

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 山口 奈美子

KLHDC10 (Kelch domain containing 10) 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 ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) の新規活性化因子として同定された。これまでに、KLHDC10 が ASK1 の脱リン酸化を介した不活性化因子である PP5 (Protein phosphatase 5) に結合し、そ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。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。そこで本研究では、KLHDC10 欠損マウスを用いて、本分子の *in vivo* での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。そのため、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 α 誘導性全身性炎症反応症候群モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウスが耐性を示すことを見出した。

全身性炎症反応症候群 (SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome) は、ヒトで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、急性呼吸窮迫症候群や播種性血管内凝固症候群、多臓器不全に発展して死に至る症例の多い重篤な病態である。罹患後の致死率は、重篤度により 20-60%にも上る。また、罹患者数が非常に多く、SIRS のいち病態である敗血症に限定しても、米国内で年間 90 万人が罹患し、全世界では常時 200-300 万人の罹患者がいるとされる。現在までに、病態分子機構に基づく治療法は確立されておらず、臨床的には SIRS からいかに早く回復するかが大きな課題となっている。

現在までの報告より、TNF α 誘導性 SIRS には、

- ①TNF α 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 β 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る。このような知見に基づき、KLHDC10 が本病態に関与する段階および分子メカニズムを明らかにすることを目的として本研究を遂行し、以下の内容を明らかにした。

○KLHDC10 欠損マウスは、TNF α 誘導性 SIRS モデルにおいて

1. 生存期間および体温低下の表現型で耐性を示す
2. **Necroptosis** の低下は全身性には見られない
3. **IL-6** の放出量（血清）、**mRNA** 誘導量（脾臓）が低下している

上記より、炎症性サイトカイン **IL-6** 量の低下が本モデルにおける耐性のひとつの要因と考えられた。脾臓がマクロファージなどの炎症細胞に富んだ臓器であることから、炎症細胞における **KLHDC10** の機能に着目して解析を進め、さらに以下の知見を得た。

- **KLHDC10** 発現抑制により、**DAMPs** 刺激下で
 4. 炎症細胞 1 細胞あたりの **IL-6 mRNA** 誘導量は低下しない
- **KLHDC10** 発現抑制により、**Smac-mimetic** (IAP 阻害剤) + **Z-VAD-fmk** (pan-caspase 阻害剤) の **Necroptosis** 誘導刺激下で
 5. 炎症細胞限定的に **RIP1/3 kinases** 依存性 **Necroptosis** が亢進する
 6. 上記と相関して、**JNK** 持続的活性化が亢進する
 7. 上記 **Necroptosis** 誘導に、**Superoxide** 産生分子の **Nox2** が部分的に関与することが示唆される

以上のように本研究では、**KLHDC10** が炎症細胞限定的に **RIP1/3** 依存性 **Necroptosis** 誘導に関与することを見出した。**Necroptosis** 誘導に至る分子シグナルの研究は、比較的歴史が浅く、現在でも未解明の点が多く残されている。したがって、本研究結果は、**RIP1/3** 依存性 **Necroptosis** に関与する新規分子として **KLHDC10** を見出した点において、細胞死研究にとって大きなブレイクスルーとなることが期待される。

さらに、臨床応用の観点からも非常に興味深い。上述のとおり、**TNF α** 誘導性 **SIRS** は、多段階の事象が時間推移的および同時並行的に進行する非常に複雑な病態である。その複雑さが故に治療薬開発の取り組みは困難を極め、現在に至るまで病態分子機構に基づく治療法は確立されていない。したがって、本病態において **KLHDC10** が関与する分子メカニズムを明らかにすることは、将来的には世界初の **SIRS** 治療薬開発の基盤となりうる点で大きな意義を持つ。

また、*in vitro* の実験系で **KLHDC10** が関与することを明らかにした **Necroptosis** シグナルは、**TNF α** 誘導性 **SIRS** のみならず、膵炎やチフス菌感染症など様々な病態に関与することが知られている。したがって、**RIP1/3** 依存性 **Necroptosis** 誘導シグナルにおいて、**KLHDC10** が関与する分子メカニズムの詳細を明らかにすることは、これら病態の発症分子機構の解明、さらには新規治療薬標的の創出につながることを期待される。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。