

氏名 山田知広

急性炎症反応は、外傷や感染症に対する重要な防御機構であり、好中球の流入により生体内の異物を排除する「初期過程」と、それに続いてアポトーシスした好中球や組織片を除去し、組織を修復へと導く「収束過程」からなる。初期過程においては炎症局所で血管内皮細胞の活性化と血管透過性亢進、それに続く好中球の浸潤と活性化が起き、異物の迅速な除去が行われる。この過程についてはこれまでに多くの研究がなされており、サイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどの起炎症性メディエーターの関与が示されている。一方、収束過程においては好中球が減少する一方でマクロファージ(Mφ)の流入が増大し、損傷した組織片やアポトーシスした好中球のクリアランスが起こることが知られているが、この過程に関わる分子機構に関してはいまだ不明な点が多い。多くの慢性炎症状態において、炎症の収束機構の機能不全が指摘されており、従って炎症の収束についての理解は医学、薬学領域の重要課題である。

本研究において、山田は炎症の収束期に増加する特定の細胞群を見だし、depletion 実験によりこの細胞が炎症の収束に寄与することを明らかにした。さらにこの細胞は炎症収束期において抗炎症性脂質メディエーター(リポキシン A4、プロテクチン D1)を産生し、積極的に炎症収束に寄与している可能性を示した。

#### 急性炎症の収束期に現れる細胞群の特定

山田はまず酵母の細胞壁成分である zymosan をマウス腹腔内に投与し、急性腹膜炎を誘導した。zymosan 投与後の腹腔内細胞を経時的に採取し、表面抗原に対する蛍光抗体で標識し、フローサイトメトリーにより細胞種の経時変化を測定した結果、炎症の初期過程(〜4 h)において好中球(F4/80<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>)の浸潤を認め、続いて収束期(24〜48 h)では好中球の減少とF4/80陽性細胞(主にMφ)の増加を確認した。さらに収束期に増加する F4/80 陽性細胞群について、ミトコンドリアに特異的に取り込まれる蛍光色素 Rhodamine 123(R123)を用いることで2つの群に分離することに成功した。これらの細胞集団をフローサイトメーター(FACS Aria)を用いて精製し、R123 で強く染まる細胞は Mφ に特徴的な形状および遺伝子発現を示し、一方の R123 で弱く染まる細胞は形状、遺伝子発現ともに Mφ と異なる細胞であることを明らかにした。山田はこの細胞を F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞と名付けており、以下の文中でも使用している。

#### F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞は炎症収束を促進する

次に、山田は特異的な抗体を投与することで F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞を約 80% depletion できる系を確立し、この細胞の炎症収束への寄与を調べた。炎症の収束は①腹腔内に残存

する好中球数、②zymosan を取り込んだ細胞のリンパ組織(胸腺リンパ節、脾臓)への移行、の2点で評価している。その結果、炎症収束期すなわち zymosan 投与後 24 h の時点において、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞を depletion したマウスはコントロールマウスに比べて腹腔内に残存する好中球数が有意に多く、炎症の収束が遅延していることを明らかにした。炎症局所で異物を貪食した好中球や Mφ などの細胞は、その後収束過程においてリンパ組織へと移行することが知られていたため、そこで山田は、zymosan を取り込んだ細胞のリンパ組織への移行を定量する目的で、FITC-zymosan を腹腔内に投与して 24 h 後の胸腺リンパ節および脾臓から細胞を調製し、フローサイトメーターを用いてそれらの臓器中の FITC-zymosan を取り込んだ細胞数を測定した。その結果、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞を depletion したマウスはコントロールマウスに比べて有意に FITC-zymosan を取り込んだ細胞数が少なく、特に胸腺リンパ節でその差が顕著であることを明らかにした。以上の結果から、炎症収束期に現れる F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞は炎症の収束に促進的に働く細胞であることを示した。

#### F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞は抗炎症性脂質メディエーター産生細胞である

炎症の進行にはサイトカインなどのペプチド性メディエーターに加え、脂質メディエーターが重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、アラキドン酸代謝物であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は血管透過性の亢進を引き起こし、またロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) は強力な好中球の誘因物質として炎症の初期過程に関わることが知られている。一方、リポキシン A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) やプロテクチン D1 (PD1) などの抗炎症性脂質メディエーターは炎症収束期に発現し、好中球の浸潤および炎症性サイトカインの産生を抑制、さらに Mφ の異物のクリアランス能を高めることで、炎症の収束過程に関わっていると考えられている。しかし、これら抗炎症性メディエーターの主たる産生細胞は特定されていなかった。

山田は、炎症収束期すなわち zymosan 投与後 24 h の時点において、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞を depletion したマウスの腹腔浸出液中の抗炎症性脂質メディエーター量を ELISA 及び LC-MS/MS を用いて測定し、コントロールマウスに比べて LXA<sub>4</sub> や PD1 のレベルが著しく低いことを示した。さらに腹腔内から回収された細胞を in vitro で刺激したところ、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞を depletion した状態では明らかに LXA<sub>4</sub> や PD1 の産生能が低下していることを示した。また、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞では LXA<sub>4</sub> や PD1 の産生酵素である 12/15-リポキシゲナーゼの発現量が著しく高いことも確認した。以上の結果より、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞は炎症収束期において LXA<sub>4</sub> や PD1 を産生する細胞であることが明らかにした。さらに、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞 depletion マウスで認められる、腹腔内に残存する好中球数の増加は、炎症局所に LXA<sub>4</sub> もしくは PD1 を添加することで正常な数まで低下することを示した。また zymosan を取り込んだ細胞の胸腺リンパ節への移行の減少も LXA<sub>4</sub> もしくは PD1 を添加することでレスキューすることを示した。従って、山田は、これらの脂質メディエーターはそれぞれ単独で、F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞 depletion による収束の遅延をレスキューできることを明らかにした。

以上のように、本研究において山田は、炎症収束期に現れる細胞として「F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup>

細胞」を見だし、この細胞が炎症の収束に促進的に働く細胞であることを depletion 実験から明らかにした。またこの細胞は LXA<sub>4</sub> や PD1 といった抗炎症性脂質メディエーターの産生細胞であることを明らかにした。LXA<sub>4</sub> や PD1 には、好中球の浸潤および炎症性サイトカインの産生を抑制、さらに Mφ の異物のクリアランス能を高める活性などが報告されている。実際に F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞 depletion マウスで認められる炎症収束の遅延が、炎症局所に LXA<sub>4</sub> を添加することでほぼ完全にレスキューされたことから、炎症の収束における脂質メディエーターの重要性が支持された。以上の結果から、山田は、炎症収束期に現れる F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞が抗炎症性メディエーターの産生を介して周囲の細胞に作用し、炎症が速やかに収束する環境を整えるような役割を果たしているという可能性を示唆した。

以上 本研究は、炎症の収束期に増加する細胞として初めて F4/80<sup>mid</sup>R123<sup>lo</sup> 細胞を特定し、さらにこの細胞は抗炎症性脂質メディエーターを産生することで炎症の収束に積極的に寄与するという非常に新しい概念を提供したことから、博士(薬学)に充分値するものと判断した。