論文の内容の要旨

論文題目　　コンディショナルノックアウトマウスを用いたHMGB1の
感染・炎症における役割の解析

氏名　　松田淳志

炎症は侵入した病原体の排除だけでなく、組織の修復などを促進して恒常性を維持するために重要な反応である。一方で、過度な炎症は種々の炎症性疾患との関連が指摘されているため、炎症が惹起されるメカニズムやその制御機構を明らかにすることは病態メカニズムの解明だけでなく、疾患治療に向けた薬剤開発への応用においても重要である。

炎症を誘導する因子として病原体由来の分子パターン (PAMPs) や自然免疫受容体とそのシグナル伝達機構が精力的に研究されてきたが、そのような中で近年、傷害を受けた細胞や死細胞から放出される自己由来分子も傷害関連分子パターン (DAMPs) として炎症に関与することが示唆されており、HMGB1 (High-mobility group box 1) はその代表例の一つとして考えられている。炎症性刺激や細胞死に伴って細胞外に放出されたHMGB1 は、RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts) や TLR4 (Toll-like receptor 4) に認識されて TNF-α (Tumor necrosis factor-α) などの炎症性サイトカイン産生を誘導することで炎症を促進する機能を持つことが示唆されている。実際、HMGB1 の炎症促進作用を、中和抗体や阻害剤を用いて抑制することで、敗血症や腸炎などの種々の疾患病態が抑えられることが報告されている。

そこでさらに HMGB1 の機能の詳細を検討するため、また、マウス個体レベルでの HMGB1 の病態における役割について解析するため、近年、当研究室で作製された *Hmgb1* コンディショナルノックアウトマウスを用いて解析を行うことにした。これまでの解析から、マクロファージを含むミエロイド系細胞特異的に HMGB1 を欠損させたマウス (*LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$マウス) では、LPS (Lipopolysaccharide) 誘導性ショック時の生存率が野生型マウスより顕著に低下することが明らかとなっていた。しかしながら、

その理由など、詳細については不明であったため、本研究においては、まずこの原因を明らかにし、HMGB1 の炎症・免疫応答における役割についてさらに解析を進めることにした。

LPS 刺激時において、ミエロイド系細胞が HMGB1 を細胞外に放出することが報告されていたため、*LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスを作製し、このマウスを用いて LPS ショックによる応答を検討した。その結果、生存率の低下が認められ、肺の炎症が亢進することが確認された。この時、末梢血中 TNF-α、IL-6 (Interleukin-6)、IL-12p40 といったサイトカイン量に差はなかったが、興味深いことに IL-1β、IL-18 の産生に亢進が認められた。しかしながら、末梢血中の HMGB1 量には差がなかったため、IL-1β、IL-18 産生の亢進には細胞外ではなく細胞内の HMGB1 が関与していることが示唆された。

IL-1β、IL-18 の産生にはインフラマソームの活性化が関与していることが知られている。そこで、*LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスから調製した腹腔マクロファージを用い、LPS+ATP (adenosine triphosphate) の刺激によりインフラマソームを活性化させた際の IL-1β産生を検討したところ、この産生に上昇が認められた。よって、細胞内 HMGB1 がインフラマソームの活性化を抑制していることが示唆された。

先行研究より、オートファジーがインフラマソーム活性を抑制すること、また、HMGB1 がオートファジー誘導を促進することが報告されていたため、HMGB1 がオートファジー誘導の促進を介してインフラマソーム活性を抑制していることが予想された。そこで *LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスの腹腔マクロファージを LPS 刺激した際のオートファジー誘導を検討したところ、オートファジーマーカーである LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)-II の発現が野生型に比して減弱することが判明し、HMGB1 がオートファジー誘導の促進を介して IL-1β、IL-18 産生の抑制と細胞死の抑制に関与していることが示唆された。

オートファジーは細胞内寄生性細菌に対する防御応答にも関与していることが知られているため、*LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスは細菌感染に脆弱性を示すことが予想された。リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)を *LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスに感染させたところ、予想通り、野生型に比して生存率が低下し、脾臓・肝臓におけるリステリア菌タイターが増加した。さらに *LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウス由来の腹腔マクロファージに *in vitro* でリステリア菌を感染させたところ、LC3-II の発現の減弱が認められ、オートファジーの誘

導が減弱していることがわかった。以上の一連の解析から、細胞質内 HMGB1 は炎症抑制と感染防御に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

上記の *LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスを用いた解析では、野生型マウスと比較して LPS 誘導性ショック時の血中 HMGB1 量に差が見られなかったことから、当初の目的であった細胞外 HMGB1 の炎症亢進に関わる役割の解析が困難であることが判明した。そこで次に、タモキシフェン依存的に全身性に HMGB1 を欠失するマウス (*Cre*-ER^{T2+}-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウス)を作製した。このマウスに LPS 誘導性ショックを行ったところ、野生型に比して血中 HMGB1 量は顕著に減少した。一方、マウスの生存率は野生型と同程度であった。血中サイトカインについて検討したところ、*LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスと同様に IL-1βが有意に増加しており、TNF-α、IL-6、IL-12p40 には差はがなかった。*LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスが LPS ショックに脆弱性を示したことと併せて考えると、*Cre*-ER^{T2+}-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスでは炎症が亢進しているにも関わらず生存率が野生型と同程度にまで上昇したと考えることができると思われる。そしてその原因には血中 HMGB1 量が減少することが関係しているものと考えられた。

細胞外 HMGB1 はどのように炎症の促進に関与しているのか。TNF-α、IL-6、IL-12p40 の産生には差が認められなかったため、これまでの報告と異なり、それらの産生には関与していないものと思われた。細胞外 HMGB1 は炎症性細胞の遊走に関与するという報告もあるため、そこで次に、LPS を投与した *Cre*-ER^{T2+}-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスの肺に浸潤する CD11b^{+}細胞 (好中球を含む) の割合を検討した。その結果、*Cre*-ER^{T2+}-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスにおいて、肺における CD11b^{+}細胞の割合が低下することが分かった。減弱が見られた CD11b^{+}細胞群内での単球と好中球の割合には野生型と比して差が無かったため、特定の細胞群ではなく CD11b^{+}細胞全体の浸潤が低下していることが示唆された。またさらに、rHMGB1 を野生型マウスに投与し、肺における CD11b^{+}細胞の割合を検討したところ、これらの細胞の肺への浸潤が誘導されることが見出された。

以上の結果より、LPS 刺激によって細胞外に放出された HMGB1 は CD11b^{+}細胞の遊走に関与しており、*Cre*-ER^{T2+}-*Hmgb1*$^{f/f}$ マウスではこの機能が減弱したために *LysM*$^{Cre/+}$-*Hmgb1*$^{f/f}$マウスに比して LPS 誘導性ショックに抵抗性を示した可能性が考えられた。細胞外 HMGB1 はどのようにこれらの細胞の遊走に関与しているのか、その機構について、細胞外 HMGB1 を認識する受容体及びそのシグナル伝達機構など、今後その詳細について明らかにしていきたい。