

学位申請論文

マクロファージならびに T 細胞サブ
セットの分化制御に関する解析

平成 29 年 3 月

榎田 直之

目次

1. 略語一覧	3
2. 要旨	4
3. 第1章	
IL-10 刺激による IL-4 誘導性 M2 マクロファージの促進及び好酸球浸潤誘導能の獲得	
3-1 研究背景と目的	7
3-2 材料と方法	9
3-3 結果	12
3-4 考察	15
3-5 参考文献	18
3-6 図表	23
4. 第2章	
DCA による PDHK 非依存的な ROS 産生を介した Treg 分化誘導及び Th17 分化抑制	
4-1 研究背景と目的	39
4-2 材料と方法	41
4-3 結果	44
4-4 考察	46
4-5 参考文献	48
4-6 図表	51
5. 謝辞	63

1. 略語一覧

Arg1	arginase I
BMDM	bone marrow derived macrophage
CMFDA	5-chloromethyl fluorescein diacetate
CCL	CC chemokine ligand
CXCL	CXC chemokine ligand
CCR	chemokine receptor
DCA	dichloro acetate
DCFDA	2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
IFN γ	interferon γ
IL	interleukin
IL-4R α	IL-4 receptor alpha
LPS	lipopolysaccharide
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MRC1	mannose receptor C1
M ϕ	macrophage
NAC	N-acetyl-L-cysteine
PDHK	pyruvate dehydrogenase kinase
ROS	reactive oxygen species
Siglec-F	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F
TGF β	transforming growth factor β
Th17	T helper 17 cell
Treg	regulatory T cell
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

2. 要旨

生体において免疫応答は、外部からの異物の排除に対して単一な応答を示すのではなく、異物の種類に応じて適切な応答を示す。その一方で、自身の細胞に対しては障害を与えないよう過剰な免疫を抑制する。このように複雑な免疫応答を行うために、生体は複数の炎症免疫系の細胞を有するとともに同一の細胞から複数のサブセットに変化し機能を発揮させている。サブセットに関する多くの研究がなされているもののその機能及び分化制御についての詳細なメカニズムは未知の部分が多い。本研究では、マクロファージ及び T 細胞サブセットの分化制御について解析を実施した。

マクロファージは、自然免疫に関わる細胞として主に宿主の感染防御に関与することが報告されており、生体の局所環境において刺激を受けることで M1M ϕ と M2M ϕ に分化する。M2M ϕ は更に IL-4 もしくは IL-13 により誘導される M2aM ϕ 、抗原抗体複合体と LPS により誘導される M2bM ϕ 、IL-10 もしくはグルココルチコイドにより誘導される M2cM ϕ に更に細分化されることが報告されている。これまでの研究では、単独のサイトカインにより誘導された M ϕ の研究が行われてきたが、生体内では複数のサイトカインによる刺激が存在すると考えられるため、本研究では複数サイトカインの組み合わせにより誘導される M ϕ サブセットの特徴についての研究を進めた。

様々なサイトカインで刺激したマクロファージを検討する過程で IL-10 刺激することで IL-4Ra を高発現することに着目し、IL-4+IL-10 刺激で誘導されるマクロファージに焦点をあてて研究を進めた。その結果、IL-4 単独で誘導した M2aM ϕ と比較して、IL-10 を IL-4 とともに刺激することで M2aM ϕ マーカーの顕著な発現増強が観察された。IL-4+IL-10 刺激で好酸球浸潤に関与する CCL24 分泌が顕著に上昇していた。そこで、IL-4+IL-10 刺激した M ϕ の好酸球への作用を検討したところ、in vitro 及び in vivo で好酸球浸潤を誘導した。以上の結果より、M2M ϕ は単一のサイトカインにより制御されているのではなく、IL-4 及び IL-10 というサイトカイン刺激のコンビネーションにより好酸球浸潤などの機能を発現している可能性が示唆された。

T 細胞においても複数のサブセットが報告されており、Th17 細胞及び Treg 細胞分化には共通の要素が必要とされる一方で Th17 細胞は免疫応答を促進し、Treg 細胞は免疫応答の抑制を示し、反対の機能を有することが知られている。Th17 細胞を含む免疫亢進に関与するエフェクター T 細胞と T 細胞の過剰な活性化を抑制する制御性 T 細胞は異物の排除を促しつつ、自己免疫疾患を誘導しないよう互いにバランスをとっている。そのバランスの制御はこれまでサイトカインを中心に研究されているが、近年、細胞内代謝の T 細胞分化バランスへの関与が示唆されている。そこで、細胞内代謝に影響を与えることが

報告されている Dichloroacetate (DCA)の Th17 及び Treg に対する作用に着目し研究を進めた。

DCA は、Th17 分化を抑制し、Treg 誘導を促進する作用を示した。DCA は pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK)を阻害することが報告されているため、PDHK が DCA による T 細胞分化に関与しているかを検討した。DCA の作用を PDHK 阻害薬である AZD7595 存在下及び PDHK1 もしくは PDHK3 のノックダウン条件下で検討したところ、PDHKs は DCA の T 細胞分化作用に関与していないことが示唆された。そこで、DCA の他の作用である ROS 産生に着目し検討すると、ROS 阻害剤である N-acetyl-L-cystein (NAC)存在下では、DCA による ROS 産生及び Th17 抑制、Treg 促進作用は観察されなかった。以上の結果から、DCA は PDHK 非依存的に ROS 産生を誘導し、Th17 抑制及び Treg 促進作用を有することが明らかとなった。

本研究により、Mφ 及び T 細胞サブセット分化制御の一端を明らかにすることができた。今後、より詳細なサブセット制御のメカニズムが明らかになることで免疫応答全てを抑制するのではなく特定の免疫応答のみを制御できる副作用の少ない新たな免疫関連疾患の治療薬創生に繋がると考えられる。

3. 第1章

IL-10 刺激による IL-4 誘導性 M2 マクロファージの促進及び好酸球浸潤誘導能の獲得

3-1 研究背景と目的

M ϕ サブセットの分類及び特徴について

マクロファージ(M ϕ)は、自然免疫に関わる細胞として主に宿主の感染防御に関与することが報告されている(Mosser et al., 2005)。生体の局所環境において M ϕ は、サイトカイン及び Toll like receptor (TLR) などの刺激により制御されている(Taylor et al., 2005)。分化したマクロファージは、大きく M1M ϕ と M2M ϕ に分類される(図 1)。M1M ϕ は、IFN γ 及び TLR アゴニスト刺激により誘導され、inducible nitric oxide synthase を発現するとともに IL-12, TNF α , IL-1 β , IL-23, IL-6, CXCL10 及び CCL5 などのサイトカイン及びケモカインを産生する(Mosser et al., 2003)。対照的に M2M ϕ は、in vitro では IL-4 もしくは IL-13 により誘導される M2aM ϕ 、抗原抗体複合体と LPS により誘導される M2bM ϕ 、IL-10 もしくはグルココルチコイドにより誘導される M2cM ϕ に更に細分化されることが報告されている(Stein et al., 1992, Muller et al., 2007, Edwards et al., 2009, Mantovani et al., 2004)。複数の M1M ϕ 及び M2M ϕ のトランスクリプトーム解析により遺伝子発現の特徴が解析されている(Martinez et al., 2006, Lacey et al., 2012, Svensson et al., 2011, Houser et al., 2011, Houser et al., 2011, Zhang et al., 2010)。しかし、これらの解析では単独のサイトカインにより誘導された場合の検討であり、複数サイトカインの組み合わせにより誘導される M ϕ サブセットの特徴については、これまでに明らかとなっていない。

M2M ϕ のこれまでの研究と本研究の位置づけについて

これまでの IL-4 により in vitro で誘導される M2aM ϕ の解析を通して C-type mannose receptor 1 (Mrc1, CD206), arginase 1 (Arg1), Chil3 chitinase-like 3 (Chi3l3) 及び resistin-like alpha (Retnla) が M2aM ϕ で特異的に発現するとともに CCL17, CCL22, CCL24 などのケモカインを産生することが報告されている(Martinez et al., 2006, Lacey et al., 2012)。また、IL-10 刺激により STAT3 活性化を介して IL-4R α 発現を誘導し、IL-4 とともに刺激をすることで Arg1 の発現を増強させることが報告されている(Biswas et al., 2011, Sica et al., 2007)。一方、In vivo での M2M ϕ はアレルギーやぜん虫感染に関与する Th2 細胞や好酸球浸潤を誘導することが報告されている(Muller et al., 2007, Kreider et al., 2007)。また、IL-10 により誘導される M2cM ϕ は骨格筋の修復に関与することが報告されている(Deng et al., 2012, Kharraz et al., 2013)。最近の研究では、in vivo では単独サイトカインの刺激だけが入ることは稀であり、複数サイトカインによりマクロファージは刺激されると考えられている。実際複数サイトカインの組み合わせで刺激すること

により単独サイトカイン刺激で観察されるよりも顕著なフェノタイプが得られることが示唆されている。IL-13 と TSLP 刺激及び IL-4 と IL-33 刺激が *in vivo* での M2M ϕ による好酸球浸潤に関与していることが報告されている (Han et al., 2013, Kurowska-Stolarska et al., 2009)。これらの研究では *in vitro* においても上記の組み合わせで M2M ϕ を誘導した場合に CCL17 及び CCL24 を顕著に産生されている。しかしながら、これらの *in vitro* で誘導した M2M ϕ が細胞移入などの方法で直接的に *in vivo* で好酸球浸潤を誘導できるかは明らかとされていない。

本研究では、マクロファージを IL-10 刺激することで IL-4Ra を高発現し、IL-4 とともに刺激することで M2aM ϕ の特徴を増強することを示した。この結果をもとに IL-4+IL-10 刺激した M ϕ を Microarray 解析することで IL-4+IL-10 刺激した M ϕ 特徴的な遺伝子発現の有無を明らかにした。さらに、IL-4+IL-10 刺激した M ϕ では、CCL24 の分泌量が顕著に上昇していることに着目し、*in vitro* 及び *in vivo* での好酸球浸潤に対する作用を検討した。

3-2 材料と方法

試薬

リコンビナントサイトカインは R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より入手した。LPS (L4391) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) より入手した。抗体は、BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA), eBioscience (San Diego, CA, USA) 及び AbD Serotec (Oxford, UK) より入手した。マウス CCL24 は、CCL24 ELISA kit (DY528, R&D Systems) を用いて測定した。

使用動物

C57BL/6J マウス及び BALB/c マウスは Charles River (Japan) より入手した。全ての実験はアスピオファーマ株式会社動物実験倫理委員会の承認のもと実施された。

M ϕ 培養条件

M-CSF もしくは GM-CSF を用いて誘導した骨髄由来マクロファージ (bone marrow derived M ϕ , BMDM) は以前の報告に基づき調製された (Fleetwood et al., 2007)。簡潔に示すと、M-CSF 誘導 BMDM は、C57BL/6J マウス由来の骨髄細胞を 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100U/mL streptomycin 及び 50ng/mL M-CSF を含む RPMI 1640 培地で 7 日間培養することで調製した。GM-CSF 誘導 BMDM は、M-CSF の代わりに 10ng/mL GM-CSF 添加した条件で培養し調製した。

ナイーブ腹腔マクロファージ、チオグリコレート誘発及びザイモサン誘導性の腹腔マクロファージは、既存の報告に基づき調製された (Navarro-Xavier et al., 2010)。簡潔に示すとナイーブ腹腔マクロファージは、C57BL/6J マウスの腹水より調製した。チオグリコレート誘発腹腔マクロファージは 2mL 3% チオグリコレートを C57BL/6J マウスに腹腔内投与しその 3 日後に得られた腹水より調製した。ザイモサン誘発腹腔マクロファージは 1mg ザイモサンを C57BL/6J マウスに腹腔内投与しその 24 時間後に得られた腹水より調製した。

マクロファージサブセットはマクロファージを下記の刺激で 24 時間培養することで誘導した (10ng/mL LPS + 50ng/mL IFN γ , 10ng/mL IL-4, 10ng/mL IL-1 β , 10ng/mL IL-10, 10ng/mL TGF β 及び IL-4+IL-10)。コントロールマクロファージは刺激無しの条件で 24 時間培養した細胞を用いた。

Real time PCR

培養した細胞は、Qiagen microRNeasy system (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてプロトコルに記載の方法に従い total RNA を精製した。Total RNA は SuperScript Vilo cDNA synthesis kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて cDNA に逆転写した。Real time PCR は Taqman-based detection methods (universal probe library, Roche, Penzberg, Germany)を用いて実施された。 β -actin の発現量を標準化に用い、標的遺伝子との発現比を Δ CT 法を用いて計算した。プライマー及びプローブは下記のものを用いた。

Arg1 (NM-007482.3; forward, ggcaaggtgatggaagagac; reverse, aggtgaatcggccttttctt; probe, #3)

Ccl24 (NM_019577.4; forward, cctctgtccctgaacttgga; reverse, tcccagctggctgtcctaaa; probe, #64)

Retnla (NM_020509.3; forward, ttgggagatccagagtggag; reverse, cagtggctcagtcacagagtaa; probe, #96)

IL-4R α (NM_001008700.3; forward, gagaggacaaccctgcagaa; reverse, caggatgttgatcggaag; probe, #64)

Mrc1 (NM_008625.2; forward, caaccaagggctcttctaa; reverse, ggcacctatcacaatcaggag)

β -actin (NM_007393.3; forward, tcaacacccagccatgta; reverse, gtggtacgaccagaggcatac; probe, #64)

フローサイトメトリー

細胞は氷冷した FACS バッファー(00-4222-26, eBioscience)で洗浄し、Fc block (CD16/CD32antibody)で 5 分 4℃で放置した。それから各抗体を添加し 30 分 4℃で放置した。FACS バッファーで 2 度洗浄後、MACSquant (Miltenyi Biotec, Bergishc Gladbach, Germany)を用いて測定し、FlowJo (TreeStar, Ashland, OH, USA)を用いて解析した。

マイクロアレイ

RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて精製した。遺伝子発現は Mouse Whole Genome Ver. 2.0 arrays (G4846A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて実施され、Feature Extraction software version 9.5.1 及び Genespring GX software, Version 12.6 (Agilent Technologies)を用いて測定及び解析を実施した。

発現増加遺伝子リストは、コントロール細胞との比較で発現比が増加した遺伝子の順に表示した。1 つの遺伝子に対して複数のプローブが存在した場合はより発現比の増加が大

きかったプローブの値を採用した。

In vitro 好酸球遊走アッセイ

BALB/c マウスに 10 倍希釈したブタクサ花粉抽出物(Torii Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を 0, 1, 6, 8, 14 日のタイムコースで皮下投与し、20 日目に 10 倍希釈したブタクサ花粉抽出物を腹腔内に投与した。腹腔内投与 48 時間後に腹水を採取し、Thy1.2 及び B220 MACS beads でネガティブセレクションすることで好酸球細胞を精製した。CCL24 及びマクロファージ上清に対する好酸球の浸潤評価は、ChemoTx System (106-5, NeuroProbe, Gaithersbur, MD, USA)を kit のプロトコルに従い実施した。簡潔に示すと、CCL24 もしくは M ϕ 上清を 10 μ g/ml IgG もしくは抗 CCL24 抗体(MAB528, R&D Systems)とともに ChemoTx System の下部チャンバーに加えた。好酸球(1×10^6 cells/mL)を 1%BSA 入りの RPMI1640 で懸濁し上部チャンバーにゆっくりと添加し、37°C 5% CO₂ 条件で培養した。細胞の下部チャンバーへの遊走は、Celltiter Glo (Promega, Madison, WI, USA)を用いて定量した。

In vivo マクロファージ移入

PBS (Vehicle control), 10ng/mL IL-4, 10ng/mL IL-10 及び IL-4+IL-10 で存在下 24 時間培養したマクロファージを 1 μ M 5-chloromethyl fluorescein diacetate (CMFDA; Life Technologies) 30 分暴露することで標識し C57BL/6J マウスに腹腔内投与した。投与 12 時間後に腹水を回収し FACS 解析を実施した。

統計解析

得られたデータは Student's t-test で有意差検討を実施、有意差については、下記の表示をした(*; $P \leq 0.05$, **; $P \leq 0.01$ 及び***; $P \leq 0.001$)

3-3 結果

BMDM での IL-10 刺激による IL-4R α 発現誘導

M2 マクロファージの遺伝子発現レベルでの特徴を明らかにするために M-CSF 誘導 BMDM を LPS+IFN γ 、IL-4, IL-1 β , IL-10 もしくは TGF β で 24 時間刺激しマイクロアレイにて発現解析を実施した。各種刺激で特徴的な遺伝子発現について解析を行ったところ、IL-10 刺激特異的に IL-4R α の遺伝子発現上昇が観察された(表 1)。そこで、マイクロアレイデータで観察された IL-4R α 発現について Realtime PCR を用いて IL-4R α の遺伝子発現を解析した。また、タンパクレベルでの発現は FACS を用いて解析した。その結果、IL-10 添加量依存的に IL-4R α が遺伝子レベル及びタンパク発現レベルで観察された(図 2A-C)。

この結果については、先行の報告においても IL-10 刺激により IL-4R α の発現が上昇するという同様の結果が得られている(Biswas et al., 2011, Sica et al., 2007)。ただし、先行の報告では、IL-10 刺激で IL-4R α が発現上昇している条件で IL-4 刺激をした時のマクロファージの特徴及びその機能については解析がなされていなかった。そこで、我々は、IL-4 単独刺激及び IL-10 単独刺激と比べて IL-4+IL-10 刺激で誘導されるマクロファージでは、新たな特徴を有するのではないかと仮説のもと検討を実施した。

IL-4+IL-10 刺激した BMDM での M2aM ϕ 関連遺伝子の発現促進

M2aM ϕ 分化には IL-4-IL-4R α の相互作用が重要であると考えられている。また、上記のように IL-10 刺激で IL-4R α の発現上昇が観察されたことから、IL-10 刺激により M2aM ϕ 関連遺伝子の発現が増強するかどうかを検討した。コントロール BMDM、IL-4, IL-10 及び IL-4+IL-10 で刺激した BMDM のマイクロアレイ解析を実施した。Principal component analysis により各種刺激した BMDM の遺伝子発現プロファイルは互いに異なることが示唆された(図 3A)。IL-4 刺激した BMDM と IL-4+IL-10 刺激した M ϕ はコントロール BMDM と比較して顕著に増加する遺伝子は重複していることが示された(図 3B)。

さらにマイクロアレイデータの M2aM ϕ 関連遺伝子の発現変動を解析したところ、コントロール BMDM と比較して IL-4+IL-10 刺激した BMDM で発現増加の大きかった 25 遺伝子のうち 13 遺伝子は IL-4 刺激 BMDM での最も発現増加の大きかった 25 遺伝子に含まれていた(表 2)。上記の 13 遺伝子の中には、M2aM ϕ でマーカーとして用いられる *retlna*, *Arg1* 及び *Chi3l3* などが含まれていた。その他、*CCL8*, *CCL22* 及び *CCL24* は、IL-4 単独の刺激で発現上昇するものの、IL-4+IL-10 刺激では更なる発現上昇が観察され

た。一方、CCL17 は、IL-4 単独刺激での発現上昇と比較して IL-4+IL-10 刺激での更なる発現上昇は観察されなかった。

M2aM ϕ マーカーとしてよく用いられる Arg1, Retnla 及び Mrc1 は、リアルタイム PCR の結果でもマイクロアレイデータと同様に IL-4 単独刺激で発現が増加し、IL-4+IL-10 刺激で更なる発現上昇が観察された(図 4A-C)。CD206 (Mrc1)については、タンパクレベルでも同様の傾向が観察された(図 4D, 3E)。

これらの結果から、IL-4 と IL-10 は相乗的に M2aM ϕ 関連遺伝子の発現を上昇させることが示唆された。

様々な M ϕ に対する IL-4+IL-10 刺激による CCL24 及び Arg1 の発現促進

CCL24 は、BMDM で IL-4 単独刺激及び IL-10 単独刺激と比較して IL-4+IL-10 刺激により顕著に発現上昇が観察された(表 2、図 4A)。また、CCL24 の産生量を ELISA にて測定したところ、CCL24 はタンパクレベルにおいても IL-4+IL-10 刺激により顕著な産生量増加が観察された(図 5B)。

この IL-4 と IL-10 の相乗作用が M-CSF で誘導した BMDM 特異的な作用なのか、他の M ϕ でも同様の作用が認められるかを明らかにするために GM-CSF で誘導した BMDM、腹腔 M ϕ 、チオグリコレート誘発 M ϕ 及びザイモサン誘発 M ϕ においても同様の傾向が観察されるかを検討した。CCL24 の発現上昇は、M-CSF で誘導した BMDM だけでなく由来の異なる M ϕ でも同様に IL-4+IL-10 で発現上昇が観察された(図 5C, 5D)。また、M-CSF で誘導した BMDM だけでなく由来の異なる M ϕ でも同様に IL-4+IL-10 で M2aM ϕ 関連遺伝子の Arg1 発現上昇が観察された(図 5E, 5F)。

これらの結果から、IL-4+IL-10 刺激の相乗的な M2aM ϕ 関連遺伝子の発現上昇は、M-CSF 誘発の BMDM に限られた現象ではなく、異なる由来の M ϕ に対しても同様の作用を有することが示唆された。

IL-4+IL-10 刺激した BMDM 上清による in vitro 好酸球浸潤促進作用

IL-4+IL-10 刺激した BMDM で CCL24 の産生が顕著であることから、CCL24 を介した生理機能への M2aM ϕ の関与を検討した。CCL24 は、CCR3 に結合し好酸球の浸潤を促進するケモカインであることが知られている(Pope et al., 2005, Sddiqui et al., 2013)。実際 CCL24 添加により濃度依存的な好酸球浸潤促進作用が観察された(EC50=10ng/ml)(図 6A)。BMDM を IL-4+IL-10 刺激した時に産生される CCL24 は約 10ng/ml 産生されることから、この上清により好酸球浸潤に影響を与える可能性があると

考え検討を進めた。

IL-4+IL-10 刺激した BMDM の上清を好酸球浸潤アッセイにて評価したところ、IL-4 単独刺激した BMDM の上清及び IL-10 単独刺激した BMDM の上清では、浸潤に影響をあたえないものの IL-4+IL-10 刺激した BMDM の上清を加えることで好酸球の浸潤促進が観察された(図 6B)。この好酸球浸潤促進作用が CCL24 を介した作用であることを明らかにするために抗 CCL24 抗体添加条件で評価をしたところ、上清により促進された好酸球浸潤促進が抗 CCL24 抗体添加により阻害された(図 6C)。また、M ϕ 刺激時に用いた IL-4, IL-10, IL-4+IL-10 による好酸球浸潤への作用は観察されなかった。これらのことから、IL-4+IL-10 刺激は、BMDM より CCL24 を大量に産生させることで好酸球浸潤促進作用を誘導することが示唆された。

IL-4+IL-10 刺激した BMDM の移入による in vivo 好酸球浸潤促進作用

これまでの検討で IL-4+IL-10 刺激した BMDM は、CCL24 を顕著に産生し好酸球浸潤促進作用を in vitro で示したことから、この細胞を in vivo に移入することで好酸球浸潤作用を有すると考え検討を行った。In vivo 作用を検討するために未刺激の BMDM, IL-4, IL-10 もしくは IL-4+IL-10 刺激した BMDM を CMFDA で標識し C57BL/6J マウスの腹腔に移入した。好酸球浸潤のマーカーとして報告のある Siglec-F を用い(Feng et al., 2012, Satoh et al., 2010), monocyte/マクロファージマーカーとして CD115 を用いて、BMDM 移入 24 時間後に腹腔内に浸潤してくる細胞を解析した。Saline 投与群、コントロール BMDM 移入群、IL-4 刺激した BMDM 移入群、IL-10 刺激した BMDM 移入群と比較して、IL-4+IL-10 刺激した BMDM 移入群で Siglec-F⁺/CD115⁺ eosinophil のポピュレーションが細胞数、細胞割合ともに有意に増加することが観察された(図 7A, B, C)。一方で CD115⁺monocyte/M ϕ については、どの群においても有意な差は観察されなかった(図 6D, E)。また、どの群においても腹腔中の全細胞数に対する変化は観察されなかった(図 6F)。これらの結果から、IL-4 単独刺激もしくは IL-10 単独刺激した BMDM では有さない好酸球浸潤促進作用を IL-4+IL-10 刺激した BMDM は、in vivo においても有することが示唆された。

3-4 考察

本研究で IL-4 もしくは IL-10 単独の刺激と比較して IL-4+IL-10 刺激で相乗的にマクロファージにおいて M2aM ϕ 関連遺伝子増加が認められ、in vitro 及び in vivo で好酸球浸潤促進作用を有することを明らかにした。以前の報告では、IL-4 刺激した M2aM ϕ 及び IL-10 刺激した M2cM ϕ それぞれの研究がなされてきた(Stein et al., 1992, Martinez et al., 2006, Zhang et al., 2010)。それらの研究では、IL-4 刺激した M2aM ϕ は、Arg1 及び Retnla を高発現し寄生虫感染に関与し Th2 ケモカインの CCL17 及び CCL22 を産生することが示された(Mantovani et al., 2004, Lacey et al., 2012, Kreider et al., 2007)。また、IL-10 刺激は STAT3 を介して IL-4Ra 発現上昇を誘導することが報告されていた(Biswas et al., 2011, Sica et al., 2007)。しかしながら、これらの研究では IL-4+IL-10 刺激による M2aM ϕ 関連遺伝子の発現変動について十分な検討がなされておらず、IL-4+IL-10 刺激の M ϕ フェノタイプにもたらす作用については未解明であった。

IL-10 刺激した M2cM ϕ での IL-4R α の発現上昇は、先行の報告と同様に我々の結果でも IL-10 刺激した M ϕ において IL-4R α の発現上昇がマイクロアレイでの解析において観察されるとともに、real time PCR 及び FACS での検討により遺伝子発現、タンパク発現ともに発現が観察された(Zhang et al., 2010)。IL-4 単独刺激もしくは IL-10 単独刺激した BMDM と比較して IL-4+IL-10 刺激した BMDM では、遺伝子発現パターンは異なるものの、IL-4+IL-10 刺激において IL-10 刺激は、IL-4 刺激した M ϕ で発現が上昇する Retnal, Arg1, Chi3l3, Mrc1 の発現上昇を促進している傾向であった。CCL24 及び CCL8 は、IL-4 単独刺激と比較して IL-4+IL-10 刺激の時に特に顕著に発現上昇が観察された。また、これらの作用は BMDM だけでなく腹腔 M ϕ 、チオグリコレート誘導 M ϕ 、ザイモサン誘導 M ϕ でも観察されたことから、IL-4+IL-10 刺激が様々な組織に存在するマクロファージのフェノタイプ変化についても重要な可能性が考えられる。

IL-4+IL-10 刺激した BMDM で CCL24 が特に発現上昇していた。また、CCL24 は CCR3 を介して好酸球浸潤を誘導することが知られている(Pope et al., 2005, Siddiqui et al., 2013)。これらのことから、IL-4+IL-10 刺激した BMDM の好酸球浸潤への作用を検討した。好酸球浸潤に関わるケモカインとしては、CCL24 以外にも CCL11, 26, lipid mediators (PGD2, PAF, LTB4, LTC4, LTD4, LTE4 が知られている(Sadik et al., 2012, Luna-Gomes et al., 2013)。これらの好酸球浸潤誘導因子の中で IL-4+IL-10 刺激した M ϕ のマイクロアレイデータにおいて高発現していたのは、CCL24 だけであった。実際に IL-4+IL-10 刺激した M ϕ の上清により観察された好酸球浸潤は、抗 CCL24 抗体により抑制されることから CCL24 が M ϕ の上清による好酸球浸潤促進に重要な因子であること

が示された。

生体内での組織常在型 M ϕ は、発生の由来が異なることが報告されている (Epelman S et al., 2014)。卵黄嚢、胎児肝臓及び骨髄から分化した組織常在型 M ϕ が正常時のホメオスタシスに関与すると考えられている。本研究で用いた M ϕ については、組織常在型の M ϕ と発生の由来が異なるため、正常組織での M ϕ の特徴及び機能を反映出来ない可能性がある。一方、炎症時には、造血幹細胞由来のモノサイト及びマクロファージが炎症部位に浸潤し炎症応答に関与することが示唆されている (Italiani P et al., 2014)。今回検討に用いた BMDM 及びザイモサン等で腹腔に誘導した M ϕ は、炎症時に浸潤してくる M ϕ に近い特徴を有していると考えられる。炎症時の *in vivo* M2M ϕ の解析としては、これまでに ovalbumin 誘発喘息モデルの肺泡マクロファージにおいて CCL24 及び CCL8 が高発現していることが報告されている (Siddiqui et al., 2013)。さらに CCL24 は、アレルギー応答での好酸球浸潤に重要であることが報告されている。また、CCL8 は CCR8 リガンドとして皮膚炎症での Th2 浸潤に関与していることが報告されている (Menzies-Gow et al., 2002, Raderinger et al., 2004)。これらのことから、*in vivo* において M2M ϕ は局所への好酸球及び Th2 浸潤に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。しかしながら、これらの研究では M2M ϕ を単離して *in vitro* での好酸球浸潤作用を有するもしくは *in vivo* への M2M ϕ の移入による好酸球浸潤作用を有するかなどの検討をしておらず、M2M ϕ の直接的な好酸球浸潤への作用の重要性については明らかとなっていなかった。本研究では、IL-4+IL-10 刺激した M ϕ を腹腔に移入することで腹腔内への好酸球浸潤が誘導された。このことから、IL-4+IL-10 刺激した M ϕ は直接的に好酸球浸潤に関与していることが示唆された。

最近の報告では、IL-10 は抗炎症性サイトカインとしての報告が多いが (Hutchins et al., 2013)、もともとは Th2 サイトカインとして報告されていた (Fiorentino et al., 1989)。いくつかの研究では IL-10 はアレルギーモデルを抑制することが報告されている (Faith et al., 2012, Fu et al., 2006)。一方で IL-10 がアレルギー疾患や寄生虫感染を誘導するとの報告もなされている (Laouini et al., 2003, Schopf et al., 2002)。これらの矛盾は IL-10 は DC 抑制を介して T 細胞活性化を抑制する作用と本研究で示したようなマクロファージを介して好酸球浸潤を誘導する両方の作用を有するためにアレルギーの状況に応じて抑制、促進両方の作用が観察されている可能性があると考えられる。

複数サイトカイン刺激という観点では、M2M ϕ 誘導に TSLP+IL-13 刺激により CCL24 産生及び好酸球浸潤を誘導するとの報告もなされている (Han et al., 2013)。しかしながら、*in vitro* で IL-13+TSLP 刺激した M ϕ での CCL24 産生及び好酸球浸潤についての検討は

なされていないため IL-13+TSLP の作用がマクロファージに対して直接的な作用かどうかは明らかとなっていない。また、IL-4+IL-33 刺激もまた M2aM ϕ を誘導し、CCL24 を高産生することが報告されている(Kurowska-Stolarska et al., 2009)。本研究で検討した IL-4+IL-10 刺激した M2aM ϕ は in vivo M2aM ϕ マーカーとして用いられる CD206 の発現も上昇しているが、IL-4+IL-33 刺激したマクロファージでは CD206 の発現上昇は観察されなかった(data not shown)。これらの結果から、IL-4+IL-10 刺激した M2aM ϕ の方が IL-13+IL-33 刺激した M2aM ϕ よりも生体での M2M ϕ により近いと考えられる。

本研究によりこれまでの単独のサイトカイン刺激の研究で認識されていなかった IL-4+IL-10 刺激で誘導される M ϕ による M2M ϕ のより顕著なマーカー発現上昇及び CCL24 の顕著な産生促進されるとともに好酸球浸潤誘導能を獲得するという新たな知見を得ることができた。今後、IL-4+IL-10 刺激した M2aM ϕ と in vivo アレルギー環境での M2M ϕ との同異を明らかにすることで、M2M ϕ の新たな制御メカニズムの解明及びそのメカニズムに着目したアレルギー疾患などへの創薬に繋がると考えられる。

3 — 5 参考文献

- Biswas, A., Bhattacharya, A., Kar, S., Das, P. K. 2011. Expression of IL-10-triggered STAT3-dependent IL-4R α is required for induction of arginase 1 in visceral leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 41:992.
- Breslin, W. L., Strohacker, K., Carpenter, K. C., Haviland, D. L., McFarlin, B. K. 2013. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *J. Immunol. Methods.* 390:1.
- Deng, B., Whling-Henricks, M., Villalta, S. A., Wang, Y., Tidball, J. G. 2012. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J. Immunol.* 189:3669.
- Edwards, J. P., Zhang, X., Mosser, D. M. 2009. The expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by regulatory macrophages. *J. Immunol.* 182:1929.
- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ, 2014, Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014 41:21.
- Faith, A., Singh, N., Farooque, S., Dimeloe, S., Richards, D. F., Lu, H., Roberts, D. et al. 2012. T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways. *Allergy.* 67:1007.
- Feng, Y. H., Mao, H. 2012. Expression and preliminary functional analysis of Siglec-F on mouse macrophages. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* 13:386.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., Mosmann, T. R. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081.
- Fleetwood, A. J. Lawrence, T., Hamilton, J. A. Cook, A. D. 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display

differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.* 178:5245.

Fu, C. L., Ye, Y. L., Lee, Y. L., Chiang, B. L. 2006. Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF-beta and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. *Respir. Res.* 7: 72.

Fujieda, Y., Manno, A., Hayashi, Y., Rhodes, N., Guo, L., Arita, M., Bamba, T., Fukusaki, E. 2013. Inflammation and resolution are associated with upregulation of fatty acid β -oxidation in Zymosan-induced peritonitis. *PLoS One.* 8:e66270.

Han, H., Headley, M. B., Xu, W., Comeau, M. R., Zhou, B., Ziegler, S. F. 2013. Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages. *J. Immunol.* 190:904.

Houser, B. L., Tilburgs, T., Hii, J., Nicotra, M. L., Strominger, J. L. 2011. Two unique human decidual macrophage populations. *J. Immunol.* 186: 2633.

Hutchins, A. P., Diez, D., Miranda-Saavedra, D. 2013. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct. Genomics.* 12:489.

Islam, S. A., Chang, D. S., Colvin, R. A., Byrne, M. H., McCully, M. L., Mosser, B., Lira, S. A. et al. 2011. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* 12:167.

Italiani P., Boraschi D. 2014, From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 17;5:514

Kharraz, Y., Guerra, J., Mann, C. J., Serrano, A. L., Muñoz-Cánoves P. 2013. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm.* 2013:491497.

- Kreider, T., Anthony, R. M., Urban, J. F. Jr. Gause, W. C. 2007. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 19:448.
- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C. J., Ying, S. Pitman, N., et al. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol.* 183:6469.
- Lacey, D. C., Achuthan, A., Fleetwood, A. J., Dinh, H., Roinotis, J., Scholz, G. M., Chang, M. W. et al. 2012. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J. Immunol.* 188:5752.
- Laouini, D., Alenius, H., Bryce, P., Oettgen, H., Tsitsikov, E., Geha, R. S. 2003. IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 112:1058.
- Luna-Gomes, T., Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C. 2013. Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. *Front. Pharmacol.* 4:27.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677.
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A. 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177:7303.
- McBride, J. M., Jung, T., de Vries, J. E., Aversa, G. 2002. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell. Immunol.* 215:162.
- Menzies-Gow, A., Ying, S., Sabroe, I., Stubbs, V. L., Soler, D., Williams, T. J., Kay, A. B. 2002. Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J. Immunol.* 169:2712.

- Mosser, D. M. 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73:209.
- Mosser, D. M. and Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8:958.
- Muller, U., Stenzel, W., Köhler, G., Werner, C., Polte, T., Hansen, G., Schütze, N. et al. 2007. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 179:5367.
- Navarro-Xavier, R. A., Newson, J., Silveira, V. L., Farrow, S. N., Gilroy, D. W., Bystrom, J. 2010. A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. *J. Immunol.* 184:1516.
- Sadik, C. D., Luster, A. D. 2012. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 91:207.
- Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T et al. 2010. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.* 11:936.
- Schopf, L. R., Hoffman, K. F., Cheever, A. W., Urban, J. F. Jr., Wynn, T. A. 2002. IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection. *J. Immunol.* 168:2383.
- Sica, A., Bronte, V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.* 117:1155.
- Siddiqui, S., Secor, E. R., JR., Silbart, L. K. 2013. Broncho-alveolar macrophages express chemokines associated with leukocyte migration in a mouse model of asthma. *Cell. Immunol.* 281:159.

- Svensson, J., Jenmalm, M. C., Matussek, A., Geffers, R., Berg, G., Ernerudh, J. 2011. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J. Immunol.* 187:3671.
- Pope, S. M. Zimmermann, N. Stringer, K. F. Karow, M. L. Rothenberg, M. E. 2005. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J. Immunol.* 175:5341.
- Radinger, M., Johansson, A. K., Sitkauskienė, B., Sjöstrand, M., Lotvall, J. 2004. Eotaxin-2 regulates newly produced and CD34 airway eosinophils after allergen exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:1109.
- Schebesch, C., Kodelja, V., Müller, C., Hakij, N., Bisson, S., Orfanos, C. E., Goerdts, S. 1997. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4⁺ T cells in vitro. *Immunology.* 92:478.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176:287.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomeras, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., Gordon, S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23:901.
- Zhang, S., Kim, C. C., Batra, S., McKerrow, J. H., Loke, P. 2010. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e648.

3-6 図表

図 1

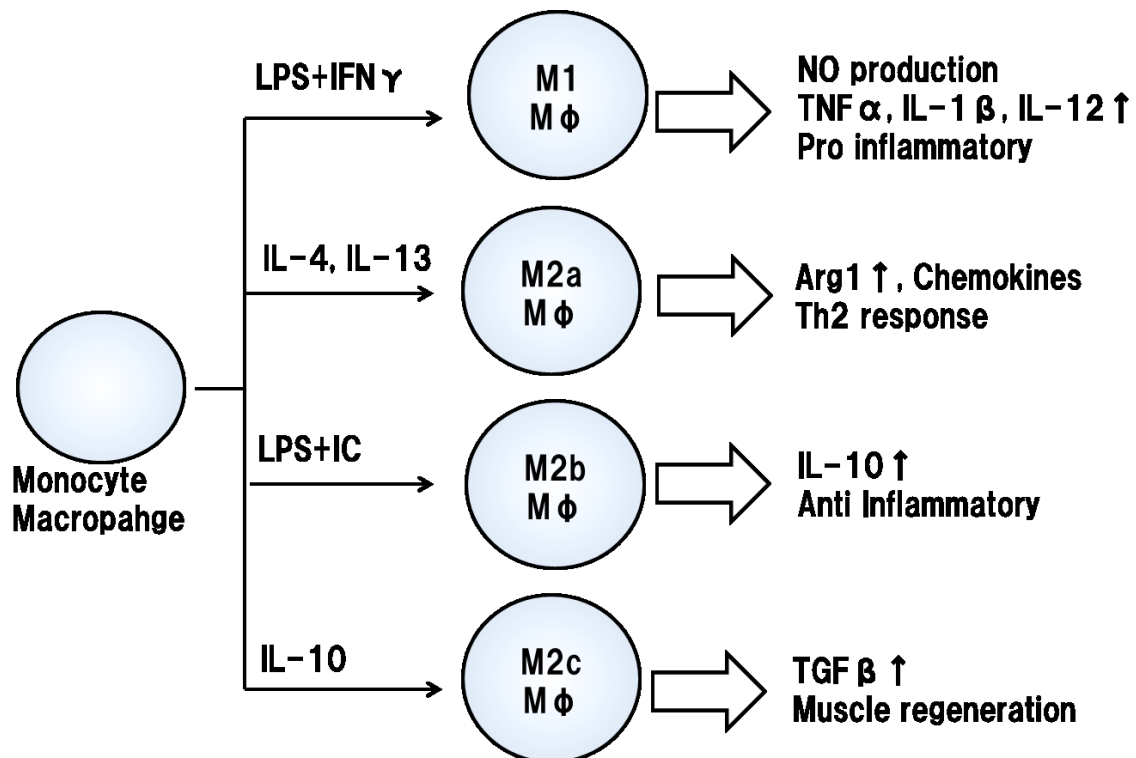


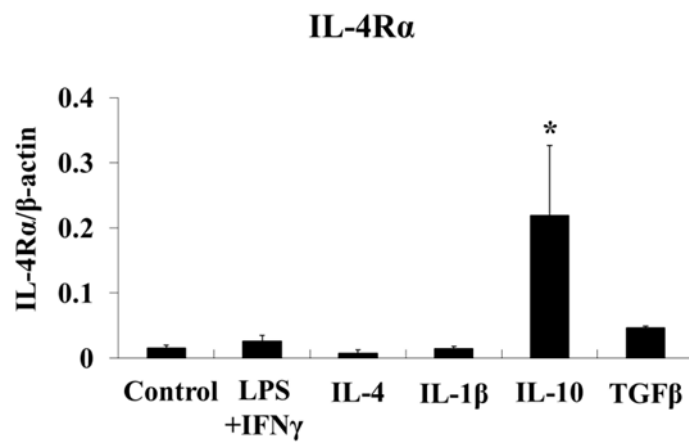
図 1

各種刺激による Mφ サブセットの誘導及びその機能。

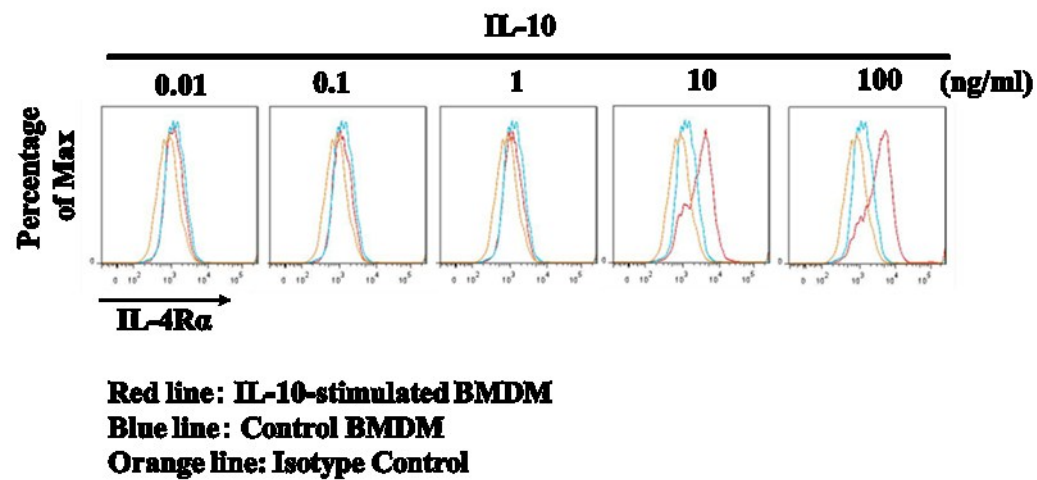
マクロファージは、M1Mφと M2Mφに分類される。M1Mφは、LPS 及び IFN γ 刺激により誘導され、inducible nitric oxide synthase を発現するとともに IL-12, TNF α などのサイトカインを産生し、炎症を惹起する。一方、M2Mφは、IL-4 もしくは IL-13 により誘導される M2aMφ、抗原抗体複合体と LPS により誘導される M2bMφ、IL-10 もしくはグルコルチコイドにより誘導される M2cMφに細分化される。M2aMφは、Arg1 などの顕著に発現上昇する遺伝子の他、CCL17, CCL22, CCL24 といった Th2 細胞及び好酸球浸潤に関与するケモカインを産生する。M2bMφは、抗炎症に関与する IL-10 を高産生する。M2cMφは、骨格筋の修復作用が知られている。

図 2

A



B



C

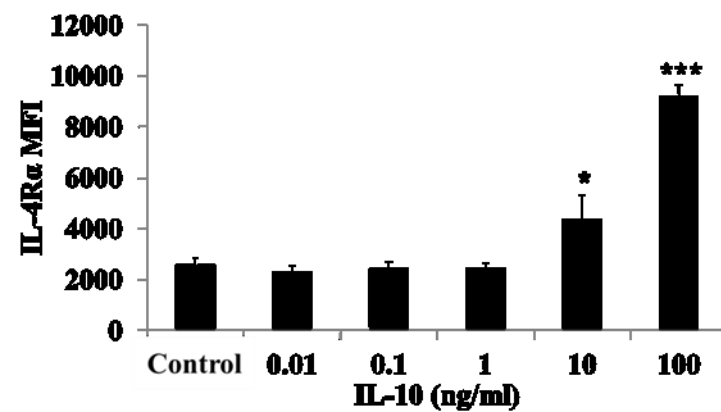


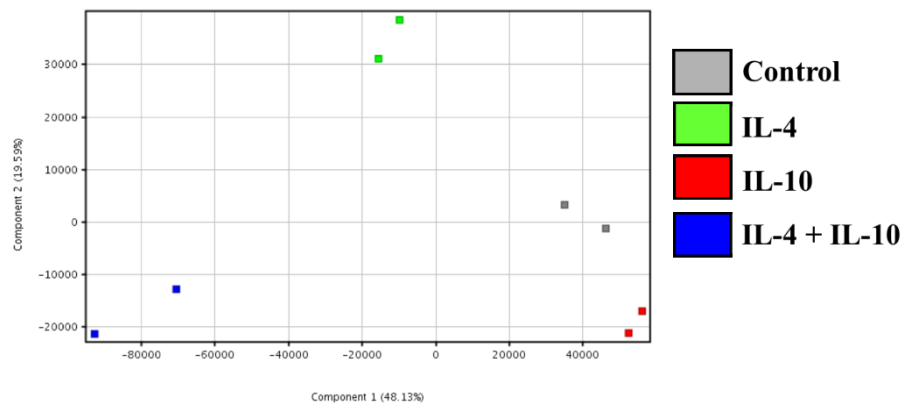
図 2

IL-10 刺激は BMDM の IL-4R α の発現を促進する。

LPS(10ng/mL)+IFN γ (50ng/mL), IL-4 (10ng/mL), IL-1 β (10ng/mL), IL-10 (10ng/mL)及び TGF β (10ng/mL)添加条件で BMDM を 24 時間刺激した。刺激した BMDM での IL-4R α の遺伝子発現を real-time PCR で測定した(A)。各種濃度の IL-10 (0.01-100ng/mL)で刺激した BMDM での IL-4R α のタンパクレベルでの発現はフローサイトメトリーで測定した(B)。IL-4R α の平均蛍光強度(mean fluorescence intensity, MFI)を棒グラフで示した(C)。各データは、平均値 \pm 標準偏差で示した(n=3)。コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(*P \leq 0.05 及び***P \leq 0.001)。

図 3

A



B

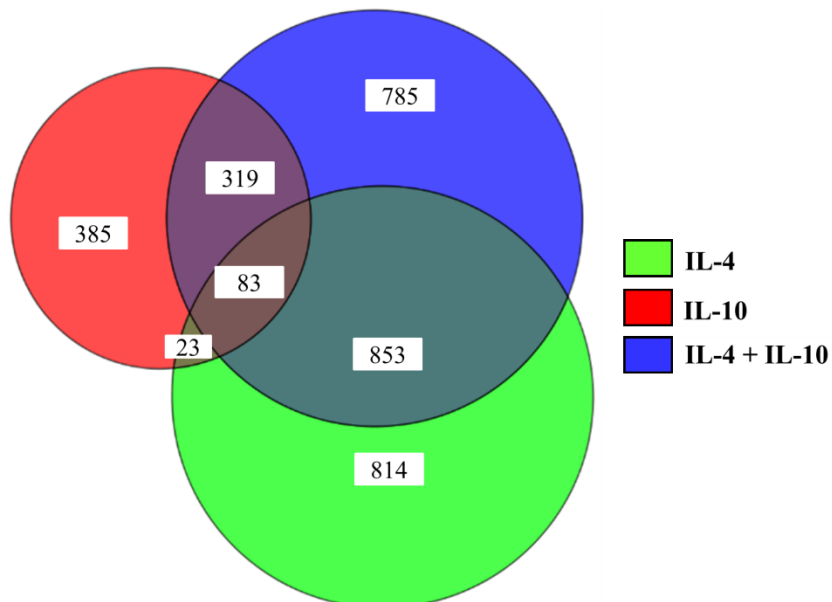


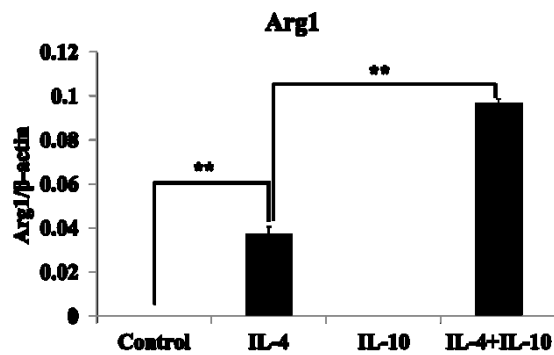
図 3

マクロファージサブセットのマイクロアレイ解析により各サブセット間で特徴的な遺伝子発現パターンが観察される。

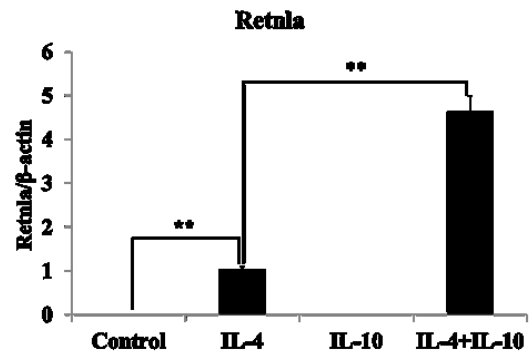
BMDM を Vehicle, IL-4 (10ng/mL), IL-10 (10ng/mL) 及び IL-4+IL-10 で 24 時間刺激した。刺激した BMDM より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を実施した。各サブセットでの遺伝子発現の傾向を解析するために Principal component analysis (PCA) を実施した。PCA により観察されたサブセット間の傾向をスキャッチャードプロットで示した (A)。コントロール BMDM と比較して 2 倍以上の変化があった遺伝子をベン図で示した (B)。ベン図中の数値は変動した遺伝数を示している。

図 4

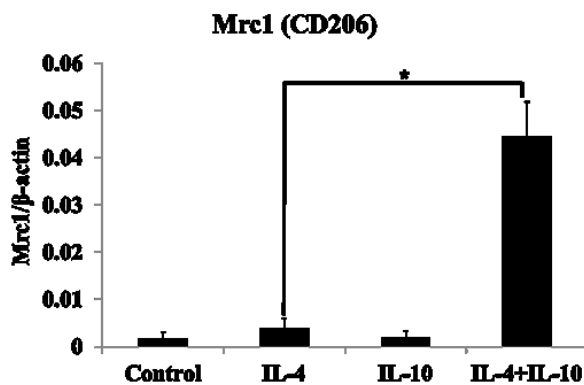
A



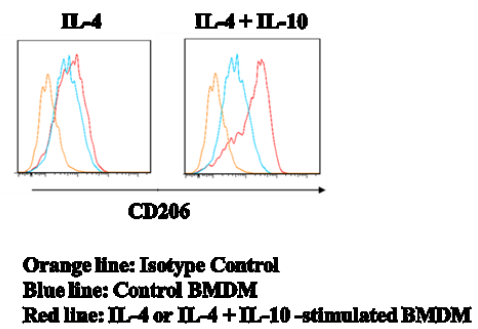
B



C



D



E

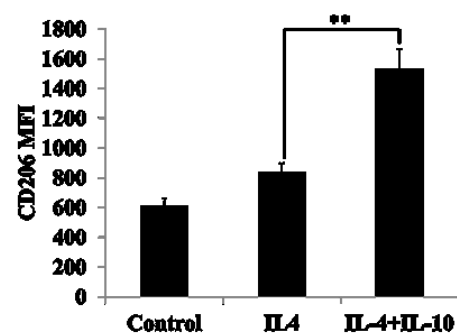


図 4

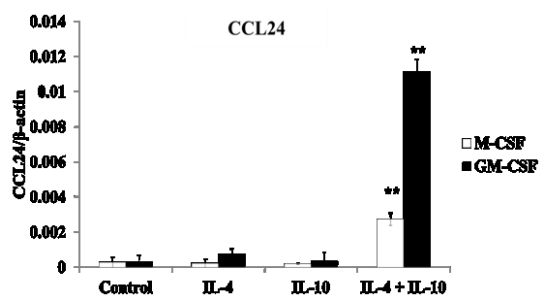
IL-10 刺激は IL-4 刺激した BMDM で発現が上昇する M2aM φ マーカー遺伝子の発現増加を促進する。

BMDM を Vehicle, IL-4 (10ng/mL), IL-10 (ng/mL) 及び IL-4+IL-10 で 24 時間刺激した。刺激した BMDM の M2aM φ マーカーの遺伝子発現を real-time PCR により定量した

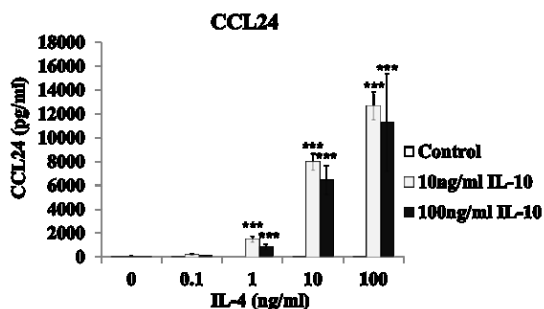
(Arg1(A), Retnla(B)及び Mrc1(C))。CD206 のタンパクレベルでの発現をフローサイトメーターで解析した(D)。各種処理した BMDM での IL-4R α の発現は下記の色で示した(アイソタイプコントロールをオレンジ、刺激無しのコントロール BMDM を青、IL-4 もしくは IL-4+IL-10 で刺激した BMDM を赤)。CD206 の MFI を棒グラフで示した(E)。各データは、平均値 \pm 標準偏差で示した(n=3-4)。コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(*P \leq 0.05 及び**P \leq 0.01)。

図 5

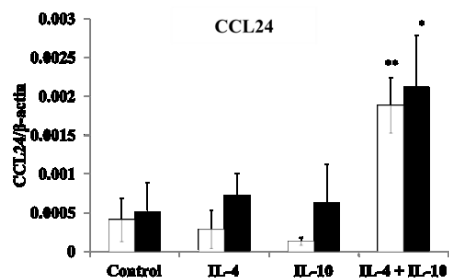
A



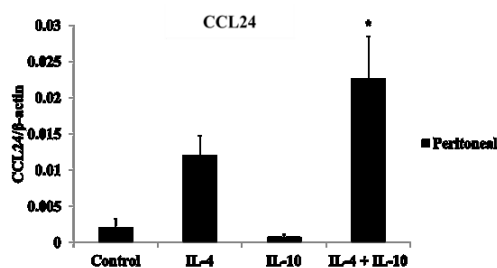
B



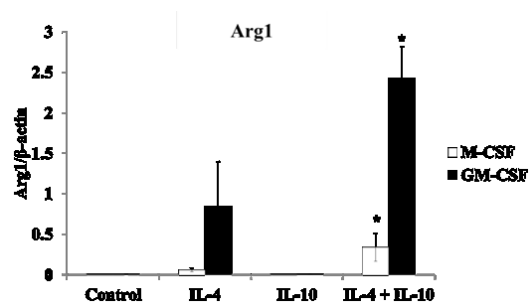
C



D



E



F

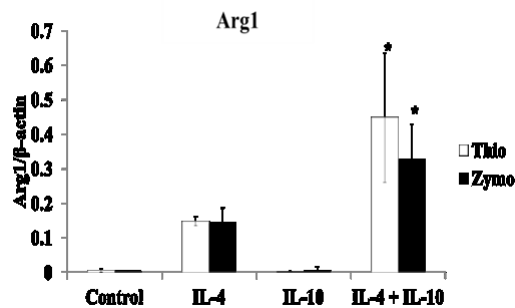


図 5

IL-10 刺激は IL-4 刺激した BMDM 及び腹腔マクロファージでの CCL24 及び Arg1 発現増加を促進する。

各種マクロファージを Vehicle, IL-4 (10ng/mL), IL-10 (ng/mL)及び IL-4+IL-10 で 24 時間刺激(遺伝子発現用)及び 72 時間刺激(CCL24 産生用)した。刺激したマクロファージの CCL24及び Arg1 の遺伝子発現を real-time PCR により定量した。培養上清中の CCL24 は、ELISA を定量した。

各グラフは、下記の細胞を用いた検討結果を示した。

M-CSF 誘導 BMDM(M-CSF)及び GM-CSF 誘導 BMDM(GM-CSF)での CCL24,及び

Arg1 の遺伝子発現(A, B)。

M-CSF 誘導 BMDM での上清中の CCL24 産生量(B)。

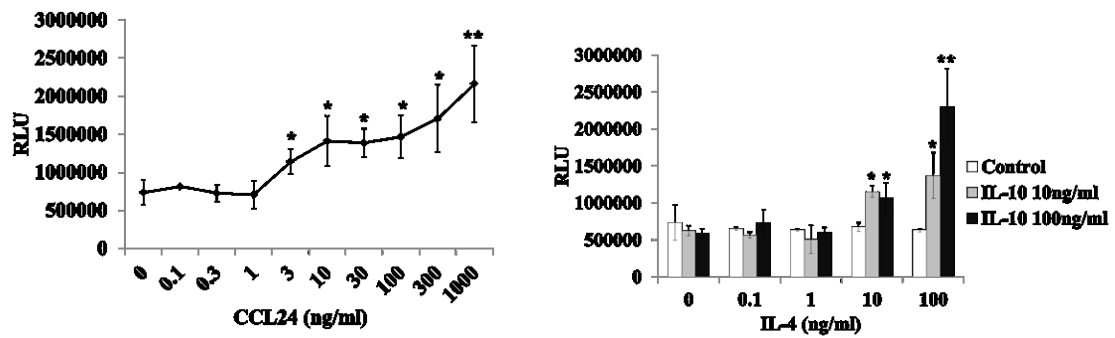
チオグリコレート誘導マクロファージ(Thio)及びザイモサン誘導マクロファージ(Zymo)での CCL24 及び Arg1 の遺伝子発現(C, E)。

腹腔マクロファージ(Peritoneal)での CCL24 遺伝子発現(D)。

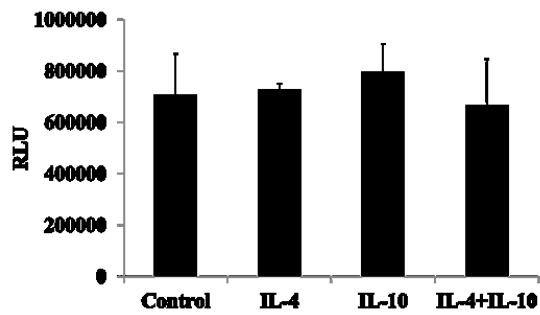
各データは、平均値±標準偏差で示した(n=3-4)。コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 及び*** $P \leq 0.001$)。

図 6

A



C



D

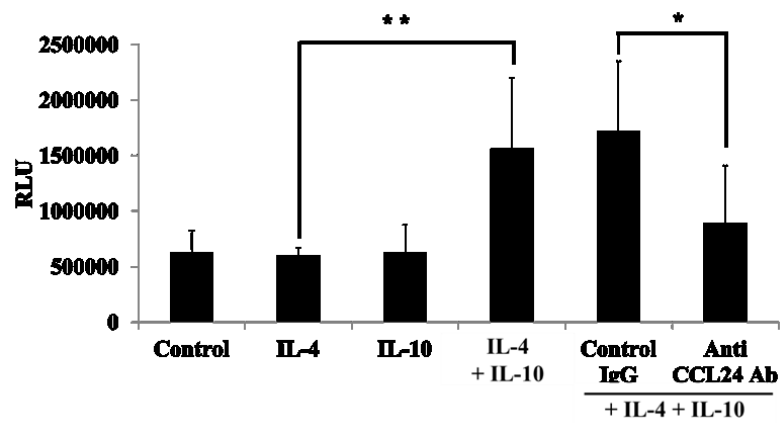


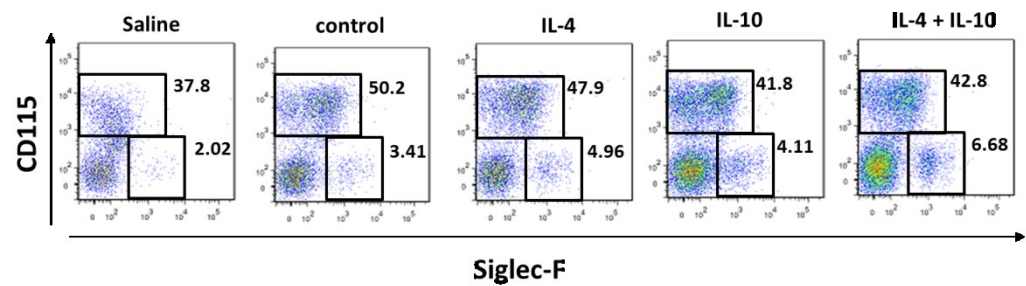
図 6

IL-4+IL-10 刺激した BMDM は、in vitro で好酸球遊走を促進する。

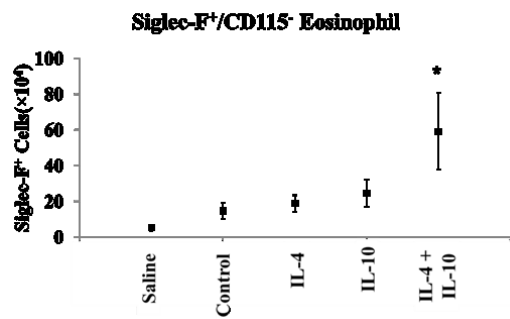
アッセイに用いた好酸球は、ブタクサ花粉誘発腹膜炎モデルマウスの腹水を Thy1.2 及

び B220 microbeads で T 細胞及び B 細胞を除くことで調製した。好酸球はケモタキシスチャンバーの上部に添加した。CCL24 (A)及び IL-4, IL-10, IL-4+IL-10 刺激した BMDM の上清(B)、BMDM 上清にアイソタイプ抗体もしくは抗 CCL24 抗体を添加した上清(C)、サイトカイン単独(10ng/mL IL-4, IL-10, IL-4+IL-10)(D)は、チャンバーの下部に添加した。1 時間培養後遊走した好酸球は、Celltiter Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて定量した。グラフの Y 軸は relative luminescence unit (RLU)を示し、好酸球の生細胞数を反映している。各データは、平均値±標準偏差で示した(n=3-4)。コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(* $P \leq 0.05$ 及び ** $P \leq 0.01$)。

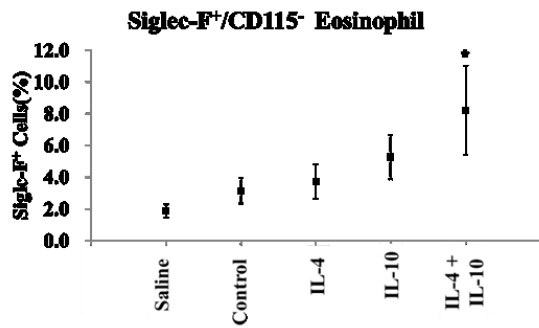
7
A



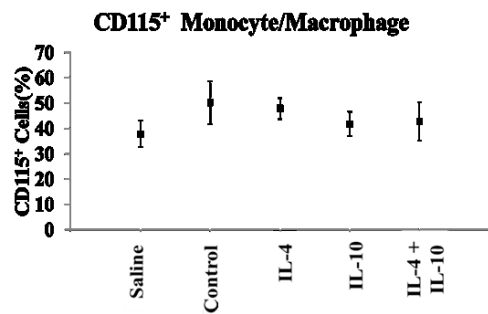
B



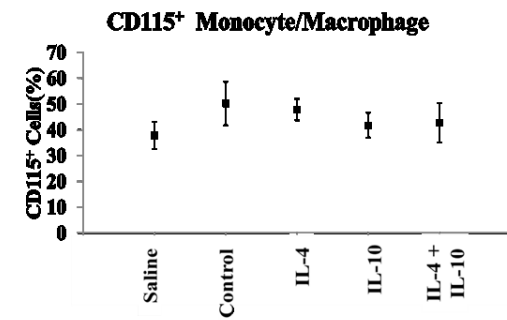
C



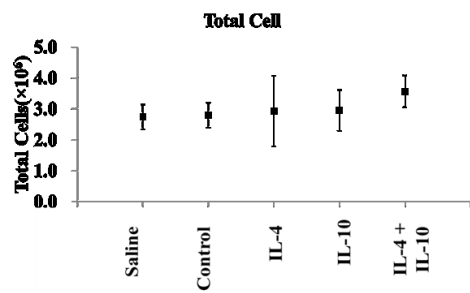
D



E



F



7

IL-4+IL-10 刺激した BMDM の腹腔への移入により腹腔への好酸球浸潤が増加する。

Vehicle (Control), IL-4, IL-10, IL-4+IL-10 で 24 時間刺激した BMDM を CMFDA でラベルし C57BL/6J マウスの腹腔に移入した。24 時間後腹水を回収し FACS を用いて Siglec-F 及び CD115 の蛍光強度を解析した(A)。Siglec-F⁺/CD115⁺細胞のポピュレーション(B)、CD115⁺細胞のポピュレーション(C)を測定した。Siglec-F⁺/CD115⁺細胞の細胞数(D)、CD115⁺細胞の細胞数(E)をポピュレーションの割合及び腹腔中のトータル細胞数(F)より算出した。

プロット図(A)の数値は CD115⁺Siglec-F⁺ポピュレーション(上部)及び Siglec-F⁺CD115⁺ポピュレーション(下部)の%表示の値。各データは、平均値±標準偏差で示した(n=4-6)。コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(*P≤0.05)。

図 8

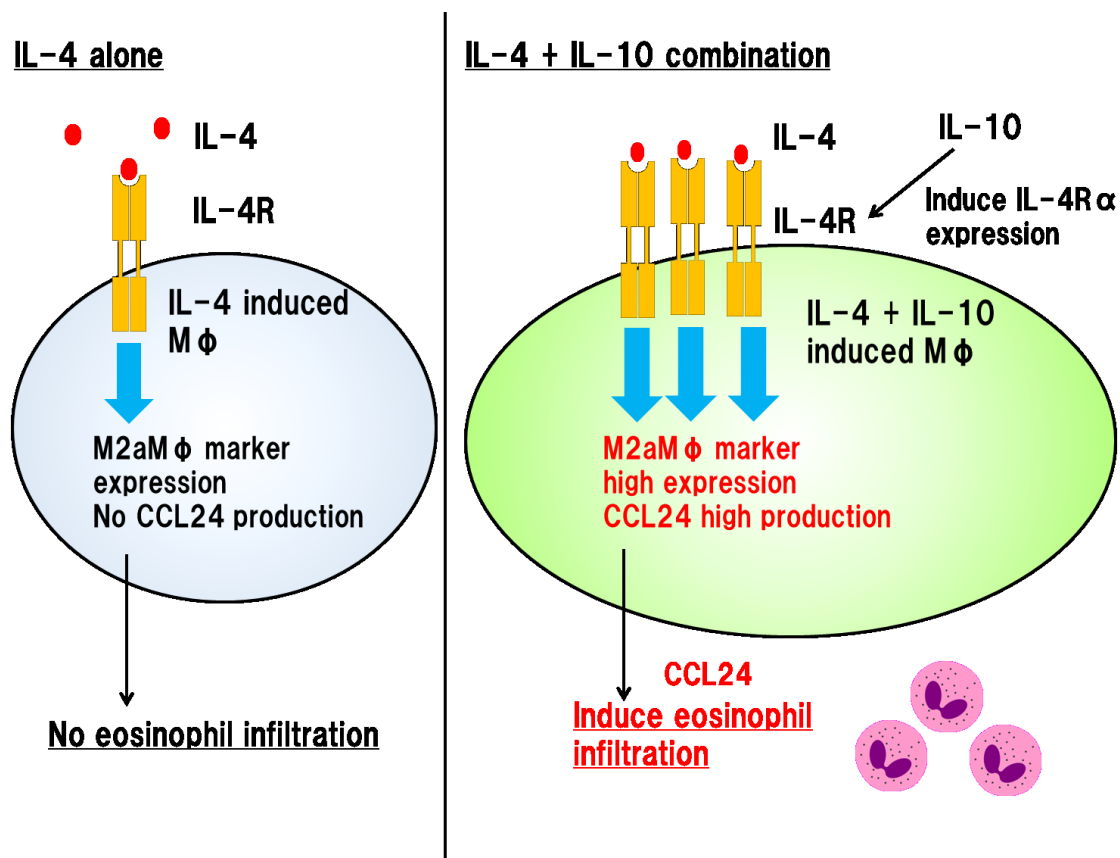


図 8

IL-4 刺激で誘導した M2aMφ と IL-4+IL-10 刺激で誘導した M2aMφ のモデル図。

以上の結果より、我々は上記のモデルを提唱する。IL-4 添加により IL-4Ra を介して M2aMφ マーカーの発現が誘導されるものの十分な CCL24 産生は誘導されず、好酸球浸潤作用を有さない。一方、IL4+IL-10 添加により IL-10 刺激を介して IL-4Ra が高発現することで IL-4-IL-4Ra によるシグナルが顕著に誘導される。その結果、IL-4 単独と比べてより顕著な M2aMφ マーカーの発現上昇とともに CCL24 が高産生することを介して好酸球浸潤能を有すると考えられる。

表 1

IL-10 刺激した Mφ で高発現したトップ 10 遺伝子

Gene name	LPS + IFN γ	IL-4	IL-1 β	IL-10	TGF β 1
Saa3 (serum amyloid A 3)	8023.2	1.4	251.4	234.0	0.6
Lrg1 (leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1)	0.3	0.4	0.8	31.6	0.6
Flrt3 (fibronectin leucine rich transmembrane protein 3)	10.4	1.5	3.5	25.0	0.5
Nrg1 (neuregulin 1)	3.8	1.1	1.3	19.0	1.8
Tug1 (taurine upregulated gene 1)	2.3	1.0	1.2	17.8	0.5
IL4ra (IL-4 receptor alpha chain)	2.7	0.3	1.0	14.2	0.4
Socs3 (suppressor of cytokine signaling 3)	43.3	0.2	4.7	13.5	0.3
Gm7676 (Gm7676 predicted gene 7676)	14.4	0.1	1.1	12.6	0.1
Itfitm1 (interferon induced transmembrane protein 1)	14.0	0.1	1.1	12.5	0.1
Clec1b (C-type lectin domain family 1, member b)	2.4	0.3	0.8	11.1	0.4

表中の数字は未刺激のコントロールマクロファージに対する発現比を示した。.

表 2

IL-4+IL-10 刺激した Mφ で高発現したトップ 25 遺伝子

Gene name	IL10	IL-4	IL4 + IL10
Retnla (resistin like alpha)	96.0 [*]	10274.4 [*] *	34490.4
Ccl8 (chemokine (C-C motif) ligand 8)	16.4 [*]	8.4	4679.6
Edn1 (endothelin 1)	1.1	148.1 ^{**}	1526.4
Gm15056 (predicted gene 15056)	12.7 [*]	0.9	1498.5
Arg1 (arginase 1)	2.5	409.3 ^{**}	1388.5
Ccl24 (chemokine (C-C motif) ligand 24)	1.6	4.8	648.2
Scn3a (sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit)	0.8	29.2 ^{**}	643.4
Tuba8 (tubulin, alpha 8)	0.7	46.6 ^{**}	508.2
Pdcd1lg2 (programmed cell death 1 ligand 2)	2.2	41.9 ^{**}	495.9
Cdh1 (cadherin 1)	1.1	168.4 ^{**}	490.9
Ccl22 (chemokine (C-C motif) ligand 22)	0.6	95.4 ^{**}	382.2
Rbp4 (retinol binding protein 4, plasma)	0.4	11.6	275.2
Cd209e (CD209e antigen)	2.2	1.5	250.3
Car2 (carbonic anhydrase 2)	0.5	20.2	239.0
Cish (cytokine inducible SH2-containing protein)	1.5	64.9 ^{**}	207.1
LOC620515 (similar to Chitinase 3-like protein 3 precursor)	1.4	65.4 ^{**}	205.0
Ddx4 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4)	0.9	18.5	187.9
Ccl17 (chemokine (C-C motif) ligand 17)	0.6	326.9 ^{**}	181.9
Chi3l3 (chitinase 3-like 3)	1.5	93.9 ^{**}	173.8
Kif1a (kinesin family member 1A)	5.0	6.3	170.0
Slamf1 (signaling lymphocytic activation molecule family member 1)	0.8	5.1	159.1
Nrg1 (neuregulin 1)	107.7 [*]	3.1	142.9
Msx3 (msh homeobox 3)	0.9	7.6	137.9
Rasgrp1 (RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated))	2.0	15.0	121.1
Chi3l4 (chitinase 3-like 4)	0.8	30.9 ^{**}	120.8

表中の数値は、未刺激のコントロールマクロファージとの発現比を示した。

*; IL-10 刺激した Mφ で高発現したトップ 25 遺伝子に含まれた遺伝子

**; IL-4 刺激した Mφ で高発現したトップ 25 遺伝子に含まれた遺伝子

4. 第2章

**DCA による PDHK 非依存的な ROS 産生を
介した Treg 分化誘導及び Th17 分化抑制**

4-1 研究背景と目的

Th17 細胞及び Treg 細胞の機能及び制御メカニズムについて

T 細胞活性化により、T 細胞は静止状態から急速な増殖分化を経て免疫応答を促進もしくは抑制する T 細胞サブセットへと分化する(Zhu et al., 2010)。Th17 細胞及び Treg 細胞分化には共通の要素が必要とされる一方で Th17 細胞は免疫応答を促進し、Treg 細胞は免疫応答の抑制を示し、反対の機能を有する(Afzali et al., 2007)。Th17 細胞を含む免疫を促進に關与するエフェクター T 細胞と制御性 T 細胞は異物の排除を促しつつ、自己免疫疾患を誘導しないようにお互いにバランスをとっている。実際腸炎などの多くの自己免疫疾患はエフェクター T 細胞の増加もしくは制御性 T 細胞の減少による両細胞のバランスの異常が發症に關与することが示唆されている。Th17, Treg バランスを制御する因子として、最も研究が進んでいるのはサイトカインであり、Th17 分化には、IL-1 β , IL-23, IL-6 及び TGF β が關与している。一方、Treg 分化には、IL-2 及び TGF β が關与している。近年 T 細胞分化に対してサイトカインによる制御に加えて、細胞内代謝変化が T 細胞分化に影響をあたえていることが示唆されている(Buck et al., 2015)。特に Th17 細胞及び Treg 細胞では、細胞内代謝が大きく異なることが示唆されている(図 1)(Michalek et al., 2011)。Th17 細胞では、多くのグルコースを利用する解糖系が亢進することで細胞内でのエネルギー供給に關与している。一方、Treg 細胞では、脂質代謝が亢進し細胞内でのエネルギー供給に關与している(Shi et al., 2011)。これらのことから、Th17 細胞と Treg 細胞の代謝変化を制御することで分化バランスを改善し自己免疫疾患の治療に繋がる可能性が考えられる。

DCA の作用メカニズム及び本研究の位置づけについて

Dichloroacetate (DCA) は Glucose oxidation の重要な分子である Pyruvate dehydrogenase (PDH)を抑制する PDHK の阻害剤として知られている。また、DCA は多くのがんに対してがん増殖抑制作用が示唆されている(Chen et al., 2009)。これは、がん細胞が正常細胞と比べて解糖系に強く依存しているためと考えられている。PDHK ファミリーは、PDHK1-4 の 4 つの分子からなり、異なる発現パターンを示し、様々な機能に關与している(Sugden et al., 2003)。がん細胞での増殖に対して DCA は PDHK2 依存的に抑制作用を示す(Bonnet et al., 2007)。これらの DCA の効果は PDHK を阻害し PDH 活性を促進することで ROS 産生が増加し、アポトーシスを誘導していると考えられる。T 細胞分化にも細胞内代謝が關与していることが報告されており、DCA は炎症性サイトカイン産生を抑制し、Treg のマスター転写因子である Foxp3 の発現促進を in vitro 及び

in vivo にて有することが報告されている(Bian et al., 2009, Eleftheriadis et al., 2013)。しかしながら DCA の T 細胞分化に対する分子メカニズムはこれまでに明らかとなっていない。

最新の研究で shRNA を用いた PDHK1 knockdown により Th17 促進、Treg 抑制が誘導されることが報告されている(Gerriets et al., 2015)。しかし、この研究では、DCA 処理時に PDHK knockdown をした場合の検討がなされておらず DCA の作用が PDHK を介しているかを明らかとなっていない。そこで、本研究では、DCA のメカニズムを明らかにするために、DCA, PDHK 阻害薬、PDHK siRNA を用いた knockdown の手法を用いた。DCA による Treg 細胞分化及び Th17 細胞分化に対する検討に加え、DCA の作用メカニズムについて PDHK 及び ROS の関与についての検討も実施した。

4-2 材料と方法

リコンビナント PDHK 活性評価

PDH-PDHK 複合体を調製するために、0.05U/mL PDH (P7032, Sigma, St. Louis, USA)及び 1 μ g/mL PDHK1 (ab110359, Abcam, Cambridge, UK)もしくは 1 μ g/mL PDHK2 (ab110354, Abcam)を PDH バッファー(50mM MOPS (pH7) (GB61, Dojindo, Kumamoto, Japan)), 20mM K₂HPO₄ (164-04295, Wako, Tokyo, Japan), 60mM KCl, (163-03545, Wako), 2mM MgCl₂ (310-90361, Wako), 0.4mM EDTA (15575-020, Life Technologies, Carlsbad, USA), 0.2% Pluronic F-68 (24040-032, Life Technologies)及び 2mM Dithiothreitol (040-29223, wako)に混和した。PDH リン酸化の前に 16 μ L PDH バッファー及び 2 μ L 化合物(30 倍濃度)を 40 μ L PDH-PDHK 複合体に添加した。PDH リン酸化は 2 μ L 30 μ M ATP (final 1 μ M)を加えることで反応を開始し室温で 45 分反応させた。PDH 活性を測定するために 20 μ L 基質(5mM sodium pyruvate (11360070, Life Technologies), 5mM coenzyme A trisodium salt (035-14061, Wako), 12mM β -NAD⁺ (440500000, Oriental Yeast, Tokyo, Japan)及び 5mM thiamine pyrophosphate (C8754, Sigma)を反応液に添加し 1 時間反応させた。反応液中の NADH 量を示す 340nm の吸光度をプレートリーダー(Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)で測定した。

細胞内 PDHK 活性評価

マウス T 細胞株 EL4 細胞を 10⁶/well で 96 ウェルプレートに播種し、DCA (326-87772, Wako)もしくは AZD7545 (S7517, SELLECKCHEM, Houston, USA)を加え 2 時間 37°C で培養した。PDH リン酸化は、リン酸化 PDH ELISA Kit (ab115343, Abcam)を製品に添付のプロトコル通りに操作することで測定した。

使用動物

動物を使用した実験では、6-12 週齢の C57BL/6J マウスを使用した。全ての実験は、第一三共動物実験倫理委員会に承認のもと実施した(実験番号 A1501497)。

In vitro Treg, Th17 分化評価

ナイーブ CD4⁺T 細胞は、マウス脾臓細胞よりナイーブ CD4⁺T 細胞単離キット (130-104-453, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて単離した。ナイーブ CD4⁺T 細胞は、10%FBS, 1%ペニシリンストレプトマイシン及び 55 μ M β メルカプトエ

タノール入りの RPMI1640 培地中に 5×10^4 cells/well で播種し、anti CD3 CD28 dynabeads (11452D, Gibco, Carlsbad, USA)を用いて刺激した。さらに下記のサイトカインを加えることで T 細胞分化を誘導した。

Treg: 10ng/mL IL-2 及び 10ng/mL TGF β

Th17: 100ng/mL IL-6, 2.5ng/mL TGF β , 10ng/mL IL-1 β 及び 10ng/mL IL-23

刺激 5 日後に Treg 分化させた細胞は Foxp3 発現を指標に評価した。Th17 分化については、刺激 5 日後に上清を回収し、さらに 100ng/ml PMA (P1585, Sigma)及び 1μ g/mL ionomycin (I0634, Sigma)を用いて再刺激し上清を回収した。IL-17A 産生は、mouse IL-17A immunoassay kit (AL514C, Perkin Elmer, Waltham, USA)を用いて測定した。また、細胞毒性及び増殖の指標として Celltiter Glo (G7571, Promega, Madison, USA)を用いて測定した。サイトカインは peprotech (California, USA)より購入し使用した。各実験で細胞は 1-30mM DCA, 1μ M AZD7545 もしくは 1mM N-acetyl-L-cystein (NAC)存在下で培養した。

Foxp3 発現及び ROS 産生評価

細胞内 Foxp3 は、Foxp3 transcription factor staining buffer set (00-5523-00, eBioscience, San Diego, USA)及びAPC 標識した抗 Foxp3 抗体(17-5773-82, eBioscience)を用いて染色した。ROS 産生に関しては、Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Ab113851, Abcam)のプロトコルに従い DCFDA とともに 37°C 30 分間細胞を標識した。標識した細胞は、Vehicle, 10mM DCA, 1μ M AZD7545 及び 10mM DCA+ 1μ M AZD7545 存在下で 2 時間培養した。培養後の細胞は FACScant (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA)を用いて測定し、FlowJo (Ashland, USA)を用いて解析した。

Real time PCR

細胞は、RNeasy mini kit (74106, Qiagen, Hilden, Germany)を用いて total RNA を抽出した。逆転写は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 及び gDNA remover (FSQ-301, Toyobo, Osaka, Japan)を用いて実施した。Real time PCR は、Thunderbird probe qPCR mix (QPS-101, Toyobo)を用いて実施した。プライマー及びプローブについては、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)の下記のセットを用いた。

GAPDH (Mm01246556_m1), PDHK1 (Mm00554300_m1), PDHK2 (Mm00446681_m1), PDHK3 (Mm0045220_m1), PDHK4 (Mm01166879_m1)

GAPDH の CT 値をもとに Δ CT 法により各サンプル中の遺伝子発現を発現比で算出した。

siRNA ノックダウン

PDHK1 及び PDHK3 のナイーブ CD4⁺T 細胞でのノックダウンは、ThermoFisher/Dharmacon 社のデザイン済み ACCELL siRNA を用いた (PDHK1, E-54066-00-0005, PDHK3, E-052920-00-0005)。ナイーブ CD4⁺T 細胞は、siRNA 及び 3%FBS 及び 55 μ M β メルカプトエタノールを含む ACCELL medium (Dharmacon) で Treg もしくは Th17 分化条件で 72 時間培養した。培養した細胞を回収後遺伝子発現及び Treg, Th17 分化を評価した。

統計解析

データについては、平均値±標準偏差で表示した。統計比較については、コントロールグループと被験グループの比較はダネットテストにて解析した。各グループ間での比較については、チューキーテストにて実施した。

4-3 結果

DCA による Treg 分化促進及び Th17 分化抑制

まず DCA の T 細胞分化への影響を検討した。Treg もしくは Th17 分化条件にて 1-30mM DCA の作用を検討した。その結果、コントロールと比較して DCA は顕著に Treg 分化誘導作用を示した(図 2A, 2B)。その作用は 3mM 以上で観察され、10mM で最大の Treg 分化誘導作用を示した。一方、DCA は Th17 分化条件での IL-17A 産生を抑制した(図 2C, 2D)。細胞増殖及び毒性の指標として Celltiter Glo を用いて ATP 量を評価すると 30mM DCA でのみ抑制する傾向が観察された(図 2E, 2F)。このことから 30mM DCA では、毒性作用を示す可能性があると考え、今後の検討は 10mM の濃度で検討することとした。

DCA 及び AZD7545 によるリコンビナント PDHK 及び細胞内 PDHK 活性阻害

DCA は PDHK として報告されている(Bonnet et al., 2007)。また、AZD7545 は、DCA と比較して活性の高い PDHK 阻害剤であることが報告されている(Kato et al., 2007)。DCA 及び AZD7545 の PDHK 阻害の活性を確認するためにリコンビナント PDHK1 及び PDHK2 活性を検討した。PDHK は PDH をリン酸化し PDHK 活性を阻害することが知られているため、化合物による PDHK 活性の阻害を評価するために PDHK 活性を評価した(Roche et al., 2001)。DCA 及び AZD7545 は PDHK 活性を用量依存的に抑制した(図 3A, 3B)。その阻害活性(IC₅₀)は、5.8mM (PDHK1)であり PDHK2 に対しては 10mM DCA で 33%阻害であった。AZD7545 の阻害活性(IC₅₀)は、38nM (PDHK1)及び 41nM (PDHK2)であった。

リコンビナント PDHK 阻害活性に加えて細胞内 PDHK 阻害活性を評価するために PDH リン酸化を検出した。DCA 及び AZD7545 は、細胞内 PDHK リン酸化活性も阻害した(図 3C)。その阻害活性は 10mM DCA 上で 70%阻害であり AZD7545 は 29nM (IC₅₀)を示した。これらの結果から AZD7545 は、DCA よりも活性の高い PDHK 阻害剤であることが示された。

DCA の PDHK 非依存的な Treg 分化誘導及び Th17 分化抑制

DCA は PDHK 阻害活性以外の作用も有することから、DCA の Treg 分化誘導及び Th17 分化抑制作用が PDHK 依存的かを明らかにするために、DCA 単独、AZD7545 単独及び DCA, AZD7545 併用での Treg 分化及び Th17 分化に対する作用を評価した。コントロールと比較して DCA は、Treg 分化誘導作用を示すものの AZD7545 は同様の作用を示さな

かった(図 4A, 4B)。また、DCA の Treg 分化誘導作用は、AZD7545 存在の有無に関わらず観察された。Th17 分化についても DCA は IL-17A 産生抑制作用を示すものの AZD7545 は抑制作用を示さなかった(図 4C, 4D)。また、DCA の Th17 分化抑制作用は、AZD7545 存在の有無に関わらず観察された。これらの効果は、ATP 量の変化は観察されないことから、細胞毒性及び増殖を介した作用ではないことが示唆された(図 4E, 4F)。

DCA の T 細胞分化への作用が PDHK を介しているかをより詳細に解析するために PDHK ノックダウン条件での T 細胞分化を検討した。PDHK1 から PDHK4 のうちどの分子が T 細胞分化に関与しているかの情報を得るためにそれぞれの遺伝子発現をナイーブ CD4⁺T 細胞、Th17 細胞及び Treg 細胞で評価したところ、PDHK1 及び PDHK3 が PDHK2 及び PDHK4 と比較して高発現していることが示唆された(図 5A)。この結果から、PDHK1 及び PDHK3 をノックダウンして検討することとした。PDHK1 siRNA 及び PDHK3 siRNA 存在下で PDHK1 及び PDHK3 のノックダウン効率を評価したところ、どちらも 60%以上のノックダウンが観察された(図 5B, 5C)。ノックダウン条件にて DCA の Treg 分化及び Th17 分化への作用を評価したところ、ノックダウンの有無に関わらず DCA による Treg 分化誘導及び Th17 抑制作用が観察された(図 5D, 5E, 5F)。これらの結果から DCA の効果は、PDHK 非依存的に Treg 及び Th17 分化に作用していることが示唆された。

DCA の ROS 産生誘導並びに ROS 依存的な Treg 分化誘導及び Th17 分化抑制

続いて DCA の Treg 分化誘導作用として、報告のある DCA の ROS 産生が関与していると考え検討を進めた。T 細胞からの ROS 産生を評価するために ROS 産生の指標である DCFDA で標識した Treg 及び Th17 細胞を DCA 及び AZD7545 存在下で 2 時間培養し ROS 産生を評価した。DCA は、ROS 産生を誘導する一方で AZD7545 はその作用を示さなかった(図 6A, 6B)。DCA の ROS 産生作用は、AZD7545 の有無による影響は観察されなかった。DCA の T 細胞分化への作用が ROS 産生依存的であるかを明らかにするために 1mM NAC (N-acetyl-L-cysteine, ROS inhibitor)存在下での Treg 及び Th17 分化への作用を検討した。DCA の Treg 分化誘導作用は NAC 存在下で阻害された(図 6C, 6D)。DCA の Th17 抑制作用も NAC 存在下で阻害された(図 6E, 6F)。これらの作用は、ATP 量の変化を伴わなかったことから、細胞毒性及び増殖非依存的であることが示された(図 6G, 6H)。これらの結果から、DCA の Treg 分化誘導及び Th17 抑制作用は ROS 産生を介した作用であることが示唆された。

4-4 考察

本研究で DCA は、Treg 誘導作用及び Th17 抑制作用を有することを示すとともにそれらの作用は、PDHK 非依存的であることを示した。また、DCA の T 細胞分化に対する作用は ROS 産生依存的な作用であることを示した(図 7)。

以前の研究では、DCA は PDHK 阻害を介して Treg 分化誘導及び Th17 抑制することが示唆されており、本研究とは矛盾が観察されている(Gerrets et al., 2015)。その研究では T 細胞及び抗原提示細胞の共培養条件で PDHK1 をノックダウンすることで T 細胞分化への作用を検討していた。このことから T 細胞ではなく抗原提示細胞を介した作用を評価している可能性が考えられる。本研究では、共培養ではなく T 細胞単独での Treg 分化及び Th17 分化の検討であることから T 細胞への影響をより直接的に評価できていると考えられる。また、先行研究と同様のノックダウン条件での検討に加えて、高活性の PDHK 阻害剤 AZD7545(IC₅₀≒40nM (PDHK protein), IC₅₀=29nM(細胞内 PHK 活性))を用いても DCA の作用は PDHK 非依存的であることを本研究では示した。よって DCA の T 細胞分化への作用は、PDHK 非依存的であるという確度の高いデータを取得できた。さらに DCA の T 細胞分化への作用が ROS 産生依存的な作用であることを ROS 阻害剤の NAC 存在下で評価することで示すことができた。

最新の研究では、DCA の他の作用として、細胞内代謝の解糖系に関連する HK2 及び Glut1 の発現を減少させる作用とともに T 細胞アポトーシス誘導作用が報告されている(Eleftheriadis et al., 2016)。この結果は、本研究の DCA は ATP 量に変化を与えないという結果と矛盾する。この結果の違いについては、使用した細胞種の違い(マウス、ヒト)及びアッセイ系の違い(T 細胞単独、MLR (T 細胞と抗原提示細胞の共培養))に由来すると考えられる。DCA の T 細胞直接への作用としては、本研究の方が正確に評価できていると考えられる。また、他の研究では、DCA は ROS 産生を介してがん細胞のアポトーシス及び細胞死を誘導することが報告されている(Haugrud et al., 2014, Lin et al., 2014, Gong et al., 2013)。こちらについては、T 細胞とがん細胞で細胞内代謝は異なっているため、DCA による作用で本研究の T 細胞では観察されないアポトーシス誘導ががん細胞では観察されたと考えられる。T 細胞分化については、これまでに ROS 阻害剤である NAC の検討を通じて ROS は Treg 分化及び Th17 分化に関与することが報告されている(Liang et al., 2012, Beier et al., 2015)。実際我々の研究でも DCA は ROS 産生を介して Treg 分化促進及び Th17 抑制作用を示した。

Treg 細胞及び Th17 細胞は複数の自己免疫疾患に関与していることが報告されている(Yang et al., 2014, Ling et al., 2011)。Th17 抑制を狙いとした創薬としては、Ror γ t,

IL-17, IL-23などが標的とされ乾癬治療薬もしくは開発薬として創薬応用がなされている (Tabarkiewicz et al., 2015)。Treg 誘導については、mTOR 阻害薬の開発が進んでいるが、T 細胞増殖抑制作用および免疫系以外への作用も有し副作用を有することが報告されている (Soliman et al., 2013)。mTOR 阻害以外にも様々なアプローチがとられているが、それらの研究は臨床試験まで進んでいない (Von Boehmer et al., 2013)。一方 DCA は T 細胞増殖に影響を与えず Treg, Th17 バランスを改善することが可能であり、DCA は乳酸アシドーシス及びがんを適応に臨床研究が進んでいる (Stacpoole et al., 2006, Zhang et al., 2015)。これらのことから DCA そのものも自己免疫疾患治療薬としてのポテンシャルを有する可能性がある。さらに DCA の ROS 産生を含む詳細なメカニズムが明らかになることで自己免疫疾患の創薬ターゲットの創出に繋がる可能性がある。

4 — 5 参考文献

Afzali B et al. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol. 2007 Apr;148(1):32-46.

Beier UH et al. FASEB J. Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3⁺ T-regulatory cell function and allograft survival. 2015 Jun;29(6):2315-26.

Bian L et al. Arthritis Res Ther. Dichloroacetate alleviates development of collagen II-induced arthritis in female DBA/1 mice. 2009;11(5):R132.

Bonnet S et al. Cancer Cell. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. 2007 Jan;11(1):37-51.

Buck MD et al. T cell metabolism drives immunity. J Exp Med. 2015 Aug 24;212(9):1345-60.

Chen Y et al. PLoS One. Oxygen Consumption Can Regulate the Growth of Tumors, a New Perspective on the Warburg Effect. 2009 Sep 15;4(9):e7033.

Eleftheriadis T et al. Dichloroacetate at therapeutic concentration alters glucose metabolism and induces regulatory T-cell differentiation in alloreactive human lymphocytes. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2013;24(4):271-6.

Eleftheriadis T et al. In human alloreactive CD4⁺ T-cells, dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis, induces apoptosis and favors differentiation towards the regulatory T-cell subset instead of effector T-cell subsets. Mol Med Rep. 2016 Apr;13(4):3370-6.

Gerriets VA et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation. J Clin Invest. 2015 Jan;125(1):194-207.

Gong F et al. Dichloroacetate induces protective autophagy in LoVo cells: involvement of cathepsin D/thioredoxin-like protein 1 and Akt-mTOR-mediated signaling. *Cell Death Dis.* 2013 Nov 7;4:e913.

Haugrud AB et al. Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Oct;147(3):539-50.

Kato M et al. Distinct Structural Mechanisms for Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoforms by AZD7545, Dichloroacetate, and Radicicol. *Structure.* 2007 Aug;15(8):992-1004.

Liang Zhi et al. Enhanced Th17 differentiation and aggravated arthritis in IEX-1-deficient mice by mitochondrial ROS-mediated signaling. *J Immunol.* 2012 Aug 15; 189(4): 1639–1647.

Lin G et al. *Br J Cancer.* Dichloroacetate induces autophagy in colorectal cancer cells and tumours. 2014 Jul 15;111(2):375-85.

Long SA, Buckner JH. CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol.* 2011 Sep 1;187(5):2061-6.

Michalek RD et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J Immunol.* 2011 Mar 15;186(6):3299-303.

Roche TE et al. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;70:33-75.

Shi LZ et al. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med.* 2011 Jul 4;208(7):1367-76.

Soliman GA. Nutrients. The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signaling in the immune responses. 2013 Jun 19;5(6):2231-57.

Stacpoole PW et al. Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. *Pediatrics*. 2006 May;117(5):1519-31.

Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 May;284(5):E855-62.

Tabarkiewicz J et al. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015 Dec;63(6):435-49.

Von Boehmer H, Daniel C. Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Jan;12(1):51-63.

Yang J et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Oct;35(10):493-500.

Zhang W et al. Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *Int J Biol Sci*. 2015 Nov 1;11(12):1390-400.

Zhu J et al. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.

4-6 図表

図 1

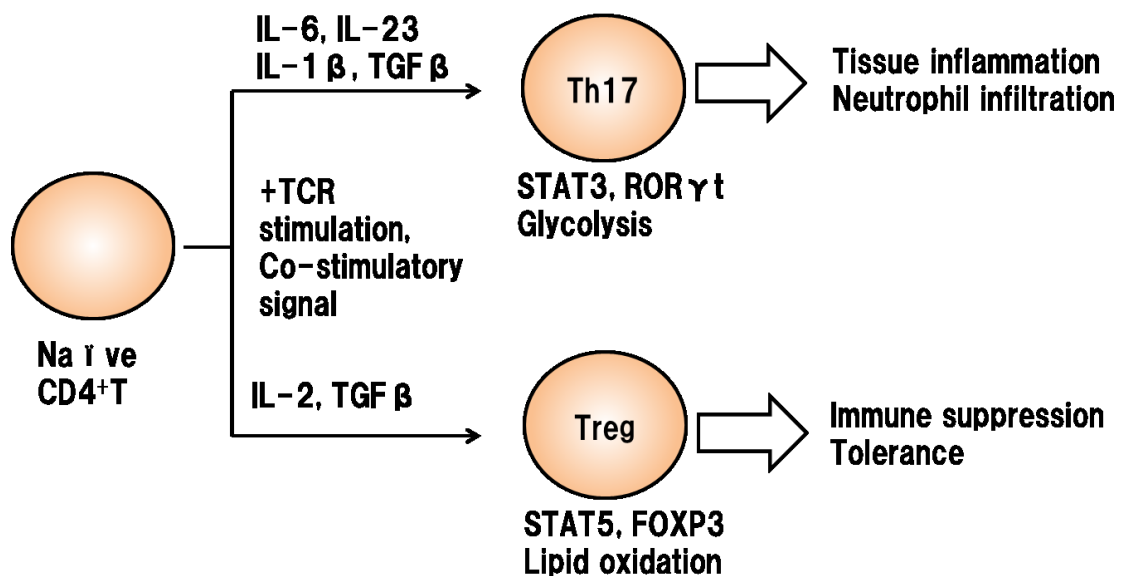


図 1

Th17 及び Treg 誘導及びその機能。

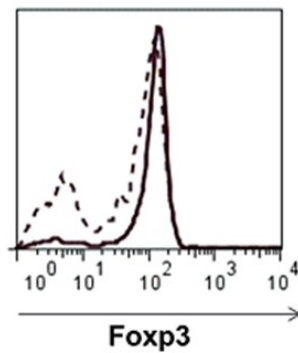
T 細胞は、Th1, Th2, Th17 及び Treg に分類される。本研究で着目した Th17 及び Treg は、誘導に必要なサイトカイン、転写因子及び細胞内代謝が異なり、その機能も異なっている。

Th17 細胞は、TCR 刺激及び CD28 などの共刺激に加え IL-1 β , IL-6, IL-23 及び TGF β などのサイトカイン刺激により誘導される。誘導に関与する転写因子として STAT3, ROR γ t などが知られており、その時の細胞内代謝は Glycolysis を利用することが示唆されている。また機能としては、IL-17 ファミリー及び IL-22 を産生し好中球などを誘導することで組織局所での炎症を促進する。

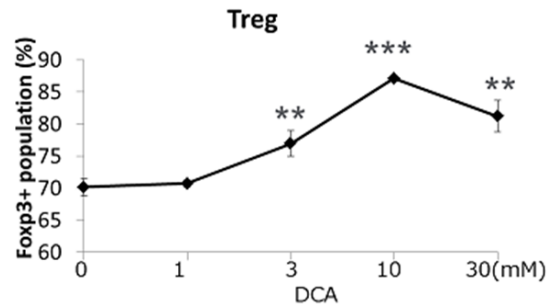
Treg 細胞は、TCR 刺激及び CD28 などの共刺激に加え IL-2 及び TGF β などのサイトカイン刺激により誘導される。誘導に関与する転写因子として STAT5, FOXP3 などが知られており、その時の細胞内代謝は Lipid oxidation を利用することが示唆されている。また機能としては、免疫抑制及び免疫寛容に関与する。

図 2

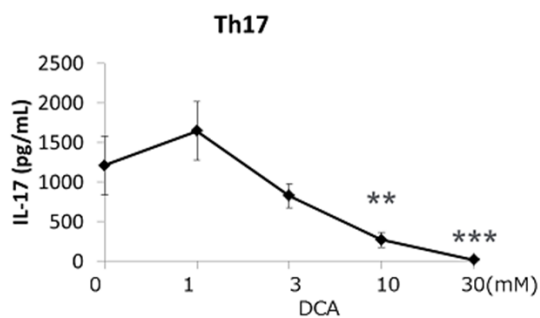
A



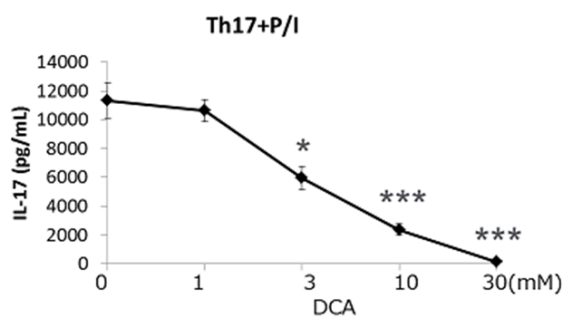
B



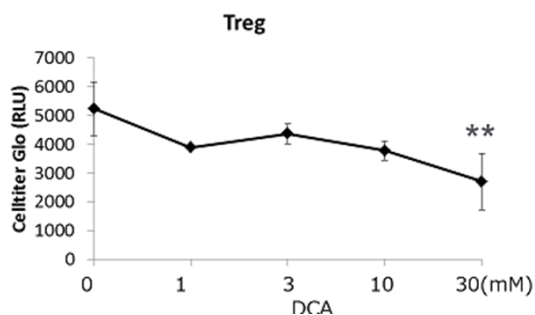
C



D



E



F

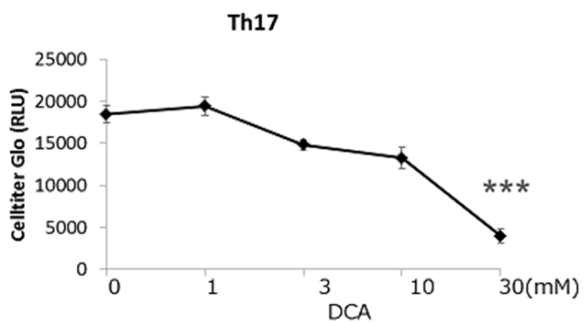


図 2

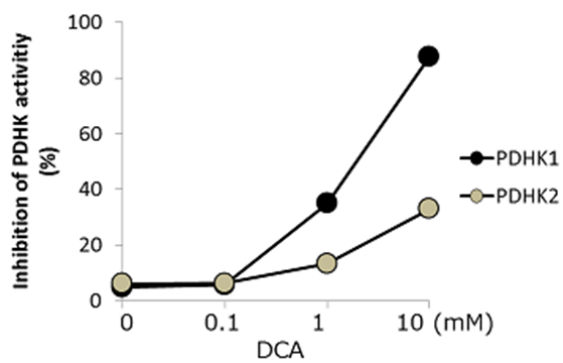
DCA は Treg 分化を誘導し、Th17 分化を抑制する。

ナイーブ CD4⁺T 細胞を 10ng/mL IL-2 及び 10ng/mL TGF β 存在下で Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 で 120 時間刺激することで Treg 分化を誘導した。DCA の作用を分化誘導時に溶媒, 1, 3, 10, 30mM DCA 存在下で評価した。Foxp3 の発現を FACS にて解析した(A, B)。ナイーブ CD4⁺T 細胞を 100ng/mL IL-6, 2.5ng/mL TGF β , 10ng/mL IL-1 β 及び 10ng/mL IL-23 存在下で Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28

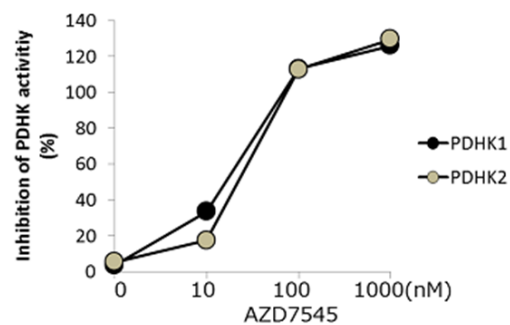
で 120 時間刺激することで Th17 分化を誘導した。120 時間後に上清を回収した。DCA の作用を分化誘導時に溶媒, 1, 3, 10, 30mM DCA 存在下で評価した。また、分化誘導後の細胞を 100ng/mL PMA 及び 1 μ g/mL ionomycin で再刺激し、その 24 時間後に上清を回収した。上清中の IL-17A を alphaLISA を用いて測定した(C, D)。細胞毒性及び増殖は、Celltiter Glo を用いて測定した(E, F)。ヒストグラム(A)は溶媒処理した細胞を点線で 10mM DCA 処理した細胞を実線で Treg 分化での Foxp3 の発現を表示した。各データは、平均値±標準偏差で示した(N=3)。溶媒コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(*P \leq 0.05、**P \leq 0.01 及び***P \leq 0.001)。

図 3

A



B



C

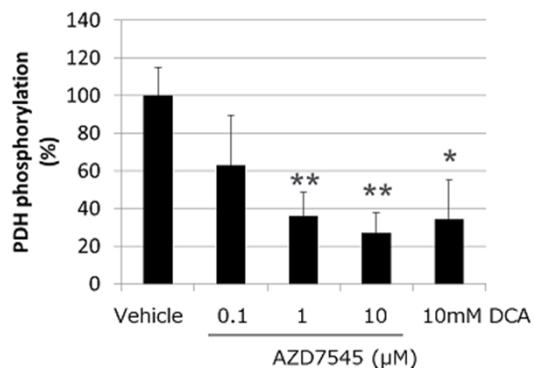


図 3

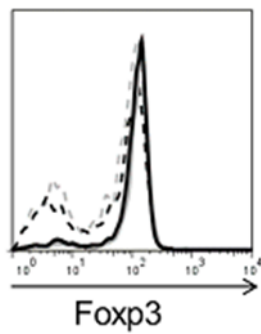
DCA 及び AZD7545 は PDHK1 及び PDHK2 活性を阻害する。

化合物存在下(溶媒、0.1, 1, 10mM DCA, 10, 100, 1000nM AZD7595)での PDHK1 及び PDHK2 の阻害活性は PDH 活性を指標に評価した(A, B)。グラフは、PDHK 添加無しでの PDH 活性を 100%、溶媒添加での PDH 活性を 0%として表示した。また、PDHK1 に対する阻害活性を黒色で PDHK2 に対する阻害活性を灰色で示した。EL4 細胞を化合物

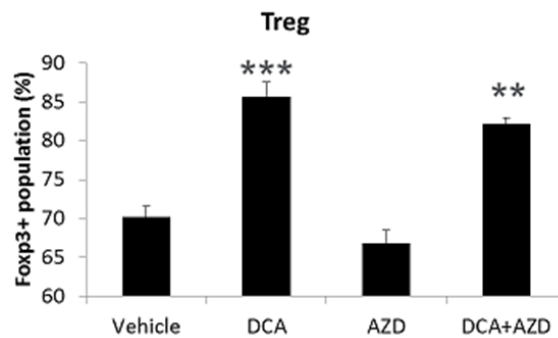
存在下(溶媒、0.1, 1, 10 μ M AZD7545 及び 10mM DCA)での細胞内 PDH リン酸化を評価キットで測定した(C)。グラフは、溶媒コントロールを 100%、細胞添加なしを 0%として表示した。各データは、平均値 \pm 標準偏差で示した(N=3)。溶媒コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(*P \leq 0.05、**P \leq 0.01 及び***P \leq 0.001)。

図 4

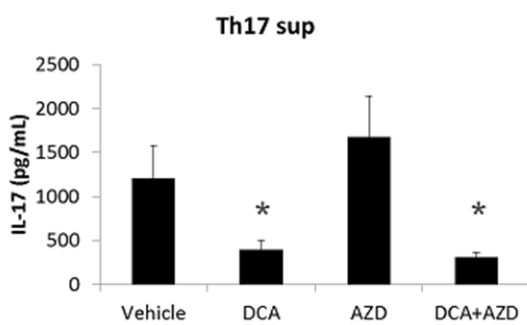
A



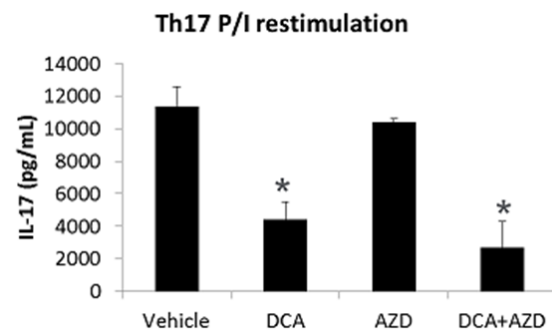
B



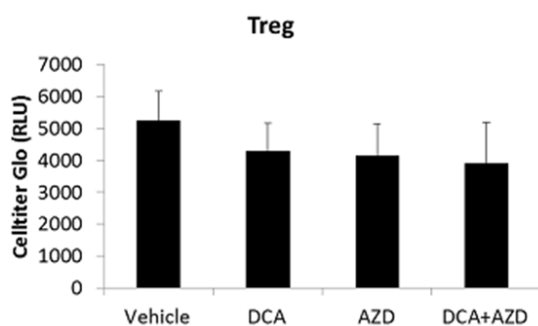
C



D



E



F

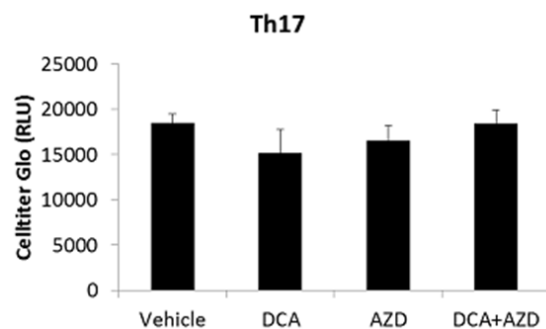


図 4

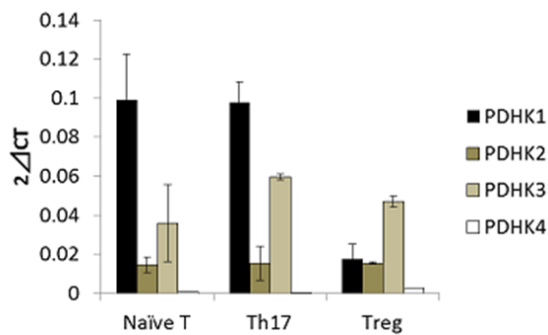
DCA は Treg 分化を誘導し、Th17 分化を抑制するが、AZD7545 は同様の作用を有さない。

ナイーブ CD4⁺T 細胞を溶媒、10mM DCA、1 μ M AZD7545 及び DCA+AZD 存在下で Treg 分化を誘導し化合物の作用を評価した。Foxp3 の発現を FACS にて解析した(A, B)。ナイーブ CD4⁺T 細胞を溶媒、10mM DCA、1 μ M AZD7545 及び DCA+AZD 存在下で Th17

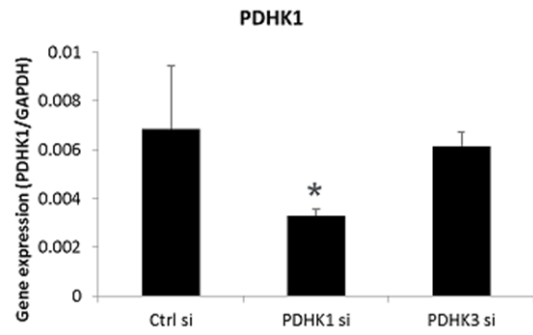
分化を誘導し化合物の作用を評価した(C, D)。細胞毒性及び増殖は、Celltiter Glo を用いて測定した(E, F)。ヒストグラム(A)は溶媒処理した細胞を点線で 10mM DCA 処理した細胞を実線、1 μ M AZD7545 処理した細胞を灰色線で Treg 分化での Foxp3 の発現を表示した。各データは、平均値 \pm 標準偏差で示した(N=3)。溶媒コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(*P \leq 0.05、**P \leq 0.01 及び***P \leq 0.001)。

図 5

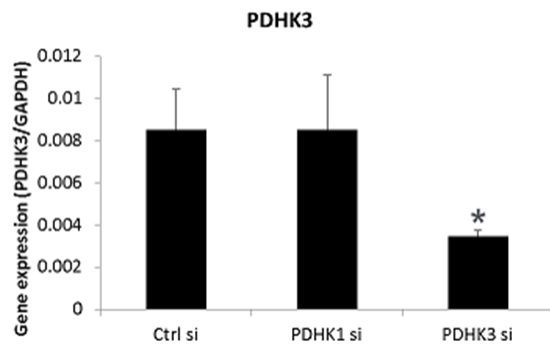
A



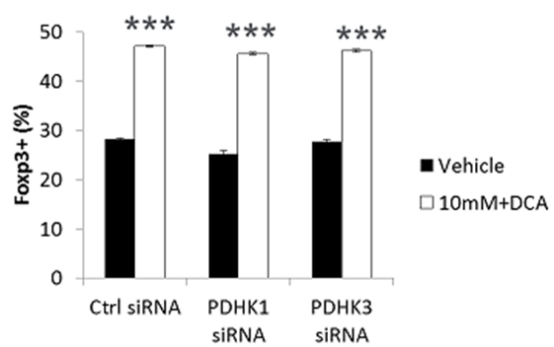
B



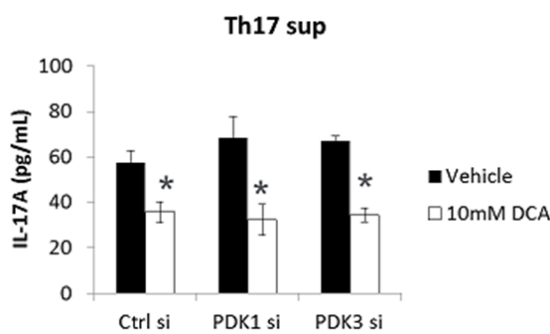
C



D



E



F

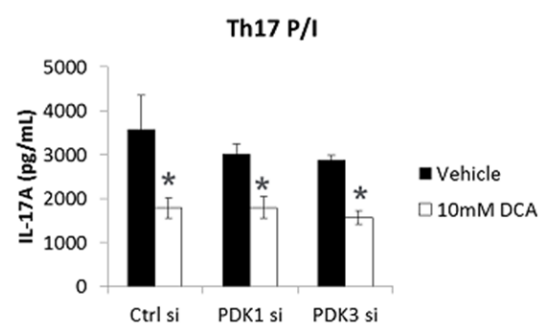


図 5

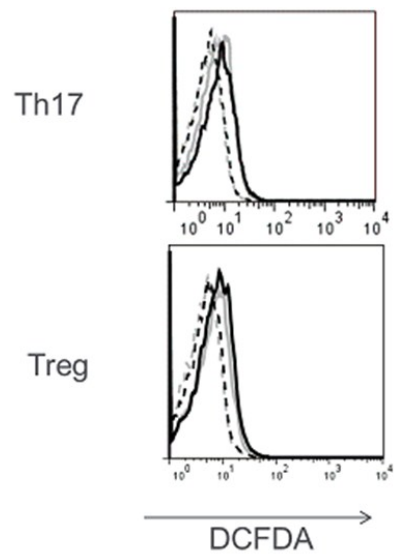
siRNA による PDHK1, 3 のノックダウン及びノックダウン条件で DCA は Treg 分化誘導及び Th17 抑制作用を有する。

ナイーブ CD4⁺T 細胞、Th17 分化誘導した細胞及び Treg 分化誘導した細胞での PDHK1-PDHK4 の発現を real time PCR で解析した(A)。ナイーブ CD4⁺T 細胞を siRNA (コントロール siRNA, PDHK1 siRNA, PDHK3 siRNA)及び化合物(溶媒、10mM DCA)

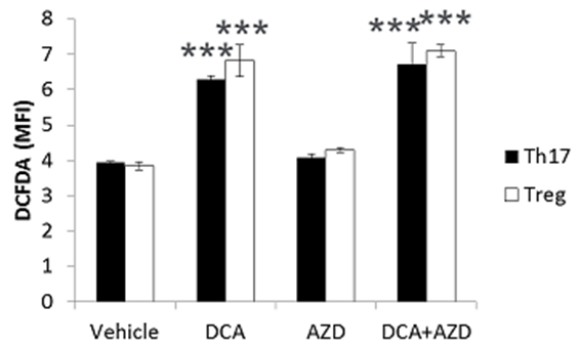
存在下で Treg, Th17 分化を誘導した。siRNA トランスフェクションによる PDHK1 及び PDHK3 のノックダウン効率を real time PCR で評価した(B, C)。Treg 分化条件での Foxp3 の発現を FACS で測定した(D)。Th17 分化条件での IL-17A 産生を alphaLISA で測定した(E, F)。各データは、平均値±標準偏差で示した(N=3)。溶媒コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(* $P \leq 0.05$ 、** $P \leq 0.01$ 及び*** $P \leq 0.001$)。

Figure 6

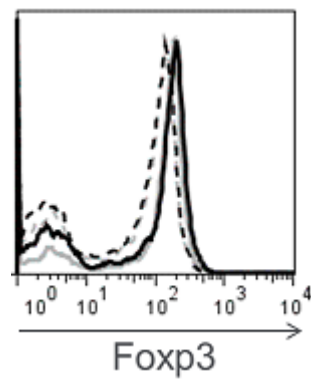
A



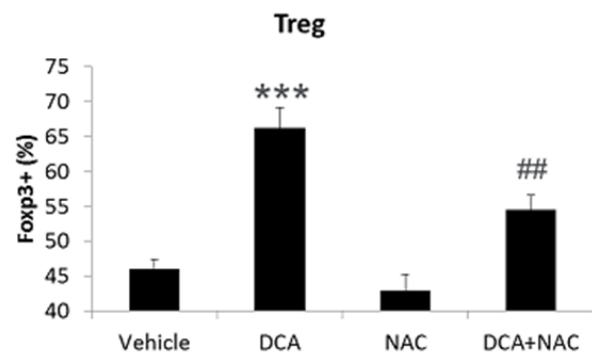
B



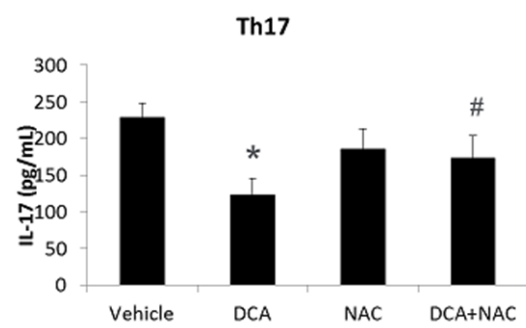
C



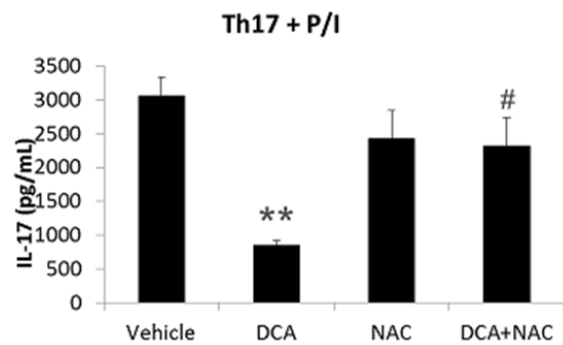
D



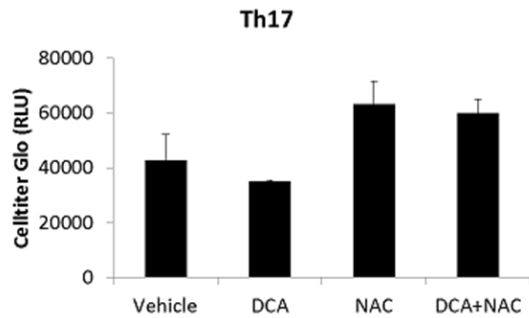
E



F



G



H

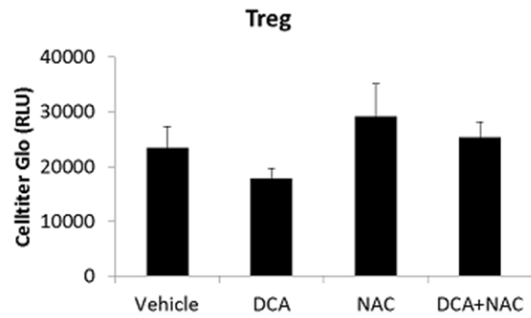


図 6

DCA は ROS 産生を誘導し、ROS 産生を介して Treg 分化誘導及び Th17 分化抑制作用を示す。

ナイーブ CD4⁺T 細胞を Th17 及び Treg に分化後、ROS 産生の指標である DCFDA で標識した。標識後、溶媒、10mM DCA, 1 μ M AZD7545 及び DCA+AZD 存在下で 2 時間培養し、FACS で測定した(A,B)。溶媒、10mM DCA, 1mM NAC 及び DCA+NAC 存在下でナイーブ CD4⁺T 細胞を Treg 及び Th17 分化誘導した。Foxp3 の発現を FACS にて測定した(C,D)。IL-17A 産生を alphaLISA にて測定した(E, F)。細胞毒性及び増殖は、Celltiter Glo を用いて測定した(G, H)。ヒストグラム(a)は DCFDA の蛍光強度を溶媒処理した細胞を灰色点線、10mM DCA 処理した細胞を灰色実線、AZD 処理した細胞を黒色点線及び DCA+AZD 処理した細胞を黒色点線で示した。ヒストグラム(C)は、Foxp3 の蛍光強度を溶媒処理した細胞を灰色点線、DCA 処理した細胞を灰色実線、NAC 処理した細胞を黒色点線及び DCA+NAC 処理した細胞を黒色点線で示した。各データは、平均値±標準偏差で示した(N=3)。溶媒コントロールと比較して有意な変化は下記のように示した(* $P \leq 0.05$ 、** $P \leq 0.01$ 及び*** $P \leq 0.001$)。DCA 添加条件と比較して DCA+NAC 添加条件での有意な変化は下記のように示した(# $P \leq 0.05$ 及び## $P \leq 0.01$)。

図 7

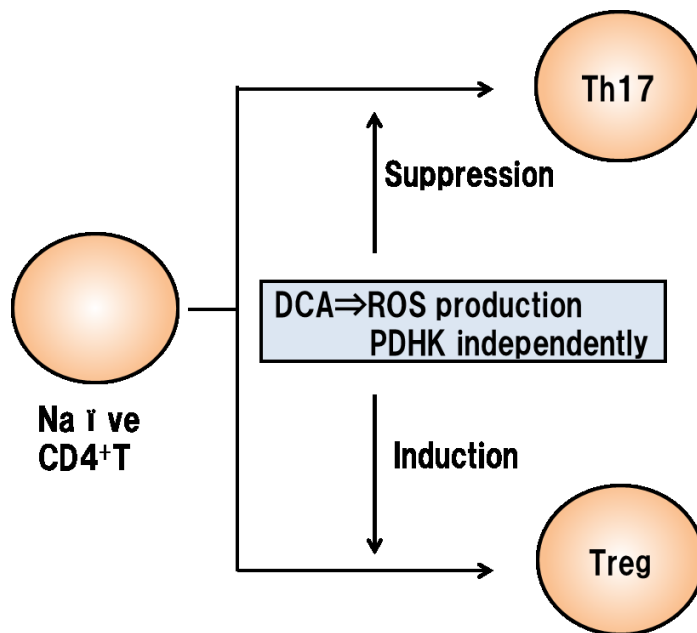


図 7

DCA による Th17 及び Treg 分化制御のモデル図。

以上の結果より、我々は上記のモデルを提唱する。DCA は、PDHK 非依存的に ROS 産生を誘導し、Th17 分化を抑制するとともに Treg 分化を誘導する。

5. 謝辞

本論文をとりまとめるにあたり、多大なるご指導ならびにご校閲を賜りました東京理科大学 生命医科学研究所 発生及び老化研究部門 後飯塚僚教授に篤く御礼申し上げます。

また本研究においてご指導を賜りました第一三共株式会社奈良太様、アスビオファーマ株式会社喜多康浩様、林靖浩様、村川正男様に深く感謝致します。

研究実施に協力頂いた第一三共株式会社鈴木啓介様、石黒純様、アスビオファーマ株式会社檜作好之様、山城恭子様に心よりお礼申し上げます。

日々の研究生生活をサポートして頂いた第一三共株式会社及びアスビオファーマ株式会社の皆様、研究生生活の精神的サポートして頂いた友人及び家族に感謝致します。

最後に研究生生活の心の支えとなってくれた妻 侑美に感謝致します。