

目次

略語一覧	1
1. はじめに	1
2. 実験材料と方法	4
2-1. 使用動物	
2-2. 腸管虚血再灌流モデルの作成	
2-3. 組織学的解析	
2-4. 血清 LDH 及び肝・腎機能測定	
2-5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法	
2-6. Real-time RT-PCR 法	
2-7. 好中球除去マウスの作成	
2-8. エバンスブルー色素漏出試験	
2-9. 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の解析	
2-10. 動脈血酸素飽和度の測定	
2-11. 骨髄移植モデルの作成	
2-12. 肺血管内皮細胞の単離と培養	
2-13. J774 細胞培養	
2-14. ウェスタンブロット法	
2-15. 脂質メディエーターの解析	
2-16. 臨床サンプルの解析	
2-17. 統計学的解析	

3. 結果	18
3-1. 再現性の高い新規腸管 I/R モデルの確立	
3-2. 腸管 I/RI における NLRP3 インフラマソームの役割	
3-3. 腸管障害及び血清 LDH、炎症性サイトカインの評価	
3-4. 腸管 I/R に続発する遠隔臓器障害の評価	
3-5. 続発性肺障害における NLRP3 と好中球の役割	
3-6. NLRP3 欠損による肺障害の軽減効果	
3-7. NLRP3 欠損による肺血管透過性亢進の抑制効果	
3-8. 続発性肺障害における肺血管内皮細胞の役割	
3-9. 腸管 I/R 由来の脂質メディエーターの役割	
4. 考察	39
5. おわりに	43
6. 謝辞	45
7. 参考文献	46

略語一覽

ACTB: actin beta

ALT: alanine aminotransferase

ARDS: acute respiratory distress syndrome

AST: aspartate transaminase

ATP: adenosine triphosphate

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

BALF: bronchoalveolar lavage fluid

BSA: bovine serum albumin

BUN: blood urea nitrogen

CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2
= monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CXCL1: chemokine (C-X-C motif) ligand 1
= keratinocyte-derived chemokine (KC)

CXCL2: chemokine (C-X-C motif) ligand 2
= macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)

CXCL5: chemokine (C-X-C motif) ligand 5

Cr: creatinine

EMR1: EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 1
= Cell surface glycoprotein F4/80

FBS: fetal bovine serum

Gr-1: granulocyte-differentiation antigen-1

HE: hematoxyline-eosin

HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid

HODE: hydroxyoctadecadienoic acid

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal

HMGB1: high mobility group box 1

HRP: horseradish peroxidase

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1

IL-1 β : interleukin-1 beta

IL-6: interleukin-6

IL-18: interleukin-18

iNOS: inducible nitric oxide synthase

I/R: ischemia-reperfusion

I/RI: ischemia-reperfusion injury

LC/MS: liquid chromatography-mass spectrometry

LDH: lactate dehydrogenase

LOX: lipoxygenase

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: mitogen-activated protein kinase

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family
pyrin domain-containing 3

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

PBS: phosphate buffered saline

PVDF: polyvinylidene difluoride

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

RNA: ribonucleic acid

ROS: reactive oxygen species

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TNF- α : tumor necrosis factor alfa

TM: thrombomodulin

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

WT: wild-type

第1章 はじめに

腸管虚血再灌流障害（ischemia-reperfusion injury: I/RI）は、急性腸間膜虚血症や腸管捻転、外傷、出血性ショック、絞扼性イレウス、小腸移植など様々な原因によって引き起こされる¹。臨床現場では、これらの疾患に対して緊急手術を行い、血流不良な部位を切除し吻合することで機能を再建する場合が多い。しかし消化器外科医として手術を積み重ねる中で、虚血に陥った腸管を再灌流させた時に、急激な呼吸状態悪化を伴う循環動態の変化を経験することが時にある。腸管 I/RI の研究においても、腸管障害だけではなく、続発性の遠隔多臓器障害（特に肺障害）をきたす事がこれまで報告されている²。腸管 I/R に続発する急性肺障害は、炎症性サイトカインの放出、好中球などの炎症細胞浸潤、活性酸素種の産生、虚血腸管から放出された腸内細菌由来のエンドトキシンなどによる過剰な炎症反応が原因とされるが^{3,4}（図1）、その詳細な分子機構は不明であり、有効な治療法も確立されていないため、病態の解明は重要な課題である。

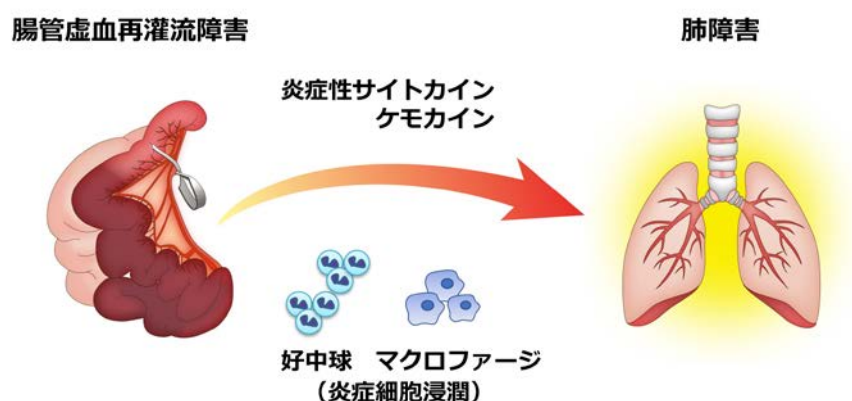


図1. 腸管 I/R に続発する ALI の病態

近年、様々な疾患において細胞質内の蛋白複合体である NLRP3 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になってきた⁵⁻⁸。NLRP3 インフラマソームは、パターン認識受容体である NLRP3 の他に、アダプター分子の ASC、IL-1 β 変換酵素としても知られている Caspase-1 から構成される。細胞質内で NLRP3 インフラマソームが形成されると、Caspase-1 の活性化を介して、IL-1 β 前駆体が切断される。IL-1 β は切断されることで成熟型へと変換され、成熟型 IL-1 β が細胞外に分泌されることによって周囲の組織に炎症反応を引き起こす。これまで、痛風の原因である尿酸結晶や傷害細胞から放出される ATP などの様々な危険シグナルが、NLRP3 インフラマソームを活性化して様々な病態に関与していることが報告されている⁹⁻¹⁴。心臓、肝臓、腎臓の I/RI においても、NLRP3 インフラマソームが炎症惹起に深く関与していることが報告されているが^{9, 15, 16}、腸管 I/RI における役割は不明である。本研究では、腸管 I/RI 及び続発する遠隔臓器障害に NLRP3 インフラマソームが関与していると考え、この仮説を証明するために、再現性の高い新たな動物モデルを作成し、インフラマソーム構成分子である NLRP3、ASC、Caspase-1/11 及び IL-1 β の欠損（^{-/-}と表記）マウスを用いて検討を行った。

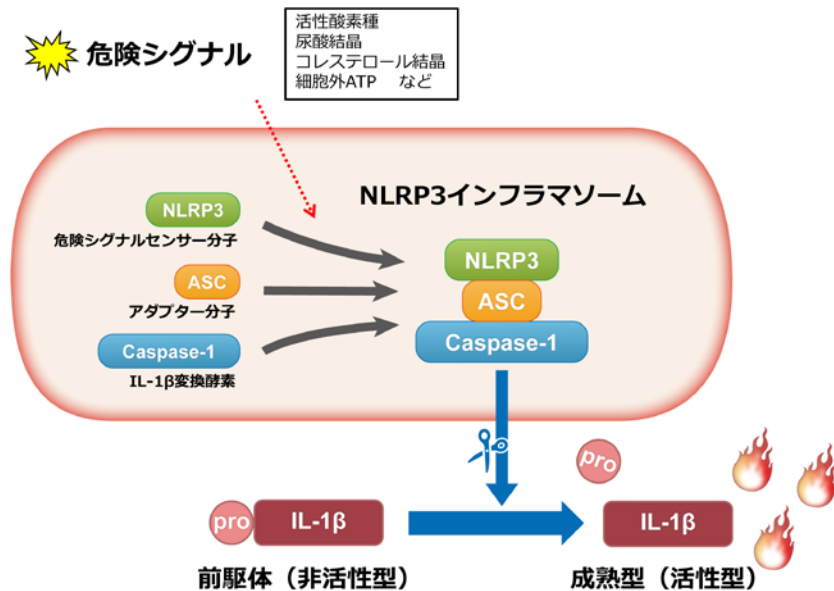


図 2. NLRP3 インフラマソーム

活性酸素種や尿酸結晶、コレステロール結晶、細胞外 ATP などの危険シグナルにより NLRP3、ASC、Caspase-1 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、Caspase-1 の活性化が引き起こされ、IL-1β 前駆体を切断して成熟化された IL-1β が細胞外へ分泌されることで、炎症が惹起される。

第2章 実験材料と方法

2-1. 使用動物

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）に従って施行した。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^{-/-}マウスは、Dr. Vishva M. Dixit (Genentech, CA)、ASC^{-/-}マウスは谷口 俊一郎先生（信州大学）、Casp1/11^{-/-}マウスは筒井 ひろ子先生（兵庫医科大学）、IL-1 β ^{-/-}マウスは岩倉 洋一郎先生（東京理科大学）の好意により提供され、実験に使用した。詳細は省略するが以前の報告に記載された方法¹⁷⁻²¹で作成され、少なくとも12世代以上は C57BL/6J マウスとバッククロスを行った。すべてのマウスは C57BL/6J の遺伝的背景を有しており、8-12 週齢の個体を実験に用いた。

2-2. 腸管虚血再灌流モデルの作成

雄性マウスを使用した。マウスをイソフルランによる吸入全身麻酔下に仰臥位とし、四肢を牽引してコルクボードに固定、腹部を除毛した後、70%エタノールで消毒した。腹部正中に約 1 cm の小切開をおき開腹、腹壁を左右に牽引した。綿棒を使用し、愛護的に腸管を腹壁外に誘導後、小腸間膜を捻れなく展開した（図 3a）。上腸間膜動静脈を中心軸として、腸間膜を扇状に折り畳み、腸間膜基部背側に綿棒を入れ、クリップ装着のための場を作成した（図 3b）。ステンレス製血管クリップ (Fine Science Tools, CA, USA) を用いて、上腸間膜動静脈、腸間膜、腸管の辺縁動静脈

を損傷なく一括でクランプした (図 3c,d)。腹腔内に温生食 1 ml を投与後に閉腹し、保温したイソフルラン麻酔箱にマウスを移動した。60 分間の虚血後、マウスを麻酔箱から取り出して血管クリップを外し、再灌流を開始した。再灌流時、血栓形成により腸管への再灌流が乏しく、腸管の色調の改善を認めなかったマウスについては解析から除外した (約 2%)。温生食 1 ml を腹腔内に投与し、結節縫合で閉腹後、飼育ケージに戻した。

Sham 手術群は、腹部を正中切開、腸間膜の露出のみ行った。マウスは、設定した時間で安楽死させ、血液、腸管、肺、肝臓、腎臓、心臓を採取し解析に用いた。

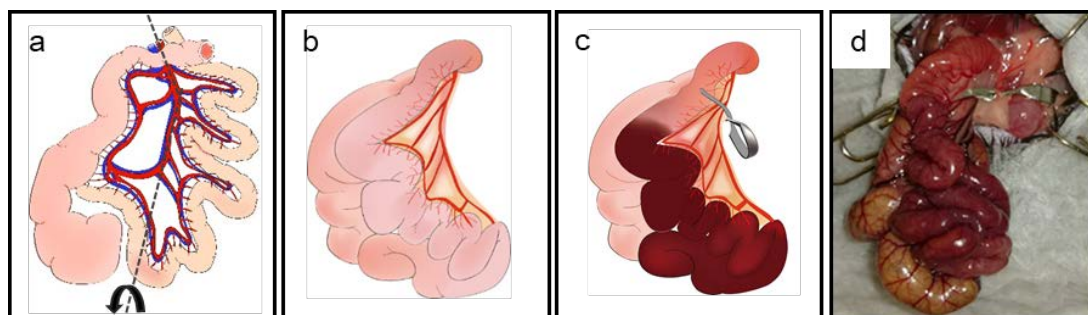


図 3. 腸管虚血再灌流モデルの作成

- a. 上腸間膜動静脈の軸を中心に捻れなく腸間膜を展開
- b. 上腸間膜動静脈を中心をして腸間膜を折りたたむ
- c, d. 辺縁動静脈も一括でクランプする

2-3. 組織学的解析

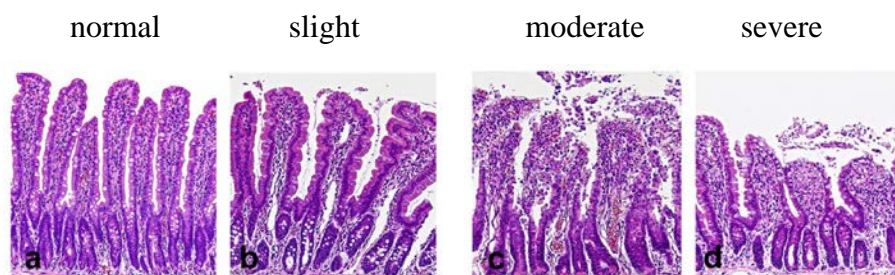
イソフルラン麻酔下に心臓採血を行った後、安楽死させ、腸間膜基部を腸管ごと切断し、摘出した。腸間膜を愛護的に腸管から切除し、腸間膜対側を腸管の長軸方向に開放した。10%ホルマリン液に3分浸透させ、半固

定を行った後、腸管を同心円状に巻きつけ10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋した。腸管組織切片は5 μm厚で作成しHematoxylin-eosin (HE)染色を行った。

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 μm厚で作成しHE染色を行った。

腸管障害の定量化 [文献22]

- 1.400倍率の視野でvilli（絨毛）の数をカウントする（20-25視野）
- 2.各villiの障害を4つのカテゴリに分類する



※参考文献 22 から引用

3. 以下の計算式でsevere damageの割合を算出

$$\frac{\text{Number of villi with severe damages}}{\text{The total number of villi counted}} = \% \text{ Severe damage}$$

肺障害の定量化 [文献3]

1. 下記の1～3のパラメータに対して0～3のスコアを算出した

2. 3つのスコアの合計（0～9）で肺障害を評価した

Parameters	score	
1. Periluminal infiltrates (airway/ vessels)	0	no infiltrate
	1	1-3 cell layers
	2	4-10 cell layers thick
	3	>10 cell layers thick
2. Pneumonitis (alveolar/ interstitial)	0	no infiltrate
	1	infiltrating cells were evident only at high magnification
	2	infiltrating cells were easily observed
	3	lung consolidation by inflammatory cells was evident
3. Percentage of affected lung tissue	0	0%
	1	5-25%
	2	26-50%
	3	>50%

2-4. 血清 LDH 及び肝・腎機能測定

マウス心臓から採血した血液をキャピジェクト (テルモ、東京、日本) に回収、遠心分離した。分離した血清を測定用のスライドに滴下し、Fuji-drychem (富士フイルム、東京、日本) を用いて測定した。腸管障害の間接的指標として lactate dehydrogenase (LDH)、肝機能測定には、alanine aminotransferase (ALT) と aspartate aminotransferase (AST) を、腎機能測定には、blood urea nitrogen (BUN) と creatinine (Cr) を用いた。

2-5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

血清、組織、気管支肺胞洗浄液中の mouse IL-1 β 、mouse TNF- α 、mouse IL-6 及び血清中の mouse HMGB1、mouse citrullinated (Cit)-Histone H3 は各 ELISA キット (mouse IL-1 β (Mouse IL-1 β /IL-1F2 DuoSet, No.DY401; R&D Systems, MN)、mouse TNF- α (Mouse TNF- α DuoSet, No.DY410; R&D Systems)、mouse IL-6 (Mouse IL-6 DuoSet, No.DY406; R&D Systems)、mouse HMGB1 (HMGB1 ELISA Kit II (Shino-Test, Tokyo, Japan)、mouse citrullinated (Cit)-Histone H (EpiGentek Group Inc., NY) を用いて測定した。各サイトカインに対する固相用抗体をプレートに吸着させた後、1%BSA 溶液によりブロッキングを行った。血清または培養上清サンプルと各標準溶液を室温で3時間反応させた。次に二次抗体を室温で3時間反応させた後、ストレプトアビジン-HRP 溶液を反応させた。その後 Tetramethylbenzidine を基質とした基質反応液 (R&D Systems) を使用して発色させ、2N 硫酸で反応を停止させた。450 nm の吸光度を測定、標準溶液を基準として濃度を算出した。

2-6. Real-time RT-PCR 法

回収した回腸末端及び右心室より PBS で還流・脱血後の肺組織より ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Toyama) を用いて RNA を抽出した。Superscript VILO™ cDNA Synthesis Kit (life technologies, MD) を用いて逆転写を行い、cDNA とした。逆転写は 25°C、10 分、続いて 42°C、60 分で反応させ、85°C、5 分保温して反応を停止させた。合成した cDNA は SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., Shiga)、Takara TP960 PCR Thermal Cycler Dice Detection System (Takara Bio Inc., Shiga) を用いて mRNA を検出した。PCR 条件は 95°C、30 秒の前反応後、2-step PCR (95°C、5 秒)、アニーリング・伸長反応 (60°C、30 秒) を 40 サイクルとして行った。内部標準 (Actb を使用) に対する目的の mRNA の比を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて計算した。結果は、WT マウス、またはコントロールマウスの sham 手術群に対する割合で示した。

Name	5'-3' sequence	
	Forward primer	Reverse primer
NLRP3	CGAGACCTCTGGGAAAAAGCT	GCATACCATAGAGGAATGTGATGTACA
ASC	GCTGAGCAGCTGCAAACGAC	ACTTCTGTGACCCTGGCAATGAG
Caspase-1	GATGGCACATTTCCAGGACTGA	TGTTGCAGATAATGAGGGCAAGAC
IL-1 β	TGAAGTTGACGGACCCCAAA	TGATGTGCTGCTGTGAGATT
IL-18	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA	TCTGACATGGCAGCCATTGT
TNF- α	GTTCTATGGCCCAGACCCTCAC	GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG
IL-6	ACAACCACGGCCTTCCCTACTT	CACGATTTCCCAGAGAACATGTG
Gr-1	TGCTCTGGAGATAGAAGTTATTGTG	TTACCAGTGATCTCAGTATTGTCCA
EMR1	CCTGGACGAATCCTGTGAAG	GGTGGGACCACAGAGAGTTG
CCL2	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAAC	GCCTACTCATTGGGATCATCTTG
CXCL1	GCTGGGATTACCTCAAGAA	TCTCCGTTACTTGGGGACAC
CXCL2	CGCTGTCAATGCCTGAAG	GGCGTCACACTCAAGCTCT
CXCL5	TGCCCTACGGTGGAAGTCATA	TGCATTCCGCTTAGCTTTCTTT
iNOS	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG	GAAGCGTTTCGGGATCTGAA
ICAM-1	CCGCAGGTCCAATTCACACT	CAGAGCGGCAGAGCAAAAG
VCAM-1	TGAACCCAAACAGAGGCAGAGT	GGTATCCCATCACTTGAGCAGG
TM	CTTGTGCAATAGGAGCACGA	GACACAAAAATGCTCGCAGA
PAI-1	GACACCCTCAGCATGTTTCATC	AGGGTTGCACTAAACATGTCAG
Actb	CACAGCTTCTTTGCAGCTCCTT	AGCGCAGCGATATCGTCAT

表 1. プライマー配列

2-7. 好中球除去マウスの作成

好中球除去のため、抗 Gr-1 抗体を産生するハイブリドーマ細胞 (clone RB-8C5, Dr. R.Coffman, DNAX Research Institute から提供) から精製した抗体を使用した²³。作製した抗 Gr-1 抗体 50 µg/匹を手術 24 時間前に腹腔内投与した。コントロール群として isotype control 抗体 50 µg/匹を投与した。

2-8. エバンスブルー色素漏出試験

肺の血管透過性を評価するために、腸管 I/R の 11 時間後に、30%イソフルラン麻酔下に PBS に溶解した 30 mg/kg のエバンスブルー色素液を内頸静脈より注入した。1 時間後にマウスを安楽死させ、右心室より還流・脱血を行い、血管内のエバンスブルー色素液を取り除いた後、肺を摘出した。摘出肺は撮影後、ホルムアミド 500 µL を添加し、55 °C で 24 時間静置しエバンスブルー色素を抽出した。その後 1000 rpm、10 分で遠心し上清を回収した。620 nm の吸光度を測定し、標準溶液を基準としてエバンスブルー色素量を算出した。得られた値は肺重量で除し、定量化した。

2-9. 気管支肺胞洗浄液 (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 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°C で遠心した。遠心後の上清は上記の方法でサイトカイン濃度を測定した他、蛋白濃度を BCA

Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., MA)で測定した。

2-10. 動脈血酸素飽和度の測定

Mouse OX pulse oximeter (Starr Life Science, Oakmont, PA)を用いて、覚醒下に動脈血酸素飽和度を測定した。測定 1 日前に、除毛クリームを用いてマウスの頸部の除毛を行い、用手保持しながら覚醒下にセンサーを装着し、Mouse OX software で記録と解析を行った。

2-11. 骨髄移植モデルの作成

マウスの大腿骨と腓骨を取り出し、キムワイプで毛、皮膚、筋肉を除去した後、Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich Co., USA) 入り Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Wako, Japan) に室温で 10 分間浸し殺菌した。下肢骨の両端を切除し、PBS でフラッシュし骨髄細胞を回収した。赤血球は低張性の ACK buffer を加え溶血させた。その後 PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を準備した。6 週齢のレシピエントマウスを準備し、移植前に 9 Gy のガンマ線全身照射を行った後、頸静脈より 2×10^6 cells の骨髄細胞を移植した。Green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスを用いた予備検討を行った結果、移植 8 週後の末梢血細胞では 90%以上が GFP 陽性細胞であることをフローサイトメトリー法にて確認済みである²⁴。このプロトコールに従い、計 4 種類の骨髄移植モデルを作成した。

Donor	Recipient	Chimera mice
Wild type	Wild type	BMT ^{WT→WT}
Wild type	NLRP3 ^{-/-}	BMT ^{WT→NLRP3^{-/-}}
NLRP3 ^{-/-}	Wild type	BMT ^{NLRP3^{-/-}→WT}
NLRP3 ^{-/-}	NLRP3 ^{-/-}	BMT ^{NLRP3^{-/-}→NLRP3^{-/-}}

表 2. キメラマウスの作成

2-12. 肺血管内皮細胞の単離と培養

肺血管内皮細胞の単離に以下の機器と試薬を用いた。

1. Gentle MACS Dissociator (Miltenyl Biotec)
2. Gentle MACS C tubes (Miltenyl Biotec #130-093-237)
3. Lung Dissociation Kit (Miltenyl Biotec #130-095-927)
 - 3-1. Buffer S
 - 3-2. Enzyme D
 - 3-3. Enzyme A
4. CD45MicroBeads, mouse (Miltenyl Biotec #130-052-301)
5. CD31MicroBeads, mouse (MiltenylBiotec #130-097-418)
6. LS-column (MiltenylBiotec#130-042-401)
- 7.低張性 ACK lysing buffer: NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 1.0mM, EDTA 0.01mM
8. MACS buffer:0.5%BSA (Biotin-free), 2 mM EDTA/PBS
9. Cell strainer (70 μm)

肺を右心室から10 mLのPBSで還流脱血した後、摘出した。摘出後、冷PBS中で可能な限り周囲の結合組織を外し、調整したEnzyme Mix (Buffer S: 4.8 mL、Enzyme D: 200 μ L、Enzyme A: 30 μ L/5 mouse) と共にGentle MACS Cチューブに入れた。Gentle MACS Dissociatorにセットし、「m_lung_01」プログラムで撹拌した後、37°Cで30分間振盪しながらインキュベートした。再度Gentle MACS Dissociatorにセットし、「m_lung_02」プログラムで粉碎した後、1500rpm、3分、4°Cで遠心した。得られたペレットを10 mLのBuffer Sで再懸濁し、Cell strainer (70 μ m)を通して低張性ACK bufferで溶血処理を行った。MACS bufferを加え中和し、1500rpm、5分、4 °Cの遠心を3回繰り返す、再度Cell strainer (70 μ m)を通して遠心した。その後LS-columnとCD45MicroBeads、CD31MicroBeadsを用いた磁気細胞分離法で、順にCD45、CD31のセレクションを行い、CD45陰性CD31陽性のフラクションを肺血管内皮細胞として回収した。

肺血管内皮細胞の培養には以下の試薬を用いた。

1. Advanced DMEM/F12 media (Thermo Fisher Scientific, #1320033)
2. Endothelial cell supplement (Sigma-Aldrich, #E2759), final conc. 50 μ g/mL
3. FBS, 20%
4. Antibiotic-Antimycotic 100 \times solution (ABAM), 1%
5. 1M HEPES buffer (Invitrogen, #15630-080), final conc. 10 mM
6. 50 mM SB431542 small molecule (R&D, #1614), final conc. 5 μ M
7. 50 mg/ml Heparin (Sigma-Aldrich, #3149-100 KU), final conc. 50 μ g/ml
8. Non-essential Amino Acids (Life technologies, #11140050), 1%

上記の磁気分離法で回収したCD45陰性CD31陽性細胞を、ゼラチンコートのディッシュに播種し調整したメディウムを用いて培養した。培養開始後72～96時間で1回目の継代を行い、その後24時間間隔で継代を続け、3～5継代の細胞を実験に使用した。

2-13. J774細胞培養

J774 (mouse macrophage) 細胞株は、理研細胞バンク (Tsukuba, Japan) から購入した。J774は10% FBS含有のRPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) で培養した。

2-14. ウェスタンブロット法

初代培養肺血管内皮細胞及び J774 細胞より RIPA バッファーを用いて蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質は Laemmli サンプルバッファーを加えて 95°C、5 分間処理し、SDS-PAGE で分離後、PDVF 膜へ転写した。転写後の PDVF 膜を Blocking One (Nacalai Tesque, Kyoto) で室温、1 時間ブロッキングし、4°C、over night で各 1 次抗体を処理した。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、Western blot Ultra Sensitive HRP Substrate (Takara Bio Inc., Shiga) で化学発光させ、Amersham Imager 680 (GE healthcare Life Sciences, NJ) を用いてバンドの検出を行った。β-actin を内在性コントロールとして使用した。

使用抗体

	抗体	製造元
1 次抗体	NLRP3	Adipogen
	ASC	Adipogen
	Caspase-1	Adipogen
	IL-1 β	R&D System
	VE-cadherin	Abcam
	β -actin	Sigma-Aldrich
2 次抗体	HRP-goat anti-mouse IgG	Invitrogen
	HRP-goat anti-rabbit IgG	Zymed Laboratories Inc.
	HRP-rabbit anti-goat IgG	Invitrogen

< 試薬組成 >

RIPA Buffer: 20 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X, 10% glycerol, 1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM NaF, and 10 mM Na₄P₂O₇·10H₂O

2-15. 脂質メディエーターの解析

I/R 後の門脈血を採取し、血漿を分離してサンプルとし解析まで−80℃で保存した。LC/MS 解析は既報を参考にした²⁵。血漿サンプル (30 μ L)を内部標準と混合し、0.1%ギ酸を含むメタノールで抽出した。分離したメタノール相を Strata X polymer reversed phase column (33 μ m, 10 mg; Phenomenex, Torrance, CA)を用いて抽出した。カートリッジを 0.1%ギ酸、15%エタノール、石油エーテル各 1 mL で洗浄した後、0.1 %ギ酸を含むメタノール 300 μ L で脂質を溶出した。溶解液を蒸発させ、30 μ L のメタノー

ルに再構成した。抽出した脂質を、LC-MS-8060 (Shimadzu, Kyoto)を用いて解析し、脂質メディエーターバージョン 2 ソフトウェアパッケージ (Shimadzu)を用いて分析した。Deuterium-labeled 6-keto prostaglandin F1 α -d4、prostaglandin F2 α -d4、prostaglandin E2-d4、prostaglandin D2-d4、Leukotriene B4-d4、15(S)-HETE-d8、12(S)-HETE-d8、5(S)-HETE-d8、PAF C-16-d4、oleoyl ethanolamide-d4 は、Cayman Chemical (An Arbor, MI) から購入し、内部標準として使用した。

2-16. 臨床サンプルの解析

自治医科大学附属病院を受診した緊急手術が必要な腸管虚血症患者 6 人（男性 3 人、女性 3 人）を登録した。同時期に 6 人の健常人をコントロール群として登録した。各患者及び健常人の血清サンプルを、解析まで -80°C で保存した。これらの研究は自治医科大学の臨床研究倫理審査委員会の許可を得て施行した（臨 A17-068）。全ての登録者に対して、研究についての説明を行い文章による同意を得た。

2-17. 統計学的解析

数値データは、平均値 \pm 標準誤差で表示した。独立 2 群間の比較には Mann-Whitney 検定を、多群間比較には一元配置分散分析法と Kruskal-Wallis 検定を用いた。統計解析は Graphpad prism 7 (Graphpad Software, CA, USA) を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

第3章 結果

3-1. 再現性の高い新規腸管 I/R モデルの確立

これまで腸管 I/RI の研究は、目的に応じて様々な方法が用いられてきた^{26,27}。その中でも上腸間膜動脈をクランプするモデルが最も一般的な方法であるが、再現性に乏しく、信頼性にかけるという報告があり、様々な工夫が試みられてきた^{26,27}。我々は再現性の高い腸管 I/R モデルを作成するために、上腸間膜動静脈を軸として腸間膜を折り畳み、辺縁動静脈を一緒にクランプする新たな方法を確立した (図 4A)。この方法を用いて、条件検討を行ったところ、60 分以上の虚血が致死的条件であった (図 4B)。腸管障害の間接的指標として用いた血清 LDH 値は 4 時間でピークとなり、以後漸減した (図 4C)。これらの結果より、虚血時間は 60 分とし、再灌流 4 時間でサンプリングを行う方針とした。

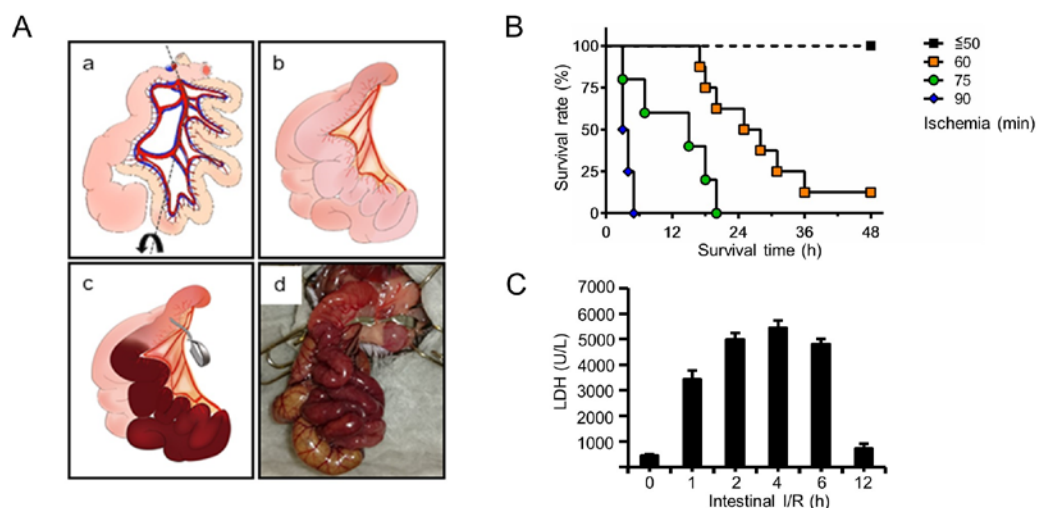


図 4. 新規腸管 I/R モデルの確立

(A) WT マウスを用いて新規腸管 I/R モデルを確立した。(B) 至適虚血時間を検討した (n = 4-8 匹)。(C) 再灌流後の経時的な血清 LDH 値を測定した (n = 3-6 匹)

3-2. 腸管 I/RI における NLRP3 インフラマソームの役割

腸管 I/RI における NLRP3 インフラマソームの役割を調べるために、NLRP3^{-/-}、ASC^{-/-}、Caspase-1/11^{-/-}、IL-1 β ^{-/-}マウスを用いて検討したところ、WT マウスと比較して生存期間が延長した (図 5)。これらの結果より、NLRP3 インフラマソーム依存的な IL-1 β が腸管 I/RI において重要な役割を果たしていることが示唆された。以後の検討は、各種欠損マウスの中で最も生存期間が劇的に延長した NLRP3^{-/-}マウスを用いて行った。

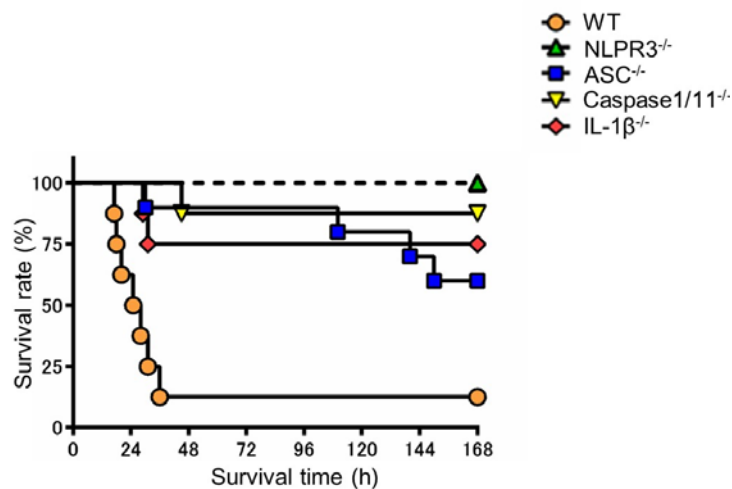


図 5. 腸管 I/RI における NLRP3 インフラマソームの役割

WT マウス、NLRP3^{-/-}、ASC^{-/-}、Caspase-1/11^{-/-}、IL-1 β ^{-/-}マウスにおいて 60 分の虚血後に再灌流を行い生存率を解析した (n = 6-8 匹)。

3-3. 腸管障害及び血清 LDH、炎症性サイトカインの評価

最初に腸管全体の障害を評価したところ、WT マウスに比べて NLRP3^{-/-} マウスでは腸管障害が抑制されていた (図 6A、B)。次に回腸末端における mRNA を解析したところ NLRP3 と ASC の発現は sham に比べて有意に上昇していた (図 7A)。炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 、CCL2、CXCL1/2、CXCL5) や、炎症細胞浸潤マーカー (Gr-1 [好中球マーカー]、EMR1 [マクロファージマーカー]) も同様に上昇を認めたが、Gr-1 を除き WT と NLRP3^{-/-} マウスとの間に差を認めなかった (図 7B)。さらに回腸末端の IL-1 β の蛋白量も sham と比べて有意に上昇していたが、NLRP3^{-/-} との間に差を認めなかった (図 8A)。インフラマソームの活性化に重要な分子である Caspase-1/11 の欠損マウスでも同様の傾向を認めた (図 8B)。

再灌流後 4 時間の血清 LDH 値、IL-1 β 、TNF- α 値も sham に比べて有意に上昇を認めたが、NLRP3^{-/-} マウスとの間に差は認めなかった (図 9A)。肝 I/RI においてインフラマソームを活性化すると報告されている HMGB1 と Histone H3 についても同様に差を認めなかった^{15,28} (図 9B)。

腸管全体の障害には差を認めるが、腸管局所の炎症性サイトカインの発現、血液中の炎症性サイトカイン濃度には差を認めなかったことから、遠隔臓器障害が生存率の差に寄与している可能性を考えた。

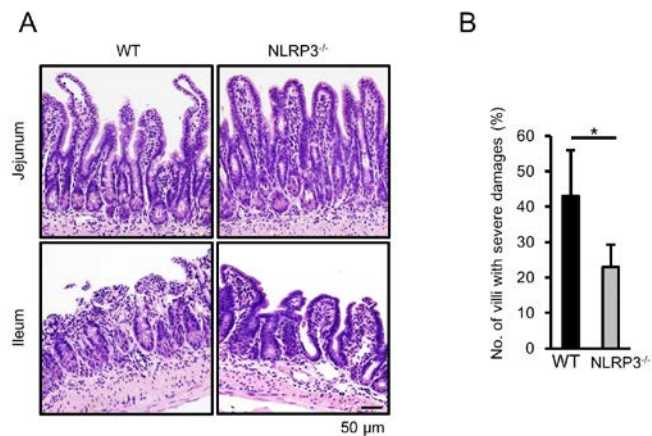


図 6. 腸管全体の障害の評価

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に腸管を採取した。(A) 腸管組織の HE 染色を行った。空腸、回腸の代表的な組織像を示す。

(B) HE 染色における腸管全体の障害を定量化した (n = 6 匹)。* $p < 0.05$ 。

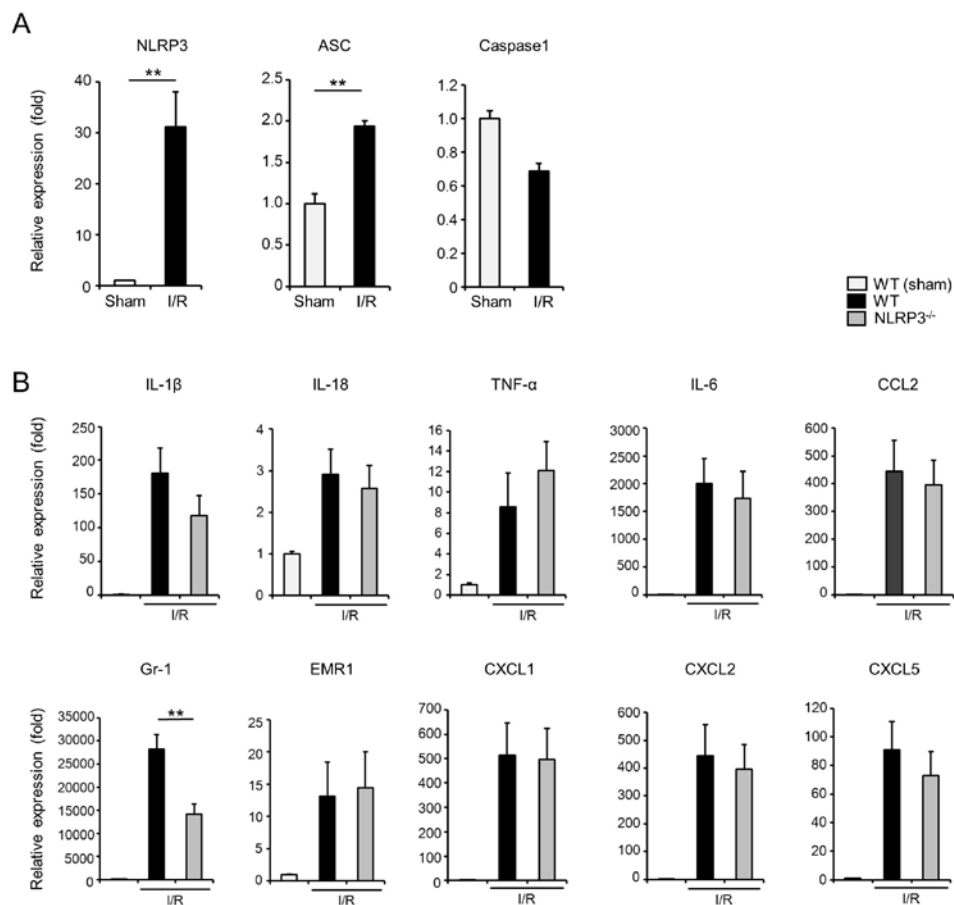


図7. 腸管組織のmRNA発現量

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に回腸末端から 1cm の部位の腸管を採取し、mRNA 発現量を Real-time PCR 法で解析した (n = 6 匹)。***p* < 0.01。

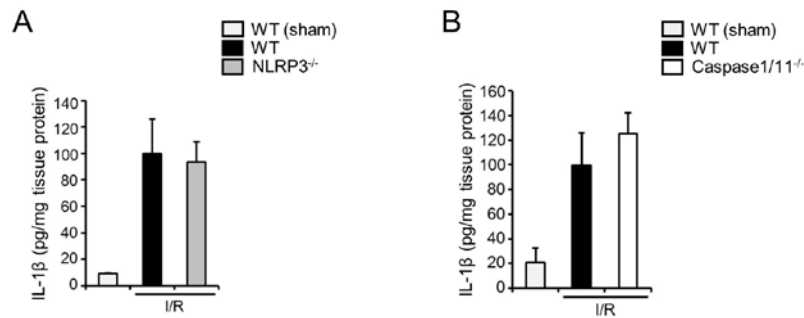


図 8. 腸管組織の IL-1β 蛋白量

WT マウス、NLRP3^{-/-}、Caspase-1/11^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に回腸末端から 1cm の部位の腸管を採取し、IL-1β 蛋白発現量を解析した (n = 6 匹)。

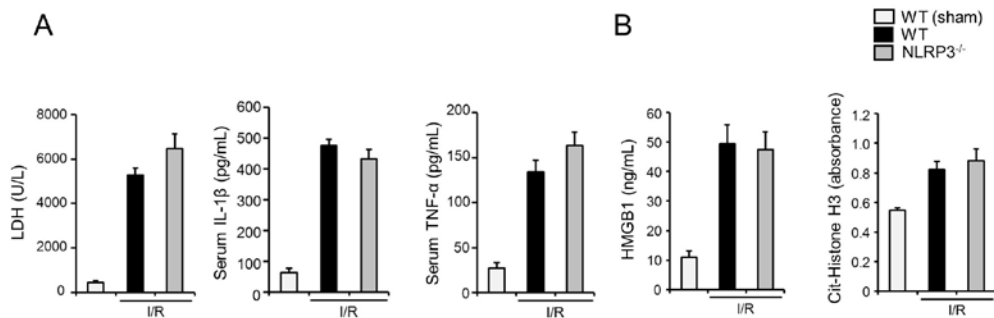


図 9. 血清 LDH と炎症性サイトカイン

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に血清 LDH と各種炎症性サイトカインを測定した。

3-4. 腸管 I/R に続発する遠隔臓器障害の評価

腸管 I/RI は遠隔臓器障害を引き起こすことが知られており²⁹、それらが生存に寄与するという仮説を検討した。生存曲線より、再灌流 12 時間後の心臓、肺、肝臓、腎臓を HE 染色で評価したところ、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、肺障害のみが顕著に抑制されていた (図 10A)。また sham に比べて血清 AST、ALT、BUN、Cr の値が上昇し肝機能・腎機能障害を認めたが、WT と NLRP3^{-/-}マウスの間に差は認めなかった (図 10B)。これらの結果より、腸管 I/RI は遠隔多臓器障害を引き起こし、特に腸管 I/R に続発する肺障害の差が生存の差に寄与していることが判明した。

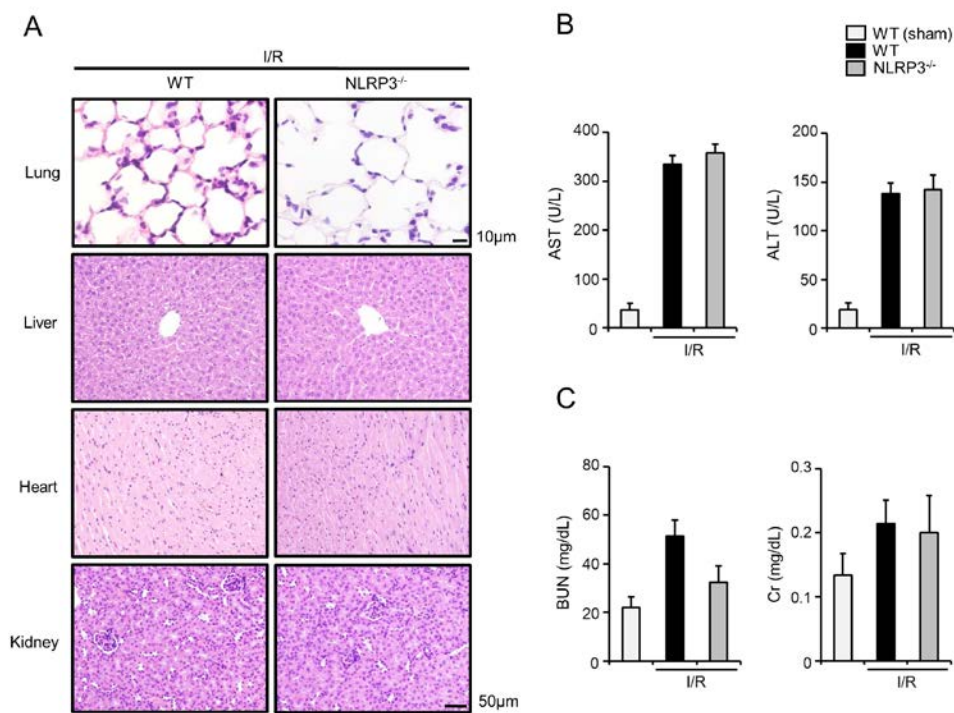


図 10. 腸管 I/R に続発する遠隔臓器障害

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成した。(A) 再灌流 12 時間後に遠隔臓器の HE 染色をおこなった。代表的な組織像を示す。(B) 再灌流 4 時間後に血清 AST、ALT、BUN、Cr を測定した。

3-5. 腸管 I/R に続発する肺障害における NLRP3 と好中球の役割

上記の結果と同様に、WT マウスでは、腸管 I/R 後の肺 HE 染色において、肺泡中隔の肥厚、血管の鬱血、肺泡の浮腫性変化及び炎症細胞の浸潤を認めたが、NLRP3^{-/-}マウスではそれらの所見は軽減され（図 11A）、肺障害スコアも有意に抑制されていた（図 11B）。腸管 I/R に続発する肺障害において NLRP3 インフラマソームの関与を検討するために、肺におけるインフラマソーム関連分子の mRNA 発現を調べたところ、NLRP3 の mRNA の発現が、経時的に上昇し 4 時間後にピークを認めた（図 12A）。さらに、肺に浸潤する炎症細胞に着目し、汎白血球マーカーである CD45、好中球マーカーである Ly6G の肺組織免疫組織化学染色を行ったところ、WT マウスでは sham に比べて、白血球、好中球の浸潤を認めたが、NLRP3^{-/-}マウスではそれらの浸潤が顕著に抑制されていた（図 12B-D）。

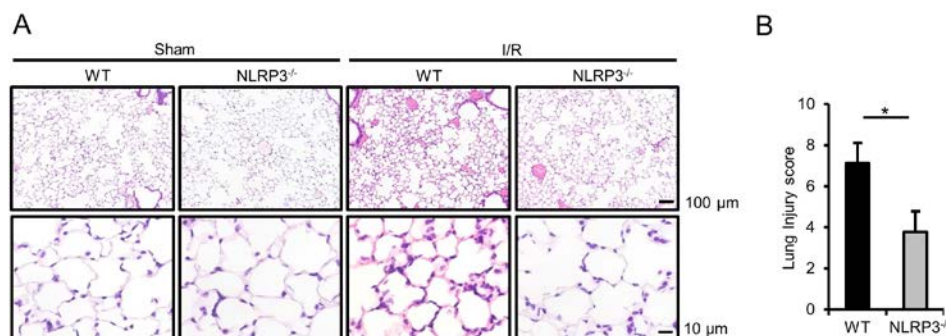


図 11. HE 染色での肺障害の評価

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 12 時間後に肺を採取した。(A) 肺組織の HE 染色を行った。代表的な組織像を示す。(B) 肺障害を Lung injury score で評価した (n = 6 匹)。**p* < 0.05。

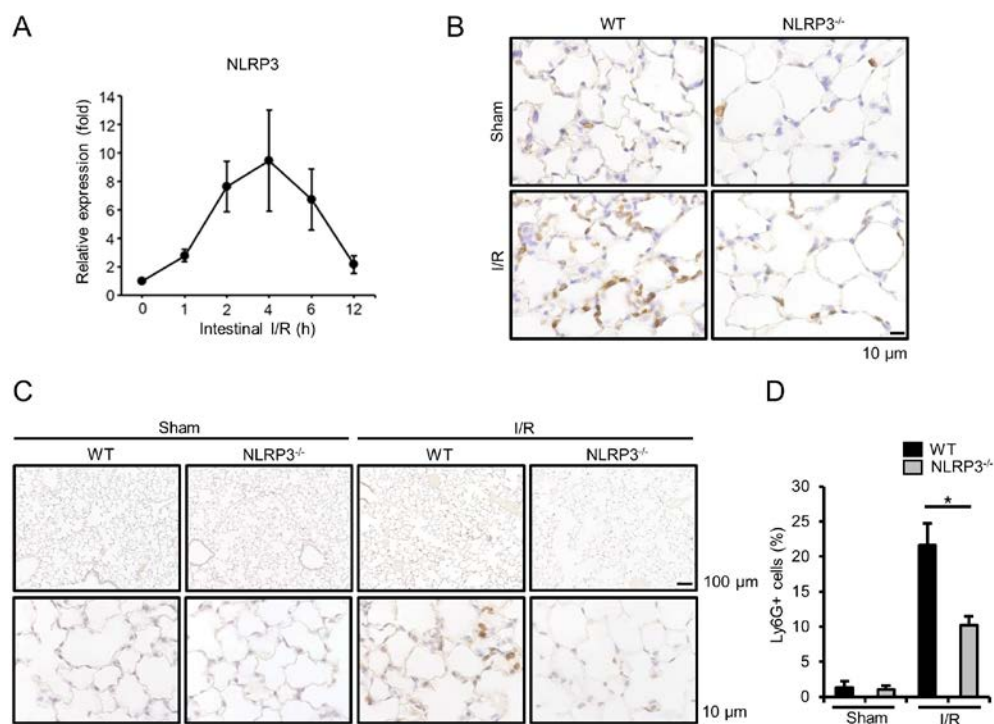


図 12. 肺 NLRP3 の mRNA 発現量の変化と肺障害の免疫組織化学染色

(A) WT マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成し経時的な NLRP3 の mRNA 発現量を real-time PCR 法で解析した (n = 3 匹)。WT マウス、NLRP3^{-/-} マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 12 時間後に肺を採取した。(B) 肺組織の CD45 染色を行った。代表的な組織像を示す。(C) 肺組織の Ly6G 染色を行った。代表的な組織像を示す。(D) Ly6G 陽性細胞数を定量化した (n = 6 匹)。**p* < 0.05。

我々の研究室では、過去に NLRP3 がインフラマソームや IL-1β とは独立して、肝 I/RI や高濃度酸素肺障害モデルにおいて好中球の遊走を制御していることを報告してきた^{30, 31}。腸管 I/RI に続発する肺障害においても著明な好中球の浸潤を認めたことから、好中球除去により病態が改善するという仮説を立てた。しかしながら、予想と反し、抗 Gr-1 抗体投与による生存の延長や続発する肺障害の軽減は認めず (図 13A、B)、腸管 I/RI に続発する肺障害において、好中球の関与はわずかなものであると考えられた。

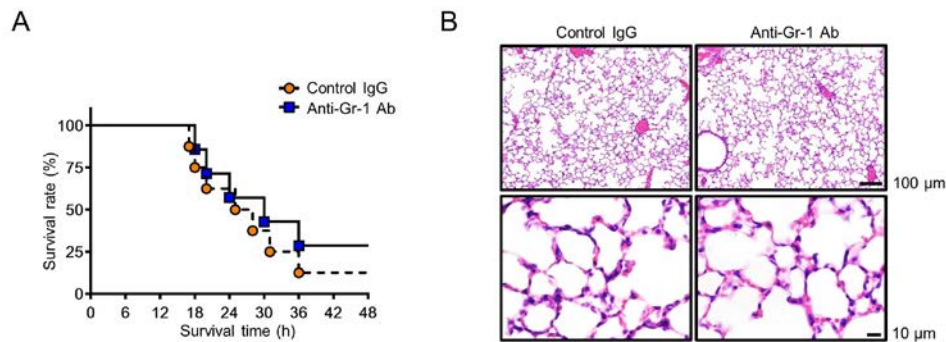


図 13. 腸管 I/R における好中球除去効果

WT マウスに抗 Gr-1 抗体またはコントロール抗体 50μg/匹を腹腔内投与、24 時間後に腸管 I/R 手術を行い、再灌流 12 時間後に肺を採取した。(A) 腸管 I/R 後の生存率を解析した。(B) 肺組織の HE 染色を行った。代表的な組織像を示す。(n = 6-8 匹)。

3-6. NLRP3 欠損による肺障害の軽減効果

NLRP3 欠損により腸管 I/R に続発する肺障害が抑制されたため、肺の mRNA 発現を解析したところ、炎症性サイトカイン(IL-1β、IL-6、IL-18、TNF-α、CCL2、CXCL1/2、CXCL5)や、炎症細胞浸潤マーカー (Gr-1、EMR1) は腸管 I/R により上昇を認めたが、NLRP3^{-/-}マウスで有意に抑制されていた (図 14A)。さらに iNOS や ICAM-1 の mRNA 発現においても、同様の傾向を認めたが、TM や PAI-1 など凝固機能に関わる mRNA の発現には差を認めなかった (図 14B)。次にアポトーシスおよび酸化ストレスを評価するために、cleaved caspase-3 および 4-HNE の免疫組織化学染色を行った。腸管 I/R 後の肺組織において、cleaved caspase-3 陽性細胞は WT、NLRP3^{-/-}マウスともほとんど認めなかったが (図 15A)、4-HNE 陽性細胞は sham に比べて腸管 I/R 後に WT マウスで増加し、NLRP3^{-/-}では有意に抑制されていた (図 15B、C)。以上の結果より、NLRP3 欠損により

腸管 I/R に続発する肺障害において、炎症性サイトカインの発現や酸化ストレスが抑制されることが示された。

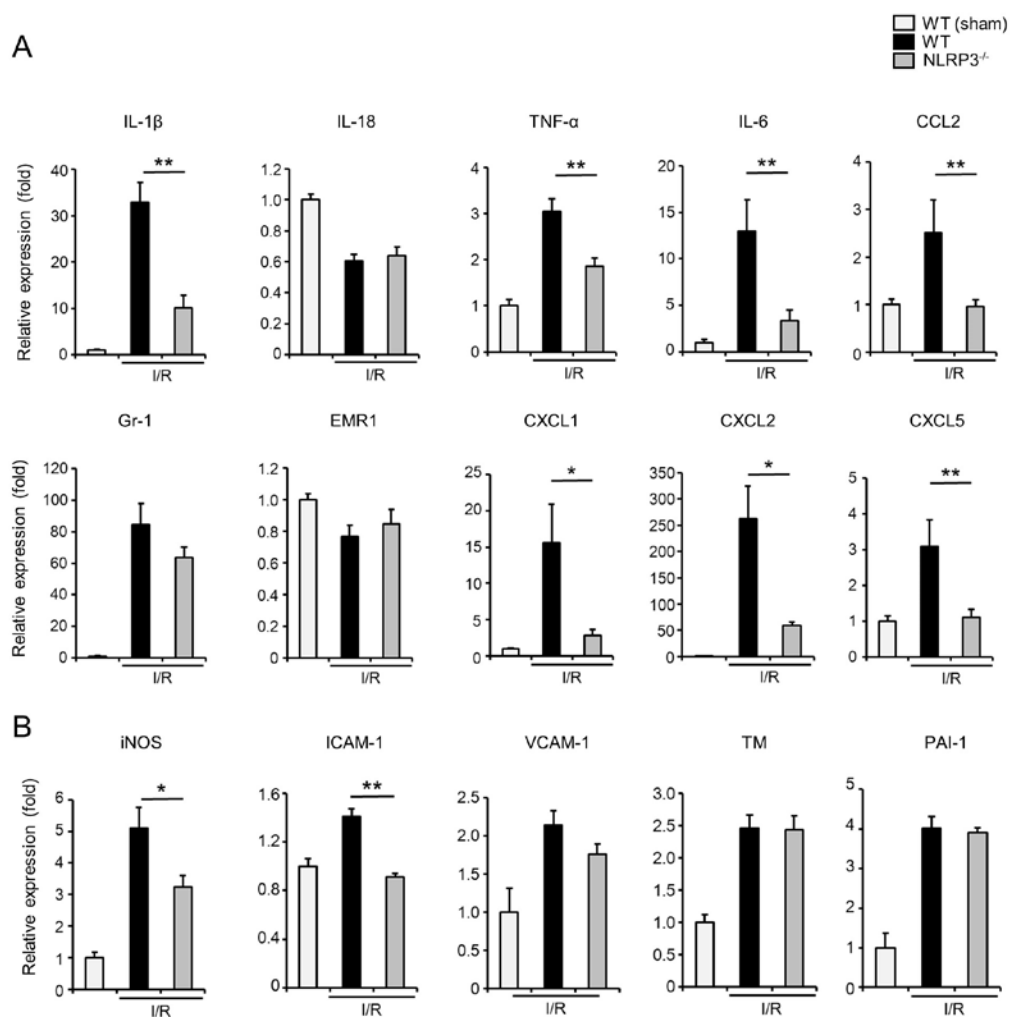


図 14. 肺組織の mRNA 発現量

WT マウス、NLRP3^{-/-} マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に肺を採取し、mRNA 発現量を Real-time PCR 法で解析した (n = 6 匹)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

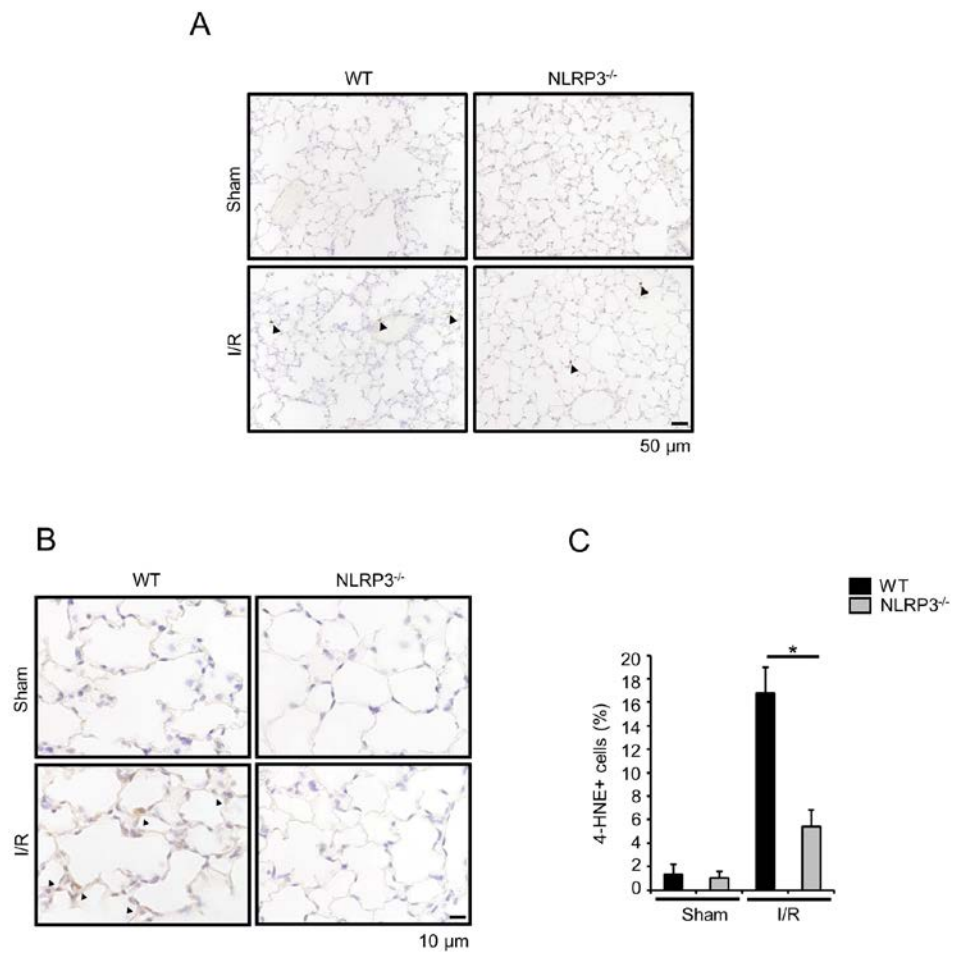


図 15. 肺組織のアポトーシス及び酸化ストレス

WT マウス、NLRP3^{-/-} マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 12 時間後に肺を採取した。(A) 肺組織 cleaved caspase-3 の代表的な組織像を示す。(矢印が cleaved caspase-3 陽性細胞) (B) 肺組織 4-HNE 染色の代表的な組織像を示す。(C) 4HNE 陽性細胞数を定量化した (n = 6 匹)。* $p < 0.05$ 。

3-7. NLRP3 欠損による肺血管透過性亢進の抑制効果

肺血管透過性の亢進は、続発性肺障害の起点となる病態であり、ARDS の特徴的な所見である^{32,33}。肺血管透過性を評価するために、エバンスブルー色素漏出試験を施行したところ、sham に比べて腸管 I/R 後の肺では血管透過性が亢進していたが、NLRP3^{-/-}マウスではほぼ完全に抑制されていた (図 16A、B)。次に動脈血酸素飽和度を測定したところ、再灌流 4 時間後で WT マウスは 95% 以下に低下していたが、NLRP3^{-/-}マウスでは 95% 以上に保たれていた (図 16C)。BALF 中の蛋白濃度も、血管透過性を示す間接的な指標のひとつであるが、同様に NLRP3^{-/-}マウスで有意に抑制されていた。BALF 中の IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 のサイトカイン濃度も NLRP3^{-/-}マウスで抑制されていたが (図 17A)、肺組織中のサイトカイン発現は IL-1 β のみ有意な差をみとめ、TNF- α 、IL-6 は WT と NLRP3^{-/-}マウスの間に差は認めなかった (図 17B)。さらに、Caspase-1/11^{-/-}マウスにおいても、WT と比べて肺障害が軽減され (図 18A)、肺組織中の IL-1 β の蛋白発現は有意に抑制されていた (図 18B)。これらの結果から、腸管 I/R に続発する肺障害において、病態の起点は血管透過性の亢進であり、NLRP3 インフラマソーム依存的な IL-1 β が重要な役割を果たしていることが示された。

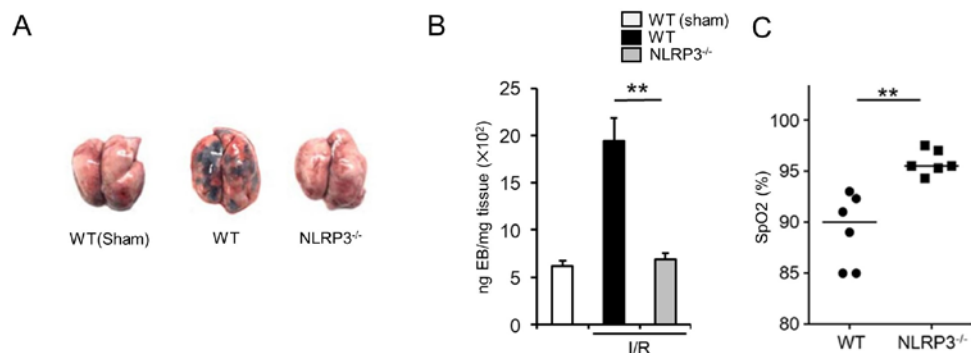


図 16. 肺血管透過性及び動脈血酸素飽和度

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 12 時間後に肺を採取した。肺摘出の 1 時間前に経静脈からエバンスブルーを静注した。(A) 摘出肺の代表的な写真を示す。(B) エバンスブルーの漏出を定量化した (n = 6)。WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に動脈血酸素飽和度を評価した (n = 6)。***p* < 0.01。

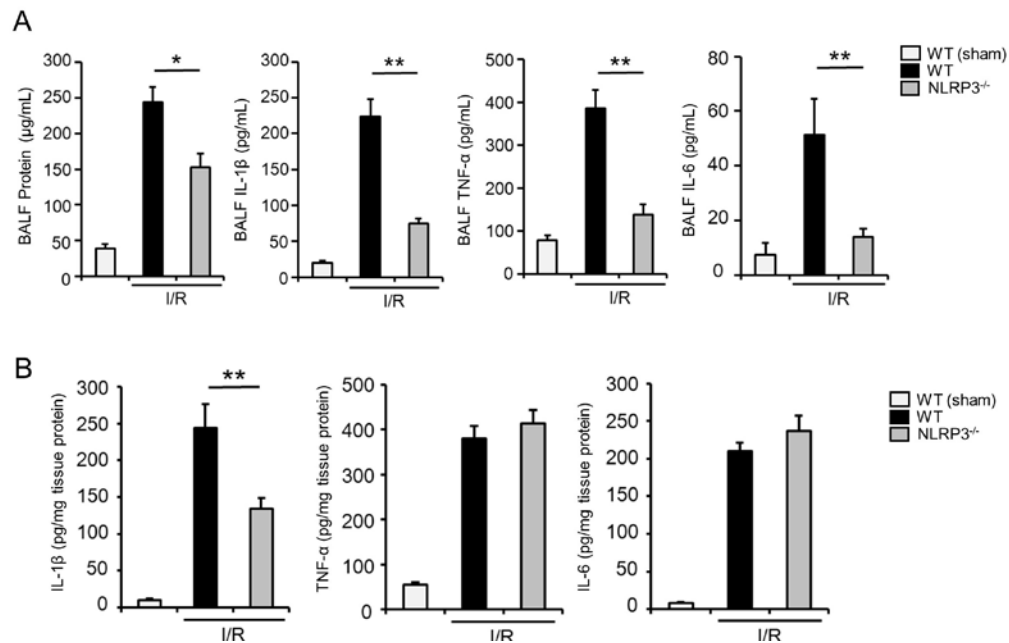


図 17. BALF 中及び肺組織における炎症性サイトカインの発現量

WT マウス、NLRP3^{-/-}マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に肺を採取した。(A) BALF 中の炎症性サイトカインを ELISA 法で測定した。(B) 肺組織中の炎症性サイトカインを ELISA 法で測定した (n = 6 匹)。**p* < 0.05、***p* < 0.01。

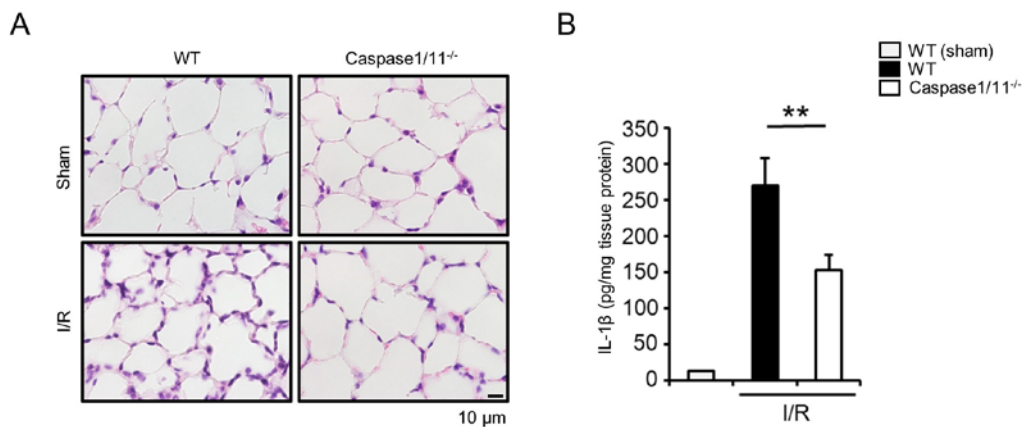


図 18. Caspase-1/11 欠損における肺 HE 染色及び肺組織の IL-1 β 蛋白量

WT マウス、Caspase-1/11^{-/-} マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 12 時間後に肺を採取した。(A) 肺組織の HE 染色を行った。代表的な組織像を示す。(n = 6 匹)。WT マウス、Caspase-1/11^{-/-} マウスにおいて、腸管 I/R モデルを作成、再灌流 4 時間後に肺を採取した。(B) 肺組織中の IL-1 β の蛋白発現量を解析した (n = 6 匹)。***p* < 0.01。

3-8. 続発性肺障害における肺血管透過性亢進の抑制効果

NLRP3 は主に骨髄由来細胞に存在することから^{5,7,8}、病態における骨髄由来細胞の役割を検討するため、4 種類の骨髄移植モデル、 $BMT^{WT \rightarrow WT}$ 、 $BMT^{WT \rightarrow NLRP3^{-/-}}$ 、 $BMT^{NLRP3^{-/-} \rightarrow WT}$ 、 $BMT^{NLRP3^{-/-} \rightarrow NLRP3^{-/-}}$ を作成し、腸管 I/R 後の生存率を評価した。骨髄移植を行っていないマウスと同様に、 $BMT^{NLRP3^{-/-} \rightarrow NLRP3^{-/-}}$ は $BMT^{WT \rightarrow WT}$ と比べて顕著に生存が延長した。さらに、 $BMT^{WT \rightarrow NLRP3^{-/-}}$ は生存が延長したが、 $BMT^{NLRP3^{-/-} \rightarrow WT}$ は生存延長を認めなかった (図 19A)。これらのことから骨髄由来細胞よりもむしろ肺における非骨髄由来細胞が病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。続発性肺障害における血管透過性亢進は、血管内皮障害が主因であるため、肺血管内皮細胞 (Lung vascular endothelial cells: LVECs) に

おける NLRP3 が病態に重要な役割を果たしているという仮説を検証した。マウスの肺より CD45 陰性 CD31 陽性の LVECs を単離し、血管内皮に特異的な接着分子である VE-cadherin の発現を確認した (図 19B)。次に腸管 I/R 後の肺組織から LVECs を単離し、sham と比較し NLRP3 が蛋白レベルで発現していることを確認した (図 19C)。更に、単離した LVECs を培養し、LPS で priming を行った LVECs に NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こす物質として知られている ATP やナイジェリシンの刺激を加えると、インフラマソームの活性化が誘導され、培養上清中に成熟型の IL-1 β が検出された (図 20A、B)。これらの結果より、LVECs における NLRP3 発現が病態の起点として重要であること、LVECs は NLRP3 インフラマソームの機構を有し、成熟型の IL-1 β を産生することが示された。

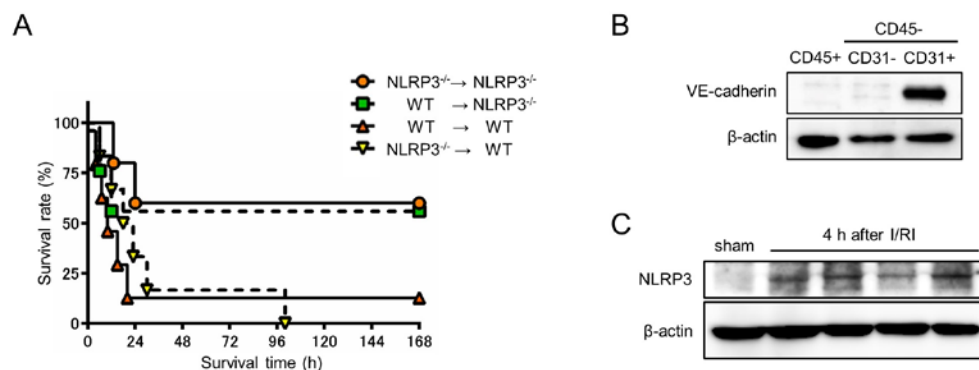


図 19. 腸管 I/R における非骨髄細胞の役割

WT マウス、NLRP3^{-/-} マウスにおいて、骨髄移植モデルを作成し、移植後 8 週間経過した後、腸管 I/R モデルを作成した。(A) 骨髄移植後のマウスを用いて腸管 I/R 後の生存率を解析した (n = 6-8 匹)。(B) WT マウスの肺から CD45 陽性細胞 (leukocytes)、CD45 陰性 CD31 陽性細胞 (Endothelial)、CD45 陰性 CD31 陰性細胞 (resident cells except for endothelial cells) を分離し VE-cadherin の蛋白発現量をウエスタンブロット法で解析した。(C) WT マウスで腸管 I/R モデルを作成、再灌流後 4 時間の肺を採取し、CD45 陰性 CD31 陽性細胞の NLRP3 蛋白発現を解析した (各レーンは個別マウス)。

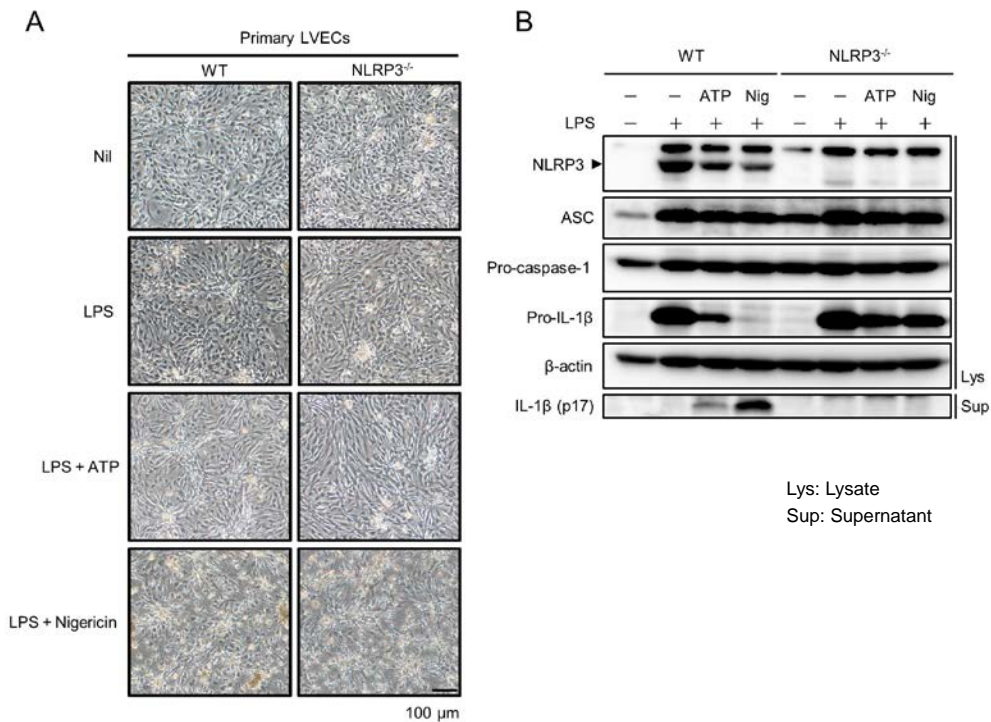


図 20. 肺血管内皮細胞における NLRP3 インフラマソームの活性化

WT マウス、NLRP3^{-/-} マウスそれぞれ 5 匹の肺から CD45 陰性 CD31 陽性細胞を分離し、培養を行った。3 継代後に LPS (1 μg/ml) で 24 時間 priming を行った後、ATP (5 mM) あるいはナイジェリシン (5 μM) で 6 時間の刺激を行った。(A) WT マウス、NLRP3^{-/-} マウス由来の肺血管内皮細胞の代表的な形態写真及び、(B) NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1β の蛋白発現をウエスタンブロット法で解析した。

3-9. 腸管 I/R 由来の脂質メディエーターの役割

腸管 I/R に続発する肺障害において、NLRP3 インフラマソームの活性化に関わる潜在的なメディエーターを検索するために、腸管 I/R 直後の門脈血（図 21A）を用いて脂質メディエーター関連物質の LC/MS 解析を行った。その結果、WT と NLRP3^{-/-}マウスにおいてアラキドン酸とリノール酸の代謝物が虚血再灌流直後に増加していた（図 21B）。その中から 12-HETE, 11-HETE、13-HODE の 3 つの脂質メディエーターを抽出し（図 21C）、LVECs での NLRP3 インフラマソームの活性化作用を確認した。これらの 3 つのメディエーターは、直接的にインフラマソームの活性化を誘導する作用はないものの、ATP 投与 1 時間前に培地に添加することで IL-1 β の成熟を増強した（図 22A、B）。インフラマソーム実験に頻用されるマウス J774 マクロファージにおいても、同様の結果を確認した（図 23A、B）。次に腸管虚血症患者の術前の血清を用いて同様に脂質メディエーターを測定したところ、マウスでの結果と同様に、12-HETE, 11-HETE、13-HODE の 3 つの脂質メディエーターを含むアラキドン酸、リノール酸の代謝物が健常ドナーと比べ増加していた（図 24A、B）。これらの結果より、腸管 I/R 由来の脂質メディエーターが、腸管 I/R に続発する肺障害において NLRP3 インフラマソームの活性化に寄与することが示された。

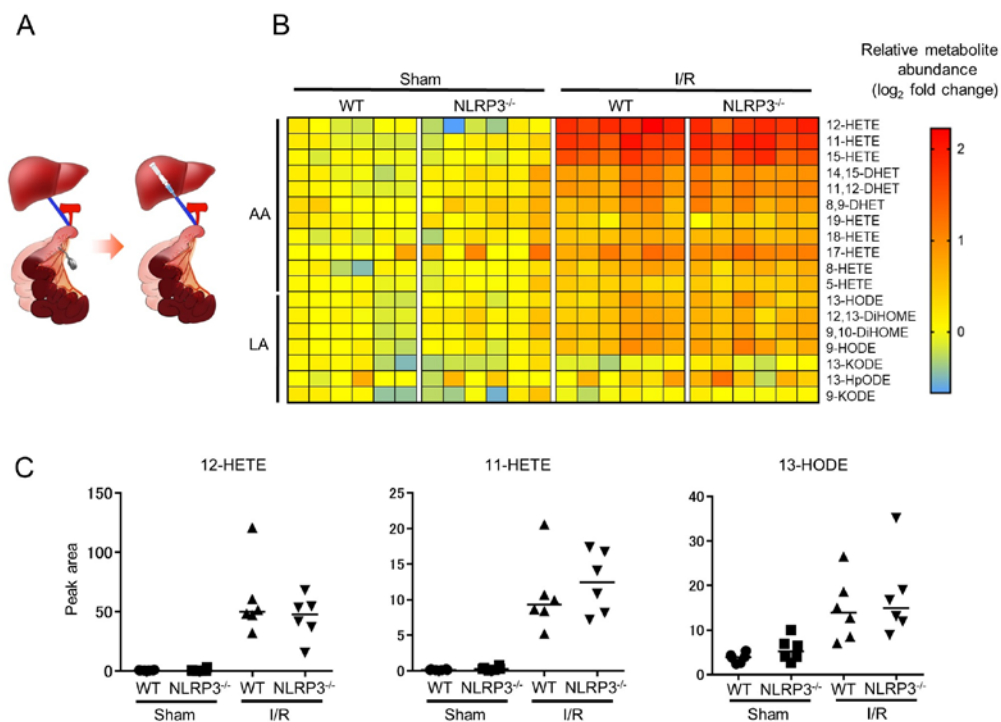


図 21. 腸管 I/R 直後の門脈血の脂質メディエーターの解析

WT マウス、NLRP3^{-/-} マウスで、腸管 I/R 直後の門脈血を採取し、LC/MS による解析を行った。(A) 門脈血採取の方法を示す。(B) WT マウス、NLRP3^{-/-} マウスにおいてアラキドン酸 (AA) とリノール酸 (LA) 由来の代謝物の相対的な変化を Heatmap に示した (n = 6)。(C) 12-HETE、11-HETE、13-HODE を抽出し Peak area を定量化した (n = 6)。

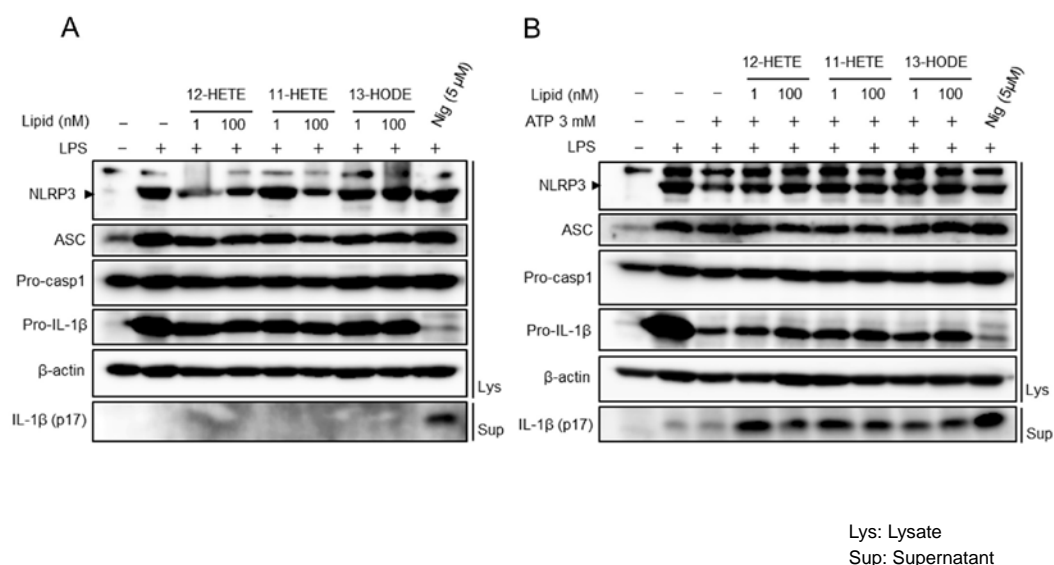
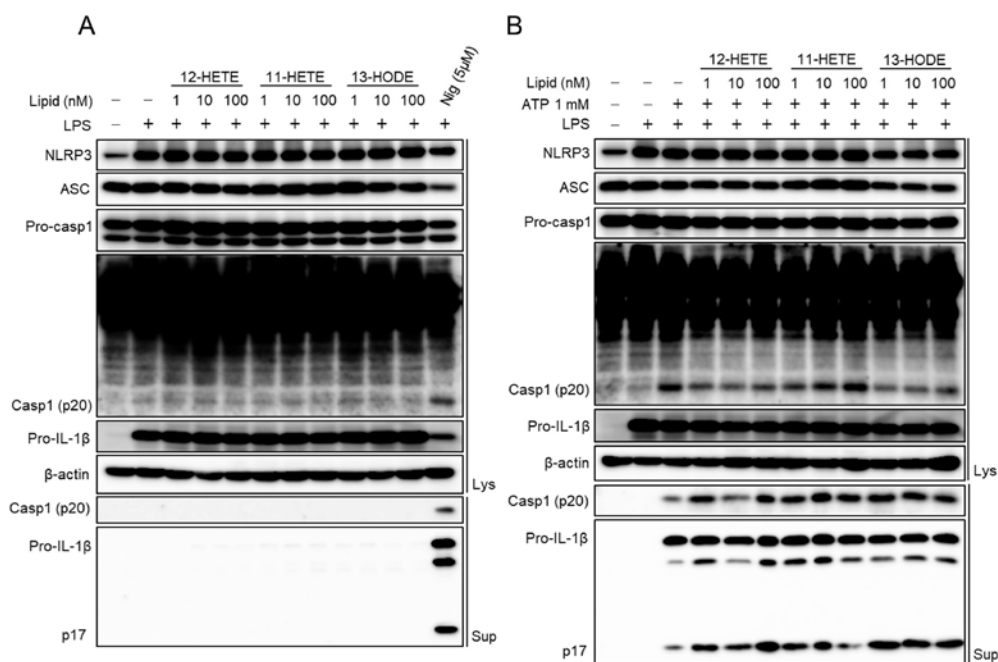


図 22. 肺血管内皮細胞における脂質メディエーターの役割

WT マウス 5 匹の肺から CD45 陰性 31 陽性細胞を分離・培養を行い、3 継代後に実験に用いた。(A) LPS (1 μg/ml) で 24 時間 priming を行った後、12-HETE (1, 100 nM)、11-HETE (1, 100 nM)、13-HODE (1, 100 nM) あるいはナイジェリシン (5 μM) で 6 時間の刺激を行い、NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1β の蛋白発現をウエスタンブロット法で解析した。(B) LPS (1 μg/ml) で 24 時間 priming を行った後、ATP 刺激の 1 時間前に 12-HETE (1, 100 nM)、11-HETE (1, 100 nM)、13-HODE (1, 100 nM) を上清に添加し、ATP 3mM あるいはナイジェリシン (5 μM) で 6 時間の刺激を行った。その後 NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1β の蛋白発現をウエスタンブロット法で解析した。



Lys: Lysate
Sup: Supernatant

図 23. J774 における脂質メディエーターの役割

マウスマクロファージ様細胞株である J774 を実験に用いた。(A) LPS (100 ng/ml) で 6 時間 priming を行った後、12-HETE (1, 10, 100 nM)、11-HETE (1, 10, 100 nM)、13-HODE (1, 10, 100 nM) あるいはナイジェリシン (5 μM) で 6 時間の刺激を行い、NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1β の蛋白発現をウエスタンブロット法で解析した。(B) LPS (100 ng/ml) で 6 時間 priming を行った後、ATP 刺激の 1 時間前に 12-HETE (1, 10, 100 nM)、11-HETE (1, 10, 100 nM)、13-HODE (1, 10, 100 nM) を上清に添加し、ATP 1mM で 6 時間の刺激を行った。その後 NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1β の蛋白発現をウエスタンブロット法で解析した。

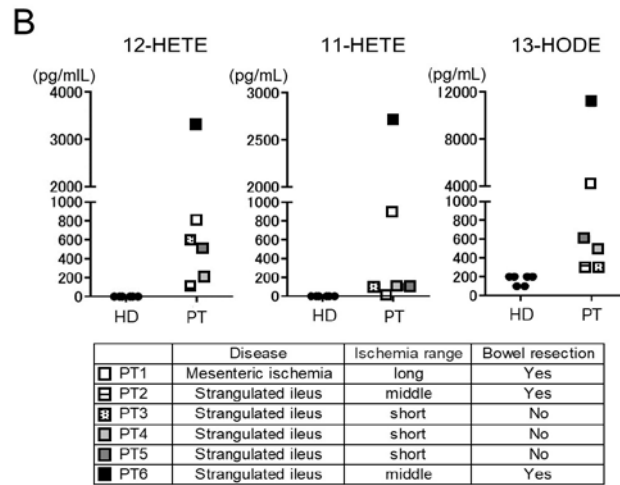
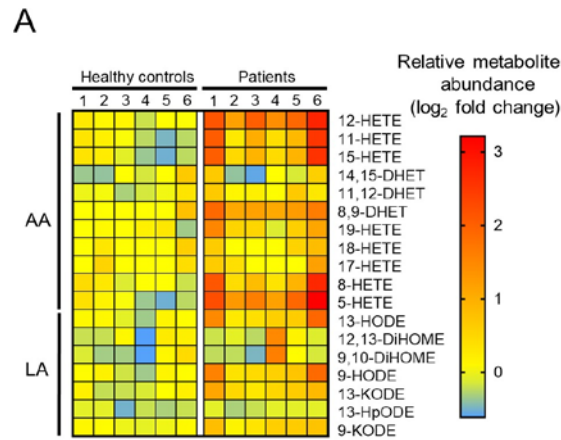


図 24. 腸管虚血症患者における脂質メディエーターの解析

腸管虚血症患者と健常者において術前の血清を用い、LC/MS による解析を行った。(A) アラキドン酸 (AA) とリノール酸 (LA) 由来の代謝物の相対的な変化を Heatmap に示した (n = 6)。(B) 12-HETE、11-HETE、13-HODE の血中濃度を定量化した (n = 6)。PT1～PT6 の患者の病態、虚血領域 (short: < 50 cm、middle: 50-200 cm、long: > 200 cm)、腸管切除の有無を記載した。

第4章 考察

本研究の結果をまとめると、次のようになる。1)NLRP3、ASC、Caspase-1/11、IL-1 β の欠損により、腸管 I/R 後の生存期間は延長するが、NLRP3 および Caspase-1/11 欠損では腸管の炎症は軽減されない、2)腸管 I/RI は遠隔臓器障害、特に肺障害を引き起こし、NLRP3 欠損により炎症、酸化ストレス、血管透過性の亢進などが劇的に抑制される、3)好中球除去により肺障害は軽減されず、生存期間も延長されない、4)骨髄移植の結果より、腸管 I/R に続発する肺障害において、骨髄由来細胞よりも非骨髄由来細胞が重要な役割を果たしている、5)腸管 I/R 由来の脂質メディエーターである 12-HETE、11-HETE、および 13-HODE が、肺血管内皮細胞やマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームの活性化を増強する、6)これらの脂質メディエーターは、腸管虚血症患者の術前の血清でも上昇した。これらの結果より、肺血管内皮細胞における NLRP3 インフラマソームは、腸管 I/R に続発する肺障害において重要な役割を果たしていることが示された。

NLRP3 インフラマソームは様々な臓器（心臓、肝臓、腎臓）の I/RI において、病態に深く関わっていることが示されている^{9,15,16}。実際、我々の研究室でも、心筋 I/RI 後の初期炎症反応の惹起に、心臓線維芽細胞におけるインフラマソームの活性化が重要な役割を果たしていることを報告している⁹。Huge らは、NLRP3 あるいは Caspase1 欠損により、肝 I/RI 後の炎症が軽減され、肝臓の非実質細胞におけるインフラマソームが炎症惹起に関連していることを示している¹⁵。また、Lyer らは、NLRP3 インフラマソーム関連分子の欠損により、腎 I/R 後の腎機能障害が軽減され生存率が延長することを報告している¹⁶。本研究で申請者らは、NLRP3 イン

フラマソームが、肺障害、特に肺血管内皮細胞の透過性亢進に寄与することで、腸管 I/R に続発する肺障害の病態に深く関与していることを見出した。それに加えて、腸管 I/R 由来の脂質メディエーターが、肺血管内皮細胞において NLRP3 インフラマソームの活性化を増強することを明らかにした。本研究は、腸管 I/R に続発する肺障害において、NLRP3 インフラマソームは病態の本質に関わる重要な役割を果たすという最初の報告である。

NLRP3 インフラマソームはマクロファージや好中球といった、主に自然免疫を担う骨髄由来細胞に好発現することが知られている^{5,7}。肺マクロファージや好中球が、急性肺障害に関与することは過去に報告されているため^{34,35}、好中球除去や骨髄移植を行うことで、それらの病態における役割を確認した。しかしながら、好中球除去による肺障害の改善、生存期間の延長は認めず、骨髄移植においても、骨髄由来細胞よりもむしろ非骨髄細胞が持つ NLRP3 が、腸管 I/R に続発する肺障害において重要な役割を果たすという結果であった。その一方で、NLRP3 欠損は腸管 I/R 後の肺血管透過性の亢進及び BALF 中への蛋白漏出を抑制した。この結果より、腸管 I/R に続発する肺障害の起点は肺血管内皮細胞での NLRP3 の発現であり、それに続く NLRP3 インフラマソームの活性化が病態の進展に重要であることが示唆された。これを支持する結果として、Yang らは、Cold inducible RNA-binding protein がマウスの肺血管内皮細胞において NLRP3 インフラマソームを活性化し、IL-1 β を産生することを報告している³⁶。同じく Yang らは、出血性ショックに続発する肺障害において、肺血管内皮細胞で Caspase-1 の活性化によりパイロプトシスと呼ばれる特徴的な細胞死が引き起こされることを示している³⁷。本研究においても、既報と同様に、肺血管内皮細胞が NLRP3 インフラマソーム活性化の機構

を持ち、IL-1 β を産生することを示している。IL-1 β は肺血管内皮細胞に作用し、血管透過性の亢進を引き起こすことが知られており³⁸、肺血管内皮細胞における NLRP3 インフラマソームの活性化及び IL-1 β 産生が、腸管 I/R に続発する肺障害を惹起する初期のトリガーであると考えられる。

脂質メディエーターは自然免疫や獲得免疫の炎症応答を調整し、様々な疾患に関与することが知られている³⁹。その中でも主にアラキドン酸由来のプロスタグランディン、トロンボキサン、HETE、ロイコトリエンなど主にアラキドン酸由来のエイコサノイドは炎症促進、炎症抑制の両方の生理学的作用を有している⁴⁰。本研究においても、腸管 I/R の直後の門脈血から複数のアラキドン酸、リノール酸由来の代謝物を同定した。その中でも 12/15-LOX によりアラキドン酸より生成された 12-HETE が腸管 I/R によって生成され、肺血管内皮細胞とマクロファージにおいて、NLRP3 インフラマソームの活性化及び成熟型 IL-1 β の産生を増強させた。また、腸管虚血症患者の術前血清においても 12-HETE が上昇していた。我々の結果と同じく、Zarbock らは、12/15-LOX 欠損により、LPS 誘導性肺障害モデルにおいて、血管透過性亢進が抑制され、好中球浸潤が減少し、生存率が延長することを報告している^{41,42}。また、Zhang らはアラキドン酸から 12-LOX を介した 12-HETE が、NLR シグナルを含めた様々な炎症経路を制御し、肝 I/RI 後の炎症や細胞死に大きく関与していることを示している⁴³。さらに、12-HETE は NF- κ B と MAPK 経路を活性化し、白血球の遊走や活性化、炎症性サイトカイン産生などに関与していることから⁴⁴、腸管 I/R 由来の 12-HETE は、NLRP3 インフラマソームの活性化の増強を含め、腸管 I/R 後の肺障害を促進していることが推察される。

本研究で検討が不十分な点は3つある。1つ目は、IL-1 β の産生には IL-1 β の前駆体の発現を誘導する Priming シグナル、インフラマソームを活性

化する **Second** シグナルの 2 段階のシグナルが必要であるが、腸管 **I/R** に続発する肺障害における **Priming** シグナルは同定できていない。腸管 **I/R** は腸管上皮細胞のバリアを破綻させ、**Bacterial translocation** を引き起こすことが知られていることから⁴⁵、腸管由来の **LPS** が **priming** シグナルとして作用していることが想定される。2 つ目は、腸管 **I/R** に由来する脂質メディエーターが、**NLRP3** インフラマソームを活性化するという結果は得たが、その詳細なメカニズムに関しては十分に検討できていない。3 つ目は、**Caspase-11** を介したインフラマソーム **Non-canonical** 経路の役割についてである。申請者らが用いたマウスは **Caspase-1/11** の二重欠損マウスであるため、腸管 **I/R** における **Caspase-1** あるいは **Caspase-11** 単独の役割については検討できていない。最近、**Cheng** らが敗血症性ショックモデルにおいて、肺血管内皮細胞の **Caspase-11** が **LPS** と結合し、ガスダーミン **D** 依存的なパイロプトーシスを引き起こすことで、**IL-1 β** の産生、血管透過性の亢進、続発する肺障害を引き起こす事を報告している⁴⁶。これらの結果を踏まえ、腸管 **I/R** に続発する肺障害における **NLRP3** インフラマソームの役割については、さらなる検討が必要である。

第5章 おわりに

本研究で新たに明らかにしたことは、次の4つである。1)再現性の高い新規腸管 I/R モデルを作成した、2)腸管 I/R に続発する肺障害において、インフラマソーム依存的な IL-1 β の重要性を示した、3)続発性肺障害において、炎症の初期応答の場は肺血管内皮細胞であり、血管内皮細胞でのインフラマソームの活性化が肺障害の進展に重要な役割を果たしていることを示した、4)腸管 I/R により誘導される脂質メディエーターが成熟型 IL-1 β へのプロセッシングを増強し、病態に深く関与している可能性を示した。

本研究により解明された腸管 I/R に続発する肺障害のメカニズムを示す(図 25)。腸管 I/R は肺血管内皮細胞において NLRP3 インフラマソームの活性化、IL-1 β を産生し、血管透過性を亢進させることで肺障害を引き起こす。腸管 I/R に由来する 12-HETE、11-HETE、13-HODE などの脂質メディエーターは再灌流直後に放出され、肺血管内皮における NLRP3 インフラマソームの活性化を増強する。本研究により、腸管 I/R に続発する肺障害の新知見が提示され、NLRP3 インフラマソーム依存的な IL-1 β を標的とした治療の可能性を示すことができた。

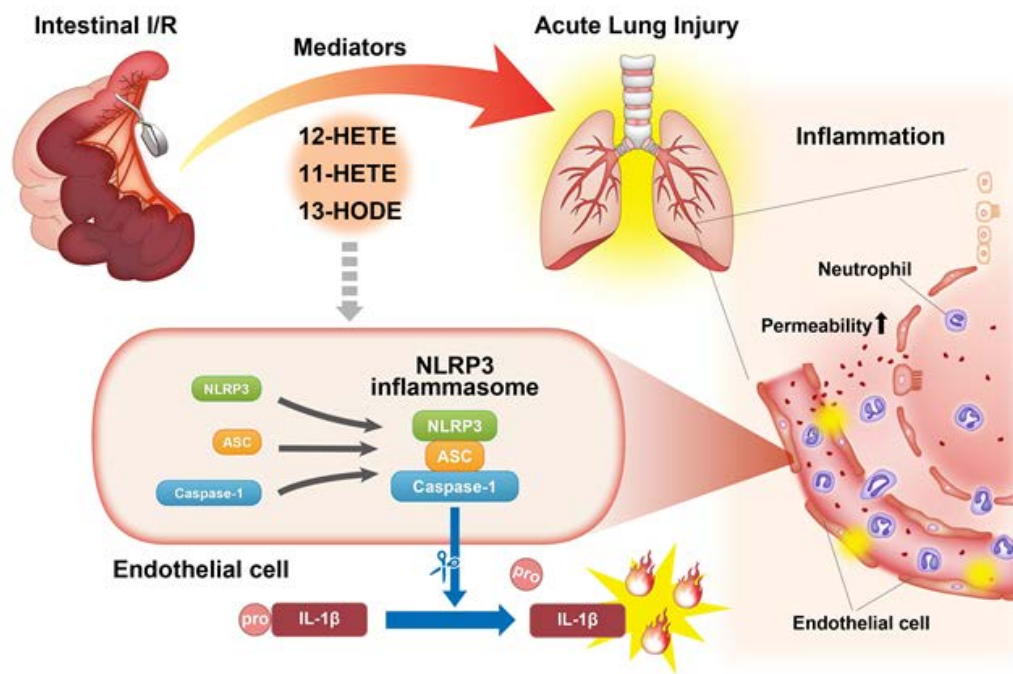


図 25. 腸管 I/R に続発する肺障害のメカニズム

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学消化器・一般外科学教授 佐田 尚宏先生、北山 丈二先生、堀江 久永先生、分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部教授 高橋 将文先生に深く感謝いたします。また、大学院への進学を強く勧めて頂いた自治医科大学消化器・一般外科前教授 安田 是和先生、卒業後から現在まで消化器外科医としてご指導頂いている福井県立病院 外科 服部 昌和先生、義務年限中に病理学の指導を頂いた福井県立病院 病理診断科 海崎 泰治先生にもこの場を借りて御礼申し上げます。

研究の計画・遂行にあたり様々なお助言を頂き、日々の研究生活を支えて下さった自治医科大学炎症・免疫研究部の木村 博昭先生はじめスタッフの先生方、大学院生、リサーチアシスタントの皆様、消化器・一般外科学、呼吸器内科学教室の皆様に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Clair DG, Beach JM. Mesenteric ischemia. *N Engl J Med* **374**, 959-968 (2016).
2. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of ikk and nf-kappab inhibition: Prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* **9**, 575-581 (2003).
3. Kannan L, Kis-Toth K, Yoshiya K, Thai TH, Sehwat S, Mayadas TN, Dalle Lucca. R-spondin3 prevents mesenteric ischemia/reperfusion-induced tissue damage by tightening endothelium and preventing vascular leakage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14348-14353 (2013).
4. Cui T, Miksa M, Wu R, Komura H, Zhou M, Dong W, Wang Z, Higuchi S, Chaung W, Blau SA, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P. Milk fat globule epidermal growth factor 8 attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* **181**, 238-246 (2010).
5. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J* **55**, 101-105 (2014).
6. He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci* **41**, 1012-1021 (2016).
7. Karasawa T, Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **24**, 443-451 (2017).
8. Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions. *Cell* **165**, 792-800 (2016).
9. 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).
10. Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Yoshimura K, Aoki H, Tsutsui H, Noda T, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 127-136 (2015).
 11. 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).
 12. Komada T, Usui F, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Inoue Y, Kobayashi M, Mizushima Y, Kasahara T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasomes for rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Sci Rep* **5**, 10901 (2015).
 13. 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, 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).
 14. Karasawa T, Kawashima A, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Kimura H, Kamata R, Shirasuna K, Koyama Y, Sato-Tomita A, Matsuzaka T, Tomoda H, Park

- SY, Shibayama N, Shimano H, Kasahara T, Takahashi M. Saturated fatty acids undergo intracellular crystallization and activate the NLRP3 inflammasome in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 744-756 (2018).
15. Huang H, Chen HW, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, Ding Q, Loughran P, Beer-Stolz D, Billiar TR, Esmon CT, Tsung A. Histones activate the NLRP3 inflammasome in kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol* **191**, 2665-2679 (2013).
 16. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, Eisenbarth SC, Florquin S, Flavell RA, Leemans JC, Sutterwala FS. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20388-20393 (2009).
 17. Yamamoto M, Yaginuma K, Tsutsui H, Sagara J, Guan X, Seki E, Yasuda K, Yamamoto M, Akira S, Nakanishi K, Noda T, Taniguchi S. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of tlr-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* **9**, 1055-1067 (2004).
 18. Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, Matsui K, Kashiwamura S, Hada T, Akira S, Yagita H, Okamura H, Nakanishi K. Caspase-1-independent, fas/fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* **11**, 359-367 (1999).
 19. 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).
 20. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M,

- 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).
21. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, Dixit VM. Glyburide inhibits the cryopyrin/nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* **187**, 61-70 (2009).
 22. Tuboly E, Futakuchi M, Varga G, Érces D, Tőkés T, Mészáros A, Kaszaki J, Suzui M, Imai M, Okada A, Okada N, Boros M, Okada H. C5a inhibitor protects against ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiol Immunol* **60**, 35-46 (2016).
 23. Sadatomo A, Inoue Y, Ito H, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Mizushima Y, Nakamura J, Kamata R, Kasahara T, Horie H, Sata N, Takahashi M. Interaction of neutrophils with macrophages promotes IL-1beta maturation and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* **199**, 3306-3315 (2017).
 24. 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).
 25. Yamada M, Kita Y, Kohira T, Yoshida K, Hamano F, Tokuoka SM, Shimizu T. A comprehensive quantification method for eicosanoids and related compounds by using liquid chromatography/mass spectrometry with high speed continuous ionization polarity switching. *J Chromatogr B Analyt*

Technol Biomed Life Sci **995-996**, 74-84 (2015).

26. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: Progress and promise for translational research. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**, G63-75 (2015).
27. Gubernatorova EO, Perez-Chanona E, Koroleva EP, Jobin C, Tumanov AV. Murine model of intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Vis Exp*, (2016).
28. Kamo N, Ke B, Ghaffari AA, Shen XD, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. ASC/caspase-1/IL-1beta signaling triggers inflammatory responses by promoting hmgb1 induction in liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* **58**, 351-362 (2013).
29. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* **17**, 1391-1401 (2011).
30. Mizushima Y, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Kobayashi M, Komada T, Inoue Y, Mato N, Yamasawa H, Latz E, Iwakura Y, Kasahara T, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi M. NLRP3 deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through stat3 signaling independently of interleukin-1beta. *J Biol Chem*, (2014).
31. 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, Takahashi M. Inoue Y, *et al.* NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *J Immunol* **192**, 4342-4351 (2014).
32. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **122**, 2731-2740 (2012).

33. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM; Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official american thoracic society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**, 725-738 (2011).
34. Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Ayala A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Rev Respir Med* **5**, 115-126 (2011).
35. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **377**, 562-572 (2017).
36. Yang WL, Sharma A, Wang Z, Li Z, Fan J, Wang P. Cold-inducible rna-binding protein causes endothelial dysfunction via activation of nlrp3 inflammasome. *Sci Rep* **6**, 26571 (2016).
37. Yang J, Zhao Y, Zhang P, Li Y, Yang Y, Yang Y, Zhu J, Song X, Jiang G, Fan J. Hemorrhagic shock primes for lung vascular endothelial cell pyroptosis: Role in pulmonary inflammation following LPS. *Cell Death Dis* **7**, e2363 (2016).
38. Yan X, Hegab AE, Endo J, Anzai A, Matsushashi T, Katsumata Y, Ito K, Yamamoto T, Betsuyaku T, Shinmura K, Shen W, Vivier E, Fukuda K, Sano M. Lung natural killer cells play a major counter-regulatory role in pulmonary vascular hyperpermeability after myocardial infarction. *Circ Res* **114**, 637-649 (2014).
39. Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: Enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**, 123-150 (2009).
40. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat*

- Rev Immunol* **15**, 511-523 (2015).
41. Zarbock A, Distasi MR, Smith E, Sanders JM, Kronke G, Harry BL, von Vietinghoff S, Buscher K, Nadler JL, Ley K. Improved survival and reduced vascular permeability by eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase in mouse models of acute lung injury (ALI). *J Immunol* **183**, 4715-4722 (2009).
 42. Rossaint J, Nadler JL, Ley K, Zarbock A. Eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase reduces neutrophil recruitment in mouse models of acute lung injury. *Crit Care* **16**, R166 (2012).
 43. Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, Fang J, Wang X, Wang W, Liu ZY, Shen LJ, Zhang P, Wang PX, Liao R, Ji YX, Wang JY, Tian S, Zhu XY, Zhang Y, Tian RF, Wang L, Ma XL, Huang Z, She ZG, Li H. An alox12-12-hete-gpr31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Nat Med* **24**, 73-83 (2018).
 44. Guo Y, Zhang W, Giroux C, Cai Y, Ekambaram P, Dilly AK, Hsu A, Zhou S, Maddipati KR, Liu J, Joshi S, Tucker SC, Lee MJ, Honn KV. Identification of the orphan g protein-coupled receptor gpr31 as a receptor for 12-(s)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* **286**, 33832-33840 (2011).
 45. Leaphart CL, Tepas JJ, 3rd. The gut is a motor of organ system dysfunction. *Surgery* **141**, 563-569 (2007).
 46. Cheng KT, Xiong S, Ye Z, Hong Z, Di A, Tsang KM, Gao X, An S, Mittal M, Vogel SM, Miao EA, Rehman J, Malik AB. Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury. *J Clin Invest* **127**, 4124-4135 (2017).