

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06747

研究課題名(和文)炎症病態に関わる新規DAMPsの解析

研究課題名(英文)Identification of novel DAMP molecules involved in inflammatory diseases

研究代表者

半谷 匠 (Hangai, Sho)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：50785350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞が死を迎える際に放出される自己由来分子(以下DAMPsと呼ぶ)のうち、炎症反応を活性化するような分子の同定を行った。生化学的、分子生物学的手法を組み合わせることでこのDAMPsの候補分子を得ることが出来た。また、癌は炎症反応がその病態に深く関与する疾患であることから、本分子が癌死細胞から放出され、周囲に炎症反応を引き起こすことで癌の進展に関わるのではないかという仮説を立てた。実際、この分子を欠損する癌細胞を作成したところ、マウス皮下においてその増殖が顕著に低下した。本研究は、炎症反応および癌病態に極めて重要な役割を果たすDAMPsの同定に迫ったと言える。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at discovering novel self-derived molecules, hereafter DAMPs, which could provoke inflammatory response. Combining biochemical and molecular biology methods, we obtained several candidate molecules of those DAMPs. Interestingly, when we made knock out cells of one candidate gene by CRISPR/Cas9, those cells grew slower than wild type cells in vivo but not in vitro. Since progression of cancer is closely connected with inflammation, the candidate molecule might augment tumor growth through modulating inflammatory response within tumor microenvironment. Collectively, we identified a DAMP molecule which enhanced inflammation, and tumor growth possibly through tumor microenvironment.

研究分野：免疫学、腫瘍学

キーワード：炎症 生体分子 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

Damage-associated molecular patterns (以下 DAMPs) は種々の細胞死に際して放出される自己由来分子であり、炎症反応の制御に関与すると考えられている (Nat Rev Cancer 12:860-75, 2012)。炎症反応は自己免疫疾患やがんなど様々な病態形成、進展に関わることから、DAMPs の本体及び DAMPs によって惹起される炎症反応に対する研究は近年注目されている (Annu Rev Immunol 28:367-388, 年数)。これまでその関与が示唆されている DAMPs のうち殆どが、Toll-like receptor (以下 TLR) などの自然免疫受容体を介し、炎症反応を正に制御することが知られている。代表的な DAMP として High-mobility group box 1 (以下 HMGB1) があり、TLR2 や TLR4 などの受容体を介し、炎症性サイトカインの誘導を行い、がん、感染症、自己免疫疾患など多様な疾患に関わることが分かっている。しかしながら DAMPs 分子の全容およびその病態あるいは生体の恒常性維持における役割については不明な点が多い。

申請者は、脂質メディエーターの一種である prostaglandin E2 (以下 PGE2) が死細胞より放出され、炎症反応を負に制御する、新たなクラスの DAMP であることを明らかにした (Proc Natl Acad Sci U S A. 113:3844-3849, 2016)。代表的な細胞死であるネクローシスを起こした細胞からは大量の PGE2 が放出され、ネクローシス細胞による炎症性サイトカインの誘導を抑制している。しかしながら、この PGE2 の産生を阻害すると、興味深いことにマクロファージにおいて炎症性サイトカインである TNF- α mRNA が顕著に誘導されることを見出した。

上記実験系を用いることで、PGE2 の存在によりこれまで検出することが困難であった、顕著な TNF- α の誘導を検出することが可能となった。本研究ではこの TNF- α 誘導を指標として、炎症病態に関わる新規 DAMPs の同定を行う。TNF- α は関節リウマチなどの自己免疫疾患や悪性腫瘍の病態進展に深く関与することが知られており、TNF- α の誘導を行うような新規 DAMPs を同定することは、死細胞による免疫応答の解明に留まらず上記疾患の病態理解および新規治療法開発につながる可能性が高い。

2. 研究の目的

DAMPs は細胞死の際に放出される自己由来免疫調節分子であり、自己免疫疾患やがんなど、種々の疾患に対する治療標的として注目されている。本研究では申請者が新規に確立した実験系により、炎症性サイトカインである TNF- α の産生を誘導する新規 DAMPs の同定を試みる。上記実験系とクロマトグラフィーによるタンパク精製および質量分析を組み合わせることで DAMPs の同定を行う。同定した分子による免疫応答の活性化について、自然免疫受容体関連遺伝子の欠損マウスを用い、炎症反応を惹起するシグナル伝達経路の解

析を行う。また、遺伝子欠損マウスを作成し、DAMPs の生体内および病態モデルにおける役割について検討する。本研究は死細胞が惹起する炎症応答機構の解明のみならず、炎症を母地とした難治性疾患に対する新規治療標的の提示に繋がることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 平成 28 年度

予備知見から想定された新規 DAMPs の同定を行う。マウス大腸癌細胞株である SL4 細胞を、PGE2 産生の阻害剤であるインドメタシンで処理した後にネクローシスを惹起し、その上清中から TNF- α を誘導する分子を同定する。これまでに、ゲル濾過クロマトグラフィーによって分子サイズにより分画し、各々の分画をマウス腹腔内マクロファージに添加すると、約 20~40kDa の分子を含む分画に TNF- α mRNA の誘導能が存在するという結果を得ている。この分画に対し、イオン交換クロマトグラフィーを行うことで更に精製度を高め、TNF- α 誘導活性のある分画を決定する。ネクローシス細胞上清による TNF- α の誘導はプロテアーゼ処理によって消失するという知見が得られており、新規 DAMPs 分子はタンパク質であると考えられる。従って、得られた分画に対し、質量分析を行うことで候補分子の決定を行う。タンパク質の精製度が低く、質量分析により多数の候補分子が得られた場合には、ハイドロキシアパタイトによるクロマトグラフィーなどを追加することで、精製度の改善を行う。得られた候補分子を SL4 細胞にレトロウイルスベクターによる過剰発現、ノックダウン、あるいは CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子欠損させ、候補分子の安定発現株、安定ノックダウン株、あるいは遺伝子欠損細胞株を樹立する。これらの細胞株を用いてネクローシス細胞上清を作成し、TNF- α 誘導能が増強、あるいは減弱するか否か qRT-PCR 法によって検討し、新規 DAMPs を同定する。

新規 DAMPs が同定された後、この DAMPs がどのような細胞死において放出されるか、検討する。ネクローシス以外の細胞死としてアポトーシス、パイロトーシス、ネクロプトーシス、ネトーシスなどがよく知られており、これらの細胞死において新規 DAMPs が放出されるかどうか、ELISA 法などを用いて検討する。

また、この DAMPs が TNF- α を誘導するメカニズムについて検討を行う。これまで知られている DAMPs の多くは TLR などの自然免疫受容体およびその下流のアダプター分子を介してシグナル伝達を行うことが知られている。自然免疫受容体下流のアダプター分子として MyD88、TRIF、IPS-I、STING が知られているが、これらの遺伝子欠損マウスから得られた腹腔内マクロファージを用いた検討では、新規 DAMPs による TNF- α mRNA 誘導は MyD88 を介することが分かっている。今後は、MyD88 を介して新規 DAMPs を認識する受容体

の同定を行う。MyD88 を用いる自然免疫受容体としては TLR の他、IL-1R などが知られており、これらの遺伝子欠損マウスを用いた検討を行う予定である。また、MyD88 によって NF κ B や MAPK 経路、および IRF7 などが活性化されることが分かっており、新規 DAMPs 分子によってこれらの分子の活性化が起こるか否か、ウェスタンブロッティング、qRT-PCR 法などを用いて検討する。さらに、この DAMPs 分子が TNF- α 以外にどのような遺伝子誘導あるいは遺伝子発現抑制を行うかどうか、検討を行う。具体的には DAMPs の安定発現株あるいは遺伝子欠損細胞株とそれぞれのコントロール細胞株にネクロシスを惹起し、その上清を腹腔内マクロファージに添加し、total RNA を回収する。この RNA に対し、マイクロアレイ解析を行うことで、DAMPs によって起こる遺伝子発現の変化を網羅的に検討する。

(2)平成 29 年度

新規 DAMPs の個体レベルでの役割の検討を行うために、遺伝子欠損マウスの作成を行う。新規 DAMPs が個体発生や細胞の生存に必須の機能を持つ分子である場合は遺伝子欠損マウスが胎性致死となると考えられる。この場合にはトランスジェニックマウスを作成する。得られた遺伝子欠損マウスあるいはトランスジェニックマウスに対し、細胞死がその病態に関わることが知られている種々の病態モデルを用いて新規 DAMPs の生体内、病態における役割を検討する。具体的にはプリスタンによる SLE モデルや CIA による関節リウマチモデルなどの自己免疫疾患、および diethylnitrosamine を用いた肝細胞癌モデルなどのモデルにおいて、病態が改善するか否か、遺伝子欠損マウスあるいはトランスジェニックマウスで検討する。また、LPS shock における生存率、臓器障害が改善するか否かの検討も行う。これらの解析を踏まえて論文の作成を行う予定である。

4. 研究成果

研究実施計画に基づき、TNF- α の誘導を行う新規 DAMPs の同定を行った。マウス大腸癌細胞株である SL4 細胞を、PGE2 産生の阻害剤であるインドメタシンで処理した後ネクロシスを惹起し、その上清中の TNF- α を誘導する分子を同定した。ネクロシス上清に対し、陽イオンおよび陰イオン交換クロマトグラフィー、さらにゲル濾過クロマトグラフィーを行うと分子量約 20~40kDa の領域に TNF- α 誘導能を有するピークが認められた(図 1)。これらのピークを含む分画に対して、銀染色を行ったところ、TNF- α 誘導活性とタンパク量が相関するバンドが複数個見られた。新規 DAMPs 分子はタンパク質であるという知見が得られているために、これらのバンドに対して質量分析を行った。質量分析の結果、候補分子が複数得られたため、これらにつき、SL4 細胞にレトロウイルスベクターにより候補分子の安定ノックダウン株を樹立した。これ

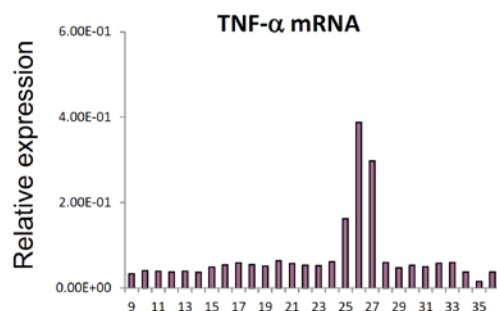


図1 ゲル濾過クロマトグラフィーによって分離したネクロシス細胞上清をマウスマクロファージ細胞株に添加し、2時間後にtotal RNAを回収した。TNF- α mRNAをqRT-PCR法で測定した。

らの細胞株を用いてネクロシス細胞上清を作成し、TNF- α 誘導能が減弱するか否か qRT-PCR 法によって検討したところ、一つの分子に対する安定ノックダウン株において、TNF- α 誘導能の減弱が見られた。さらに、この分子を欠損する SL4 細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いて作成し(以下 KO 細胞)、この細胞由来のネクロシス細胞上清をマクロファージに添加すると、TNF- α 誘導の減弱が見られた(図 2)。また、新規 DAMPs 候補分子の遺伝子組み換え体を作成した。これをマウス腹腔マクロファージに作用させると TNF- α mRNA の誘導が見られた。この分子は比較的 low molecular weight (約 20kDa) でもあり、上記の結果により、新規 DAMPs である可能性が示唆された。

また、過去の報告からこの分子は大腸癌細胞において高発現していることが知られていた。そこで大腸癌細胞が細胞死を起こす際にこの分子が DAMPs として細胞外に放出され、周囲に炎症反応を惹起することで癌の進展に何等かの影響を及ぼすのではないかという仮説を立てた。実際、KO 細胞および野生型

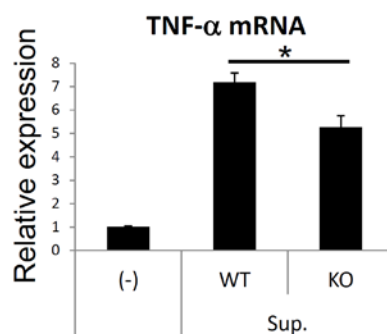


図2 DAMPs候補分子を欠損させたSL4細胞由来のネクロシス細胞上清をマウスマクロファージ細胞株に添加し、2時間後にtotal RNAを回収した。TNF- α mRNAをqRT-PCR法で測定した。

細胞をマウスに皮下移植すると、野生型細胞と比較し顕著な増殖遅延を示した(図 3)。興味深いことにこの KO 細胞は *in vitro* において野生型細胞と同程度の増殖を示した。これはこの分子が癌そのものの増殖ではなく、癌の周囲環境、すなわちがん微小環境に働きかけ、癌の進展を促進しているものと考えられ

た。がん微小環境においては、多様な細胞種が機能を発揮しているが、なかでも免疫細胞は中心的な役割を担っている。そこで、がん微小環境中の免疫細胞集団をフローサイトメトリーによって解析したところ、KO細胞由来の腫瘍において、骨髄由来免疫抑制細胞（Myeloid-derived suppressor cells; MDSCs）の顕著な低下が見られた。MDSCsは未熟な骨髄系細胞であり、抗腫瘍免疫応答を強

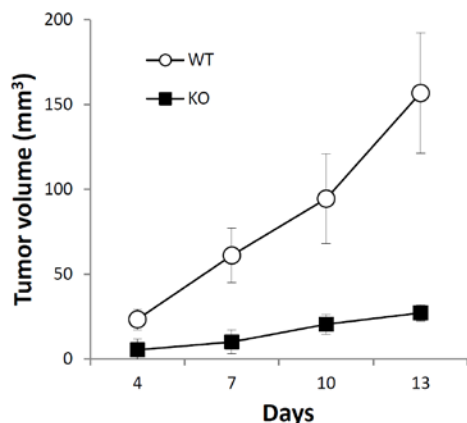


図3 野生型あるいはDAMPs候補遺伝子欠損SL4細胞を野生型マウスに皮下移植し、腫瘍径を計測したところ、遺伝子欠損細胞で増殖の遅延が見られた。

力に抑制することでがんの進展を促進する。すなわちこの分子はMDSCsのがん微小環境への動員を介して、癌の進展を促進していると考えられる。

がん微小環境は抗腫瘍免疫応答抑制などの機構により、がんの治療反応性に極めて重要な役割を果たすものとして近年注目されている。本研究はがん微小環境を標的とした新規治療法開発につながる可能性が高い。本研究では当初の目的に基づき、TNF- α 誘導を行う新規DAMPs分子の同定に迫り、かつその癌病態における役割の一端を明らかにすることが出来た。当初の研究計画に挙げた、自己免疫疾患や炎症病態における検討を進めつつ、得られた候補分子のがん微小環境、および癌進展に役割の解明、さらには新規治療法の開発に邁進したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Hideyuki Yanai, Shiho Chiba, Sho Hangai, Kohei Kometani, Asuka Inoue, Yoshitaka Kimura, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Junko Nishio, Naoko Taguchi-Atarashi, Yu Mizushima, Hideo Negishi, Rudolf Grosschedl, and Tadatsugu Taniguchi

Revisiting the role of IRF3 in

inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice.

Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America

2018 doi: 10.1073/pnas.

査読 有り

2. Yoshitaka Kimura, Asuka Inoue, Sho Hangai, Shinobu Saijo, Hideo Negishi, Junko Nishio, Sho Yamasaki, Yoichiro Iwakura, Hideyuki Yanai, Tadatsugu Taniguchi

The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by

Kupffer cells for the suppression of liver metastasis

Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America

2016;113(49):14097-14102.

査読 有り

[学会発表] (計2件)

① Sho Hangai

Prostaglandin E2 released by dying cells functions as an inhibitory DAMP

The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, 2017

② 半谷 匠

PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP

第45回日本免疫学会学術集会, 2016

[図書] (計1件)

Sho Hangai, Yoshitaka Kimura, Tadatsugu Taniguchi, Hideyuki Yanai

Springer International Publishing

Oncoimmunology, 2018, 407-427

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半谷 匠 (HANGAI Sho)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号: 50785350