

【目的】 Damage-associated molecular patterns (以下 DAMPs) は細胞死に際して放出される自己由来分子であり、種々の炎症性免疫応答を惹起して自己免疫疾患やがんなどの、炎症反応の関与する種々の病態に深く関与している。本研究では、代表的な細胞死であるネクロシス細胞より放出される分子に対し、生物学的・生化学的スクリーニングを行い、炎症病態に関わる新規 DAMPs の同定を行う。またこの新規 DAMPs が炎症応答を惹起するメカニズム、およびマウス病態モデルにおける役割を検討し、DAMPs をターゲットとした治療基盤の創出を目指す。

【方法】 新規 DAMPs の同定は、マウス大腸癌細胞株である SL4 細胞に凍結融解法によるネクロシスを惹起し、その上清を用いた。この上清はマウス腹腔マクロファージに対して TNF- α mRNA 誘導を行うという結果がすでに得られている。そこでこの TNF- α mRNA 誘導を指標として、この上清を、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラムおよびゲル濾過クロマトグラフィーにて精製した。精製後の TNF- α 誘導を持つ分画に対し質量分析を行った。得られた新規 DAMPs 候補分子を、SL4 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いてそれぞれ欠損させた後、ネクロシス細胞上清を作製し、TNF- α 誘導能を検討した。また、候補分子の遺伝子組み換え体を用いてマウス腹腔マクロファージに対する遺伝子誘導能の検討を行った。さらに候補分子を欠損する SL4 細胞をマウスに皮下移植し、移植後 4 日後より開始し、3 日毎に腫瘍径を計測した。また皮下移植後 19 日後に腫瘍内の免疫細胞をフローサイトメトリー法で解析した。

【結果】 スクリーニングの結果、新規 DAMPs は陰イオン交換カラムに結合し、陽イオン交換カラムに結合しないことが判明した。従ってネクロシス細胞上清に対し、陰イオン交換カラム結合分画かつ陽イオン交換カラム非結合分画を分取し、これに対してゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、約 15~40 kDa 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が得られた。この分画に対し質量分析を行ったところ、10 個程度の候補分子が得られた。これらの分子のうち、ある分子 (以降新規 DAMPs とする) を欠損した SL4 細胞のネクロシス細胞上清は、TNF- α mRNA 誘導能が減弱しており新規 DAMPs である可能性が高いと考えられた。さらにこの新規 DAMPs の遺伝子組み換え体を腹腔マクロファージに添加すると、TNF- α mRNA 誘導が濃度依存的に認められ、かつ TLR2 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでは TNF- α 誘導が消失した。この新規 DAMPs を欠損した SL4 細胞では野生型 SL4 細胞と比較して皮下における増殖が顕著に遅延し、腫瘍内の骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid derived suppressor cells : MDSC) が減弱していた。MDSC は抗腫瘍免疫応答を強力に抑制し、がんの増殖を促進する細胞であり、一連の結果は、がん死細胞よりこの新規 DAMPs が放出され、MDSCs を腫瘍内部に動員してがんの増殖を促進する、腫瘍増殖スパイラルを形成していると考えられた (図)。

新規 DAMP による腫瘍増殖スパイラル

