

氏名（本籍）	まき た なお ゆき 榎 田 直 之（兵庫県）
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	乙第 1141 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	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

論文審査委員	（主査）教授 後飯塚 僚
	教授 安部 良      教授 北村 大介
	教授 久保 允人    准教授 中野 直子

## 論文内容の要旨

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 M1Mφ と M2Mφ に分化する。M2Mφ は更に 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 もしくはグルココルチコイドにより誘導される M2cMφ 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 Mφ 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 Mφ サブセットの特徴についての研究を進めた。

様々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 M2aMφ と比較して、IL-10 を IL-4 とともに刺激することで M2aMφ 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 Mφ 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、M2Mφ 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。PDHK 阻害薬の AZD7595 及び PDHK1, PDHK3 のノックダウンを実施し、DCA の作用を検討したところ、PDHK 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 の他の作用として 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。

## 論文審査の結果の要旨

生体防御機構である免疫系は、マクロファージなどの自然免疫に関与する細胞と T 細胞のような獲得免疫に関与する細胞の相互作用により、病原体やがん細胞の排除に寄与するだけでなく、過剰な反応を抑制する機能も備えており、それによって自己免疫病などの発症を回避している。近年、がんに対する免疫チェックポイント療法の臨床的有効性が注目されているが、このような治療は複雑な免疫応答を制御する特定の細胞集団（サブセット）を標的にすることが基盤となっている。しかしながら、特定のサブセットへの分化機構、表現型と機能の相関ならびに異なる組織における特異的な機能など未解明な点が多く残されているのも事実である。本研究では自然免疫を担うマクロファージならびに獲得免疫を担う T 細胞サブセットの分化制御に焦点を当てて

解析を行っている。

まず、マクロファージは生体の局所環境において刺激を受けることで M1 マクロファージと M2 マクロファージに分化することが知られており、M2 マクロファージはさらに M2a、M2b ならびに M2c マクロファージに分類可能であることが報告されている。しかしながら、現在までの報告では単独のサイトカインにより誘導されたマクロファージの機能について解析されているのみで、生体の炎症や免疫応答の現場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、生体におけるマクロファージの機能を正しく反映しているとは言い難い。そこで、本研究では、IL-10 刺激により IL-4 受容体  $\alpha$  鎖がマクロファージ表面に高発現することから、IL-4 と 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ている。その結果、IL-4 単独で誘導した M2a マクロファージと比較して、IL-10 と IL-4 で刺激することで M2a マクロファージ表現型の顕著な発現増強が観察され、好酸球浸潤に関与する CCL24 分泌が顕著に上昇することを明らかにしている。この IL-10 と IL-4 刺激で誘導される M2a マクロファージを腹腔内投与することで、生体でも好酸球浸潤が起こることから、生体における M2a マクロファージの機能分化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 ならびに IL-10 という 2 つのサイトカインにより協調的に制御されている可能性が考えられる。

次に、免疫応答を促進する T 細胞サブセットである T ヘルパー17 細胞ならびに抑制するサブセットである調節性 T 細胞の分化制御機構について、細胞内代謝に影響を与える薬剤であるジクロロ酢酸を用いて解析を行っている。その結果、ジクロロ酢酸は T ヘルパー17 細胞の分化を抑制する一方、調節性 T 細胞の分化を促進することを示し、このジクロロ酢酸の T 細胞サブセット分化における作用は、ジクロロ酢酸によって阻害されるピルビン酸脱水素酵素リン酸化酵素 を介したものではなく、活性酸素産生を介することを明らかにしている。

このように本研究の成果は、マクロファージならびに T 細胞サブセットのサイトカインおよび薬剤による分化制御機構を明確に示しており、特定の免疫応答のみを制御可能な新たな免疫関連疾患の治療薬創生において基盤となる重要な知見であると考えられる。したがって本研究は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認められる。