

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 29 年度 博士課程入学

氏名 衛藤 翔太郎

指導教員 西村 亮平

論文題目 Effects of damage associated molecular patterns (DAMPs) on immune cells and a search for a novel DAMP in dogs

(イヌにおけるダメージ関連分子パターン(DAMPs)が免疫細胞に与える影響と新規 DAMP の探索)

生体には免疫系が備わっており、異物や病原体、異常細胞などの「非自己」を認識・排除することで、恒常性を維持している。例えば、細菌やウイルスなどの病原体が体内に侵入すると、マクロファージなどの自然免疫系が活性化することで、病原体の排除や抗原提示を行い、さらに獲得免疫系の活性化を促す。この時、自然免疫系は自らが発現するパターン認識受容体 (Pattern-recognition receptors ; PRRs) によって細菌やウイルスに特異的な分子パターン (Pathogen associated molecular patterns ; PAMPs) を認識し、炎症反応を誘導する。一方、近年になって自然免疫系が非自己由来分子のみならず、自己の損傷組織や死滅細胞から放出される内因性分子も認識し、免疫応答が惹起されることが明らかになってきた。これらの自己由来分子はダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns; DAMPs) と総称され、近年注目を集めている。これまでに HMGB1、熱ショックタンパク (Heat Shock Proteins; HSPs)、核酸、ATP などの様々な分子が DAMPs として同定されており、外傷、虚血再灌流障害、がん、自己免疫疾患などにおける無菌性炎症の引き金になることがわかってきた。し

かしながら、最近の研究によってこれまで同定されていなかった DAMPs が新たに同定されているように、DAMPs の実体や炎症誘導メカニズムには不明な点が多く残されており、その全貌の解明には至っていない。一方、イヌにおいてもいくつかの疾患で主要な DAMPs の一つとされる HMGB1 の血中濃度の上昇が報告されており、DAMPs はイヌの疾患病態にも深く関与している可能性が高い。しかし、獣医学領域における DAMPs に関する研究は非常に限られており、イヌ細胞由来の DAMPs が実際にどのように免疫細胞に作用し、炎症反応を誘導するのか検討した報告はない。

このような背景から、本研究ではイヌ細胞由来 DAMPs が免疫細胞に与える影響を解析し、DAMPs による無菌性炎症誘導メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。まず様々なイヌ細胞株にネクロシスを誘導し、その細胞内成分(DAMPs)を含む上清がマクロファージ細胞株の遺伝子発現に与える影響を解析した(第一章)。第一章の結果から、これまで DAMPs との関連が報告されていなかった CCL24 (C-C Motif Chemokine Ligand 24)が DAMPs によって顕著に誘導されることを見出した。CCL24 は様々な炎症性疾患の増悪に関与していることが報告されていたが、がんにおける役割については不明であった。そこで第二章では CCL24 のがんにおける役割をマウスモデルおよび The Cancer Genome Atlas (TCGA)患者データベースの解析によって明らかにした。最後に、CCL24 を誘導する新規 DAMP の本態およびシグナル伝達経路の同定を試みた(第三章)。

第一章では、まず 12 種類のイヌ細胞株から凍結融解サイクルによってネクロシス細胞上清を作製し、マウスおよびイヌマクロファージ細胞株 (RAW264.7 および DH82) に添加することで、イヌ細胞由来の DAMPs の炎症誘導作用を調べた。その結果、大部分の死細胞由来上清は炎症性サイトカイン *Tnf* mRNA の発現を誘導せず、逆に強力な免疫抑制分子である Prostaglandin E2 (PGE2) を多量に含有していることが明らかとなった。そこで、PGE2 の産生を阻害するインドメタシンを前処置したイヌ細胞株からネクロシス細胞上清を作製し、マクロファージ細胞株に添加したところ、*Tnf* mRNA の発現が上昇することが示された。これらの結果から、死細胞由来の DAMPs が *Tnf* mRNA の誘導を惹起すること、同時に PGE2 も放出され、これが DAMPs の作用を抑制するという機構が存在することが示唆された。例えば急性炎症では PGE2 が DAMPs の

炎症誘導作用を抑制するブレーキのように働き、慢性炎症やがんでは DAMPs と PGE2 が協調的に疾患病態を増悪させる可能性があると考えられた。一方、インドメタシン処置および未処置のイヌ尿路上皮癌細胞株 Sora からそれぞれネクロシス細胞上清を作製し、これらの上清で刺激した RAW264.7 細胞の遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に解析したところ、DAMPs によって誘導される遺伝子には PGE2 によって抑制される遺伝子群と PGE2 によって抑制されない遺伝子群が存在することが明らかになった。これらの遺伝子には CCL2 や CXCL2 をはじめとした多くのケモカインが含まれていたことから、DAMPs がケモカインの誘導を介して二次的に免疫細胞および間葉系幹細胞を集積させ、局所の炎症や組織修復に関与している可能性が示された。さらに、DAMPs によって誘導されるケモカインのうち、これまで DAMPs との関連性が報告されていない CCL24 が、PGE2 を除去したネクロシス細胞上清によって強く誘導されることが明らかになった。以上のことから死滅したイヌ細胞からは DAMPs とその働きを抑制する PGE2 が同時に放出され、さらに PGE2 の除去によりその抑制作用を排除することで、DAMPs が CCL24 を誘導することを明らかにした。

第二章では、CCL24 のがんにおける役割について検討した。CCL24 は、Eotaxin2 としても知られており、好酸球を含む様々な免疫細胞の遊走に関するケモカインである。近年、CCL24 はアレルギー性疾患や関節リウマチ、脳脊髄炎、非アルコール性脂肪肝炎などの様々な炎症性疾患の病態に深く関与していることが報告されている一方で、腫瘍組織における役割、特に CCL24 が腫瘍免疫微小環境に与える影響については不明な点が多い。そこで、CCL24 を過剰発現させたマウス腫瘍細胞株を同系マウスに移植するシンジェニックマウスモデルを作製し、CCL24 の発現が腫瘍の成長や免疫微小環境に与える影響を解析した。その結果、CCL24 過剰発現腫瘍細胞株と野生型細胞株では形成される腫瘍の大きさに差はなかったものの、CCL24 過剰発現細胞株で腫瘍内への好酸球浸潤が野生型細胞株に比べて有意に増加していることが示された。さらに、ヒトの患者データベース TCGA を解析したところ、CCL24 や好酸球浸潤を示す 16 個の遺伝子群 (Eosinophil gene signature) の高発現は、大腸癌や悪性黒色腫の患者において良好な予後と相関していることを見出した。以上のことから、CCL24 は腫瘍組織内への好酸球の浸潤を誘導することで、腫瘍抑制因子として作用している可能性が示された。

第二章の結果および先行研究から、CCL24 は様々な炎症性疾患やがんの病態において重要な役割を果たしていることが示唆されたことから、CCL24 の発現を上流で制御する DAMP も、これらの疾患の病態に深く関与している可能性が高いと考えられた。そこで、第三章では CCL24 を誘導する新規 DAMPs を探索した。まず、CCL24 mRNA 発現誘導の指標として、ネクローシス細胞上清をゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。その結果、CCL24 を誘導する DAMP は 1~6kDa と比較的小さい分子であることが明らかになった。この分子量からは新規 DAMP がペプチドである可能性が高いため、ネクローシス細胞上清をペプチダーゼで処理したところ、CCL24 の誘導が消失した。この結果から、CCL24 発現を誘導する新規 DAMP はペプチドであることが強く示唆された。最後に、新規 DAMP が CCL24 を誘導するシグナル伝達経路を調べた。DAMPs の多くは、PRR に分類される Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) によって認識されることが報告されている。そこで、TLR3 を除くすべての TLR の下流のアダプター分子である MyD88 欠損マウス由来の腹膜マクロファージをネクローシス細胞上清で刺激したところ、CCL24 誘導は認められなかった。この結果は、CCL24 誘導は MyD88 依存性、すなわち TLRs 依存性であることを示している。TLRs の中でも特に TLR2/TLR4 は特に DAMPs の認識に重要であることが知られている。そこで、次に TLR2 または TLR4 欠損マクロファージにネクローシス細胞上清を添加したところ、TLR2 欠損マクロファージでのみ CCL24 誘導が認められなかった。これらの結果から、CCL24 は新規 DAMP によって TLR2-MyD88 依存的に誘導されていることが示された。

以上の結果から、いくつかの組織由来のイヌ細胞は細胞死に際して DAMPs と PGE2 の両方を放出していることが明らかとなり、PGE2 を除去することでこれまで報告されていない DAMPs による CCL24 の発現誘導を見出した。この CCL24 は様々な炎症性疾患を増悪させることが知られていたが、がんにおいては腫瘍内への好酸球浸潤を促すことで腫瘍抑制的に働いている可能性が示された。さらに CCL24 を誘導する新規 DAMP は、TLR2-MyD88 によって認識されるペプチドであることが強く示唆された。今後この死細胞由来ペプチドの同定および病態における役割、および PGE2 との相互作用を明らかにすることで、DAMPs による無菌性炎症誘導メカニズムのさらなる理解につながることを期待される。