

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 26 年度 博士課程入学
氏名 溝渕 悠代
指導教員名 後藤 康之

論文題目

Exacerbation of hepatic injury during rodent malaria by myeloid-related protein 14
(myeloid-related protein 14 によるローデントマラリア肝障害の悪化)

【背景と目的】

マラリアは *Plasmodium* 属原虫の感染により発症する原虫感染症であり、赤内期に認められる重篤な症状の一つとして肝障害が挙げられる。マクロファージの集簇はマラリアの肝臓における典型的な病理像であることから、マラリアにおける肝障害にマクロファージが関与すると考えられてきた。しかしながら、マラリア肝障害の病態機序は未だ明らかになっていない。一方、myeloid-related protein 14 (MRP14) および MRP8 は炎症性マクロファージの細胞質に発現する蛋白質であり、細胞活性化により分泌される。現在、関節リウマチや動脈硬化症などの様々な炎症性疾患において、病態悪化に伴う MRP14 陽性マクロファージの炎症部位への集簇が報告されているが、マラリアにおける MRP14 陽性マクロファージの動態については、ほとんど明らかになっていなかった。筆者は卒業論文において、*P. berghei* 感染 BALB/c マウスの肝臓における MRP14 陽性及び MRP8 陽性マクロファージの増加を明らかにした。また、感染マウスにおいて血中 MRP14 濃度が上昇することも示した。以上の結果から MRP14 陽性マクロファージより分泌された MRP14 がマラリアの肝障害に関与していると考えられた。本研究では、*P. berghei* の赤内期感染によって引き起こされるマラリア肝障害への MRP14 の関与を明らかにすることを目的とした。

【第 1 章】

第 1 章では、細胞外 MRP14 が肝障害へもたらす影響を解析した。*P. berghei* 感染マウスにおいて、肝障害の指標である血清中 AST・ALT の上昇及びマクロファージの浸潤を伴う巣状壊死が認められたことから、肝障害が示された。さらに免疫組織学的解析では、感染マウスの肝臓類洞において MRP14 陽性マクロファージの顕著な集簇が認められた。T 細胞を欠

損するヌードマウスにおいてはこのような肝障害が生じず、血中 MRP14 の上昇も認められなかった。一方、MRP14 陽性マクロファージの集簇はヌードマウスでも認められたことから、MRP14 陽性マクロファージは T 細胞に依存しない機構で集簇するが、MRP14 の分泌は T 細胞依存性に誘導されることが明らかになった。また、*in vitro* 解析では、MRP14 が toll-like receptor (TLR) 2 及び TLR4 の新規内因性アゴニストであり、damage-associated molecular patterns (DAMPs) の一つとして機能することが明らかになった。

次に、*P. berghei* 感染後のマウスに 7 日間 MRP14 を静脈内投与し、肝障害への影響を PBS 投与のコントロール群と比較した。末梢血中感染赤血球率およびヘマトクリット値に関して、MRP14 投与による影響は見られなかった。一方、MRP14 投与群では血清中 AST・ALT 濃度のさらなる上昇及び巣状壊死レベルの悪化が認められた。また、MRP14 投与による MRP14 陽性および MRP8 陽性マクロファージ集簇の増強も確認された。さらに、MRP14 投与は非感染マウスにおいても同様に MRP 陽性マクロファージの集簇を誘導し、IL-1 β ・IL-12・TNF- α ・iNOS といった炎症性因子、および CCL2・CCR2 といった走化性因子の発現を誘導した。以上の結果から、*P. berghei* 感染において分泌される MRP14 は肝臓における MRP 陽性マクロファージ集簇及び炎症性サイトカイン・NO 産生を促進し肝障害を悪化させることが明らかになった。

【第 2 章】

C57BL/6 マウスにおける様々な炎症性疾患モデルの先行研究において、MRP14-KO マウスでは炎症反応が抑制され病態改善が認められることが報告されている。従って、第 1 章の結果から BALB/c マウスでも MRP14 を欠損させることで炎症反応が減弱し肝障害が改善されると仮説をたて、第 2 章では、MRP14-knockout (KO) BALB/c マウスを作製し、*P. berghei* 感染 MRP14-KO BALB/c マウスにおける肝障害を解析した。しかしながら仮説に反して、MRP14-KO マウスの血清中 AST・ALT 上昇及び巣状壊死レベルに wild-type (WT) マウスとの差は認められず、MRP14-KO マウスでも WT マウスと同様な肝障害が生じていた。また、肝臓における MRP8 陽性マクロファージ集簇数にも MRP14-KO マウスと WT マウスの間に有意差は認められなかった。肝臓におけるサイトカイン等の炎症性因子及び走化性因子の発現においても、MRP14-KO マウスと WT マウスの間にほとんど差は認められなかった。以上の結果から、MRP14-KO マウスにおいても *P. berghei* 感染における肝障害は引き起こされることが明らかになった。

【第 3 章】

第 1 章では細胞外 MRP14 による肝障害の悪化が見られた一方、第 2 章においては MRP14-KO BALB/c マウスも WT マウスと同等の肝障害を呈した。これらの結果は、C57BL/6 マウスを用いた先行研究により確立されてきた、「MRP14-KO マウスでは extracellular MRP14 及び MRP8 が抑制されるために炎症反応が抑制される」という仮説自体がそもそも BALB/c マ

ウスに適用できないことを示唆していた。以上のことから、同じ MRP14-KO マウスでも BALB/c マウスと報告のある C57BL/6 マウスの2系統間に免疫学的性状の違いがあることが予想された。そこで第3章では、作製した MRP14-KO BALB/c マウスの免疫学的性状を解析するために、ナイーブマウスにおける免疫細胞の動態を解析するとともに、LPS 誘導性ショックモデルを用いて、報告されている MRP14-KO C57BL/6 マウスの結果との比較を行った。MRP14-KO C57BL/6 マウスでは骨髄細胞における LPS 刺激時の TNF- α 分泌が抑制されており、また LPS 誘導性ショックに抵抗性を示すという報告があったことから (Vogl *et al.*, 2007, *Nat. Med.*,13(9):1042)、MRP14-KO BALB/c マウスでも同様であるか検証した。その結果、今回作製した MRP14-KO BALB/c マウスと WT マウスの間に LPS 誘導性ショックによる生存率の差は認められず、LPS 刺激時の MRP14-KO 骨髄細胞からの TNF- α 産生量はむしろ WT より有意に高い値を示した。一方で、LPS 刺激後の肝臓における MRP8 陽性細胞集簇数は MRP14-KO BALB/c マウスで有意に少なく、数時間という急性炎症における MRP8 陽性細胞の集簇に MRP14 が関与することが示唆された。以上の結果から、C57BL/6 マウスと異なり、BALB/c マウスにおける細胞内 MRP14 欠損は骨髄細胞の応答性に影響を与え、TLR4 シグナルを増強することが明らかになった。

【結論】

本研究により、ローデントマラリアにおいて、細胞外 MRP14 は炎症性サイトカイン産生及び MRP14 陽性マクロファージ集簇を促進することで炎症反応カスケードを増幅し、肝障害を悪化させる重要な因子であることが明らかになった。一方で、MRP14-KO BALB/c マウスでも肝障害が認められたが、この背景には、先行研究の MRP14-KO C57BL/6 マウスと本研究で作製した MRP14-KO BALB/c マウスの免疫学的性状が大きく異なり、細胞内 MRP14 の欠損によって骨髄細胞がより炎症反応に応答性を増したことが考えられる。実際、MRP14-KO BALB/c マウスでは骨髄細胞の TLR4 シグナルの過反応性が認められ、これが LPS 刺激時に MRP14-KO BALB/c マウスでも WT と同程度の炎症性サイトカイン発現が維持されていた一因と考えられた。以上のことから、BALB/c マウスにおいて MRP14 の欠損は単純に細胞外 MRP14 の炎症促進作用という機能欠損だけではなく、細胞内 MRP14 欠損による TLR4 シグナルの過反応をもたらすことが明らかとなった。本研究は今まで注目されていなかった細胞内 MRP14 の機能という新たな視座を据えたという点でも有意義な研究であり、多面的な MRP14 の機能を解明する嚆矢となると期待される。本研究を通して明らかとなった MRP14 の免疫病理学的な機能をさらに詳細に解析することは、MRP14 コントロールによるマラリア肝障害の治療につながると考えられる。