

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS における急性炎症制御因子としての KLHDC10 の新規機能

### 氏名

山口奈美子

### 【序論】

Kelch domain containing 10 (KLHDC10) は、当研究室におけるショウジョウバエの遺伝子発現系を用いたスクリーニングにより、ストレス応答性 MAP3K の 1 つである Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) の新規活性化因子として同定された。これまでに、KLHDC10 が ASK1 の不活性化因子である Protein phosphatase 5 (PP5) のホスファターゼ活性を抑制することで、酸化ストレス依存的な ASK1 の持続的活性化および細胞死を亢進することが明らかにされた。また、KLHDC10 は、複合体型ユビキチン E3 リガーゼである CRL2 (Cullin-2 RING E3 ligase) 複合体の基質認識受容体として機能することが示唆されているが、前述の ASK1 活性化機能は CRL2 複合体非依存的であることも当研究室において明らかにされている。

一方で、KLHDC10 の *in vivo* における機能については未解明であった。そこで私は、当研究室において作出された KLHDC10 欠損マウスを用いて、本分子の *in vivo* での生理学的もしくは病態生理学的機能の解明を試みた。本マウスは、通常飼育条件下では野生型マウスと顕著に異なる表現型を示さないため、その発症機構に酸化ストレスの関与が報告されている病態モデルを中心に、表現型の検討を行った。その結果、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS (Systemic inflammatory response syndrome) モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウスが野生型マウスと比べ耐性を示したことから、本モデルにおける KLHDC10 の生理機能解析を進めた。

現在までの報告より、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS の発症過程には、①TNF $\alpha$ による RIP1/3 kinases 依存的

な Necroptosis、②Necroptosis 細胞から放出された内因性炎症惹起物質 DAMPs (Damage-associated molecular patterns) を受容した炎症細胞による、IL-1 $\beta$ や IL-6 等の炎症性サイトカインの過剰産生、という 2 つの段階が関与することが知られている。本研究において私は、KLHDC10 の炎症細胞における機能欠損が、SIRS モデルにおける耐性の表現型に寄与している可能性を新たに見出した。

## 【方法と結果】

### 1. KLHDC10 欠損マウスは TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて耐性を示す

SIRS は、細菌感染や外傷等の侵襲によって引き起こされる全身性の急性炎症であり、マウスに TNF $\alpha$  を大量に投与することで実験的に病態を模倣できることが知られる。本モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウスは、野生型マウスに比べ有意な生存率の延長と体温低下の抑制という表現型を示した。また、KLHDC10 欠損マウスが ASK1 欠損マウスと比べても有意な耐性を示したことから、本モデルにおいては KLHDC10 が ASK1 以外のターゲット分子を制御している可能性が示唆された。

### 2. KLHDC10 欠損マウスにおいて、Necroptosis の低下は全身性には見られない

前述した知見に基づき、各段階における KLHDC10 の関与について検討を進めた。まず、「① TNF $\alpha$ による RIP1/3 kinases 依存的な Necroptosis」の差異について検討した。TNF $\alpha$ 投与後の血清において、組織傷害マーカーである LDH 放出量、および DAMPs の 1 種である mtDNA (mitochondria DNA) 量をそれぞれ比較したところ、いずれのマーカーについても野生型マウスと KLHDC10 欠損マウス間で顕著な差は見られなかった。したがって、TNF $\alpha$ 誘導性の Necroptosis の段階において KLHDC10 が全身性に関与する可能性は低いことが示唆された。

### 3. KLHDC10 欠損マウスの血清および脾臓において、IL-6 の産生量が低下している

次に、「② 炎症性サイトカインの過剰産生」の差異について検討した。TNF $\alpha$ 投与後の血清中で、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ および IL-6 の放出量を比較したところ、IL-6 量についてのみ、KLHDC10 欠損マウスにおける有意な低下が見られた。さらに、臓器レベルで IL-6 mRNA 誘導量を比較した

ところ、脾臓において KLHDC10 欠損による有意な低下が見られた。

生体内において炎症性サイトカインが過剰に放出された場合には、その恒常性維持のために、二次的に抑制性サイトカインの放出量が上昇し、フィードバック制御により炎症性サイトカインの産生量が低下する現象が知られている。そこで、上述の表現型が抑制性サイトカインの産生量上昇によるものである可能性を検証した。その結果、少なくとも代表的な抑制性サイトカインである IL-4、IL-10、TGF- $\beta$ の産生量について、KLHDC10 欠損マウスにおける亢進は認められなかった。

#### 4. 炎症細胞における KLHDC10 発現抑制により、DAMPs 応答性 IL-6 誘導量は低下しない

KLHDC10 の欠損によって IL-6 の誘導量低下が見られた脾臓がマクロファージなどの免疫細胞に富んだ臓器であることから、KLHDC10 欠損により、それら 1 細胞あたりの DAMPs 応答性 IL-6 mRNA 誘導量が低下している可能性について検証した。DAMPs 模倣刺激として TNF $\alpha$ により Necroptosis を誘導した L929 細胞の培養上清、および TNF $\alpha$ を投与した野生型マウスより採取した血清、の 2 種類を用意し、それぞれをマクロファージ様細胞株である RAW 264.7 細胞に添加したさいの IL-6 mRNA 誘導量を定量する系を確立し、検討を行った。その結果、いずれの DAMPs 模倣刺激についても、RAW 264.7 細胞における IL-6 mRNA 誘導量は KLHDC10 発現抑制によって低下せず、むしろ亢進する傾向を示した。以上より、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウス脾臓中のマクロファージ 1 細胞あたりの DAMPs 応答性 IL-6 産生は低下していないことが予想された。

#### 5. 炎症細胞における KLHDC10 発現抑制により、Necroptosis 誘導が亢進する

上述 4. の結果を受け、次に KLHDC10 欠損マウス脾臓において IL-6 の誘導量低下が見られる原因として、DAMPs 応答細胞の“数”が減少している可能性を検証した。TNF 受容体下流での Necroptosis を誘導するさいに、TNF $\alpha$ と併用される Smac-mimetic (IAP 阻害剤) /Z-VAD-fmk (pan-caspase 阻害剤) 刺激を RAW 264.7 細胞に処置し、細胞死を定量することで検討を行った。その結果、KLHDC10 発現抑制下では細胞死が有意に亢進することが明らかとなった。

続いて、上述の細胞死に至るまでの過程において、KLHDC10 が関与する分子およびシグナルについて検討した。TNF 受容体下流においては、RIP1/3 kinases が活性化し、その後の JNK 持続的活性化を介して Necroptosis が誘導されることが知られる。KLHDC10 の発現抑制下で亢進した RAW 264.7 細胞の細胞死が、RIP1 kinase 阻害剤である Necrostatin-1 処置によって抑制されたことから、KLHDC10 の発現抑制により上述のシグナル伝達が亢進している可能性を検証した。その結果、KLHDC10 発現抑制下では JNK の活性化が亢進していることが明らかとなった。

興味深いことに、同様の刺激を繊維芽細胞株である不死化 MFF 細胞および L929 細胞に処置したさいには、細胞死の亢進は見られなかった。この結果は、上述 2. の項で示した、野生型マウスと KLHDC10 欠損マウス間で Necroptosis の顕著な差が全身性には認められなかったことと矛盾しないと考えられる。以上の結果から、KLHDC10 発現抑制下における JNK 活性化の亢進を介した RIP1/3 kinases 依存的な Necroptosis の亢進は、マクロファージ様細胞で限定的に見られる現象であることが示唆された。

#### 【まとめ・考察】

本研究において私は、KLHDC10 欠損マウスが TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて耐性の表現型を示すことを新規に見出した。また、KLHDC10 の欠損により、炎症細胞限定的に RIP1/3 kinases 依存性の Necroptosis が亢進することを明らかにした。以上より、現在、「IL-6 を産生する炎症細胞の、細胞死による“数”の減少が、KLHDC10 欠損マウスにおける SIRS 耐性の表現型に寄与する」との仮説を立て、検証を進めている。

さらに、本研究で私は、RAW 264.7 細胞における KLHDC10 発現抑制が、TNF 受容体下流における JNK 持続的活性化を亢進させることを明らかにした。RAW 264.7 細胞における TNF 受容体下流の Necroptosis には、ROS 産生分子である NADPH oxidase Nox2 (gp91 phox) の細胞種限定的な関与が示唆されていることから、今後は Nox2 による ROS 産生への影響を含め、KLHDC10 が関与する詳細な分子およびシグナルを同定したい。さらに、それらを分子標的とすることで、世界初の SIRS 治療薬開発をも目指していきたい。