

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17711

研究課題名（和文）移植後拒絶反応におけるNLRP3の役割

研究課題名（英文）Role of NLRP3 in cardiac allograft rejection

研究代表者

五味淵 俊仁（GOMIBUCHI, Toshihito）

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：90597668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：NLRP3ノックアウトマウスを用いて、腹部への異所性心移植モデルを作成した。急性拒絶モデルにおいてはコントロール群と比較して生着率に有意差は認めなかった。移植後5日に犠牲死させ移植心を摘出し、組織学的検討を行った。NLRP3ノックアウト群において、炎症細胞浸潤や心筋障害の程度は重度であった。Caspase-3、ICAM1、CD45、CD3、CD31、SMA、NLRP3について免疫染色を行い、解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、NLRP3と移植免疫についての研究は無く、これまでにない独創的な計画であると考えられる。DNA修復酵素であるNLRP3が移植後の拒絶反応を抑える新たな標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We used a murine heterotopic cardiac transplantation model using NLRP3 knockout mice. There is no difference in graft survival of fully mismatched model compared to control group. Donor hearts were harvested for examination on Days 5. In NLRP3 knockout group, a severe infiltration of inflammatory cells was observed in the graft and more myocardial injury was seen. The expression of Caspase-3, ICAM1, CD45, CD3, CD31, SMA, NLRP3 was analyzed by immunohistochemistry.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心移植 NLRP3

1. 研究開始当初の背景

移植医療は、実験的医療の域を脱し世界中で多くの末期臓器不全の患者に恩恵をもたらしている。しかし、移植後拒絶反応は、免疫抑制剤の進歩した現在においてもなお、重要な合併症であり、特に急性拒絶反応は移植後一年以内の死亡率に最も影響を及ぼす因子である。近年、虚血再灌流障害と急性拒絶反応の相互作用による移植後急性炎症の研究がすすんでおり、移植後早期の炎症をいかに抑制するかが、グラフト生着の長期成績を左右すると考えられるに至っている。最近免疫応答には TLR 経路とは異なった炎症カスケードが存在することが明らかにされた。このカスケードにおける認識センサーとして働いているのがインフラマソームであり痛風やアルツハイマーなど感染が直接関与しない炎症状態における新たな炎症惹起経路として注目されている。ヒトの心移植後急性拒絶反応とインフラマソームが関連する (Shah KB et al, *Int J Cardiol* 2015;201:328-330) ことが報告されており、この機序を解明することが急性拒絶反応の抑制につながると我々は考えている。

インフラマソームは、カスパーゼ-1 の活性化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、アダプター分子 Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) を中心として、NLR(Nod-like receptor)である NLRP3 とカスパーゼ 1 の複合体からなり、これを活性化する(図 1)。その結果炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の産生・分泌が誘導され、炎症反応が惹起されると考えられている。申請者らはこれまでにマウス異所性心移植モデルを用いて、移植心におけるインフラマソームの構成部分である ASC と IL-1 β の関連を解析し、ASC が急性拒絶における key molecule である可能性が示唆された(Seto et al, *J Heart Lung Transplant* 2010;29:352-259)。ASC 同様、NLRP3 もこのインフラマソームの構成分子として機能していることから、マウス allograft モデルでの急性拒絶反応における NLRP3 の役割とその治療標的としての可能性について研究を重ねている。

2. 研究の目的

急性拒絶反応における細胞内パターン認識受容体の一つである NLRP3 の役割について、NLRP3 ノックアウトマウスを用いた異所性心移植モデルを用いて解析したい。この研究成果は NLRP3 を介した虚血再灌流障害の制御により、急性拒絶反応を抑制しうる有用な治療戦略として期待できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 急性拒絶モデル作成および生着率の比較

6 週から 8 週の雄の NLRP3 ノックアウトマウス (C57BL/6 (H-2^b)バックグラウンド) をドナー、BALB/c (H-2^d)マウスをレシピエントに用い、腹部への異所性心移植モデルを作成する。コントロール群として、C57BL/6 (H-2^b)マウスをドナー、BALB/c (H-2^d)マウスをレシピエントとした MHC フルミスマッチモデルを作成する。移植後は移植心の拍動を確認、拍動の消失をもって拒絶とし、生着率を比較検討する。

(2) 組織学的検討

このコントロール群においては、移植後 6 日から 10 日で移植心は拒絶されるので、移植後 5 日に犠牲死させ移植心を摘出する。摘出した移植心は、2 分割しパラフィン包埋標本、凍結標本と

する。HE 染色にて炎症細胞浸潤や心筋傷害の程度を観察し比較検討する。Caspase-3、ICAM3、CD45、CD3、CD31、 α SMA、NLRP3 について免疫染色を行い、解析した。

4. 研究成果

(1) 急性拒絶モデルのグラフト生着率

NLRP3 ノックアウト群(n=4)、コントロール群(n=4)とも移植後5日までに拒絶され、両群間に有意差を認めなかった。

(2) 組織学的検討

(i) 移植後5日に摘出された移植心の HE 染色においては、NLRP3 ノックアウト群では広範囲に炎症細胞浸潤、心筋炎を認め、組織の浮腫や出血を認めた。コントロール群においても同様に炎症細胞浸潤や心筋障害を認めたが、ノックアウト群に比べて、コントロール群は軽度であった。

(図 1)

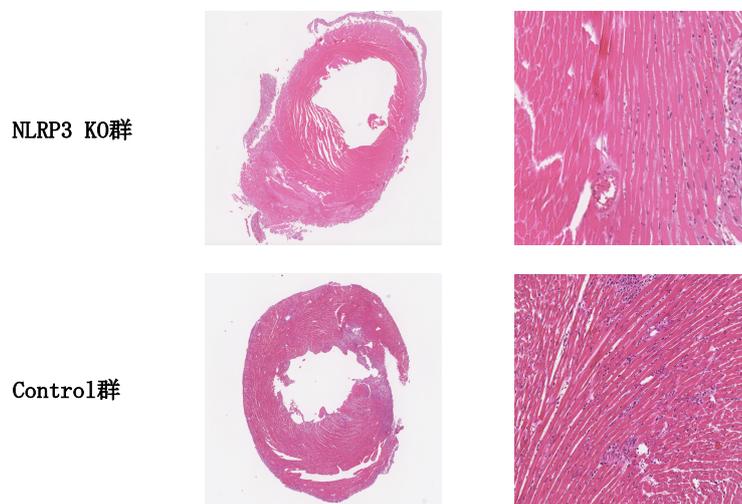
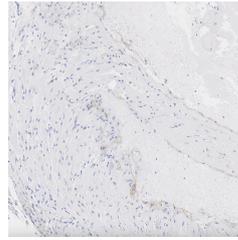
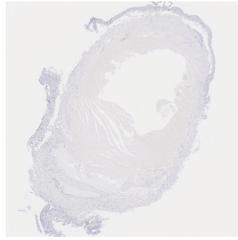


図1 移植後5日におけるHE染色

(ii) 図 2 は ICAM1 の免疫染色を示す。炎症細胞の浸潤部位と一致して発現が見られたが、壊死が進行していたため多くの発現は確認できなかった。コントロール群でも同様に発現が見られた。

NLRP3 KO群



Control群

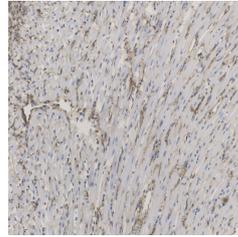
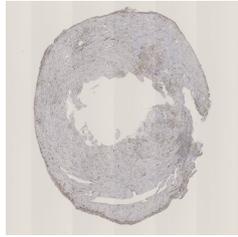
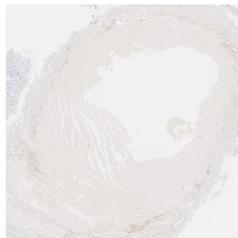


図2 免疫染色 ICAM1

図3は Cleaved Caspase-3 の免疫染色を示す。炎症細胞の浸潤部位と一致して発現が見られたが、壊死が進行していた。コントロール群でも同様に発現が見られた。

NLRP3 KO群



Control群

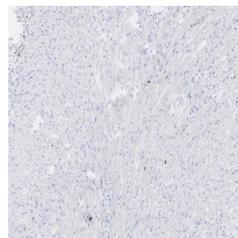
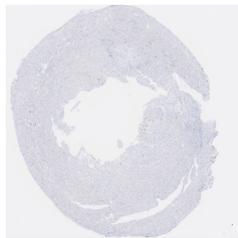
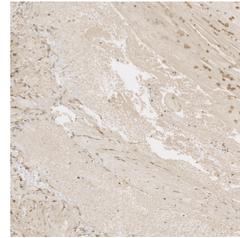
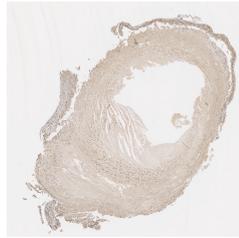


図3 免疫染色 Cleaved Caspase-3

図4は NLRP3 の免疫染色を示す。コントロール群では炎症細胞の浸潤部位と一致して発現が見られた。NLRP3 ノックアウト群では発現は確認されなかった。

NLRP3 KO群



Control群

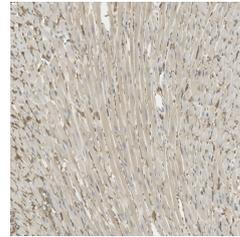


図4 免疫染色 NLRP3

(3) サイトカインの解析

移植後 5 日に犠牲死させ IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 に関して、RT-PCR を施行した。現在、データの解析を行っている。

(4) 慢性拒絶モデル作成と生着率の比較

NLRP3 ノックアウトマウス (C57BL/6 (H-2b) バックグラウンド) マウスをドナー、B6. C-H-2bm12 をレシピエントに用い、急性期モデル同様の異所性心移植モデルを作成した。コントロール群として、B6. C-H-2bm12 マウスをドナーとした MHC マイナーミスマッチモデルを用いた。移植後 21 日、42 日に犠牲死させて移植心を摘出した。現在データを解析中である。

これまでの研究で、NLRP3 は急性拒絶反応と関与していた。二群間でのグラフト生着率に有意差はなかったが、組織学的には NLRP3 ノックアウト群で炎症細胞浸潤や心筋障害の程度は重度であった。急性拒絶反応との関連を解析すべく移植後 5 日の摘出心で Caspase-3、ICAM3、CD45、CD3、CD31、 α SMA、NLRP3 で免疫染色を行った結果、NLRP3 ノックアウト群で Caspase-3、ICAM3 の発現を認めたが、壊死が進行していた。RT-PCR、ERISA を施行し現在データを解析中である。また、NLRP3 が慢性拒絶に関与している可能性を考慮し、現在慢性拒絶モデルを作成し、現在データ解析をすすめている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------