

令和元年6月15日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09288

研究課題名(和文) インフラマソームからみたバレット食道の発生ならびに発癌機序の解明と予防法の確立

研究課題名(英文) Role of inflammasome in Barrett's esophagus and esophagus cancer

研究代表者

渡邊 俊雄 (Watanabe, Toshio)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50336773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、ラットでは、逆流性食道炎の形成時、特に後期でNLRP3インフラマソームが病態に関与していることが明らかになったが、NLRP3インフラマソームにより誘導されたIL-1 およびIL-18のどちらが主導的な役割を果たしているのか、傷害促進的に働いているのか、保護的に働いているのかは未だ不明のままである。特に本実験に用いるモデルは作成が難しく、特にマウスに傷害を作成し検討することは実験の継続が困難であった。そのため、今後は培養細胞を用いた検証や、違う手法でのモデル作成を用いての研究が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は食道上皮の慢性炎症とそれに引き続いての炎症発癌にインフラマソームの活性化が関与しているかを検討した研究となる。直接的な影響の結論がでるには至らなかったが、今後インフラマソームに注目することにより食道炎症、発がんに影響をあたえることができる可能性があることを示唆している。特にインフラマソーム抑制薬がベーチェット病などの炎症性腸疾患にも使用され始めていることもあり、食道炎症、発癌の予防薬としても使用できれば臨床的なインパクトは大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that NLRP3 inflammasome is involved in the pathological condition, especially in the later stages of formation of reflux esophagitis in rats. The role of NLRP3 inflammasome-induced IL-1 and IL-18 has been still unclear and we cannot conclude that the inflammasome promotes or protects from the injury. In particular, it was difficult to create a model, especially to create and examine the mice injury. Therefore, in the future, it was thought that research using modeling with different methods and cultured cells were necessary.

研究分野：消化器内科学

キーワード：インフラマソーム

## 1. 研究開始当初の背景

バレット食道とは、胃酸逆流、胆汁酸逆流などによる食道胃接合部の慢性炎症のため、食道下部の粘膜が円柱上皮に化生した状態のことであり、バレット食道癌の発生源地である。その発生や進展には、胃酸や胆汁の逆流に加えて、食事や遺伝的素因などの様々な要因が複雑に関連していると考えられているが、現在のところそのメカニズムは完全には明らかになっていない。現在、バレット食道を発生源地とする食道癌の発生を抑制するために、前癌病変であるバレット食道の時点からの治療が試みられているが成功していない。

インフラソームとは、カスパーゼ1とASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) および自然免疫に関与する分子群であるNOD-Like receptor (NLR)で構成されるカスパーゼ1を活性化させるための分子基盤である。活性化したカスパーゼ1がIL-1 $\beta$ 、IL-18を成熟型に変換し、分泌を促進させることにより、自然免疫の一翼を担っている。

現在では、刺激の種類に応じて様々な種類のNLRがインフラマソームを構成することが知られており、NLRP1、NLRP4、AIM2インフラマソームなどが同定されているが、その中でも特にNLRP3インフラマソームは痛風や2型糖尿病などの原因として最近注目されている。

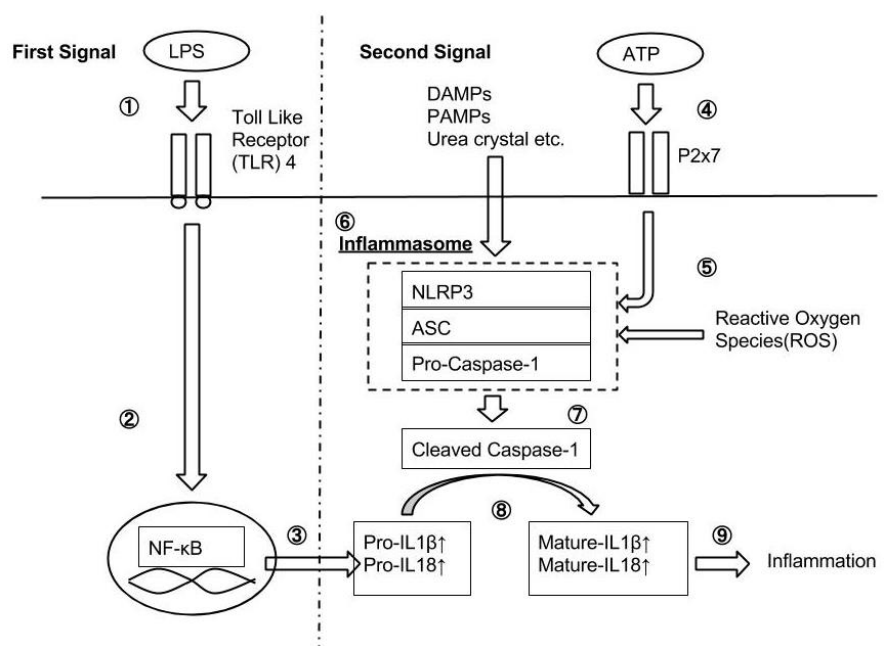
特にNLRP3インフラマソームは以下に示すとおり、First SignalとSecond Signalの2つのステップを経て最終的にIL-1 $\beta$ 、IL-18の成熟化、放出を行っていると考えられている。

### (1) First Signal

- ① グラム陰性桿菌構成成分である Lipopolysaccharide (LPS) や DAMPs (Damage-associated molecular pattern molecules) などを細胞膜上の Toll Like Receptor (TLR) 4 が認識する。
- ② TLR4 シグナルパスウェイにより結果的に NF- $\kappa$ B が活性化される。
- ③ NF- $\kappa$ B により、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の前駆体である Pro-IL-1 $\beta$ 、Pro-IL-18 が生成される。

### (2) Second Signal

- ④ ATP が膜表面の P2X7 で認識され、細胞内にシグナルが伝達される。
- ⑤ Reactive Oxygen Species (ROS) が誘導される。
- ⑥ NLRP3 はアダプタータンパク質の ASC を介し、カスパーゼ1の前駆体であるプロカスパーゼ1を集約させ、巨大タンパク複合体であるインフラマソームを形成する。
- ⑦ カスパーゼ1の活性化が引き起こされる。
- ⑧ カスパーゼ1が前駆体である pro-IL-1 $\beta$ 、Pro-IL-18 を IL-1 $\beta$ 、IL-18 へと活性化する。
- ⑨ IL-1 $\beta$ 、IL-18 が細胞外に放出され、好中球の誘引など様々な細胞を介して炎症を増悪をきたす。同時に Pyroptosis と呼ばれる炎症性細胞死を引き起こす。



インフラマソームは心筋梗塞、腎硬化症、肺線維症、痛風、糖尿病、家族性地中海熱などの様々な炎症性の疾患の主な病因であることが明らかになっている。消化管でも主に炎症性腸疾患との関連が動物モデルを用いて研究されているが、今のところインフラマソームパスウェイが腸管保護的に働くか傷害的に働くかについての結論はまだ出ていない。これはインフラマソームパスウェイの活性化により IL-1 $\beta$  と IL-18 の両方が放出されるためである。

Bauer らはインフラマソームの構成蛋白の一つである NLRP3 の遺伝子を欠損させたマウスでは、マウス実験腸炎が軽減することを報告している。その下流のカスパーゼ1の阻害薬を使用するもしくは、カスパーゼ1遺伝子を欠損させることによっても、やはりマウス実験腸炎が軽減するとの報告もある。これは、インフラマソームにより産生される IL-1 $\beta$  が組織傷害的な作用を持つためである。しかしながら、同様の処置すなわち、NLRP3 遺伝子欠損マウス、カスパーゼ1遺伝子欠損マウスの使用、カスパーゼ1阻害薬の投与であっても、反対にマウス実験腸炎が悪化するとの報告がAllenらなど様々なグループよりなされている。これは、IL-1 $\beta$  の作用とは対照的に、IL-18 が組織保護的に働くためであると主張されている。このように大腸炎では諸説ありインフラマソームの働きについての結論は出ていない。小腸に関しては我々は以前の検討で NSAIDs 起因性小腸傷害マウス実験モデルでは NLRP3 インフラマソームが IL-1 $\beta$

の活性化を通じて小腸組織傷害的に働いており、インフラマソームの阻害薬であるコルヒチン投与で傷害が改善することを示した。

このように、下部消化管に注目した先行研究は存在するが、上部消化管での報告は少なく、特に逆流性食道炎からバレット食道そしてバレット発癌に通じる食道の炎症においてインフラマソームがどのような役割を果たしているかについての報告は無い。しかし、IL-1 $\beta$ が前がん病変であるバレット食道の進展に寄与しているという報告がすでに存在し、IL-1 $\beta$ がバレット食道発癌の一つの因子であることはすでに証明されているため、インフラマソームパスウェイが食道炎症発癌において重要な役割を果たすと想定される。

## 2. 研究の目的

本研究では、食道の慢性炎症、正常上皮から前癌病変であるバレット食道上皮への転化、ひきつづいておこる発癌のそれぞれのステップにおいてインフラマソームが果たす役割を明らかにし、最終的にはバレット発癌の予防治療に繋がる知見を得ることを目標とする。そのため、以下に示す項目について検討する。

(1)食道正常上皮からバレット発癌に至るどのステップで上皮細胞を舞台としたインフラマソームの活性化とそれに引き続いての成熟型 IL-1 $\beta$  と IL-18 の放出が起こるかを付随するシグナル経路にも注目しながら明らかにする。

(2)食道で観察されたインフラマソームの活性化が、現在バレット食道化との関連が示唆されている胃酸、胆汁酸、PAMPs、DAMPs、活性酸素などの因子由来であるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)胃酸逆流による食道上皮の慢性炎症においてインフラマソームが果たす役割の検討 使用モデル

逆流性食道炎モデルは小村らの方法を用いて制作する。具体的には、マウスあるいはラットの前胃を結紮後、十二指腸にネラトンカテーテルを細断したものを被包し、胃内容物の食道への逆流を誘導する。同モデルでは十二指腸が正常に比べて狭窄するため、胃酸を含め、胃内容物の逆流がひきおこり、食道下部に粘膜傷害、慢性炎症がみられる。

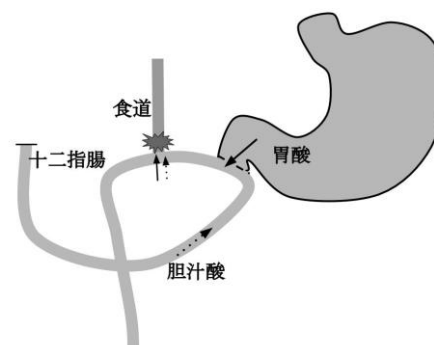
#### 検討項目

- ①食道ではどの NLRPs が主に存在し炎症に関わるかを RT-PCR などで測定する。
- ② NLRPs、カスパーゼなどのインフラマソーム関連蛋白の免疫染色を行い食道上皮細胞、炎症細胞それぞれの抗原局在の観察と半定量を行う。
- ③ Western Blotting で、インフラマソーム関連蛋白と、下流蛋白である成熟型 IL-1 $\beta$ 、活成熟型 IL-18、カスパーゼ 1 の半定量を行う。
- ④ NLRPs、カスパーゼ 1 のノックアウトマウスを用い、シグナル経路の精査確認を行う。
- ⑤外因的にインフラマソーム装置の最終産物である成熟型 IL-1 $\beta$ 、成熟型 IL-18、もしくはその中和抗を投与し、インフラマソームが食道下部の慢性炎症に及ぼす影響を検討する。
- ⑥インフラマソームを抑制する薬剤であるコルヒチン、カスパーゼ 1 阻害薬 YVAD などを用い、インフラマソームを抑制することが逆流性食道炎の粘膜傷害の治療につながるのかを探索する。
- ⑦上流の TLR4 のシグナルにも注目しながら、胃酸による細胞傷害により生じた DAMPs や、口腔内細菌の落下などの PAMPs がインフラマソームを誘導しているかなど、インフラマソーム活性化のトリガーとなりうる因子を同定する。



### (2)酸、胆汁酸逆流による食道上皮の炎症発癌においてインフラマソームが果たす役割の検討 使用モデル

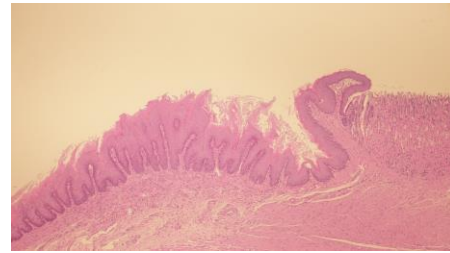
前癌病変であるバレット食道と引き続いての発癌モデルは Zhang らの方法で制作する。具体的には、十二指腸を切断後、口側断端を空腸と端側吻合、食道胃接合部より肛門側で食道を切断し、食道近位断端を空腸と端側吻合する。十二指腸肛門側断端ならびに、食道の肛門側断端は閉鎖する。このモデルでは食道内に胃酸と胆汁酸の同時逆流がおこり約 8 割に前がん病変であるバレット食道が形成され、約半数にバレット発癌が形成されることが報告されている実績のあるモデルである



#### 4. 研究成果

##### (1) ラットにおける逆流性食道炎モデルでの NLRP3 インフラマソーム

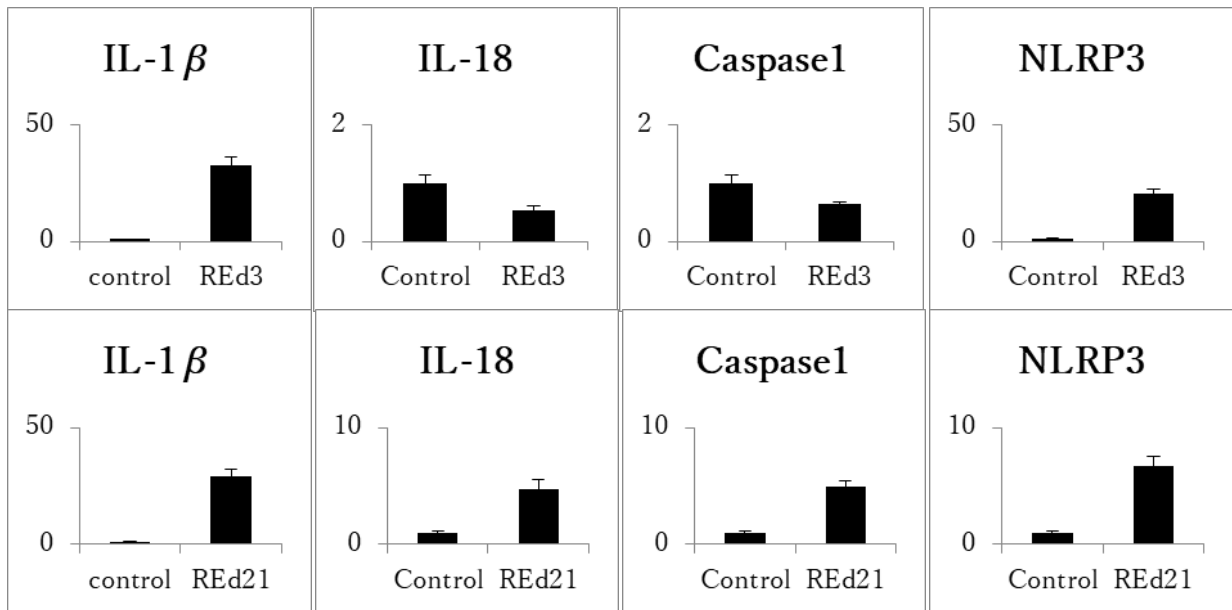
ラットに先述の方法で逆流性食道炎を作成した。モデルによる逆流性食道炎の程度は、右に示すように HE 染色を行い顕微鏡的に判定した。実験期間全体でのモデル作成成功率は約 20%と既報通りであった。



モデル作成後 3 日目を REd3 とし、胃酸逆流による炎症形成の前期を、モデル作成後 21 日目を REd21 とし、炎症形成の後期を評価した。

mRNA をリアルタイム PCR で評価したところ、REd3 では、カスパーゼ 1 については有意差を認めなかったが減少傾向であった。反対に NLRP3 インフラマソームの構成成分である NLRP3 に関しては有意差を持って上昇した。また、インフラマソームの結果誘導される IL-1 $\beta$  は上昇していたが、反対に IL-18 の mRNA については有意差はみとめなかったが減少傾向であった。

REd21 では REd3 と異なりカスパーゼ 1 及び NLRP3 の mRNA の上昇を認めた。また、インフラマソームにより活性化される IL-1 $\beta$  および IL-18 の上昇も認めた。



次に RE 作成後の蛋白のウェスタンブロットを試みた。まず pro-Caspase1 および mature-Caspase1 の検出を試み、数種類の抗体での検出をこころみたが、非特異的な蛋白検出しかされなかったため、評価困難であった。

以上の結果より、Caspase1 のノックアウトなどの実験は、ウェスタンブロットで pro-Caspase1 および mature-Caspase1 の検出に成功しているマウスを用いて行うこととした。また、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の外因的投与、中和抗体の投与も試みたが、致死率の高さ、必要薬剤の量を計算し、可能であればマウスにて同様のことが可能かを実験してから行ったほうがよいと判断した。

##### (2) マウスにおける逆流性食道炎モデルでの NLRP3 インフラマソーム

(1)の結果を受けて、マウスにおける逆流性食道炎モデルでの NLRP3 インフラマソームについての検討を試みた。ラットにおこなった手術と同様の方法で逆流性食道炎の作成を試みたが致死率 100%であったため、断念した。

NLRP3 ノックアウトマウス、Caspase1 ノックアウトマウスに関しても本実験のために購入し実験に用いられるように、数を増やしたが、手術に関しては数匹行ったところで断念した。

次に既報にあったネオジウム磁石を用いた切開が最小限となる方法を試みた。ネオジウム磁石 : 1.5 $\times$ 0.8mm を用意し、胃の大湾側を切開し、まず下部食道に磁石を留置。次に切開部より幽門を超えて磁石を挿入。小腸壁の外側から磁力を用いて内腔にある磁石を誘導した。その後小腸を持ち上げ、下部食道と接触できるまで剥離した。しかしながら、この剥離過程で、腸間膜の血管の損傷による出血が避けられず、全例死亡したため、研究期間内ではモデルの完成に至らなかった。

##### (3) ラット、マウスにおけるバレット食道モデルでの NLRP3 インフラマソーム

ラット、マウスに上述の方法でバレット食道モデルを制作し NLRP3 インフラマソームについての検討を試みた。ラットにおける手術では、術中、術後の生存率が低く、10%以下となったため、それ以降の検討が困難であった。マウスにおいては吻合が困難で違う手術方法を考えることが

必要と想定された。

## 結語

本研究では、バレット食道、逆流性食道炎に NLRP3 インフラマソームが関与しているかを検証した。ラットによる実験では、逆流性食道炎の形成特に後期で NLRP3 インフラマソームが病態に関与していることが明らかになったが、NLRP3 インフラマソームにより誘導された IL-1 $\beta$  および IL-18 のどちらが主導的な役割を果たしているのかや、傷害促進的に働いているのか、保護的に働いているのかは未だ不明のままである。既報にあった方法でマウスに傷害を作成しメカニズムを明らかにしようとしたが、手技による致死率が高く検証が困難であった。また、胃酸と胆汁酸の両方が逆流するバレット食道モデルではさらに傷害度が高く致死率が高く実験の継続が困難であった。新しいモデル作成方法を試みるも手技が安定しなかった。そのため、今後は培養細胞を用いた検証や、違う手法でのモデル作成を用いての研究が必要であると考えられた。

## 6. 研究組織

本研究は大阪市立大学 医学部 消化器内科にて行った。結果や手法に関しては大阪市立大学 医学部消化器内科におけるカンファレンスで議論し、アドバイスを得て修正を試みながらおこなった。

研究分担者氏名：藤原 靖弘  
ローマ字氏名：(Yasuhiro, Fujiwara)  
所属研究機関名：大阪市立大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：教授  
研究者番号 (8 桁)：40285292

研究分担者氏名：谷川 徹也  
ローマ字氏名：(Tetsuya, Tanigawa)  
所属研究機関名：大阪市立大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：准教授  
研究者番号 (8 桁)：70423879

研究分担者氏名：富永 和作  
ローマ字氏名：(Kazunari, Tominaga)  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：特別任命教員教授  
研究者番号 (8 桁)：80336768

その他の研究協力者：なし