HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the Functions of Protein Phosphatase PPM1D in Myeloid Innate Immunity [an abstract of entire text]
Author(s)	工藤, 風樹
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14005号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78062
Type	doctoral thesis
File Information	Fuki_KUDOH_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　　博士（理学）　　氏名　工藤　風樹

学 位 論 文 題 名

Study on the Functions of Protein Phosphatase PPM1D in Myeloid Innate Immunity
（骨髄系細胞による自然免疫におけるプロテインホスファターゼ PPM1D の機能に関する研究）

自然免疫応答は、体細胞における感染・損傷の検知および免疫系の惹起と、自然免疫細胞による異物の排除および獲得免疫の惹起によって構成される。好中球は、ヒト血中白血球において最も多く存在する自然免疫担当細胞である。急性骨髄性白血病（AML）は、好中球前駆細胞における変異により生じる疾患であり重篤な免疫不全を引き起こす。好中球による癌細胞に対する効果は腫瘍抑制的効果と腫瘍促進的効果の両面が存在し、この二面性は好中球に機能の異なるサブセットにより生じる。免疫抑制的なサブセットである PMN-MDSC は、T 細胞の増殖抑制能を示し、がん免疫を抑制し腫瘍発達に寄与することが報告されている。このため、より効果的ながん免疫療法の確立には、骨髄系細胞の機能制御が肝要である。

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、当初野生型 p53 誘導性ホスファターゼとして同定され、p53 の負の調節因子であり p53 経路の不活化による細胞癌化を引き起こす癌原遺伝子であるとみなされてきた。一方で、ノックアウトマウスの解析および当研究室でのこれまでの知見から、PPM1D が白血球特異的な機能を有すること、特に好中球分化に関与することが示唆されている。

そこで本研究では、骨髄系細胞による自然免疫におけるプロテインホスファターゼ PPM1D の機能探索のため、（１）PPM1D 阻害によるヒト AML 由来細胞株の分化状態に与える効果および（２）PPM1D 阻害による PMN-MDSC への分極化誘導を解析し、そのメカニズムに関する研究を実施した。

本論文は、全４章より構成されている。第一章では総括的序論として研究背景及び目的を述べている。

第二章では、好中球分化モデル細胞である HL-60 に対する、プロテインホスファターゼ PPM1D の薬理学的阻害による分化誘導の効果を解析した。HL-60 細胞は、All-*trans* レチノイン酸（ATRA）の添加により好中球様の表現型、すなわち核分葉を示し、CD11b 発現亢進、そして NBT 還元能を獲得する。はじめに ATRA 添加した HL-60 細胞における PPM1D 発現解析を実施した。定量的 RT-PCR および Western blotting によって、PPM1D の発現量が好中球分化に伴い、増加することを示した。HL-60 細胞が、p53 が欠損している細胞株であることから PPM1D の上流転写因子を明らかとするために、ChIP-seq データベースを用いた網羅的解析を行った。この結果、*PPM1D* Exon 1 周辺配列に結合する 100 以上の転写因子が同定された。この中には、好中球系列への分化の過程に

おいて、重要な機能を果たすことが報告されている C/EBP family, RUNX1 などが含まれており、分化段階に応じた転写制御が行われていることが示唆された。分化前後における細胞内局在を解析したところ、分化前は細胞核、特に核小体に強くする一方で、分化後の HL-60 細胞では細胞質にも存在することが示された。この結果は分化前後で異なる機能を有することを示唆している。次に、TAP-4PH が生細胞形態の可視化が可能な蛍光プローブであることを示し、これを用いて PPM1D 阻害による分化誘導の解析を実施した。阻害剤添加した HL-60 細胞において、細胞核が分かれる核分葉が観察された。一方で、マクロファージ様細胞は見られなかった。この結果から、PPM1D 阻害が骨髄分化を促進するが、マクロファージ様への分化は誘導しないことが明らかとなった。加えて、TAP-4PH が HL-60 細胞の細胞形態を可視化する上で非常に有用なツールであることを示した。さらに詳細な解析のため、分化マーカーである表面抗原 CD11b と NBT 還元試験による解析を実施した。これらの解析から TAP-4PH を用いた解析と同様に、PPM1D の阻害によって HL-60 が好中球様細胞に分化したことが示された。

第三章では、PPM1D 阻害した HL-60 細胞が免疫抑制的なサブタイプへと分極化していることを見出した。PPM1D 阻害 HL-60 細胞において、敗血症ショックを与えた際の炎症性サイトカイン産生の亢進が見られた一方で、炎症に伴うアポトーシスが誘導されないことが明らかとなった。これは、重度の炎症時の好中球でみられる好中球アポトーシスの遅延に類似した表現型であると考えられる。次に、貪食能の解析を実施し、分化誘導の効率は PPM1D 阻害 HL-60 のほうが高いにもかかわらず、貪食能は低下することを示した。これらの結果から、PPM1D 阻害 HL-60 における異なるサブセットへの分極化が示唆された。このため、PMN-MDSC としての機能解析のため、T 細胞モデル細胞との共培養を行った。ATRA により分化誘導した HL-60 との共培養では T 細胞増殖抑制は見られなかった一方で、PPM1D 阻害 HL-60 では増殖抑制が見られた。次に、ヒト肺がん細胞との共培養を実施した結果、ATRA 分化誘導 HL-60 は肺がん細胞の細胞数を顕著に低下させるが、PPM1D 阻害細胞ではその効果は大きく減少することが示された。以上の結果より、PPM1D 阻害 HL-60 が、PMN-MDSC 様のサブセットへと分極化していることが明らかとした。

近年、PMN-MDSC の免疫抑制能に Prostaglandin E_2 産生の亢進が必要であることが報告されており、前駆体の細胞内への取り込み酵素である FATP2 の発現上昇が癌患者の末梢好中球において見られることが報告されている。このため、PPM1D 阻害による PMN-MDSC への分極化のメカニズムを明らかとするために Prostaglandin E_2 の代謝系すなわちアラキドン酸カスケードの解析を実施した。この結果、大変興味深いことに PPM1D 阻害 HL-60 細胞では、ATRA 単独分化誘導細胞と比較して、Prostaglandin E_2 が 15 倍以上も産生されることが明らかとなった。続いて、アラキドン酸カスケードの代謝酵素の発現解析を実施した。PGE_2 の合成酵素である COX-2/mPGES-1 発現量は、PPM1D 阻害により有意に増加していた。加えて、細胞内脂肪量も増加しており、脂肪滴タンパク質の発現量も増加していた。これらの結果から、PPM1D 阻害 HL-60 細胞において、脂肪滴形成およびアラキドン酸代謝酵素の発現亢進によって PGE_2 産生が亢進し、PMN-MDSC への分極化が起こったことが示唆された。さらに、PMN-MDSC 様細胞の転写的なバックグラウンドを明ら

かとするために、Transcriptome 解析を行った。この結果、炎症関連遺伝子の発現亢進と代謝関連遺伝子の発現亢進が見られた。PPM1D 阻害による MDSC への分極化は転写レベルでの変化を起こしていることが明らかとなった。以上より、PPM1D の抑制が、HL-60 細胞を PMN-MDSC 様の細胞へと誘導し、その誘導が PGE_2 産生増大による転写的な変化に起因することが明らかとなった。

第四章では、結言を述べている。今回の研究により、PPM1D 阻害剤による AML 細胞の好中球への分化促進剤としての有用性を示した。この過程において、分化誘導における細胞の形態変化において、TAP-4PH による生細胞形態の可視化が非常に強力なツールとなることを見出した。加えて、PPM1D 阻害条件において、分化した好中球は免疫抑制的な機能を獲得することが見いだされた。さらにこの免疫抑制的なサブセットへの分極化のメカニズムとして、PPM1D 発現低下による COX-2/mPGES-1/PGE2 カスケード亢進を介した PMN-MDSC 分極化モデルを提案した。これら成果は、PPM1D を分子標的とするがん治療だけではなく、自然免疫細胞の強化によるがん免疫療法の効率化に大いに貢献することが期待される。また、さらなる研究の発展として、PPM1D が血球系において、加齢に伴い発現低下することが報告されていることから、PPM1D の発現調節機構の解明による、免疫老化の分子機構の一端を明らかとすることが期待される。