



Title	Interleukin -18- deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock
Author(s)	坂尾, 宣充
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41645">https://hdl.handle.net/11094/41645</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	坂 尾 宣 充
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14472 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Interleukin - 18 - deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock (インターロイキン18欠損マウスはエンドトキシンによる肝障害に対して抵抗性であるがエンドトキシンショックに対して高感受性である)
論文審査委員	(主査) 教授 菊谷 仁  (副査) 教授 平野 俊夫. 教授 仲野 徹

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

一般にヒトはグラム陰性菌の感染によりグラム陰性菌由来のエンドトキシン (LPS) により肝障害を含む多臓器不全を伴う敗血症性ショックに陥る。LPS は敗血症性ショックの病態形成に重要で、各種の炎症性メディエーターの産生を引き起こす。それらのメディエーターとして TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  および NO が知られている。

一方、インターロイキン18 (以下IL-18) は最初活性化マクロファージとクッパー細胞から分泌され、タイプI Tヘルパー細胞 (Th1細胞) からインターフェロン $\gamma$  (以下IFN- $\gamma$ ) 産生を誘導するサイトカインとして同定された。IL-18はIL-12と協調しナチュラルキラー細胞を活性化し、活性化T細胞の増殖を促す。また、IL-18はプロピオニバクテリウム、アクネス (以下P.acnes) 処理マウスのリポ多糖 (以下LPS) による肝障害において重要な役割を担っている。なぜなら、P.acnes 処理マウスのLPSによる肝障害は抗IL-18抗体の投与により防げることが示されたからである。本研究において私は、LPSによるエンドトキシンショックと肝障害におけるIL-18の生理的役割を解明するためIL-18ノックアウトマウスを用いて解析した。

#### 【方法ならびに成績】

LPSによる肝障害を観察するために12週令のマウスに200 $\mu$ gの熱処理したP.acnesの死菌を腹腔内に投与し、7日後にLPSを2 $\mu$ g静注した。LPS負荷24時間後組織を病理学的に観察した。野生型マウスの肝組織は巣状壊死像があり肝障害が認められた。一方IL-18ノックアウトマウスの肝組織は軽度の静脈うっ滞はみられたが、巣状壊死像はみられなかった。血清トランスアミナーゼAST, ALTは野生型マウスでは著明に上昇していたが、IL-18ノックアウトマウスでは、P.acnes処理せずLPS負荷していないマウスと同等の値であった。

肝組織を観察した際、P.acnes処理後LPS負荷したIL-18ノックアウトマウスは肝障害を認めなかったにもかかわらず、何匹か死亡した。一方、同様に処理した野生型マウスは殆ど死ななかった。そこでIL-18ノックアウトマウスのLPSによるエンドトキシンショックに対する感受性をさらに詳細に解析するため、P.acnesによる感作を強めて以下の実験を行った。マウスに1mgの熱処理したP.acnesの死菌を腹腔内に投与し、7日後にLPSを1 $\mu$ g静注した。野生型マウスの半数がLPS負荷後12時間以上生存していたが、IL-18ノックアウトマウスはLPS負荷後4時

間以内にすべて死亡した。以上より *P.acnes* 処理した IL-18 ノックアウトマウスは LPS によるエンドトキシンショックに対して高感受性であることが証明された。

LPS によるエンドトキシンショックと炎症性メディエーターの上昇はよく相関する事が報告されている。そこで *P.acnes* 処理した野生型マウスと IL-18 ノックアウトマウスに LPS 負荷した後に血清サイトカインおよびメディエーターの濃度を測定した。両群マウスに 200  $\mu$ g の熱処理した *P.acnes* の死菌を腹腔内に投与し、7 日後に LPS を 2  $\mu$ g 静注した。IL-12 および NO の値は野生型マウスと IL-18 ノックアウトマウスとも同じ値で推移した。IFN- $\gamma$  の値は IL-18 ノックアウトマウスで上昇はしたが野生型マウスと比べると著明に低く、IL-18 が IFN- $\gamma$  産生を誘導するという事を支持した。IL-1  $\beta$ , IL-6 の値は IL-18 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ 3 時間後では少し高く、6 時間後では 3 時間後の値を維持したが、野生型マウスでは低下した。TNF- $\alpha$  の値は野生型マウスでは LPS 負荷 1.5 時間後有為に上昇したが、IL-18 ノックアウトマウスでは 1.5 時間後著明に上昇し、野生型マウスの約 10 倍に達した。以上より IL-18 ノックアウトマウスでは TNF- $\alpha$  の著しい上昇と IL-1  $\beta$ , IL-6 の濃度上昇が遷延することから、IL-18 がエンドトキシンショックの際に上昇するサイトカインのネガティブレギュレーターとして重要な役割をはたしていることが示唆された。

IL-18 ノックアウトマウスはエンドトキシンショックの際、TNF- $\alpha$  を過剰産生したあと短時間で死亡するという結果を得た。TNF- $\alpha$  の過剰産生とエンドトキシンショックに高感受性であることとの関係を確認するために、IL-18 ノックアウトマウスに抗 TNF- $\alpha$  中和抗体を投与する実験を行った。IL-18 ノックアウトマウスに 1 mg の熱処理した *P.acnes* の死菌を腹腔内に投与し、7 日後に LPS を 1  $\mu$ g 静注した。LPS 負荷 30 分前に家兎ポリクロナール抗 TNF- $\alpha$  抗血清あるいは対照家兎免疫グロブリンを投与した。抗 TNF- $\alpha$  抗血清投与群では対照群に比べ生存率が著明に改善した。以上より IL-18 ノックアウトマウスが LPS によりエンドトキシンショックで死亡するのは著しく上昇した TNF- $\alpha$  が原因であることが示唆された。

TNF- $\alpha$  は LPS の刺激により主にマクロファージから産生される。そこで、腹腔マクロファージからの TNF- $\alpha$  の産生について解析した。*P.acnes* 処理したマウスから腹腔マクロファージを採集し、LPS 存在下、非存在下で培養し、上清中の TNF- $\alpha$  を ELISA により測定し、細胞はノザンプロット解析による TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量の測定に使用した。上清中の TNF- $\alpha$  濃度は LPS 刺激した野生型マウスの腹腔マクロファージでは有為に上昇した。しかし、IL-18 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージの TNF- $\alpha$  産生は野生型マウスのそれに比べ約 6 倍高かった。ノザンプロット解析でも IL-18 ノックアウトマウスのマクロファージの TNF- $\alpha$  mRNA 量は野生型マウスのそれに比べ約 3 倍であった。しかし、IL-1  $\beta$  と IL-6 の mRNA 量は両群に差はなかった。以上より *P.acnes* 処理した IL-18 ノックアウトマウスのマクロファージにおいて LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生の増強は特異的であることが示唆された。

最後に *P.acnes* 感作における IL-18 の時間的関与を解析した。*P.acnes* 処理前日から 2 日おきに組み換え型 IL-18 を IL-18 ノックアウトマウスに投与していくと LPS 負荷後 TNF- $\alpha$  産生は減少し生存率が上昇した。逆に野生型マウスに抗 IL-18 抗体を *P.acnes* 処理前日から 2 日おきに投与していくと、LPS 負荷後 TNF- $\alpha$  の値は有為に上昇し生存率が減少した。以上より IL-18 は *P.acnes* 感作マウスの LPS に対する反応を抑制する働きをもつが、それは *P.acnes* 感作の時期で働いていることが示唆された。

〔総括〕

*P.acnes* で感作された IL-18 欠損マウスはエンドトキシンによる肝障害に対して抵抗性であるがエンドトキシンショックに対して高感受性であった。これは LPS による TNF- $\alpha$  の異常産生が原因であり IL-18 が *P.acnes* 感作後、TNF- $\alpha$  の産生を抑制することが示唆された。また、エンドトキシンと肝障害を含む多臓器不全は一連の症候群として考えられるが、一つのサイトカインがそれぞれに相反する作用を有していることを考えると興味深い。今後、IL-18 のエンドトキシンショックにおける役割をさらに分子生物学的に解析することが、その病態の解明につながると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、インターロイキン18欠損マウスを解析し、敗血症の病態形成においてインターロイキン18が重要な生理的役割をはたしていることを解明した論文である。インターロイキン18は、近年同定されたサイトカインでありその生理作用は、まだ明確にされていない。本研究では、遺伝子欠損マウスを世界に先駆けて作製し、それをを用いてその生理活性の一端を解明したものであり意義深い。また、本研究の結果から、インターロイキン18が、エンドトキシンショックという複雑な症候群の発症において特にTNF- $\alpha$ の産生抑制を通して負の制御を担っていることを明確にしており、今後のエンドトキシンショックの病態解明に一つの光明を灯したものと考えられる。よって本研究は、学位論文に値するものと認められる。