

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	伊藤 徹
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 968 号
学位授与の日付	令和2年9月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Inorganic polyphosphate potentiates lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response (無機ポリリン酸はリポ多糖がマクロファージに引き起こす炎症反応を増強する)
論文審査委員	主査 教授 河内 裕 副査 教授 片貝 智哉 副査 准教授 矢尾板 永信

博士論文の要旨

【背景】

無機ポリリン酸 (polyphosphate : polyP) は、単リン酸が高リン酸エネルギー結合で直鎖的に結合したポリマーである。polyP は細胞～哺乳類をはじめとした多くの生体内に存在し、その長さは10から1000鎖長程度とされる。ヒトでは60から100鎖長程度のpolyPが血小板内の顆粒に存在し、活性化された際に血中に放出される。最近の研究でpolyPは血液の凝固、細胞の炎症反応、エネルギー代謝、アミロイド線維の伸長などのさまざまな生理学的事象に関与していることが明らかになっており、注目を集めている。

リポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) はグラム陰性桿菌の外膜の構成物質で、それらから放出される外毒素である。LPSはヒトやマウスなどの免疫担当細胞に炎症反応を引き起こすことで知られ、急性、慢性の炎症疾患と関連する。Toll様受容体 (Toll-like receptor : TLR) 4は単球やマクロファージなどの免疫担当細胞の表面に発現するレセプターであり、その関連シグナルは細胞内シグナルであるMAPKやNF κ Bを活性化させ、サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL-6など) の産生を含めた炎症反応を引き起こす。polyPが免疫担当細胞の炎症反応と関わるのが過去の報告で示唆されているが、詳細は理解されていない。

【目的】

今回申請者らは、LPSがマクロファージに引き起こす炎症反応に及ぼすpolyPの影響について、in vitroで検討した。

【方法】

ヒト白血病由来のTHP-1細胞をマクロファージに分化させ、大腸菌由来のLPSとpolyP (1-850鎖長) と同時に反応させた。反応後の細胞内の炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL-6) のmRNA発現量をリアルタイムPCRで、反応液中のサイトカインの量をELISA法で測定した。細胞内の炎症関連シグナル蛋白の活性はウエスタンブロットで確認した。polyPがLPSの細胞表面の接着へ及ぼす影響についてフローサイトメトリーと免疫蛍光染色を用いて検証した。LPSのTLR4への結合に及ぼす影響について、水晶振動子マイクロバランス法 (QCM法) を用いて検討した。polyPがLPSのミセルサイズに及ぼす影響について動的光

散乱法 (DLS) を用いて、polyP と LPS の結合について等温滴定熱量測定 (ITC) を用いて検証した。

【結果】

polyP は LPS により誘導されるマクロファージによる炎症性サイトカイン産生を増幅した。その効果は polyP の容量および鎖長に依存したが、単リン酸はその効果はなかった。polyP 単独では細胞に炎症を引き起こさなかった。また、炎症性サイトカインの mRNA の発現レベル、MAPK、NF κ B、NLRP3 などの細胞内炎症関連シグナル伝達が polyP により増強された。マウス由来マクロファージや健康人の単球由来のマクロファージでも polyP による同様の炎症反応の増強反応を認めた。これらの結果から polyP は LPS が誘発するマクロファージの炎症反応を容量と鎖長依存的に増強し、その機序として細胞内のシグナル伝達を増強することが示された。

次に、polyP と LPS、TLR4 の分子間相互作用を検討した。免疫蛍光染色では polyP により細胞表面に接着する LPS が有意に増加することが示された。フローサイトメトリーでも LPS 陽性細胞数が polyP の添加により有意に増加した。さらに、polyP は LPS と TLR4 への結合を増加させることが QCM 法で示された。

次に LPS と polyP の親和性について解析を行った。LPS は自然にミセルを形成することが知られているが、polyP の添加により LPS のミセルのサイズが小さくなることが DLS の実験で示された。さらに、polyP は LPS と相互作用することが ITC の実験で示された。これらの結果は polyP が LPS と相互作用し、LPS の形成するミセルのサイズを小さくすることが示唆された。

【考察】

この研究では、polyP がマクロファージの LPS が誘発する炎症反応を促進することが示された。その機序として polyP が LPS の受容体である TLR4 への結合を高めることが示された。

これまで polyP が免疫担当細胞の炎症反応を増強した報告はない。今回の実験では単リン酸は細胞の炎症反応の増強を引き起こさず、炎症反応を増強する要素として、単リン酸のポリマー化が重要であることが示唆された。鎖長が長い polyP ほど生理活性が高いとされているが、今回実験で用いた 60 から 70 鎖長程度の polyP (血小板にある polyP と同程度の鎖長) でも十分な炎症反応が増強されることがわかった。

過去の報告では polyP は特定のリガンドと受容体の親和性を高めると報告がある。申請者らの polyP、LPS、TLR4 の親和性に関する実験から、polyP と LPS と相互作用し、LPS のミセルサイズを小さくし、その複合体と細胞表面の TLR4 との親和性が高まることで、炎症反応を増幅すると考えられた。この仮説は単リン酸が炎症反応を増幅しないこと、polyP 単独では炎症反応を起こさないことに合致する。

LPS は大腸菌などの細菌に存在し、敗血症時に血中に放出される。放出された LPS はマクロファージをはじめとした免疫担当細胞の炎症応答を引き起こす。活性化された血小板から放出され血中に存在する polyP は LPS による細胞の炎症シグナルを増幅し、過剰な炎症性サイトカインが産生され、致死的な全身炎症性疾患と関与すると考えることができる。今回の研究で、polyP は炎症性疾患の新たな病因、治療ターゲットなることを示唆された。

審査結果の要旨

無機ポリリン酸 (polyphosphate : polyP) は多くの生体内に存在するが、その生物学的意義は不明な点が多い。ヒトでは 60 から 100 鎖長程度の polyP が血小板内顆粒に存在し、活性化された際に血中に放出される。最近、polyP が血液の凝固、細胞の炎症反応、エネルギー代謝、アミロイド線維の伸長などの多様な生理学的事象に関与していることが明らかになっている。本論文は、LPS 存在下でのマクロファージの炎症惹起作用に及ぼす polyP の影響とそのメカニズムについて、主にヒト白血病由来の THP-1 細胞をマクロファージに分化させ *in vitro* で検討した。結果、polyP は LPS のミセルサイズを減少させることにより LPS

と TLR4 の結合を促進し、その下流にある細胞内シグナルの増強および炎症性サイトカインの産生促進を介して炎症反応を増幅する可能性が示された。これまで polyP が免疫担当細胞の炎症反応を増強した報告はない。本論文で単リン酸は細胞の炎症反応の増強を引き起こさず、炎症反応を増強する要素として、単リン酸のポリマー化が重要であることが示唆された。

以上、polyP が炎症性疾患の新たな病因、治療ターゲットとなることを初めて示唆した点に博士論文としての価値を認める。