

氏 名	佐田 友 藍
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 545 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 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	肝虚血再灌流障害におけるインフラマソーム非依存性 IL-1 β プロセッシング機構の解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 水 田 耕 一 (委 員) 教 授 西 村 智 准教授 小宮根 真 弓

論文内容の要旨

1 研究目的

肝臓の虚血再灌流障害は肝切除、肝移植術後の肝不全を引き起こす要因の一つであり、その機序の解明、治療法の確立は重要な課題である。近年、この病態に無菌性炎症が重要と考えられており、その経路の一つである NLRP3 インフラマソームとの関連が報告されている。NLRP3 インフラマソームは強力な炎症性サイトカインである IL-1 β の前駆体 (pro-IL-1 β) を活性型に切断（プロセッシング）する Caspase-1 を誘導する細胞内分子複合体である。NLRP3 インフラマソームはパターン認識受容体の NLRP3、アダプター分子である ASC、Caspase-1 から構成され、インフラマソームが形成されると Caspase-1 の活性化が起こり、強力な炎症性サイトカインである IL-1 β の前駆体が成熟型へとプロセッシングされ、炎症惹起、組織障害が生じる。当研究室の Inoue らが NLRP3 インフラマソーム構成分子の欠損マウスを用いて肝虚血再灌流障害への影響を検証した。NLRP3^{-/-}マウスでは IL-1 β 産生が減少、肝障害が抑制されたが、ASC^{-/-}、Caspase-1^{-/-}マウスでは肝障害が野生型マウスと変わりなく、IL-1 β 産生も認めたことから、インフラマソーム非依存性の IL-1 β プロセッシング機序の存在が示唆された。さらに NLRP3^{-/-}マウスのみで肝臓への好中球浸潤が軽減しており、肝虚血再灌流障害の病態において IL-1 β が重要であり、肝臓に浸潤した好中球がインフラマソーム非依存性の IL-1 β プロセッシングを制御するのではないかと仮説を立てて研究を行った。

2 研究方法

In vivo 実験では野生型 (Wild-type : WT) マウス、IL-1 β 欠損 (IL-1 β ^{-/-}) マウス、マクロファージ除去マウス、好中球除去マウスに 70%肝虚血再灌流障害モデルを作成、虚血 1 時間再灌流 6 時間後に肝組織、血液のサンプリングを行った。肝逸脱酵素、サイトカイン測定、肝臓の組織学的検討、遺伝子発現解析を行った。

In vitro 実験ではマクロファージと好中球、また Kupffer 細胞と好中球の共培養による IL-1 β 産生の検討、各種阻害剤を用いた解析を行った。pro-IL-1 β の予想される切断部位のアミノ酸変異体を導入した細胞を用いて、好中球によるプロセッシング機序の解析を行った。*In vitro* 実験の結果、好中球プロテアーゼの重要性が示唆され、好中球プロテアーゼ阻害剤をマウスに投与、肝虚血再灌流障害モデルを作成、肝障害への影響を検証した。

3 研究成果

IL-1 β ^{-/-}マウスでは肝虚血再灌流による肝障害が抑制され、炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現も軽減した。肝臓への炎症細胞浸潤に関しても好中球だけでなくマクロファージの浸潤も抑制され、肝虚血再灌流障害の病態における IL-1 β の重要性が明らかになった。マクロファージと好中球、各々の細胞を除去したマウスで肝虚血再灌流障害モデルを作成し、その役割を検証した。マクロファージまたは好中球を除去したマウスで、どちらも肝障害が軽減するとともに IL-1 β 産生も抑制された。以上の結果より肝虚血再灌流障害において IL-1 β が炎症惹起、肝障害形成に重要なサイトカインであり、その産生にマクロファージと好中球の両方が関与していることが分かった。

IL-1 β 産生機序を解明するため、マウスから単離したマクロファージと好中球の共培養実験を行った。LPS プライミングにより pro-IL-1 β を発現させたマクロファージと好中球の共培養により、IL-1 β の成熟型へのプロセッシングを認めた。さらに、野生型マウス、IL-1 β ^{-/-}マウス由来の細胞で解析を行った結果、好中球由来のプロテアーゼがマクロファージ由来の pro-IL-1 β をプロセッシングすることで IL-1 β の産生と放出が起こることが明らかになった。また、この反応は Caspase-1 阻害剤で抑制されず、インフラマソーム非依存性であることが分かった。好中球による IL-1 β の切断部位を同定するため、推定される切断アミノ酸部位に変異を入れたマクロファージ細胞株を用いて検討したところ、Val114 と Tyr113 の両方で切断されており、複数の好中球プロテアーゼが関与していることが明らかになった。さらに、好中球プロテアーゼ阻害剤を投与したマウスでは、肝虚血再灌流障害が軽減するとともに IL-1 β 産生が減少した。

以上の結果から、肝虚血再灌流障害ではインフラマソーム非依存性に好中球プロテアーゼがマクロファージ由来の pro-IL-1 β をプロセッシングし、これによって放出された IL-1 β が炎症惹起と肝障害に寄与していることを証明した。

4 考察

肝虚血再灌流障害において IL-1 β が重要であることは示されているが、そのプロセッシング機序については不明な点も多い。本研究は肝虚血再灌流障害におけるインフラマソーム非依存性の IL-1 β プロセッシングの役割について新たに示すことができた。また、マクロファージから供給された pro-IL-1 β が好中球由来のプロテアーゼによってプロセッシングされるというマクロファージと好中球の相互作用の重要性についても明らかとした。

肝虚血再灌流刺激による IL-1 β 産生に関して pro-IL-1 β 合成を誘導するプライミングシグナルが同定されていないなどの解明不十分な点もあり、IL-1 β と病態との関連についてさらなる検証が必要である。一方、抗 IL-1 β 中和抗体はクリオピリン周期熱症候群 (CAPS) という自己炎症症候群に対してすでに臨床応用されており、肝虚血再灌流障害の治療にも応用できる可能性がある。

5 結論

本研究では、肝虚血再灌流障害の病態にインフラマソーム非依存性の IL-1 β プロセッシングが重要な役割を果たしていること、このプロセッシング機序が好中球プロテアーゼによって引き起こされることを明らかにした。本研究の結果より、肝虚血再灌流障害に対する IL-1 β および好中球プロテアーゼを標的とした新たな治療法開発の可能性を示すことができた。

論文審査の結果の要旨

2. 評 価

本学位論文では、肝虚血再灌流障害の病態において、IL-1 β が重要なサイトカインであり、肝臓に浸潤した好中球がインフラマソーム非依存性の IL-1 β 産生を制御するのではないかという仮説を立てて、マウスを用いた *in vivo* 実験と *in vitro* 実験を行った。その結果、肝虚血再灌流障害では、インフラマソーム非依存性に好中球プロテアーゼがマクロファージ由来の pro-IL-1 β をプロセシングし、これによって放出された IL-1 β が炎症惹起と組織傷害に寄与することが明らかとなった。また、セリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF をマウスに投与することで肝虚血再灌流刺激による IL-1 β 産生が減少し、肝障害が軽減することを証明した。これまで肝虚血再灌流障害における AEBSF の肝障害軽減効果についての報告はなく、肝虚血再灌流障害の予防や治療法につながる可能性を初めて示した貴重な研究である。

研究目的、実験デザインも明確で、インフラマソーム非依存性 IL-1 β プロセシング仮説の解明という独創性のあるテーマであり、学位授与に相応しい論文内容であると、審査員一同判断した。論文の修正点として、①「はじめに」の部分に、研究に至る背景、肝虚血再灌流障害の病態、インフラマソームの総論的な説明を追記すること、②仮説を明確にするためにシェーマを加えること、③「考察」の部分で、本研究での新規性の部分を明確化すること、④本研究の課題や今後の展望、本研究の臨床応用や他の疾患の病態解明への発展性を加筆すること、⑤一部、病理所見の図を拡大すること、などを依頼した。

最終試験の結果の要旨

2. 評 価

本審査に関する諮問では、肝虚血再灌流障害におけるシグナルの機序、実験モデルの作成方法と評価ポイントの設定、好中球プロテアーゼの発現機序、過去の同様な研究結果との矛盾点、研究の発展性と臨床応用などに関する質問がなされた。その受け答えは的確であり、この実験系の限界をふまえた上で妥当な結論を導いていた。その後の審査員の指摘に対する修正も適切であり、十分な学識を有することが伺えた。

以上より、本論文の申請者は、本学の学位授与に値すると審査員全員により判断した。