

令和 2 年 12 月 09 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860571

氏 名 永田 雅大

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：University of Cologne（国名：ドイツ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
プログラム細胞死に伴う免疫活性化分子の探索と炎症病態への関与の解明
3. 派遣期間：平成 30 年 9 月 29 日 ～ 令和 2 年 9 月 28 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：University of Cologne
部局名：
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究プロジェクトは、プログラム細胞死（アポトーシス、ネクロプトーシス、パイロプトーシス等）が引き起こす炎症反応の惹起機構解明から、自己炎症性疾患等の新たな治療法の開発につなげる事を目的とした。各プログラム細胞死は、発生や癌細胞排除といった生体恒常性維持にも寄与していることから、細胞死自体の抑制は副作用症状を呈することが推測される。本研究により、新たな免疫活性化分子やその放出を担う分子による炎症惹起への寄与が明らかとなれば、その機構のみの阻害により特定の炎症応答を阻害できる可能性が高く、副作用の少ない治療法の開発が期待される。

研究目的

プログラム細胞死特異的 Lipid DAMPs の探索

死細胞より放出、露出される様々なタンパク質成分や核酸成分が、過剰な細胞死に伴う炎症反応惹起に寄与することが分かってきており、これら内因性の免疫活性化成分は、Damage associated-molecular patterns (DAMPs) と呼ばれる。近年、アポトーシスに加え、様々な形態のプログラム細胞死がその制御分子の発見から明らかとなってきた。特に、ネクロプトーシス、パイロプトーシスは多くの DAMPs の放出を伴い、強く自然免疫細胞を活性化することが分かってきており、様々な疾患との関わりが注目されている。しかし、それら DAMPs の放出制御機構、そして、各 DAMPs のそれぞれのプログラム細胞死における機能については、*in vivo* を用いた機能解析が不足しており、詳細は分かっていない。

DAMPs は、その機能的特性を考慮すると、細胞にとって必須な成分であり、通常は細胞内に局在しており免疫細胞に認識されないが、細胞死によって初めて外界に放出・露出される成分であると考えられる。脂質成分は、細胞膜を構成するだけでなくシグナル伝達にも関わり細胞の機能維持に必須ではあるが、これらの DAMPs としての機能解析は少なく、不明な部分が多く残されている。私はこのような現状に対し、脂質成分に着目し、炎症性脂質成分の探索とその機能解析を行った。

以下に現在までの結果を記す。

- ① 生細胞由来脂質成分からは、強力な免疫活性化作用を示す成分は検出されなかった。

まず、骨髓由来マクロファージを誘導し、この細胞から脂質成分を抽出し、Thin-layer chromatography (TLC) によって各脂質成分を分離した。Raw-Dual Cells (InvivoGen) を用いて各脂質成分の NF- κ B 活性化能を測定したところ、いくつかのフラクションにおいて活性が見られたが、これらの活性は LPS に比べて 10 倍程度低いものであった (図 1)。この結果より、通常状態においては、活性化作用の強い lipid 成分は含まれていないことが示唆された。これまでに報告されてきている内因性の免疫活性化脂質成分は、細胞内において、局所に蓄積させた状況や、何かしらの修飾を受けることで強い活性化作用を示している可能性が考えられる。

- ② ネクロプトーシス細胞において蓄積する脂質ファミリーを同定した。

次に、プログラム細胞死の一つであるネクロプトーシス細胞において、含有量が上昇する脂質群の探索を行った。ネクロプトーシスは、アポトーシスの誘導に必要なカスパーゼの阻害によって引き起こされる。私は、ネクロプトーシスの誘導のため、LPS 刺激に加えてカスパーゼ阻害剤である Emricasan を使用した。まず、細胞膜成分であるリン脂質について Lipidomics 解析を行ったところ、ネクロプトーシス細胞において大きく組成が変わるものは検出されなかった (図 2A)。そこで、他の脂質ファミリーにおいても同様に Lipidomics 解析を用いて測定したところ、ある脂質ファミリーにおいて上昇を認めるものを発見した (図 2B)。

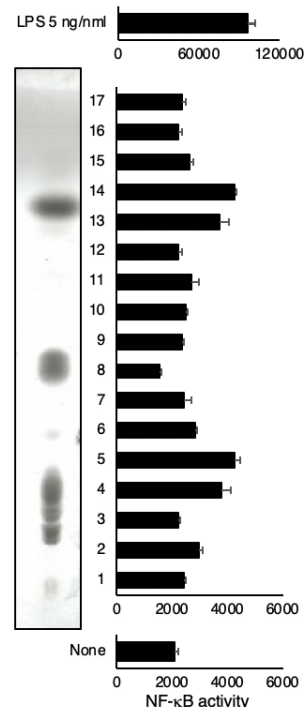


図 1. 生細胞由来脂質成分の NF- κ B 活性化能の測定

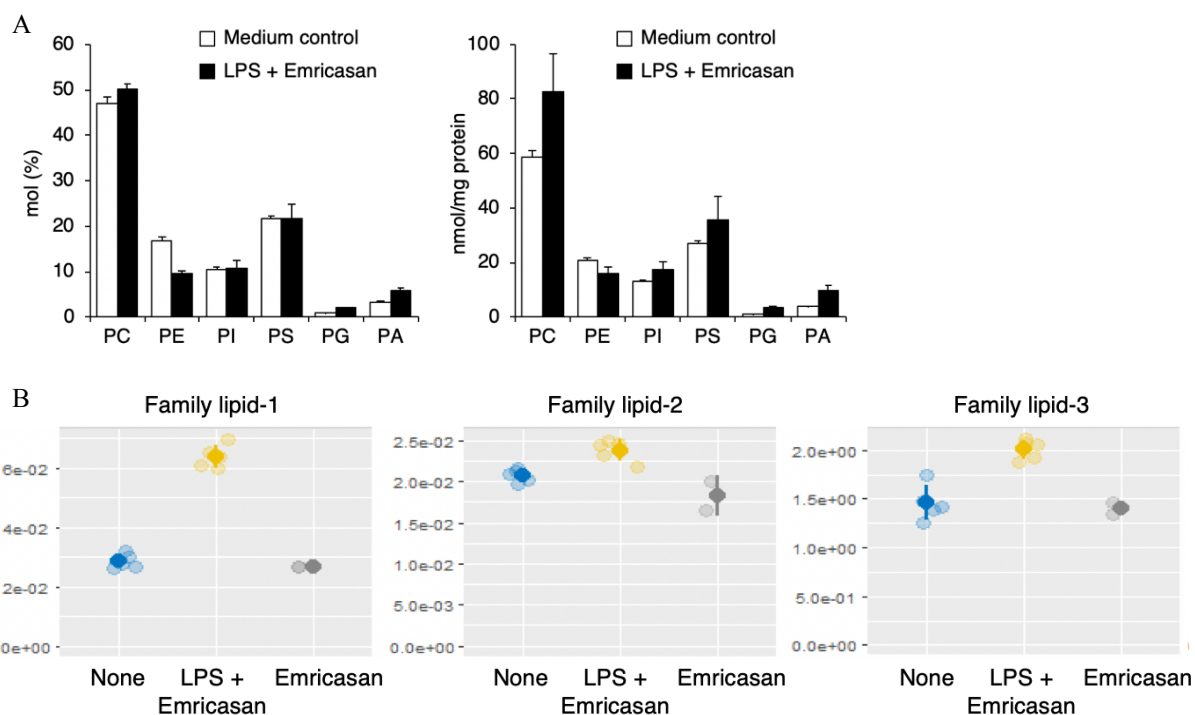


図 2. ネクロプトーシス細胞における Lipidomics 解析

③ ネクロプトーシス細胞内において蓄積する脂質成分は細胞死を誘導した。

今回発見した脂質成分は、生細胞内に多く含まれる脂質が修飾を受けることで合成される。次に、これら脂質成分の細胞死誘導能を、骨髓由来マクロファージをそれぞれの脂質成分（通常型、修飾型）で刺激することで検討した。すると、今回検出された修飾型の脂質成分は通常型に比べて、強く細胞死を誘導することが明らかとなった。さらに、カスパーゼ阻害剤である Emricasan を加えると、さらに強い細胞死を引き起こした（図 3）。

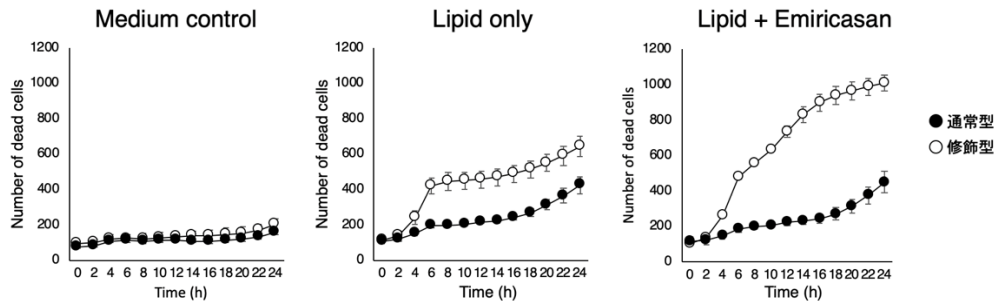


図 3. 修飾型脂質成分による細胞死誘導

この脂質成分によって、どのプログラム細胞死が引き起こされているかを検討するため、ネクロプトーシスのエフェクター分子である MLKL 欠損骨髓由来マクロファージを用いて同様の検討を行ったところ、検出されていた細胞死は MLKL の欠損により抑制されたことから、ネクロプトーシスが起きていることが示唆された（図 4）。特に、カスパーゼが抑制される状況下においては、この脂質成分は強くネクロプトーシスを誘導することが示唆された。

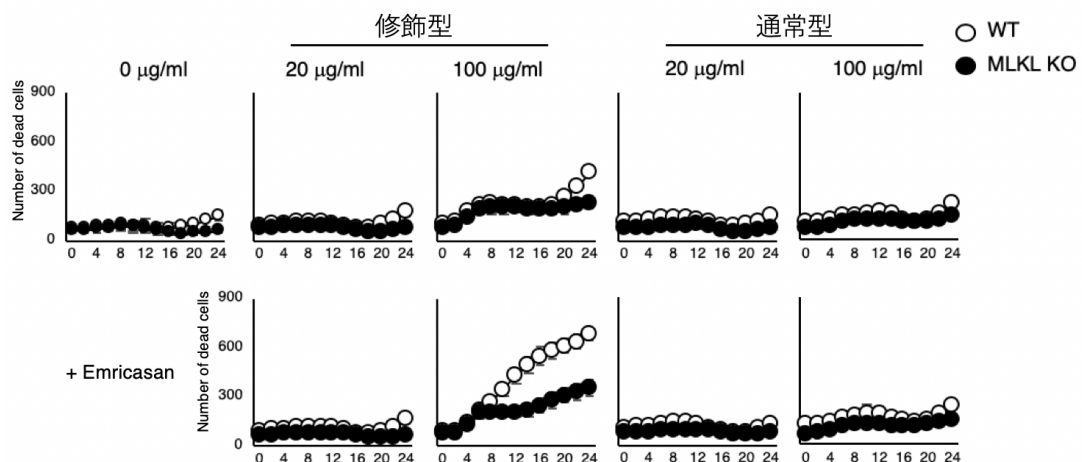


図 4. MLKL 欠損骨髓由来マクロファージを用いた細胞死解析

④ 修飾型脂質成分は TNF 産生を介して細胞死を誘導する。

細胞死の誘導は、今回の修飾型脂質が直接細胞死誘導シグナルを導入する機構と、TNF 等の細胞死を誘導するサイトカイン産生を介した間接的な機構の 2 通りが推測される。これらの可能性を検討するため、野生型と TNFR1、TNF の欠損骨髓由来マクロファージを用いて細胞死誘導実験を行ったところ、この脂質成分によって誘導される細胞死は、TNF 等の欠損によって抑制されることが明らかとなった（図 5）。

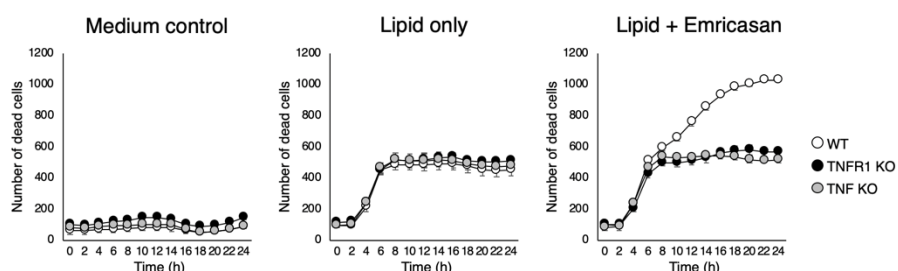


図 5. TNFR1、TNF 欠損骨髓由来マクロファージを用いた細胞死解析

以上の結果より、ネクロプトーシス細胞によって上昇する修飾型脂質成分は、TNF 産生を介してネクロプトーシスを誘導することが明らかとなった。今後、病態マウスを用いてそれらの脂質成分の組成を解析していく予定である。

現在、多くの制御分子の発見により、各プログラム細胞死の誘導機構が明らかとなってきた。しかし、ネクロプトーシスにおいては、生体内においてどのようにアポトーシスからネクロプトーシスへとシフトされるのかについて詳細は不明な部分が多い。本研究の結果から、今回見出した脂質成分の組成の変化が、ネクロプトーシスへと傾ける一つのメカニズムである可能性は十分考えられる（図 6）。しかし、そのメカニズムの可能性を解析するためには、これら脂質成分の阻害方法の構築、または代謝酵素の同定とその阻害、といった解析がさらに必要と考えられる。

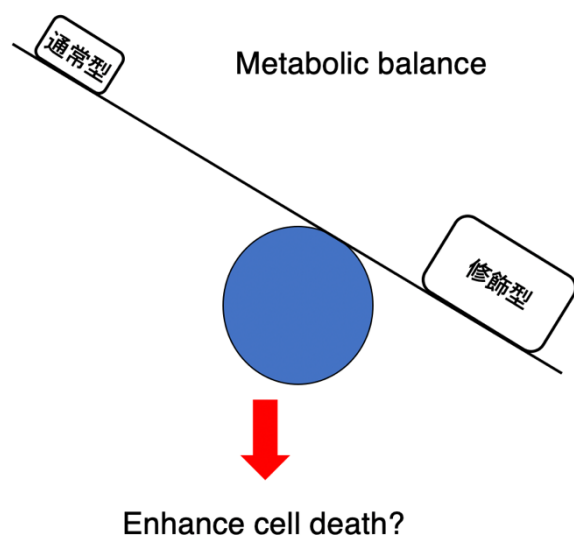


図 6. Metabolic balance を介した、細胞死調節機構の可能性