



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハダカデバネズミのマクロファージの同定と細胞株樹立に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	柴田, 悠平
Description	配架番号 : 2533
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14068号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77909
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuhei_Shibata_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（医 学） 氏 名 柴田 悠平

学 位 論 文 題 名

ハダカデバネズミのマクロファージの同定と細胞株樹立に関する研究
(Detection and establish of cell lines of macrophage in naked mole-rat)

【背景と目的】高齢社会になった我が国において、主要な死因を占めるがんや動脈硬化症等の老化関連疾患の有病率がより一層増すことが予想され、これらの疾患に対する対処が今後重要になる。これまでショウジョウバエ、線虫、マウス・ラットなどのモデル動物が医学研究に寄与してきたが、これらはヒトに比して寿命が短い動物種である。近年、分子生物学的な解析技術の進歩により、より望ましい形質を持つ動物を用いた研究が着目されている。東アフリカの地中に生息するハダカデバネズミ(naked mole rat: NMR, *Heterocephalus glaber*)は、マウスと同じサイズでありながら長寿形質を示し、老化耐性だけではなく、腫瘍や動脈硬化等の加齢関連疾患に対しても耐性を持つことが報告されている。また、NMRの腫瘍耐性のメカニズムについて、これまで contact inhibition に対する過剰応答、高分子ヒアルロン酸の分泌、がん抑制遺伝子の不活化によるアポトーシスや細胞老化の誘発、p53の高発現、テロメラーゼ活性の過剰制御、タンパク質合成能、高い抗酸化活性やオートファジー活性、より高度な DNA 二重鎖の修復能などが報告されている。一方、NMRの免疫系についての報告については、少なく腫瘍免疫についても未だ不明な点が多い。そこで、本研究では NMR について、各種免疫担当細胞を解析し、種特異的な免疫機能の解明を目的とした。

【材料と方法】はじめに NMR 由来の骨髓細胞、脾臓細胞、peritoneal cavity cells(PEC)を用いて、マウス/ヒトのモノクローナル抗体、サイトカインとの交差性を検証した。次に NMRの免疫担当細胞の同定を目指し、セルソーターで分取した各種細胞のサイトカイン反応性や食食能を解析、評価するとともに、定量 PCR 法により、免疫関連遺伝子発現の検討を行った。さらに、ウイルスベクターを用いて、マクロファージ細胞株を樹立し、その特性について検討した。

【結果】NMRの骨髓細胞、脾臓細胞および PEC は、マクロファージの細胞表面マーカー分子を認識する抗マウス CD11b 抗体、NK 細胞のマーカー分子を認識する抗マウス NK1.1 抗体に交差性を示した。またマウス/ヒトマクロファージコロニー増殖因子 (M-CSF)に反応して有意に増殖し、さらに活性化することで食食能を示すことが分かった。CD11b 陽性あるいは CD11b 陰性細胞について、それぞれサイズ毎にセルソーターで分取し、各分画の特性について検証した結果、CD11b 陽性、low side scatter の分画の細胞は、大きい細胞質と空胞を有し、マクロファージ様の形態であることを確認した。この分画の細胞は M-CSF 刺激により有意に増殖し、食食能を有することが明らかとなった。また、この細胞は、マクロファージ特異的な細胞表面マーカーの遺伝子である *Emr1* (F4/80)、*Cd68* および *Siglec1*(CD169)を高発現していることを確認した。この NMR 由来の細胞に対して抗 NK1.1 抗体を使用し、架橋刺激をすることで、有意な増殖と形態の変化を認めた。さらに Simian virus40 early region(SV40ER)を含むレトロあるいはレンチウイルスベクターを用いて細

胞株の樹立を試みた結果、マウス PEC では、レトロウイルスベクターを用いた場合、不死化細胞は得られたが、細胞表面の CD11b および F4/80 分子の発現は消失した。一方、レンチウイルスベクターを用いた所、細胞への感染効率が增加するとともに、CD11b および F4/80 分子の発現を保持したまま細胞が不死化することが分かった。NMR の PEC に対してレンチウイルスを感染させたところ、M-CSF 非依存的に増殖する細胞(Naked mole rat Peritoneal cavity Macrophage-1: NPM1)を得た。この NPM1 細胞は貪食能、抗マウス/ヒト CD11b 抗体および抗マウス NK1.1 抗体と交差性を示し、LPS 刺激により炎症性サイトカイン遺伝子の発現レベルが亢進した。また IFN- γ あるいは IL-4 などのサイトカイン刺激を加えることで M1/M2 マクロファージサブセットへの分化誘導能を認めた。またマウス細胞の培養条件と同様の温度である 37°C、20 % O₂ および 5 % CO₂ 濃度の条件下で培養すると細胞は死滅し、32°C、5 % O₂ および 5 % CO₂ 濃度の条件で増殖することが判明した。

【考察】本研究において NMR 細胞は、抗マウス/ヒト CD11b 抗体及び抗マウス/ヒト M-CSF に交差性を示すことが明らかとなり、これはアミノ酸配列の相同性に起因するものと考えられた。CD11b 分子は、一般にマクロファージに加えて、好中球や樹状細胞にも発現している分子であるが、セルソーターを用いて細胞を分画し、サイトカイン反応性や貪食能、また *Emr1* (F4/80)、*Cd68* および *Siglec1* (CD169) など細胞表面マーカーの遺伝子発現を解析した結果により、この CD11b 分子を発現している細胞について、NMR のマクロファージと定義した。またこの細胞は、抗マウス NK1.1 抗体も交差性を示したが、一般に、NK1.1 分子は NK 細胞のマーカーであり、定常状態のマウスマクロファージでは発現は認められないこと、刺激があった時に発現が亢進することが報告されている。一方、NMR 由来のマクロファージは定常状態でも発現し、また抗 NK1.1 抗体を使用して架橋刺激することで、細胞増殖能を示したことから、抗 NK1.1 抗体が認識する分子は、NMR マクロファージにおいて実際に細胞機能を制御していることが示唆された。今後、抗マウス NK1.1 抗体が認識する分子の同定や NK1.1 陽性 NMR 細胞の細胞傷害性を示す必要があると考えられた。これまでマウスを使用した研究で NK 細胞は老化細胞を除去することで、個体の寿命が延長することが報告されていることから、NMR マクロファージが NK1.1 分子の発現を介して、個体の長寿、腫瘍耐性の形質獲得に寄与する可能性が考えられた。本研究で SV40ER を導入することで機能的な NMR マクロファージの NPM1 細胞株を樹立することができた。この NPM1 細胞は、一般的なマウスの細胞培養条件下では死滅し、低温および低酸素下で増殖することを確認した。これまで NMR 細胞は温度耐性がある一方で、酸化ストレスへの耐性が低いことが報告され、また HIF-1 α が高発現しておいたことから、低酸素環境に耐性を示す可能性が考えられた。さらに SV40ER が抑制する p53 と相互作用を持つことから、本遺伝子導入による細胞増殖への影響も考えられた。

【結論】本研究では長寿形質を有する NMR の免疫担当細胞の解析を行い、マクロファージの同定と新規マクロファージ NPM1 細胞株を樹立するとともに、その細胞機能を評価し、低温および低酸素耐性など特異的な性質を有することが明らかとなった。今後、本研究で新たに樹立された NPM1 細胞を詳細に検証することで、NMR 種特異的な免疫機能の制御および長寿形質獲得の機序解明に寄与する可能性が期待される。