

論文の内容の要旨

論文題目

Elucidation of the molecular mechanisms underlying 12/15-lipoxygenase-dependent functional regulation of macrophages

(12/15-リポキシゲナーゼによるマクロファージの機能制御機構の解明)

氏名 加藤 大雅

【序】

炎症反応は外傷や感染に対する重要な生体防御系であり、好中球の一過的な浸潤を伴う起炎期と、マクロファージ (MΦ) などの貪食細胞がアポトーシスした炎症細胞や組織屑のクリアランスを行う収束期からなる。特に収束過程は組織恒常性の維持に必須であり、この制御が破綻すると慢性炎症や組織障害を伴う病態へと発展してしまう。12/15-リポキシゲナーゼ (12/15-LOX) は、多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸やEPA、DHAを基質として、炎症抑制性の脂質メディエーター産生に関わることが知られている酵素である。これまでに12/15-LOX欠損マウスのフェノタイプとしては、自己免疫疾患の自然発症が報告されており、その生体恒常性維持に対する重要性は示唆されているが、その詳細なメカニズムに関しては未だに不明な点が多い。

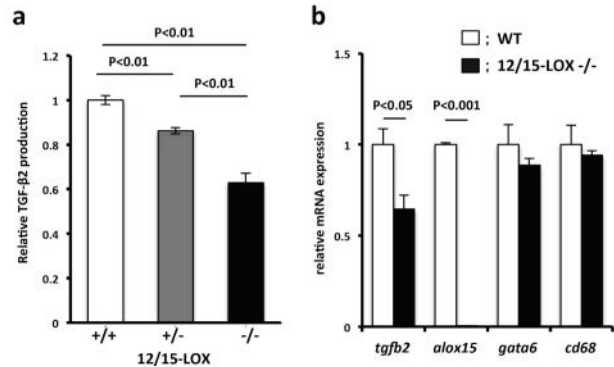
我々はこれまでに、急性炎症モデルであるマウスのザイモサン腹膜炎モデルを用いた解析から、収束期の炎症巣に存在するMΦのうち、5-10%程度の集団が12/15-LOXを高発現することを見出している。この12/15-LOX陽性MΦは、マウス腹腔に常在する組織常在性MΦを由来とし、炎症の収束の進行と共に腹腔内に集積する。私は修士課程において、この12/15-LOX陽性MΦが他のMΦに比べて、貪食や組織修復に関連する遺伝子群を高発現する一方で、炎症性サイトカインや抗原提示関連の発現が低く、炎症を抑制する方向の性質を有する事、さらにその性質が12/15-LOX欠損時に減弱する事を明らかにした。

そこで私は博士課程において、これら12/15-LOX陽性MΦを用いた解析から、細胞レベルで特徴的な遺伝子発現パターンを規定する転写制御機構を明らかにし、それを制御する活性代謝物の同定を目指した。さらに、このような12/15-LOX依存的なMΦの機能が炎症の収束に及ぼす影響について個体レベルでの解析を行った。

【方法と結果】

1. 12/15-LOX 陽性MΦの特徴的な TGF β2 の発現は12/15-LOX KO で減弱する

12/15-LOX 陽性MΦにおいて12/15-LOX 依存性的な発現パターンを示す遺伝子群の中から、炎症の収束に関わるサイトカインである TGF β2 に着目した。マウス腹腔より回収した常在細胞をプレートにて3日間培養した後、培地中に放出された TGF β2 の量を ELISA によって測定したところ、12/15-LOX ヘテロ、ホモ KO マウス由来の細胞でそれぞれ産生量が有意に減少する様子が観察された (図 1a)。また腹腔常在 MΦ における *tgfb2* mRNA 発現を定量 PCR によって測定したところ、12/15-LOX KO マウスで有意な発現減少が見られ、12/15-LOX 依存的な *tgfb2* の発現制御が転写レベルで行われている事が示唆された (図 1b)。

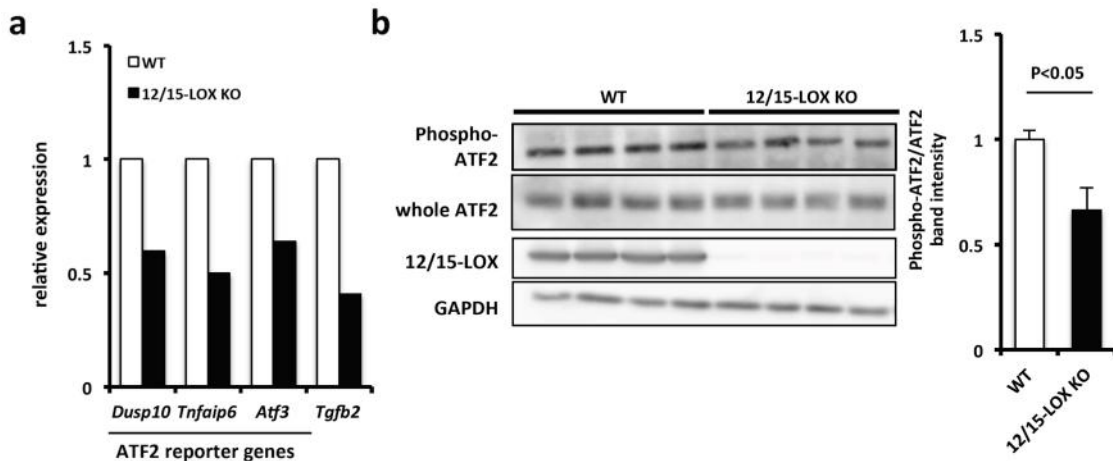


【図 1】 (a)マウス腹腔常在 MΦからの TGF β2 発現量は 12/15-LOX 発現量に比例する。(b)*tgfb2* mRNA 発現量も 12/15-LOX KO で減弱する。gata6: 腹腔常在 MΦのマスターレギュレーター、cd68:MΦマーカー

2. 12/15-LOX KO MΦでは *tgfb2* mRNA 発現に関与する転写因子 ATF2 の活性化が減弱している

次に、12/15-LOX 依存的な遺伝子発現を担う転写制御機構を明らかにする目的で、WT と 12/15-LOX KO マウス由来の腹腔常在 MΦにおける遺伝子発現を比較し IPA パスウェイ解析を行った。その結果、有意に活性が変動する候補分子の一つとして ATF2 (Activating Transcription Factor 2) が見出された (図 2a)。

ATF2 は、ストレス応答性の転写因子として、p38 などの MAP キナーゼ経路によるリン酸化を介した活性化が知られている。また、*tgfb2* のプロモーター領域に結合し、その転写レベルを制御することも報告されている (Nat Genet. 2007 Oct;39(10):1225-34.)。野生型と 12/15-LOX KO MΦにおいて ATF2 のリン酸化レベルを比較すると、KO における有意な減弱が観察され、12/15-LOX 依存的なリン酸化を介した ATF2 活性化のメカニズムが存在することが示唆された (図 2b)。



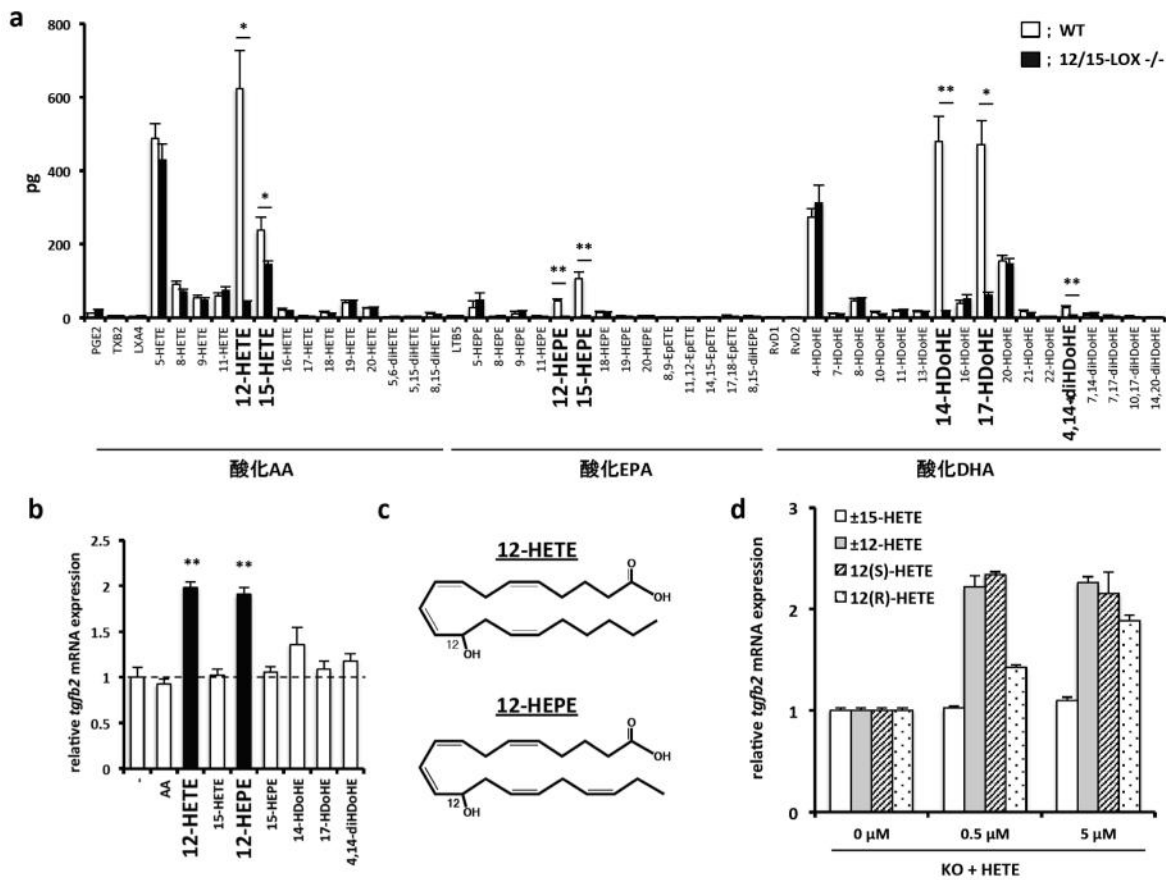
【図 2】

(a)WT、12/15-LOX KO MΦにおける RNA-seq 解析の結果。
 (b)WT、KO MΦにおけるウェスタンブロッティングのデータ。

3. MΦの *tgfb2* mRNA 発現上昇を促す 12/15-LOX 由来の活性代謝物の探索

以上の結果より、12/15-LOX が生成する何らかの脂肪酸代謝物の中に TGF β2 の発現制御に関わる活性代謝物が存在する可能性が考えられた。そこで、これら MΦ から 12/15-LOX 依存的に生成する脂肪酸代謝物について LC-MS/MS を用いた包括的メタボローム解析を行った。その結果、アラキドン酸、EPA, DHA から生成する計 7 種類の脂肪酸代謝物が候補に上がった (図 3a)。

そこで、12/15-LOX KO MΦ に対してこれら 7 種類の脂肪酸代謝物をそれぞれ添加し、*tgfb2* mRNA の発現に対する影響を調べた。その結果、12-HETE と 12-HEPE においてのみ *tgfb2* mRNA の発現上昇が見られた (図 3b, c)。この活性は、図 2a で示した ATF2 に支配される他の遺伝子群においても同様に認められた。さらに、12-HETE に関して 12 位の水酸基の立体異性体を用いた検討を行った結果、12(S)-HETE においてのみ強い活性が認められた (図 3d)。

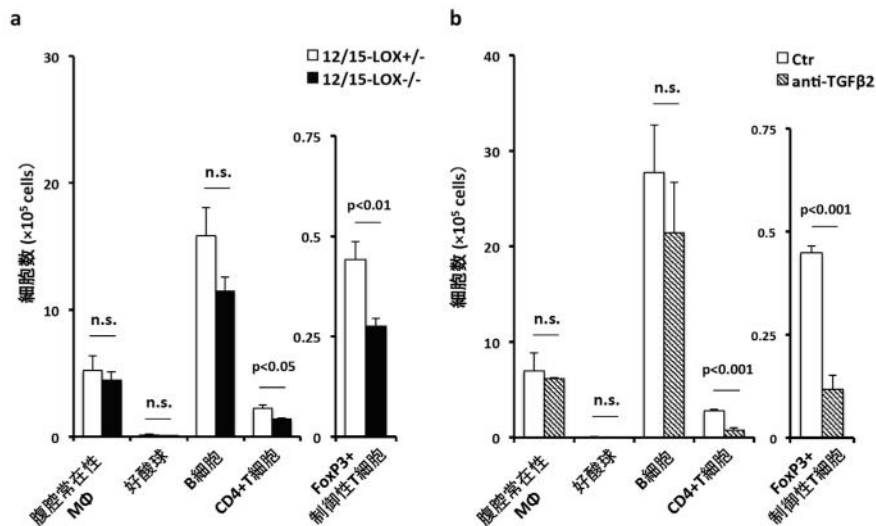


【図 3】(a)マウス腹腔常在 MΦ の培養上清に対する網羅的酸化脂肪酸の解析結果。(b)各脂肪酸を MΦ に対して 2 μM 添加し、*tgfb2* mRNA 発現の変化を調べた。12-HETE と 12-HEPE には強い *tgfb2* mRNA 発現上昇作用が見られる。(c)12-HETE と 12-HEPE の構造式。(d)12(S)-HETE は構造特異的に *tgfb2* mRNA 発現上昇作用を有する。* ; p<0.05, ** ; p<0.01

4. 12/15-LOX KO マウスでは、ザイモサン腹膜炎の収束後期の制御性 T 細胞の数が減少する

次に、細胞レベルの解析から明らかになった 12/15-LOX 依存的な MΦ の機能が炎症の収束に及ぼす影響について個体レベルでの解析を行った。12/15-LOX ヘテロ KO マウスとホモ KO マウスに対してザイモサン腹膜炎を惹起し、収束期 14 日目における腹腔内の脂肪酸代謝物の量と主要な細胞集団の数を測定した。まず、代謝物に関しては *in vitro* での活性が確認された 12-HETE、12-HEPE などの代謝物が KO マウスで有意に減少した。この時、フローサイトメーターを用いて細胞集団を観察すると、腹腔常在性 MΦ や B 細胞などの数に変化が見られない一方で、CD4⁺T 細胞および FoxP3⁺制御性 T 細胞の数が KO マウスで有意に減少することが分かった (図 4a)。

ザイモサン腹膜炎はいわゆる急性炎症モデルであるが、その収束期にはT細胞やB細胞等のリンパ球の増加と、それに伴う制御性T細胞の増加が観察される (Blood. 2014 Sep 11;124(11):1748-64.)。この制御性T細胞は、過剰な免疫応答や自己抗原に対する応答の抑制などに関わっており、炎症の適切な収束に寄与していると考えられている。一方、TGFβは制御性T細胞の分化を誘導するサイトカインとしてよく知られている。そこで、TGFβ2に対する中和抗体を投与した野生型マウスにおいて収束期の細胞集団を解析すると、12/15-LOX KO マウスと同様の変化が観察された (図 4b)。以上より、12/15-LOX 依存的なMΦの機能が炎症収束期のCD4+T細胞数およびFoxP3+制御性T細胞数に影響を及ぼすことが示唆された。



【図4】(a) 12/15-LOXヘテロ(+/+)マウスとKO(-/-)マウスのザイモサン腹膜炎14日目の腹腔内の細胞集団を、フローサイトメーターを用いて定量した。(b) 炎症収束期にTGFβ2の阻害抗体を投与した野生型マウスでは、12/15-LOX KOマウスと同様に、腹膜炎14日目のCD4陽性T細胞、FoxP3+制御性T細胞数の有意な減少が観察される。

【まとめと考察】

本研究で私は、12/15-LOX陽性MΦにおける*tgfb2*の発現が12/15-LOX依存的であることを見出し、その転写制御機構として、転写因子ATF2の関与を網羅的パスウェイ解析より明らかにした。また、*tgfb2*の発現を促進する12/15-LOX由来の活性代謝物として12(S)-HETEを見出した。さらにマウス個体レベルでの解析から、腹膜炎収束期におけるCD4+T細胞やFoxP3+制御性T細胞の増加が12/15-LOX KOマウスで有意に減弱すること、またこの変化がTGFβ2阻害時にも同様に観察される事を示した。このように、細胞質の脂肪酸代謝酵素が転写制御に関わるメカニズムは大変興味深く、MΦにおいて12/15-LOX由来の活性代謝物12(S)-HETEが構造特異的に相互作用する標的分子の存在が強く示唆された。