

審査の結果の要旨

氏名 衛藤 翔太郎

申請者は、がんと炎症や免疫応答との相互作用に着目し研究を重ねてきた中で、CCL24(C-C Motif Chemokine Ligand 24)を誘導する新規ダメージ関連分子パターン(Damage-associated molecular patterns; DAMPs)を発見した成果をまとめ、学位論文として申請している。DAMPsとは自己の損傷組織や死滅細胞から放出される自己由来内因性分子の総称であり、免疫応答を惹起することでがんや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近年明らかとなっている。ヒトではHMGB1、HSPsなどがDAMPsとして同定されている一方、DAMPsの実体や炎症誘導メカニズムには未だ不明な点が多い。イヌにおいてもDAMPsの存在や病態への関与が示唆されるものの、イヌ細胞由来DAMPsによる免疫細胞や炎症反応への関与を検討した報告はない。

そこで、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べく、第一章では、イヌ悪性腫瘍細胞由来の細胞内成分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ている。13種類の細胞株からネクロシス細胞上清を複製しマクロファージ細胞株に添加することで、そのほとんどで炎症性サイトカインTnfの発現誘導は見られず、逆に強力な免疫抑制分子であるPGE2を多量に含有していることが明らかとなった。またインドメタシンによりPGE2産生を阻害したところTnf発現が上昇したことから、何らかのDAMPsが存在し、同時に放出されるPGE2がその作用に影響を与えていることが示唆された。インドメタシン処置および未処置のネクロシス細胞上清で刺激したマクロファージ細胞株をRNA-seqにより網羅的遺伝子発現解析したところ、PGE2により発現抑制される遺伝子群に多くのケモカインが含まれ、その中からこれまでDAMPsとの関連性が報告されていないCCL24を見出した。

CCL24は様々な炎症性疾患への関与が報告されているが、がんにおける役割は不明であったため、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検討している。CCL24を過剰発現させたマウス腫瘍細胞株を用いたシンジェニッ

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ところ、CCL24 過剰発現細胞株移植マウスでは腫瘍内への好酸球浸潤が有意に増加していた。ヒトの患者データベース TCGA において *in silico* 解析したところ、CCL24 や好酸球浸潤を示す 16 個の遺伝子群の高発現は、大腸癌や悪性黒色腫の患者においては良好な予後と相関していた。マウスモデルと患者データベースによる解析結果は必ずしも一致しない部分が見られたが、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。

第三章では CCL24 を誘導する新規 DAMPs およびそのシグナル伝達経路の同定を試みている。ネクローシス細胞上清をゲルろ過クロマトグラフィーで精製し CCL24 を誘導する分画を検索し、新規 DAMP が 1~6kDa と比較的小さい分子であることを明らかにした。さらにペプチダーゼ処理により CCL24 の誘導が消失したことから、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。次にそのシグナル伝達経路を、DAMPs を認識する Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) の下流のアダプター分子である MyD88 欠損マウス、および TLR2、TLR4 欠損マクロファージを用いて検討した結果から、CCL24 は新規 DAMPs によって TLR2-MyD88 依存的に誘導されていることを明らかにした。

本論文において、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を明らかにし、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 はがんにおいて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。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は、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。

審査会においては、これら研究の科学的意義、実験デザインの妥当性、解析方法、研究結果のなどについて専門的な質疑が行われたが、申請者は研究全体の背景から実験手技、科学的解釈に至るまで、詳細かつ明解な説明を行い、博士学位取得に足る科学的論理性や技術的背景を有していると考えられた。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。