生存解析を Kaplan-Meier 法で行った (各 n=9-12)。
- C. 正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより採取した BALF 中の IL-1β 濃度 (正常酸素濃度: 各 n=3-5、高濃度酸素: 各 n=12-14)。
- D. 正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後の肺組織 *Il1b* mRNA 発現量 (正常酸素濃度: 各 n=6、高濃度酸素: 各 n=9-12)。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.01$ であるものを**で示した。

3-2. 高濃度酸素暴露による肺傷害の解析

高濃度酸素暴露後の WT マウスの肺組織の HE 染色では、肺胞隔壁の肥厚、うつ血および肺水腫が認められ、これらの所見は NLRP3^{-/-}マウスとの間に有意差を認めなかった (図 6A)。また、高濃度酸素暴露により肺組織で活性酸素種が産生されることが報告されていることから[1]、脂質過酸化のマーカーで、活性酸素種の産生を示す 4-HNE の肺組織免疫組織化学染色を行った。高濃度酸素暴露により陽性細胞数は有意に増加するが、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスの間に有意差を認めなかった (図 6B)。血管透過性の指標である肺組織の wet/dry 重量比および BALF 蛋白濃度も、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスの間に有意差を認めなかった (図 7A, B)。

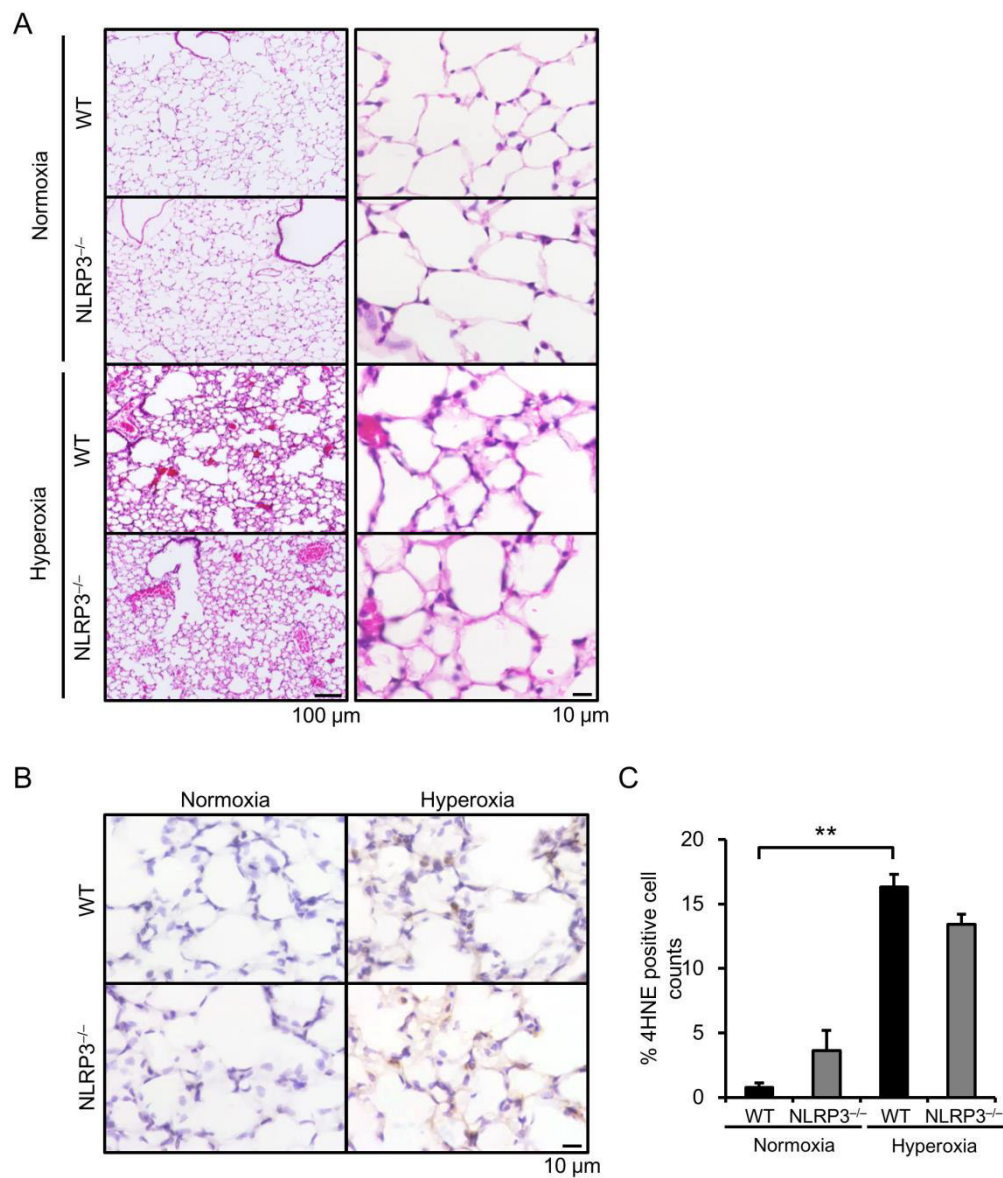


図 6. 肺組織 HE 染色および 4-HNE 免疫組織化学染色

正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより採取した肺組織切片を用いた。

A. HE 染色を行った。代表的な組織像を示す (各 n=3-4)。

B-C. 4-HNE 免疫組織化学染色を行った (各 n=3-4)。

B. 代表的な組織像を示す。

C. 4-HNE 陽性細胞数を定量した (各 n=3-4)。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**で示した。

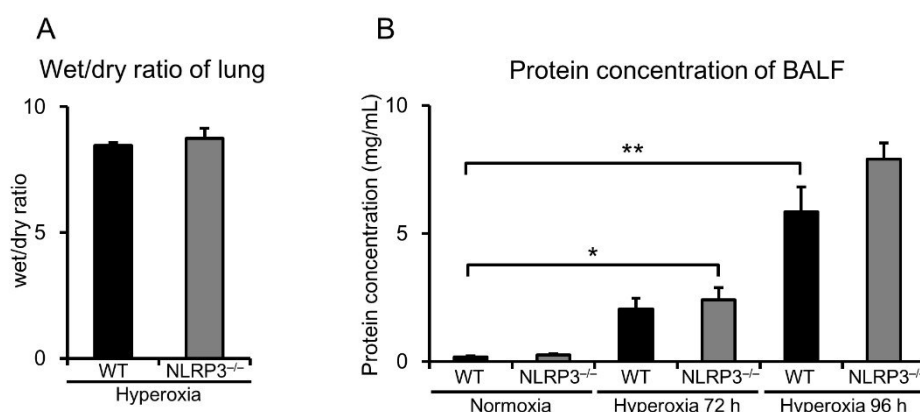


図 7. 肺組織 wet/dry 重量比と BALF 蛋白濃度

A. 高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより採取した肺組織で wet/dry 重量比を解析した (各 n=5-7)。

B. 正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間、96 時間後のマウスより採取した BALF の蛋白濃度を測定した (各 n=5-8)。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ であるものを*、 $p < 0.01$ であるものを**で示した。

3-3. 肺組織への炎症細胞浸潤の評価

肺組織への炎症細胞浸潤を評価するため、CD45 免疫組織化学染色を行った。高濃度酸素暴露により WT マウス肺組織における CD45 陽性細胞数は正常酸素濃度環境下と比較して増加し、NLRP3^{-/-}マウスではその増加が有意に抑制されていた (図 8A, B)。次に、BALF 中の炎症細胞数およびその分画を解析した。CD45 免疫組織化学染色と同様に、WT マウスでは高濃度酸素暴露により総細胞数は増加し、NLRP3^{-/-}マウスではその増加が有意に抑制されていた (図 8C)。フローサイトメトリーで解析した細胞分画は、肺胞マクロファージ (CD11c 陽性細胞) および好中球 (Ly6G 陽性かつ CD45R 陰性細胞) が高濃度酸素暴露後の WT マウスで増加し、NLRP3^{-/-}マウスではその増加が有意に抑制されていた (図 8D)。NLRP3^{-/-}マウス肺組織における好中球浸潤の抑制は、好中球エステラーゼ染色でも確認した (図 9A, B)。

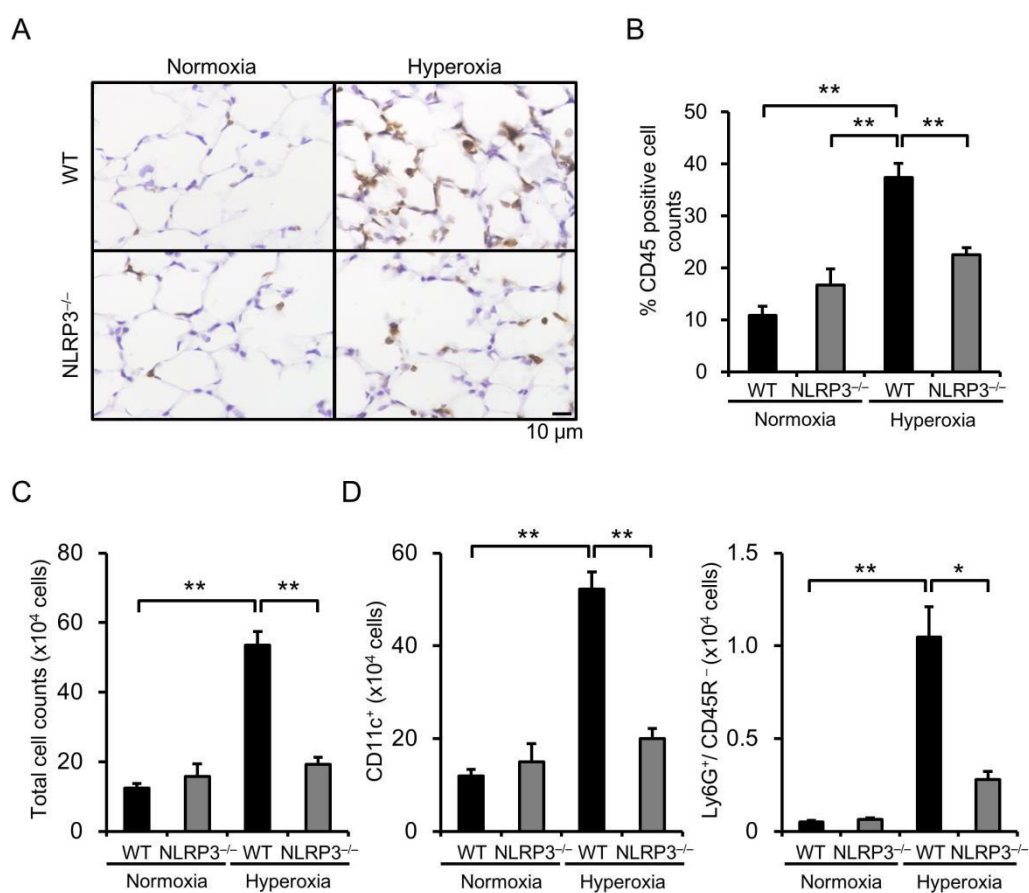


図 8. 肺組織および BALF 中の炎症細胞浸潤

A-B. 正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより採取した肺組織切片で CD45 免疫組織化学染色を行った (各 n=3-4)。

A. 代表的な組織像を示す。

B. CD45 陽性細胞数を定量した。

C-D. 正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより BALF を採取した。

C. 総細胞数をカウントした (正常酸素濃度: 各 n=3-5、高濃度酸素: 各 n=5-6)。

D. 細胞分画 (CD11c⁺: 肺泡マクロファージ、Ly6G⁺/CD45R⁻: 好中球) をフローサイトメトリーで解析した。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.05$ であるものを*、 $p<0.01$ であるものを**で示した。

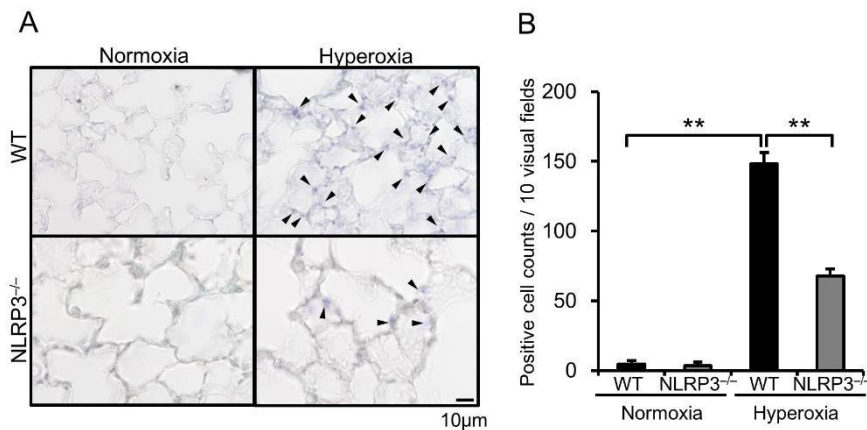


図 9. 肺組織好中球エステラーゼ染色

正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより採取した肺組織切片で好中球エステラーゼ染色を行った (各 $n=3-4$)。

A. 代表的な組織像を示す。矢頭は好中球エステラーゼ陽性細胞を示している。

B. 好中球エステラーゼ陽性細胞数を定量した。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.01$ であるものを**で示した。

3-4. 肺組織 mRNA 発現解析

次に、NLRP3^{-/-}マウスで高濃度酸素暴露による肺組織への炎症細胞浸潤が抑制されるメカニズムを検討した。肺組織の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で解析すると、高濃度酸素暴露により *Ccl2*、*Cxcl1*、*Il6* および *Lif* の発現は WT マウス肺組織で有意に増加するが、NLRP3^{-/-}マウスではその増加が有意に抑制されていた (図 10)。

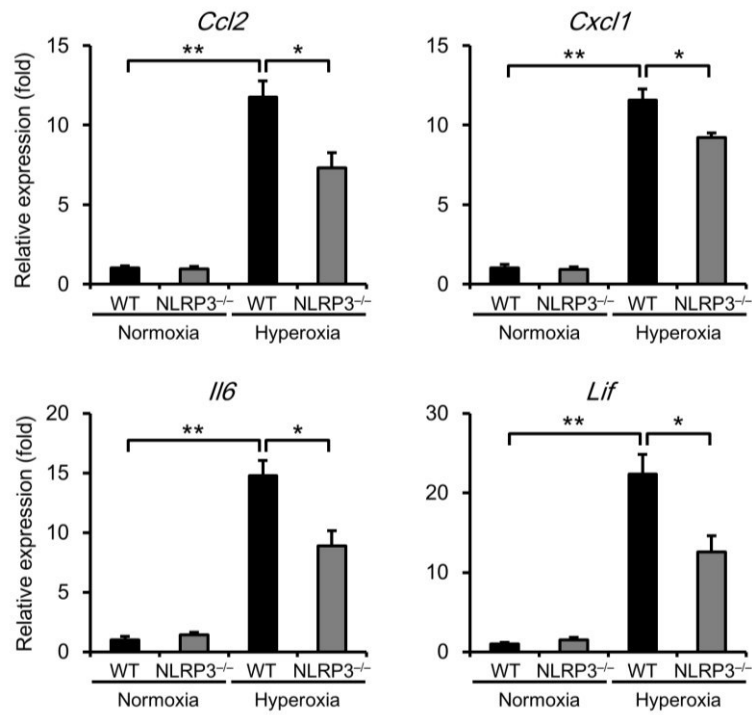


図 10. 肺組織 mRNA 発現量

正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウス肺組織の mRNA 発現量を real-time RT-PCR で解析した（正常酸素濃度：各 n=6、高濃度酸素：各 n=6-12）。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.05$ であるものを*、 $p<0.01$ であるものを**で示した。

3-5. 肺組織における MMP-9 および Bcl-2 発現解析

NLRP3^{-/-}マウスでは、高濃度酸素環境下で生存期間が短縮するが、炎症細胞浸潤はむしろ抑制されることが明らかとなったことから、炎症細胞浸潤以外の HALI の病態に関与する因子について解析を行った。これまで MMP-9 とアポトーシスが HALI の増悪因子であることが報告されている[22, 4]。そこで、肺組織における *Mmp9* mRNA 発現を real-time RT-PCR で解析したところ、高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウスでは WT マウスと比較して、有意にその発現が増加していた (図 11A)。肺組織 MMP-9 蛋白発現量も、NLRP3^{-/-}マウスでは WT マウスと比較して有意な増加を認めた (図 11B)。アポトーシスに関しては、抗アポトーシスに作用する Bcl-2 およびアポトーシス促進因子である Bax の解析を行った。肺組織における *Bcl2* mRNA 発現量は高濃度酸素暴露後の WT マウスで増加するが、NLRP3^{-/-}マウスではその増加が有意に抑制され、アポトーシスの指標である *Bax/Bcl2* 比は有意に上昇していた (図 11C)。Western blot 法による解析では、高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織では WT マウスと比較して、Bcl-2 の発現が有意に低下し、*Bax/Bcl-2* 比は有意に上昇していた (図 11D, E)。

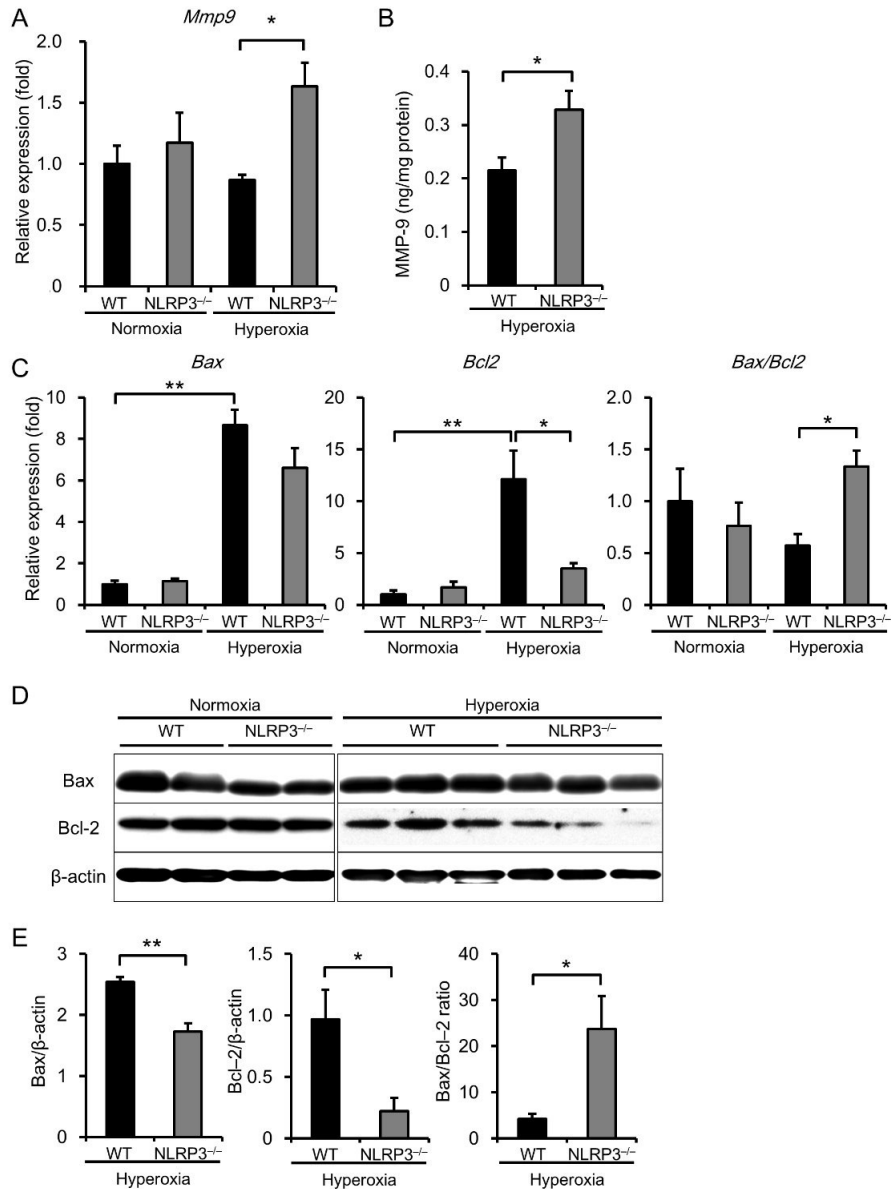


図 11. 肺組織 MMP-9 発現量と Bax および Bcl-2 発現量

正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより肺組織を採取した。

A. 肺組織の *Mmp9* mRNA 発現量を real-time RT-PCR で解析した (正常酸素濃度: 各 n=4-6、高濃度酸素: 各 n=7-8)。

B. 肺組織の MMP-9 蛋白発現量を解析した (各 n=3-4)。

C. 肺組織の *Bax* および *Bcl2* mRNA 発現量を real-time RT-PCR で解析した (正常酸素濃度: 各 n=4-6、高濃度酸素: 各 n=6-13)。

D-E. 肺組織の Bax および Bcl-2 蛋白発現量を Western blot 法で解析した (各 n=5-6)。

D. 代表的なバンドを示す。

E. バンドの定量を行った。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ であるものを*、 $p < 0.01$ であるものを**で示した。

3-6. 肺組織のアポトーシス

高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織で、WT マウスと比較して Bcl-2 の発現が有意に低下し、Bax/Bcl-2 比が有意に上昇していたことから、肺胞上皮細胞のアポトーシスを TUNEL 染色および cleaved caspase-3 に対する免疫組織化学染色を用いて解析した。高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織では、WT と比較して、TUNEL 陽性細胞、cleaved caspase-3 陽性細胞ともに有意な増加が認められた（図 12）。以上の結果から、肺胞上皮細胞のアポトーシスの進行が、高濃度酸素環境下での NLRP3^{-/-}マウスの生存期間短縮に関与していることが示唆された。

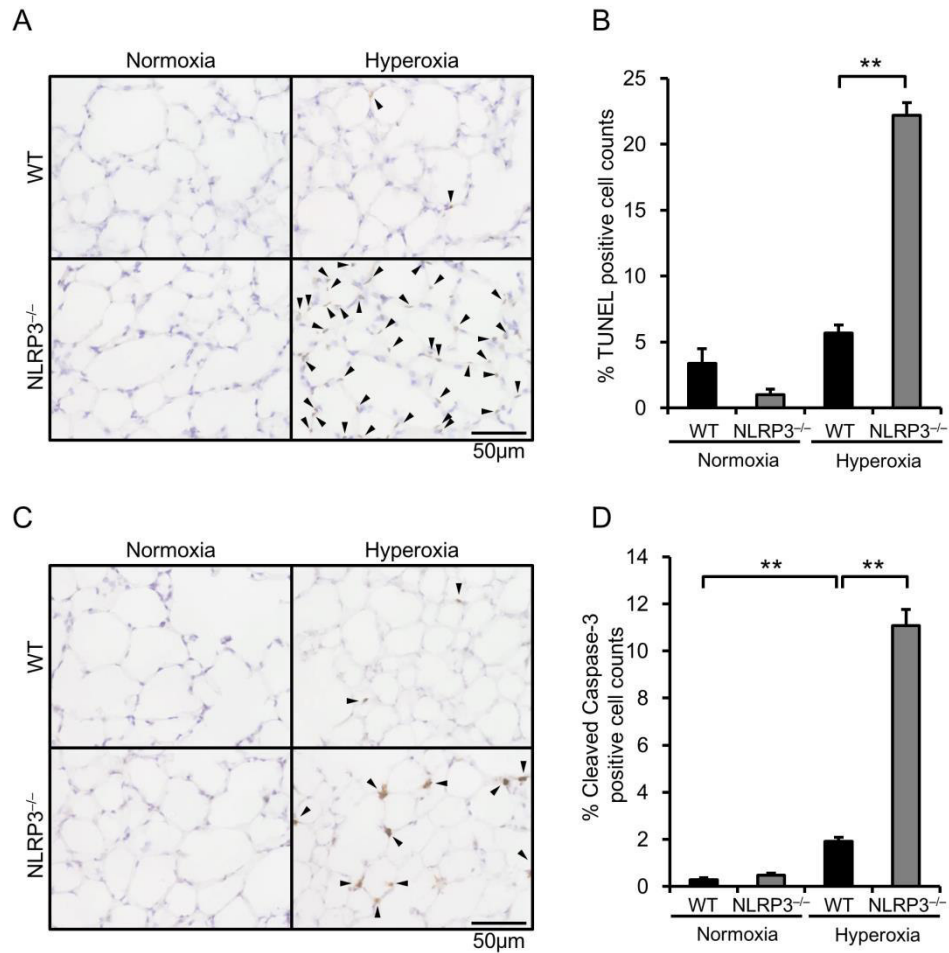


図 12. 肺組織のアポトーシス

正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより採取した肺組織切片を用いた。

A. TUNEL 染色を行った。代表的な組織像を示す。矢頭は陽性細胞を示している。

B. TUNEL 陽性細胞比率を示す (各 n=3-4)。

C. cleaved caspase-3 に対する免疫組織化学染色を行った。代表的な組織像を示す。矢頭は陽性細胞を示している。

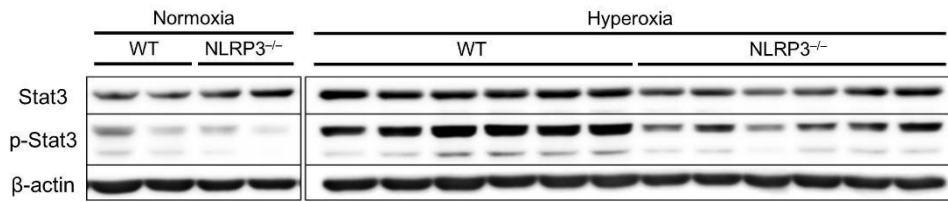
D. cleaved caspase-3 陽性細胞比率を示す (各 n=3-4)。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.01$ であるものを**で示した。

3-7. 肺組織における Stat3 発現解析

ここまでの解析から、MMP-9、Bcl-2、LIF および IL-6 が、NLRP3^{-/-}マウスにおける HALI の病態に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで、MMP-9 と Bcl-2 の共通の上流因子であり[22-26]、LIF や IL-6 により活性化（リン酸化）される Stat3 に着目した[27, 28]。肺胞上皮細胞における Stat3 の発現は HALI に保護的に作用し、その強制発現により高濃度酸素環境下でのマウスの生存期間が改善するとの報告がある[22, 29]。そこで、マウス肺組織における Stat3 およびリン酸化 Stat3 (phosphorylated-Stat3: p-Stat3) の発現を Western blot 法で解析した。正常酸素濃度環境下では WT と NLRP3^{-/-}マウスの Stat3 および p-Stat3 発現量に有意差を認めなかった（図 13A, B）。高濃度酸素暴露後の WT マウス肺組織では Stat3 および p-Stat3 の発現量は増加し、一方 NLRP3^{-/-}マウスではその増加が有意に抑制され、特に p-Stat3 でその発現増加の抑制が顕著であった（図 13A, B）。以上より、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスの肺組織における Stat3 および p-Stat3 発現量の相違により MMP-9 や Bcl-2 の発現量の相違が生じ、結果として NLRP3^{-/-}マウスでアポトーシスが進行し、高濃度酸素環境下で生存期間が短縮した可能性が考えられた。

A



B

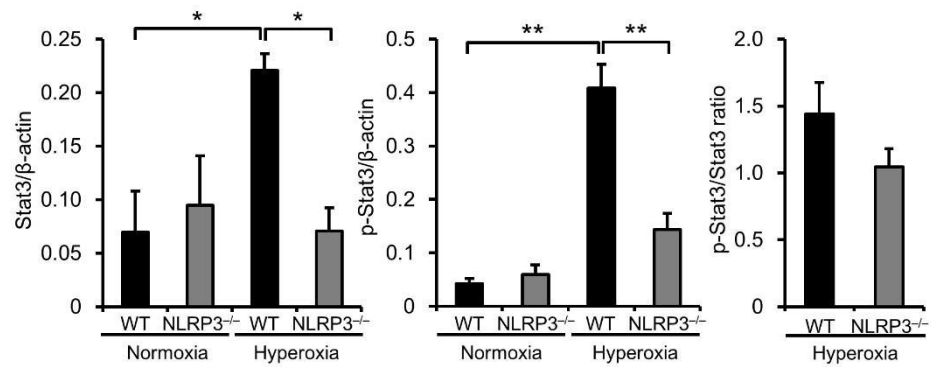


図 13. 肺組織における Stat3 の発現および活性化

正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウスより肺組織を採取した。

A. Stat3 およびリン酸化 Stat3 (phosphorylated-Stat3: p-Stat3) の発現を Western blot 法で解析した。

B. Western blot 法の結果を定量した (各 n=5-6)。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.05$ であるものを*、 $p<0.01$ であるものを**で示した。

3-8. 肺胞上皮細胞における Stat3 発現解析

次に NLRP3^{-/-}マウスの肺組織で Stat3 および p-Stat3 の発現量が減少するメカニズムを *in vitro* で検討した。まず、HALI に関与する肺組織の主要な構成細胞である肺胞マクロファージ、好中球および肺胞上皮における NLRP3 の発現を Western blot 法で解析した。マウス肺組織より分離・回収した初代培養細胞では、肺胞マクロファージにおいて NLRP3 の発現を認めたが、肺胞上皮細胞では発現を認めなかった (図 14A)。同様に、肺胞マクロファージの細胞株である MH-S 細胞では NLRP3 の発現を認めたが、肺胞上皮細胞の細胞株である MLE 12 細胞では NLRP3 の発現を認めなかった (図 14B)。一方、腹腔由来好中球では NLRP3 の発現を認めた (図 14C)。また Stat3 および p-Stat3 の発現は、MLE 12 細胞、MH-S 細胞および腹腔由来好中球いずれの細胞でも認められたが、MH-S 細胞では p-Stat3 の発現量が少ない傾向であった (図 14B, C)。さらに、各細胞を 90 % 酸素に暴露させたが、Stat3 および p-Stat3 の発現量に変化を認めなかった (図 14B, C)。

上述の通り、肺胞上皮細胞における Stat3 の発現が HALI の病態に重要であるが[22]、一方で肺胞上皮細胞自体には NLRP3 の発現を認めなかったことから、浸潤してくる炎症細胞により肺胞上皮の Stat3 および p-Stat3 の発現が変化するのではないかと考え、共培養実験を行った。Transwell を用いて、MLE 12 細胞を MH-S 細胞および腹腔由来好中球と分離共培養を行ったところ、いずれの共培養でも MLE 12 細胞の p-Stat3 の発現量が増加した (図 14D)。また、MH-S 細胞および腹腔由来好中球の培養上清を MLE 12 細胞に添加することでも、MLE 12 細胞の p-Stat3 の発現量が増加した (図 14D)。以上の結果から、浸潤してきたマクロファージや好中球からの液性因子により、肺胞上皮細胞の Stat3 の活性化が促進することが示唆された。*in vivo* の結果では、NLRP3^{-/-}マウスの肺組織への炎症細胞浸潤が抑制されており、そのため肺胞上皮細胞の Stat3 の活性化が抑制され、結果的に高濃度酸素環境下での生存期間が短縮する可能性が考えられた。一方、

肺胞上皮細胞の Stat3 発現量は共培養で変化を認めなかった。このことから、*in vivo* で認めた高濃度酸素暴露後の WT マウスと NLRP3^{-/-}マウス肺組織の Stat3 発現量の相違は、浸潤した炎症細胞自体の Stat3 の発現量を反映しているものと考えられた。

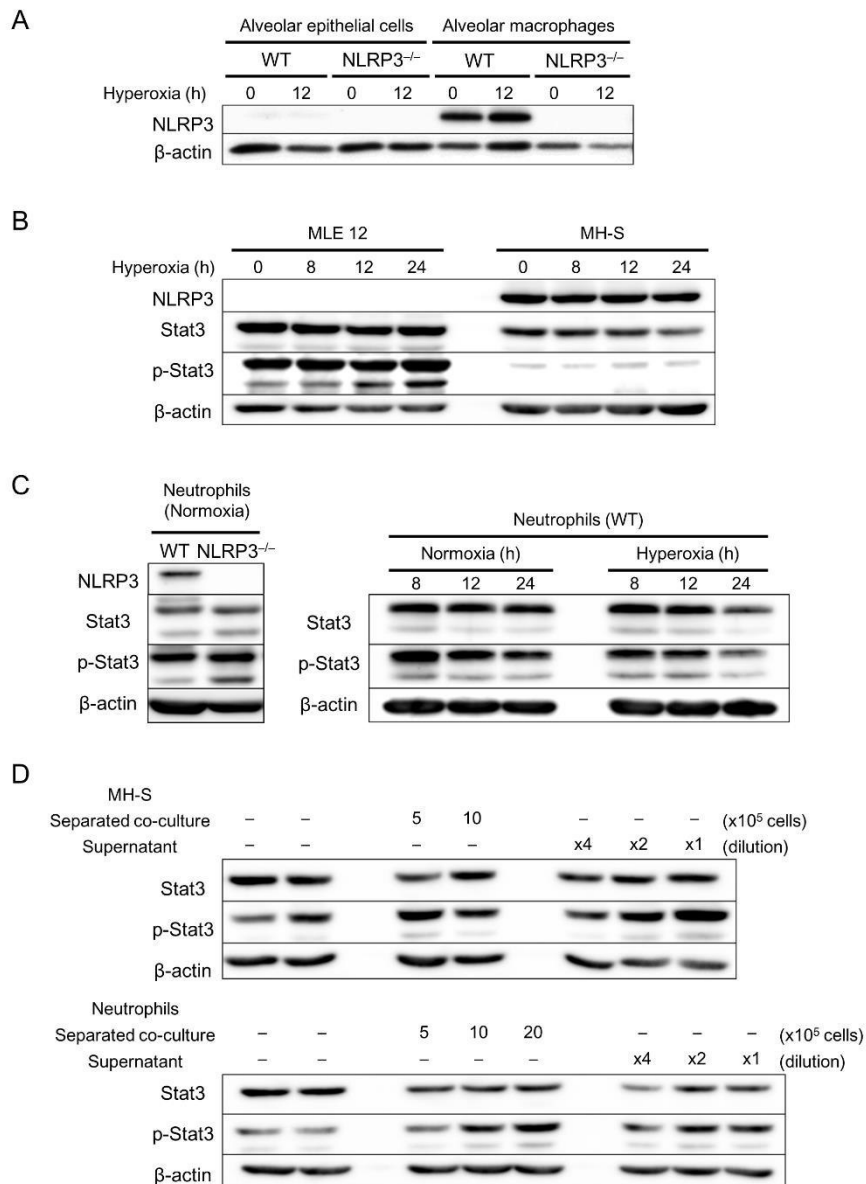


図 14. 肺胞上皮細胞における Stat3 の発現および活性化

- A. WT マウスおよび NLRP3^{-/-}マウスの肺組織より肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージを分離し、NLRP3 の発現を Western blot 法で解析した。
- B. 高濃度酸素暴露させた MLE 12 細胞および MH-S 細胞の NLRP3、Stat3 および p-Stat3 の発現を Western blot 法で解析した。
- C. WT マウスおよび NLRP3^{-/-}マウスより採取した腹腔由来好中球の NLRP3 の発現を Western blot 法で解析した。また高濃度酸素暴露させた腹腔由来好中球の Stat3 および p-Stat3 の発現を Western blot 法で解析した。
- D. MLE 12 細胞を MH-S 細胞 (5-10×10⁵ 細胞) および腹腔由来好中球 (5-20×10⁵ 細胞) と各々 8 時間分離共培養した。また MH-S 細胞および腹腔由来好中球の培養上清 (×4 および ×2 希釈) を MLE 12 細胞に添加し、8 時間培養した。その後の MLE 12 細胞の Stat3 および p-Stat3 の発現を Western blot 法で解析した。

3-9. NLRP3^{-/-}好中球およびマクロファージの機能解析

NLRP3^{-/-}マウス肺組織で炎症細胞浸潤が抑制されるメカニズムを *in vitro* で解析を行った。WT マウスおよび NLRP3^{-/-}マウスより各々腹腔由来好中球を採取し、MLE 12 の培養上清を用いて Transwell migration assay を行った。MLE 12 の培養上清により、WT 好中球の遊走は促進したが、NLRP3^{-/-}好中球では促進効果は認められなかった (図 15A)。未刺激 (Nil : RPMI-1640 を使用) の状態でも、NLRP3^{-/-}好中球の遊走は WT 好中球と比較して低下が認められた (図 15A)。なお CXCL1 ケモカインは好中球遊走を誘導する陽性コントロールとして使用した。

また、WT 不死化 BMDM および NLRP3^{-/-}不死化 BMDM 各々を高濃度酸素暴露させ、ケモカイン発現を real-time RT-PCR で解析した。WT 不死化 BMDM を高濃度酸素暴露させると *Ccl2* および *Cxcl1* の発現が増加するが、NLRP3^{-/-}不死化 BMDM ではその増加が有意に抑制されていた (図 15B)。

最後に、高濃度酸素環境下で NLRP3^{-/-}マウスの生存期間が短縮することへの好中球の役割を確認する目的で、adoptive transfer を行った。NLRP3^{-/-}好中球の transfer と比較して、WT 好中球の移入により、高濃度酸素環境下での NLRP3^{-/-}マウスの生存期間は有意に延長した (図 15C)。

以上の結果より、NLRP3^{-/-}マウスでは、好中球遊走能の低下とマクロファージのケモカイン産生の低下によって肺組織への炎症細胞浸潤が抑制されることが示唆された。さらに、好中球の NLRP3 の発現が、高濃度酸素環境下での生存期間に関与していることが示された。

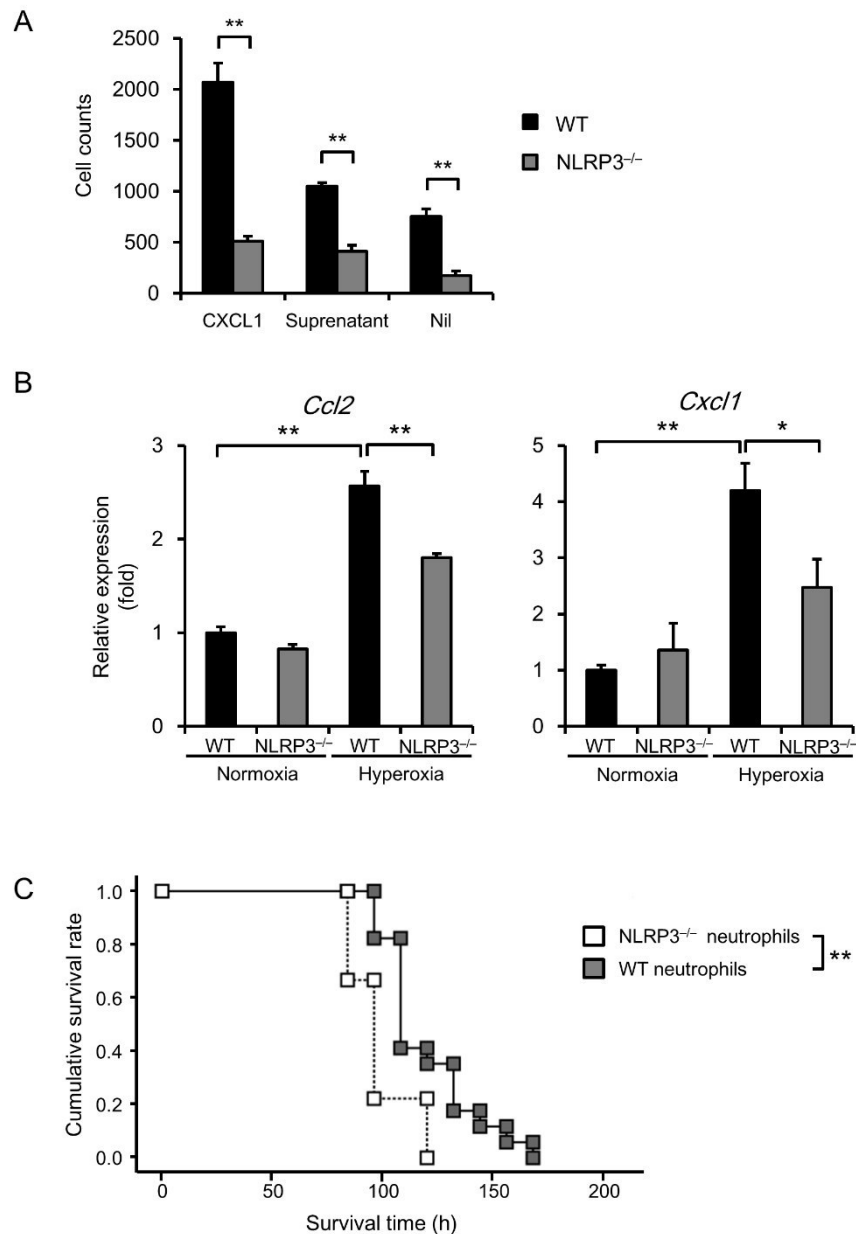


図 15. 高濃度酸素暴露 NLRP3^{-/-}マウスにおける好中球およびマクロファージの役割

- A. CXCL1 および MLE 12 細胞培養上清に対する WT および NLRP3^{-/-}好中球遊走能を Transwell migration assay で解析した (各 n=3)。Nil はコントロールとして RPMI-1640 を用いた。
- B. WT および NLRP3^{-/-}不死化 BMDMs を 48 時間高濃度酸素下で培養し *Ccl2* および *Cxcl1* mRNA 発現量を real-time RT-PCR で解析した。
- C. WT および NLRP3^{-/-}腹腔由来好中球を NLRP3^{-/-}マウスに adoptive transfer した。投与 5 時間後より高濃度酸素環境下で飼育し、Kaplan-Meier 法で生存解析を行った (各 n=9-15)。データは平均値±標準誤差で表示し、 $p<0.05$ であるものを*、 $p<0.01$ であるものを**で示した。

4. 考察

本研究では、以下の点を明らかにした。1) 高濃度酸素環境下では、NLRP3^{-/-}マウスは WT マウスと比較して有意に生存期間が短縮したが、IL-1 β ^{-/-}マウスと WT マウスの生存期間に有意差を認めず、肺組織における IL-1 β 産生にも有意な変化を認めなかった 2) 高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織で、炎症細胞浸潤およびサイトカインの発現が抑制された 3) 高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織では、MMP-9 発現が増加し、Bcl-2 発現が減少した 4) 高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織では、肺胞上皮のアポトーシス陽性細胞が増加した 5) 高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織では Stat3 の発現および活性化が低下した 6) 肺胞マクロファージおよび好中球は肺胞上皮細胞の Stat3 活性化を促進した 7) NLRP3 欠損により好中球の遊走能が低下し、高濃度酸素暴露時のマクロファージのケモカイン発現が低下した 8) WT 好中球の adoptive transfer により NLRP3^{-/-}マウスの高濃度酸素環境下での生存期間が延長した。

以上のことから、NLRP3 が IL-1 β 非依存的に炎症細胞浸潤に関与し、Stat3 シグナルを制御することで、HALI の病態に関与していることが示され、HALI の病態における NLRP3 の新たな役割が明らかになった。

HALI では炎症細胞浸潤、血管透過性亢進、血管内皮細胞や肺胞上皮細胞の傷害が認められる[3, 2]。過剰な炎症反応は肺傷害を増悪させるが、炎症反応の抑制が必ずしも高濃度酸素環境下でのマウスの生存期間を改善させるわけではない。炎症細胞浸潤は肺傷害の修復やリモデリングに不可欠であり[30]、炎症細胞浸潤は HALI の病態において増悪因子と保護因子の双方の側面を兼ね備えている。Bhandari らは、マウス HALI モデルにおいて、IL-13 欠損が肺組織の炎症反応を抑制するにも関わらず、DNA 傷害やアポトーシスにより生存期間を悪化させることを示している[4]。また Jain らは、SP-D (surfactant protein-D) 過剰発現マウスを用いて HALI モデルを解析し、SP-D 過剰発現マウスは、WT マウスと比較して炎症細胞浸潤に有意差を認めないものの、生存期間が改善することを

報告している[31]。本研究では、Fukumoto らの報告と同様に、NLRP3^{-/-}マウスで肺組織への炎症細胞浸潤が抑制されていたが[15]、組織学的な肺傷害の程度や活性酸素種の産生、血管透過性については WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスで有意差を認めなかった。また、予測に反して NLRP3^{-/-}マウスでは高濃度酸素環境下での生存期間が短縮していた。一方、IL-1 β ^{-/-}マウスと WT マウスの生存期間に有意差を認めなかったことから、NLRP3 が IL-1 β 非依存的に高濃度酸素環境下での生存期間に関与していると考えられた。近年、NLRP3 のインフラマソーム非依作用的な作用が報告されている[32, 21]。Shigeoka らは腎虚血再灌流モデルにおいて NLRP3^{-/-}マウスでは腎傷害が軽減するが、ASC^{-/-}マウスや caspase-1^{-/-}マウスでは傷害が軽減しないことを報告している[32]。私たちの研究室からも肝虚血再灌流モデルにおいて同様の知見を報告している[21]。NLRP3 インフラマソームの HALI への関与を明らかにするには、caspase-1^{-/-}マウスを用いた解析が必要であるが、本研究結果とこれらの報告を考慮すると、NLRP3 が NLRP3 インフラマソーム非依作用的に HALI に関与していると推測される。

本研究では、HALI に関与する主要な肺組織の構成細胞のうち、肺胞マクロファージと好中球では NLRP3 の発現を認めたが、肺胞上皮細胞では発現を認めなかった。このことは、NLRP3^{-/-}マウスの生存期間短縮に好中球とマクロファージが主要な役割を果たしていることを示唆している。NLRP3^{-/-}マウスでは高濃度酸素暴露後の肺組織へのマクロファージおよび好中球の浸潤が抑制されていた。私たちの研究室では、NLRP3^{-/-}好中球では 3 量体 G 蛋白質の活性化が抑制されることで、細胞内 Ca²⁺の増加や Rac の活性化、さらにはアクチン重合が抑制され、遊走能が低下することを以前に報告している[21]。本研究ではそれに加えて、肺胞上皮細胞の培養上清による好中球遊走の促進が NLRP3^{-/-}好中球で低下していることを明らかにした。このことは肺内でも NLRP3^{-/-}好中球の遊走能が低下していることを示している。また、高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織では CCL2 および CXCL1 の発現増加が抑制され、*in vitro* でも同様に NLRP3^{-/-}マクロファージで高濃度酸素暴露後の CCL2 および CXCL1 の発現増加が抑制さ

れていた。これらの結果から、肺組織において NLRP3 は好中球遊走能およびマクロファージのケモカイン発現を制御することで、炎症細胞浸潤に関与していると考えられた。

Stat 蛋白は転写因子の 1 つで、細胞膜から核へのシグナルを伝達し、過剰なサイトカイン発現や免疫反応を制御している。特に Stat3 は細胞の成長や生存に重要な役割を果たしている[24]。HALI と Stat3 については、Hokuto らが肺胞上皮細胞特異的な Stat3 の欠損により高濃度酸素環境下でのマウスの生存期間が短縮することを報告している[29]。また、Lian らは、肺胞上皮細胞に Stat3 を過剰発現させることで、高濃度酸素環境下で肺組織の MMP-9 発現が低下し、マウスの生存期間が改善することを示した[22]。さらに Bcl-2 は Stat3 によって制御され[23]、一方で Stat3 は IL-6 サイトカインファミリーである IL-6 および LIF によって活性化される[27, 28]。本研究では、高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織における Stat3 の発現および活性化は、WT マウスと比較して有意に低下していた。さらに高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織ではアポトーシス陽性の肺胞上皮細胞が有意に増加していた。本研究結果を支持する報告として、Zaubier らは WT および ASC^{-/-}マウスの心臓で認められる虚血プレコンディショニングによる心保護作用が、NLRP3^{-/-}マウスの心臓では認められないことを示しており、これは NLRP3^{-/-}マウスの心臓で Stat3 の発現が低下しているためであると考察している[33]。加えて、本研究では *in vitro* の解析で、好中球および肺胞マクロファージが液性因子を介して肺胞上皮細胞の Stat3 の活性化を促進していることを明らかにした。上述の通り、肺胞上皮細胞における Stat3 の発現は HALI の病態に重要な役割を果たしており[29, 22]、Stat3 とその下流の因子であるアポトーシスが特に高濃度酸素環境下での NLRP3^{-/-}マウスの生存期間短縮に関与していると考えられた。

本研究の実施中に、Zhang らのグループから NLRP3^{-/-}マウスは HALI に抵抗性であることが報告された[34]。彼らは、NLRP3^{-/-}マウス肺組織で PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) の発現がベースラインおよび高濃度酸素暴露後いずれ

も増加していることを示し、そのことが高濃度酸素環境下で $\text{NLRP3}^{-/-}$ マウスの生存期間が延長するメカニズムであると考察している。これは、私たちの研究における生存解析と矛盾する結果を示している。この相反する結果の原因は不明であるが、我々の解析では高濃度酸素暴露後の WT マウスおよび $\text{NLRP3}^{-/-}$ マウスともに肺組織における PINK1 の発現増加を認めなかった（図 16）。また、私たちの研究と Zhang らの報告とでは実験方法や条件に相違がある。本研究ではマウスを 90 % 酸素に暴露させたが、Zhang らは 100 % 酸素に暴露させており、本研究では Zhang らの報告と比較してマウスの生存期間が長かった。さらに、Lingappan らは、雄性マウスは雌性マウスと比較して高濃度酸素への感受性が高いことを報告し、HALI の程度に雌雄差があることを報告している[35]。加えて、HALI の病態は飼育温度によっても影響されることも報告されている[1]。本研究では雌マウスのみを使用し、飼育温度は 24-25°C で管理した。一方、Zhang らはこれらの条件を明示しておらず、これらの実験手法や条件が HALI およびその生存期間に影響している可能性がある。いずれにせよ、HALI の病態における NLRP3 の役割については、今後より詳細な解析が必要であると考えられた。

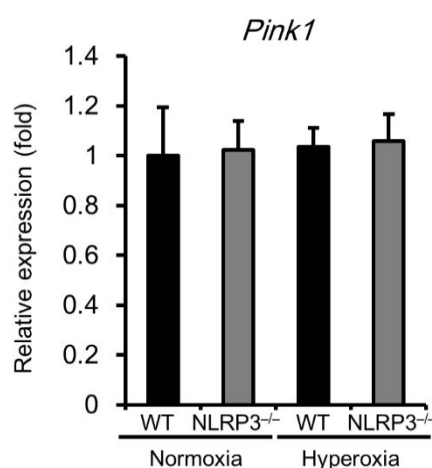


図 16. 肺組織 *Pink1* mRNA 発現量

正常酸素濃度環境下および高濃度酸素環境下 72 時間後のマウス肺組織の *Pink1* mRNA 発現量を real-time RT-PCR で解析した（正常酸素濃度：各 $n=5-6$ 、高濃度酸素：各 $n=10-13$ ）。データは平均値±標準誤差で表示し、各データ間に統計学的有意差を認めなかった。

まとめとして、本研究結果から明らかとされた HALI の病態、および NLRP3 の役割を示す (図 17)。高濃度酸素吸入により、肺組織で CCL2 や CXCL1 の発現が増加し、好中球およびマクロファージが浸潤する。これらの炎症細胞からの液性因子を介して肺胞上皮細胞の Stat3 が活性化される。活性化 Stat3 は MMP-9 の発現減少および Bcl-2 の発現増加を誘導し、さらには Bcl-2 の下流の肺胞上皮細胞のアポトーシスを減少させることで、肺傷害に保護的に作用する。一方 NLRP3^{-/-}マウスでは、マクロファージの CCL2 および CXCL1 発現低下および好中球の遊走能低下により炎症細胞浸潤が抑制される。その結果、Stat3 の活性化が抑制され、その下流の肺傷害保護作用が不十分となり、肺傷害が増悪しマウスの生存期間が短縮すると考えられた。

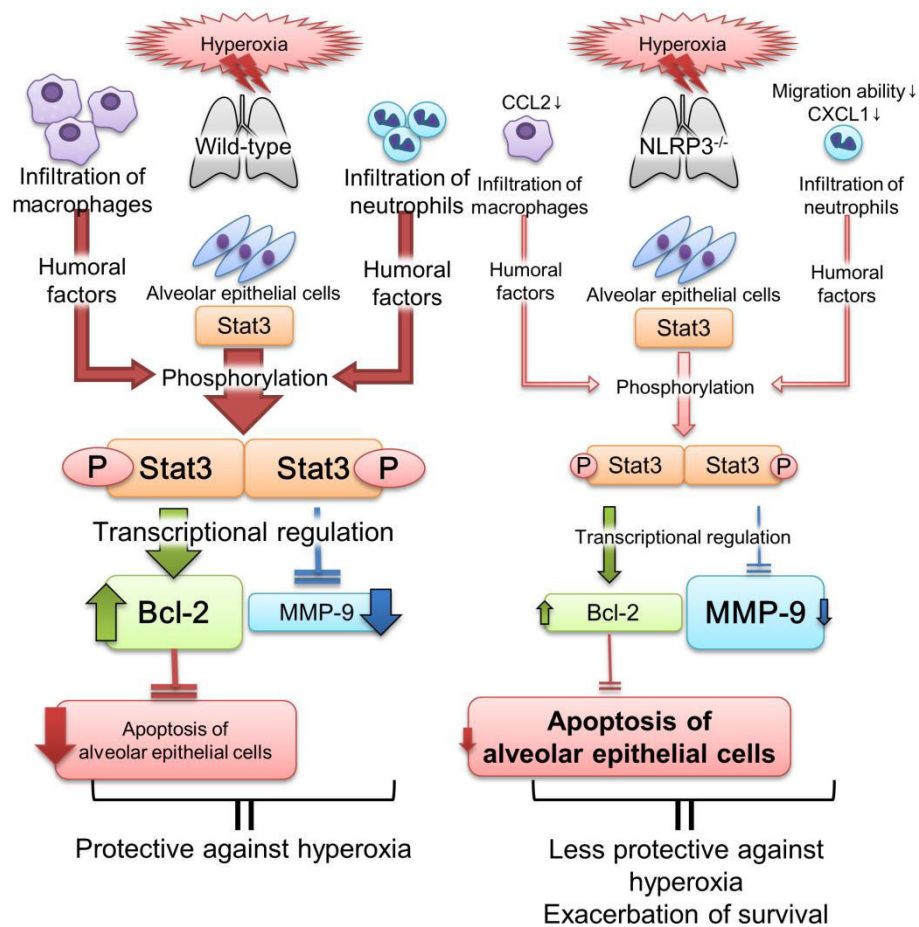


図 17. 予測されるメカニズム

WT マウスでは、高濃度酸素に暴露されることにより肺組織で CCL2 や CXCL1 の発現が増加し、炎症細胞（好中球およびマクロファージ）が肺組織へ浸潤する。浸潤した炎症細胞からの液性因子により肺胞上皮細胞の Stat3 が活性化する。それにより MMP-9 発現の抑制と Bcl-2 の発現増加が誘導され、さらに下流の肺胞上皮細胞のアポトーシスが抑制されることで、肺傷害が軽減する。一方、NLRP3^{-/-}マウスではマクロファージの CCL2 および CXCL1 の発現低下、好中球の遊走能の低下により、肺組織への炎症細胞浸潤が抑制される。そのため肺胞上皮細胞の Stat3 の活性化が進みにくくなり、結果として MMP-9 の発現増加、Bcl-2 の発現抑制と肺胞上皮細胞のアポトーシスが進行し、肺傷害が増悪し生存期間が短縮する。

5. 今後の課題

本研究における課題としては以下の点が挙げられる。

(1) 肺胞マクロファージにおける NLRP3 の機能の解明

本研究では、好中球に焦点を当てて解析し、新たな好中球の機能を報告した。しかし、もう一つの炎症細胞として重要な肺胞マクロファージに関する解析が不十分である。肺胞マクロファージは一匹のマウスから少量しか単離できないことから、動物愛護の観点からも数多くの動物を犠牲死させて細胞を単離することは問題がある。そこで、NLRP3-siRNA をレンチウイルスベクターにより細胞へと導入し、NLRP3 をノックダウンした肺胞マクロファージ(NLRP3-KD-MH-S 細胞) の作製を試みたが、以下の点から作製が困難であった。

- ・ ウイルス導入効率が低く、さらにウイルス濃度を上昇させると毒性が強くなり細胞死が生じてしまう。
- ・ ベクターには Puromycin 耐性遺伝子が含まれているため、薬剤による細胞選択を行ったが、どうしても非感染細胞が一部に残存してしまう。薬剤添加を中止すると、非感染細胞の増殖が感染細胞より明らかに速く、徐々に非感染細胞比率が増えてしまう。
- ・ 薬剤で選択後の細胞群をさらにフローサイトメトリーを用いて細胞選択を行ったが、わずかに残った非感染細胞がその後増殖し、徐々に非感染細胞比率が増加してしまった。
- ・ フローサイトメトリーで選択後の細胞をさらに単細胞培養したところ、感染細胞のみを増殖させることができたが、ある一定数以上に細胞を培養していくと細胞死が生じてしまい、実験に用いることができなかった。

今後はウイルスベクター以外の遺伝子導入方法やその他の細胞株の使用等の

検討が必要と考えている。

(2) 好中球における NLRP3 の役割の解析

NLRP3^{-/-}好中球では 3 量体 G 蛋白質の活性化が抑制されることで遊走能が低下することを、私たちの研究室からすでに報告している[21]。本研究では肺胞上皮細胞の培養上清に対しても NLRP3^{-/-}好中球の遊走能が低下していることを示すことができたが、NLRP3 がどのように 3 量体 G 蛋白質の活性化に影響しているのか、その詳細は明らかになっていない。今後は好中球における NLRP3 の詳細な機能解析を行うことを検討している。

(3) 他のインフラマソーム構成分子 ASC および caspase-1 の役割の解析

高濃度酸素暴露による肺傷害は、IL-1 β には依存していなかったが、他のインフラマソーム構成分子に依存するかどうかを明らかにするため、NLRP3 以外の構成分子である ASC^{-/-}マウスや caspase-1^{-/-}マウスを用いた解析を行うことを検討している。

6. おわりに

本研究は、HALI 保護因子である Stat3 に NLRP3 が作用することを示した最初の報告である。特に、HALI において、好中球が炎症とは独立して組織傷害を軽減し、生存を改善するという知見は、新規性が高く、その学術的な意義も大きいと考えられる。また、HALI において、炎症反応の抑制と生存率の改善とが必ずしも一致しない場合があることを示した意義は大きいと考えられる。

今後は、肺胞マクロファージにおける NLRP3 の機能解析や他のインフラマソーム構成分子の役割の解析を進め、さらに HALI の病態を明らかにしていきたいと考えている。これは HALI のみならず ALI/ARDS の新たな治療標的の発見および治療法の開発に繋がることが期待される。

7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導頂きました自治医科大学内科学講座呼吸器内科学部門教授 杉山幸比古先生、自治医科大学分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 高橋将文先生に深謝致します。

また研究の計画・遂行にあたり、自治医科大学内科学講座呼吸器内科学部門、自治医科大学分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部の皆様には並々ならぬご助力とご協力を頂きました。心より御礼を申し上げます。

8. 参考文献

1. Kallet, R.H. and Matthay, M.A. Hyperoxic acute lung injury. *Respir Care*. **58**: 123-141, 2013.
2. Bhandari, V. Molecular mechanisms of hyperoxia-induced acute lung injury. *Front Biosci*. **13**: 6653-6661, 2008.
3. Bhandari, V. and Elias, J.A. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. *Free Radic Biol Med*. **41**: 4-18, 2006.
4. Bhandari, V., Choo-Wing, R., Homer, R.J., and Elias, J.A. Increased hyperoxia-induced mortality and acute lung injury in IL-13 null mice. *J Immunol*. **178**: 4993-5000, 2007.
5. Latz, E., Xiao, T.S., and Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. **13**: 397-411, 2013.
6. Davis, B.K., Wen, H., and Ting, J.P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. **29**: 707-735, 2011.
7. 高橋将文. 【炎症シグナルの指揮者インフラマソーム】 インフラマソームを介した無菌性炎症と心血管病. *実験医学*. **30**: 1750-1755, 2012.
8. Usui, F., Shirasuna, K., Kimura, H., Tatsumi, K., Kawashima, A., Karasawa, T., Hida, S., Sagara, J., Taniguchi, S., and Takahashi, M. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. **425**: 162-168, 2012.
9. 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., and Takahashi, M. ASC in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury after unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol*. **184**: 1287-1298, 2014.

10. Yajima, N., Takahashi, M., Morimoto, H., Shiba, Y., Takahashi, Y., Masumoto, J., Ise, H., Sagara, J., Nakayama, J., Taniguchi, S., and 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.
11. 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., and Ikeda, U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. **123**: 594-604, 2011.
12. Takahashi, M. Role of the inflammasome in myocardial infarction. *Trends Cardiovasc Med*. **21**: 37-41, 2011.
13. Kolliputi, N., Galam, L., Parthasarathy, P.T., Tipparaju, S.M., and Lockey, R.F. NALP-3 inflammasome silencing attenuates ceramide-induced transepithelial permeability. *J Cell Physiol*. **227**: 3310-3316, 2012.
14. Kolliputi, N., Shaik, R.S., and Waxman, A.B. The inflammasome mediates hyperoxia-induced alveolar cell permeability. *J Immunol*. **184**: 5819-5826, 2010.
15. Fukumoto, J., Fukumoto, I., Parthasarathy, P.T., Cox, R., Huynh, B., Ramanathan, G.K., Venugopal, R.B., Allen-Gipson, D.S., Lockey, R.F., and Kolliputi, N. NLRP3 deletion protects from hyperoxia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. **305**: C182-189, 2013.
16. Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., Suzuki, M., Nishihara, M., Takahashi, M., and Iwakura, Y. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*. **187**: 1463-1475, 1998.
17. Lamkanfi, M., Mueller, J.L., Vitari, A.C., Misaghi, S., Fedorova, A., Deshayes,

- K., Lee, W.P., Hoffman, H.M., and Dixit, V.M. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol.* **187**: 61-70, 2009.
18. Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* **9**: 847-856, 2008.
 19. Dobbs LG, G.R., *Chapter 9. Isolation and Culture of Pulmonary Alveolar Epithelial Type II Cells*. Culture of Epithelial Cells, Second Edition, ed. R.I.F.a.M.G. Freshney. 2002: Wiley-Liss, Inc.
 20. Gonzalez, R.F. and Dobbs, L.G. Isolation and culture of alveolar epithelial Type I and Type II cells from rat lungs. *Methods Mol Biol.* **945**: 145-159, 2013.
 21. 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., and Takahashi, M. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *J Immunol.* **192**: 4342-4351, 2014.
 22. Lian, X., Qin, Y., Hossain, S.A., Yang, L., White, A., Xu, H., Shipley, J.M., Li, T., Senior, R.M., Du, H., and Yan, C. Overexpression of Stat3C in pulmonary epithelium protects against hyperoxic lung injury. *J Immunol.* **174**: 7250-7256, 2005.
 23. Yu, H. and Jove, R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* **4**: 97-105, 2004.
 24. Inghirami, G., Chiarle, R., Simmons, W.J., Piva, R., Schlessinger, K., and Levy, D.E. New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle.* **4**: 1131-1133, 2005.
 25. You, S., Li, R., Park, D., Xie, M., Sica, G.L., Cao, Y., Xiao, Z.Q., and Deng, X. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung

- cancer. *Mol Cancer Ther.* **13**: 606-616, 2014.
26. Alas, S. and Bonavida, B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* **61**: 5137-5144, 2001.
 27. Quinton, L.J., Jones, M.R., Robson, B.E., Simms, B.T., Whitsett, J.A., and Mizgerd, J.P. Alveolar epithelial STAT3, IL-6 family cytokines, and host defense during *Escherichia coli* pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **38**: 699-706, 2008.
 28. Quinton, L.J., Mizgerd, J.P., Hilliard, K.L., Jones, M.R., Kwon, C.Y., and Allen, E. Leukemia inhibitory factor signaling is required for lung protection during pneumonia. *J Immunol.* **188**: 6300-6308, 2012.
 29. Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A.K., Hull, W.M., Wert, S.E., and Whitsett, J.A. Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J Clin Invest.* **113**: 28-37, 2004.
 30. Crosby, L.M. and Waters, C.M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **298**: L715-731, 2010.
 31. Jain, D., Atochina-Vasserman, E.N., Tomer, Y., Kadire, H., and Beers, M.F. Surfactant protein D protects against acute hyperoxic lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* **178**: 805-813, 2008.
 32. Shigeoka, A.A., Mueller, J.L., Kambo, A., Mathison, J.C., King, A.J., Hall, W.F., Correia Jda, S., Ulevitch, R.J., Hoffman, H.M., and McKay, D.B. An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* **185**: 6277-6285, 2010.
 33. Zuurbier, C.J., Jong, W.M., Eerbeek, O., Koeman, A., Pulskens, W.P., Butter, L.M., Leemans, J.C., and Hollmann, M.W. Deletion of the innate immune NLRP3 receptor abolishes cardiac ischemic preconditioning and is associated with

- decreased Il-6/STAT3 signaling. *PLoS One*. **7**: e40643, 2012.
34. Zhang, Y., Sauler, M., Shinn, A.S., Gong, H., Haslip, M., Shan, P., Mannam, P., and Lee, P.J. Endothelial PINK1 Mediates the Protective Effects of NLRP3 Deficiency during Lethal Oxidant Injury. *J Immunol*. **192**: 5296-5304, 2014.
 35. Lingappan, K., Jiang, W., Wang, L., Couroucli, X.I., Barrios, R., and Moorthy, B. Sex-specific differences in hyperoxic lung injury in mice: implications for acute and chronic lung disease in humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. **272**: 281-290, 2013.