

氏名	菱田英里華
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 571 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 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	腹膜線維症におけるインフラマソームの役割の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 八木澤 隆 (委員) 教授 古川 雄祐 教授 山田 俊幸

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

腹膜透析（Peritoneal Dialysis: PD）は自宅で実施可能で QOL 維持に繋がる有用な腎代替療法の一つであるが、全透析患者数に占める PD 患者の割合は減少している。腹膜線維症に伴う腹膜機能の劣化や致死率の高い合併症である被嚢性腹膜硬化症（Encapsulating Peritoneal Sclerosis: EPS）の存在がその理由として挙げられるが、これらの合併症に対する確立された有効な治療法は未だ存在せず、PD 普及の妨げとなっている。腹膜線維症の発症には、生体適合性の低い透析液の腹腔内長期暴露による炎症の関与が知られていることから、申請者は自然炎症経路であるインフラマソーム活性化を介した炎症が腹膜線維症の進展に寄与しているとの仮説に至った。

本研究では、腹膜線維症におけるインフラマソームの役割とその分子メカニズムを解明し、新たな治療法開発に繋げることを目的に研究を行った。従来型の腹膜透析液に含まれるメチルグリオキサール（Methylglyoxal: MGO）のマウス腹腔内投与により腹膜線維症を誘発できることが既に報告されており、このモデルを用いて研究を進めた。

### 2 研究方法

野生型 (WT) マウス (C57BL/6J) に MGO 40 mM を含む腹膜透析液 100 mL/kg を週 5 日間連続、合計 3 週間腹腔内投与を行い、腹膜線維症モデルを作成した。投与開始後 7, 14, 21 日目に屠殺し、腹膜前壁（壁側腹膜）、腸管膜（臓側腹膜）、腹腔内洗浄液、血清を採取した。血中及び組織のインフラマソーム関連分子、炎症性サイトカイン等を評価するとともに、組織学的解析を行った。

*In vivo* の解析として、インフラマソーム関連分子欠損マウス (NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup>, IL-1β<sup>-/-</sup>) を用いて、MGO 腹膜線維症モデルを作製し、その表現型を解析した。

*In vitro* の解析として、ヒト血管内皮細胞 (HUVECs), マウス初代肺血管内皮細胞 (MLVECs) に MGO 刺激を行い、細胞死、酸化ストレスを評価した。

### 3 研究成果

WT マウスにおいて腹膜のインフラマソーム関連分子発現は MGO 群で有意に上昇した。壁側腹膜の線維性肥厚は WT マウスと比較し、NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> マウスで有意に抑制された。ASC 欠損は腸間膜の癒着と腸間膜面積の縮小も有意に抑制した。さらに、ASC 欠損は炎症性サイトカインと

線維化マーカーの発現のみならず、白血球・マクロファージ浸潤も有意に抑制したが、骨髄由来細胞特異的 ASC 欠損 (ASC<sup>cf</sup>;LysM<sup>cre/-</sup>マウス)は腹膜線維化を抑制しなかった。そこで、ASC 欠損は MGO 投与により誘導される血性腹水、腹膜フィブリン沈着、PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)の発現上昇を抑制したことから、腹膜線維症における血管内皮細胞の役割に着目した。*In vivo*において、WT マウス腹膜の CD34 陽性血管内皮細胞が ASC を共発現していることを確認した。*In vitro*において、MGO は血管内皮細胞において酸化ストレスを介した細胞死を誘導し、IL-1 $\beta$  共刺激により細胞死は増強した。さらに、MLVECs において ASC 欠損は MGO により誘導される細胞死を抑制した。最後に IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>マウスにおいて腹膜線維化が有意に抑制されたことを確認した。

#### 4 考察

MGO 投与は壁側腹膜の線維性肥厚のみならず、腸間膜の癒着と縮小を誘発することを本研究で新たに見出した。この肉眼所見は EPS の臨床所見 (abdominal cocoon)を反映していると考えられた。次にインフラマソーム関連分子欠損により腹膜の線維化が抑制されることを示した。インフラマソームは主に血球細胞で重要な役割を担っていること、またマクロファージでの発現量が多いことから、骨髄由来細胞の ASC に着目した。しかし、骨髄由来細胞特異的 ASC 欠損は腹膜の線維化を抑制しなかった。そこで、MGO 投与は血性腹水、腹膜フィブリン沈着、PAI-1 の発現上昇といった血管内皮傷害を示唆する所見を誘導したこと、また腹膜線維症の病態における血管内皮傷害の重要性を示す過去の報告より、腹膜の血管内皮細胞に着目し解析を進めた。*In vivo*で腹膜の血管内皮細胞が ASC を共発現していることを示しただけでなく、*In vitro*においてもマウス初代血管内皮細胞を用いて ASC が MGO により誘導される血管内皮細胞死を抑制することを明らかにした。本病態における血管内皮細胞の寄与度に関する解析や中皮細胞を含めた他細胞におけるインフラマソームの役割については検討を継続する予定である。

#### 5 結論

MGO による腹膜線維症モデルにおいては、腹膜の血管内皮細胞における NLRP3 インフラマソームの活性化とそれに続発する細胞死が重要であることが示された。本研究成果がインフラマソームを中心とした腹膜線維症の病態解明と新規治療薬への開発に繋がることが期待される。

### 論文審査の結果の要旨

腹膜透析の継続によって生じる腹膜線維症は腹膜機能の低下をもたらし、長期の治療を困難としている。本研究は無菌性炎症の病態に関与するとされるインフラマソームに着目し、腹膜線維症におけるこの役割と分子メカニズムを解明したものである。

研究には C57BL/6J マウス、またインフラマソーム関連分子 (主に ASC) 欠損マウス、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ ) 欠損マウスを用い、腹膜線維症は methylglyoxal (MGO) 腹腔内注射によって作成している。そして、血中、および組織中のインフラマソーム関連分子、炎症性サイトカイン等を経時的に解析し、腹膜を組織学的に検討している。また MGO の血管内皮細胞に及ぼす直接的な影響とこれに関与するインフラマソーム関連分子、IL-1 $\beta$  についても *in vitro* の実験系で検

討を加えている。

その結果、MGO の腹腔内投与によりインフラマソーム関連分子、IL-1 $\beta$  の腹膜内発現が有意に上昇することを認め、また、インフラマソーム関連分子 (ASC) 欠損マウス、IL-1 $\beta$  欠損マウスにおいては腹膜線維化や肥厚が抑制されていることを確認した。さらに血管障害によると考えられる血性腹水やフィブリン沈着、内皮障害マーカーPAI-1 発現もインフラマソーム (ASC) 欠損マウスにおいては抑制されることを確認した。

さらに *in vitro* の実験系で ASC 欠損マウス血管内皮細胞においては MGO による細胞死、酸化ストレス (ROS) が有意に抑制されることを認めている。一方、インフラマソームは炎症細胞、とりわけマクロファージに発現が認められることから、マクロファージ特異的 ASC 欠損マウスモデルで ASC の役割も評価したがこの線維化への影響は認めなかった。

以上の研究成績は腹膜線維症の発生に血管内皮インフラマソームが関与することを明らかとしたもので、インフラマソーム活性化の抑制が血管内皮細胞死を回避し、また IL-1 $\beta$  活性を軽減して腹膜線維症発生を予防できる可能性のあることを示唆するものである。血管内皮細胞に影響するインフラマソームの詳細な役割、またその後の腹膜線維症発生の機序に関してはさらなる研究を要するがインフラマソームを標的とした腹膜線維症の克服への道を開く意義ある成果と考えられる。

これらの研究内容に関して審査委員は一致して学位授与に相応しいものと判断した。

学位論文については一部の修正を要したが適確な修正がなされた。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は腹膜透析療法の現況や課題、とくに長期継続の支障となる腹膜線維症の病態を総説した後、本研究の意義について述べた。続いて、最近、無菌性炎症の病態に関与することが注目されているインフラマソームと腹膜線維症発生に関する研究の意義について言及し、インフラマソーム欠損マウスを用いた本実験の方法 (*in vivo*、*in vitro*)、結果を簡潔にまとめた。血中、および組織中のインフラマソーム関連分子、炎症性サイトカイン、また腹膜組織の解析結果を中心に質疑応答がなされたが返答は適切であり、また今後の研究の発展や課題についても十分に理解できていることが確認された。

博士論文最終試験 (試問) においても審査委員は一致して合格と判定した。