

炎症性疾患における炎症惹起と組織修復のメカニズム

慶應義塾大学 医学部 微生物学 免疫学教室
七田 崇

1. はじめに 目的

それぞれの臓器、病態においてどのように炎症が惹起されるかは未解明のままである。例えば脳梗塞と心筋梗塞の違いのように、炎症の惹起と沈静化（組織修復）の過程は臓器によって異なっていることから、臓器に存在している内因性組織因子（DAMPs: danger-associated molecular patterns）が炎症のプロセスを制御している可能性が高い。本研究では我々が新規に同定したPrxファミリーをはじめとする炎症惹起に働く内因性組織因子の役割を明らかにし、新たな治療戦略を提示する。

Prxタンパクは本来、細胞内で機能する抗酸化タンパクとして知られていた。我々は脳抽出液中にTLR依存的な樹状細胞活性化因子が存在することを発見し、これを質量分析によって解析することでPrxファミリータンパクがTLR2、TLR4を介して強く樹状細胞を活性化することを明らかにした。ナイロン系による中大脳動脈閉塞モデルマウス（脳虚血モデルマウス）を用いた解析では、虚血誘導12～24時間後に脳組織でのPrxの発現が顕著に増加し、虚血壊死に陥った脳細胞から細胞外に放出されている様子が観察された。細胞外に放出されたPrxは脳内に浸潤したマクロファージと細胞表面で接触しており、ポリクローナルPrx抗体の投与によってマクロファージによる炎症性サイトカインの産生を有意に抑制することができた。

本研究ではPrxがマクロファージを活性化して炎症を惹起するメカニズムの詳細を解明すること、さらにPrxに対するモノクローナル抗体の樹立により様々な炎症性疾患におけるPrxの役割を明らかにすること、を目的とする。

2. 方法

(1) PrxファミリーのTLR活性化機構の解明

Prxファミリーの変異体タンパクを作製してTLRを活性化するのに必要な部位を検索する。

(2) Prxファミリーに対するモノクローナル抗体の作成

(3) 各種炎症モデルでの役割の解明と抗体を用いた治療法の開発

Prxに対するモノクローナル抗体産生株の樹立を行い、病態モデルに投与することにより様々な炎症性疾患におけるPrxの寄与を証明する。

3. 結果 研究成果

(1) PrxファミリーのTLR活性化機構の解明

Prxタンパクの変異体を作製するにあたり、まず抗酸化作用を有する部位に着目して変異体を作製したが、TLR活性化には影響しないことが明らかとなった。そこでPrxタンパクのC末端側を削除した変異体を用いた解析を行ったところ、Prxファミリーに共通な $\alpha 3$ -helix部位がTLR活性化に中心的な部位であることが判明した。 $\alpha 3$ -helix部位に対するポリクローナル抗体を作製して

脳虚血モデルマウスに投与したところ、有意な脳梗塞体積の減少が観察された。この α 3-helix部位を標的とした新規抗炎症薬の開発が期待される。

(2) Prx ファミリーに対するモノクローナル抗体の作成

Prxタンパクをラットに免疫することにより、脾臓細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製して、Prxに対する特異的抗体の産生株を選出した。本研究によってPrx1、Prx5、Prx6に対する抗体産生株を作製することができた。今後は炎症性疾患モデルに投与することによって得られる効果を検討する。

(3) 各種炎症モデルでの役割の解明と抗体を用いた治療法の開発

脳虚血モデルマウスにおける検討では、虚血壊死に陥った脳細胞からはPrxが細胞外に放出され、Prxは脳内に浸潤したマクロファージをTLR依存的に活性化して炎症性サイトカインを産生誘導する。このような炎症性サイトカインの1つであるIL-23は、マクロファージに遅れて脳内に浸潤する $\gamma\delta$ T細胞よりIL-17の産生を誘導して炎症を遷延化させることが明らかとなっている。

そこで加齢性黄斑変性の病態モデルである、網膜損傷による血管新生モデルマウスを用いてPrxや炎症性サイトカイン（IL-23やIL-17）の機能を検討した。IL-17KOマウスを用いた検討では野生型マウスと比較して血管新生の程度が減弱し、この効果は血管新生に重要なVEGFの効果に非依存的であることが示唆された。IL-17の産生源を検索したところ、 $\gamma\delta$ T細胞とinnate lymphoid細胞が主にIL-17を産生していることが明らかとなった。

これらの細胞によるIL-17産生はIL-23KOマウスでは変化せず、血管新生の程度もIL-23KOマウスと野生型マウスでは変化がないことから、網膜損傷による血管新生モデルではIL-23の役割は中心的ではない可能性が示唆された。IL-17の産生を誘導する因子を検索したところ、IL-1 β が重要なIL-17産生刺激であることが明らかとなった。IL-1 β はTLR依存的に活性化されたマクロファージより産生されるが、網膜損傷による血管新生モデルにおいてもTLR2、TLR4を介した炎症惹起のメカニズムが重要であった。Prxは網膜損傷によって発現誘導されることはなく、Prx抗体の投与による炎症抑制効果も顕著には観察されなかった。他のDAMPsの中和抗体を投与した結果、HMGB1が網膜損傷後の炎症惹起に重要な役割を持つことが判明した（Hasegawa E, et al. *J Immunol* 2013）。

4. 考察 まとめ

急性炎症のメカニズムには、PrxやHMGB1のようなDAMPs、TLR依存的なマクロファージの活性化による炎症性サイトカインの産生、IL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞やinnate lymphoid細胞による炎症の促進、といった一連の炎症メカニズムが関与していることが解明された。今後は本研究で明らかとなった新規の治療標的に着目した抗炎症薬が開発されることが期待される。

5. 発表論文、参考文献

Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. IL-23-Independent Induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T Cells and Innate Lymphoid Cells Promotes Experimental Intraocular Neovascularization. *J Immunol.* **190**(4): 1778-1787 (2013)