

氏 名	みず しな よし こ 水 品 佳 子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 510 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	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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 小 山 信一郎 (委 員) 教 授 長 田 太 助 講 師 早 川 盛 禎

論文内容の要旨

1 研究目的

酸素療法は、呼吸不全患者の治療に不可欠である。一方で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知られており、高濃度酸素暴露急性肺傷害（hyperoxic acute lung injury : HALI）と呼ばれている。HALI の分子機序についてはいまだ不明な点が多いが、近年、炎症の関与が指摘されている。

インフラマソームは、caspase-1 の活性化を誘導することで IL-1 β の分泌に関わる細胞質内蛋白複合体で、特に NLRP3 インフラマソーム（NLRP3、アダプター分子 ASC と caspase-1 の複合体）が無菌性炎症の惹起経路の 1 つとして注目されている。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、マウス HALI モデルを作製して検証を行った。

2 研究方法

In vivo では野生型（Wild-type : WT）マウス、NLRP 欠損（NLRP3^{-/-}）および IL-1 β 欠損（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。また、90 % 酸素暴露 72 時間で気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid : BALF）および肺組織を採取し、BALF 中の細胞成分解析や上清中のサイトカイン測定、肺の組織学的検討、肺組織の遺伝子および蛋白発現解析を行った。

In vitro では *in vivo* で得られた結果のメカニズムの解明を目的に、HALI の病態形成に関わる肺胞上皮細胞・マクロファージおよび好中球の蛋白発現解析や、共培養実験による細胞間相互作用の解析、炎症細胞遊走能の解析を行った。

3 研究成果

高濃度酸素環境下におけるマウスの生存分析では、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。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ず、BALF 中の IL-1 β にも有意な変化を認めなかった。以上の結果から NLRP3 が IL-1 β 非依存的に HALI に作用している可能性を考え、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスの相違に着目して解析を進めた。

高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マウス肺組織では好中球・マクロファージの浸潤が抑制されて

いたにもかかわらず、HALI 増悪因子である MMP-9 の発現が増加していた。加えて NLRP3^{-/-}マウスの肺組織では抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現が低下し、肺胞上皮細胞のアポトーシスも亢進していた。そこで、MMP-9 および Bcl-2 の共通の調節因子である Stat3 に着目して解析を行ったところ、肺組織における Stat3 および活性化 Stat3 の発現は、NLRP3^{-/-}マウスで有意に低下していた。過去のマウス HALI モデルの報告で、肺胞上皮細胞に Stat3 を強制発現させることで、高濃度酸素環境下での生存期間が延長することが示されている。このことから、肺組織における Stat3 発現量の相違が NLRP3^{-/-}マウスの生存期間短縮の要因になっていると推測された。

そこで、*in vitro* で Stat3 およびリン酸化 Stat3 の発現調節の機序を検証した。

HALI に関わる主要な肺組織の構成細胞である肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージおよび好中球のうち、肺胞上皮細胞のみ NLRP3 の発現を認めなかった。このことから、炎症細胞との相互作用により肺胞上皮細胞の Stat3 の発現が変化すると考え、共培養実験を施行した。MLE 12 細胞（肺胞上皮細胞株）を MH-S 細胞（肺胞マクロファージ細胞株）または腹腔由来好中球と共培養を行うと、MLE 12 細胞の Stat3 の活性化は促進し、MH-S 細胞あるいは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同様の結果が得られた。このことから、浸潤してきた炎症細胞からの液性因子により肺胞上皮の Stat3 の活性化が促進し、HALI に保護的に作用すると考えられた。以上の実験結果から、NLRP3^{-/-}マウスでは、肺組織への炎症細胞浸潤が抑制されることにより、肺胞上皮の Stat3 の活性化が抑制され、高濃度酸素環境下での生存期間が短縮することが示唆された。

NLRP3^{-/-}マウスで肺組織への炎症細胞浸潤が抑制されたメカニズムとしては、NLRP3^{-/-}好中球では遊走能の低下を認め、また、高濃度酸素暴露後の NLRP3^{-/-}マクロファージではケモカイン発現の抑制が観察された。さらに、NLRP3^{-/-}マウスに、WT 好中球を adoptive transfer することで高濃度酸素環境下での NLRP3^{-/-}マウスの生存期間が改善した。このことから好中球における NLRP3 が HALI において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

4 考察

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。一般に過剰な炎症反応は肺傷害を増悪させるが、HALI の病態は炎症反応以外にもアポトーシスや保護因子等の複雑な要因から成立している。本研究では、炎症細胞浸潤の抑制が保護因子 Stat3 の活性化を抑制して、マウスの生存期間を短縮させることを明らかとし、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を改善するわけではないことを示した。

近年、インフラマソーム非依存的な NLRP3 の作用が注目されているが、本研究では、HALI の病態における、IL-1 β とは独立した炎症細胞における NLRP3 の新たな役割を示すことができた。

本研究結果から想定されるメカニズムは以下の通りである。

高濃度酸素暴露により肺組織へ好中球およびマクロファージが浸潤し、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 が活性化される。Stat3 の活性化は、MMP-9 の発現抑制、Bcl-2 の発現増加と肺胞上皮細胞のアポトーシス抑制により HALI に対して保護的に作用する。一方、NLRP3 が欠損していると、好中球の遊走能低下やマクロファージのケモカイン発現が抑制されることにより、高濃度酸素暴露後の肺組織への炎症細胞浸潤が抑制される。これにより肺胞上皮細胞の Stat3 の活性化が抑制され、結果として MMP-9 の発現増加や肺胞上皮細胞のアポトーシ

スが進行し、高濃度酸素環境下での生存期間が短縮すると考えられた。

5 結論

本研究は、NLRP3 が IL-1 β 非依存的に Stat3 に作用し、HALI に保護的に作用することを明らかにした。また、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新たな知見を示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、高濃度酸素曝露時の急性肺傷害におけるインフラマソームの関与について、特に無菌性炎症に関与する NLRP3(Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain containing 3)インフラマソームに注目し、NLRP3 ノックアウトマウスを用いて種々検討した。その結果、高濃度酸素吸入により、肺組織での炎症細胞浸潤が起こり、肺胞上皮細胞の Stat3 が活性化された。活性化された Stat3 は、Bcl-2 の発現を増加させることにより肺胞上皮細胞のアポトーシスを減少させ、その結果肺傷害に保護的に作用した。このように本論文は、非常に新規性のある知見を示した。

本研究については、すでに 2015 年に Journal of Biological Chemistry に論文として掲載されており、また平成 28 年 2 月 8 日に開催された学位審査委員会において、学位論文に相応しいものであることが評価された。

最終試験の結果の要旨

本論文は、高濃度酸素曝露時の急性肺傷害におけるインフラマソームの関与について、特に無菌性炎症に関与する NLRP3(Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain containing 3)インフラマソームに注目し、NLRP3 ノックアウトマウスを用いて種々検討した。その結果、高濃度酸素吸入により、肺組織での炎症細胞浸潤が起こり、肺胞上皮細胞の Stat3 が活性化された。活性化された Stat3 は、Bcl-2 の発現を増加させることにより肺胞上皮細胞のアポトーシスを減少させ、その結果肺傷害に保護的に作用した。このように本論文は、非常に新規性のある知見を示した。

本研究については、すでに 2015 年に Journal of Biological Chemistry に論文として掲載されており、また平成 28 年 2 月 8 日に開催された学位審査委員会において、プレゼン・質疑応答の内容について審議された結果、学位論文に相応しいものであることが評価された。