



Title	A PROTECTIVE ROLE FOR INFLAMMASOME ACTIVATION FOLLOWING INJURY
Author(s)	大須賀, 章倫
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59722
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 >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	お お す か あき のり 大 須 賀 章 倫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 9 3 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	A PROTECTIVE ROLE FOR INFLAMMASOME ACTIVATION FOLLOWING INJURY (外傷後におこるインフラマソーム活性化の生体防御的役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 嶋 津 岳 士 (副査) 教 授 奥 村 明 之 進 教 授 熊 ノ 郷 淳

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的(Purpose)〕

インフラマソームは細胞内に存在するパターン認識受容体の一つであり、病原体や内因性の危険信号に応答して活性化され、炎症反応を惹起することが知られている。本研究の目的は外傷後にインフラマソームが活性化するか否かを明らかにすることにより、活性化するならばその経時的な変化及び活性化する免疫細胞を同定し、外傷後にインフラマソームが活性化することの機能的な意義を解明する。

〔 方法ならびに成績(Methods/Results)〕

カスパーゼ-1がインフラマソームより分離し、活性型のカスパーゼ-1になることが、インフラマソーム活性化経路の最終産物であるため、細胞内における分離型カスパーゼ-1 (p10 及びp20) を測定し、インフラマソームの活性化を計測することとした。初めにflow cytometryを用いたカスパーゼ-1 p10、p20の測定系を*in vitro*にて確立した。インフラマソーム活性の陽性コントロールとしてATP及びLPSを用いてマウスの脾臓細胞を刺激した。同時にFLICA(蛍光抗体認識カスパーゼ-1特異的阻害剤)を用いて我々の測定系が妥当であることを確認した。また、ATPとLPSの刺激によるサイトカインの産生を測定した。*In vitro*での測定系を確立した後、熱傷モデルマウスの創部所属リンパ節及び脾臓を摘出し、インフラマソームの活性を経時的に測定した。同時に血中のサイトカイン濃度も経時的に測定した。最後にカスパーゼ-1特異的阻害剤であるAC-YVAD-CMKを用いて熱傷モデルにおけるインフラマソームの活性化の意義を検証した。

結果は*in vitro*においてATPとLPSによる刺激でマクロファージ、樹状細胞、NK細胞内において顕著なインフラマソームの活性化が起こった。FLICAにおいて我々の測定系が妥当であることが確認された。また、CD4、CD8 T細胞及びB細胞においてもインフラマソームが活性化することが示された。ATPとLPSによる刺激において、IL-1βの産生は増加したが、IL-6、TNFαの産生は抑制された。*In vivo*の結果は、所属リンパ節ではマクロファージにおいて受傷後1時間よりインフラマソームの活性が見られるが、一過性であり4時間をピークとし、その後漸減していた。全身反応としては、マクロファージ及び樹状細胞内において所属リンパ節に引き続き、熱傷受傷2時間後からインフラマソームは活性化し、受傷1日をピークとして漸減した。FLICAによる染色でもインフラマソームの活性が受傷1日後に起こることが確認された。NK細胞、CD4 T細胞、B細胞においてもインフラマソームの活性がみられたが、CD8 T細胞においては認められなかった。インフラマソームの活性とアポトーシスの関連を調べるために、アポトーシスのマーカーであるAnnexin V陽性の細胞内でカスパーゼ-1濃度を測定したところ、熱傷群においてAnnexin Vの増加は見られたが、Annexin V陽性群におけるカスパーゼ-1の濃度には有意差は認められなかった。また血中サイトカインもインフラマソームの活性化と一致して上昇が見られた。次にAC-YVAD-CMKを用いてカスパーゼ-1の活性化を抑制したところ、熱傷マウス

において有意に死亡率が増加した(p<0.01)。AC-YVAD-CMK投与にて熱傷マウスが死亡した原因を究明するために、血液培養および抗菌薬の経口投与を行った。血液培養は全て陰性であり、抗菌薬の投与にても死亡率に差は認めなかったため、菌血症による死亡ではないと考えられた。続いて血中のサイトカイン濃度を測定したところ、IL-1βは低下していたが、IL-6、IL-33の著明な上昇を認めた。さらに抗炎症性のサイトカインであるIL-4、IL-13も顕著に低下していた。これらの結果から、インフラマソームの活性を抑制することにより熱傷マウスの生体内では炎症がより活性化し、組織損傷が起こり死亡したと考えられた。

〔 総 括(Conclusion)〕

外傷によりマクロファージをはじめ、多くの免疫細胞においてインフラマソームが活性化され、このインフラマソームの活性化は重症外傷において生体防御的な役割を果たしていると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

インフラマソームはパターン認識受容体の一つであり、炎症における中心的な役割を果たすと考えられているが、外傷におけるその役割は明らかにされていない。本研究は、外傷におけるインフラマソーム活性の役割を評価したものである。インフラマソームの活性を調べるために分解型カスパーゼ-1のflow cytometryによる測定系を確立した後、熱傷モデルマウスにおけるインフラマソームの活性の有無を検討した。次にカスパーゼ1の特異的阻害薬を投与し熱傷モデルにおけるインフラマソームの役割を検証した。結果、インフラマソームは熱傷後1日目をピークとして主にマクロファージで活性化していた。阻害薬使用群では死亡率が有為に増加した。以上より外傷後早期にインフラマソームは活性化され、その活性化は外傷後に生存するために重要な役割を果たしていると考えられた。元来非自己に対し活性化すると考えられている免疫細胞が、外傷そのものにより、生体防御的に活性化することを新たに示したものであり、学位の授与に値すると考えられる。