

〔別紙2〕

## 審査の結果の要旨

氏名 岡田 匡央

マクロファージにおいてリソソームの破裂は、NLRP3 Inflammasome の活性化を引き起こし、生体に炎症応答を誘導する。特にマクロファージにおいては貪食依存的にリソソームの破裂が引き起こされることが知られている。例えば、侵入した細菌の産生する毒素がリソソーム膜に穴を開ける場合や、アスベストやシリカのような外因性の結晶、また尿酸ナトリウム結晶やコレステロール結晶のような内因性の結晶が、貪食された後に、物理的にリソソーム膜に穴を開ける場合である。NLRP3 Inflammasome の活性化は、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ を成熟させ、マクロファージから放出させる。IL-1 $\beta$ はケモカインや接着因子の発現を誘導し、好中球の遊走を引き起こすことから、NLRP3 Inflammasome の活性化は炎症の幅広い段階を制御している。実際、リソソームの破裂に伴う NLRP3 Inflammasome の活性化は、感染症、塵肺症、痛風といった幅広い炎症性疾患との関連が指摘されている。このように疾患における意義や免疫学的な意義は高い一方で、いかにしてリソソームの破裂が NLRP3 Inflammasome の活性化を引き起こしているのかという分子機構に関する知見は少なく、未だ未解明な点が数多く残されていた。

申請者は、細胞内シグナル伝達経路の中でストレス応答性 MAPK 経路に着目し、この分子機構の解明を試みた。申請者は、種々の阻害剤を用いた実験、及び siRNA 導入によるノックダウンスクリーニングから、リソソームの破裂に応答するストレス応答性 MAPK 経路として TAK1-JNK 経路を同定し、NLRP3 Inflammasome の活性化の制御因子であることを見出した。またこの活性化は Ca<sup>2+</sup>の流入により保持されており、TAK1-JNK 経路の上流として CaMKII が関与していることを示唆した。更に NLRP3 Inflammasome の活性化に強く関連の示唆されているミトコンドリアの傷害を介して、JNK が NLRP3 Inflammasome の活性化に関与している可能性を提示した。

本博士論文において申請者が明らかにした新しい知見は以下の通りである。

リソソーム破裂によってストレス応答性 MAPK 経路である p38 MAPK、JNK が活性化する。活性化した JNK は、NLRP3 Inflammasome の活性化を制御する。JNK の上流として TAK1 がリソソーム破裂によって活性化し、TAK1 もまたリソソーム破裂による NLRP3 Inflammasome の活性化を制御する。JNK と Inflammasome の関連については、先行研究により、アダプタータンパク質 ASC のリン酸化レベルを制御することで、ASC の多量体化、ならびに Inflammasome の活性化を促進していることが明らかとなっていた。これとは独立して申請者もまた、TAK1-JNK 経路が、アダプタータンパク質 ASC の多量体化を制御す

ることを見出した。更に先行研究と異なる制御機構として、TAK1-JNK 経路が、細胞質 ROS の産生量を制御している可能性を見出した。ROS は NLRP3 Inflammasome の活性化因子の一つとして知られており、リソソーム破裂により検出された細胞質 ROS は、ファゴリソソーム由来のものだけではなく、ミトコンドリアの機能障害によるミトコンドリア由来の ROS が放出されたものも含まれているのではないかと推定している。実際、申請者もまた、ミトコンドリアを保護するような試薬の処置により、リソソーム破裂による NLRP3 Inflammasome の活性化を抑制することを確認しており、ミトコンドリア傷害に焦点をあてた更なる解析を行った。JNK は、Bax などの Bcl-2 family protein のリン酸化を制御し、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導を制御している。このことから、JNK によるミトコンドリア傷害機構の一つとして Bax のミトコンドリア移行に着目し、NLRP3 Inflammasome の活性化との関連を検証した。その結果、Bax のミトコンドリアへの移行は NLRP3 Inflammasome の活性化に関与し、また JNK がリソソーム破裂依存的な Bax のミトコンドリア移行を部分的に制御していることを明らかとした。更に、近年、NLRP3 Inflammasome の活性化との関連の指摘されている  $Ca^{2+}$  の流入に着目してリソソーム破裂における  $Ca^{2+}$  の関係性を解析した結果、 $Ca^{2+}$  の流入が TAK1-JNK 経路の活性化に必要であり、 $Ca^{2+}$  によって活性化することの知られる CaMKII がリソソーム破裂依存的な TAK1-JNK 経路の活性化、ならびに NLRP3 Inflammasome の活性化を、特異的に制御することを示した。

以上の知見は、リソソームの破裂による NLRP3 Inflammasome の活性化機構に関与する分子機構の一つに、 $Ca^{2+}$  の流入を引き金として活性化する CaMKII に端を発した、ストレス応答性リン酸化酵素による一連のシグナル伝達経路 CaMKII-TAK1-JNK 経路が関与することを提唱しており、同時にまたストレス応答性 MAPK 経路の新たな生理応答の一端を明らかにしていると言える。更に JNK による NLRP3 Inflammasome の活性化制御機構として、先行研究にある既存の機構に付け加え、ミトコンドリア傷害を介してもまた、NLRP3 Inflammasome の活性化に寄与しているという新たな可能性を見出した。また、本論文で明らかとなった分子機構は、NLRP3 Inflammasome の活性化を原因とした多くの炎症性疾患の治療標的としても応用されることが期待される。新規性や独創性といった科学の進歩という点においても、また創薬への応用という点においても、本論文はその責務を果たしていると言える。

以上のことから、本研究は博士（薬学）の学位を与えるに値するものであると判断した。