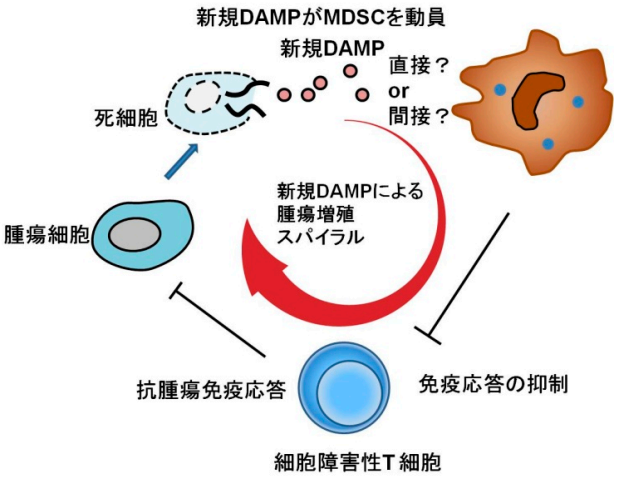
171　炎症病態に関わる新規自己由来分子のスクリーニング	半谷　匠

【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ー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ーシスを惹起し、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、ネクロー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。従ってネクロー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 細胞のネクローシス細胞上清は、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



171. 炎症病態に関わる新規自己由来分子のスクリーニング

半谷　匠

*東京大学 生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門

Key words：炎症，DAMPs，MDSC

緒　言

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、炎症性サイトカインの誘導を始めとした、種々の炎症性免疫応答を惹起する［1］。炎症反応は自己免疫疾患やがんなどの様々な病態に関わることから、DAMPs はこれらの疾患の病態形成に深く関与することが明らかとなってきている［2］。最もよく研究されている DAMP として High-mobility group box 1（以下 HMGB1）があり、Toll-like receptor（TLR）や Receptor for advanced glycation endproducts（RAGE）などの受容体を介し、TNF-α を始めとした炎症性サイトカインの誘導を行い、がんや自己免疫疾患などの種々の疾患病態に関与することが知られている［3］。しかしながら、DAMPs の全貌、および病態との関わりについては未知の部分が多く、近年活発に研究が行われている。本研究では、代表的な細胞死であるネクロー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 の同定を行った。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。スクリーニングの結果、ある分子（以降新規 DAMP とする）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た。また、TLR2 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージではこの TNF-α mRNA 誘導が消失し、TLR2 依存的に炎症反応を惹起する新規 DAMP を同定したものと考えられた。さらにこの新規 DAMPs を欠損したマウス大腸癌細胞株である SL4 細胞では、野生型 SL4 細胞と比較して、*in vivo* 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。MDSCs 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。

方法および結果

1.　新規 DAMPs のスクリーニング

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ーシスを惹起し、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 誘導を行うという結果を既に得ている。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。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。従ってネクロー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 DAMP とする）を CRISPR/Cas9 システムを用いて欠損させた SL4 細胞のネクローシス細胞上清は、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。

*現在の所属：東京大学 先端科学技術研究センター 炎症疾患制御分野 社会連携研究部門

2. 新規 DAMP による炎症性サイトカイン誘導メカニズムの解析

次にこの新規 DAMP が炎症性サイトカインを誘導するメカニズムについて検討した。この新規 DAMP の遺伝子組み換え体をマウス腹腔マクロファージに添加すると、TNF-α mRNA の顕著な誘導が見られた（図 1）。DAMPs の多くは TLR2 や TLR4 などの自然免疫受容体を介して作用を発揮することが知られている。そこで TLR2 または TLR4 を欠損したマウス由来に腹腔マクロファージに対し、新規 DAMP を添加し TNF-α mRNA の誘導を検討した。興味深いことに TLR4 を欠損した腹腔マクロファージでは TNF-α mRNA の誘導は野生型の腹腔マクロファージと同様に認められたが、TLR2 を欠損した腹腔マクロファージでは TNF-α mRNA の誘導が消失していた（図 1）。従って、新規 DAMP は TLR2 を介して TNF-α mRNA の誘導を行うものと考えられた。

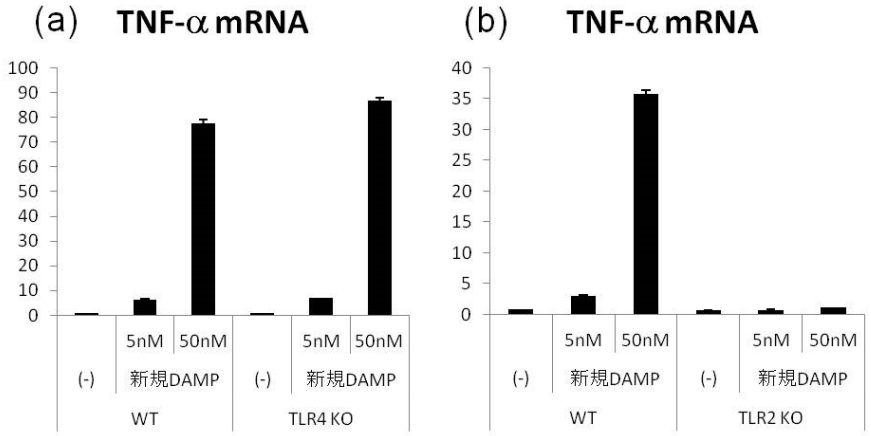


図 1. 新規 DAMP は TLR2 を介して TNF-α mRNA の誘導を行う

(a) 新規 DAMP の遺伝子組み換え体を野生型（WT）および TLR4 欠損（TLR4 KO）腹腔マクロファージに添加し、2 時間後に total RNA を回収、RT-qPCR 法で TNF-α mRNA を定量した。

(b) 新規 DAMP の遺伝子組み換え体を野生型（WT）および TLR2 欠損（TLR2 KO）腹腔マクロファージに添加し、2 時間後に total RNA を回収、RT-qPCR 法で TNF-α mRNA を定量した。

3. 新規 DAMP による骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）の動員と腫瘍病態における役割

DAMPs は炎症反応、特に慢性炎症の惹起によりがんや自己免疫疾患などの種々の病態に関与することが知られている。新規 DAMP は種々のがん患者において高発現していることが報告されているため、この新規 DAMP のがん病態における役割を検討した。まず、この新規 DAMP を欠損した SL4 細胞（以降 KO 細胞とする）をマウスに皮下移植し、移植後 4 日後より開始し、以後 3 日毎に腫瘍径を計測したところ、野生型の SL4 細胞（以降 WT 細胞とする）と比較し、顕著な増殖遅延を示した。興味深いことに、KO 細胞は、*in vitro* においては WT 細胞と同等に増殖することが分かった。これらの結果は、新規 DAMP はがん周囲の微小環境（tumor microenvironment : TME）に働きかけて、腫瘍の増殖に寄与することを示唆していると考えられた。TME においては免疫細胞が抗腫瘍免疫応答を介して、腫瘍の増殖制御に重要な役割を果たしている。そこで、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ところ、腫瘍内の骨髄由来免疫抑制細胞（Myeloid derived suppressor cells : MDSC）が顕著に減弱していた。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［4］、一連の結果はがん死細胞よりこの新規 DAMP が放出され、MDSC 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 3）。

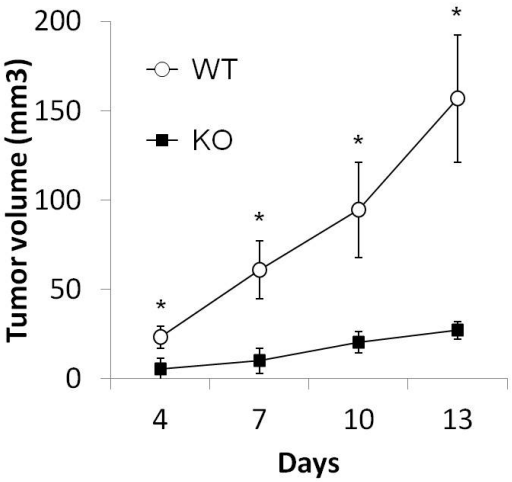


図 2. 新規 DAMP 欠損 SL4 細胞は顕著な増殖遅延を示す

新規 DAMP 欠損 SL4 細胞（KO）および野生型 SL4 細胞（WT）を C57BL/6 マウスに皮下移植し、移植後 4 日後より 3 日毎に腫瘍体積を測定した。WT と KO の腫瘍体積を Student t-test を用いて検定した。* $p < 0.05$

考　察

本研究は、炎症病態に関わる新規自己由来分子・DAMPs の同定を行った。生物学的・生化学的手法を組み合わせたスクリーニングにより新規 DAMP の同定に至った。この新規 DAMP は MDSC の動員を介して腫瘍微小環境を制御し、腫瘍増殖に寄与することが示唆された。DAMPs と疾患の関わりについては精力的な研究が国内外で行われているが、このような働きをもつものは殆ど知られておらず、本研究は高い独創性を有すると考えられる。この新規 DAMP を欠損させた SL4 細胞のネクローシス上清においても、炎症性サイトカイン誘導能が一部残存していたため、本研究で同定した DAMP 以外にも新たな DAMPs が含まれている可能性が高い。今後、このような新しい DAMPs の同定にも取り組んでいきたい。新規 DAMP は TLR2 を介して TNF-α mRNA の誘導を行うことが判明した。今後、TNF-α 以外の炎症性サイトカイン、あるいは炎症性サイトカインとは異なった遺伝子の誘導を行うか否か、RNA-seq 法などを用いて網羅的に検討していきたい。マウス大腸癌細胞株を用いた検討により、新規 DAMP は MDSCs の動員を介してがんの進展に関わることが示唆されたが、今後は新規 DAMP が MDSCs を動員するメカニズムの解析や、マウス自然発癌モデルを用いた検討を行い、DAMPs をターゲットとした治療基盤の創出を目指したい。

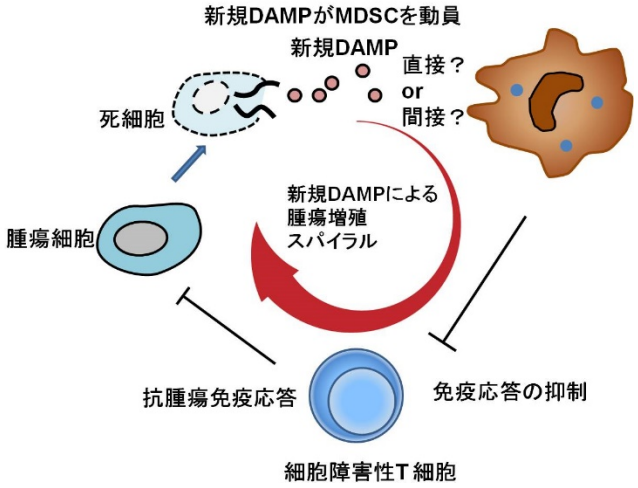


図 3. 新規 DAMP による腫瘍増殖スパイラルの概念図

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は東京大学先端科学技術研究センターの谷口維紹先生、柳井秀元先生、児玉龍彦先生、川村猛先生である。この場を借りて御礼申し上げます。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文　献

1) Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2012 Dec;12(12):860-75. PMID: 23151605 DOI: 10.1038/nrc3380.

2) Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. Annu Rev Immunol. 2010;28:367-88. PMID: 20192808 DOI: 10.1146/annurev.immunol.

3) Yanai H, Ban T, Taniguchi T. High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity.Trends Immunol. 2012 Dec;33(12):633-40. PMID: 23116548 DOI: 10.1016/j.it.2012.10.005.

4) Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol. 2009 Mar;9(3):162-74.PMID: 19197294 DOI: 10.1038/nri2506.