

氏 名	藤 村 研 太
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 685 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 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	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
論文審査委員	(委員長) 教授 武 田 憲 彦 (委 員) 教授 今 井 靖 准教授 小 山 寛 介

論文内容の要旨

1 研究目的

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。敗血症性ショックは、敗血症のうち、循環不全や細胞機能、代謝の異常により、死亡率が高くなった状態と定義され、その中でも、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が知られている。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 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 や NO 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が、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確立していない。

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が重要な役割を担っていることが明らかとなっており、特に NLRP3 インフラマソームは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、エフェクター分子 Casp 1 からなる細胞内分子複合体であり、PAMPs や DAMPs を認識することで、NLRP3、ASC、Casp1 が重合し NLRP3 インフラマソームが形成される。Casp1 の活性化は、IL-1 β や IL-18 を成熟化し、また、GSDMD を切断することで、細胞膜上に穴を形成し、IL-1 β や IL-18 が細胞外に流出することで Pyroptosis を誘導する。

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、過去の報告からは NLRP3 活性化に続く IL-18 の成熟化が心機能低下に寄与していることが示唆されたが、IL-18 の単独の阻害で心機能が改善したとの報告はなく、不明な点も多く残されている。

敗血症性心筋症に対して、多くの研究が行われているが、臨床においては未だに有効な治療法は確立していない。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再考し、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、研究を開始した。

2 研究方法

実験動物として、8~12 週齢の個体(雄)の WT、NLRP3^{-/-}、Casp1/11^{-/-}、IL-1 α ^{-/-}、IL-1 β ^{-/-}、GSDMD^{-/-}、NLRP3^{ff}、 α MHC^{cre/+}マウスを用いた。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。

敗血症性心筋症モデルを作成するため、マウスに LPS を 6 mg/kg の濃度で単回腹腔内投与した。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、3、6 時間後、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単回腹腔内投与した。

採取した血液を用い、Fuji-drychem にて CK-MB を、ELISA 法で炎症性サイトカインなどの測定を行った。マウスより摘出した心臓、肝臓、脾臓の組織から RNA を抽出し、Real-time RT-PCR 法を用いて遺伝子発現を確認した。

マウスにベクターとして IL-18BP がコードされた AAV-IL-18BP、およびコントロールとして GFP がコードされた AAV-GFP をマウスの右腓腹筋に筋肉内注射を行い、その 2 週間後に LPS 投与をした。

骨髄移植モデルの作成では、ドナーマウスを安楽死させた後、大腿骨および脛骨を取り出し、骨髄細胞を回収し、細胞懸濁液を調製した。レシピエントマウスとして 6 週齢のマウスを用いた。移植前に 5.0 Gy 照射の後、3 時間後に、さらに 5.0 Gy を照射し、計 10.0 Gy の γ 線全身照射を行った。ドナー細胞としてレシピエントマウス 1 匹あたり 2×10^6 個の骨髄細胞を頸静脈より注入し、移植を行い、その 6 週間後に LPS 投与を行なった。

心筋細胞特異的 NLRP3 欠損マウス (NLRP3^{ff} ; α MHC^{cre/+})は、NLRP3^{ff}マウスと、マウスの心筋細胞特異的に発現している α MHC (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 α MHC^{cre/+}マウスを交配させることで作成した。

脾臓摘出モデルの作成では、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した。次いで頭側の血管も結紮した後に脾臓を摘出し、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 投与を行った。

3 研究成果

WT マウスに LPS を投与し 6 時間後に心エコー検査を施行したところ、心機能の低下が認められた。一方、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 を投与しても心機能の低下は認めなかった。IL-1 α ^{-/-}マウス、IL-1 β ^{-/-}マウス、GSDMD^{-/-}マウスに LPS を投与すると心機能は有意に低下していた。これらのマウスの血漿を用い CK-MB を測定すると、心機能の低下した群と比較し、低下しなかった群では CK-MB の上昇が有意に抑制されていた。Co-housing の実験では、NLRP3^{-/-}マウスと共同飼育した WT マウスでは心機能が低下し、WT マウスと共同飼育した NLRP3^{-/-}マウスでは心機能が低下しなかった。

定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現の検討では、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。Tnf や Il6、Ifng の発現は、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。

ELISA 法による血中炎症性サイトカインの濃度の検討では、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。特に、IL-1 β 、IL-18 では産生量に顕著な差を認めた。

WT に AAV-IL-18BP を導入したマウスではコントロールと比較し、LPS による心機能低下は抑制され、CK-MB の上昇も抑えられた。次に IL-1 β $^{-/-}$ に AAV-IL-18BP を導入したところ、WT と比較し、さらに心機能低下抑制効果が上昇した。

WT と NLRP3 $^{-/-}$ の間で骨髄移植をおこなった実験では、レシピエントが NLRP3 $^{-/-}$ であるマウスにおいて心機能低下が抑制されており、CK-MB の上昇も抑えられた。

心筋細胞特異的に NLRP3 を欠損させたマウスでは、コントロールと同様に、LPS による心機能低下は抑制できず、CK-MB も上昇した。

脾臓を摘出したマウスでは、コントロール群と比較し、LPS による心機能低下は抑制され、CK-MB も有意差は認めなかったが、低下傾向であった。また血中 IL-1 β や IL-18 の濃度も低下していた。

4 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、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、AAV-IL-18BP を導入した IL-1 β 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。

5 結論

本研究では、敗血症性心筋症において NLRP3 活性による血中 IL-1 β 濃度と IL-18 濃度の両方の上昇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を期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究では、LPS 投与により敗血症を再現する病態モデルを用いた解析により、敗血症性心筋症の病態において 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示された。NLRP3 インフラマソームの下流では様々なサイトカインシグナルが活性化するが、遺伝子改変マウス、および AAV を用いた *in vivo* の解析から IL-1 β および IL-18 のシグナルが協調して敗血症性心筋症を引き起こしていることが明らかになった。また心筋細胞特異的 NLRP3 欠損マウスを用いた検討から、非心筋細胞における NLRP3 インフラマソームがその病態に重要であることが確認された。さらに骨髓移植実験から造血系以外の細胞における NLRP3 の役割が明らかになった。

本研究により IL-1 β および IL-18 の両者を標的とする治療が、敗血症性心筋症の病態を改善する新たな治療標的として期待できることが明らかになり、臨床的にも重要な研究結果であると高く評価される。またこれらの検討は遺伝子改変マウスおよび AAV ウイルスを用いた病態モデルでの解析により行われたものであり、その新規性は高く評価される。審査委員より実験データおよび考察の記載について、いくつかの課題が指摘され、これらにつき適切に修正することを条件として、審査委員全員で合格と判定した。

申請者より論文が再提出され、指摘された課題につき適切に修正されたことを確認した。

最終試験の結果の要旨

本研究は遺伝子改変マウスを用いた検討から敗血症性心筋症の病態プロセスを明らかにし、その治療標的として IL-1 β および IL-18 シグナルの有用性を明らかにした。プレゼンテーションでは研究の背景、目的、方法、結果および考察について、定められた時間内でわかりやすく説明された。審査委員からは主に以下の項目についての質問がなされた。

- 1) 敗血症モデルでは心臓のみならず、全身のさまざまな臓器で炎症プロセスが活性化していると考えられる。これらは敗血症性心筋症の病態にどのように関与していると考えられるか？
- 2) IL-1 β と IL-18 シグナルが協調的に働いている分子機構について、どのような可能性が想起されるか？
- 3) 脾臓摘出はどのように免疫応答に影響するのか？

申請者は上記を含むほとんどの質問に対して、自身の実験データや既報での検討結果を踏まえて適切に説明することができた。また学位論文につき、審査委員からの指摘に応じて適切に修正・加筆されていることが確認された。

以上の発表・質疑応答および修正された論文を確認し、申請者が十分な能力を有していることが確認され、審査委員全員一致で合格と判定された。