OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/41645
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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（さかおよしみつ）
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－α，IL－1，IL－6，IL－12，IFN－γ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ⅠTヘルパー細胞（Th1細胞）からインターフェロンγ（以下IFN－γ）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200μg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2μg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1μg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200μg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2μg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－γ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－γ産生を誘導するということを支持した。IL－1β，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－α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－αの著しい上昇とIL－1β，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－α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－α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の関係を確かめるために，IL－18ノックアウトマウスに抗TNF－α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1μg静注した。LPS負荷30分前に家兎ポリクロナール抗TNF－α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－α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－αが原因であることが示唆された。

TNF－α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－α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－αをELISAにより測定し，細胞はノザンブロット解析によるTNF－αのmRNA発現量の測定に使用した。上清中のTNF－α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－α産生は野生型マウスのそれに比べ約6倍高かった。ノザンブロット解析でもIL－18ノックアウトマウスのマクロファージのTNF－α 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－1β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－α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 －α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－α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－αの異常産生が原因でありIL－18がP.acnes感作後，TNF－α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。