

細胞死に伴う炎症制御のための基盤的研究

順天堂大学大学院 医学研究科 免疫学

中野 裕康

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

発生や老化の過程で不要となった細胞や生体にとって有害な細胞は、細胞死により排除される。長年にわたり細胞死は細胞の一生の最終過程であり、死んだ細胞は単に捨て去られる存在であると考えられてきた。ところが近年、細胞死が誘導された後の死細胞それ自身が周囲の細胞や組織に多様なシグナルを発信し、様々な生体応答を引き起こすことが分かってきた (Kono *et al*, *Nat Rev Immunol* 2008)。これまで細胞死に伴い HMGB1, HSP, SAP130 などの danger associated molecular pattern (DAMP)s と呼ばれる様々な分子が放出され、細胞死に伴う炎症に関与することが示されてきた。また、ショウジョウバエではアポトーシスに伴い死細胞から増殖因子が放出され、それらが残存した生細胞に増殖シグナルを誘導することで、組織の恒常性維持に関与していることが示されている (代償性増殖) (Steller *et al*, *Dev Cell* 2003)。一方で、ほ乳類細胞では細胞死に伴い放出され代償性増殖に関与する因子として prostaglandin E2 が同定されていたが (Li *et al*, *Science Signaling* 2011)、最近我々は酸化ストレス依存性に死細胞から放出され、代償性増殖に関与する因子として IL-11 を同定した (Nishina *et al*, *Science Signaling* 2012)。また死細胞の存在は、従来よく知られている肝炎や急性期感染症などの一部の疾患あるいは病態だけではなく、メタボリック症候群など、様々な疾患の場において認められることが知られるようになってきた。このように様々な因子が死細胞から放出されることは明らかになってきたものの、生体内において死細胞がどのような局面で、どのようなメッセージを発しているかの全貌の解明には至っていない。

一方で我々は cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) と呼ばれる細胞死抑制遺伝子が、NF- κ B による細胞死抑制に中心的な役割を果たしていることを明らかにしてきた (Nakajima *et al*, *EMBO J* 2006; *Oncogene* 2008)。全身性の c-FLIP 欠損マウスは卵黄囊の血管形成不全により胎生の 10.5 日に致死となってしまうために (Yeh *et al*, *Immunity* 2000)、それぞれの組織における c-FLIP の役割を明らかにするために、組織特異的な c-FLIP 欠損マウスを樹立した。腸上皮および肝細胞において完全に c-FLIP を欠損したマウスはメンデルの法則に従い出生するものの、それぞれの組織のアポトーシスおよびプログラムネクロトーシスが亢進したために、生後2日以内にほぼ全例が死亡することが明らかとなった。このことから、c-FLIP はこれらの組織の恒常性維持に必須の役割を果たしていることが明らかとなった (Piao *et al*, *Science Signaling in press*)。肝細胞において完全に c-FLIP を欠損させた場合には致死となるために、我々は同時に c-FLIP の部分欠損マウスを作製した。このマウスはストレスを与えない状況では正常に発育するが、野生型マウスには肝傷害を誘導しない程度の少量の TNF α 投与により、一過性の肝傷害が誘導され、その傷害は24時間後にはほぼ正常になることが明らかとなった (未発表データ)。このことは、このモデルを用いることにより、細胞死とその後の食細胞による貪食、組織修復、炎症制御などのステップを短時間で観察できる優れたモデルであることが考えられた。そこで我々が樹立している肝細胞特異的 c-Flip 部分欠損マウスを用い、死細胞貪食に関与すると考えられる食細胞を特異的に欠損させた場合に、どのような生体応答が誘導される

のか、またそれにより死細胞から放出されるメッセージを増幅し、死細胞の発する新たなシグナルの同定を目指す。

2. 方法

- 1) クロドロネート・リポソームを投与することで、肝臓に常在する Kupffer 細胞を一過性に欠損させたマウスを樹立する。
- 2) 肝細胞特異的 c-FLIP 部分欠損 (c-Flip^{Δhep}) マウスに、ジフテリアトキシン(DT)により食細胞を一過性に除去することのできるマウスの骨髄(Lysozyme M-human DT receptor: LysM-DTR ノックインマウス)を移入したキメラマウスを作製し、DT 投与により骨髄由来の食細胞を一過性に除去することの可能なマウスを樹立する。
- 3) 上記2)のマウスにDTとクロドロネート・リポソームを同時に投与することによりCD11b陽性細胞とKupffer細胞とを同時に欠損させたマウスを樹立する。

上記3種類のマウスにTNFαを投与し、肝炎を誘導し、ある特定の食細胞を欠損させることで、どのような病態が誘導されるのか、また死細胞の発する信号を増幅させ、定常状態では同定することの困難な死細胞から放出され炎症制御に関与する因子を同定する。

3. 結果および考察

クロドロネート・リポソーム投与によりKupffer細胞を除去しても、TNFα投与により誘導された肝死細胞の食処理は障害されず、Kupffer細胞非除去群と比較して、炎症性サイトカインの産生にも変化は認められなかった。免疫染色の結果からは、F4/80陽性のKupffer細胞は完全に消失していたが、CD11b+Ly-6G+の好中球とCD11b+Ly-6G-のマクロファージが血中から侵入し、死細胞の周囲に存在していることが明らかとなった。一方で、LysM-DTRマウス由来の骨髄を移入したキメラマウスでは、DT投与により肝臓に浸潤してくるCD11b陽性細胞はほぼ完全に消失したが、Kupffer細胞は残存していた。驚いたことに、DT投与した骨髄キメラマウスでは、CD11b陽性細胞の消失に伴い、肝炎は劇的に悪化し、IL-6やTNFαなどの炎症性サイトカインの著明な産生亢進が認められた。また組織学的な検査では、活性化型カスパーゼ3抗体陽性細胞が著明に増加していることが明らかとなった(図1)。この事は、細胞死に伴い浸潤してくるCD11b陽性細胞が炎症性サイトカインや細胞死を抑制する因子を放出し、炎症の収束に関与していることを示している。また逆にこの状況では、死細胞から放出される因子の産生が持続かつ亢進し、肝炎の病態を増悪させている可能性が考えられた。

クロドロネート・リポソーム投与によりKupffer細胞を除去しても、TNFα投与により誘導された肝死細胞の食処理は障害されず、Kupffer細胞非除去群と比較して、炎症性サイトカインの産生にも変化は認められなかった。免疫染色の結果からは、F4/80陽性のKupffer細胞は完全に消失していたが、CD11b+Ly-6G+の好中球とCD11b+Ly-6G-のマクロファージが血中から侵入し、死細胞の周囲に存在していることが明らかとなった。一方で、LysM-DTRマウス由来の骨髄を移入したキメラマウスでは、DT投与により肝臓に浸潤してくるCD11b陽性細胞はほぼ完全に消失したが、Kupffer細胞は残存していた。驚いたことに、DT投与した骨髄キメラマウスでは、CD11b陽性細胞の消失に伴い、肝炎は劇的に悪化し、IL-6やTNFαなどの炎症性サイトカインの著明な産生亢進が認められた。また組織学的な検査では、活性化型カスパーゼ3抗体陽性細胞が著明に増加していることが明らかとなった(図1)。この事は、細胞死に伴い浸潤してくるCD11b陽性細胞が炎症性サイトカインや細胞死を抑制する因子を放出し、炎症の収束に関与していることを示している。また逆にこの状況では、死細胞から放出される因子の産生が持続かつ亢進し、肝炎の病態を増悪させている可能性が考えられた。

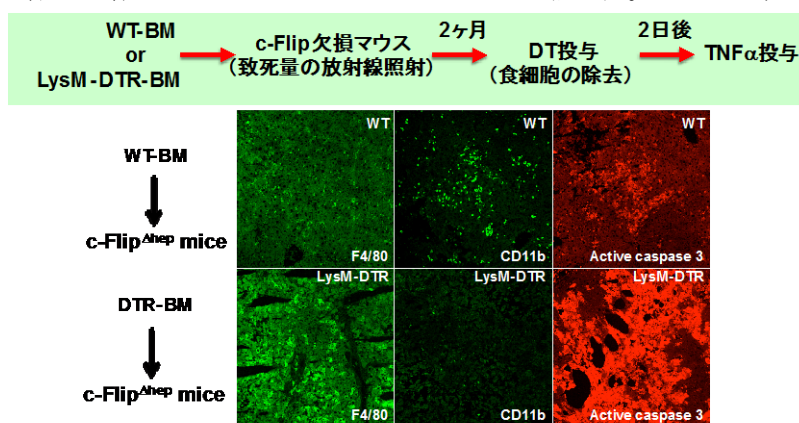


図1. CD11b陽性浸潤細胞除去による肝炎の増悪

そこで、次に細胞死に伴いIL-6やTNFαを産生する細胞を同定するために、まず肝臓におけるIL-6やTNFαのmRNAsの発現上昇が、DT+クロドロネート処理をしたLysM-DTR骨髄キメラマウスの肝臓でもIL-6やTNFαの著明な発現上昇が認められたことから、炎症性サイ

トカイン産生に關与する細胞は、少なくとも肝臓にも存在すること、およびその細胞は末梢血から流入してくる CD11b 陽性細胞や、Kupffer 細胞以外の細胞であることが判明した。現在、死細胞から放出される因子に応答して IL-6 産生に關与する細胞の同定と、CD11b 陽性細胞を除去することで、どのようなメカニズムにより細胞死が亢進するののかのメカニズムを検討中である。これらの研究を通じて、細胞死の貪食除去に關与する特異的な食細胞の機能や、細胞死後の炎症制御の新たなメカニズムの解明につながる可能性がある。

最後に助成金を援助していただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究会および担当者の皆様に深謝致します。

4. 発表論文

1. Piao, X., S. Komazawa-Sakon, T. Nishina, M. Koike, J.-H. Piao, H. Ehlken, K. Kurihara, M. Hara, N. Van Rooijen, G. Schütz, M. Ohmuraya, Y. Uchiyama, H. Yagita, K. Okumura, Y.-W. He, and *H. Nakano. 2012. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. *Sci Signal* in press.
2. Nishina, T., S. Komazawa-Sakon, S. Yanaka, X. Piao, D.M. Zheng, J.H. Piao, Y. Kojima, S. Yamashina, E. Sano, T. Putoczki, T. Doi, T. Ueno, J. Ezaki, H. Ushio, M. Ernst, K. Tsumoto, K. Okumura, and *H. Nakano. 2012. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal* 5:ra5.
3. Piao, J.H., H. Yagita, K. Okumura, and *H. Nakano. 2012. Aberrant accumulation of interleukin-10-secreting neutrophils in TRAF2-deficient mice. *Immunol Cell Biol* 90:881-888.
4. Minami, T., K. Kuwahara, Y. Nakagawa, M. Takaoka, H. Kinoshita, K. Nakao, Y. Kuwabara, Y. Yamada, C. Yamada, J. Shibata, S. Usami, S. Yasuno, T. Nishikimi, K. Ueshima, M. Sata, H. Nakano, T. Seno, Y. Kawahito, K. Sobue, A. Kimura, R. Nagai, and K. Nakao. 2012. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodeling in mice. *EMBO J* in press.
5. Li, D., F. Waheed, M. Lodyga, P. Speight, A. Masszi, H. Nakano, M. Hersom, S. Pedersen, K. Szászi, and A. Kapus. 2012. Hyperosmotic stress regulates the distribution and stability of Myocardin-Related Transcription Factor, a key modulator of the cytoskeleton *Am J Physiol Cell Physiol* in press.
6. Ushio, H., T. Ueno, Y. Kojima, M. Komatsu, S. Tanaka, A. Yamamoto, Y. Ichimura, J. Ezaki, K. Nishida, S. Komazawa-Sakon, F. Niyonsaba, T. Ishii, T. Yanagawa, E. Kominami, H. Ogawa, K. Okumura, and *H. Nakano. 2011. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 127:1267-1276 e1266.
7. Tokunaga, F., T. Nakagawa, M. Nakahara, Y. Saeki, M. Taniguchi, S. Sakata, K. Tanaka, H. Nakano, and K. Iwai. 2011. SHARPIN is a component of the NF-kappaB-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* 471:633-636.
8. Piao, J.H., M. Hasegawa, B. Heissig, K. Hattori, K. Takeda, Y. Iwakura, K. Okumura, N. Inohara, and *H. Nakano. 2011. Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor (TRAF) 2 Controls Homeostasis of the Colon to Prevent Spontaneous Development of Murine Inflammatory Bowel Disease. *J Biol Chem* 286:17879-17888.
9. *Nakano, H., and H. Ushio. 2011. An unexpected role for autophagy in degranulation of mast cells. *Autophagy* 7:657-659.
10. Kojima, Y., M. Nakayama, T. Nishina, H. Nakano, M. Koyanagi, K. Takeda, K. Okumura, and H. Yagita. 2011. Importin beta1 Protein-mediated Nuclear Localization of Death Receptor 5 (DR5) Limits DR5/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Cell Death of Human Tumor Cells. *J Biol Chem* 286:43383-43393.
11. Charbonney, E., P. Speight, A. Masszi, H. Nakano, and A. Kapus. 2011. beta-catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. *Mol Biol Cell* 22:4472-4485.