

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16329

研究課題名(和文) 腸管虚血再灌流障害における新規自然炎症経路NLRP3インフラマソームの役割の解明

研究課題名(英文) Role of NLRP3 inflammasome in intestinal ischemia/reperfusion and subsequent acute lung injury

研究代表者

井上 賢之 (Inoue, Yoshiyuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80375279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NLRP3インフラマソーム関連分子欠損マウスでは腸管虚血再灌流(I/R)後の生存が延長することを見出した。NLRP3欠損により、腸管炎症には有意な抑制を認めなかったが、腸管I/Rに続発する肺血管透過性の亢進や炎症反応による急性肺障害が有意に抑制された。骨髄移植実験により非骨髄由来細胞の寄与が示唆され、肺血管内皮細胞のNLRP3インフラマソームが腸管I/R障害後の急性肺障害に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肺血管内皮細胞におけるNLRP3インフラマソームが腸管I/R障害に続発する肺血管透過性の亢進による急性肺障害において重要な役割を果たしていることを明らかにした。腸管I/R障害と肺障害を繋ぐ新たな分子機序および新たな臓器連関機構の解明という点から、本研究の学術的な意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury leads to inflammation and remote organ damage. The NLRP3 inflammasome regulates the caspase-1-dependent release of IL-1 after I/R injury. Here, we investigated the role of the NLRP3 inflammasome in mice with intestinal I/R injury. Deficiency of NLRP3, ASC, caspase-1, or IL-1 prolonged survival after intestinal I/R injury. NLRP3 deficiency prevented intestinal I/R-induced acute lung injury (ALI) characterized by inflammation and vascular permeability. Bone marrow chimeric experiments showed that NLRP3 in non-bone marrow-derived cells was the main contributor to development of intestinal I/R-induced ALI. The NLRP3 inflammasome in lung vascular endothelial cells is thought to be important to this process. These findings provide new insights into the mechanism underlying intestinal I/R-induced ALI, and suggest that endothelial NLRP3 inflammasome is a novel potential target for treating and preventing this disorder.

研究分野：医歯薬学・消化器外科学

キーワード：インフラマソーム 炎症反応 サイトカイン 腸管虚血再灌流 肺血管内皮細胞

## 1. 研究の開始当初の背景

腸管虚血再灌流 (ischemia-reperfusion : I/R) 障害は、急性腸管膜虚血小や腸管捻転、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。この病態には、活性酸素種や好中球浸潤による炎症反応および組織障害が主要な役割を果たしていると考えられる。また、腸管 I/R 障害により腸管粘膜バリアの破綻が生じると腸内細菌等のトランスロケーションを引き起こして炎症反応が増悪し、結果として多臓器不全が誘発されて死に至る場合もある。しかしながら、腸管 I/R 障害における炎症反応の惹起機構および、腸管や他の臓器への障害機序については不明な点が多く、これに対する有効な治療法も確立されていない。

NLRP3 インフラマソーム (inflammasome) は、カスパーゼ-1 (Casp1) の活性化を誘導する細胞内分子複合体であり、主として NLRP3 (Nod-like receptor [NLR] family, pyrin domain-containing 3) とアダプター分子 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)、Casp1 から構成される。NLRP3 インフラマソームが形成されると、Casp1 の活性化により強力な炎症性サイトカインである interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の産生が誘導され、炎症反応が惹起される。申請者らのグループは、この NLRP3 インフラマソームが心臓や肝臓の I/R による炎症惹起に関与していることを報告しているが [1-3]、現在のところ、腸管 I/R 障害における NLRP3 インフラマソームの役割はわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腸管 I/R 障害における NLRP3 インフラマソームの役割を明らかにすることである。特に、腸管 I/R 障害に続発する肺障害の重要性が示唆されたことから、この分子機構の解明を行うことで、新たな治療法の開発や臓器連関機構の解明の手がかりを得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) マウス腸管 I/R モデルの作成 : 野生型 C57BL/6J マウス (wild-type : WT ; ♂、8-12 週齢) および NLRP3 欠損 (NLRP3<sup>-/-</sup>)、ASC<sup>-/-</sup>、Casp1<sup>-/-</sup>、IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> マウス (C57BL/6J background) を使用した。マウス腸管 I/R 障害モデルは、腸管膜を折り畳み、その基部をクリップすることにより作成した [4]。全ての動物実験は、自治医科大学動物実験倫理委員会に許可されたプロトコール (承認番号 17172-01) で実施し、動物愛護の精神のもとで行った。

(2) 炎症性サイトカインと NLRP3 インフラマソーム活性化の評価 : IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現および IL-1 $\beta$  タンパク濃度は、real-time RT-PCR 法および ELISA 法により評価した。細胞での NLRP3 インフラマソーム活性化は、lipopolysaccharide (LPS) で priming した後、インフラマソーム活性化薬である ATP あるいは Nigericin (Nig) で処理し、上清 (Sup) と細胞溶解液 (Lys) をウェスタンブロット法により解析した。

(3) マウス骨髄移植モデルの作成 : レシピエントマウスに 9Gy の放射線を照射した後、ドナーマウスから採取した骨髄細胞を静脈内注射し、2 ヶ月後に実験に使用した。

(4) 肺血管内皮細胞の単離と培養：Lung Dissociation Kit (Miltenyi Biotec)を用いて、肺の細胞を single-cell とした後、磁気ビーズを用いて肺血管内皮細胞 (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>) を単離して培養した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 腸管 I/R 障害における NLRP3 インフラマソームの役割

腸管 I/R により、WT マウスでは 48 時間以内に約 90%のマウスが死亡したが、NLRP3<sup>-/-</sup>や ASC<sup>-/-</sup>、Casp1<sup>-/-</sup>、IL-1β<sup>-/-</sup>マウスでは生存率が有意に改善した (図 1A)。以降の実験では、最も生存率の改善が良かった NLRP3-KO マウスを用いて、その機序を解析することにした。腸管 (小腸) での組織傷害は、NLRP3<sup>-/-</sup>でやや改善していたが、インフラマソームの下流サイトカインである IL-1β や IL-18 の発現には WT と NLRP3<sup>-/-</sup>マウスで有意な差を認めなかった (図 1B)。また、もう一つの代表的な炎症性サイトカインである TNF-α の発現にも有意な差を認めなかった。

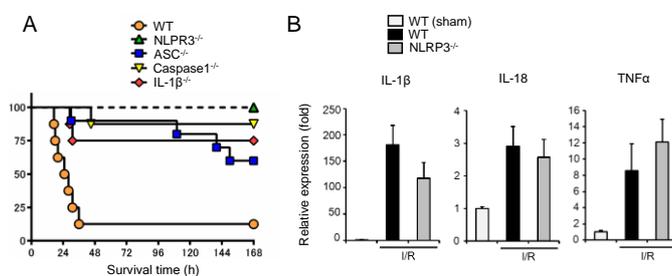


図1 腸管I/R障害におけるNLRP3インフラマソームの役割

##### (2) NLRP3-KO マウスにおける腸管 I/R 障害後肺障害の抑制

腸管 I/R は遠隔臓器での障害を引き起こすことから、肺や心臓、肝臓、腎臓について組織傷害を評価したところ、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスの肺において炎症性細胞浸潤や肺胞壁の肥厚、うっ血や肺胞浮腫といった組織傷害が有意に抑制されていた (図 2A・B)。一方、心臓や肝臓、腎臓における組織では、その傷害に大きな変化を認めなかった。さらに、エバンスブルー色素注入実験により、WT マウスで認められた肺血管透過性の著明な亢進が、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスではほぼ完全に抑制されていることがわかった (図 2C)。

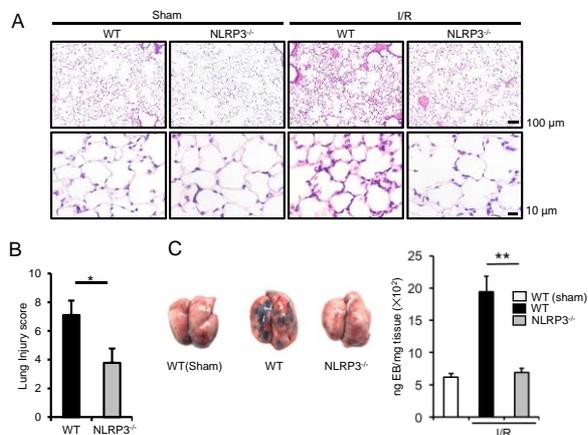


図2 NLRP3<sup>-/-</sup>マウスにおける腸管I/R障害後肺障害の抑制

### (3) 肺血管内皮細胞における NLRP3 インフラマソームの役割

NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでの腸管 I/R 後の肺障害において、骨髄細胞由来の炎症細胞と非骨髄細胞の寄与を検証するため、マウス骨髄移植モデルを作成した。WT および NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでの結果と同様に、WT 骨髄細胞を WT マウスに移植したマウス (WT→WT) と比較して、NLRP3<sup>-/-</sup>骨髄細胞を NLRP3<sup>-/-</sup>マウスに移植したマウス (NLRP3<sup>-/-</sup>→NLRP3<sup>-/-</sup>) では腸管 I/R 後の生存率が有意に改善した (図 3A)。一方、NLRP3<sup>-/-</sup>骨髄細胞を WT マウスに移植したマウス (NLRP3<sup>-/-</sup>→WT) では、生存率が改善しなかったが、WT 骨髄細胞を NLRP3<sup>-/-</sup>マウスに移植したマウス (WT→NLRP3<sup>-/-</sup>) では NLRP3<sup>-/-</sup>→NLRP3<sup>-/-</sup>マウスと同程度に生存率が改善した。このことから、非骨髄細胞における NLRP3 インフラマソームが腸管 I/R 後の肺障害において重要な役割を果たしていることが示唆された。NLRP3<sup>-/-</sup>マウスでは、肺血管透過性の亢進が著明に抑制されていたことから、肺組織から肺血管内皮細胞 (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>) を単離して解析を行った (図 3B)。腸管 I/R 後 4 時間で単離した肺血管内皮細胞において NLRP3 の発現が増加していた (図 3C)。また、肺血管内皮細胞にインフラマソーム活性化薬である ATP や Nigericin を処理すると IL-1β のプロセシングや上清中への IL-1β 産生の増加を認めた。これら IL-1β のプロセシングや産生は、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスから単離した血管内皮細胞では認められなかった (図 3D・E)。これらの結果から、NLRP3 インフラマソームが腸管 I/R 障害に続発する急性肺障害において重要な役割を果たしていることが明らかになった (論文投稿中)。

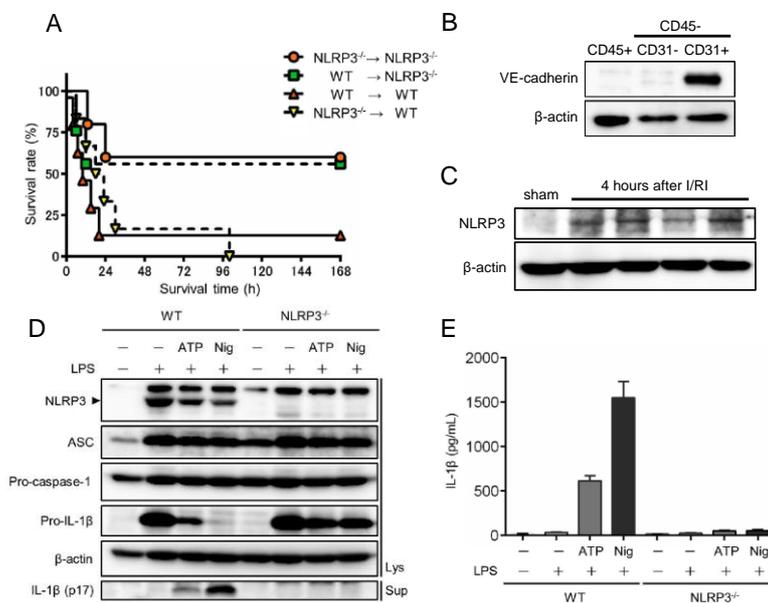


図3 肺血管内皮細胞におけるNLRP3インフラマソームの役割

<引用文献>

1. 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
2. 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. NLRP3 regulates neutrophil function and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *J Immunol* 192: 4342-4351, 2014
3. Sadatomo A, Inoue Y, Ito H, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Mizushina Y, Nakamuara J, Kamata R, Karasawa T, Horie H, Sata N, Takahashi M. Interaction of neutrophils with macrophages promotes interleukin-1 $\beta$  maturation and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 199: 3306-3315, 2017
4. Ito H, Sadatomo A, Inoue Y, Yamada N, Aizawa E, Hishida E, Kamata R, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Komada T, Horie H, Kitagawa J, Sata N, Takahashi M. Role of TLR5 in inflammation and tissue damage after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 519: 15-22, 2019

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ito Homare, Sadatomo Ai, Inoue Yoshiyuki, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Hishida Erika, Kamata Ryo, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Horie Hisanaga, Kitayama Joji, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 519
2. 論文標題 Role of TLR5 in inflammation and tissue damage after intestinal ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 15～22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.08.083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hishida Erika, Ito Homare, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Kamata Ryo, Aizawa Emi, Kasahara Tadashi, Morishita Yoshiyuki, Akimoto Tetsu, Nagata Daisuke, Takahashi Masafumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Crucial Role of NLRP3 Inflammasome in the Development of Peritoneal Dialysis-related Peritoneal Fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46504-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Naoya, Karasawa Tadayoshi, Wakiya Taiichi, Sadatomo Ai, Ito Homare, Kamata Ryo, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kimura Hiroaki, Sanada Yukihiro, Sakuma Yasunaru, Mizuta Koichi, Ohno Nobuhiko, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia reperfusion injury in liver transplantation: Potential role of ferroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ajt.15773	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa E, Karasawa T, Watanabe S, Komada T, Kimura H, Kamata R, Ito H, Hishida E,	4. 巻 -
2. 論文標題 GSDME-dependent incomplete pyroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 4. 伊藤誉、佐田友藍、井上賢之、鎌田諒、渡邊幸子、唐澤直義、木村博昭、佐田尚宏、高橋将文
2. 発表標題 腸管虚血再灌流障害におけるNLRP3インフラマソームの役割の解明
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----