

表 題 敗血症性心筋症における NLRP3 インフラマソーム誘導性

IL-1 β /IL-18 の役割の解明

副 題 IL-1 β and IL-18 driven by NLRP3 inflammasome are both indispensable for
lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy

論文の区分 博士課程

著者名 藤村 研太

担当指導教員氏名 苅尾 七臣

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
循環器・呼吸器疾患学
心血管病学

目次

略語一覧	3
1. 第1章 はじめに	6
2. 第2章 実験材料と方法	12
1. 2-1. 使用動物および動物モデルの作成	
2. 2-2. 心臓エコー検査	
3. 2-3. 血漿 CK-MB 測定	
4. 2-4. Real-time RT-PCR 法	
5. 2-5. ELISA 法	
6. 2-6. アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入	
7. 2-7. Western blot 法	
8. 2-8. 骨髄移植モデルの作成	
9. 2-9. 心筋特異的 NLRP3 欠損マウスの作成	
10. 2-10. 脾臓摘出モデルの作成	
11. 2-11. 統計学的解析	
3. 第3章 結果	20
1. 3-1. 敗血症による心筋傷害と NLRP3 ^{-/-} マウスにおける傷害抑制効果	
2. 3-2. LPS 投与後の遺伝子発現	
3. 3-3. LPS 投与後の血中炎症性サイトカインの産生	
4. 3-4. IL-18BP 遺伝子導入による敗血症性心筋症への影響	
5. 3-5. 骨髄移植モデルにおける敗血症性心筋症	

- 6. 3-6. 敗血症性心筋症における心筋細胞の NLRP3 の役割
- 7. 3-7. 脾臓摘出モデルにおける敗血症性心筋症

第 4 章 考察	38
----------	----

第 5 章 おわりに	46
------------	----

謝辞	47
----	----

引用文献	48
------	----

略語一覽

AAV: adeno-associated virus

ACTB: actin beta

ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain

ATP: adenosine triphosphate

BMT: bone marrow transplantation

BSA: bovine serum albumin

BNP: brain natriuretic peptide

CAPS : cryopyrin-associated periodic syndrome

CASP1: caspase 1

CASP11: caspase 11

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CK-MB: creatine kinase-myocardial band

CLRs: C-type lectin receptors

DAMPs: damage-associated molecular patterns

DNA: deoxyribonucleic acid

ECMO: extracorporeal membrane oxygenation

EF: ejection fraction

EGFP: enhanced green fluorescent protein

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FCS: fetal calf serum

%FS: % fractional shortening

GFP: green fluorescent protein

GSDMD: gasdermin D

HRP: horseradish peroxidase

IL-10: interleukin-10

IFN γ : interferon gamma

IL-1 α : interleukin-1 alpha

IL-1 β : interleukin-1 beta

IL-18: interleukin-18

IL-18BP: interleukin-18 binding protein

IL-6: interleukin-6

iNOS: inducible nitric oxide synthase

LDH: lactate dehydrogenase

LPS: lipopolysaccharide

LV: left ventricle

LVEDD: LV end-diastolic diameter

LVESD: LV end-systolic diameter

MHC: myosin heavy chain

NLRs: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

NLRP3: NLR family pyrin domain-containing 3

NO: nitric oxide

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

PBS: phosphate-buffered saline

PRRs: pattern recognition receptors

RIPA: radio-immunoprecipitation assay

RLRs: RIG-I-like receptors

ROS: reactive oxygen species

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

SIRS: systemic inflammatory response syndrome

SOFA: sequential organ failure assessment

TLRs: Toll-like receptors

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha

WT: wild-type

第1章 はじめに

敗血症は日常診療においてありふれた疾患であるが、世界で年間約 1000 万人が死亡し、全死亡者数の 2 割に及ぶとされている(1)。敗血症は、感染に対する宿主生体反応の統御不全により臓器機能不全を呈している状態と定義されている。感染の主な原因菌として、グラム陰性桿菌やグラム陽性球菌が挙げられ、感染経路は外傷や肺炎、尿路感染症、腸管穿孔、留置カテーテル、術後創部など多岐に渡る。新生児や高齢者、妊婦に多くみられる他、糖尿病や肝硬変、がん患者やその治療薬剤による白血球減少など基礎疾患を持つ者にも多い。2016 年にヨーロッパと米国の集中治療学会の合同委員会において診断基準が改定され、これまでの SIRS (systemic inflammatory response syndrome)における 4 つの項目 (体温、呼吸数、心拍数、白血球数)から SOFA (sequential organ failure assessment) スコア (呼吸: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 、凝固: 血小板数、肝臓: ビリルビン、心血管系: 血圧、中枢神経系: Glasgow Coma Scale、腎臓: クレアチニン、尿量)に変更され、より臓器障害に焦点を置いた診断基準となった。

敗血症性ショックは、敗血症のうち、循環不全と細胞機能や代謝の異常により、死亡率が高くなった状態と定義され、より厳密な治療が必要とされる。発生機序は完全には解明されていないが、以下の機序が提唱されている。感染により IL-1 (interleukin-1)や TNF (tumor necrosis factor)などの炎症性サイトカインの産生が惹起され、さらにロイコトリエン、ヒスタミン、ブラジキニンなどのメディエーターの放出を促す。それらのメディエーターが動脈、細動脈を拡張させ、末梢動脈抵抗が減少することや血管透過性が亢進すること、さらに発熱による脱水が原因となり、循環血漿量の低下と血圧の低下が起こり、臓器への灌流が減少することで臓器障害および臓器不全が引き起こされる。また、大量の凝固因子消費に伴う血管内凝固と、線溶系の過剰亢進により凝固能異常を起こし、多臓器不全の一因となる(図 1)。

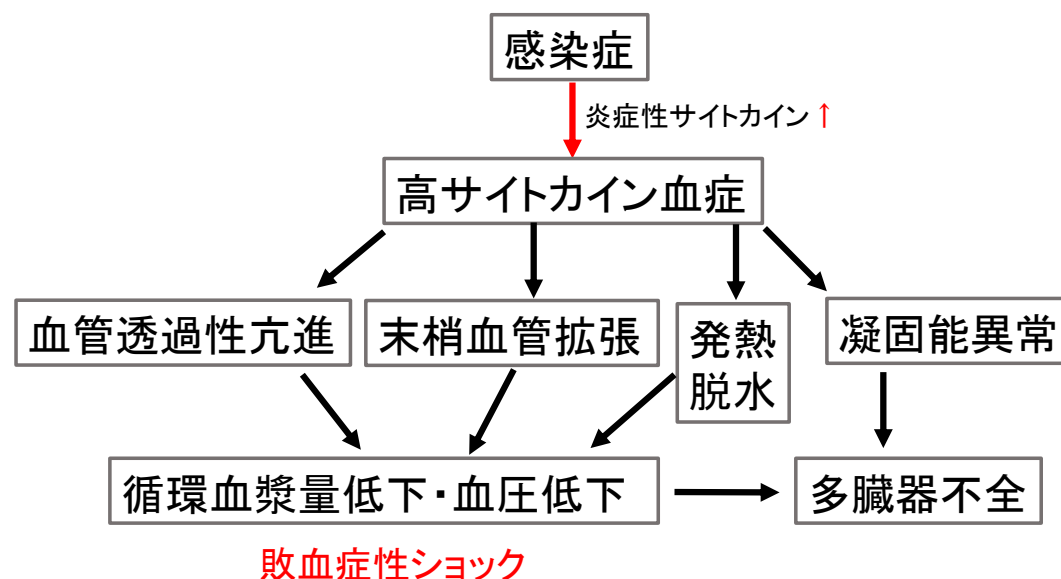


図 1. 敗血症性ショックの機序

感染により炎症性サイトカインの産生が上昇し、高サイトカイン血症を呈すると、末梢血管拡張や血管透過性が亢進、また発熱による脱水が原因となり、循環血漿量の低下と血圧が低下し敗血症性ショックを起こす。臓器灌流の減少から臓器障害、臓器不全を引き起こす。また、凝固能異常を起こし、多臓器不全を助長する。

敗血症性ショックの中でも、特に心機能の低下と血圧の低下を伴った敗血症性心筋症を起こすと、その死亡率が非常に高くなることも知られている(2)。現在、敗血症（敗血症性心筋症を含む）に対する治療として、抗菌薬や補液、昇圧薬等に加え、重症例では体外式膜型人工肺（ECMO: extracorporeal membrane oxygenation）も使用されているが、その導入には議論もあり、より病態に即した治療法の開発が求められている。これまでに提唱されている敗血症性心筋症の分子機序として、心筋障害、炎症性サイトカインや ROS (reactive oxygen species) や NO (nitric oxide) の過剰産生、カルシウム輸送不全、ミトコンドリア機能不全などが挙げられている(図 2) (3)。しかし、心機能低下の機序は未だ不明な点も多く、この病態を標的とした治療法は未だ確立し

ていない。

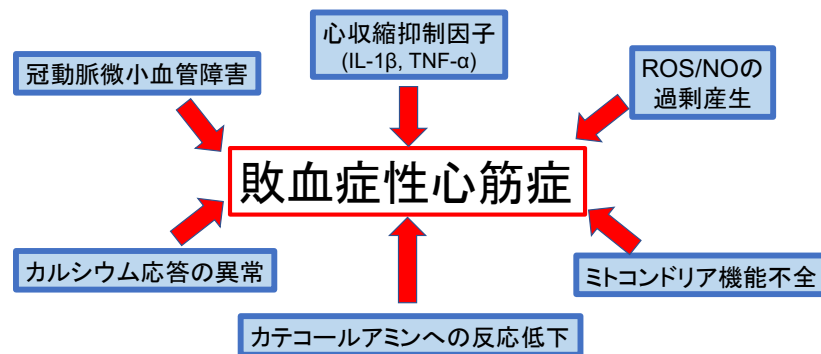


図 2. 提唱されている敗血症性心筋症の機序

敗血症性心筋症の分子機序として、心収縮抑制因子(炎症性サイトカイン)、ROS や NO の過剰産生、ミトコンドリア機能不全、カテコールアミンへの反応低下、カルシウム輸送不全、冠動脈微小血管障害などが挙げられている。

生体は常に多くの病原体にさらされており、自然免疫による病原体認識は感染防御の最前線として働いている。主な免疫細胞の表面にはパターン認識受容体 (PRRs: pattern recognition receptors)が発現しており、病原体が PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)として認識されることで免疫経路が活性化され、排除される。PRRs は大きく 4 種類に分けられ、TLRs (Toll-like receptors)、NLRs (NOD-like receptors)、CLRs (C-type lectin receptors)、RLRs (RIG-I-like receptors)が知られている。PRRs は病原体由来の PAMPs だけでなく、DAMPs (damage-associated molecular patterns)と呼ばれる細胞外 ATP (adenosine triphosphate)や DNA (deoxyribonucleic acid)、尿酸結晶などの危険シグナルも認識する。TLRs の一つである TLR4 は細胞膜およびエンドソームに存在しているが、グラム陰性菌の細胞壁を構成している LPS (lipopolysaccharide)を認識することで、細胞内にシグナルを伝えて炎症を惹起する。細胞質内に存在する NLRs の一つである NLRP3(NLR family pyrin domain-

containing 3)は、病原体のみならず尿酸結晶、細胞外 ATP を認識し、免疫を活性化
する。その他、細胞膜に存在している CLR_s は主に真菌を認識し、細胞質に存在して
いる RLR_s は主にウイルスを認識することで免疫を活性化する。

近年、細菌やウイルス、真菌の関与しない炎症、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 (inflammasome)が重要な役割を担っているこ
とが明らかとなってきた。インフラマソームは、痛風や2型糖尿病などでその重要
性が知られるようになり、また、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(4)。インフラマソームの中でも、特に NLRP3 インフラマソームが無
菌性炎症において重要な役割を果たしている。NLRP3 インフラマソームは、センサー
分子 NLRP3、アダプター分子 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing
caspase recruitment domain)、エフェクター分子カスパーゼ 1 (Casp1: caspase 1)からな
る細胞内分子複合体であり、PAMPs や DAMPs の刺激により、NLRP3/ASC/Casp1 が
重合して NLRP3 インフラマソームが形成される。これにより Casp1 が活性化され、炎
症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の前駆体 (pro-IL-1 β /pro-IL-18) が切断され活
性型となる。また、活性化 Casp1 はガスダーミン D (GSDMD: gasdermin D)を切断し、
その N 末端が細胞膜上で重合することで膜孔を形成し、そこから IL-1 β や IL-18 が
細胞外に流出することで炎症性細胞死 (pyroptosis) を誘導する (canonical 経路)。(図
3) 一方、関連分子である Casp11 (caspase 11)は細胞内 LPS を直接認識することで、
GSDMD を切断し、pyroptosis を起こすことも報告されている (non-canonical 経路) (5)
(図 4)。さらに GSDMD によって形成された膜孔からカリウムイオンの流出が起き、細
胞内が低カリウム刺激を受けることで NLRP3 インフラマソームが形成され、IL-1 β や
IL-18 が活性化することも報告されている。一方、NLRP3 の変異によりインフラマソー
ムが恒常的に活性化することで IL-1 β が過剰に産生され、全身の炎症が惹起される
疾患としてクライオピリン関連周期熱症候群 (CAPS: cryopyrin-associated periodic

syndrome)が知られている。CAPS には、軽症型である家族性寒冷自己炎症症候群 (FCAS: familial cold-autoinflammatory syndrome)、中等度の症状を示す MWS (Muckle-Wells syndrome)、重症型である慢性乳児期発症神経-皮膚-関節症候群 (CINCA: chronic infantile neurological cutaneous articular syndrome)が含まれる。いずれも早期発症の蕁麻疹様皮疹や反復性の発熱がみられ、重症型の CINCA では関節の変形や拘縮、感音性難聴、アミロイドーシスを呈する。CAPS に対する治療として、リコンビナント IL-1 受容体拮抗薬のアナキンラや抗 IL-1 β ヒト化モノクローナル抗体のカナキヌマブが使用されている。さらに、2017 年にはカナキヌマブによる心筋梗塞後の心血管イベントの再発予防効果を検証する臨床試験(CANTOS)が報告され、IL-1 β 阻害による炎症反応の抑制がその 2 次予防に有効であることが明らかになった(6)。

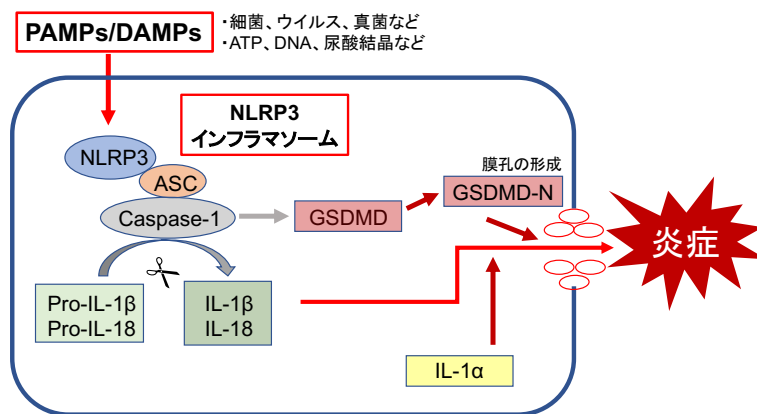


図 3. NLRP3 インフラマソーム

細菌やウイルス、真菌由来の PAMPs、細胞外 ATP や DNA、尿酸結晶などの DAMPs により NLRP3、ASC、Casp1 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、Casp1 活性型となり、Pro-IL-1 β 、Pro-IL-18 を切断する。また活性化した Casp1 は GSDMD を切断し、その N 末端である GSDMD-N が細胞膜で重合することで膜孔を形成する。NLRP3 インフラマソームによって成熟化した IL-1 β や IL-18 が、形成された膜孔から細胞外に放出され pyroptosis が起きる。

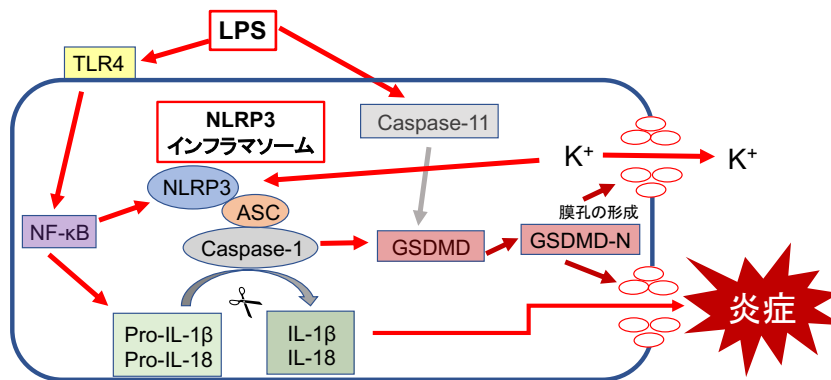


図 4. LPS による NLRP3 インフラマソームの活性

Casp11 は細胞内 LPS を直接認識し、GSDMD を切断する。GSDMD の N 末端により形成された膜孔から炎症性物質が放出され pyroptosis が起きる。またカリウムイオンの細胞外への流出が起き、細胞内が低カリウム刺激を受けることで NLRP3 インフラマソームが形成され、IL-1 β や IL-18 が活性化し炎症が誘導される。TLR4 は細胞外 LPS を認識することで NF- κ B の活性を誘導し、NLRP3 や proIL-1 β 、proIL-18 の発現を亢進する(プライミング)。さらに PAMPs や DAMPs により NLRP3 インフラマソームが形成され、炎症が促進する。

敗血症において血中 IL-1 β 濃度が増加することが知られており、かつ IL-1 β が心機能を低下させるという報告がある(2, 7)。しかし、重症敗血症者 696 人に対しアナキンを静脈投与した臨床試験では、アナキン投与群の死亡率が 33.1%に対して、プラセボ群の死亡率が 36.4% ($p=0.36$)とアナキンの敗血症に対しての治療有効性はないとされた(8)。一方で、NLRP3 を欠損させると敗血症モデルマウスの死亡率が低下するという報告(9)もある。これら過去の報告からは、敗血症における NLRP3 インフラマソームおよび、炎症関連分子について、NLRP3 活性化に続く IL-1 β の成熟化が心機能低下に寄与していることが示唆されてはいるが、その役割については不明な点が多く残されている。

本研究では、敗血症性心筋症と NLRP3 インフラマソームとの関係を解明し、敗血症性心筋症に有効な治療を模索することを目的として研究を行った。

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。自治医科大学実験動物委員会より動物に対する遺伝子組み換え実験の許可を取得した(承認番号:22-37)。実験動物として、C57BL/6J(野生型:WT:SLC, Japan)、NLRP3^{-/-}マウス(Vishva M. Dixit[Genentech])より提供)、Casp1/11^{-/-}マウス(筒井先生[兵庫医科大学]より提供)、IL-1 α ^{-/-}マウス、IL-1 β ^{-/-}マウス(岩倉先生[東京理科大学]より提供)、GSDMD^{-/-}マウス(Genentech より提供)、 α MHC^{cre/+}マウス(大津先生[国立循環器研究センター]より提供)を用いた。NLRP3^{-/-}マウスおよび IL-1 β ^{-/-}マウスは、過去に記載された方法に従って作成され(10-11)、12 世代以上 C57BL/6J マウスとのバッククロスを行った。NLRP3^{fl/fl}マウスは筑波大学生命科学動物資源センターにて CRISPR/Cas9 による遺伝子改変が行われ作成された(12)。Co-housing の実験では、同週齢、同性別の WT と NLRP3^{-/-}マウスを同ケージ内で 14 日間飼育した。NLRP3^{-/-}マウスと共同飼育した WT マウスを WT [NLRP3^{-/-}]マウス、WT マウスと共同飼育した NLRP3^{-/-}マウスを NLRP3^{-/-} [WT]マウスと表記した。マウスは温度 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 45%、および明暗時間(それぞれ 8:00 \sim 20:00, 20:00 \sim 8:00 の 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。

敗血症性心筋症モデル

マウスに LPS (Escherichia coli O111:B4, Sigma-Aldrich より購入) を 6 mg/kg (PBS で希釈し計 300 μ L に調製)の濃度で単回腹腔内投与することで敗血症性心筋症モデルを作成した。心エコーによる心機能評価は LPS の投与前、投与 6 時間後、24 時間後に行った。採血は LPS の投与前、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間後に、臓器摘

出は LPS の投与前、投与 6 時間後にそれぞれ心エコーの後に施行した。コントロール群は生理食塩水を 300 μ L 単回腹腔内投与した。

2-2. 心エコー検査

心エコー検査は小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo2100 (Visual Sonics Inc. Canada)を用いた(13)。マウスをイソフルラン吸入で全身麻酔をし、四肢を牽引し、固定テーブルに固定した。除毛クリームで胸部の毛を除き、30MHz のエコープローブをあて、乳頭筋レベルで心臓左室短軸像を描出し、M モード画像を取得した。左室拡張期末期径(LVEDD)、左室収縮末期径 (LVESD)を計測し、左室内径短縮率(%FS)を算出した。

2-3. 血漿中 CK-MB 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 CK-MB 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。

2-4. Real-time RT-PCR 法

安楽死させたマウスから摘出した心臓、肝臓、脾臓の組織より ISOGEN(Nippon Gene, Japan)を用いて RNA を抽出した。Nano Drop (Thermo SCIENTIFIC, USA)を用いて抽出 RNA より RNA 濃度を測定した後、2 μ 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で相補的 DNA(cDNA)を作製した。

逆転写反応条件: 25°C 10 分→42°C 60 分→85°C 5 分

cDNA を作製後、Takara TP 960 PCR Thermal Cycler Dice Detection System (Takara Bio Inc, Japan)を使用し、Real-time RT-PCR 解析を行った。

増幅反応条件: 95°C 30 秒×1 サイクル→(95°C 5 秒、60°C 30 秒)×40 サイクル

プライマー配列は以下のものを用いた。

Name	Forward	Reverse
<i>Nppb</i>	5'-CTGAAGGTGCTGTCCCAGAT-3'	5'-GTTCTTTTGTGAGGCCTTGG-3'
<i>Ifng</i>	5'-AGCAACAGCAAGGCGAAAA-3'	5'-CTGGACCTGTGGGTTGTTGA-3'
<i>Il1b</i>	5'-TGAAGTTGACGGACCCCAA-3'	5'-TGATGTGCTGCTGTGAGATT-3'
<i>Il18</i>	5'-CAGGCCTGACATCCTCTGCAA-3'	5'-TCTGACATGGCAGCCATTGT-3'
<i>Il6</i>	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'	5'-CACGATTTCAGAGAACATCTG-3'
<i>Nos2</i>	5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3'	5'-GAAGCGTTTCGGGATCTGAA-3'
<i>Tnf</i>	5'-CCCCAAAGGGATGAGAAGTTC-3'	5'-GCTTGTCACCTCGAATTTGAGAA-3'
<i>Actb</i>	5'-CACAGCTTCTTTGCAGCTCCTT-3'	5'-AGCGCAGCGATATCGTCAT-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、*Actb* を内部標準として、各サンプル間で比較、検討を行った。

2-5. ELISA 法

LPS 投与後のマウスより採取した血液から血漿を分離し、ELISA 法でタンパク濃度を測定した。マウス IL-1 β 、マウス TNF- α 、マウス IL-18、マウス IL-18BP、マウス IL-6 濃度は以下に記載する各 ELISA キットを用いてサンドイッチ法により測定した。

Target	ELISA kit
マウス IL-1 β	Quanikine ELISA for mouse IL-1 β /IL-1F2 immunoassay, Cat No. MLB00C; R&D Systems, USA
マウス TNF- α	Mouse TNF- α DuoSet, No. DY410; R&D Systems, USA
マウス IL-18	Quantitative test kit for mouse IL-18, CODE No.7625; MBL
マウス IL-18BP	Mouse IL-18BP DuoSet, No. DY122-05; R&D Systems, USA
マウス IL-6	Mouse IL-6 DuoSet, No. DY406; R&D Systems, USA

DuoSet では、各サイトカインに対する固相用抗体をプレートに室温で一晩吸着させた。次に、1% BSA 溶液により室温でブロッキングを 1 時間行い、血漿サンプルと標準溶液を室 3 時間室温で反応させ、洗浄した。次に、一次抗体を 3 時間室温で反応させ洗浄、streptavidin-HRP 溶液を反応させた。その後、基質反応液を加え発色させたあと、2N 硫酸を用いて反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定し、標準溶液を基準として濃度算出を行った。Quanikine ELISA kit、Quantitative ELISA kit では Assay Diluent を添加後、標準溶液と血漿サンプルを加え室温で 2 時間反応させ、洗浄を行った。その後、一次抗体を室温で 2 時間反応

させ洗浄し、基質反応液を加え 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。

2-6. アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入

マウス生体に IL-18BP 遺伝子を導入するために、AAV(adeno-associated virus)ベクターを作成した。まず C57BL/6J マウス肝臓由来 cDNA より、以下のプライマーと KOD One (TOYOBO)を用いて遺伝子の増幅を行った。

IL18bp_fwd tcgcgagaattctctagaacccatgacatgagacactgctg

IL18bp_rev gccacccgtggatccttatgcaaccctgggcc

その後、Gibson Assembly Master Mix (NEB)を用い pAAV-CMV Vector (TAKARA)に導入した。AAV ベクターは作成したプラスミドベクターを用い、水上先生(自治医科大学)に作成していただいた。IL-18BP をコードした AAV を AAV-IL-18BP とした。コントロールとして GFP がコードされた AAV (AAV-GFP) を用いた。精製した AAV ベクターは 8~9 週齢マウスの右腓腹筋に筋肉内注射(1×10^{11} genome copies/mouse, 40 μ L/mouse)を行い、その 2 週間後に LPS 投与をし、心機能評価、血液採取、臓器摘出を行った。GFP の発現は臓器摘出後のマウスの腓腹筋を摘出し、蛍光顕微鏡で確認した。

2-7. Western blot 法

AAV-IL-18BP を作成する過程で、IL-18BP 遺伝子をトランスフェクションした HEK293T 細胞に対して、Western blot 法を用いて IL-18BP の発現を確認した。

HEK293T 細胞からのタンパク抽出は RIPA Buffer (組成: 20 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X, 1% deoxycholic acid, 10% glycerol, 50 mM NaF, 0.1% SDS, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) を用いた。抽出したタンパク質に 1×Laemmli Sample Buffer を加えて 95°C で 5 分間処理し、SDS-PAGE でタンパクを分離後、PDVF 膜へ転写した。その後、PDVF 膜を Blocking ONE (ナカライテスク株式会社、京都) にて 1 時間室温でブロッキングし、1 次抗体を 4°C で一晩、インキュベートした。次に、Horseradish peroxidase (HRP) 付き 2 次抗体を 1 時間室温で反応させた後、Western Blot Quant HRP Substrate、または Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate (タカラバイオ株式会社) を使用し発光させ、Amersham680 (GE healthcare Life Sciences, NJ, USA) でバンドの検出を行った。 β -actin の発現量をコントロールとした。

1 次抗体として、

Mouse IL-18BPd Antibody, No. AF122; R&D Systems

anti- β -actin, No. A5441; Sigma-Aldrich

2 次抗体として

HRP-goat anti-Mouse Superclonal IgG, No. A28177; Thermo Fisher Science を使用した。

2-8. 骨髄移植 (BMT [bone marrow transplantation]) モデルの作成

ドナー細胞を作製するにあたり、マウスを安楽死後、大腿骨を取り出し、周囲の筋肉や腱などを鈍的に剥離した。氷冷中の PBS へ入れ、大腿骨の両端を切断後、PBS でフラッシュすることで骨髄細胞を回収した。その後、ACK lysing Buffer を用いて赤血球を溶血させ PBS で洗浄し、細胞懸濁液を作製した。レシピエントマウスには 6 週齢のマウスを用いた。移植前に 5.0 Gy 照射をし、その 3 時間後に、さらに 5.0 Gy を照

射することで、計 10.0 Gy の γ 線の全身照射を行った。レシピエントマウス 1 匹あたりドナー細胞として 2×10^6 個の骨髄細胞を尾静脈から注入した。この骨髄移植モデルについては、以前に GFP トランスジェニックマウスを用いた予備検討が行われており、移植 8 週後の末梢血細胞において 90% 以上が GFP 陽性細胞であることがフローサイトメトリー法にて確認されている(14)。今回、このプロトコールに従って、以下の骨髄移植モデルを作成した。

ドナー	レシピエント	表記
WT	WT	BMT ^{WT to WT}
NLRP3 ^{-/-}	WT	BMT ^{NLRP3^{-/-} to WT}
WT	NLRP3 ^{-/-}	BMT ^{WT to NLRP3^{-/-}}
NLRP3 ^{-/-}	NLRP3 ^{-/-}	BMT ^{NLRP3^{-/-} to NLRP3^{-/-}}

2-9. 心筋特異的 NLRP3 欠損マウスの作成

NLRP3^{f/f} マウスは CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により、筑波大学生命科学動物資源センターにて作成された。ゲノム編集には以下のガイド RNA を使用し、loxP 配列はエクソン 4 の 5'側及び 3'側に導入された。

Left gRNA: TAGGTGGTATGACCGGACAGAGG

Right gRNA: CTCAGAACGACGGAATCAGGAGG

心筋細胞特異的 NLRP3 欠損マウス ($\text{NLRP3}^{\text{f/f}}; \alpha\text{MHC}^{\text{cre/+}}$)は、 $\text{NLRP3}^{\text{f/f}}$ マウスと、マウスの心筋細胞特異的に発現している αMHC (myosin heavy chain)遺伝子のプロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現する $\alpha\text{MHC}^{\text{cre/+}}$ マウスを交配させることで、作成した(15-16)。コントロール群としては同腹仔の $\text{NLRP3}^{\text{f/f}}$ マウスを用いた。

2-10. 脾臓摘出モデルの作成

イソフルランで麻酔後、左側腹部を約 1cm 切開し、腸管膜を避け脾臓を牽引し、尾側の血管を結紮し切断、次いで頭側の血管も結紮し切断した後に脾臓を摘出した。その後、切断腹膜と皮膚をそれぞれ縫合した。手術から 1 週間後に LPS 投与を行い、心機能評価、血液採取、臓器摘出を行った。コントロール群には、シャム手術を行なった。

2-11. 統計学的解析

データは、平均値±標準偏差で示した。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。全ての解析は Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego)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. 敗血症による心筋傷害と NLRP3^{-/-}マウスにおける傷害抑制効果

敗血症性心筋症を生じさせる LPS の濃度と、LPS 投与後の心機能測定時間、および臓器摘出時間を決定するために予備検討を行なった。WT マウスにおいて、LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与をすると 24 時間では約 15%、48 時間では約 40% の死亡率であったが、LPS を 10 mg/kg の濃度で投与すると 24 時間で約 70%が死亡してしまったため、LPS の投与濃度を 6 mg/kg に決定した。一方、NLRP3^{-/-}マウスでは、LPS 6 mg/kg 投与により、48 時間で死亡した個体は認めなかった(図 5A)。

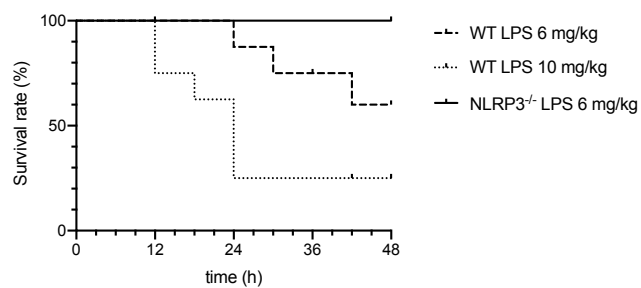
LPS 投与 6 時間後に心エコー検査を施行したところ、WT マウスにおいて心機能(%FS)の低下が認められた(図 5B)。LPS 投与 24 時間後に同マウスの心機能を再測定すると、LPS 投与前と比較し有意差は認めず、LPS 投与 6 時間後の心機能と比較し改善を認めた。インフラマソーム構成分子の欠損マウスである NLRP3^{-/-}マウスと Casp1/11^{-/-}マウスに LPS を投与しても 6、24 時間後いずれにおいても心機能の低下を認めなかった。マウスにおける敗血症時の心機能の低下は、LPS 投与 6 時間後に生じており、時間経時的に改善するため、以降は LPS 投与 6 時間後で解析を行なった。次に IL-1 α ^{-/-}マウス、IL-1 β ^{-/-}マウス、GSDMD^{-/-}マウスに LPS を投与した。いずれのマウスでも、WT マウスと同様、LPS 投与 6 時間後に心機能は有意に低下していた(図 5C)。

これらのマウスの血漿を用いて、心筋傷害の指標とされる血中の CK-MB を測定した。WT と NLRP3^{-/-}マウスは LPS 投与前と、投与後から 1、3、6 時間後に採取した血液を、Casp1/11^{-/-}マウスは LPS 投与前と、投与後から 6 時間後に採取した血液を用いた。WT マウスでは LPS 投与後 6 時間まで経時的な CK-MB の上昇を認めたが、NLRP3^{-/-}マウスでは 1 時間後に上昇(有意差なし)したものの、3、6 時間後も投

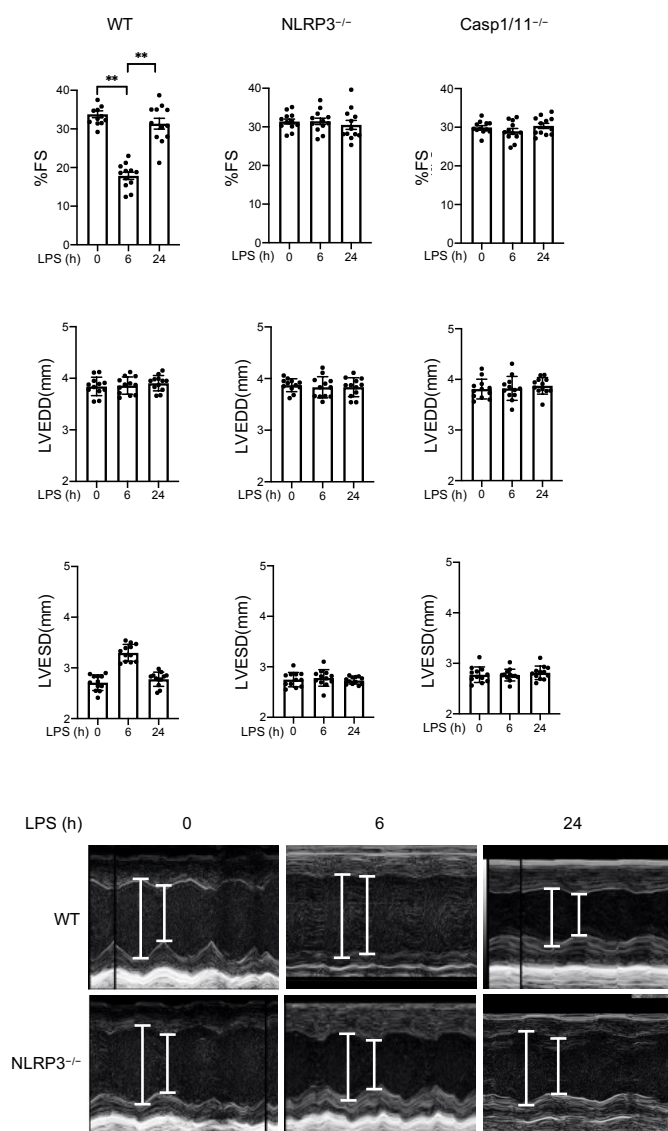
与 1 時間後の値と変化は認めなかった。心機能が低下していた LPS 投与 6 時間後の WT マウスと比較すると、NLRP3^{-/-}マウスでは CK-MB の上昇が有意に低下していた(図 5D)。Casp1/11^{-/-}マウスでも 6 時間後に軽度の上昇(有意差なし)を認めたが、WT と比較すると CK-MB の上昇は有意に低下していた。一方、IL-1 α ^{-/-}マウス、IL-1 β ^{-/-}マウス、GSDMD^{-/-}マウスでは LPS 投与 6 時間後に有意な CK-MB 上昇を認め WT と比較しても有意差は認めなかった。以上より NLRP3^{-/-}マウス、Casp1/11^{-/-}マウスでは LPS により誘発された敗血症性心筋症による心機能低下および心筋傷害を抑制することが明らかになった。

近年、腸内細菌叢がインフラマソームの活性化に重要であることが知られている(17)。そこで、NLRP3 欠損が LPS による心機能低下を抑制する要因として腸内細菌が関与しているかを検討するため、WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスをそれぞれ単独、または同ケージ内で飼育する共同飼育(Co-housing)を行い、共同飼育から 4 週間経過後に LPS を投与して解析を行なった。LPS 投与 6 時間後において WT [NLRP3^{-/-}]マウス(NLRP3^{-/-}マウスと共同飼育した WT マウス)では心機能は低下し、NLRP3^{-/-} [WT]マウス(WT マウスと共同飼育した NLRP3^{-/-}マウス)では心機能の低下を認めなかった(図 5E)。血中の CK-MB は LPS 投与により WT [NLRP3^{-/-}]マウスでは上昇を認めたが、NLRP3^{-/-} [WT]マウスでは上昇を認めなかった。これらのことより、LPS 誘発性敗血症性心筋症による心機能低下には腸内細菌叢の影響は低いと考えられた。

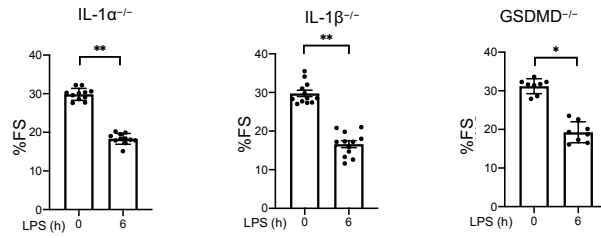
A



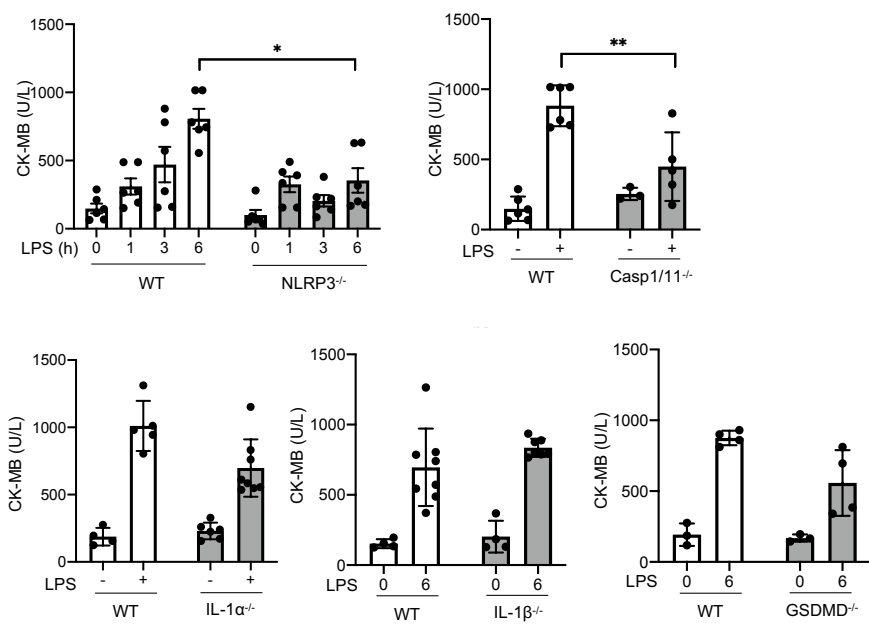
B



C



D



E

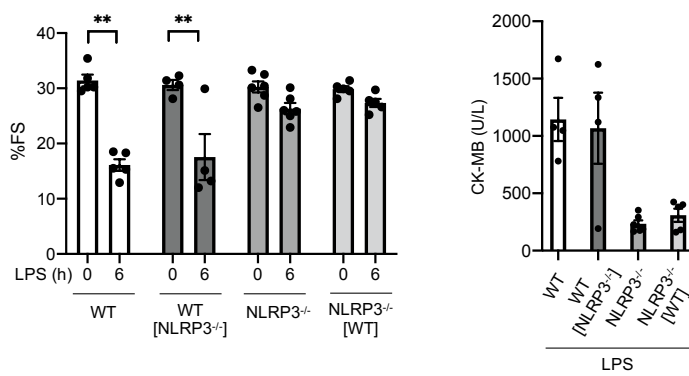


図 5. 敗血症による心筋傷害と NLRP3^{-/-}マウスにおける傷害抑制効果

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウス、Casp1/11^{-/-}マウス、IL-1 α ^{-/-}マウス、IL-1 β ^{-/-}マウス、GSDMD^{-/-}マウス、WT [NLRP3^{-/-}]マウス、NLRP3^{-/-} [WT]マウスに LPS の単回腹腔内投与を行い、心機能を評価後、血液を採取した。

A: WT マウスに対して LPS を 10 mg/kg、または 6 mg/kg の濃度で、NLRP3^{-/-}に対して LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与を行い生存率を評価した。(n=8)

B: WT マウス、NLRP3^{-/-}マウス、Casp1/11^{-/-}マウスに LPS の投与前、LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与後 6、24 時間後に心臓エコー検査にて、左室拡張期末期径(LVEDD)、左室収縮末期径 (LVESD)を測定し、心収縮力の指標である%FS を評価した(n=12)。

心エコー画像 上段:WT マウス 下段:NLRP3^{-/-}マウス

左:LPS 投与前 左:LPS 投与 6 時間後 右:LPS 投与 24 時間後

C: IL-1 α ^{-/-}マウス、IL-1 β ^{-/-}マウス、GSDMD^{-/-}マウスに LPS の投与前、LPS の投与 6 時間後に%FS を評価した(n=8-11)。

D: 採取した血液から血漿を抽出し CK-MB を測定した(n=8-12)。

E: WT [NLRP3^{-/-}]マウス、NLRP3^{-/-} [WT]マウスに LPS の投与前、LPS の投与 6 時間後に%FS、CK-MB を評価した(n=4-6)。

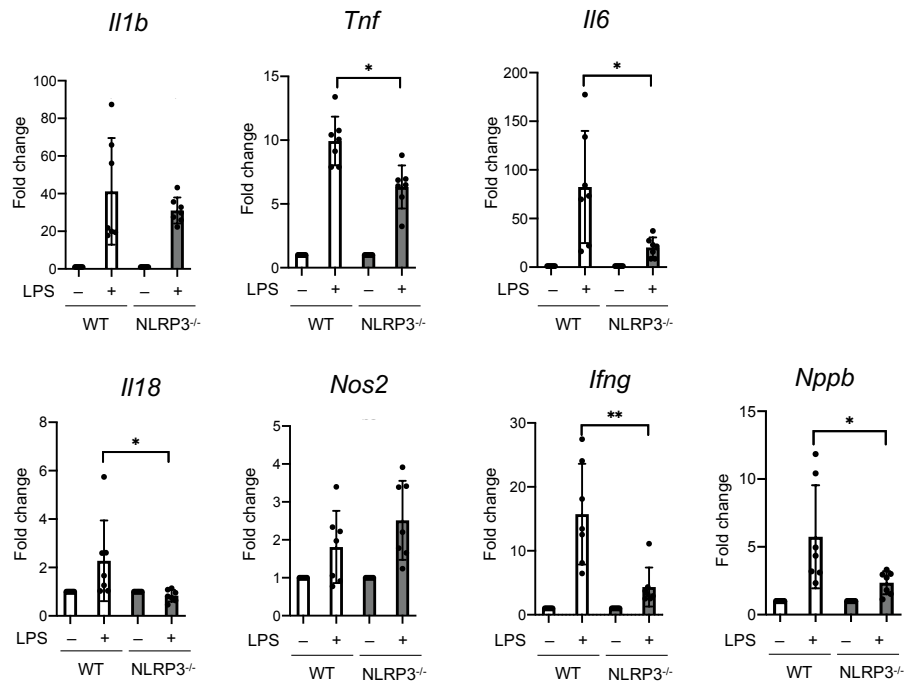
データは平均値 \pm 標準偏差で表示し、 $p<0.05$ を有意差ありとし*で、 $p<0.01$ を**で表した。

3-2. LPS 投与後の遺伝子発現

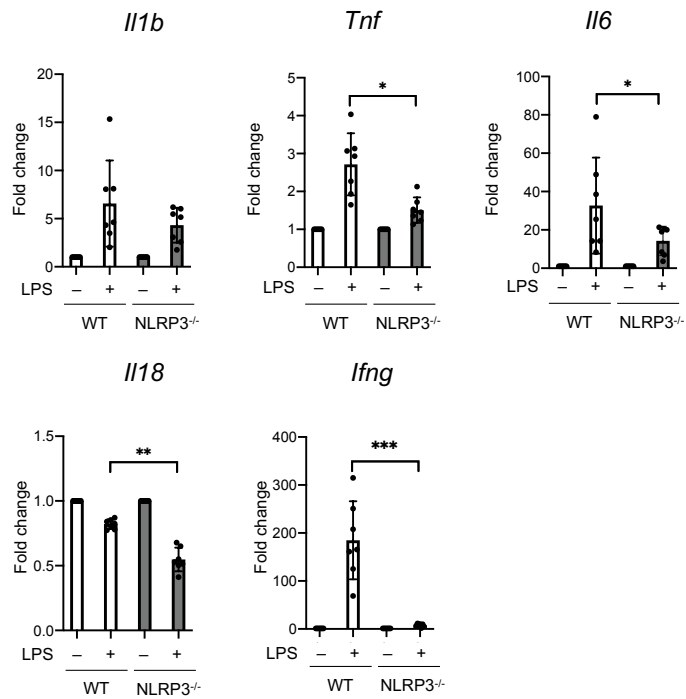
WT マウスにおいて、LPS 投与による敗血症を起こすことで心機能が低下したが、心機能を低下させる原因因子を推測するために定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現を確認した。WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスに LPS を投与し、6 時間後に心臓、および炎症性サイトカインの主な産生臓器である脾臓、肝臓を摘出し、RNA を抽出し定量的 RT-PCR を行なった。心臓、脾臓、肝臓いずれの臓器においても *Il1b* の発現は WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスで LPS 投与後に上昇するが、両方の間に有意差は見られなかった(図 6A-C)。その他の炎症性サイトカインでは、*Tnf* や *Il6*、*Ifng* の発現は、LPS 投与後の WT マウスと比較し NLRP3^{-/-}マウスにおいて有意に抑制されていた。*Il18* は心臓、脾臓では WT マウスと比較し NLRP3^{-/-}マウスにおいて有意に抑制

されていたが、肝臓では有意差を認めなかった。心臓における *Nos2* (iNOS) の発現は、主に PAMPs に対する防御としての NO (nitric oxide) の産生に関与するが、NO の過剰な産生は心機能の低下を起こすことが知られている(18)。WT マウスと NLRP3^{-/-} マウスで LPS 投与後に *Nos2* の上昇を認めたが、予想に反して両方の間に有意差は認めなかった。心臓の負荷が増大したことを示唆する *Nppb* (BNP) の発現は、LPS 投与後の WT マウスと比較し NLRP3^{-/-} マウスにおいて有意に抑制されていた。次に WT マウスと IL-1 β ^{-/-} マウスでの比較を行なった。心臓では *Tnf* の発現に有意差は認めなかったが、*Il6*、*Ifng* の発現は IL-1 β ^{-/-} マウスで有意に低下していた(図 6D)。脾臓では *Tnf* と *Il6* の発現に有意差は認めなかったが、*Ifng* の発現は IL-1 β ^{-/-} マウスで有意に低下していた(図 6E)。肝臓については、部分的肝臓切除を行なっても LPS 投与による血中 IL-1 β 濃度の上昇には変化がないとの報告があったことから(19)、IL-1 β ^{-/-} マウスでの肝臓の定量的 RT-PCR は行わなかった。

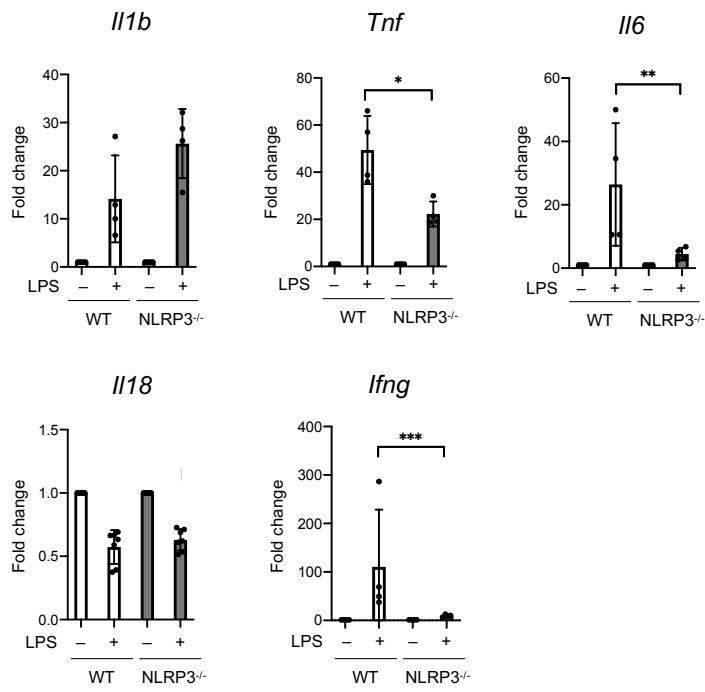
A



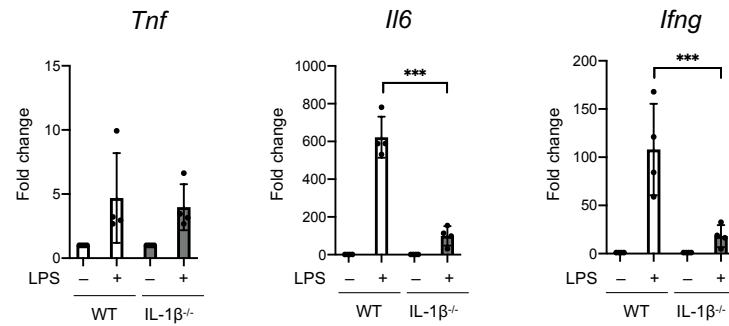
B



C



D



E

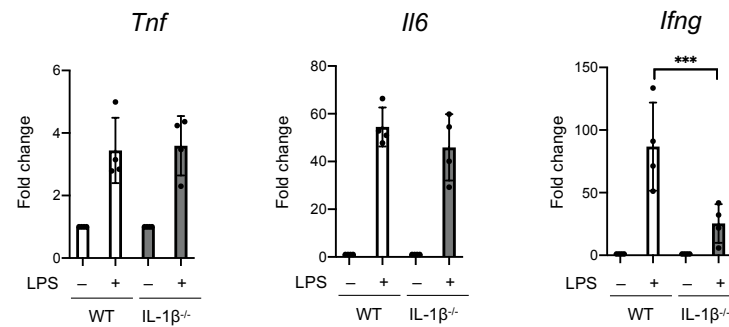


図 6. LPS 投与後の遺伝子発現

WT マウスと NLRP3^{-/-} マウス、IL-1 β ^{-/-} マウスに生理食塩水、または LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与を行い 6 時間後に摘出した心臓、脾臓、肝臓を用いて炎症関連因子の mRNA 発現を解析した。

[A-C] real-time RT-PCR 法により WT マウスと NLRP3^{-/-} マウスの下記に示す臓器における mRNA 発現を解析した。

A:心臓組織中における *Il1b*、*Tnf*、*Il6*、*Il18*、*Nos2*、*Ifng*、*Nppb* の発現を解析した (n=7)。

B:脾臓組織中における *Il1b*、*tnf*、*Il6*、*Il18*、*Ifng* 発現を解析した(n=7)。

C:肝臓組織中における *Il1b*、*tnf*、*Il6*、*Il18*、*Ifng* の発現を解析した(n=4)。

[D-E] real-time RT-PCR 法により WT マウスと IL-1 β ^{-/-} マウスの下記に示す臓器における mRNA 発現を解析した。

D:心臓組織中における *tnf*、*Il6*、*Ifng* の発現を解析した(n=4)。

E:脾臓組織中における *tnf*、*Il6*、*Ifng* の発現を解析した(n=4)。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

3-3. LPS 投与後の血中炎症性サイトカインの産生

LPS 投与後の血中炎症性サイトカインの濃度を ELISA 法により測定した。WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスに対して、LPS 投与前、投与 1、3、6 時間後のマウスの血液から血漿を分離し、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-18 を測定した。IL-1 β 、IL-18 では 6 時間後、IL-6 では 3 時間後、TNF- α では 1 時間後に NLRP3^{-/-}マウスにおいて WT マウスより有意に産生が抑制されていた。IL-6 の抑制効果は小さかったが、IL-1 β 、IL-18 では産生量に著明な差を認めた(図 7A)。

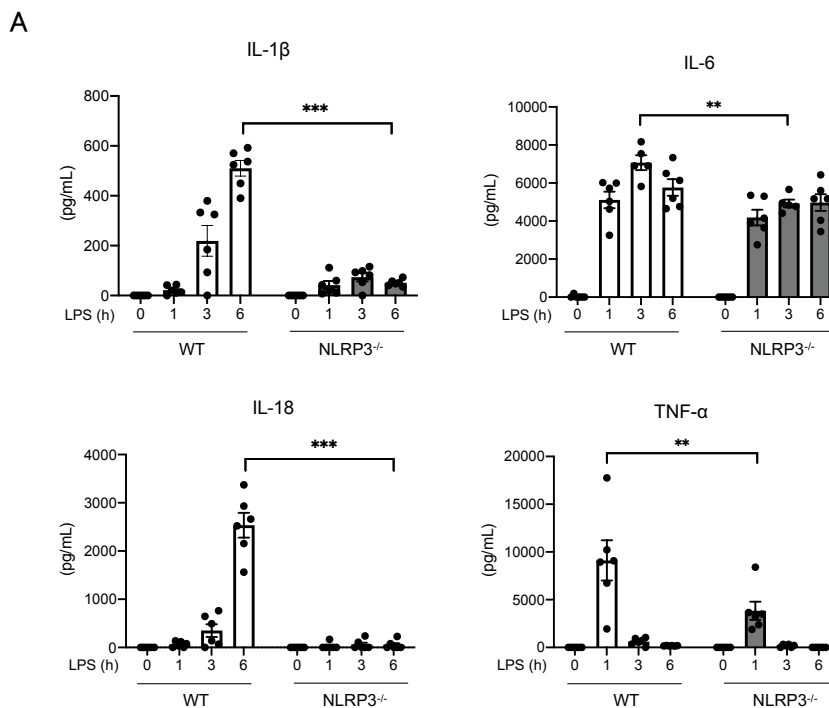


図 7. LPS 投与後の血中炎症性サイトカインの産生

WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスに生理食塩水、または LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与を行った後、血液を採取し、血漿を分離後に炎症性サイトカインの産生量を解析した。

A: WT マウスと NLRP3^{-/-}マウスに生理食塩水、または LPS の投与前、または腹腔内投与 1、3、6 時間後に血液採取を行い、血漿を分離後 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-18 を ELISA 法で測定した(n=5-6)。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

3-4. IL-18BP 遺伝子導入による敗血症性心筋症への影響

これまでの結果から、NLRP3^{-/-}マウスでは IL-18 により産生誘導される IFN γ の遺伝子発現と IL-18 の産生が抑制されることがわかり、NLRP3 インフラマソームによって活性化される IL-18 が敗血症性心筋症の発症に寄与している可能性が考えられた。そこで、IL-18 の機能を抑制する実験を行なった。IL-18 binding protein (IL-18BP) は IL-18 の内因性阻害物質として知られおり(20)、今回、マウスで IL-18BP タンパク質を発現させるために、ベクターとして IL-18BP がコードされた AAV (AAV-IL-18BP) を作成して使用した。まず、GFP(コントロール)と IL-18BP をコードしたプラスミドをトランスフェクションさせた HEK293T 細胞の上清と細胞溶解液を Western blot 法で解析し、IL-18BP の発現を確認した(図 8A)。作成した AAV-GFP の発現は、AAV を導入したマウスの右腓腹筋を摘出し、蛍光顕微鏡で確認した(図 8B)。そこで、AAV-GFP と AAV-IL-18BP を WT マウスに投与し、適切なウイルス濃度と IL-18BP が増加するまでの期間を決定するための予備検討を行なった。 3×10^{10} genome copies/mouse の低濃度では AAV 導入 2 週間後も IL-18BP の増加は認めなかった(図 8C)。 1×10^{11} の中濃度では 2 週間後に IL-18BP の増加を確認できた。 3×10^{11} の高濃度では 1 週間後に IL-18BP の増加を確認でき、2 週間後でも同程度の増加を確認できた。AAV 導入 2 週間後の血中 IL-18BP 濃度は、ウイルス量は中濃度と高濃度で著変なかったため(2サンプルのため有意差は測定できなかった)、ウイルス量は中濃度の 1×10^{11} genome copies/mouse に定め、AAV 導入 2 週間後に LPS 投与を行なった。AAV-GFP 群と比較し、AAV-IL-18BP 群では、LPS による心機能の低下は、軽度ではあるが有意に抑制され、CK-MB の上昇も抑制できた(図 8D-E)。IL-18 の存在下で IL-1 β の発現が上昇するという過去の報告(21)があることから、次に、IL-1 β ^{-/-}マウスに対して同条件で AAV の遺伝子導入を行なった。その結果、WT マウスに AAV-IL-18BP を導入した時よりも、IL-1 β ^{-/-}マウスでは LPS による心機能低

下と CK-MB の上昇をさらに抑制することが明らかになった。また、血中 IL-18BP の濃度も上昇していたが、血中 TNF- α 、IL-6 の濃度に差は認めなかった(図 8F)。

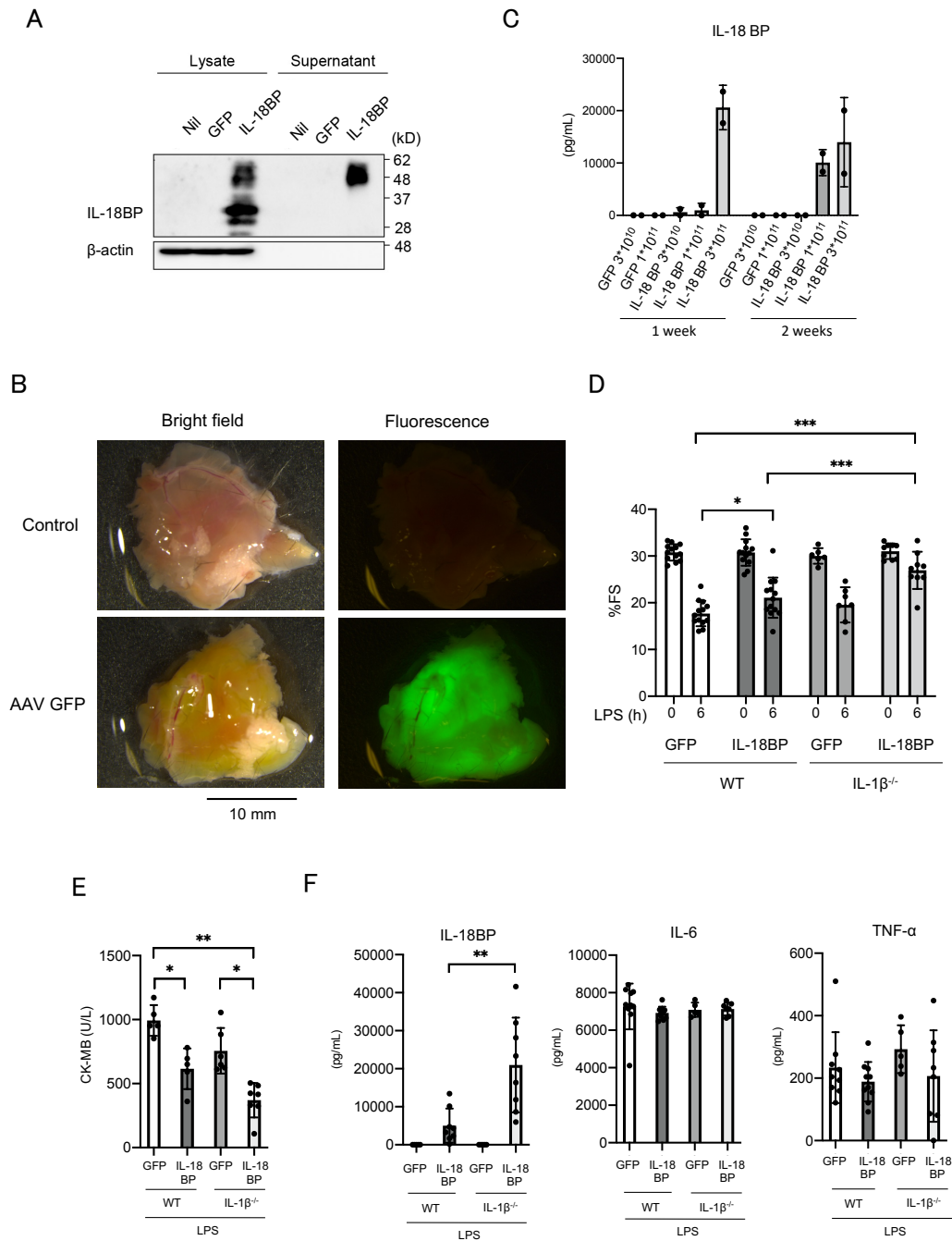


図 8. IL-18BP 遺伝子導入による敗血症性心筋症への影響

ベクターとして IL-18BP がコードされた AAV (AAV-IL-18BP)、およびコントロールとして GFP がコードされた AAV (AAV-GFP) をマウスの右腓腹筋に筋肉内注射をし、ウイルスを増加させた後、LPS 投与、心機能測定、臓器摘出を行ない、敗血症性心筋症への影響を検討した。

A: GFP と IL-18BP がコードされたプラスミドをトランスフェクションさせた HEK293T 細胞の Lysate と Supernatant を Western blot 法にて解析した。

B: AAV-GFP を腓腹筋に筋肉内注射し、2 週間後に腓腹筋を摘出し蛍光顕微鏡で観察した。

C: WT マウスに 1 匹あたり、AAV-GFP を 3×10^{10} または 1×10^{11} genome copies/mouse, 40 μ L/mouse、AAV-IL-18BP を 3×10^{10} 、 1×10^{11} 、 3×10^{11} genome copies/mouse, 40 μ L/mouse の条件で右腓腹筋に注射後 1 週間、または 2 週間後に血液を採取した。血漿に分離後 ELISA 法で IL-18BP を測定した。

D: WT マウス、IL-1 β ^{-/-}マウスに AAV-GFP、または AAV-IL-18BP を 1×10^{11} genome copies copies/mouse, 40 μ L/mouse の条件で筋肉内注射を行い、2 週間後に LPS の投与前、LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与後、6 時間後に%FS を評価した(n=9-11)。

E: D のマウスの心エコー後に血液を採取し、血漿に分離後 CK-MB の濃度を測定した(n=5-7)

F: D のマウスの心エコー後に血液を採取し、血漿に分離後 ELISA 法で IL-18BP、IL-6、TNF- α の濃度を測定した(n=5-8)。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

3-5. 骨髄移植モデルにおける敗血症心筋症

IL-1 β や IL-18 の主な産生源としてマクロファージや単球、リンパ球や組織マクロファージの一種であるクッパー細胞などが知られている。そこで、敗血症性心筋症における心機能低下を引き起こす責任細胞を明らかにするために、骨髄移植モデルを作成し、LPS 投与による心機能への影響を観察した。レシピエントが WT マウスである BMT^{WT to WT} と BMT^{NLRP3^{-/-} to WT} では LPS 投与により心機能が有意に低下したが、レシピエントが NLRP3^{-/-} である BMT^{WT to NLRP3^{-/-}} と BMT^{NLRP3^{-/-} to NLRP3^{-/-}} では心機能の低下は抑制されていた(図 9A)。血漿中の CK-MB は心機能の低下した群(BMT^{WT to WT}、BMT^{NLRP3^{-/-} to WT})において有意な上昇を認めたが、心機能が低下しなかった群では上昇が抑制されていた(図 9B)。これらの結果より、本検討における責任細胞としては、非骨髄由来細胞が寄与している可能性が考えられた。

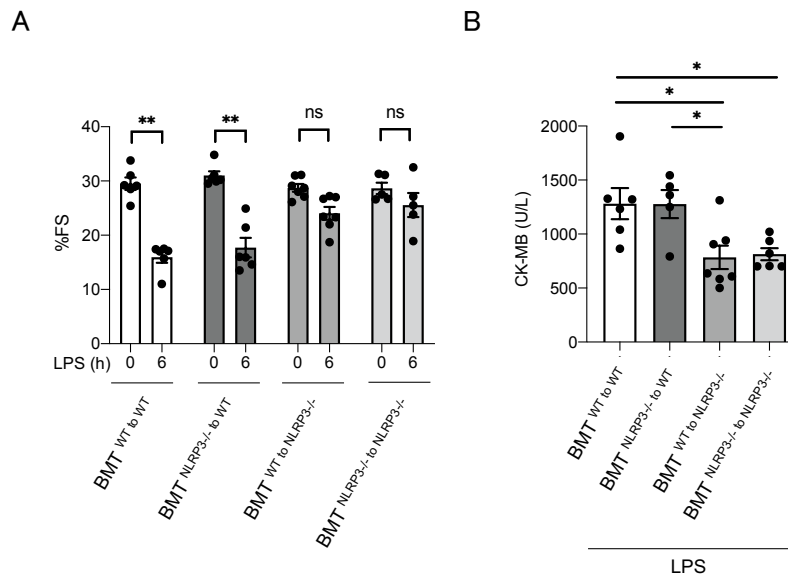


図 9. 骨髄移植モデルにおける敗血症心筋症

WT マウスと NLRP3^{-/-} マウスの間で骨髄移植を行い、それぞれ LPS を投与後に心機能と CK-MB を測定し、骨髄移植による敗血症性心筋症への影響を検討した。

A: BMT^{WT to WT}、BMT^{NLRP3^{-/-} to WT}、BMT^{WT to NLRP3^{-/-}}、BMT^{NLRP3^{-/-} to NLRP3^{-/-}}、に対して LPS の投与前、LPS を 6

mg/kg の濃度で腹腔内投与後、6 時間後に%FS を評価した(n=5-7)。

B: A のマウスの心エコー後に血液を採取し、血漿に分離後、CK-MB を測定した(n=5-7)。

*p<0.05、**p<0.01

3-6. 敗血症性心筋症における心筋細胞の NLRP3 の役割

骨髄移植モデルにおける実験から、敗血症性心筋症には非骨髄由来細胞が重要であることが示唆された。そこで、心筋細胞の役割を調べるために心筋細胞特異的な NLRP3 欠損マウスを作成した。MHC(myosin heavy chain)は α -MHC と β -MHC の 2 種のアイソフォームを持ち、マウスの心室では α -MHC が発現している。Cre-loxP システムを用いて作成した心筋特異的 NLRP3 欠損マウス ($NLRP3^{f/f}; \alpha MHC^{Cre/+}$)に LPS 投与後、心機能並びに心筋傷害を評価した。 $NLRP3^{f/f}; \alpha MHC^{Cre/+}$ マウスでは心機能の有意な低下と CK-MB の有意な上昇を認め、コントロール群 ($NLRP3^{f/f}$)と差は認めなかった(図 10A-B)。このことから敗血症性心筋症の病態に、心筋細胞の NLRP3 が関与している可能性は低いと考えた。

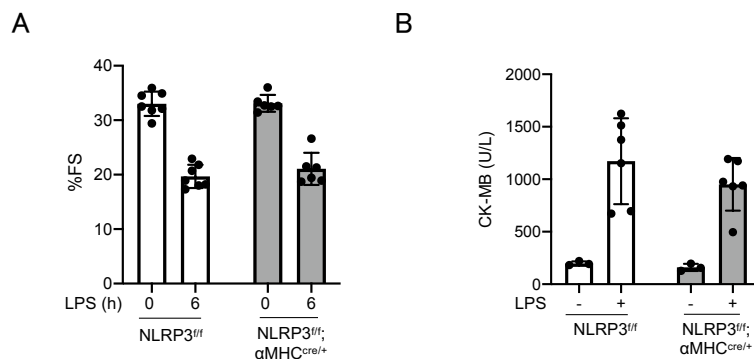


図 10. 敗血症性心筋症における心筋細胞の NLRP3

$NLRP3^{f/f}$ マウス、 $NLRP3^{f/f}; \alpha MHC^{Cre/+}$ マウスに LPS の腹腔内単回投与を行い、心機能評価を施行後、血液を採取した。

A: $NLRP3^{f/f}$ マウス、 $NLRP3^{f/f}; \alpha MHC^{Cre/+}$ マウスに LPS の投与前と、LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与後 6 時間後に心エコー検査を行い、%FS を評価した(n=3-7)。

B: A のマウスの心エコー後に血液を採取し、血漿に分離後 CK-MB を評価した (n=3-6)。

3-7. 脾臓摘出モデルにおける敗血症性心筋症

敗血症性心筋症には IL-1 β と IL-18 の両方が重要な役割を果たしていることが示唆されたが、どの臓器から産生されているかは病態の把握や治療に重要である。骨髓移植モデルの実験からは非骨髓細胞が重要であると考えられたが、骨髓移植の細胞は臓器や骨髓移植後の経過時間により置換効率が変わることもある。IL-1 β や IL-18 の主な産生細胞はマクロファージや単球、リンパ球、内皮細胞などであるが、過去に敗血症時に脾臓から分泌されたロイコトリエン B₄ により、肝臓からの TNF- α 産生が増大することが報告されている(19)。TNF- α には IL-1 β の産生を促進する働きがあることから、脾臓摘出モデルを作成し、LPS 投与による心機能への影響を検討した。WT マウスに脾臓摘出手術を行い、その 1 週間後に LPS 投与を行なった。コントロール群と比較し、脾臓摘出群では LPS 投与による心機能低下抑制効果を認めた。CK-MB 上昇に有意な差は認めなかったが、脾臓摘出群では低下傾向であった(図 11A-B)。また、コントロール群と比較し、脾臓摘出群では LPS 投与後の IL-1 β と IL-18 の上昇が抑制されていた(図 11C)。これらのことから、敗血症時には、脾臓の存在下で IL-1 β と IL-18 の発現が上昇し、心機能を低下させていることが示唆された。

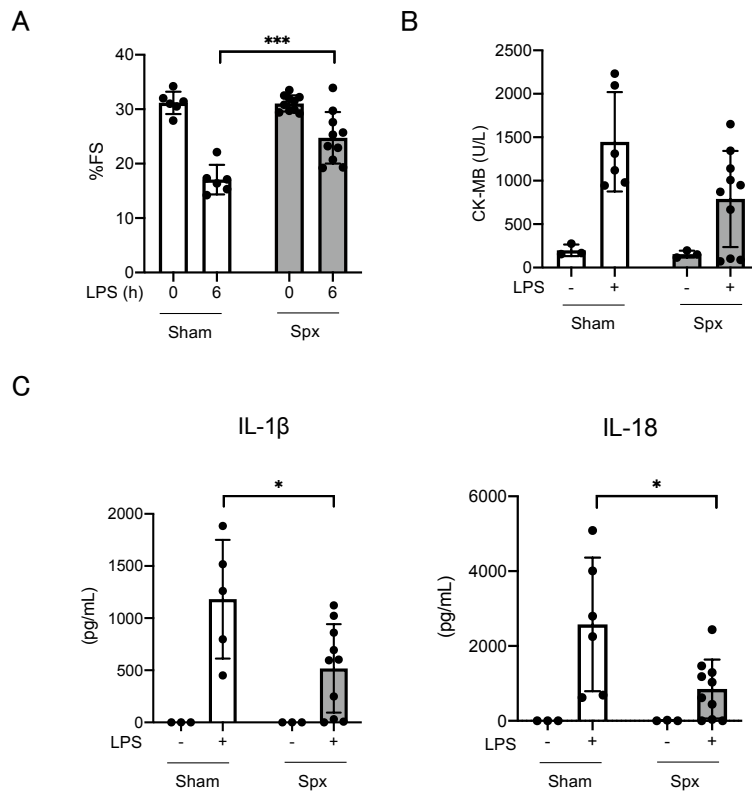


図 11. 脾臓摘出モデルにおける敗血症性心筋症

WT マウスに脾臓摘出を行い、LPS を投与後に心機能と CK-MB、炎症性サイトカインを測定し、脾臓摘出による敗血症性心筋症への影響を検討した。

A: 脾臓摘出、または sham 手術 1 週間後のマウスに対して LPS の投与前、LPS を 6 mg/kg の濃度で腹腔内投与後、6 時間後に%FS を評価した(n=3-10)。

B: A のマウスの心エコー後に血液を採取し、血漿に分離後 CK-MB を測定した(n=3-10)。

B: A のマウスの心エコー後に血液を採取し、血漿に分離後、ELISA 法で IL-1β、IL-18 を測定した(n=3-10)。

*p<0.05、***p<0.001

第4章 考察

本研究では、NLRP3 欠損および Casp1/11 欠損により、LPS によって誘導した敗血症性心筋症モデルで引き起こされる心機能低下と心筋傷害が抑制されたことから、その病態に NLRP3 インフラマソームが重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、NLRP3 欠損では、LPS 投与による心臓、脾臓、肝臓における炎症関連遺伝子の発現および血中の炎症性サイトカインの産生が抑制されており、NLRP3 インフラマソームを介した炎症性サイトカインが寄与していることもわかった。さらに、NLRP3 インフラマソームの下流因子である IL-1 β や GSDMD または IL-1 α の欠損マウスでは、敗血症性心筋症の抑制効果を認めなかったが、AAV-IL-18BP 遺伝子導入により IL-18 を阻害したマウスでは、軽度の抑制効果が観察された。さらに興味深いことに、AAV-IL-18BP を導入した IL-1 β の欠損マウスでは、その抑制効果が顕著となったことから、敗血症性心筋症の病態には IL-1 β と IL-18 の両方の存在が重要であることが示された。また、骨髄移植実験から非骨髄由来細胞の役割が示唆されたが、心筋特異的 NLRP3 欠損マウスを用いた実験からは心筋細胞の NLRP3 の寄与は低いと考えられた。一方、脾臓摘出によって敗血症性心筋症が抑制されるとともに、IL-1 β と IL-18 の産生も抑制されたことから、脾臓がこれら炎症性サイトカインの産生臓器として重要な役割を果たしていることが示唆された。

敗血症は多臓器不全を引き起こし、心機能および血圧の低下といった敗血症性ショック(敗血症性心筋症)を呈することが知られている。特に、心係数低下を認めた場合の敗血症の死亡率は 70-80%とも報告されていることから、敗血症性心筋症に対する有効な治療法の開発は急務である(2)。しかし、心機能低下の原因として、これまで、過剰に産生される TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカイン、筋小胞体上のカルシウムチャネル発現減少から起こるカルシウム輸送障害、一酸化窒素の過剰産生等が提唱されているが、未だ統一した見解は得られていないのが現状である(3)。

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ている(22)。過去にインフラマソーム下流の因子である IL-1 β の投与が心機能の低下を引き起こしているとの報告(7)があった一方で、敗血症に対する IL-1 受容体拮抗薬を用いた臨床試験では有効性が認められなかった(8)など、心機能の低下や敗血症性心筋症における NLRP3 インフラマソームの役割は未だ解明されておらず、見解の乖離も生じている。そこで、本研究では、敗血症性心筋症の病態における NLRP3 インフラマソームの役割を解明することを目的に研究を行った。

本研究において、敗血症を誘発させるために LPS の単回腹腔内投与を行った。マウスに敗血症を引き起こす方法として、他に盲腸結紮穿刺モデルが挙げられる。敗血症の原因として LPS モデルが内毒素によるものに対し、盲腸結紮穿刺モデルは多微生物性であること点が異なっている。盲腸結紮穿刺モデルでは、穿刺部位からの糞便流出の差や腸管の壊死の程度、炎症の局在化などにより個体ごとの重症度が異なるが、複数の原因菌により引き起こされる炎症は、実臨床での敗血症における血行動態や免疫反応により近いモデルである。一方で LPS 投与モデルでは、原因菌由来の毒素の投与のみであり、臨床の病態とはやや異なっているが、投与後の結果に誤差は少なく、安定した再現性が得られる。今回の実験では、安定した結果が得られ、かつインフラマソームとの関連性がよく知られている LPS による敗血症の誘導を行った。

LPS 投与後のマウスの生存率は、WT と比較し NLRP3 欠損マウスで大きく改善した。LPS により引き起こされた敗血症マウスの死亡した理由として、心機能低下に伴う心拍出量の低下が引き起こす全身への循環血漿量の低下や、敗血症に誘発された凝固能異常により血栓が生じ臓器への灌流が減少したこと、その結果、多臓器不全や急性呼吸促窮迫症候群が生じ、肺水腫による呼吸不全が起きたことが原因と考えられる。LPS は心臓だけでなく、肝臓など多くの臓器を傷害することが知られており

(23)、LPS による肝障害が引き起こす凝固能異常や肺傷害からの肺水腫を確認するため、今後 LPS 投与後の肝臓や肺の評価が必要と考える。

LPS 投与で誘発した敗血症性心筋症モデルでは、WT マウスでは有意な心機能の低下と血漿中の心筋逸脱酵素の上昇を認めたが、NLRP3 欠損マウスでは抑制されたことから、敗血症性心筋症による心機能の低下に NLRP3 インフラマソームを介した経路が重要であることがわかった。この結果は、NLRP3 を欠損、または阻害したマウスに対して盲腸穿孔を行ったところ、血中 IL-1 β の産生を低下させ、敗血症性心筋症が抑制できたという過去の報告と一致する(24)。また、心筋線維芽細胞における NLRP3 インフラマソームの活性化が敗血症時の心機能低下に重要であると報告がある(25)。しかし、NLRP3 はインフラマソームとは独立した機能を有することも知られていることから (26-27)、インフラマソームのエフェクター因子である Casp1 欠損による影響も調べた。その結果、Casp1/11 欠損マウスでも敗血症性心筋症を抑制できることが観察され、敗血症性心筋症が NLRP3 インフラマソームを介して誘導されることが明らかになった。今回、使用した Casp1/11 欠損マウスは、Casp1 と Casp11 が遺伝子的に近い領域に存在するため、以前より Casp1 欠損モデルとして世界で幅広く使用されているマウスである(27)。マウス Casp11 (ヒトでは Casp4/5) は Casp1 と異なり、細胞内 LPS と直接結合し、GSDMD を切断することで pyroptosis を引き起こす (non-canonical 経路)(27)。Casp11 は pro-IL-1 β や pro-IL-18 を直接切断することはできないが、細胞外への K⁺の流出を促進することで、NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こすことが報告されている(28)。敗血症性心筋症における Casp11 の役割については現在のところ報告がないが、Busch ら(29)は Casp11 欠損が盲腸穿孔誘発性敗血症モデルにおける死亡率に影響を与えないことを報告している。したがって、敗血症性心筋症においては NLRP3 インフラマソームが主に関与しており、Casp11 はその病態にほとんど寄与していないと考えられた。また、心機能低下を引き起こす分子

として、インフラマソーム下流イベントに関わる IL-1 β や IL-1 α 、GSDMD の関与の可能性は低いと思われた。

WT マウスでは LPS 投与 24 時間後の心エコーによる再評価で、低下した心機能の改善を認めた。臨床において、ヒトでは心機能が低下する敗血症に罹患後、約 1~2 週間後に心機能が改善することが多いとされている(30)。抗生剤や補液、昇圧剤などの適切な治療が施された場合、この時期に炎症が改善していることが多く、それに伴い心機能も改善していると考えられる。一方、本研究ではマウスに対して敗血症を誘発する LPS は単回投与であり、臨床では持続的に敗血症誘発物質にさらされるところが異なる点である。今後、間隔をあけて LPS を複数回投与し、心機能の変化や採血データを観察することは、敗血症性心筋症の更なる病態の理解に繋がるだろう。また、一度低下した心機能が改善することは、心筋梗塞の様な虚血による心筋細胞の完全な壊死に伴う不可逆的な心収縮力の低下ではなく、炎症性サイトカインなどの液性因子やカルシウム輸送障害など、時間経過により改善が期待できる一時的な心収縮の障害が考えられる。しかし、心機能が低下した敗血症性心筋症の患者では、その後の心不全の罹患率が上昇する(31)など、心筋細胞への傷害は起きていると思われるため、心機能の低下を起こさせないことが重要と考える。

心臓、脾臓、肝臓の遺伝子解析では、炎症性サイトカインである *Tnf* や *Il6*、*Ifng* の発現が、NLRP3 欠損マウスで有意に抑制されていた。*Il1b* の発現は WT マウスと NLRP3 欠損マウスのどちらでも上昇しており、敗血症時において、IL-1 β (pro- IL-1 β) は、タンパクレベルで発現が制御されていることを示している。*Il18* は心臓、脾臓において NLRP3 欠損マウスで発現が有意に抑制されていたが、肝臓では抑制できなかった。これも同様に、特に発現が最も多いとされる肝臓において IL-18 (pro- IL-18)がタンパクレベルで発現が制御されていることを示している。*iNOS* は NO を生成することで、TCA サイクルのアコニターゼや DNA 合成の律速酵素であるリボヌクレオチド

還元酵素をニトロ化し活性を阻害、またはスーパーオキシドと反応し、ペルオキシナイトレイトと呼ばれるラジカル分子を形成することで、主に細菌などの PAMPs の細胞代謝や増殖を抑制する。心臓における *Nos2* の発現は、WT マウスと NLRP3 欠損マウスで LPS 投与後に上昇したが、両方の間に有意差は認めなかった。過去に、IL-1 β が心筋細胞での iNOS を誘導し、心機能低下を起こすという報告(32)があるが、本研究では mRNA レベルでしか検討していないため、今後、iNOS によって産生される一酸化窒素(NO)濃度を測定する必要がある。心収縮力の低下による心室容量負荷の増大に反応し発現が増加する *Nppb* は、NLRP3 欠損マウスにおいて有意に抑制されており、NLRP3 欠損により敗血症時の心臓への負荷が軽減したことが示された。

NLRP3 欠損マウスでは、敗血症時の血中の炎症性サイトカインの濃度の低下を認めた。TNF- α は LPS 投与 1 時間後に、IL-6 は 3 時間後に、IL-1 β 、IL-18 は 6 時間後に、それぞれ産生が抑制されていた。特に IL-1 β 、IL-18 では産生に顕著な差を認めた。IL-18 は主に、T 細胞、B 細胞、NK 細胞に作用し、IFN γ の産生を誘導する。IL-18 の産生抑制は前述の IFN γ の遺伝子発現抑制の結果と合致する。心機能が低下している LPS 投与後 6 時間時点での IL-6 と TNF- α は WT マウスと NLRP3 欠損マウスとの間で有意差は認めなかったことから、心機能の低下には直接は関与していない可能性が示された。

これまでの結果から、NLRP3 欠損マウスでは IL-18 により産生誘導される IFN γ の遺伝子発現と IL-18 サイトカインの産生が抑制されることがわかり、敗血症性心筋症の病態には、NLRP3 インフラマソームにより活性化された IL-1 β ではなく、IL-18 が寄与している可能性が示唆された。IL-18 の内因性阻害物質である IL-18BP を AAV-IL-18BP を用い増加させたマウスでは、軽度ではあるが心機能低下は抑制されたが、NLRP3 欠損マウスと比較すると効果は乏しかった。しかし過去に、IL-1 β の単独投与で IL-18 の発現が上昇し心機能障害を起こすという報告(33)や、LPS 投与

による致死率が IL-1 β と IL-18 の欠損によって相加的に改善されるという報告(29)があり、次に IL-1 β 欠損マウスに対して AAV-IL-18BP の導入を行なったところ、心機能低下と CK-MB の上昇の抑制効果が増大した。このことは、IL-1 β と IL-18 両方の血中濃度の上昇で敗血症性心筋症が起きることを示している。これは Busch ら(29)の結果と合致する。一方で、LPS 投与 6 時間後の測定ではあるが、TNF- α 、IL-6 の発現は IL-1 β 欠損や IL-18BP の上昇に関係なく有意差は認めなかったため、敗血症性心筋症の病態に直接的な関係は低いと思われた。

骨髄移植モデルでは WT マウスがレシピエントである群で心機能が低下したが、レシピエントが NLRP3 欠損マウスである群では心機能の低下は抑制された。血漿中の CK-MB も心機能の低下した群において有意な上昇を認めた。このことから、敗血症性心筋症における責任細胞として、非骨髄由来細胞が重要であると考えられた。しかし、本研究では骨髄移植後 6 週間というやや短い期間で実験を行ったことから、骨髄キメラの効率が十分ではなかった可能性がある。また、骨髄移植後も約半数の常在性マクロファージ(クッパー細胞)は置き変わらなかったという報告(34)がある。さらに、当研究室で過去に行われた、WT マウスと EGFP マウスとの骨髄移植後の脾臓の免疫染色において、一部の CD45(白血球マーカー)陽性細胞が EGFP 陽性細胞に置き換わらなかったこと(図 12)などから、放射線の影響を受けにくい常在性のマクロファージが心筋症の発症に関与している可能性がある。今後、常在マクロファージを除去することができるクロドロン酸リポソームの投与実験が必要と考える。

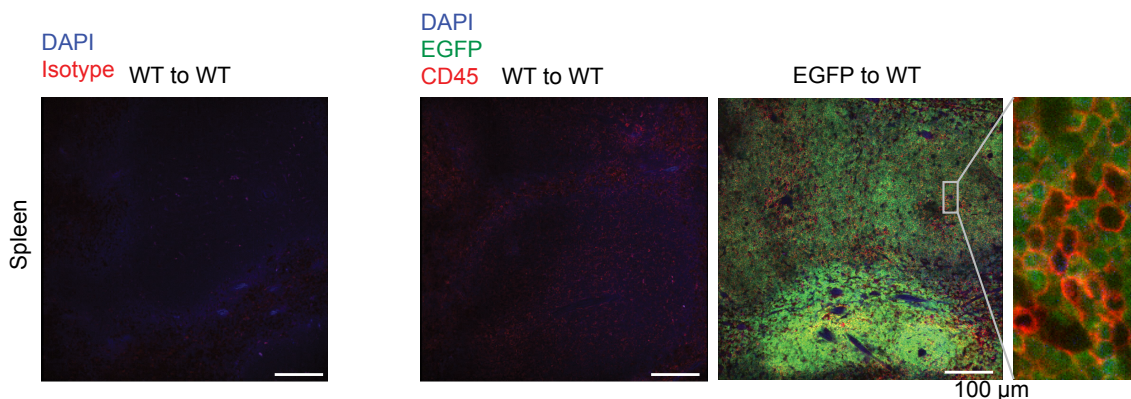


図 12. 骨髄移植後の脾臓における免疫染色

放射線を照射した WT マウスに、WT マウス、または EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)マウスの骨髄を移植した後、6 週間後に脾臓を摘出し免疫染色を行った。緑色に発光している細胞が EGFP 陽性細胞、赤色に発光している細胞が CD45 陽性細胞。

左:コントロール 中央:WT to WT マウス 右(弱拡大、強拡大):EGFP to WT マウス

骨髄移植モデルにおける実験から、敗血症性心筋症には非骨髄由来細胞が重要であることが示唆された。このことから、心筋細胞の NLRP3 が敗血症性心筋症における心機能低下に関与しているかを調べるために、心筋細胞特異的な NLRP3 欠損モデルを用い実験を行なった。心筋細胞特異的に NLRP3 を欠損したマウス ($NLRP3^{f/f}; \alpha MHC^{Cre+}$) では心機能の有意な低下と CK-MB の有意な上昇を認め、コントロール群 ($NLRP3^{f/f}$) と差は認めなかった。このことから敗血症性心筋症の病態に、心筋細胞の NLRP3 が関与している可能性は低く、心筋細胞における IL-1 β や IL-18 の産生は無い、もしくは非常に少ないと考えた。しかし、過去に心筋梗塞時に心筋線維芽細胞から産生される IL-1 β が心筋リモデリングに重要であるとも報告(12)もあり、更なる検証が必要である。

これまでの結果から、非骨髄由来細胞(または一部の常在性細胞)から産生された IL-1 β と IL-18 の両方が敗血症性心筋症において重要な役割を果たしていることが

示唆されたが、どの臓器から産生されているか特定することは、病態の把握や治療に重要である。IL-1 β の主な産生細胞はマクロファージや単球、リンパ球、内皮細胞などであり、IL-18 の主な産生細胞はマクロファージやクッパー細胞であるが、過去に敗血症時に脾臓から分泌されたロイコトリエン B4 が肝臓からの TNF- α 産生を促進するという報告が(19)ある。TNF- α には IL-1 β の産生を促進する働きがあることから、ロイコトリエン B4 を主に産生する脾臓に着目した。ロイコトリエン B4 はアラキドン酸から産生される生理活性脂質であり、白血球遊走や血管透過性の亢進を促し、気管支喘息やアレルギー反応に関与していることが知られている。近年、インフラマソームの形成にロイコトリエン B4 が必要であるという報告(35)があり、今回、脾臓摘出モデルを作成した。脾臓摘出群では心機能低下抑制効果を認め、CK-MB 上昇に有意な差は認めなかったが、低下傾向であり、一定の心筋傷害抑制効果が期待できた。また IL-1 β と IL-18 の上昇も抑制されていたことから、敗血症時には、脾臓の存在下で IL-1 β と IL-18 の発現が上昇すること、そしてそれらが心機能を低下させる一因となっていることが示唆された。一方で、脾臓は最大のリンパ組織として知られ、脾髄の中でも白脾髄には非常に多くの T 細胞や B 細胞などの免疫細胞が存在している。脾摘を行ったことでこれらの多くが失われた結果、免疫細胞からの炎症性物質が減少し、心機能低下を抑制した可能性がある。

現在、臨床では敗血症性心筋症に対する有効な治療法はないが、例えば抗 IL-1 β ヒト化モノクローナル抗体のカナキヌマブと IL-18BP 製剤のタデキニグアルファの併用、またはロイコトリエン B4 阻害剤などが有効であるかもしれない。インフラマソーム阻害薬の臨床試験も現在様々な疾患に対して進行中であり、今後期待される。しかしながら、以下の点について、より詳細な解析が必要であると考えられた。まず、IL-1 β と IL-18 の上昇により、なぜ心機能が低下するかという機序の解明が必要である。IL-1 β と IL-18 の両方が作用し傷害を起こすのか、またはどちらかが主に作用し、もう

一方が補助的に作用するのかは未だ不明であるが、IL-1 β の阻害では心機能低下抑制効果がなく、IL-18 の阻害では軽度の効果があったという今回の結果からは、IL-18 が主に働き、IL-1 β が補助的に働くと考えている。その他、脾臓中のどの細胞が炎症性サイトカインやロイコトリエン B₄ の産生に関与しているのかということや、常在マクロファージを除去させるクロドロン酸リポソームなどの検証は必要である。さらに、脾臓自体による心機能低下効果が確かなものかを検証するために、非致死量の放射線照射を行い免疫細胞を減少させる実験は必要だろう。本研究では心臓のみに着目していたが、敗血症時における IL-1 β と IL-18 の両方の阻害が、肝臓や腎臓、肺などの他の臓器の保護に関与しているかの検証も重要である。これらの解明は、本疾患の有用な治療法の開発につながると期待される。

第 5 章 おわりに

本研究では、敗血症性心筋症において NLRP3 インフラマソーム活性化によって誘導される IL-1 β と IL-18 の両方が心機能低下を起こす因子として重要であることを明らかにした。さらに、それら IL-1 β と IL-18 の産生に脾臓の存在が重要であることも明らかとなった。本研究成果が、敗血症性心筋症の新規治療法につながることが期待される。

第 6 章 謝辞

本研究の実施と本論文を作成するにあたり、多大なご助力とご指導を賜りました自治医科大学循環器内科学講座 苅尾七臣先生、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、唐澤直義先生、駒田敬則先生、松村貴由先生、山田直也先生に心より感謝申し上げます。

また、研究の計画・遂行にあたり、自治医科大学循環器内科学講座、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。心より感謝を申し上げます。

最後に、大学院での生活を支え続けてくれた家族に感謝の意を表明致します。

第 7 章 参考文献

- [1] Rudd, K. E, Johnson, S. C, Agesa, K. M, Shackelford, K. A, Tsoi, D, Kievlan, D. R, Colombara, D. V, Ikuta, K. S, Kissoon, N, Finfer, S, Fleischmann-Struzek, C, Machado, F. R, Reinhart, K. K, Rowan, K, Seymour, C. W, Watson, R. S, West, T. E, Marinho, F, Hay, S. I, Lozano, R, Lopez, A. D, Angus, D. C, Murray, C. J. L.Naghavi, M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*.395:200-211.(2020)
- [2] Y. Kakiyama, T. Ito, M. Nakahara, K. Yamaguchi, T. Yasuda, Sepsis-induced myocardial dysfunction, *Journal of Intensive Care*4:22. (2016)
- [3] M. L'Heureux, M. Sternberg, L. Brath, J. Turlington, M.G. Kashiouris, Sepsis-Induced Cardiomyopathy: a Comprehensive Review, *Curr Cardiol Rep* 22(5):35 (2020)
- [4] M. Takahashi, NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction, *Int Heart J* 55(2) 101-5. (2014)
- [5] N. Kayagaki, I.B. Stowe, B.L. Lee, K. O'Rourke, K. Anderson, S. Warming, T. Cuellar, B. Haley, M. Roose-Girma, Q.T. Phung, P.S. Liu, J.R. Lill, H. Li, J. Wu, S. Kummerfeld, J. Zhang, W.P. Lee, S.J. Snipas, G.S. Salvesen, L.X. Morris, L. Fitzgerald, Y. Zhang, E.M. Bertram, C.C. Goodnow, V.M. Dixit, Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling, *Nature* 526(7575) 666-71. (2015)
- [6] P.M. Ridker, B.M. Everett, T. Thuren, J.G. MacFadyen, W.H. Chang, C.Ballantyne, F. Fonseca, J. Nicolau, W. Koenig, S.D. Anker, J.J.P. Kastelein, J.H. Cornel, P.

Pais, D. Pella, J. Genest, R. Cifkova, A. Lorenzatti, T. Forster, Z. Kobalava, L. VidaSimiti, M. Flather, H. Shimokawa, H. Ogawa, M. Dellborg, P.R.F. Rossi, R.P.T. Troquay, P. Libby, and R.J. Glynn, Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease, *N Engl J Med* 377:1119-1131 (2017)

- [7] C.D. Raeburn, C.A. Dinarello, M.A. Zimmerman, C.M. Calkins, B.J. Pomerantz, R.C. McIntyre, Jr., A.H. Harken, X. Meng, Neutralization of IL-18 attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(2) H650-7. (2002)
- [8] Opal, Steven M. Fisher, Charles J. Dhainaut, Jean-Francois A. Vincent, Jean-Louis Brase, Rainer Lowry, Stephen F. Jerald C. Gus J. Levy, Howard Robert A. Shelly, Maire P. John P. LaBrecque, John F. Lookabaugh, Donovan, Baughman, Robert, Norman, James DeMaria, Matzel, Klaus, Abraham, Edward, Seneff, Michael, Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Critical Care Medicine*, 25(7):1115-1124. (1997)
- [9] Seonmin Lee, Kiichi Nakahira, Jesmond Dalli, Ilias I. Siempos, Paul C. Norris, Romain A. Colas, Jong-Seok Moon, Masakazu Shinohara, Shu Hisata, Judie Ann Howrylak, Gee-Young Suh, Stefan W. Ryter, Charles N. Serhan, and Augustine M. K. Choi, NLRP3 Inflammasome Deficiency Protects against Microbial Sepsis via Increased Lipoxin B₄ Synthesis, *Am J Respir Crit Care Med*. 196:713-726 (2017)

- [10] 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)
- [11] 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
- [12] S. Mizuno-Iijima, S. Ayabe, K. Kato, S. Matoba, Y. Ikeda, T.T.H. Dinh, H.T. Le, H. Suzuki, K. Nakashima, Y. Hasegawa, Y. Hamada, Y. Tanimoto, Y. Daitoku, N. Iki, M. Ishida, E.A.E. Ibrahim, T. Nakashiba, M. Hamada, K. Murata, Y. Miwa, M. Okada-Iwabu, M. Iwabu, K.I. Yagami, A. Ogura, Y. Obata, S. Takahashi, S. Mizuno, A. Yoshiki, F. Sugiyama, Efficient production of large deletion and gene fragment knock-in mice mediated by genome editing with Cas9-mouse Cdt1 in mouse zygotes, *Methods* 191:23-31. (2021)
- [13] 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)
- [14] 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)

- [15] S. Mizuno-Iijima, S. Ayabe, K. Kato, S. Matoba, Y. Ikeda, T.T.H. Dinh, H.T. Le, H. Suzuki, K. Nakashima, Y. Hasegawa, Y. Hamada, Y. Tanimoto, Y. Daitoku, N. Iki, M. Ishida, E.A.E. Ibrahim, T. Nakashiba, M. Hamada, K. Murata, Y. Miwa, M. Okada-Iwabu, M. Iwabu, K.I. Yagami, A. Ogura, Y. Obata, S. Takahashi, S. Mizuno, A. Yoshiki, F. Sugiyama, Efficient production of large deletion and gene fragment knock-in mice mediated by genome editing with Cas9-mouse Cdt1 in mouse zygotes, *Methods* 191 (2021) 23-31.
- [16] K. Nishida, O. Yamaguchi, S. Hirotani, S. Hikoso, Y. Higuchi, T. Watanabe, T. Takeda, S. Osuka, T. Morita, G. Kondoh, Y. Uno, K. Kashiwase, M. Taniike, A. Nakai, Y. Matsumura, J. Miyazaki, T. Sudo, K. Hongo, Y. Kusakari, S. Kurihara, K.R. Chien, J. Takeda, M. Hori, K. Otsu, p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload, *Mol Cell Biol* 24(24) (2004) 10611-20.
- [17] S.M. Man, Inflammasomes in the gastrointestinal tract: infection, cancer and gut microbiota homeostasis, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(12) 721-737. (2018)
- [18] Kitajima I, Kawahara K, Nakajima T, Soejima Y, matsuyama T, maruyama I. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine mastocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 204:244-51. (1994)
- [19] M.T. Fonseca, E.H. Moretti, L.M.M. Marques, B.F. Machado, C.F. Brito, J.T. Guedes, E.N. Komegae, T.S. Vieira, W.T. Festuccia, N.P. Lopes, A.A. Steiner, A leukotriene-dependent spleen-liver axis drives TNF production in systemic inflammation. *Sci Signal* 14(679) (2021).

- [20] Charles A. Dinarello, Daniela Novick, Soohyun Kim, Gilles Kaplanski. Interleukin-18 and IL-18binding protein. *Frontiers in IMMUNOLOGY*, 4:289-299 (2013)
- [21] Manoranjan Sahoo, ivonne Ceballos-Olvera, Laura del Barrio, Fabio re. Role of Inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in Bacterial Infecrions. *ScientificWorldJournal*, 11:2037-2050. (2011)
- [22] M. Takahashi, NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease, *Cardiovasc Res* 118(2) 372-385. (2022)
- [23] Liao H., Du S., Jiang T., Zheng M., Xiang Z., Yang J. UMSCs Attenuate LPS/D-GalN-Induced Acute Liver Failure in Mice by Down-regulating the MyD88/NF- κ B Pathway. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 9:690–701 (2021).
- [24] M. Kalbitz, F. Fattahi, J.J. Grailer, L. Jajou, E.A. Malan, F.S. Zetoune, M. Huber-Lang, M.W. Russell, P.A. Ward, Complement-induced activation of the cardiac NLRP3 inflammasome in sepsis, *FASEB J* 30(12) 3997-4006 (2016).
- [25] W. Zhang, X. Xu, R. Kao, T. Mele, P. Kvietys, C.M. Martin, T. Rui, Cardiac fibroblasts contribute to myocardial dysfunction in mice with sepsis: the role of NLRP3 inflammasome activation, *PLoS One* 9(9) (2014) e107639.
- [26] Y. Inoue, K. Shirasuna, H. Kimura, F. Usui, A. Kawashima, T. Karasawa, K. Tago, K. Dezaki, S. Nishimura, J. Sagara, T. Noda, Y. Iwakura, H. Tsutsui, S. Taniguchi, K. Yanagisawa, T. Yada, Y. Yasuda, M. Takahashi, NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes, *J Immunol* 192(9) (2014) 4342-51.

- [27] Y. Mizushima, K. Shirasuna, F. Usui, T. Karasawa, A. Kawashima, H. Kimura, M. Kobayashi, T. Komada, Y. Inoue, N. Mato, H. Yamasawa, E. Latz, Y. Iwakura, T. Kasahara, M. Bando, Y. Sugiyama, M. Takahashi, NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1beta, *J Biol Chem* 290(8) (2015) 5065-5077.
- [28] N. Kayagaki, S. Warming, M. Lamkanfi, L. Vande Walle, S. Louie, J. Dong, K. Newton, Y. Qu, J. Liu, S. Heldens, J. Zhang, W.P. Lee, M. Roose-Girma, V.M. Dixit, Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11, *Nature* 479(7371) (2011) 117-21.
- [29] K. Busch, M. Kny, N. Huang, T.E. Klassert, M. Stock, A. Hahn, S. Graeger, M. Todiras, S. Schmidt, B. Chamling, M. Willenbrock, S. Gross, D. Biedenweg, A. Heuser, C. Scheidereit, C. Butter, S.B. Felix, O. Otto, F.C. Luft, H. Slevogt, J. Fielitz, Inhibition of the NLRP3/IL-1beta axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 12(6) (2021) 1653-1668.
- [30] Parker M, Shelhamer J, Bacharach S, Green M, Natanson C, Frederick T, Damske B, Parrillo J: Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1984, 100: 483-490. Parker M, Shelhamer J, Bacharach S, Green M, Natanson C, Frederick T, Damske B, Parrillo J: Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*, 100: 483-490. (1984)
- [31] Furian T, Aguiar C, Prado K, et al. Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: Relation to endothelial function and mortality. *J Crit Care*;27:319.e9-319.e15. (2012)

- [32] L. Jia, M. Takahashi, H. Morimoto, S. Takahashi, A. Izawa, H. Ise, T. Iwasaki, H. Hattori, K.J. Wu, U. Ikeda, Changes in cardiac lipid metabolism during sepsis: the essential role of very low-density lipoprotein receptors, *Cardiovasc Res* 69(2) (2006) 545-55.
- [33] S. Toldo, E. Mezzaroma, L. O'Brien, C. Marchetti, I.M. Seropian, N.F. Voelkel, B.W. Van Tassell, C.A. Dinarello, A. Abbate, Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306(7) H1025-31. (2014)
- [34] Beattie L, Sawtell A, Mann J, et al. Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *J Hepatol*; 65: 758-68. (2016)
- [35] Dong-Wook Kwak, Donghwan Park, Jae-Hong Kim. Leukotriene B₄ Receptors Are Necessary for the Stimulation of NLRP3 Inflammasome and IL-1 β Synthesis in Neutrophil-Dominant Asthmatic Airway Inflammation. *Biomedicines* 9(5):535 (2021)