



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Tyk2のマクロファージにおける機能調節と炎症応答への関与 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	平島, 洸基
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13617号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73866
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koki_Hirashima_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 平 島 洸 基

学 位 論 文 題 名

Tyk2 のマクロファージにおける機能調節と炎症応答への関与

マクロファージは体内のいたる所に存在し、外来異物の認識・貪食やヘルパーT細胞に対する抗原提示のほか、組織の発生・修復、恒常性維持に役割をもつ。マクロファージの機能を調節するサイトカインとしてI型IFN (IFN- α , IFN- β 等)が報告されている。骨髓細胞にマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)を添加することで分化誘導されるマクロファージ(bone marrow-derived macrophage: BMDM)はI型IFNを恒常的に産生し、自己分泌／傍分泌シグナルによりLPS刺激を受けると高いIL-10産生を示す性質を持つが、一方I型IFN受容体Ifnar1を欠損したBMDMではLPSによるIL-10産生が認められなくなることが報告されている。

Tyrosine kinase 2 (Tyk2)はJanus Kinase (Jak)ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼであり、I型IFNやIL-12, IL-23によって活性化されそれらの応答に役割をもつことが報告されている。当研究室ではTyk2欠損マウスを用いた解析により、IL-12およびIL-23が関わる種々の炎症・免疫疾患モデルにおいてTyk2が促進的な役割をもつことを見出してきた。また一方でTyk2欠損マウスは、細菌成分LPSによるエンドトキシンショックに対して強い抵抗性を示す。野生型に比べTyk2欠損マウス由来マクロファージは非刺激時およびLPS刺激時のI型IFN産生能が低下し、また、I型IFNであるIFN- β の欠損マウスはTyk2欠損同様にエンドトキシンショックに対する抵抗性を示す。これらのことから、細菌成分に対するマクロファージ応答においてTyk2やI型IFNが役割をもち、Tyk2はマクロファージにおけるI型IFN産生への寄与を通じマクロファージの細胞自律的機能調節に影響をもつことが示唆される。しかしながらこの観点でのTyk2機能の研究は現在までに十分行われておらず多くの不明点が残されている。以上を踏まえ本研究では、マクロファージの機能調節におけるTyk2の役割とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

野生型およびTyk2欠損マウスより骨髓細胞を採取してM-CSF存在下に培養することでBMDMを調製し実験に用いた。野生型BMDMは非刺激下に炎症性性質の古典的指標のひとつであるCxcl10のmRNAを発現しており、グラム陽性菌*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)死菌による刺激下にその発現増加が認められたがTyk2欠損BMDMにおいてはいずれの条件下においても野生型に比べて有意にCxcl10発現量が低下していた。また、Tyk2欠損BMDMでは非刺激時および*P. acnes*刺激時のIrf7 (I型IFN応答性遺伝子)の発現が有意に低下していたことからTyk2欠損ではI型IFN産生低下およびI型IFNの自己分泌／傍分泌シグナル低下の結果としてCxcl10発現が低下することが示唆された。

一方でTyk2欠損BMDMでは*P. acnes*死菌刺激による抗炎症性サイトカインIL-10産生が野生型BMDMよりも有意に増強した。I型IFNシグナルが低下するTyk2欠損BMDMでのIL-10産生増強という結果は、IL-10産生にI型IFNシグナルが必要であるとする先行研究を基にすると予想外の結果であり、Tyk2がI型IFNシグナルを介する機能以外に、それと独立してマクロファージ機能に影響をもつ経路の存在が示唆され興味を持たれた。

次に炎症抑制性マクロファージにおいて脂肪酸合成経路の亢進が報告されているため、野生型及びTyk2欠損BMDMにおいて、脂肪酸合成やコレステロール代謝に関与するLXR標的

遺伝子の mRNA 発現量を解析した。その結果, Tyk2 欠損マクロファージでは非刺激時において LXR 標的遺伝子 *Abca1*, *Fads2* の脂質代謝関連遺伝子発現が有意に増加した。また, 野生型 BMDM において I 型 IFN シグナルを遮断すると *Abca1* の発現は有意に増強し Tyk2 欠損との差が消失したが, *Fads2* 発現においてはそのような効果がみられず, IFN の影響は遺伝子によって異なっていた。以上より, Tyk2 はマクロファージの機能調節に役割をもち, その分子機構には I 型 IFN 依存的／非依存的な機序が存在することが示された。

生体内の炎症応答における Tyk2 の役割を明らかにするために, *P. acnes* 加熱死菌を野生型および Tyk2 欠損マウスに腹腔内投与し急性腹腔内炎症を誘導し腹腔内への多形核白血球(Gr-1+CD11b+, PMN)浸潤数を炎症のパラメータとして評価した。*P. acnes* により誘導される腹腔内総細胞数および PMN 数は野生型に比べ Tyk2 欠損マウスで有意に抑制された。一方で野生型マウスに対する抗 *Ifnar1* 中和抗体および抗 IFN- γ 中和抗体の併用投与は *P. acnes* 投与時の腹腔内 PMN 浸潤に影響しなかったことから, 本炎症モデルにおける IFN 非依存的な Tyk2 の役割が示唆された。また *P. acnes* 投与時の腹腔内炎症性サイトカイン IL-6, TNF- α の産生量は, 野生型に比べ Tyk2 欠損マウスで有意に減少した一方, 抗炎症性サイトカイン IL-10 は Tyk2 欠損マウスでのみ検出された。IL-10R 中和抗体をあらかじめ投与した Tyk2 欠損マウス群において, *P. acnes* 投与時の腹腔内 PMN 浸潤数が野生型と同程度まで回復した。さらに, 腹腔常在性細胞のうちどの細胞種において IL-10 産生が増加したのか, 細胞内染色法により検討した。その結果, B220⁺ 細胞群においては野生型と Tyk2 欠損細胞間で IL-10 陽性細胞の割合に差が見られない一方で, F4/80⁺ 細胞群においては Tyk2 欠損による IL-10 陽性細胞割合の増加が観察された。以上の結果から, Tyk2 欠損マウスでは腹腔内の F4/80⁺ マクロファージにおける IL-10 産生能が亢進しており, それに伴う腹腔内 IL-10 産生量の増加が腹腔内炎症の抑制を引き起こしていることが示された。

Tyk2 を欠損した BMDM や腹腔内常在性細胞において IL-10 産生が野生型に比べ増強していた結果を受け, Tyk2 が IL-10 産生に関与する機構を明らかにするために, シクロオキシゲナーゼ(Cox)-プロスタグランジン(PG)E₂-プロテインキナーゼ A(PKA)経路への関与を検討した。PGE₂ は, 生体内で Cox の作用によりアラキドン酸から誘導される抗炎症性脂質メディエーターであり, LPS 等の刺激時に PKA 活性化を介してマクロファージの IL-10 産生を正に制御する役割をもつことが報告されている。Tyk2 欠損マウスの腹腔における定常時の PGE₂ 量, および腹腔常在性細胞における Cox-1 mRNA 発現が Tyk2 欠損によって増加していた。腹腔常在性細胞を *in vitro* で *P. acnes* 6 時間刺激した際の IL-10 産生は, Cox 阻害剤ジクロフェナクまたは PKA 阻害剤 H-89 の前処理によって有意に抑制され, 特に PKA 阻害の効果により強く見られた。以上の結果から, Tyk2 欠損マウス腹腔における Cox-PGE₂-PKA 経路を介した IL-10 産生促進機構の存在が示された。

本研究により Tyk2 は構成的な IFN シグナルに寄与することで, マクロファージの脂肪酸合成関連遺伝子群の発現を抑制的に制御し炎症に適切に応答するための性質の維持に役割をもつこと, また Cox-PGE₂-PKA 経路を介した IL-10 産生に対して抑制的に関与することが新たに示された。Tyk2 を欠損したマクロファージは IL-10 を産生しやすい性質を獲得しており, 腹腔内炎症における炎症抑制効果に寄与していると考えられた。