

角膜炎症における  
インフラマソームの役割について

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系眼科学専攻

清水洋明

修了年 2021 年

指導教員 山上 聡 教授

角膜炎症における  
インフラマソームの役割について

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系眼科学専攻

清水洋明  
修了年 2021 年  
指導教員 山上 聡 教授

## 目次

ア) 概要	1
イ) 緒言	2
1. 角膜の解剖・生理	2
2. インフラマソームとは	5
3. インフラマソームと疾患の関係	6
4. 角膜疾患とインフラマソームの関係	11
ウ) 目的	12
エ) 対象と方法	12
オ) 結果	15
カ) 考察	17
キ) まとめ	23
ク) 謝辞	24

## ア) 概要

研究テーマ：角膜炎症におけるインフラマソームの役割について

背景：インフラマソームは感染や細胞・組織傷害に伴う **danger signal** に応答して炎症の惹起を制御する細胞内の分子複合体であり、その中核をなすのは細胞内パターン認識受容体の一つである **NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3)** である。NLRP3 インフラマソームは、炎症性の皮膚疾患や腸疾患のみならず、生活習慣病やアルツハイマー病など多岐にわたる病態に関与することが知られている。

一方、眼の前眼部においては、モーレン潰瘍、アクネ菌等による感染アレルギーと考えられているフリクテン性角膜炎などが自己免疫性疾患とされている。しかしモーレン潰瘍やフリクテン性角膜炎等の角膜潰瘍で原因抗原が未だ同定されていないことが一つの臨床上の問題点である。

目的：我々はこれら炎症性の角膜潰瘍にインフラマソームが関与しているとの仮説を立て、NLRP3 knockout (KO) マウス角膜における実験的無菌性炎症 (sterile inflammation) モデルを用いた検討を行い、角膜炎症における NLRP3 インフラマソームの **pro-inflammatory** な役割を明らかにする。

方法：Lipopolysaccharide (LPS) 点眼モデル、アルカリ外傷モデルを用い、NLRP3 KO マウスと Wild type (WT) マウスを対象とした。これら実験的無菌性炎症モデルについて、免疫組織化学的検討、Laser capture microdissection (LCM) 法・Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて角膜炎症における NLRP3 の役割の検討を行った。

結果：WT マウスのアルカリ外傷モデル、LPS 点眼モデルではその両方において角膜中の NLRP3 を始めとしたインフラマソーム関連因子の発現増強を認めた。NLRP3 KO マウスにおいては、アルカリ外傷モデルでは、角膜混濁、好中球浸潤、Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 mRNA 発現や IL-1 $\beta$  発現細胞のそれぞれ有意な抑制を認めた。また、網羅的な RT-PCR アレイでは種々の炎症性ケモカインの発現低下も認めた。LPS 点眼モデルでは好中球浸潤や MMP-9 mRNA 発現、IL-1 $\beta$  発現細胞の有意な抑制を認めた。

結論：これらの結果は、前眼部炎症における NLRP3 インフラマソームの **pro-inflammatory** な役割を示唆するものであり、前眼部炎症に対する抗炎症治療に繋がられる可能性が示された。

## イ) 緒言

### 1. 角膜の解剖・生理

眼表面を構成する角膜、結膜、涙液はオキユラーサーフェスと総称される。角膜は透明で、血管やリンパ管を含まない組織であり、角膜上皮細胞層、ボーマン膜、角膜実質細胞層、デスメ膜、角膜内皮細胞層の5層からなる(図1)。涙液は眼瞼結膜と角膜表面の潤滑剤として、また保湿効果をもたらす。涙液中にはさまざまなサイトカイン、ケモカイン等が存在し、角結膜に傷害が加わると、涙液は炎症細胞等を傷害部に運搬する作用を有し、角結膜の創傷治癒の調節に関与している。このように涙液は、オキユラーサーフェスの炎症に際して、角結膜の間の炎症細胞の移動の場を提供し、膜の透明性や恒常性を保つのに大切な役割を果たしている。結膜は半透明の膜で眼球表面のバリアとして働き、傷害から保護する役割がある1)。

角膜上皮は厚み50 $\mu\text{m}$ で5~6層からなる重層扁平上皮である。表層細胞、翼細胞、基底細胞が存在し、その中で基底細胞は高い分裂能を有し、7日から14日にかけて、翼細胞、表層細胞へ順次分化し、涙液上に脱落する。角膜上皮が欠損すると、基底細胞の扁平化、フィブリン、フィブロネクチン、インテグリンを介した局所接着の形成-細胞のアクチンの収縮による基底細胞の移動-局所接着の解除というサイクルを繰り返すことによって基底細胞が上皮欠損部位を覆っていく2)。基底細胞が増殖し、翼細胞、ひいては表層細胞へと変化していく。このように欠損部を覆ってのち重層化が起こり、最終的に微絨毛を多く持った表層細胞が出現し正常形態を取り戻す。角膜上皮細胞の増殖・伸展・分化・脱落についてはThoftがXYZ仮説を提唱している3)。すなわち、X成分として上皮基底細胞の分裂、Y成分としての角膜輪部から中心部へ向かう移動、Z成分として角膜表面からの上皮細胞の脱落と規定し、XYZのバランスにより正常角膜での角膜上皮が維持されるというものである。

角膜実質は角膜実質細胞と細胞外マトリックスであるコラーゲンとプロテオグリカンから構成される。角膜実質細胞は非常に扁平な細胞で、角膜実質細胞はコラーゲンの層間に存在し、細胞分裂とともにコラーゲンやプロテオグリカンの合成、分解を行っている。角膜実質のコラーゲンはI型コラーゲンが80%以上を占め、次いでIII型コラーゲン、V型コラーゲンと続く、I型コラーゲンは直径20~30nmと均一な線維を形成し、規則的な300層からなるラメラ構造をしている。角膜が透明性を保つためにはコラーゲン線維の直径の均一性と線維間距離の均一性が重要である。角膜が透明性を保つ角膜実質細胞を取り巻くコラーゲンは角膜実質細胞の形態や増殖能を制御している4)。

創傷治癒の過程として実質に傷害が及ぶと、涙液や輪部血管を介し、急性期には好中球が、数日後にはリンパ球やマクロファージが実質中に浸潤する。これらの炎症細胞が浸潤することで、角膜実質細胞は活性化される。活性化した角膜実質細胞は増殖能、貪食能が

上昇し、創部の活性化した角膜実質細胞が主にIII型コラーゲンを分泌し、創部を充填する。新しく合成されたコラーゲンは線維の太さも不均一で線維間距離も不定なため、強い散乱光が生じ、臨床的に角膜混濁として観察される。経時的にIII型コラーゲンが分解され、I型コラーゲンに置き換わる。また、プロテオグリカンの組成の回復や浮腫の消失により、徐々に透明性の回復は得られるものの瘢痕として混濁が残る 4)。角膜上皮細胞と角膜実質細胞には上皮-実質相互作用があることが知られている 5)。IL-1 が角膜上皮細胞で発現し、角膜実質細胞では IL-1 受容体が発現している。IL-1 シグナリングを受けた角膜実質細胞からは MMP が産生され、実質コラーゲン線維の再構成やコラーゲン破壊を引き起こすといわれている 5)。

創傷治癒の過程において、コラーゲンが過剰に破壊されることにより角膜潰瘍が発生する。角膜潰瘍は感染症や Mooren 潰瘍などの自己免疫疾患などで生じる。感染角膜潰瘍では角膜上皮バリアの破綻により、病原微生物が角膜実質内に侵入することにより引き起こされる。特異的防御機構である自然免疫をつかさどる好中球やマクロファージなどが病原微生物あるいは感染細胞を排除するため動員され、細菌由来コラーゲナーゼにより、コラーゲンの融解を引き起こす。非感染性角膜潰瘍では生体内の免疫細胞が本来認識することのない角膜構成成分を何らかの機序で認識し、一種の自己免疫反応を生じることが引き金となる、免疫反応が生じると抗原抗体反応による免疫複合体の沈着とそれに引き続き生じる補体系の活性化による病態と炎症性細胞の浸潤に伴う細胞由来 MMPs の活性化が生じ、コラーゲンの過剰分解を引き起こす 6)。角膜潰瘍などの激しい角膜炎症に伴い、無血管の角膜実質に血管新生が生じることが知られている。輪部上皮は幹細胞が豊富であるが、輪部上皮が炎症により欠損が生じると幹細胞がアポトーシスを起こし、結膜上皮によって異常に修復される。結膜上皮は杯細胞が豊富なため、そのさいに血管新生を引き起こす 7,8)。角膜血管新生には IL-8 や VEGF などが関与していると報告されている 9,10)。

本研究では LPS 点眼モデル、アルカリ外傷モデルの無菌性角膜炎症モデルを用いた。以前の研究では、擦過した角膜表面に LPS を点眼すると、動物モデルで角膜実質への好中球動員が誘導されることを示している 11)。LPS は PAMPs として NLRP3 インフラマソームの活性化を誘発することがよく知られており、角膜の LPS 点眼処置を行ったマウスは好中球浸潤と NLRP3 を介した炎症誘発性経路の活性化によって誘発される角膜炎症を調査するための有用なモデルである。アクネ菌等による感染アレルギーと考えられているフリクテン性角膜炎は結節性角膜浸潤とそれに伴う角膜血管侵入を引き起こす 12)。LPS 点眼モデルをフリクテン角膜炎と比較すると、やや角膜炎症の程度が弱い、機序では病原体が角膜に関連する点が類似している。角膜におけるアルカリ外傷は、角膜実質細胞および上皮細胞の活性化、ならびに好中球やマクロファージなどの炎症性細胞の多大な浸潤を引き起こす 13)。活性化された角膜細胞と浸潤性炎症細胞の両方が、アルカリ外傷を介した角膜の損傷に関与し、MMP の分泌により基底膜の破壊を引き起こし、角膜潰瘍と角膜穿孔に寄与する 14)。自己免疫性疾患とされるも原因抗原が明らかでないモーレン潰瘍は角膜の

菲薄化を引き起こし、角膜穿孔などに至ることがある 15)。モーレン潰瘍は自己免疫性疾患、アルカリは化学外傷であり、機序に相違はあるが、アルカリ外傷モデルでも角膜潰瘍、角膜穿孔を引き起こし、傷害の程度はモーレン潰瘍と類似する部分がある。したがって、本研究で使用した2つのマウスモデルは、無菌性角膜炎症における NLRP3 インフラマソームの役割を観察するのに最も適正があると考えた。

## 2.インフラマソームとは

細胞内パターン認識受容体である NLRP3 の活性化を引き金とするインフラマソームの発現亢進が、様々な病態における炎症惹起に関連することが最近明らかとなっている。NLRP3 などの細胞質内パターン認識受容体は、刺激となる因子により構造変化を起こし、Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD(ASC)と呼ばれるアダプター蛋白と蛋白分解酵素である caspase-1 と結合し、インフラマソームとよばれるタンパク質複合体を形成する。このインフラマソームによって caspase-1 が活性化され、IL-1 や IL-18 などの炎症性サイトカインの分泌・活性化を誘導する。それゆえに強大な炎症を引き起こし、インフラマソームは細胞死を引き起こす 16,17,18)。 (図 2)

インフラマソームを形成する sensor protein に NOD-like-receptor (NLR)があり、人間では 22 の遺伝子でマウスでは 33 の遺伝子が存在する。NLR は Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)を中核に leucine-rich repeat (LRR)domain、Pyrin domain や Caspase activation and recruitment domain(CARD) 等の複数のドメインが組み合わさり形成される 18,19,20)。 (図 3)NLR に加え、AIM-receptor や RIG-1 もインフラマソームを活性化させる。NLR のなかでは NLRP3 がもっとも研究されており、感染とストレスで NLRP3 のインフラマソームのシグナルは成立しており、LPS、黄色ブドウ球菌、アクネ菌、カンジダ等の Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)と ATP や尿酸、アミロイドβ等の Damage-associated molecular patterns (DAMPs)がある 17,18,19)。

NLRP3 活性化には主に 3 つの形態モデルがあり、イオン流出モデル、Reactive oxygen species (ROS)モデル、リソソーム崩壊モデルがある。イオン流出モデルは K, Ca, H などの細胞内濃度の変化によって、細胞外 ATP は ATP 依存性の P2X7 受容体を刺激し、急速に K の濃度を引き上げる。ROS モデルは機能しないミトコンドリアから放出された酸化されたミトコンドリア DNA が NLRP3 を活性化させる。リソソーム崩壊モデルは尿酸やアミロイドβなどの大きい分子を貪食することで、リソソームが崩壊し、NLRP3 を誘導するものである 18,19,21)。

### 3. インフラマソームと疾患の関係

#### ①インフラマソームと痛風

ヒトの疾患へのインフラマソームの関与に関する疾患で代表的なのが高尿酸血症によって引き起こされる痛風である。関節内に沈着している尿酸ナトリウム結晶が、急性炎症反応を引き起こす。尿酸ナトリウム結晶がマクロファージに作用して NLRP3 インフラマソームを形成および活性化すると急性炎症反応が始まり、活性化 NLRP3 インフラマソームが IL-1 $\beta$  を活性化する 22)。炎症反応は好中球とマスト細胞の活性化によって増幅され、多くの炎症誘発性サイトカインが放出される 23)。また、NLRP3KO マウスで尿酸ナトリウム 1 水和物(monosodium urate: MSU)により誘発される好中球浸潤および炎症が低下することが報告されている 22)。

#### ②インフラマソームと代謝性疾患

2 型糖尿病や肥満は NLRP3 インフラマソームと関連について多数報告されている。2 型糖尿病はインスリン抵抗性による慢性高血糖を引き起こす。膵臓に浸潤したマクロファージにより発現される IL-1 $\beta$  は、高血糖での  $\beta$  細胞のアポトーシスを引き起こす 24)。2 型糖尿病における NLRP3 活性化の機序として、高血糖による  $\beta$  細胞でのミトコンドリア ROS 産生を誘発する経路によるものがあるが、他にもアミロイドポリペプチド (amyloid polypeptide: IAPP) の関連が報告されている。膵島における IAPP は、豊富な最小酸化低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein: LDL) でプライミングされたマウス膵臓マクロファージの NLRP3 インフラマソームを特異的に活性化することや、マクロファージがヒト IAPP トランスジェニックマウスの膵島でより多くの IL-1 $\beta$  を発現すると報告されている 25)。

肥満については、肥満マウスやヒトの肥満患者で NLRP3 インフラマソームと caspase-1 の活性化は、脂肪組織で増加するという報告がされている 26)。NLRP3 の活性化の機序として飽和脂肪酸パルミチン酸が、ミトコンドリア ROS の蓄積を伴う経路を通じて NLRP3 インフラマソーム活性化を引き起こすと報告されている。26,27)。肥満はインスリン抵抗性を助長するといわれているが、肥満マウスの脂肪組織浸潤マクロファージにおける強化された NLRP3 を介した caspase-1 活性化により、IL-1 $\beta$  は活性化され、インスリン抵抗性促進サイトカインである腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF- $\alpha$ )の発現を誘導するという報告がある 27)。NLRP3<sup>-/-</sup>、Asc<sup>-/-</sup>、および Caspase-1<sup>-/-</sup>マウスでは、体重増加と脂肪量が減少し、インスリン抵抗性も減少すると報告されている 28)。このように肥満と 2 型糖尿病の相互関係に NLRP3 インフラマソームが深く関係していることがわかる。

### ③NLRP3 インフラマソームとアテローム性動脈硬化の関係

動脈硬化と NLRP3 インフラマソームの関連についての報告では、NLRP3 を活性化させる機序でヒトでは LDL と遊離脂肪酸 (free fatty acid: FFA) の上昇、29) マウスではコレステロール結晶によるものがある 30)。コレステロール結晶を腹腔内投与したマウスで NLRP3 欠損マウスでは炎症が減弱した。NLRP3 インフラマソーム活性化を通じて放出される IL-1 $\beta$  は好中球の浸潤、動脈硬化プラークを促進させる。動脈硬化プラークを発達させる LDL 受容体 deficient マウスでは、NLRP3 $^{-/-}$ 、ASC $^{-/-}$ 、IL-1 $\beta$  $^{-/-}$  マウスの骨髄細胞を用いた場合、動脈硬化の範囲が著しく縮小するとの報告がある 30)。また、アテローム性動脈硬化症のモデルである ApoE $^{-/-}$  マウスを用いた研究で、IL-1 Receptor deficient ApoE $^{-/-}$  マウスでアテローム性動脈硬化の減少を示した 31)。その一方で、ApoE $^{-/-}$  マウスにさらに NLRP3、ASC、caspase-1 を knockout させた場合も、動脈硬化が進行するという報告がある 32)。これらの矛盾する結果の理由として、使用された 2 つのモデルマウスのジェノタイプの違いと IL-1 $\alpha$  が動脈硬化に関係していることが指摘されている 32)。

### ④インフラマソームと神経学的疾患の関係

アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease: AD) は慢性の神経変性疾患であり、緩徐に進行し、認知症の原因の 60%~70% を占めている。AD は、脳にアミロイド  $\beta$  の蓄積を認めるが、アミロイド  $\beta$  がマウスモデルの研究で NLRP3 を活性化させるという報告がある。家族性アルツハイマー病に関連する変異を伴い、アミロイド  $\beta$  の沈着を示す APP/PS1 マウスを用いた研究で、NLRP3KO マウスでアミロイド  $\beta$  の沈着の減少を示した。また、NLRP3 KO マウスと Caspase-1 KO マウスでは空間記憶の喪失を防ぎ、脳の Caspase-1 と IL-1 $\beta$  の活性化が低下し、アミロイド  $\beta$  のクリアランスを高めることが示された 33)。

Parkinson 病 (Parkinson's disease: PD) と NLRP3 の関連では PD 誘発マウスモデルにおいて、NLRP3 $^{-/-}$  マウスでは PD が進行しづらいつとの報告がある 34)。これは、NLRP3 インフラマソームと PD の関係性を示す。また、ドーパミン産生ニューロンと NLRP3 インフラマソームが相互関係であることが報告されている。ドーパミンは、ドーパミン D1 受容体 (dopamine D1 receptor: DRD1) -環状アデノシンリン酸 (cyclic adenosine monophosphate: cAMP) シグナル伝達経路を介して、ミクログリアと星状細胞の両方において、NLRP3 活性化を抑制し、さらに、DRD1 欠損マウスでは NLRP3 活性化依存性の IL-1 $\beta$  および IL-18 産生とドーパミン作動性ニューロンの減少を認めた 34)。

最も一般的な自己免疫性炎症性疾患の 1 つである多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は、中枢神経系 (central nervous system: CNS) に浸潤し、乏突起膠細胞を攻撃し、脱髄を引き起こすのを特徴とする 35)。実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) は、MS を模倣するために一般的に使用される動物モデルであり

る。EAE 誘導マウスを使用した研究報告で EAE マウスの脊髄で NLRP3 発現が増加すること、caspase-1、IL-1 $\beta$  が EAE の進行に寄与することが示された 36、37、38)。

NLRP3 deficient マウスでは EAE の進行が劇的に遅延し疾患の重症度が低下すること、浸潤する炎症性細胞の減少およびアストログリオシスの減少が見られることが示されている 35,39)。

#### ⑤インフラマソームと炎症性腸疾患

腸粘膜上皮は、腸管腔に存在する病原性微生物または外部から侵入する微生物から宿主を保護する上で重要な役割を果たしている。さらに、腸粘膜は腸の共生微生物叢の調節と耐性に関与している。NLRP3 インフラマソームと粘膜の間には免疫反応と腸の恒常性といった複雑な相互作用があると考えられており、インフラマソームの経路が崩れると、腸内毒素症と病原菌のコロニー形成の増加をもたらす。腸内細菌叢は腸の恒常性の調節に重要な役割を果たす。微生物相の組成が変化すると異常な自然免疫応答を開始する 40,41)微生物叢が粘膜固有層に侵入し、およびサイトカイン、ケモカインを分泌する免疫細胞を集族させ、炎症を促進する 42)。

NLRP3 インフラマソームは炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease: IBD)の病因の開始と維持に関連する。炎症性腸疾患は大腸性潰瘍炎やクローン病の腸管での粘液免疫の低下をもたらす。炎症性腸疾患のマウスモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (Dextran sulfate sodium: DSS) 誘発モデルでは NLRP3 の活性化を認め、NLRP3KO マウスで腸炎の重症度が低下した。一方で同じ DSS モデルを用いて NLRP3、Pycard、および Caspase-1 を欠損したマウスでは腸炎の重症度が増悪し、粘膜損傷における NLRP3 の再生の役割を示唆していることを報告した。これらの一致しない結果は、腸管免疫に関するさまざまなインフラマソーム研究で繰り返し報告されている 40,43,44)。これらの矛盾する結果により、腸の炎症における NLRP3 インフラマソームの役割はまだ解明されていない。臨床領域ではクローン病群、潰瘍性大腸炎群において大腸生検で NLRP3、IL-1 $\beta$ 、ASC、caspase-1 の mRNA が上昇していた 45)。またクローン病患者の NLRP3 を抑制することにより、サイトカイン、ケモカインを抑制し、クローン病での NLRP3 の関連を示した 46)。大腸性潰瘍炎の発症から 1.5 年以上の群で NLRP3 は上昇しており、クローン病や発症が長い大腸性潰瘍炎では NLRP3 が活性化されることが報告されている 47)。

#### ⑥インフラマソームと自己免疫疾患の関係

インフラマソームは関節リウマチ、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患と関連があるといわれている。関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は滑膜の炎症と多関節破壊が主な臨床症状であり炎症細胞で関節の軟骨、骨を破壊し、関節の線維化を促す 48)。RA

は DAMPs の刺激によって NLRP3 インフラマソームが活性化し、IL-1 $\beta$ 、IL-1 を分泌し、軟骨へのダメージ、RA の骨の再吸収に重要な役割を果たしていることが示されている。遺伝子研究では RA の症例で NLRP3 関連遺伝子が増加しているとの報告がある 49,50)。関節炎モデルラットの研究では、滑膜のコハク酸の蓄積が、低酸素誘導性転写因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF-1 $\alpha$ ) を介して NLRP3 インフラマソーム活性化を誘導することにより、RA の線維化に関与することを見出した 51)。

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は、多臓器炎症を伴う全身性自己免疫疾患であり、一連の自己抗体、補体活性化、および免疫複合体沈着を特徴とし、様々な臨床症状を引き起こす。NLRP3 インフラマソームの関連については、報告で SLE ループス腎炎患者の生検にて NLRP3、caspase-1 の上昇を認め、52) またループス腎炎マウスモデルを用いて NLRP3 インフラマソームとループス腎炎が関連していることが示されている 53)。SLE における NLRP3 の活性化の機序については U1-snRNP が抗 U1-snRNP 抗体に依存して CD14+ヒト単球の NLRP3 インフラマソームを活性化し、ROS および K<sup>+</sup>流出を介した IL-1 $\beta$  産生を誘導し、また NLRP3 欠損させることにより、抗 U1-snRNP 抗体の存在下で U1-snRNP で処理された単球からの IL-1 $\beta$  産生が減少したとの報告がある 54,55)。

#### 4) インフラマソームと自己炎症性疾患の関係

インフラマソームはクリオピリン関連周期熱症候群 (Cryopyrin-associated periodic syndromes: CAPS)、家族性地中海熱 (Familial Mediterranean Fever: FMF) 等の自己炎症性疾患等の発症機序に関与している。自己炎症性疾患は IL-1 が上昇し、インフラマソームの活性化経路の単一遺伝子変異によって自然免疫のコントロールがつかない状態で自己抗体や T 細胞などの獲得免疫の反応が欠如していると考えられている。

CAPS はまれな遺伝性常染色体優性自己炎症性疾患であり、推定有病率は人口 100 万人あたり 1~3 例である 56、57)。この疾患の発症には変異型 NLRP3 遺伝子に関与しており、変異型 NLRP3 遺伝子は、インフラマソームの恒常的な活動亢進、caspase-1 の活性化、IL-1 $\beta$  の過剰な放出を引き起こす。CAPS には、家族性風邪蕁麻疹症候群 (familial cold urticaria syndrome : FCAS) 58)、マックルウェルズ症候群 (Muckle-Well syndrome: MWS) 59)、および新生児発症の多発性炎症性疾患 (neonatal onset multisystemic inflammatory disease: NOMID) としても知られる慢性乳児神経性皮膚および関節 (chronic infantile neurological cutaneous and articular: CINCA) 症候群 60) が含まれる。FCAS は、寒冷暴露による発熱、頭痛、関節痛、時には結膜炎を伴う蕁麻疹を主症状とする短期間の発作を繰り返すのを特徴とする疾患であり、比較的軽症である。MWS は、発熱、発疹に関節痛、結膜炎、ぶどう膜炎や感音性難聴などの症状を伴い、アミロイドーシスなどを引き起こすこともある。CINCA / NOMID は重症の疾患であり、生後まもなく発熱および蕁麻疹様発疹を初発症状とし、慢性無菌性

髄膜炎等による中枢神経系の症状と関節痛などの炎症症状が、持続かつ繰り返すのを特徴とする 61)。

FMF は遺伝性常染色体劣性自己炎症性疾患でインフラマソームセンサータンパク質のピリンをコードしている MEFV 遺伝子変異により引き起こされる疾患である。FMF は 1～3 日程度の持続する発熱が出現し、漿膜炎または間接炎、筋肉痛、そして丹毒様発疹、アミロイドーシスなどを併発することがある 62)。検証された診断基準には、典型的な臨床症状、家族歴、コルヒチン療法への反応性が含まれる 63)。

このように NLRP3 インフラマソームはあらゆる分野の疾患との関連性が報告されている。

#### 4. 角膜疾患とインフラマソームの関係

最近、ドライアイと NLRP3 との関連が報告されている。ドライアイ症例にて結膜組織中の NLRP3 発現が亢進、涙液中 IL-1 $\beta$  発現が亢進していた (64)。また、ドライアイモデルマウスで ROS によって NLRP3 インフラマソームが活性化されていることが報告され、角結膜上皮組織に NLRP3 が存在していることが示されている (65,66)。

しかし、角膜炎症の症例での前眼部における誘導因子並びにその役割は不明である。自己免疫性疾患とされるも原因抗原が明らかでないモーレン潰瘍や、アクネ菌等による感染アレルギーと考えられているフリクテン性角膜炎など、原因が未だ同定されていない炎症性の角膜潰瘍が生じることが一つの臨床上の問題点である。

本研究は、無菌角膜炎症における NLRP3 の役割を検討するために行った。アルカリ外傷および LPS 点眼により、WT マウスおよび NLRP3 KO マウスで角膜の無菌性炎症を誘発し、NLRP3 依存性の角膜混濁、好中球浸潤、および pro-inflammatory 因子の増強を認めた。本研究の結果は、角膜炎症疾患を治療するための局所低分子量薬の将来の開発に役立つ可能性があると考えている。

## ウ) 目的

我々は炎症性の角膜潰瘍にインフラマソームが関与しているとの仮説を立て、NLRP3 knockout (KO) マウス角膜における実験的無菌性炎症 (sterile inflammation) モデルを用いた検討を行った。

## エ) 対象と方法

### 1. 角膜炎モデルマウスの作製

本研究の動物実験は、日本大学医学部動物委員会が定めた日本大学動物実験運営内規、眼科および視覚研究における動物の使用に関する Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research に従って行い、日本大学医学部動物実験委員会によって承認された。50 眼 50 頭のメスの C57BL/6J マウスと 30 眼 30 頭の NLRP3 knockout(KO)マウス(系統名 B6.129S6-Nlrp3<sup>tm1Bhk</sup>/J) を対象とした。NLRP3KO マウスは米国ジャクソン研究所から入手し、NLRP3KO マウスの使用、飼育、繁殖について日本大学医学部遺伝子組換え実験実施規程に定める承認をえた。角膜炎モデルの作製は、メデトミジン 0.3mg/kg、ミダゾラム 4mg/kg、酒石酸ブトルファノール 5mg/kg を用いて腹腔内投与で全身麻酔を行った。PAMPs のモデルとして、ブレードで角膜中央部上皮を擦過剥離後に LPS 4 $\mu$ l (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) を右眼に点眼し、LPS 点眼モデルマウスを作製した (67)。LPS 点眼モデルは以前の報告 (67) で用いられた方法を修正した。LPS 点眼モデル作製後、48 時間後に右眼球を摘出した。DAMPs のモデルとして角膜中央に 1N 水酸化ナトリウムに浸漬した 1.5mm 径濾紙を右眼に 30 秒ひたし、濾紙を除去した後右眼を生理食塩水 5ml で洗い、タリビット軟膏を塗布し、アルカリ外傷モデルマウスを作製した (68) 齧歯類は非常に感染に強く、処置後の抗生剤軟膏塗布程度で感染をおさえることはできると考える。アルカリ外傷モデル作製後 1 週間後に右眼球を摘出した。摘出した眼球は O.C.T (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) で包埋し、イソペンタン・ドライアイスを用いて凍結した。経時的な変化を確認し、LPS 点眼モデルはアルカリ外傷モデル角膜と比較し、軽微な炎症で 48 時間後には好中球の増加を認めたが、1 週間後では好中球の増加を認めなかった。アルカリ外傷モデルではマクロファージをみることを想定したので、1 週間後を目安にしたところ、好中球の増加を認めた。角膜での激しい炎症の場合、好中球の寿命ものびることが示唆されている (69)。よって、上記の条件で評価することに決定した。

### 2. 免疫組織染色

摘出眼を O.C.T を用いて包埋し、cryostat (HM505; Microm, Walldorf, Germany) を使用して厚さ 7 $\mu$ m の切片に薄切した。これらの薄切片は、一次抗体として抗 Gr-1 抗体 (好中球のマーカー、希釈 1 : 100、BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)、抗 IL-1 $\beta$  抗体 (希釈 1 : 100、Abcam, Cambridge, United Kingdom)、および抗 MMP-9 抗体 (希釈 1 : 250、Abcam)

をそれぞれ 4°Cで一晩寝かせ、その後、間接酵素抗体法（アビジンビオチン複合法;Histofine®, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan）で染色した。観察には光学顕微鏡（BH-2, Olympus, Tokyo, Japan)を用いた。各検体は、200倍で観察した（20倍対物レンズと10倍接眼レンズ; 0.723 mm<sup>2</sup>の視野）。各マウスの中心部位（処置部位）の角膜実質を観察し、角膜実質において陽性の褐色染色を有する細胞を数えた。

### 3. 遺伝子学的検討

上記の角膜薄切片を、クライオスタットを使用して 2µm の厚さで laser microdissection スライドガラス (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)上でカットした。Laser microdissection (Leica)を用いて角膜実質を単離し(図 4)、RNeasy キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、総 RNA を調製した。RNA は、Platinum Taq システム (Invitrogen, Carlsbad, CA) に基づき、One-Step RT-PCR キットを RT-PCR 分析に用いた。角膜アルカリ外傷は大規模な炎症反応を引き起こすため、さまざまな遺伝子の発現パターンを検索および決定するために、定量的 RT-PCR アレイを施行した。未処置角膜およびアルカリ外傷モデル角膜のインフラマソームに関連する影響を受ける遺伝子を特定して比較するために、RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Inflammation (PAMM-097ZC) を使用した。WT マウスと NLRP3 KO マウスのアルカリ外傷モデル角膜を伴う遺伝子プロファイリングの比較するために、RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Inflammatory Response & Autoimmunity (PAMM-077) を使用した。各アレイには、84 個のターゲット遺伝子と 5 個のハウスキーピング遺伝子が含まれている。ハウスキーピング遺伝子 (Actb, B2m, Gapdh, Gusb および Hsp90ab1) を使用して、データを正規化し、 $\Delta\text{Ct}$  値を生成した。 $\Delta\Delta\text{Ct}$  法を使用して、未処置マウスとアルカリ外傷マウス、またはアルカリ外傷モデル WT マウスと NLRP3 KO マウスの間の倍率変化を比較および計算した。研究されたすべてのサンプルにおいて 2 倍以上の上方制御または下方制御された遺伝子を抽出した。

さらに特定遺伝子発現をみるために、NLRP3 (assay ID Mm00840904\_m1)、caspase-1 (assay ID Mm00438023\_m1)、PYCARD (assay ID Mm00445747\_g1)、IL-1 $\beta$  (assay ID Mm00434228\_m1)、および MMP-9 (assay ID Mm00442991\_m1) の定量的 PCR を TaqMan Universal PCR Master Mix と FAM-MGB dye-labeled predesigned primers [Applied Biosystems, Foster City, CA]を用いて施行した。PCR 条件は、50°Cで 2 分、95°Cで 10 分、続いて 95°Cで 15 秒、60°Cで 1 分を 35 サイクルで行った。(ABI PRISM 7900 HT; Applied Biosystems)。

### 4. 統計学的解析

アルカリ外傷モデルでは、Mann-Whitney U 検定を使用して、WT マウスと NLRP3 KO マウスの間で角膜混濁の程度を角膜混濁スコア(表 1) 70)を用いて、角膜混濁の程度を比較した。2 種類の無菌性角膜炎症モデルの免疫組織化学的検討では、陽性細胞数を Mann-Whitney U 検定で分析し、 $<0.05$  の P 値を統計的に有意とした。m-RNA の発現の比較につ

いて、結果は、**threshold cycle (CT)** 法によって分析され、各サンプルの相対的発現レベルは、正常対照からの変化倍率として表したものを **Mann-Whitney U** 検定で比較した。本研究において、どの比較も群ごとで **Shapiro-Wilk** 検定において正規分布に従わず、また **F** 検定で各モデルマウスの **WT** 群、**NLRP3KO** 群の等分散性も否定され、ノンパラメトリック検定である **Mann-Whitney** 検定を用いた。

## オ) 結果

### 1. アルカリ外傷モデル角膜中のインフラマソーム関連の遺伝子発現の増強

PCR アレイを用いて図に示すとアルカリ外傷モデルマウスで NLRP3(8.0±3.9 fold)、AIM3(7.2±4.8 fold)、NAIP1(6.2±2.5 fold)の NLR や IL-1β(102.4±71.1 fold)、ASC(2.2±0.3 fold)、caspase-1(30.1±5.4 fold)のインフラマソームの関連遺伝子の発現が増強した。(図 5)

### 2. アルカリ外傷モデル NLRP3KO マウス角膜における角膜混濁の抑制

まず、アルカリ外傷モデルマウスの角膜混濁の程度を角膜混濁スコア(表 1) 70)を用いて、WT マウスと NLRP3 KO マウスで比較した。NLRP3 KO マウスは WT マウスと比べて有意に低い角膜混濁スコアを示した。(N=10 each, WT マウス; 3.5±0.5, NLRP3 KO マウス; 2.0±1.2 \*p<0.05) (図 6)

### 3. アルカリ外傷モデル NLRP3 KO マウス角膜における好中球浸潤の抑制

アルカリ外傷角膜に対する免疫組織学的検討で好中球に染色する Gr-1 陽性細胞を観察した。光学顕微鏡 200 倍観察下での角膜実質中の Gr-1 陽性細胞をカウントして比較すると、NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べてアルカリ外傷による好中球浸潤は有意に抑制されていた。(N=5 each, WT マウス; 34.8±9.7 cells/field, NLRP3 KO マウス; 16.1±8.3 cells/field, \*p<0.01)(図 7)

### 4. アルカリ外傷モデル NLRP3 KO マウス角膜における炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の減弱

PCR アレイを用いて、WT マウスと NLRP3 KO マウスで比較した。CCL8 (-14.9±13.9 fold), CCR2 (-8.9±8.1 fold), CCR1 (-6.3±4.4 fold), IL-1β (-4.9±2.5 fold), CCL17 (-4.7±2.5 fold), CCR3 (-4.6±1.4 fold), TNF (-4.4±2.6 fold), and CCL25 (-2.8±0.5 fold) と NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べて炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の減弱を認めた。(図 8)

### 5. アルカリ外傷モデル NLRP3 KO マウス角膜における MMP-9 m-RNA 発現の低下、IL-1β、MMP-9 蛋白発現の低下

RT-PCR でアルカリ外傷モデルマウスの角膜において WT マウスと NLRP3KO マウスで比較し、NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べてアルカリ外傷による MMP-9 m-RNA 発現の有意な低下を認めた。(N=8 each, WT マウス; 1.2±0.5fold, NLRP3 KO マウス;

0.4±0.1 fold, respectively, \*p<0.05) (図 9a). アルカリ外傷モデル角膜に対する免疫組織学的検討で IL-1β と MMP-9 蛋白発現を観察した。光学顕微鏡 200 倍観察下での角膜実質中陽性細胞をカウントして比較するとアルカリ外傷モデル角膜の NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べて IL-1β 陽性細胞、MMP-9 陽性細胞の有意な低下を認めた。(IL-1β 細胞: N=8 each, WT マウス; 28.2±9.6 cells/field, NLRP3 KO マウス; 9.8±2.6 cells/field, \*p<0.01) (図 9b,c,d) (MMP-9 陽性細胞: N=8 each, WT マウス; 37.3±9.7 cells/field, NLRP3 KO マウス; 14.9±6.3 cells/field, \*p<0.01)。 (図 9e,f,g)

#### 6. LPS 点眼モデルマウスで角膜中の NLRP3 インフラマソーム関連の遺伝子発現が増強する (Real-time PCR)

RT-PCR を用いて図に示すと LPS 点眼モデル角膜で NLRP3 (2113.1±950.4 fold), IL-1β (485.9±208.7 fold), caspase-1 (210.5±79.2 fold)などのインフラマソームの関連遺伝子の発現が増強した。それに対し、ASC (1.3±0.3 fold)の発現は増強しなかった (図 10)。

#### 7. LPS 点眼モデル NLRP3 KO マウス角膜における好中球浸潤の抑制

光学顕微鏡 200 倍観察下での角膜実質中の Gr-1 陽性細胞をカウントして比較すると、NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べて LPS 点眼による好中球浸潤は有意に抑制されていた。(N=3 each, WT マウス; 12.3±1.5cells/field, NLRP3KO マウス; 1.2±1.1 cells/field, respectively, \*p<0.01) (図 11)

#### 8. LPS 点眼モデル NLRP3 KO マウス角膜における MMP-9 m-RNA 発現の低下、IL-1β、MMP-9 タンパク発現の低下

RT-PCR で LPS 点眼モデルマウスの角膜において WT マウスと NLRP3KO マウスで比較し、NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べて MMP-9 m-RNA 発現の有意な低下を認めた。(N=3, WT マウス; 1.2±0.4fold, NLRP3 KO マウス; 0.4±0.3fold, respectively, \*p<0.05). (図 12a)

LPS 点眼モデル角膜に対する免疫組織学的検討で IL-1β と MMP-9 蛋白発現を観察した。光学顕微鏡 200 倍観察下での角膜実質中陽性細胞をカウントして比較すると NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べて IL-1β 陽性細胞、MMP-9 陽性細胞の有意な低下を認めた。(IL-1β 細胞: N=8 each, WT マウス; 7.8±1.3 cells/field, NLRP3 KO マウス; 4.0±1.9 cells/field, \*p<0.01, 図 12b,c,d) (MMP-9 細胞: N=8 each, WT マウス; 7.0±2.9 cells/field, NLRP3 KO マウス; 1.3±1.3 cells/field, \*p<0.01, 図 12e,f,g)

## カ) 考察

本研究は、無菌性角膜炎の2種類のモデルマウスで角膜のNLRP3依存性好中球浸潤を示した。アルカリ外傷モデルでは、さまざまなNLRP3インフラマソーム関連分子が増強され、NLRP3をノックアウトすることにより、角膜混濁、好中球浸潤、およびMMP-9を含む炎症性分子の発現が大幅に低下した。LPS点眼モデルマウスではNLRP3インフラマソーム関連分子の増強を認め、NLRP3 KOマウスは好中球浸潤の有意な減少とMMP-9を含む炎症性分子の発現の低下を示した。これらの研究結果に基づき、NLRP3インフラマソームは無菌性角膜炎の発症に不可欠と考える。

NLRP3インフラマソームの活性化とIL-1 $\beta$ プロセッシングは、単球、マクロファージ、樹状細胞などで示されている(71,72)。しかし、好中球とインフラマソーム活性化の関係およびIL-1 $\beta$ 産生への好中球の寄与ははっきりしていない。好中球は、炎症性サイトカインや、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17、MMP-9などの炎症性分子を誘導する。IL-1 $\beta$ は活性化単球、マクロファージ、および樹状細胞によって産生され、その後、好中球の動員および線維芽細胞の増殖に関連しているTNF $\alpha$ およびIL-6などのケモカインまたはサイトカイン、またはMMPなどのプロテアーゼの産生を誘導する。本研究の結果では、アルカリ外傷モデルNLRP3 KOマウスにおいて、様々なサイトカインとケモカインが抑制されていることがわかった(図8)。ケモカイン受容体(CCR1、CCR2、およびCCR3)は、好中球を含む白血球の走化性に関与している(73,74)。また、最近の報告では、CCL8は強力なpro-inflammatoryの作用を持つ可能性があることを示唆されている(75,76)。したがって、本研究においてもアルカリ外傷モデルNLRP3 KOマウスにおける角膜好中球浸潤、炎症の抑制がこれらのケモカイン/ケモカイン受容体の抑制に関連していたと考える。

好中球の炎症誘発性の役割も他臓器モデルのNLRP3 KOマウスで確認されている(77,78,79)。ただし、好中球の挙動は、NLRP3 KOマウスにおいて感染と炎症で異なる。NLRP3 KOマウスで好中球は、オートファジーの減少と食菌作用の増加を誘導し、敗血症下で好中球の増加を認めた(80)。既報の研究では、好中球がNLRP3インフラマソーム経路の活性化に関連して、角膜の病態生理学において主要であることが示されている(81)。細胞外ATPはインフラマソームの重要な誘導体であるDAMPであり、P2X7受容体-NLRP3インフラマソームを介してヒトおよびマウス好中球によるIL-1 $\beta$ 分泌の急速な増加を促進する。肺炎球菌の角膜炎マウスモデルにおいて、好中球がNLRP3インフラマソームによって誘導されるIL-1 $\beta$ の主な供給源である(82)。ヘルペス角膜実質炎で、炎症が出現してから2,3日後に角膜に好中球の浸潤を認めたが、8日後にも角膜への多数の好中球浸潤を認めている(69)。報告ではヘルペス角膜実質炎マウスモデルで好中球内のcaspase-1の活性化を認め、角膜上皮細胞内のNLRP3が上昇することがわかっている(83)。報告では単純ヘルペスウイルス1型の前眼部感染症のNLRP3 KOマウスとWTマウスで比較した。NLRP3

KO マウスの方が早期の好中球浸潤と角膜血管新生の大幅な増加を引き起こし、角膜実質炎は WT マウスよりも早期に発症し、重症であった。それに対して早期好中球浸潤の抑制をすることにより NLRP3KO マウスでの角膜炎の早期発症を防ぎ、IL-1 $\beta$  活性化を低下させた (84)。これらの結果は、NLRP3 が角膜の病態生理において免疫制御の役割を果たしていることを示している。

角膜上皮細胞において、IL-1 は NF- $\kappa$ B、Smad、p38、および JNK シグナル伝達経路を介して作用し、主に MMP-9 プロモーターの特定の領域を標的とする。したがって、好中球と角膜細胞は、IL-1 の分泌、それに続く MMP-9 の産生、および角膜実質の破壊に参与している。MMP-9 には細胞外マトリックスのリモデリングを行う作用がある (85,86)。アルカリ外傷や感染性角膜炎モデルマウスの角膜において MMP-9 の上昇を認める報告がある (85,87,88)。アルカリ外傷とドライアイモデルを用いた研究ではアルカリ外傷単独モデルでの MMP-9 の有意な上昇を認めたが、アルカリ外傷とドライアイの合併モデルでさらなる有意な MMP-9 の上昇を認めた。また、MMP-9KO マウスを用いて Photorefractive keratectomy (レーザー屈折矯正角膜切除術)を行った研究によると MMP-9KO マウスでは角膜創傷治癒が早まった (89)。以上のことから MMP-9 は負荷をかけられた角結膜上皮から産生され、マトリックスの破壊と炎症作用を促し、角膜創傷治癒を遅らせる作用があると報告されている (90)。感染性角膜炎では MMP-9 が好中球の角膜への浸潤を促す作用があると報告されている。好中球は、角膜線維芽細胞を活性化し、線維芽細胞による MMP 分泌を誘導することにより、角膜実質におけるコラーゲンの分解を誘導することが示されている (91)。緑膿菌角膜炎モデルでは MMP-9KO マウスで有意な好中球の低下を認め、また MMP-9 中和抗体を静脈注射し、有意に好中球が低下したとの報告がある (92,93)。NLRP3 KO による MMP-9 の低下は炎症抑制と好中球の低下との関連を示唆するものと考えられる。本研究では、アルカリ外傷と LPS 点眼モデルマウスにおいて、遺伝子発現と IL-1 $\beta$  と MMP-9 のタンパク質発現の両方が NLRP3 KO マウス角膜において抑制された。なので、角膜炎症において IL-1 $\beta$  の発現細胞は好中球、MMP-9 の発現細胞は角膜細胞が考えられる。

本研究で角膜炎症における NLRP3 インフラマソームの炎症誘発性の役割を解明したが、角膜炎に対して NLRP3 をターゲットとした治療応用が期待される。現在、多分野の疾患で NLRP3 をターゲットとした薬物治療の研究の報告がされている。それらは、NLRP3 インフラマソームの複雑なシグナル伝達経路を把握することにより、様々な因子をターゲットしたものが考案されている。例として、Glyburide は 2 型糖尿病の治療薬のスルホニル尿素薬があり、ATP 感受性カリウムチャンネルを遮断し、Ca<sup>+</sup>の流入により膵  $\beta$  細胞の膜脱分極を誘発し、最終的にインスリンの放出を引き起こす。既報では、Glyburide が LPS および ATP 刺激後のヒト単球およびマウス腹腔マクロファージの IL-1 $\beta$  分泌を阻害することが示された。さらなる研究により、Glyburide は NLRP3 インフラマソームに対して特異的に反応し、caspase-1 および IL-1 $\beta$  分泌の活性化を抑制し、P2X7 受容体の下流で機能することが示唆されている (94)。また、マウスモデルでは、Glyburide により、LPS 誘発

性敗血症性ショックの死亡率と気管支肺異形成の重症度が低下したと報告されている(94,95)。

NLRP3 インフラマソームを抑制する因子が報告されている。ケトン代謝産物  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 ( $\beta$  hydroxybutyrate: BHB) は、ヒト単球およびマウス BMDM における NLRP3 インフラマソームを特異的に阻害する(96)。BHB は、 $K^+$ 流出を抑制し、ASC のオリゴマー化とスペック形成を低下させる。BHB はヒト単球の NLRP3 インフラマソームによる IL-1 $\beta$ 、IL-18 の分泌を低下させ、FCAS および MWS のマウスモデルに対して IL-1 $\beta$ 、caspase-1 の分泌を抑制したとの報告もあり、これらの報告から、BHB 濃度を上げる薬理的または食事療法は、NLRP3 を介した慢性炎症性疾患の重症度を軽減する可能性があると考えられる。NLRP3 の調節因子としてオートファジーが注目されており、例として、ATG5、Hemin は、オートファジーの促進を介して NLRP3 インフラマソームを抑制する方向に働く(97)。その仕組みは ASC の軽減、NLRP3 のリン酸化、ミトコンドリア ROS のクリアランスと関連している。オートファジーとは、細胞の恒常性と損傷した細胞小器官およびタンパク質のリサイクル、ならびに細胞内病原体の破壊にとって重要な細胞内プロセスである(98)。過剰産生または不要なタンパク質、ミトコンドリア、病原性細菌などは、オートファジーの標的である。これらの標的タンパク質は、二重膜オートファゴソームに貪食され、アミノ酸の分解とリサイクルのためにリソソームに送達される。インフラマソームとオートファジーの関係は、ミトコンドリアまたはインフラマソーム構成要素に関連する豊富なタンパク質がオートファジーの標的であるため、非常に注目されている。また一方で Atg5 などの主要なオートファジータンパク質は、Caspase-1 の活性化、IL-1 $\beta$  および IL-18 の産生、食細胞における NLRP3 の活性化を増加させたという報告もある(99)。インフラマソームとオートファジーの関係は複雑であり、まだ解明されていない点も多い。

MCC950 は NLRP3 に結合し、ヒトおよびマウスのマクロファージにおける NLRP3 誘発 ASC オリゴマー形成を阻害することにより、NLRP3 インフラマソーム活性化および IL-1 $\beta$  分泌を特異的に阻害すると推測されている。また、TLR シグナル伝達または NLRP3 活性化プライミングの過程を阻害せず、MCC950 の阻害作用は  $K^+$ 流出、 $Ca^{2+}$ 流入、または NLRP3-ASC 相互作用に影響しない(100)。MCC950 が IL-1 $\beta$  と IL-18 の分泌を低下させ、それにより EAE マウスモデルに基づいて、EAE の重症度が軽減されたとの報告がある(101)。他に NLRP3 インフラマソームを抑制する因子として、CY-09 が挙げられる。CY-09 は、NLRP3 NACHT ドメインの ATP 結合モチーフに直接結合し、NLRP3 ATPase 活性を阻害して、NLRP3 インフラマソームの活性化を抑制する。CY-09 による治療は、CAPS および 2 型糖尿病のマウスモデルに顕著な治療効果を示す(102)。

他にもインフラマソームの経路を阻害するだけでなく、IL-1 阻害薬を用いた薬物治療の報告もある。IL-1 $\beta$  の IL-1RI への結合を阻害する IL-1Ra の組み換え型である Anakinra や、また、IL-1 $\beta$  に対するヒト化モノクローナル抗体である Canakinumab 等は CAPS、コルヒチン不応性 FMF 等の自己炎症性疾患に用いられる(103)。Caspase-1 を標的にした薬物治療の報告もある。Caspase-1 阻害剤として VX-765 が挙げられる。VX-765 は、RA に対して高い

効力を示し、皮膚炎のマウスモデルにおいて IL-1 $\beta$ / 18 の減少を示した。最近では、VX-765 がマウスの認知障害と AD の重症度の緩和に役立つことが報告されている (103,104,105)。また、FCAS 患者の単球における IL-1 $\beta$  および IL-18 の放出を減少させた (106)。また、自己炎症性疾患において眼症状を呈し、それが IL-1 阻害薬によって改善された報告がある。CAPS による虹彩炎と中央の楕円形の角膜混濁を伴った症例では canakinumab 投与後 6 か月以内に改善され、MWS による角膜混濁、視神経乳頭浮腫は Anakinra で改善した (107)。

インフラマソームと角膜炎症の関連で、Joni らはフィンランドで発見された Keratoendotheliitis fugax hereditaria と NLRP3 の関連について報告している。Keratoendotheliitis fugax hereditaria はフィンランドで報告された疾患で、遺伝形式は常染色体優性遺伝であり、片側性の角膜内皮炎の急性発作を引き起こし、視力低下や眼痛等の症状をきたす。Joni らの報告では Keratoendotheliitis fugax hereditaria の罹患者に対し、遺伝子学的解析を行った結果、Cryopyrin をコードする NLRP3 遺伝子中の病原性変異体 c61G>C が、検出され、c61G>C 変異型は Keratoendotheliitis fugax hereditaria を引き起こす遺伝子突然変異であることを強く示唆された。NLRP3 は内皮を含む角膜組織でも発現しており、NLRP3 変異がこの疾患の原因である可能性があることを示している。さらに、NLRP3 変異により引き起こされる自己炎症性疾患の CAPS が角膜炎を発症するという報告もあり、遺伝性角膜内皮炎の c.61G>C 変異の病原性を支持する。以上のことから遺伝性角膜内皮炎が CAPS のスペクトラムに含まれている可能性が指摘されている (108)。

これらの報告は、CAPS のスペクトラムを持つ Keratoendotheliitis fugax hereditaria による角膜混濁が NLRP3 関連をターゲットとした薬物治療で治療できる可能性を示唆する。以上から、NLRP3 インフラマソームをターゲットとした角膜炎症治療への臨床応用もこれから進歩していくと考えられる。

角膜に NLRP3 が存在する意義として、角膜はオキユラーサーフェスの一つで、微生物や外傷に対する最初の防御機構であり、あらゆる刺激を受ける。角膜は無血管組織であり、免疫細胞が存在しないので、角膜の創傷治癒のさいに、NLRP3 が結膜から免疫細胞やサイトカインなどを誘導する主軸となっていると考える。本研究では急性の炎症性障害において NLRP3 が関与していることは示したが、より弱い障害による慢性的な変化で NLRP3 は重要な役割を果たしていると考えられる。眼疾患において、ドライアイは様々な原因による涙液および角結膜上皮の慢性疾患と定義されており、ドライアイ患者の角膜上皮細胞において、酸化ストレスおよび、曝露に伴う涙液層の高浸透圧によって ROS が NLRP3-IL-1 $\beta$  シグナリングを刺激していることが報告されている (66)。つまり、角膜において、高浸透圧などの弱い刺激による涙液への変化が NLRP3 を活性化させ、角膜に慢性的な炎症を引き起こしていることが十分に考えられる。最近の報告で、NLRP3 を抑制すると考えられている酢酸ナトリウムがアルカリ外傷モデルマウスの角膜炎症を抑制したとの報告があ

り、NLRP3を抑制することによって、角膜創傷治癒を促す方向に働くことが示されている(109)。NLRP3は本研究結果も含め、角膜の創傷治癒に関連があると考えられる。

NLRP3の上流遺伝子の抑制においてP2X7受容体遺伝子のKOマウス(82,110)やCathepsin B KOマウス(111)などの報告がある。前述したとおり、P2X7受容体はNLRP3を活性化させるが、高眼圧モデルにおいてWTマウスとP2X7受容体KOマウスで比較し、アストロサイトでP2X7受容体をKOすることにより、NLRP3 mRNAの低下、IL-1 $\beta$ の発現の低下を認めた(110)。しかし、肺炎球菌角膜炎モデルではWTマウスとP2X7受容体KOマウスで比較して、好中球の発現や角膜のIL-1 $\beta$ やcaspase-1の発現に有意差を認めなかった。だが、P2X7受容体をKOすることにより、角膜の病原体はWTより有意に生き残り、P2X7受容体は肺炎球菌角膜炎において好中球の殺菌能に関係することが示された。(82)リソソームプロテアーゼであるCathepsin Bの阻害剤により、Cathepsin BがNLRP3インフラマソームのタンパク質分解活性化に関与している可能性があることが示唆された(112)。Cathepsin BをKOすることによりIL-1 $\beta$ などの発現が抑制されている報告があるが(30)、一方で差がないとの報告もある(111)。これはCathepsin Bだけを抑制すると他種類のCathepsinの発現が上昇し、NLRP3を活性化するからと考えられている。以上からNLRP3の上流遺伝子を抑制しても、NLRP3が直接抑制されるわけではなく、別の経路によってNLRP3を活性化させている可能性も考えられる。

NLRP3をKOすることにより、代償性変化として尿管障害モデルマウスでオートファジーが促進されることが報告されている(113)。NLRP3を活性化させる機能不全ミトコンドリアの除去や、免疫細胞での細胞死を減らすことにより、臓器への損傷を減らすことが報告されている(113)。しかし、感染においてはNLRP3をKOすることによりオートファジーを抑制するとの報告もある(80)。報告で肺嚢胞線維症マウスモデルに緑膿菌を腹腔内投与し、さらにMCC950を腹腔内投与すると緑膿菌のクリアランスが改善された報告がある(114)。緑膿菌角膜炎モデルにおいて、Anakinraの投与により緑膿菌のクリアランスが向上したとの報告もある(115)。腹膜炎モデルマウスにNLRP3阻害薬を投与し、生存率向上を認めた(80)。緑膿菌角膜炎のマウスモデルを使用した研究では、オートファジーを誘導するラパマイシンが好中球の殺菌活性を低下させ、緑膿菌が増加した報告があり(116)、また、腹膜炎モデルNLRP3KOマウスにおいてオートファジーが抑制され、かわりに好中球の貪食亢進が引き起こされた(80)。コルチコステロイドなどの免疫抑制剤は細菌感染を増強させるといわれており(117)、NLRP3をターゲットとした治療の易感染性が危惧されるが、NLRP3阻害薬はオートファジーを抑制することにより、従来の免疫抑制剤より易感染性を低下させる可能性が考えられる。

本研究には限界がある。まず、角膜におけるインフラマソームの起源を特定できない。NLRP3 KOマウスの角膜における好中球浸潤の低下を示すことができたが、この結果が好中球を刺激するマクロファージあるいは角膜細胞を抑制されたことによる結果であるか、または好中球でのインフラマソームを抑制させた結果であるかは確認できなかった。マクロファージでのインフラマソームおよびその後のIL-1 $\beta$ プロセッシングの調節について広く

研究されているが、インフラマソーム活性化を介して IL-1 $\beta$  成熟に至る分子メカニズムは、好中球では長い間扱われていなかった。しかし、最近の研究では、炎症状態の好中球における NLRP3 由来の IL-1 $\beta$  プロセッシングが示されている (118)。特に、最近の報告では、好中球が、NLRP3 / ASC インフラマソームおよびカスパーゼ-1 の活性化、それに続く IL-1 $\beta$  処理に関する角膜炎のマウスモデルで主要な細胞であることが示されている (119)。さらに、マクロファージ/単球だけでなく好中球のタンパク質欠失は、両方の細胞がインフラマソーム由来の炎症メカニズムに広く関与していることを明らかにしている (120、121、122)。今後、本研究で用いた無菌性角膜炎モデルを用いて角膜炎でのオートファジーとインフラマソームの関連について研究し、上記のように DAMPs と PAMPs でインフラマソームを抑制することによりオートファジーがどのように調節されるか解明し、NLRP3 をターゲットにした治療をより詳細に研究していく所存である。

## キ) まとめ

アルカリ外傷および LPS 点眼モデルをそれぞれ DAMP および PAMP 誘発性の無菌角膜炎症のモデルとして使用して、角膜混濁、好中球浸潤、ならびに IL-1 $\beta$  および MMP-9 発現の増強等の NLRP3 依存の機序により、角膜炎症における NLRP3 インフラマソームの pro-inflammatory な役割を明らかにした。

## ク) 謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇篤なるご指導とご高配を賜りました日本大学医学部視覚科学系眼科学分野 主任教授 山上聡先生に深甚なる謝意を表します。

終始ご指導を賜り、研究手法や研究に対する姿勢をご教授いただきました日本大学医学部視覚科学系眼科学分野 准教授 崎元 暢先生に厚く感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、日本大学医学部視覚科学系眼科学分野 研究助手 富岡秋子氏には実験を行うに際し、温かいご協力をいただきました。心より感謝いたします。

本論文は Creative Commons Attribution 4.0 International License の認可をうけ Scientific reports 誌に掲載された”Pro-inflammatory role of NLRP3 inflammasome in experimental sterile corneal inflammation. Scientific Reports Vol.9: No. 9596, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46116-9>.”を基幹としており、一部改変を行った。

Creative Commons license <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

【表】

表 1

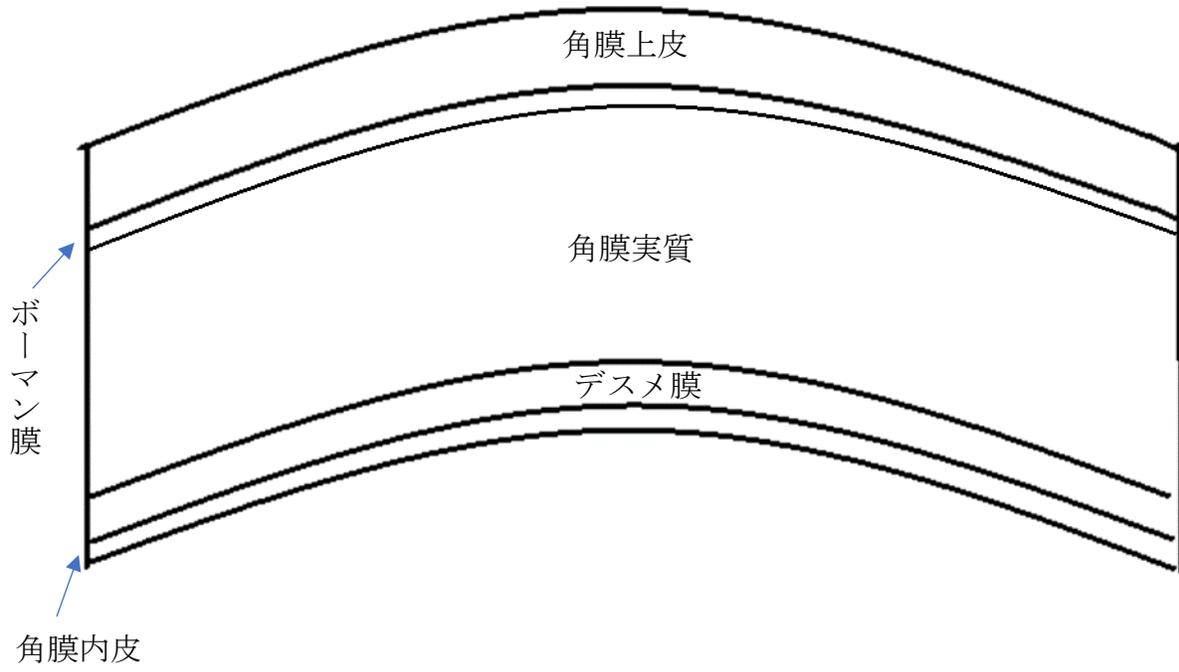
## 角膜混濁スコア

(Chen GL1, et al. International Journal of Ophthalmology. 2013 6:578-83.から引用改変)

スコア	前眼部所見
0	透明角膜
1	軽度の表層混濁;瞳孔領や虹彩紋理は容易に透見可能
2	軽度の混濁;瞳孔領や虹彩紋理は透見可能
3	中等度の混濁;瞳孔領のみ透見できる
4	強い混濁;瞳孔が辛うじて透見できる
5	極めて強い混濁;前房内が透見できない

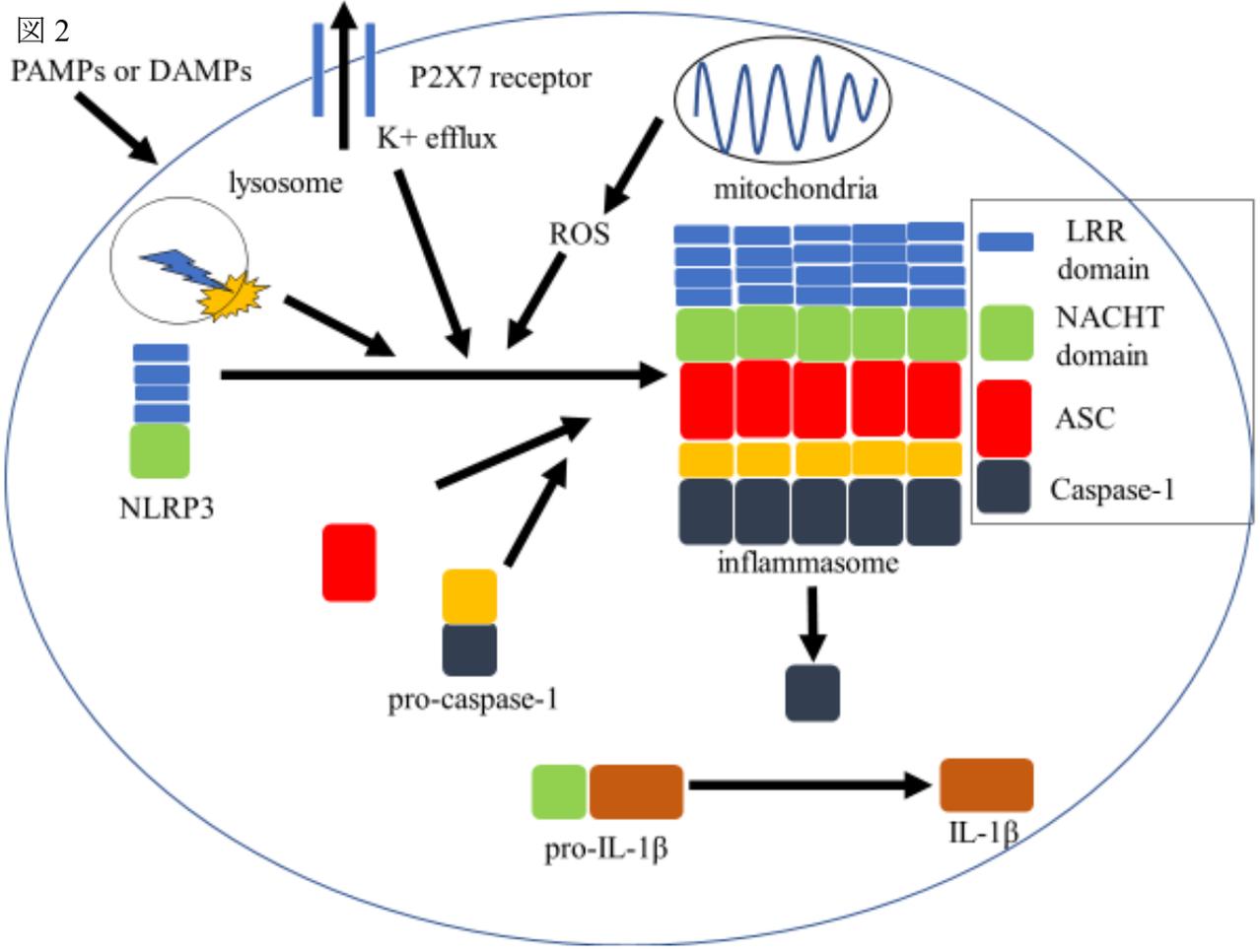
図

図 1



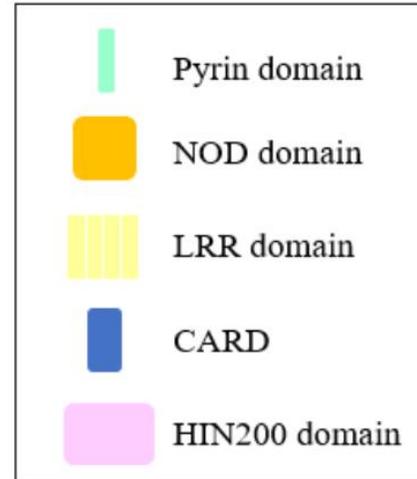
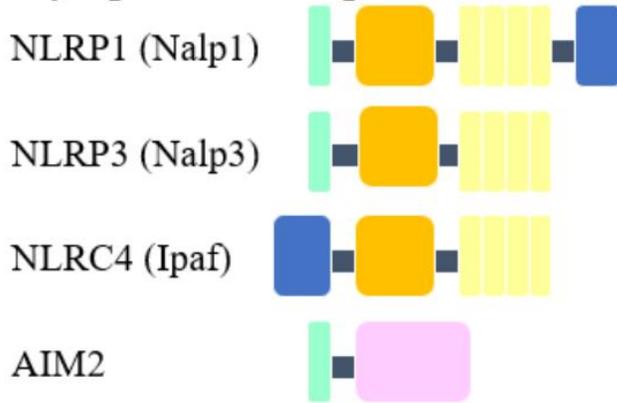
☒ 2

PAMPs or DAMPs



☒ 3

● Cytoplasmic receptors (=NLR)



● Adaptor protein; ASC



● Pro-caspase-1



図 4

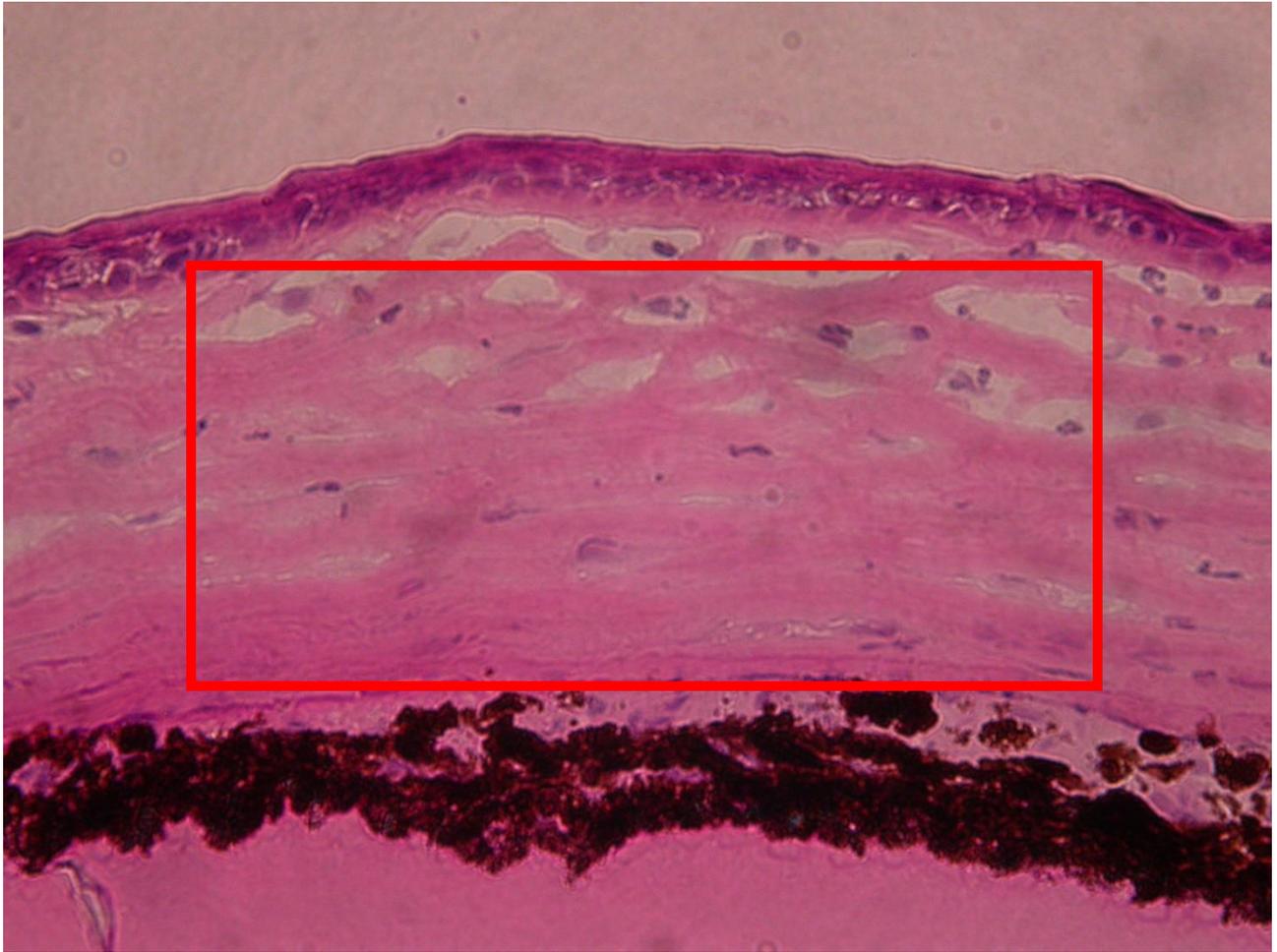
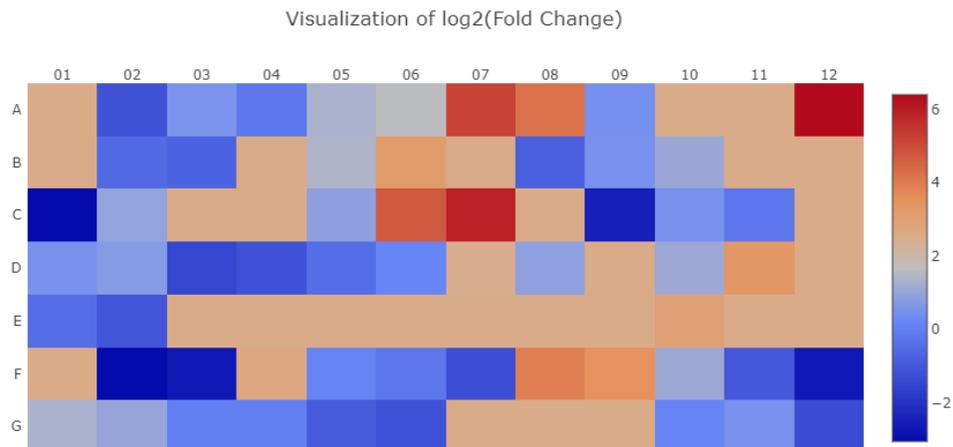
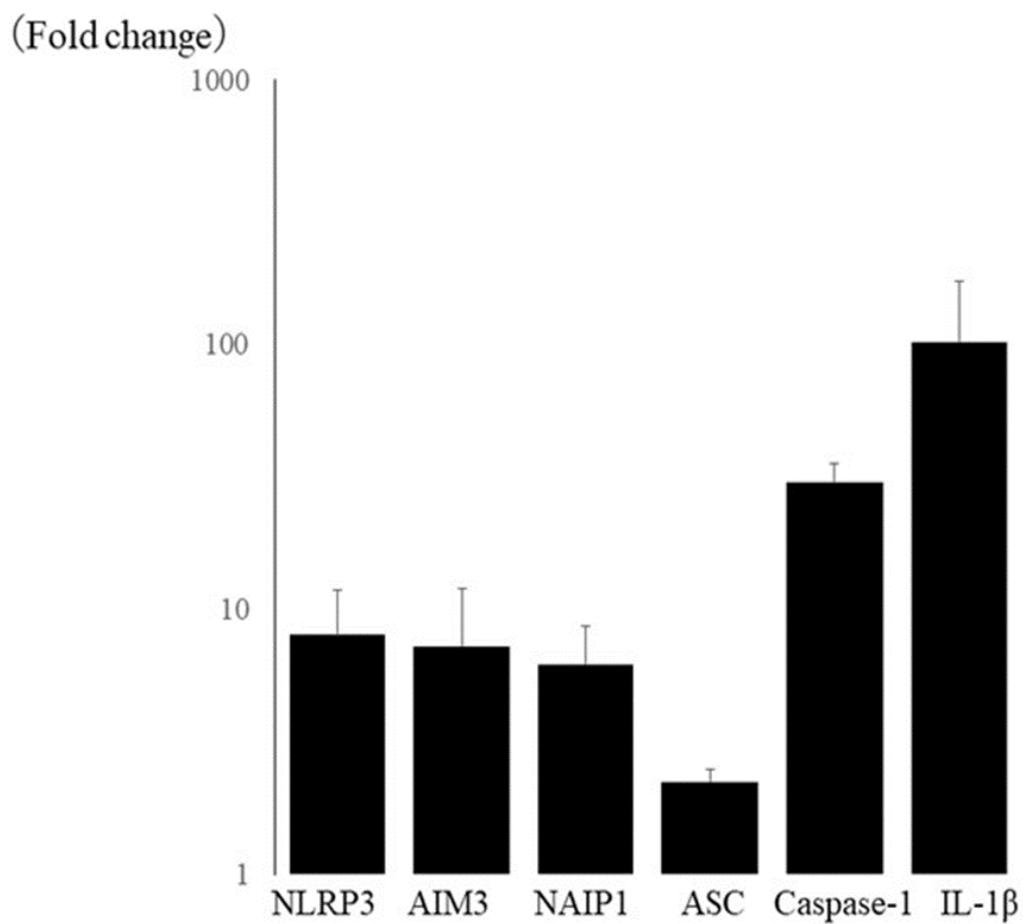


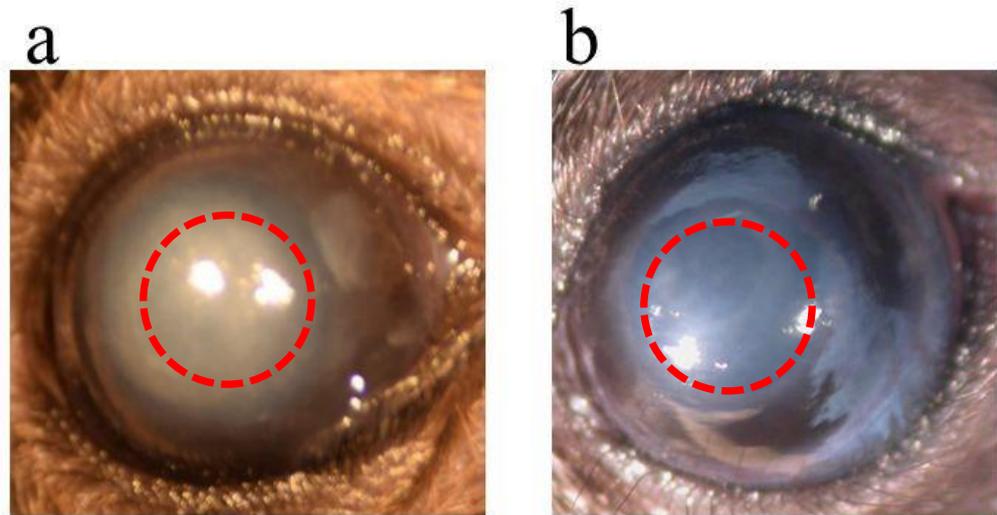
図 4. Laser microdissection 法  
Laser microdissection (Leica)を用いて角膜実質（赤線の範囲内）を単離した。

図 5



Heat map: RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Inflammasomes (PAMM-097ZC)  
未処置角膜 vs アルカリ外傷 WT





WT:角膜混濁

NLRP3KO:角膜混濁

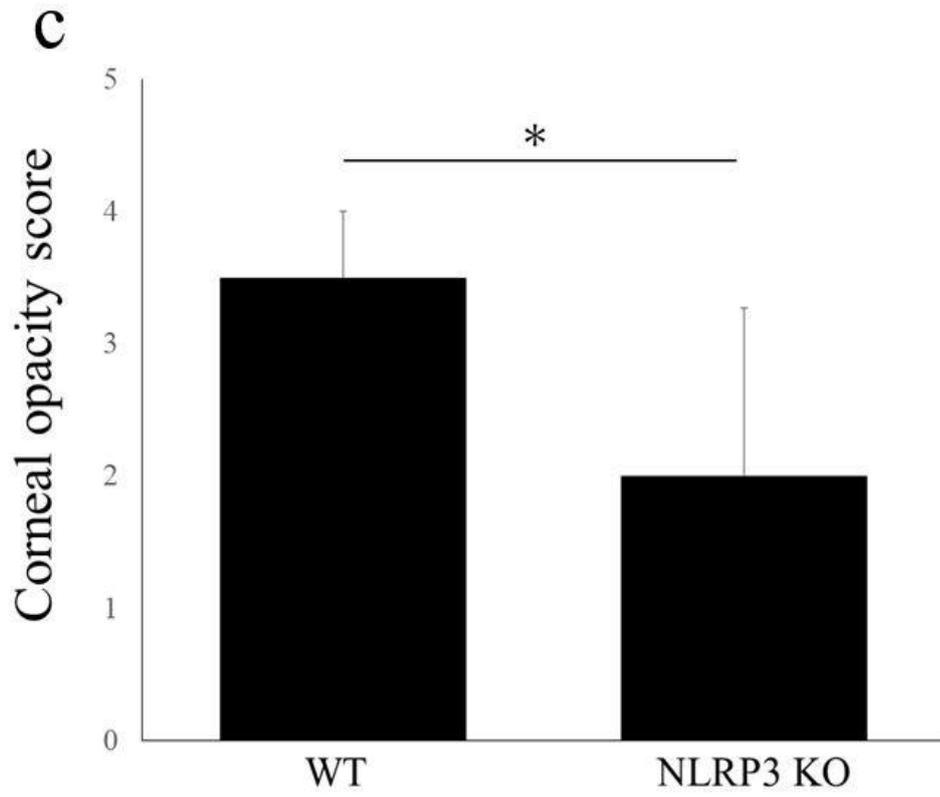
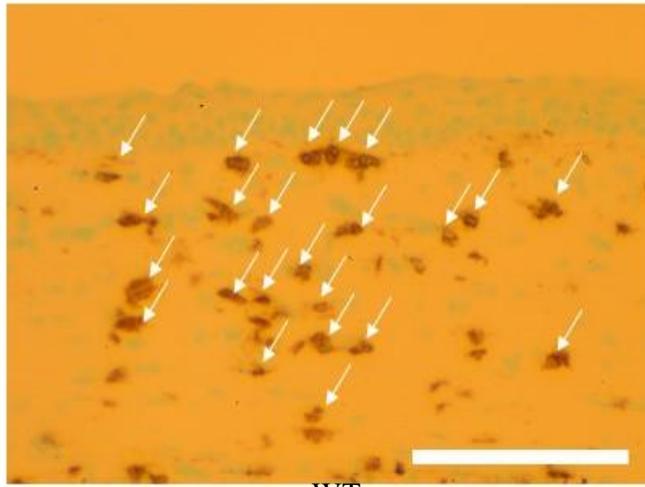


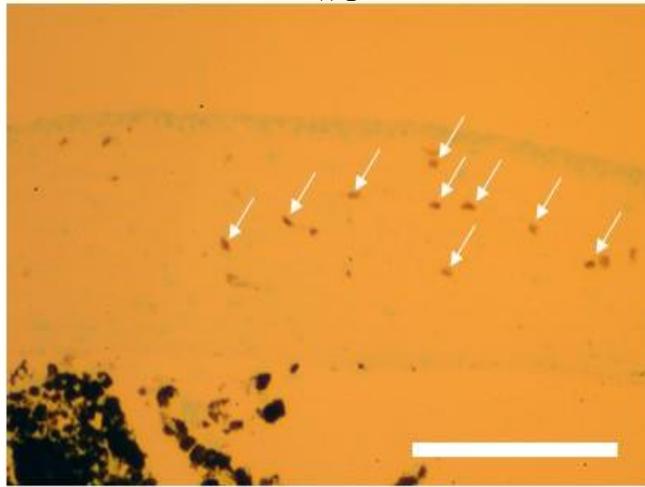
図 7

a



WT

b



NLRP3 KO

c

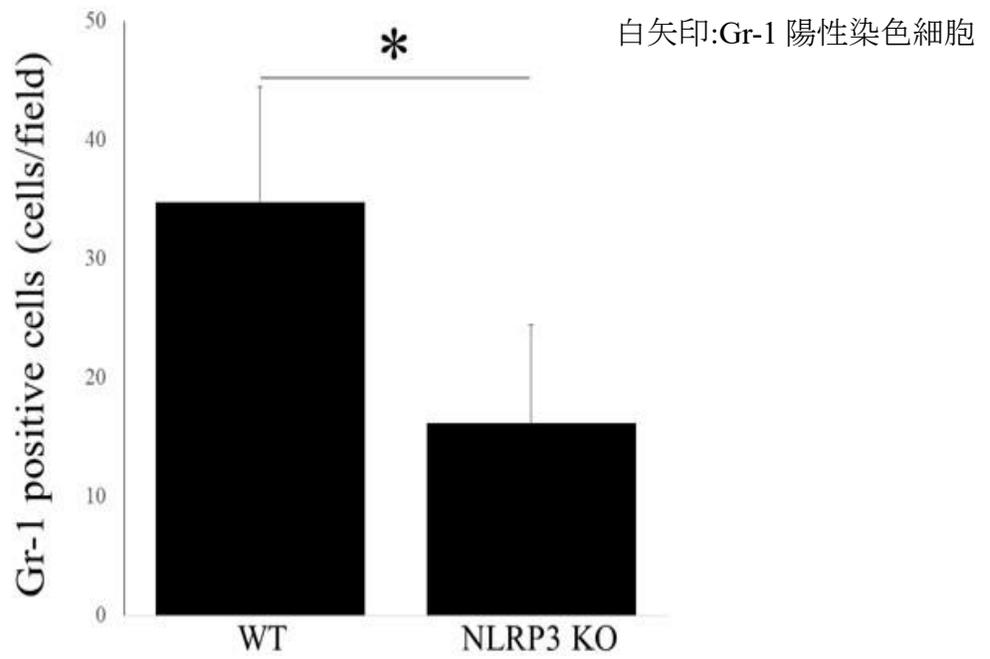
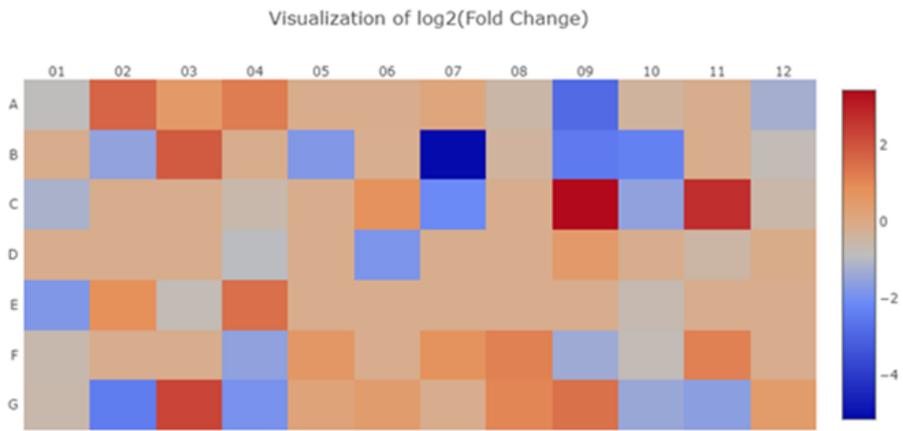


図 8



Heat map: RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse  
Inflammatory Response & Autoimmunity (PAMM-077)  
アルカリ外傷 WT vs NLRP3KO

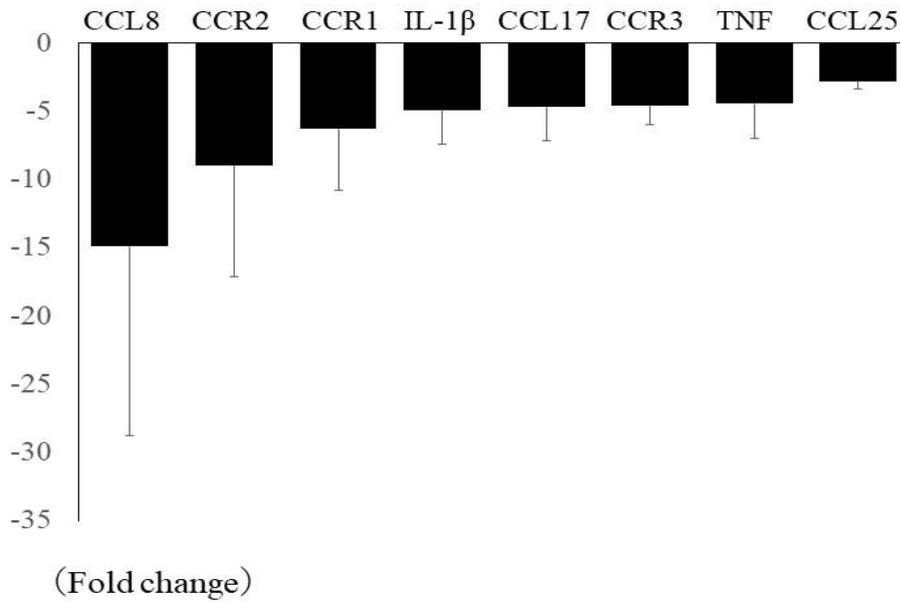
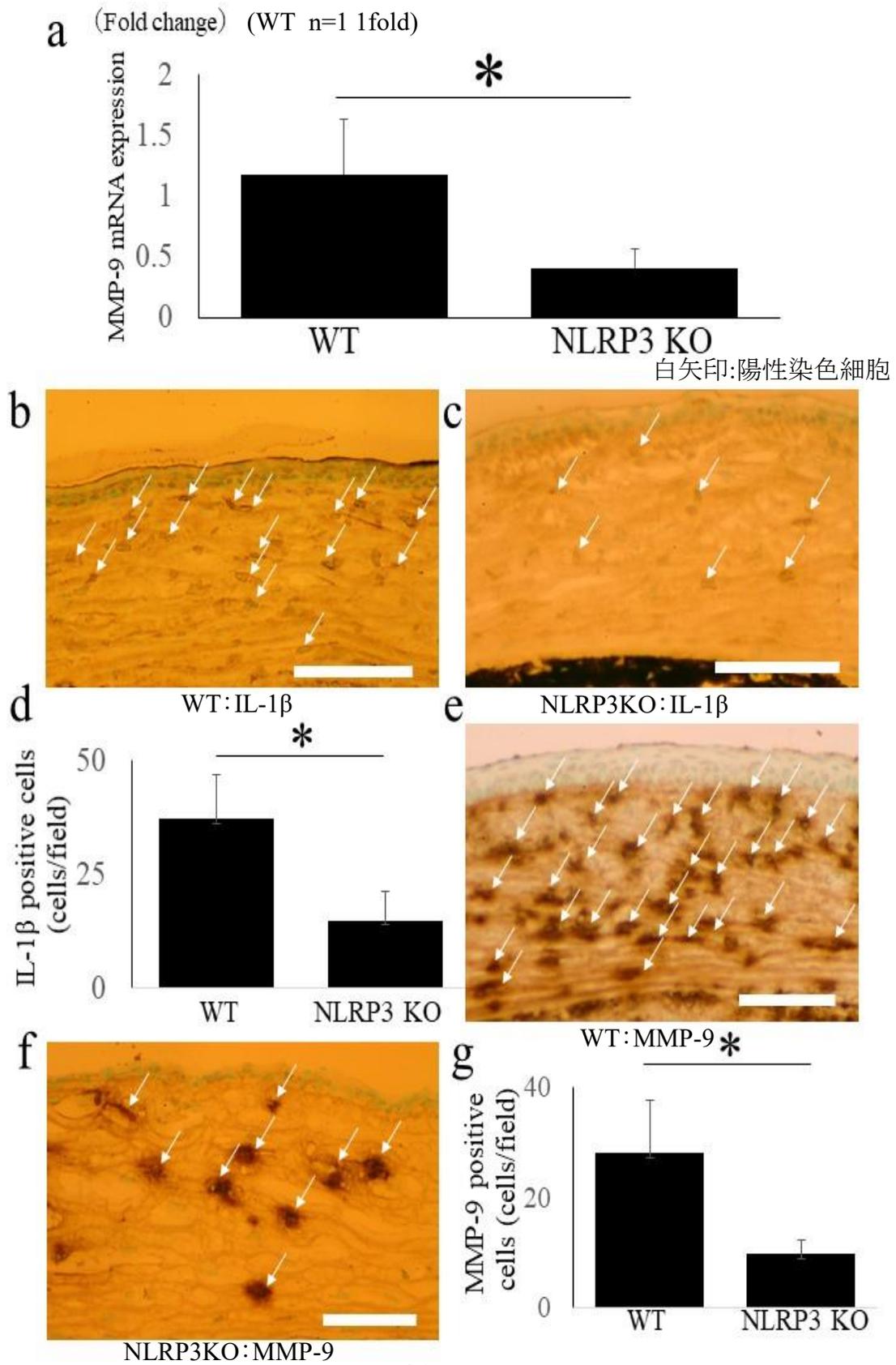


図 9



☒ 10

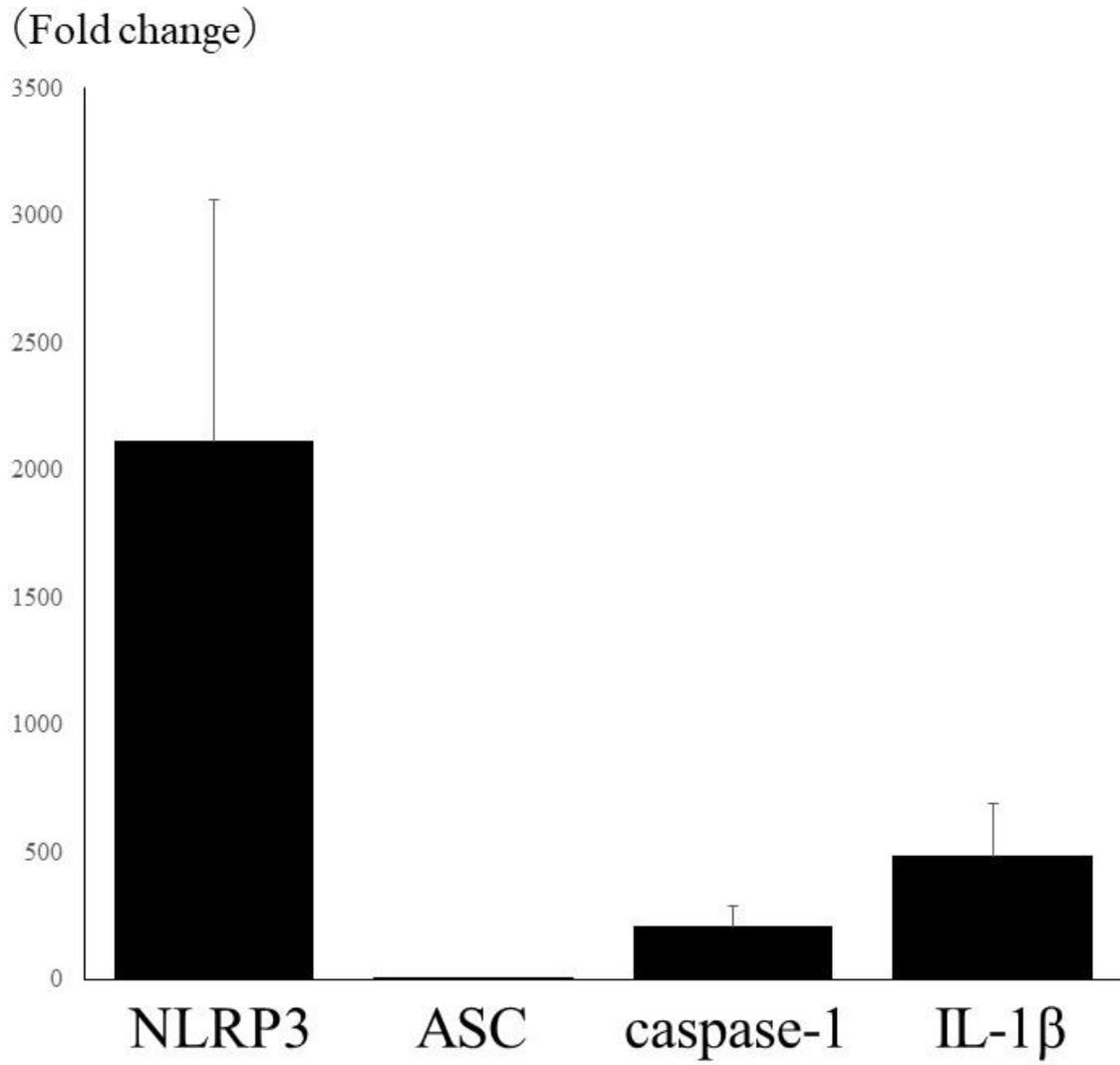
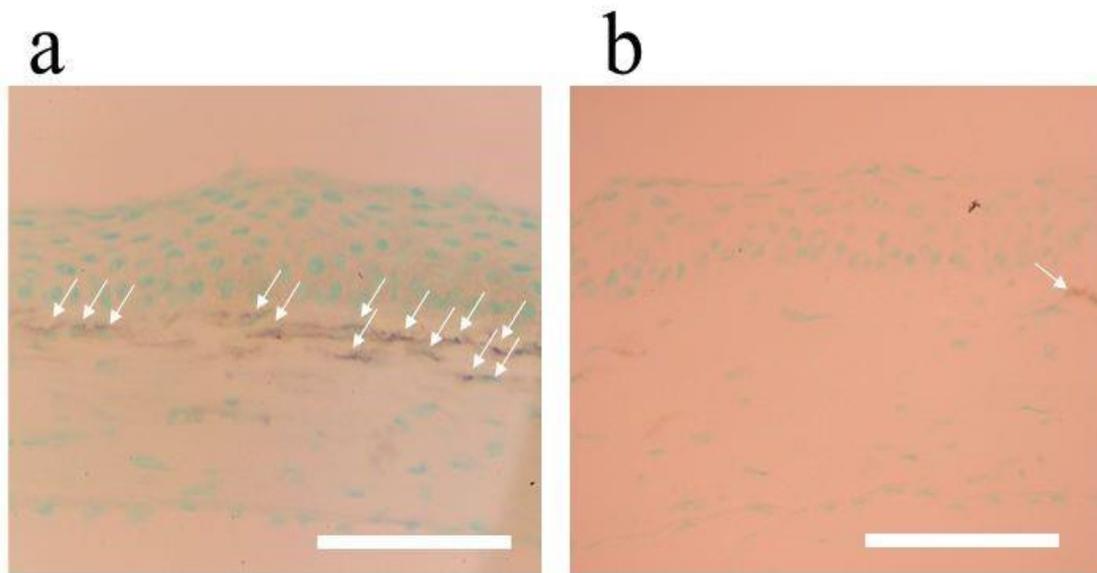
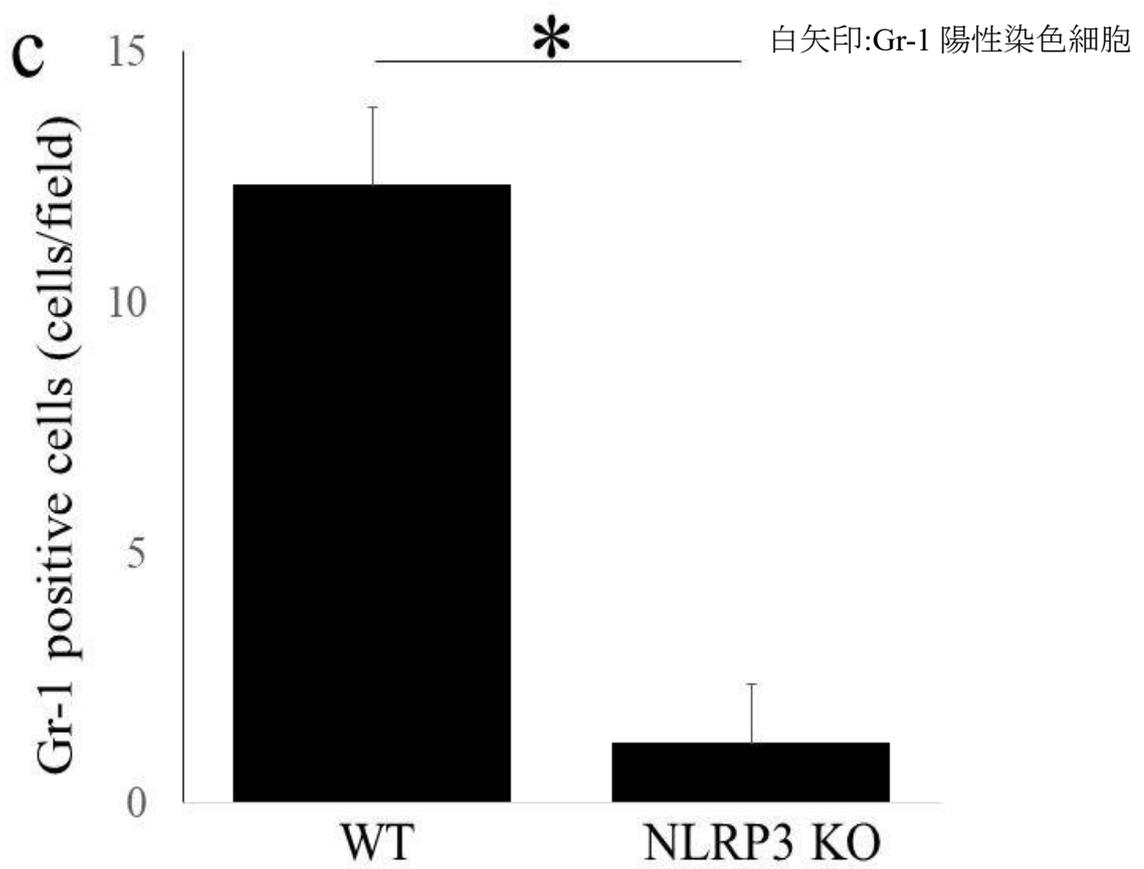


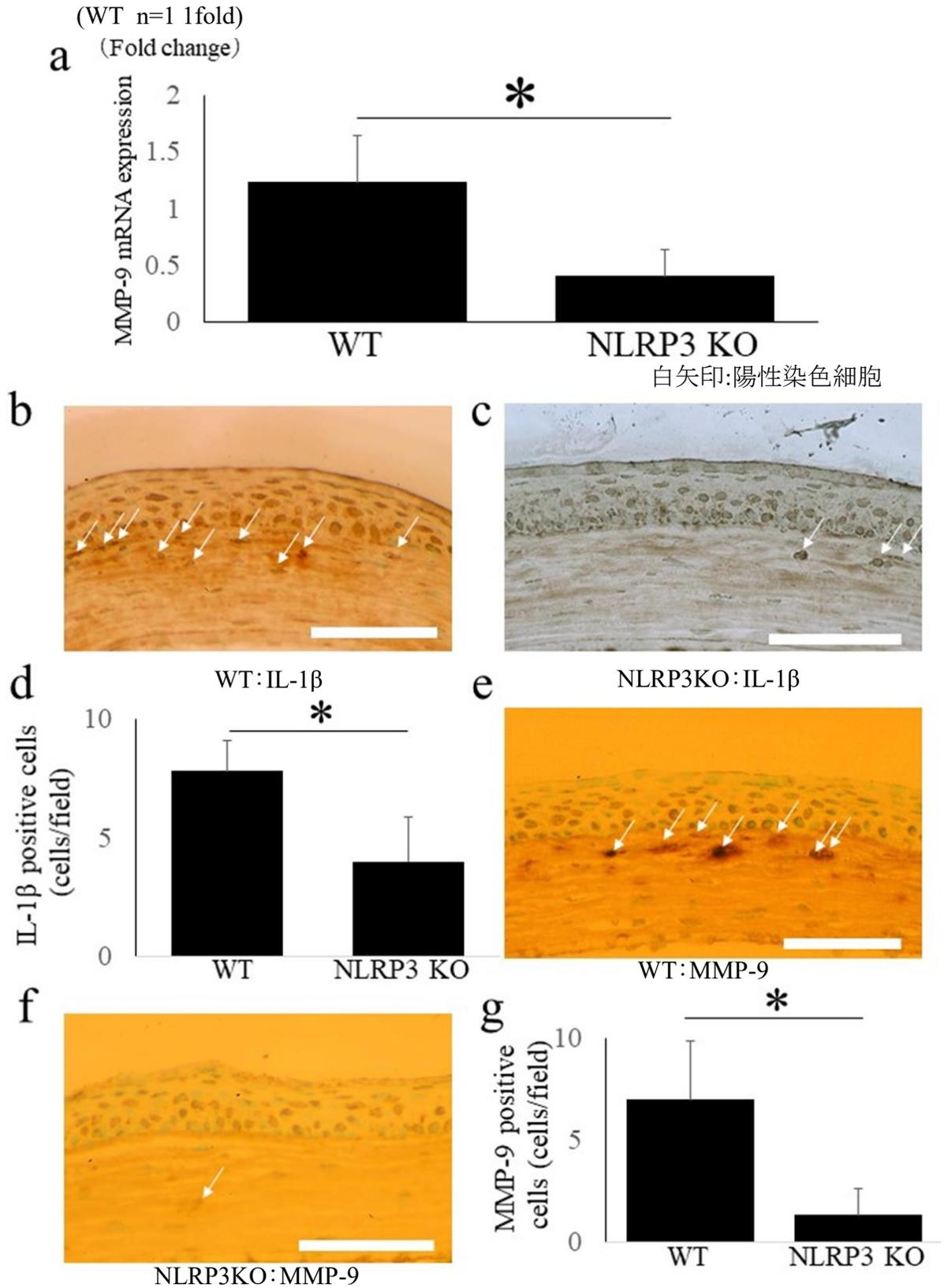
図 11



WT

NLRP3KO





## 【図の説明】

表 1 角膜混濁スコア.

### 図 1. 正常ヒト角膜の組織学的所見

角膜は組織学的に角膜上皮層、ボーマン膜、角膜実質層、デスメ膜、角膜内皮細胞層の5層に分類される。

### 図 2 インフラマソームが形成される過程

NLRP3 などの細胞質内パターン認識受容体は、刺激となる因子により、イオン流出モデル、Reactive oxygen species (ROS)モデル、リソソーム崩壊モデル等の経路を介して活性化され、構造変化を起こし、ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)と呼ばれるアダプター蛋白と蛋白分解酵素である caspase-1 と結合し、インフラマソームとよばれるタンパク質複合体を形成する。このインフラマソームによって caspase-1 が活性化され、IL-1 や IL-18 などの炎症性サイトカインの分泌・活性化を誘導する。

### 図 3. インフラマソームの構造

NLR は Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)を中核に leucine-rich repeat (LRR)domain、Pyrin domain や CARD 等の複数のドメインが組み合わさり形成される。NLR の代表的なものとして、NLRP1、NLRP3、NLRC4、AIM2 がある。

### 図 4. Laser microdissection 法

摘出眼を O.C.T を用いて包埋し、クライオスタットを使用して 2 $\mu$ m の厚さで laser microdissection スライドガラス (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)上カットした。Laser microdissection (Leica)を用いて角膜実質 (赤線の範囲内) を単離した。

### 図 5. アルカリ外傷モデル角膜中のインフラマソーム関連の遺伝子発現の増強

PCR アレイを用いて図に示すとアルカリ外傷モデルマウスで NLRP3(8.0 $\pm$ 3.9 fold)、AIM3(7.2 $\pm$ 4.8 fold)、NAIP1(6.2 $\pm$ 2.5 fold)の NLR や IL-1 $\beta$ (102.4 $\pm$ 71.1 fold)、ASC(2.2 $\pm$ 0.3 fold)、caspase-1(30.1 $\pm$ 5.4 fold)のインフラマソームの関連遺伝子の発現が増強した。(未処置眼を正常対象とし、control に設定した。)

## 図 6. アルカリ外傷モデル NLRP3KO マウス角膜における角膜混濁の抑制

まず、アルカリ外傷モデルマウスの角膜混濁の度合いを、角膜混濁スコア(表 1)を用いて、WT マウス(図 6a)と NLRP3 KO(図 6b)マウスで比較した。NLRP3 KO マウスは WT マウスと比べて有意に低い角膜混濁スコアを示した。(N=10 each, WT マウス;  $3.5 \pm 0.5$ , NLRP3 KO マウス;  $2.0 \pm 1.2$  \* $p < 0.05$ ) (図 6c)

## 図 7. アルカリ外傷モデル NLRP3 KO マウス角膜における好中球浸潤の抑制

アルカリ外傷角膜に対する免疫組織学的検討で好中球に染色する Gr-1 細胞を観察した。光学顕微鏡 200 倍観察下 Gr-1 免疫染色アルカリ外傷モデル WT マウス角膜(図 7a) アルカリ外傷モデル NLRP3KO マウス角膜(図 7b)での角膜実質中陽性細胞をカウントして比較すると NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べてアルカリ外傷による好中球浸潤は有意に抑制されていた(N=5, WT マウス;  $34.8 \pm 9.7$  cells/field, NLRP3 KO マウス;  $16.1 \pm 8.3$  cells/fields, \* $p < 0.01$ ) (図 7c) Bar=40 $\mu$ m。

## 図 8. アルカリ外傷モデル NLRP3 KO マウス角膜における炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の減弱

PCR アレイを用いて、WT マウスと NLRP3 KO マウスで比較すると CCL8 ( $-14.9 \pm 13.9$  fold), CCR2 ( $-8.9 \pm 8.1$  fold), CCR1 ( $-6.3 \pm 4.4$  fold), IL-1 $\beta$  ( $-4.9 \pm 2.5$  fold), CCL17 ( $-4.7 \pm 2.5$  fold), CCR3 ( $-4.6 \pm 1.4$  fold), TNF ( $-4.4 \pm 2.6$  fold), and CCL25 ( $-2.8 \pm 0.5$  fold) と NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べて炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の減弱を認めた。

## 図 9. アルカリ外傷モデル NLRP3 KO マウス角膜における MMP-9 m-RNA 発現の低下、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 蛋白発現の減少

RT-PCR でアルカリ外傷モデルマウスの角膜において WT マウスと NLRP3KO マウスで比較し、NLRP3KO マウスで有意に MMP-9 m-RNA 発現の低下を認めた。(N=8, WT マウス;  $1.2 \pm 0.5$  fold, NLRP3 KO マウス;  $0.4 \pm 0.1$  fold., respectively, \* $p < 0.05$ ,

WT の検体のうち、もっとも平均値に近い 1 検体の値を control と設定した。) (図 9a)

アルカリ外傷モデル角膜に対する免疫組織学的検討で IL-1 $\beta$  と MMP-9 蛋白発現を観察した。光学顕微鏡 200 倍観察下 IL-1 $\beta$  免疫染色アルカリ外傷モデル WT マウス角膜(図 9b) アルカリ外傷モデル NLRP3KO マウス角膜(図 9c)での角膜実質中陽性細胞をカウントして比較すると NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比較して IL-1 $\beta$  陽性細胞は有意に低下していた。(N=8 each, WT マウス;  $28.2 \pm 9.6$  cells/field, NLRP3 KO マウス;  $9.8 \pm 2.6$  cells/field, \* $p < 0.01$ ) (図 9d) Bar=40 $\mu$ m。光学顕微鏡 200 倍観察下 MMP-9 免疫染色アルカリ外傷モデル WT マウス角膜(図 9e) アルカリ外傷モデル NLRP3KO マウス角膜(図 9f)での角膜実質中陽性細胞をカウントして比較すると NLRP3KO マウスにおいて

WT マウスと比較して MMP-9 陽性細胞は有意に低下していた。(N=8 each, WT マウス;  $37.3 \pm 9.7$  cells/field, NLRP3 KO マウス;  $14.9 \pm 6.3$  cells/field,  $*p < 0.01$ )(図 9g) Bar=40 $\mu$ m。

図 10. LPS 点眼モデルマウスで角膜中の NLRP3 インフラマソーム関連の遺伝子発現が増強する

RT-PCR を用いて図に示すと LPS 点眼モデルマウスで NLRP3 ( $2113.1 \pm 950.4$  fold), IL-1 $\beta$  ( $485.9 \pm 208.7$  fold), and caspase-1 ( $210.5 \pm 79.2$  fold)などのインフラマソームの関連遺伝子の発現が増強した。それに対し、ASC ( $1.3 \pm 0.3$  fold)の発現は増強を認めなかった。(未処置眼を正常対象とし、control に設定した。)

図 11. LPS 点眼モデル NLRP3 KO マウス角膜における好中球浸潤の低下

光学顕微鏡 200 倍観察下 Gr-1 免疫染色 LPS 点眼モデル WT マウス角膜(図 10a)LPS 点眼モデル NLRP3KO マウス角膜(図 10b)で比較し、NLRP3KO マウスにおいて WT マウスと比べて好中球浸潤の有意な低下を認めた(N=3 each, WT マウス;  $12.3 \pm 1.5$  cells/field, NLRP3 KO マウス;  $1.2 \pm 1.1$  cells/field, respectively,  $*p < 0.01$ ) (図 10c) Bar=40 $\mu$ m。

図 12. LPS 点眼モデル NLRP3 KO マウス角膜において MMP-9 m-RNA 発現の低下、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 タンパク発現の低下

RT-PCR で LPS 点眼モデルマウスの角膜において WT マウスと NLRP3KO マウスで比較し、NLRP3KO マウスで有意に MMP-9 m-RNA 発現の低下を認めた。(N=3, WT マウス  $1.2 \pm 0.4$ fold, NLRP3KO マウス  $0.4 \pm 0.3$ fold, respectively,  $*p < 0.05$  WT の検体のうち、もっとも平均値に近い 1 検体の値を control と設定した。).(図 12a)

LPS 点眼モデル角膜に対する免疫組織学的検討で IL-1 $\beta$  と MMP-9 蛋白発現を観察した。光学顕微鏡 200 倍観察下 IL-1 $\beta$  免疫染色 LPS 点眼モデル WT マウス角膜(図 12b)LPS 点眼モデル NLRP3KO マウス角膜(図 12c)での角膜実質中陽性細胞をカウントして比較すると NLRP3 KO マウスにおいて WT マウスと比べて IL-1 $\beta$  陽性細胞は有意に低下していた(N=8 each, WT マウス;  $7.8 \pm 1.3$  cells/field, NLRP3 KO マウス;  $4.0 \pm 1.9$ cells/field,  $*p < 0.01$ ) (図 12d)。光学顕微鏡 200 倍観察下 MMP-9 免疫染色 LPS 点眼モデル WT マウス角膜(図 12e)LPS 点眼モデル NLRP3KO マウス角膜(図 12f)での角膜実質中陽性細胞をカウントして比較すると NLRP3 KO マウスにおいて WT マウスと比べて LPS 点眼による MMP-9 陽性細胞は有意に低下していた(N=8 each, WT マウス;  $7.0 \pm 2.9$  cells/field, NLRP3 KO マウス;  $1.3 \pm 1.3$  cells/field,  $*p < 0.01$ ) (図 12g) Bar=40 $\mu$ m。

【引用文献】

1. 西田輝夫 角膜テキスト エルゼビア・ジャパン、東京、2010:24-25.
2. 辻川元一、西田幸二、横井則彦、前田直之（編集）、大鹿哲郎（監修）：眼手術学 4：角膜・結膜・屈折矯正：2013 文光堂 2-5.
3. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*1983; 24:1442-3.
4. 近間泰一郎、西田幸二、横井則彦、前田直之（編集）、大鹿哲郎（監修）：眼手術学 4：角膜・結膜・屈折矯正：文光堂 2013: 6-8.
5. Wilson SE, et al. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18: 293-309.
6. 西田輝夫 角膜テキスト エルゼビア・ジャパン、東京、2010: 71-74.
7. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology.* 2000; 44: 415-425.
8. Clements JL, Dana R. Inflammatory corneal neovascularization: Etiopathogenesis. *Semin Ophthalmol.* 2011; 26: 235-245.
9. Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Faghihzadeh S, Hassan ZM. Roles of IL-8 in ocular inflammations: A review. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011;19: 401-412.
10. Amano S et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* . 1998 Jan;39(1):18-22.
11. Boff, D, et al. Neutrophils: Beneficial and Harmful Cells in Septic Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2018 19, E468.
12. 大鹿哲郎（編集主幹）、園田康平（編集）、近藤峰生（編集）、稲谷大（編集）：眼科学：文光堂 2020: 132.
13. Sakimoto, T, et al. Upregulation of tumor necrosis factor receptor 1 and TNF-alpha converting enzyme during corneal wound healing. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2008 52, 393-398.
14. Saika, S. et al. Therapeutic effect of topical administration of SN50, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, in treatment of corneal alkali burns in mice. *Am. J. Pathol.* 2005 166, 1393-403.
15. 大鹿哲郎（編集主幹）、園田康平（編集）、近藤峰生（編集）、稲谷大（編集）：眼科学：文光堂 2020: 133.

16. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta. *Mol. Cell.* 2002;10: 417–426.
17. Palazon-Riquelme P, Lopez-Castejon G. The inflammasomes, immune guardians at defence barriers. *Immunology.* 2018; 155: 320-330.
18. Marcel R. de Zoete, Noah W. Palm, Shu Zhu, Richard A. Flavell. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6.
19. Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. *Journal of Cell Science* 2017; 23: 3955-3963.
20. Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly *FEBS journal.* 2015; 282 :435-444.
21. Haneklaus M, O'Neill LA, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Current Opinion in immunology* 2013; 25: 40-45.
22. Martinon F, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006; 440:237-241.
23. Cronstein BN, Sunkureddi P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. *J Clin Rheumatol* 2013; 19: 19–29.
24. Dinarello, CA, et al. Role of IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2010; 17: 314–321.
25. Masters, SL, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nature Immunol.* 2010; 11: 897–904.
26. Vandanmagsar, B, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Med.* 2011; 17: 179–188.
27. Wen, H. et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunol.* 2011; 12: 408–415.
28. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012 481:278-86.
29. Masters, SL, Latz, E, O'Neill, LA. The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. *Sci. Transl. Med* 2011; 3: 81ps17.
30. Duewell, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464: 1357–1361.

31. Chi, H, et al. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation* 2004; 110: 1678–1685.
32. Menu, P. et al. Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis.* 2011;2: e137.
33. Heneka MT, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature.* 2013; 493:674-678.
34. Yan, Y. et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 2015; 160: 62–73.
35. Goverman, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9: 393–407.
36. Matsuki, T, et al. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.* 2006; 18: 399–407.
37. Furlan, R, et al. Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *J. Immunol.* 1999; 163: 2403–2409.
38. Shi, F.D, et al. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *J. Immunol.* 2000; 165: 3099–3104.
39. Gris, D, et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J. Immunol.* 2010; 185: 974–981.
40. Hirota SA, et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17: 1359-1372.
41. Willing B, et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15: 653-660.
42. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014; 157: 121-141.
43. Allen IC, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med.* 2010; 207:1045-1056.
44. Zaki MH, et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity.* 2010; 32:379-391.

45. Ranson N, et al. NLRP3-Dependent and -Independent Processing of Interleukin (IL)-1 $\beta$  in Active Ulcerative Colitis. *Int J Mol Sci.* 2018; 20: 57
46. Liu L, et al. The Pathogenic Role of NLRP3 Inflammasome Activation in Inflammatory Bowel Diseases of Both Mice and Humans. *J Crohns Colitis.* 2017; 11: 737-750.
47. Lazaridis LD, et al. Activation of NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Bowel Disease: Differences Between Crohn's disease and ulcerative Colitis digestive diseases *Science* 2017; 62: 2348-2356.
48. McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1898–1906.
49. Young-Su Yi. Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases *Korean J Physiol Pharmacol.* 2018; 22: 1-15.
50. Kleopatra D, et al. Novel insights into the role of inflammasomes in autoimmune and metabolic rheumatic diseases *Rheumatology International.* 2018; 38: 1345-1354.
51. Yi L, et al. Succinate/NLRP3 inflammasome induces synovial fibroblast activation: therapeutical effects of clematichinenoside AR on arthritis. *Front Immunol.* 2016; 7: 532.
52. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr Opin Rheumatol.* 2014; 26: 475-481.
53. Ka SM, et al. Citral alleviates an accelerated and severe lupus nephritis model by inhibiting the activation signal of NLRP3 inflammasome and enhancing Nrf2 activation. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17: 331.
54. Shin MS, et al. Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1 $\beta$  production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. *J Immunol.* 2013; 190: 1407-1415.
55. Shin MS, et al. U1-small nuclear ribonucleoprotein activates the NLRP3 inflammasome in human monocytes. *J Immunol.* 2012; 188: 4769-4775.
56. de Jesus AA, Canna SW, Liu Y, Goldbach-Mansky R. Molecular mechanisms in genetically defined autoinflammatory diseases: disorders of amplified danger signaling. *Annu Rev Immunol* 2015; 33:823–74.
57. Cuisset L, et al. Mutations in the autoinflammatory cryopyrin-associated periodic syndrome gene: epidemiological study and lessons from eight years of genetic analysis in France. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 495–9.

58. Hoffman HM, Wanderer AA, Broide DH. Familial cold autoinflammatory syndrome: phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:615–20.
59. Muckle TJ, Wells M. Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *Q J Med* 1962; 31:235–48.
60. Prieur AM, et al. A chronic, infantile, neurological, cutaneous and articular (CINCA) syndrome. A specific entity analysed in 30 patients. *Scand J Rheumatol Suppl* 1987; 66:57–68.
61. Aksentijevich I, et al. The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis Rheum* 2007; 56:1273–85.
62. Mukhin NA, et al. Predictors of AA amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2015; 35:1257–61.
63. Demirkaya E, et al. Performance of different diagnostic criteria for familial Mediterranean fever in children with periodic fevers: results from a Multicenter International Registry. *J Rheumatol* 2016; 43:154–60.
64. Niu L, Zhang S, Wu J, Chen L, Wang Y: Upregulation of NLRP3 Inflammasome in the Tears and Ocular Surface of Dry Eye Patients. *PLoS One*. 2015; 1-13.
65. Zheng Q, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes prime environment-induced murine dry eye. *Experimental Eye Research*. 2014; 125: 1-8.
66. Zheng Q, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. *Experimental Eye Research*. 2015; 134: 133-40.
67. Lee, J. E., Sun, Y., Gjorstrup, P., Pearlman, E. Inhibition of Corneal Inflammation by the Resolvin E1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2015; 56: 2728–2736.
68. Sakimoto, T., Ishimori, A. Anti-inflammatory effect of topical administration of tofacitinib on corneal inflammation. *Exp. Eye. Res*. 2016; 145: 110–117.
69. Thomas J, et al. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis *J Immunol*. 1997; 58: 1383-91.
70. Chen GL, Zhang JJ, Zhao J, Wang DJ, Zhang H: Evaluation of corneal graft survival in mice model. *International Journal of Ophthalmology*. 2013; 6:578-83.
71. Lamkanfi, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol*. 2011; 11: 213–220.

72. Hoseini, Z, et al. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J. Cell. Physiol.* 2018; 233: 2116–2132.
73. Boff, D, et al. Neutrophils: Beneficial and Harmful Cells in Septic Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: E468.
74. Hartl, D, et al. Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *J. Immunol.* 2008; 181: 8053–8067.
75. Asano, K, et al. Intestinal CD169(+) macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. *Nat. Commun.* 2015 6, 7802.
76. Islam, SA, et al. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* 2011 12, 167–177.
77. Fukumoto, J. et al. NLRP3 deletion protects from hyperoxia-induced acute lung injury. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2013; 305: C182–189.
78. Mulay, SR, et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 $\beta$  secretion. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 236–246.
79. McDonald, B, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 2010; 330: 362–366.
80. Jin, L, Batra, S, Jeyaseelan, S. Deletion of Nlrp3 augments survival during polymicrobial sepsis by decreasing autophagy and enhancing phagocytosis. *J. Immunol.* 2017; 198: 1253–1262.
81. Karmakar, M., et al. Neutrophil IL-1 $\beta$  processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K<sup>+</sup> efflux. *J. Immunol.* 2015; 194: 1763–1775.
82. Karmakar, M., et al. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. *Nat. Commun.* 2016; 7: 10555.
83. Coulon PG, et al: NLRP3, NLRP12, and IFI16 inflammasomes induction and caspase-1 activation triggered by virulent HSV-1 strains are associated with severe corneal inflammatory herpetic disease. *Front Immunol* 2019; 16: 10: 1631.
84. Gimenez, F. et al. The inflammasome NLRP3 plays a protective role against a viral immunopathological lesion. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 99: 647–657.
85. Messmer EM, et al. Matrix Metalloproteinase 9 Testing in Dry Eye Disease using a commercially available point-of-care Immunoassay. *Ophthalmology* 2016; 123 :2300-2308.

86. Corrales RM, et al. Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology Visual Science*. 2006; 47: 3293-302.
87. Bian F, et al. Differential effects of dexamethasone and doxycycline on inflammation and MMP production in murine alkali-burned corneas associated with dry eye. *Ocular Surface*.: 2016; 14: 242-54.
88. Rohini G, et al. Matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9) and the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in patients with fungal keratitis. *Cornea* 2007;26: 207-211.
89. Mohan R, et al. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 18: 277:2065-72.
90. Bian F, et al. Desiccating stress-induced MMP production and activity worsens wound healing in alkali-burned corneas. *Investigative Ophthalmology Visual Science*. 2015; 56: 4908-4918.
91. Li, Q, et al. Enhancement by neutrophils of collagen degradation by corneal fibroblasts. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 74: 412–419.
92. McClellan SA, et al. Matrix metalloproteinase-9 amplifies the immune response to *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. *Invest Ophthalmology Visual Science*. 2006; 47: 256-64.
93. Yerramothu P, Vijay AK, Willcox MDP: Inflammasomes, the eye and anti-inflammasome therapy. *Eye* 2018; 32: 491-505.
94. Lamkanfi M, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol.* 2009; 187:61–70.
95. Liao J, et al. The NLRP3 inflammasome is critically involved in the development of bronchopulmonary dysplasia. *Nat Commun.* 2015; 6: 8977.
96. Youm Y, et al. The ketone metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med*, 2015; 21: 263-269.
97. Cao Z, et al. Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2019,51:1087-1095.
98. Sun Q, et al. Inflammasome and autophagy regulation—a two-way street. *Mol Med.* 2017;23: 188–195.
99. Dupont N, et al. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *EMBO J* 2011, 30: 4701–4711.

100. Coll, RC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 2015; 21: 248.
101. Jiang, H, et al.: Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *J Exp Med*, 2017; 214: 3219-3238.
102. Moltó A, Olivé A. Anti-IL-1 molecules: new comers and new indications. *Joint Bone Spine* 2010; 77:102–7.
103. Wannamaker W, et al. (S)-1-((S)-2-[[1-(4-Amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino]-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide (VX-765), an Orally Available Selective Interleukin (IL)-Converting Enzyme/Caspase-1 Inhi. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321:509–16.
104. Maroso M, et al. Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J Int Med.* 2011; 270:319–26.
105. Flores J, et al. Caspase-1 inhibition alleviates cognitive impairment and neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun.* 2018; 9(1)3916.
106. Stack JH, et al. IL-converting enzyme/caspase-1 inhibitor VX-765 blocks the hypersensitive response to an inflammatory stimulus in monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients. *J Immunol* 2005; 175:2630–4.
107. Terrada C, et al. Ocular modifications in a young girl with cryopyrin-associated periodic syndromes responding to interleukin-1 receptor antagonist anakinra. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2011; 1:133–136.
108. Joni AT, et al: Keratoendotheliitis Fugax Hereditaria: A novel cryopyrin-associated periodic syndrome caused by a mutation in the nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) Gene. *Am J Ophthalmol.* 2018; 188:41-50.
109. Bian, F. et al. Inhibition of NLRP3 Inflammasome Pathway by Butyrate Improves Corneal Wound Healing in Corneal Alkali Burn. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: E562.
110. Albalawi F, et al. The P2X7 Receptor Primes IL-1beta and the NLRP3 Inflammasome in Astrocytes Exposed to Mechanical Strain. *Front Cell Neurosci.* 2017 ;8;11: 227.
111. Vasiljeva O., A. et al. 2006. Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 5242–5250.
112. Hornung V., F, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 847–856.

113. Kim SM, et al. Inflammasome-Independent Role of NLRP3 Mediates Mitochondrial Regulation in Renal Injury. *Front Immunol.* 2018 12; 9:2563.
114. McElvaney OJ, et al. Specific Inhibition of the NLRP3 Inflammasome as an Antiinflammatory Strategy in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019; 200:1381-1391.
115. Rossana G. Iannitti, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nature Communications* volume 7, 2016:10791.
116. Foldenauer ME, et al. Mammalian target of rapamycin regulates IL-10 and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. *J Immunol* 2013;190: 5649–5658.
117. Ni N, et al. Use of adjunctive topical corticosteroids in bacterial keratitis. *Curr Opin Ophthalmol.* 2016; 4: 353-7.
118. Mankan, A. K. et al. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 $\beta$  processing in neutrophils. *Eur J Immunol* 2012; 42: 710–715
119. Sun, Y. et al. Neutrophil Caspase-11 Is Required for Cleavage of Caspase-1 and Secretion of IL-1 $\beta$  in *Aspergillus fumigatus* Infection. *J Immunol.* 2018; 201: 2767–2775.
120. Sadatomo, A. et al. Interaction of Neutrophils with Macrophages Promotes IL-1 $\beta$  Maturation and Contributes to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol.* 2017; 199: 3306–3315.
121. Zhang, Y. et al. The GTPase Rab1 Is Required for NLRP3 Inflammasome Activation and Inflammatory Lung Injury. *J Immunol.* 2019; 202: 194–206.
122. Neudecker, V. et al. Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome. *J Exp Med.* 2017; 214: 1737–1752.

## 研究業績

清水 洋明

- I 発表 ①一般発表 4  
②特別発表 0
  
- II 論文 ①原著論文 1  
②症例報告 1  
③総説 なし
  
- III 著者 なし

## I 発表

### ①一般発表

1. 清水洋明、崎元 暢、山上聡、杉谷雅彦：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の完全寛解後に結膜 MALT 型リンパ腫を発症した一例，第 71 回日本臨床眼科学会，東京，2017 年 10 月
2. 清水洋明、崎元 暢、崎元丹、山上聡：全層角膜移植眼に対する選択的抜糸の乱視矯正効果，第 42 回日本角膜学会総会/第 34 回日本角膜移植学会，広島，2018 年 2 月
3. 清水洋明、崎元 暢、山上聡：実験的角膜炎症におけるインフラマソーム発現についての検討，第 122 回日本眼科学会総会，大阪，2018 年 4 月
4. 清水洋明 花崎浩継 加島陽二 秋本高義、原誠、中嶋秀人：両側視神経萎縮から神経梅毒の診断に至った一例，第 77 回神経眼科学会，北海道，2019 年 10 月

### ②特別発表          なし

## II 原著論文

### ①原著論文

1. Shimizu H, Sakimoto T, Yamagami S: Pro-inflammatory role of NLRP3 inflammasome in experimental sterile corneal inflammation. Scientific Reports Vol.9: No. 9596, 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46116-9>.

### ②症例報告

1. 清水 洋明, 花崎 浩継, 加島 陽二, 秋本 高義, 原 誠, 中嶋 秀人: 両側視神経萎縮から神経梅毒の診断に至った一例, 眼科 62: 611-616, 金原出版, 東京, 2020.

### ③総説 なし

## III 著書

なし