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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13617
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91885
Type	doctoral thesis
File Information	Koki_Hirashima.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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

北海道大学大学院生命科学院

生命科学専攻　生命医薬科学コース

衛生化学研究室

平島　洸基

2019 年 3 月

目次

1 略語表 2

2 序論 3

3 実験方法 7

4 実験結果

4-1 マクロファージの *Cxcl10* 遺伝子発現における Tyk2 の役割 12

4-2 脂質代謝関連遺伝子発現における Tyk2 の寄与 14

4-3 脂質代謝関連遺伝子発現における IFN 経路の関与 16

4-4 マクロファージの IL-10 産生における Tyk2 の影響 18

4-5 *P. acnes* 誘導性腹腔内炎症における Tyk2 の関与 20

4-6 マクロファージの IL-10 産生経路における Tyk2 の役割 27

4-7 Tyk2 の PGC-1α を介した IL-10 産生への影響 27

5 考察・結論 29

6 参考文献 33

7 謝辞 37

1. 略語表

ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
BMDM	Bone-marrow derived macrophage
CXCL	CXC chemokine ligand
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FADS2	Fatty acid desaturase 2
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Janus kinase
KO	Knock out
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver X receptor
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
P. acnes	*Propionibacterium acnes*
PBS	Phosphate-buffered saline
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α
RT-PCR	Reverse transcription-Polymerase chain reaction
SCD2	Stearoyl-CoA desaturase 2
siRNA	small interfering RNA
SREBP1	Sterol responsive element binding protein 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Th	Helper T Cell
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tyk2	Tyrosine kinase 2
WT	Wild-type

2．序論

生体は病原体への防御手段，環境の変化に対応した恒常性維持の手段として免疫系を備えている。炎症応答は，組織間や細胞間の綿密な連携によって行われ，組織損傷や病原体侵入に応じた免疫系活性化を介して生体の恒常性を維持するために必要な応答である一方，異常な炎症応答はアレルギー疾患や自己免疫疾患を引き起こす (Majno and Joris, 2004; Nathan, 2002)。したがって生体は免疫系のはたらきを促進および抑制する双方のシステムを備えており，炎症応答を「適切な持続時間および強度」に調節していると考えられている。

マクロファージは Toll-like receptor (TLR) を介した外来異物の認識や貪食，ヘルパーT 細胞に対する抗原提示といった機能により，免疫応答の開始段階を担う細胞である。マクロファージは体内のいたる所に存在し，組織の発生，恒常性維持や組織修復にも役割をもつ (Wynn et al., 2013)。マクロファージの機能的な亜群として M1 および M2 マクロファージが知られる。細菌等の異物を認識した後，炎症誘導に寄与するのは M1 マクロファージであり，TNF-α，IL-12，CXCL10 などの炎症性サイトカインや誘導型 NO 産生酵素を発現し NO を合成することで，Th1 型免疫応答を誘導するとともに抗菌及び抗ウイルス活性，抗腫瘍効果を発揮する (Verreck et al., 2004)。M2 マクロファージは，IL-10 などの抗炎症性サイトカインの発現を通じて炎症抑制や炎症後の組織修復に関与する (Mantovani et al., 2004)。マクロファージの機能面における多様性は発生・分化の起源が異なることに加え，マクロファージが高い可塑性を有する細胞であることに起因する (Sica and Mantovani, 2012)。マクロファージは病原体認識受容体，サイトカイン受容体，G タンパク質共役受容体，核内ホルモン受容体など様々な細胞外シグナルセンサーを介して周囲に存在する様々なシグナルを認識し，その性質を M1 型や M2 型に可逆的に分極化させる。

免疫調節作用や抗ウイルス作用をもつサイトカインとして知られる I 型 IFN (IFN-α, IFN-β 等) は炎症が起きていない状況下でもマクロファージを含む多くの種類の細胞が恒常的に微量産生しており autocrine/paracrine の様式で周囲及び自身の細胞機能を自律的に調節する (Gough et al., 2012)。そのシグナルは微弱であるものの確かな生理的役割をもち，例えばその微弱な I 型 IFN シグナルが I 型 IFN 受容体 (*Ifnar1*) 遺伝子欠損や IFNAR1 タンパクに対する中和抗体によって遮断された場合には，細胞は多量の外因性 I 型 IFN にさらされた際の応答性や，他のサイトカイン／増殖因子 (IL-6, IFN-γ, CSF-1 等) への応答性も低下することが報告されている。このように恒常的 IFN シグナルが他のサイトカイン応答を下支えしている現象は「tonic signaling」あるいは「priming」という用語で呼ばれており，この現象のメカニズムは I 型 IFN シグナリングの構成因子群 (STAT1, STAT2, IRF9 等) がそれら自身 IFN 誘導性遺伝子であることにより説明されている。恒常的 IFN シグナルの欠如は STAT1 の細胞

内発現量の減少をもたらし, STAT1 をシグナル伝達に利用するサイトカイン (I 型 IFN や IFN-ɤ) に対する応答性が低下するとされている。骨髄細胞にマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor: 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, tonic IFN シグナルによる機能調節が起こることが観察されており (Fleetwood et al., 2009), 恒常的な IFN 産生およびそのシグナルはマクロファージの性質に大きく影響すると考えられている。

炎症抑制性サイトカインである IL-10 はマクロファージ, T 細胞, B 細胞など様々な細胞から産生され, T 細胞の活性を抑制することやマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制することを通じて特に Th1 型炎症反応を抑制する (Mosman, 1994)。IL-10 を欠損したマウスでは慢性腸炎を自発的に発症することや (Kühn et al., 1993), 盲腸結紮穿刺 (cecal ligation and puncture: CLP) による敗血症性腹膜炎モデルにおける症状が増悪化する (Latifi et al., 2002) ことが報告されている。また, ヒトにおける IL-10 一塩基多型が潰瘍性大腸炎と関連することが指摘されている (Franke et al., 2008) だけでなく, 小児の炎症性腸疾患患者において IL-10 や IL-10 受容体の機能喪失変異が同定されている (Kotlarz et al., 2012)。これらのことから IL-10 の炎症抑制作用やヒト炎症性疾患との関係は広く知られており, IL-10 産生制御機構の理解は炎症を人為的にコントロールするための基礎知見となると考えられる。I 型 IFN 受容体 IFNAR1 を欠損した BMDM では, LPS 刺激で誘導される IL-10 産生が認められなくなることが報告されている (Chang et al., 2007; Fleetwood et al., 2009)。

マクロファージは炎症性または抗炎症性作用を示す種々の脂質メディエータを産生する (Dennis et al., 2010)。近年, 炎症収束を担う脂質メディエータとしてω3 系の多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) やその代謝物であるプロテクチン・レゾルビン等の脂質由来メディエータが注目されている (Serhan et al., 2008; Simopoulos, 2002)。細胞内での PUFA 合成には脂肪酸伸長酵素や不飽和化酵素が役割をもつ (Cho et al., 1999; Ratledge, 2004)。マクロファージから産生されるこれらの脂質メディエータの量や構成は炎症刺激後の継時推移に伴い変動すること, その変動メカニズムには核内受容体 Liver X receptor (LXR) や転写因子 sterol responsive element binding protein 1 (SREBP1) の活性調節や発現誘導が役割をもつことが報告された (Oishi et al., 2017)。炎症抑制性の性質を示すマクロファージにおいて LXR や SREBP1 の標的遺伝子である脂肪酸伸長酵素や不飽和化酵素の発現が亢進する結果として脂肪酸の不飽和化亢進がみられることから, LXR および SREBP1 標的遺伝子の発現亢進はマクロファージの炎症抑制性質と関連すると考えられる。また, I 型 IFN はマクロファージにおける脂質代謝系に影響をもつことが示唆されている。I 型 IFN により活性化される転写因子 STAT1 と LXR の間には互いに機能を抑制する関係性が

ある (Pascual-García et al., 2013) ことから, I 型 IFN は STAT1 を介して LXR に抑制的に関与している可能性がある。

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，同ファミリータンパクに JAK1, JAK2, JAK3 がある。Tyk2 は I 型 IFN や IL-12，IL-23 の受容体に会合して存在し，それらのサイトカイン刺激によって活性化され，転写因子 STAT をリン酸化することでシグナル伝達を行う (Ghoreschi et al., 2009)。リン酸化された STAT は核へと移行し多様な標的遺伝子発現を誘導する。この経路は JAK-STAT 経路と呼ばれ (Figure 1), IFN を始めとするサイトカインシグナル伝達に必須の経路として考えられている (Leonard and O'Shea, 1998)。

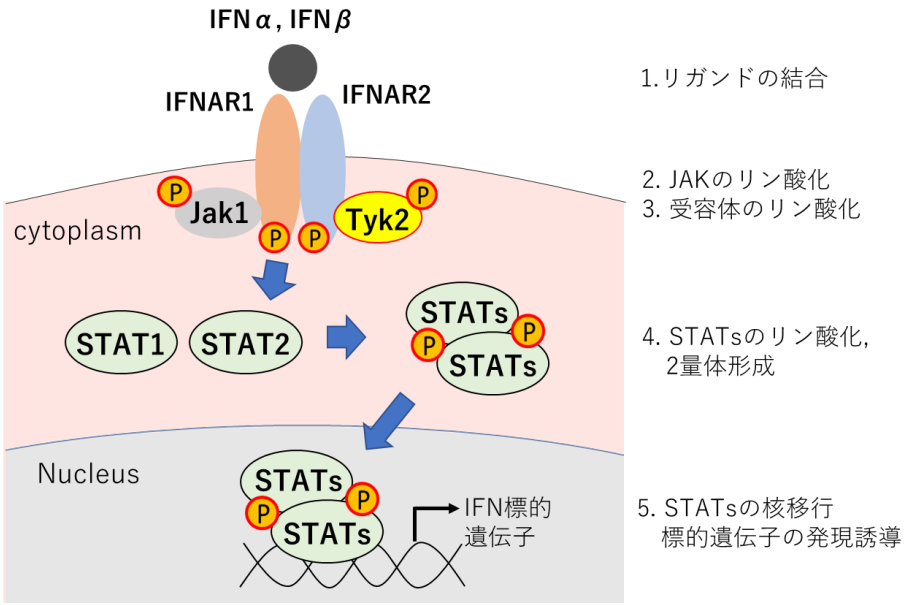

Figure 1.　JAK-STAT 経路

重篤な免疫不全となる高 IgE 症候群の患者 1 例において Tyk2 の遺伝子異常が原因であること (Minegishi et al., 2006) や Tyk2 の一塩基多型が全身性エリテマトーデス多発家系において見られた (Graham et al., 2007; Sigurdsson et al., 2005) ことから, Tyk2 の免疫系調節機構における重要性が近年注目されている。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 (Ishizaki et al., 2011, 2014)。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 (Kamezaki et al., 2004; Karaghiosoff et al., 2003)。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 NF-kB 活性化や MAPK 活性化は低下せず, TNF-α 産生も低下しない一方で I 型 IFN 産生能が低下し，また，I 型 IFN である IFN-β の欠損マウスが 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 (Karaghiosoff et al., 2003)。さらに野生型マクロ

ファージと Tyk2 欠損マクロファージにおける遺伝子発現変動を LPS 刺激下／非刺激下で比較したマイクロアレイの解析論文 (Vogl et al., 2010) では，特に LPS 非刺激下における I 型 IFN 応答性遺伝子群の発現が Tyk2 欠損マクロファージ内で低下していた．同報告中では Tyk2 欠損マクロファージにおいて LXR 標的を含む幾つかの脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現の亢進も観察されている．これらよりマクロファージにおける Tyk2 が恒常的 I 型 IFN 産生あるいは tonic signaling の伝達に役割をもつことや, Tyk2 が脂質代謝関連遺伝子群の発現に影響をもつことが示唆されている。

これらのことから， 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て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ている。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。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。

3．実験方法

3-1　実験材料

P. acnes 加熱死菌は筒井ひろ子博士(兵庫医科大学)より恵与された (Tsutsui et al., 1997)。

実験に用いた試薬の入手先は以下のとおりである。

抗 Actin 抗体 clone:AC15	SIGMA
抗 CREB 抗体 clone: 86B10	Cell Signaling Technology
抗 phospho-CREB (Ser133) 抗体 clone: 87G3	Cell Signaling Technology
抗 PGC-1α ポリクローナル抗体	NOVUS Biologicals
抗 IFNAR1 中和抗体 clone: MAR1-5A3	BioXCell
抗 IFN-ɤ 中和抗体 clone: R4-6A2	BioXCell
抗 IL-10R 中和抗体 clone: 1B1.3A	BioXCell
CP690550	Phoenix Pharmaceuticals
DEPC	SIGMA
Diclofenac Sodium	Wako pure chemical industries
DMEM	SIGMA
FCS	Thermo Scientific
H-89 dihydrochloride	Cell Signaling Technology
IFN-β	Calbiochem
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen
MRS1754	Abcam
Opti-MEM	GIBCO
Prostaglandin E_2	AdipoGen
Pyridone 6	Santa Cruz Biotechnology
Recombinant murine M-CSF	PEPROTECH
RPMI-1640	SIGMA
SR-18292	Cayman chemical
TRI Reagent	SIGMA
ZM-241385	AdooQ Bioscience

その他の試薬については特に言及しない限り市販の特級試薬を用いた。

3-2　使用動物及び飼育条件

BALB/c 系統 WT マウスは日本チャールズリバーより購入し, Specific pathogen free (SPF) 条件下で飼育し使用した。BALB/c 系統 Tyk2 遺伝子欠損マウス (Shimoda et al., 2000) は下田和哉博士 (宮崎大学) より恵与され, SPF 条件下で飼育し使用した。全ての実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に従って行った。

3-3　細胞培養

マウス腹腔常在細胞および骨髄由来マクロファージは, 8 %ウシ胎児血清 (FCS, 56℃, 30 分間非動化処理), 100 U/mL ペニシリン G, 100 μg/mL 硫酸ストレプトマイシン及び 0.15% $NaHCO_3$ を含む RPMI-1640 (RPMI) 培地を用いて 37℃, 5% CO_2 の条件下で培養した。

3-4　マウス骨髄採取及び骨髄由来マクロファージへの分化誘導

マウス大腿骨より回収した骨髄細胞を RPMI 培地中に放出させた。室温, 1500 rpm, 5 分間遠心分離したあと上清を除去し, 1 mL の 1×溶血バッファー (154 mM NH_4Cl, 14 mM $NaHCO_3$, 64.7 μM EDTA-2Na, pH 7.3) に懸濁し 2 分間室温にて静置させた。FCS 含有 RPMI 培地 5 mL を加えてから室温, 1500 rpm, 5 分遠心分離を行い, 上清を除去した後, 10 cm dish に 1×10^7 cells を播種し, M-CSF (PEPROTECH, 100 ng / mL) を含む RPMI 培地 10 mL で 6 日間培養し BMDM 分化誘導を行った。

3-5　サイトカイン産生量および PGE_2 産生量の測定

細胞培養上清中および腹腔洗浄液中のサイトカイン濃度および PGE_2 濃度の測定は, 以下の表に示したキットを用い, 添付のプロトコールに従って行った。

Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 Quantikine ELISA kit	R&D Systems
Mouse IL-6 Uncoated ELISA	Thermo Fisher Scientific
Mouse TNF-α Uncoated ELISA	Thermo Fisher Scientific
Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go! kit 2nd Generation	eBioscience
Prostaglandin E_2 ELISA kit	Cayman chemical

3-6　定量 RT-PCR 法による解析

1) Total RNA の調製

BMDM を培養して適宜刺激を行った後に培地を除去し, TRI Reagent 400 μL を加えて Total RNA を調製した。ピペッティングにより細胞を溶解させ, クロロホルム 80 μL を加えてボ

ルテクッスミキサーで 10 秒間激しく撹拌した。室温で 5 分間静置した後, 4℃, 13000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清 (水層) の RNA 画分を別の 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し, 移した水層と等量のイソプロパノールを加えて転倒混和した。室温で 5 分間静置した後, 4℃, 13000 rpm で 15 分間遠心分離し, RNA を沈殿させた。得られた RNA は 500 µL の 75%エタノール/ in DEPC 処理滅菌水を加えて洗浄し, 風乾させた後, 適当量の DEPC 処理滅菌水に溶解させた。RNA 溶液の濃度は NanoDrop Lite (Thermo scientific) を用いて測定した。

腹腔常在細胞については GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma) を用いて添付のプロトコールに従って RNA を抽出した。

2) 逆転写酵素反応

逆転写酵素反応は ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて行った．Total RNA 1 µg 相当に対して, randam primer (TOYOBO) 25 pmol, 5×buffer (TOYOBO) 5 µL, 2 mM dNTP mixture (TOYOBO) 6 µL, 100 U/µL ReverTra Ace 0.5 µL, DEPC 処理滅菌水を用いて混和し, 全量 25 µL とした。これを i Cycler (Bio-Rad Laboratories) にて, 30℃で 10 分間, 42℃で 40 分間, 99℃で 5 分間反応させ cDNA サンプルとした。

3) 定量 PCR 法

反応は相対定量法 (KAPA SYBR® FAST qPCR Kit, KAPA Biosystems) を用いて行った。鋳型 cDNA 1 µL に対して, 10 µM Forward primer 0.2 µL, 10 µM Reverse primer 0.2 µL, 5×Mixture 5 µL, ROX 0.2 µL, DW を用いて反応溶液が全量で 10 µL となるように調製した。これを Mx3005P® real-time PCR system (Stratagene) を用いて, まず, 94℃ 30 秒間反応させ, 初期変性を行った。次に, 95℃で 3 秒間の変性, 60℃で 30 秒間のアニーリングと合成を 1 サイクルとし, 40 サイクル反応させた。解析はサイクル比較法 (ΔΔCt 法) により行った。

PCR に使用したプライマーは以下の通りである。

gene	Forward	Reverse
Abca1	AAAACCGCAGACATCCTTCAG	CATACCGAAACTCGTTCACCC
Actb	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
Cxcl10	GTGAGAATGAGGGCCATAGG	TTTTGGCTAAACGCTTTCATT
Fads2	TCCATCTGGACCTGGACTTC	GATGTGGGACAGGAGGAGAA
Il10	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	TTTTCACAGGGGAGAAATCG
Irf7	CCAGTTGATCCGCATAAGGT	GAGCCCAGCATTTTCTCTTG

Ppargc1a	TTGACTGGCGTCATTCGGG	TCGCAGGCTCATTGTTGTACT
Ppargc1b	CTCTGACACGCAGGGTGG	ATCCAGGGTCTTCGTAAGCG
Ptgs1	CTTCTCCACGATCTGGCTTC	GCTGCAGGAAATAGCCACTC
Ptgs2	AGAAGGAAATGGCTGCAGAA	GCTCGGCTTCCAGTATTGAG
Scd2	GCATTTGGGAGCCTTGTACG	AGCCGTGCCTTGTATGTTCTG
Srebp1c	GAGCCATGGATTGCACATTT	CAGAGAGGAGGCCAGAGAAG
Tyk2	CAGGATGCTTGATGGTGCTA	CCAGACCTTAGCCTGTGCAT

3-7　ウエスタンブロッティング

BMDM (3×10^5 cells) を培養し, 回収時に培養上清を除去した後, 冷 PBS を用いて洗浄した。PBS を除去した後, 細胞ペレットに対し SDS-PAGE Sample Buffer (0.17M Tris-HCl, pH 7.4, 10% グリセロール, 5% メルカプトエタノール, 2.5% SDS, 1% NP-40, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF, 1mM NaF) を 60 µL 加え, 100℃で 7 分静置し細胞ライゼートとした。

ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE にてタンパク質を分離し, PVDF メンブレン (Millipore) にタンパク質を転写した。このメンブレンに抗体を反応させた後, Immobilon™ Western Chemiluminesent HRP Substrate (Millipore) と反応させ, 化学発光により検出を行った。検出には Imagequant LAS 4000 (GE Healthcare Japan) を用いた。

3-8　腹腔常在細胞を用いた解析

野生型および Tyk2 欠損マウスの腹腔を PBS 3mL を用いて 2 回洗浄し, 遠心後上清を除去した。室温, 1500 rpm, 5 分間遠心分離したあと上清を除去し, 1 mL の 1×溶血バッファー (154 mM NH_4Cl, 14 mM $NaHCO_3$, 64.7 µM EDTA-2Na, pH 7.3) に懸濁し 2 分間室温にて静置させた。FCS 含有 RPMI 培地を 5 mL 加えてから室温, 1500 rpm, 5 分遠心分離を行い, 上清を除去した後, RPMI 培地に再懸濁し, 腹腔常在細胞集団とした。その後 RPMI 培地中での培養・刺激, またはフローサイトメトリーによる腹腔細胞数・好中球数の解析を行った。

3-9　*P. acnes* 投与による急性腹腔内炎症モデルを用いた解析

野生型および Tyk2 欠損マウスに対して, *P. acnes* 加熱死菌 500 µg/head または PBS を腹腔内投与した。投与 12 時間後に PBS を用いて腹腔を洗浄し腹腔内に浸潤した細胞を回収し, 腹腔細胞数・好中球数の解析および腹腔洗浄液中のサイトカイン量の解析を行った。抗 IFNAR1 中和抗体 MAR1-5A3 (200 µg/head), 抗 IFN-γ 中和抗体 R4-6A2 (200 µg/head) および

抗 IL-10R 中和抗体 1B1-3A (300 μg/head) については *P. acnes* 投与の 3 時間前に腹腔内投与した。

3-10　フローサイトメトリーによる解析

(1) 腹腔内好中球数の解析

マウス腹腔の洗浄で得られた腹腔常在細胞または腹腔浸潤細胞を 50 μL の FACS Buffer (FCS 1%を含む PBS) に懸濁した。そこに抗 CD16/CD32 抗体 (BD Pharmingen, clone: 2.4G2) を加え 4℃で 20 分間静置し Fc 受容体のブロッキングを行った。5 分間 1000×g で遠心し上清を除き, 0.5 μg/mL の FITC 標識抗 Gr-1 抗体 (BD Biosciences, clone: RB6-8C5) および PE 標識抗 CD11b 抗体 (Biolegend, clone: M1/70) を含む FACS Buffer 50 μL 中で 4℃ 30 分間反応させた。細胞を FACS Buffer で 2 回洗浄した後, PBS に懸濁し, FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

(2) 細胞内染色法による IL-10 陽性細胞割合の解析

Fc 受容体のブロッキングまでは(1)と同様に行った。5 分間 1000×g で遠心し上清を除き, 0.5 μg/mL の APC 標識抗 F4/80 抗体 (Biolegend, clone: BM8) または APC 標識抗 B220 抗体 (BD Biosciences, clone: RA3-6B2) を含む FACS Buffer 50 μL 中で 4℃ 30 分間反応させた。細胞を FACS Buffer で 2 回洗浄した後, Cytofix/Cytoperm Solution (BD Biosciences) 100 μL に懸濁し 4℃ 20 分間反応させ細胞を固定した。細胞を 0.04%サポニン含有 PBS で 2 回洗浄後, 0.2 μg/mL PE 標識抗 IL-10 抗体 (Biolegend, clone: JES5-16E3) を含む 0.04%サポニン含有 PBS に懸濁し 4℃で一晩反応させた。細胞を 0.04%サポニン含有 PBS で 2 回洗浄後, PBS に懸濁し, FACSCalibur を用いて解析を行った。

データ解析については Cell Quest software (Becton Dickinson) を用いて行った。細胞の Gating については, まず FSC-SSC plot を用いて debris を除去し生細胞集団として扱った。生細胞集団のうち Gr-1 陽性 CD11b 陽性細胞集団を好中球, F4/80 陽性 IL-10 陽性細胞集団を IL-10 産生マクロファージ群, B220 陽性 IL-10 陽性細胞集団を IL-10 産生 B 細胞群として扱った。

3-11　統計解析

グラフには平均値 (Mean 値) を示し, 誤差範囲 S.D.または S.E.をバーで示した。2 群間の連続した数値の比較は Student's t-test により有意水準 0.05 (両側検定) をもって有意差を判定した。

4．実験結果

4-1　マクロファージの *Cxcl10* 遺伝子発現における Tyk2 の役割

マウスマクロファージ様細胞株 J774 細胞を用いたケモカイン発現の解析により，定常状態および *P. acnes* 死菌刺激による誘導時の双方で Tyk2 ノックダウンにより発現が大きく減弱するケモカインとして CXCL10 を見出した (data not shown)。CXCL10 はマクロファージを含め様々な細胞から分泌され (Xu et al., 2012), Th1 細胞を遊走させるケモカインであり，古典的な M1 マクロファージのマーカーとして知られている。また CXCL10 は I 型 IFN および IFN-γ によって発現が制御される IFN 応答性遺伝子として知られている (Hamilton et al., 1989; Luster et al., 1985; Mori et al., 2004)。

Tyk2 が IFN シグナルを介してマクロファージの遺伝子発現に関与するかを確かめるために，野生型および Tyk2 欠損マウスより採取した骨髄細胞を M-CSF 存在下に培養し骨髄由来マクロファージ BMDM を調製した。マクロファージの刺激には TLR4 リガンドである LPS，および TLR2/9 を活性化する *P. acnes* 死菌 (Kalis et al., 2005) を用いた。*Cxcl10* 遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により解析した結果，未刺激時および *P. acnes* 死菌，LPS による刺激時のいずれにおいても *Cxcl10* 遺伝子発現は Tyk2 欠損により有意に抑制された (Figure 2A)。マクロファージの IFN 刺激への応答における Tyk2 の寄与を確かめるため，野生型および Tyk2 欠損 BMDM に対し Type I IFN である IFN-β を外因的に添加する実験を行った。Tyk2 欠損 BMDM では，野生型と比較して弱いながらも，IFN 応答性遺伝子である *Irf7* および *Cxcl10* の mRNA 発現が有意に誘導された (Figure 2B)。

次に恒常的な IFN シグナルの関与を調べるため，抗 IFNAR1 中和抗体を用いて IFN シグナルを阻害する実験を行った。野生型 BMDM において抗 IFNAR1 中和抗体処理により，*Irf7* および *Cxcl10* 発現は有意に減弱した (Figure 2C)。

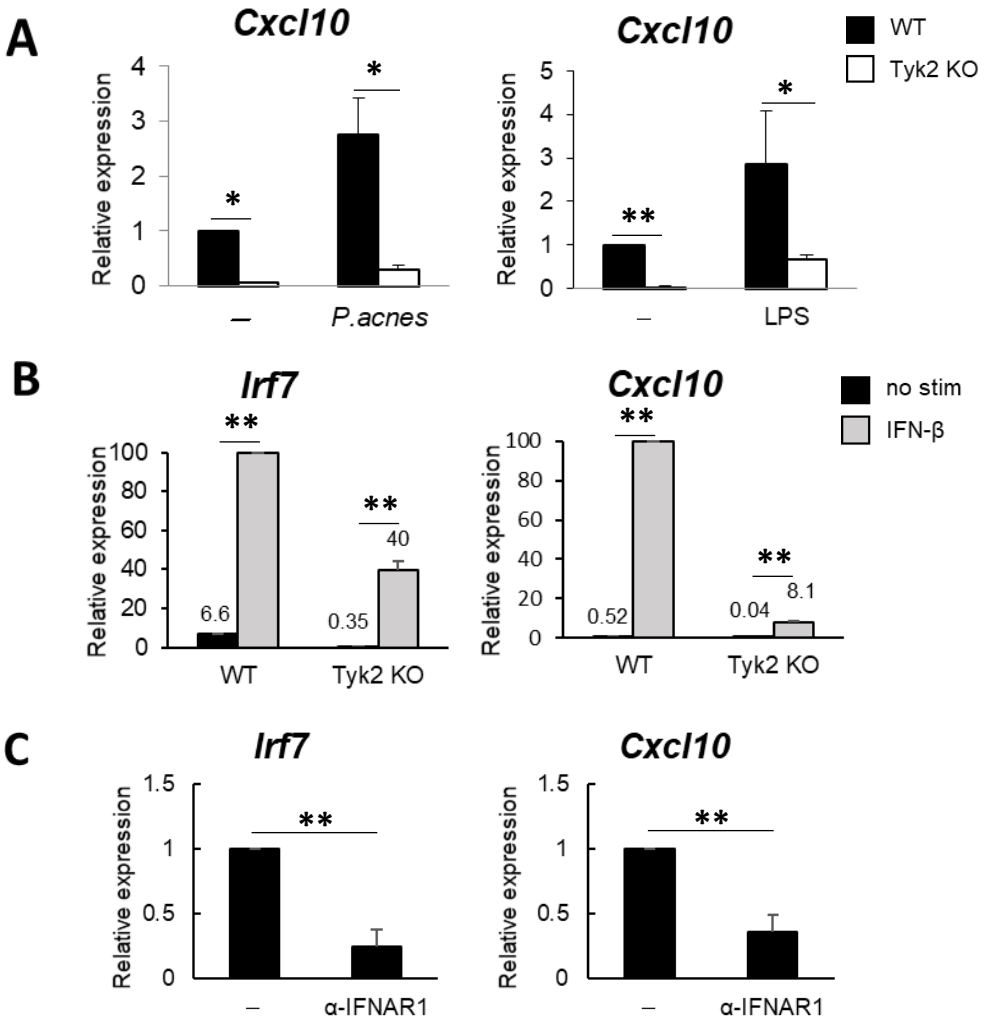

Figure 2. マクロファージの Cxcl10 遺伝子発現における Tyk2 の寄与

(A) BMDM に対し *P. acnes* (10 μg/mL)または LPS (100 ng/mL)で刺激を 2 時間行い, total RNA を抽出し, *Cxcl10* 遺伝子発現について定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)。

(B) BMDM に対し IFN-β (20 U/mL)を 24 時間処置し, total RNA を抽出し, *Irf7*, *Cxcl10* 遺伝子発現について定量的 PCR 法により検出した。グラフには野生型 IFN-β 処理時の値を 100 としたときの相対値を示した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$)。

(C) BMDM に対し IFNAR1 中和抗体 (50 ng/mL)で 24 時間処理を行い, total RNA を抽出し, *Cxcl10* 遺伝子発現について定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$)。

4-2　脂質代謝関連遺伝子発現における Tyk2 の寄与

次にマクロファージの炎症抑制的性質の指標として脂肪酸の不飽和化などに関わる, LXR 標的遺伝子群に着目した。野生型および Tyk2 欠損マウスより骨髄由来マクロファージを調製し, LXR の転写標的である脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量について定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果, Tyk2 欠損マクロファージでは定常状態における *Abca1* (コレステロール排出輸送体), *Fads2* (脂肪酸不飽和化酵素), *Scd2* (ステアロイル CoA 不飽和化酵素)および *Srebp1c* (転写因子 SREBP1 をコードする遺伝子) といった脂質代謝関連遺伝子発現が有意に増加していた (Figure 3A)。

次に Tyk2 がどのように脂質代謝関連遺伝子発現に関与するのか調べるため, Tyk2 キナーゼ活性の寄与について JAK 阻害剤を用いて検討した。Tyk2 を含め JAK を広く阻害する 2 種の低分子化合物 Pyridone 6 (Thompson et al., 2002), CP690550 (Changelian et al., 2003) を用いた。骨髄由来マクロファージにおいて定量的 RT-PCR 法により脂質代謝関連遺伝子発現を解析した結果, Pyridone 6, CP690550 のいずれの処理においても Abca1 遺伝子発現が野生型マクロファージにおいて Tyk2 欠損マクロファージと同程度まで亢進した。また *Scd2, Fads2* 遺伝子発現もまた野生型マクロファージにおける発現亢進が見られた。一方で *Srebp1c* 遺伝子発現については, JAK 阻害による影響は見られなかった (Figure 3B)。

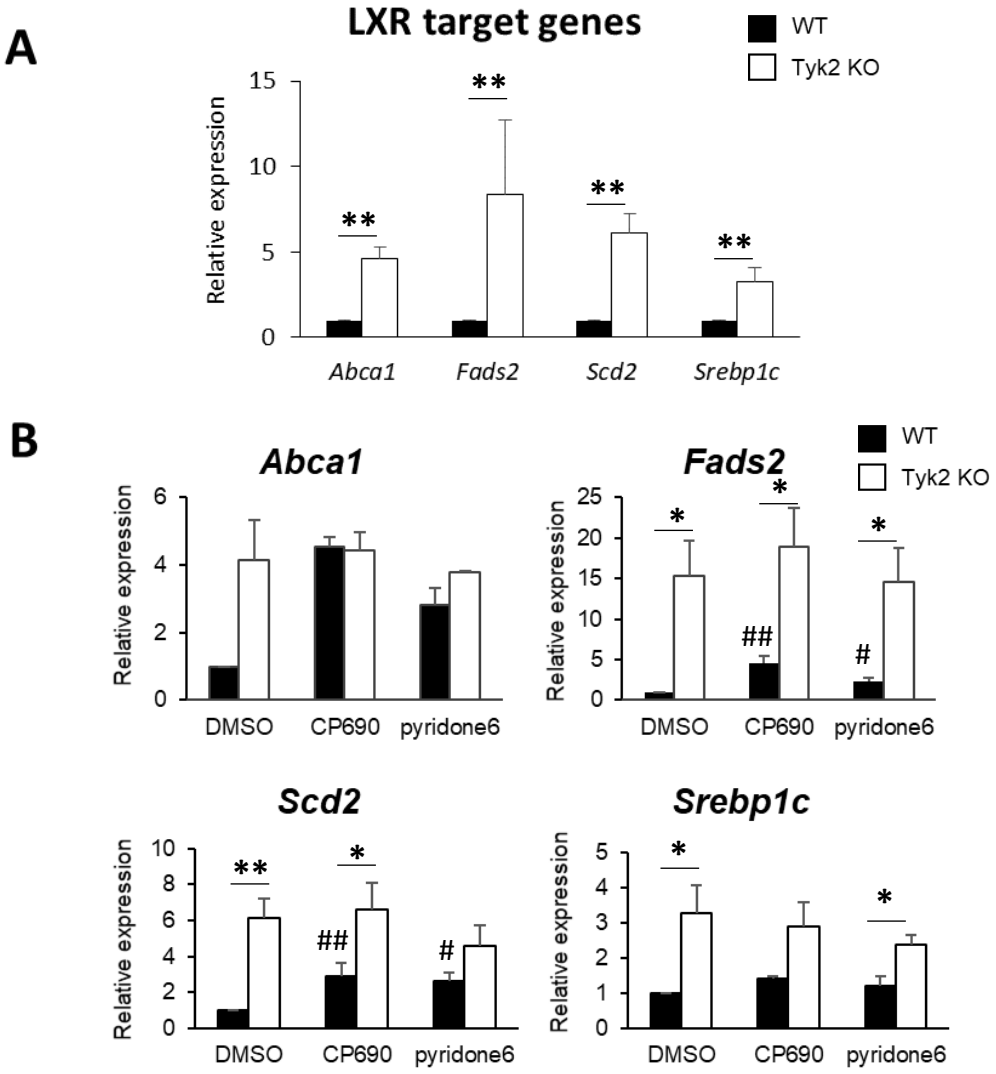

Figure 3. 脂質代謝関連遺伝子発現における Tyk2 の寄与

A) BMDM から total RNA を抽出し, *Abca1, Fads2, Scd2, Srebp1c* 遺伝子発現について定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$)。

B) BMDM に対し CP690550 (CP690, 10 μM)または Pyridone6 (10 μM)を 24 時間処理し, total RNA を抽出し, *Abca1, Fads2, Scd2, Srebp1c* 遺伝子発現について定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=4~5, Abca1 のみ n=2)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ compared with WT, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$ compared with DMSO)。

4-3　脂質代謝関連遺伝子発現における IFN 経路の関与

次に Tyk2 が促進的に寄与する IFN 経路が脂質代謝関連遺伝子群の発現に関与するかを確かめる実験を行うこととした。未刺激定常状態における脂質代謝関連遺伝子発現への IFN シグナルの関与を検討するため, 抗 IFNAR1 中和抗体を用いて恒常的な IFN シグナルを阻害する実験を行った。野生型および Tyk2 欠損マウス骨髄由来マクロファージにおいて抗 IFNAR1 中和抗体を 24 時間処理し, 脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量について定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果, 野生型マクロファージでは *Abca1* mRNA 発現が抗 IFNAR1 中和抗体処理により亢進した (Figure 4A 左)。*Fads2* の発現は抗 IFNAR1 中和抗体処理による変化は見られなかった (Figure 4A 右)。

Figure 2 の実験から Tyk2 欠損マクロファージでは恒常的な IFN シグナルの減弱が示唆されたため, 次に外因的な IFN 添加による脂質代謝関連遺伝子群発現への影響度合いを検討する実験を行った。野生型および Tyk2 欠損マウス骨髄由来マクロファージにおいて IFN-β を 4 時間処理し, 脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量について定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果, Tyk2 欠損マクロファージの *Scd2* 発現が IFN-β 処理により有意に減弱し, *Abca1* および *Srebp1c* では減弱傾向が見られたが, *Fads2* 発現には IFN-β 処理は影響しなかった (Figure 4B)。

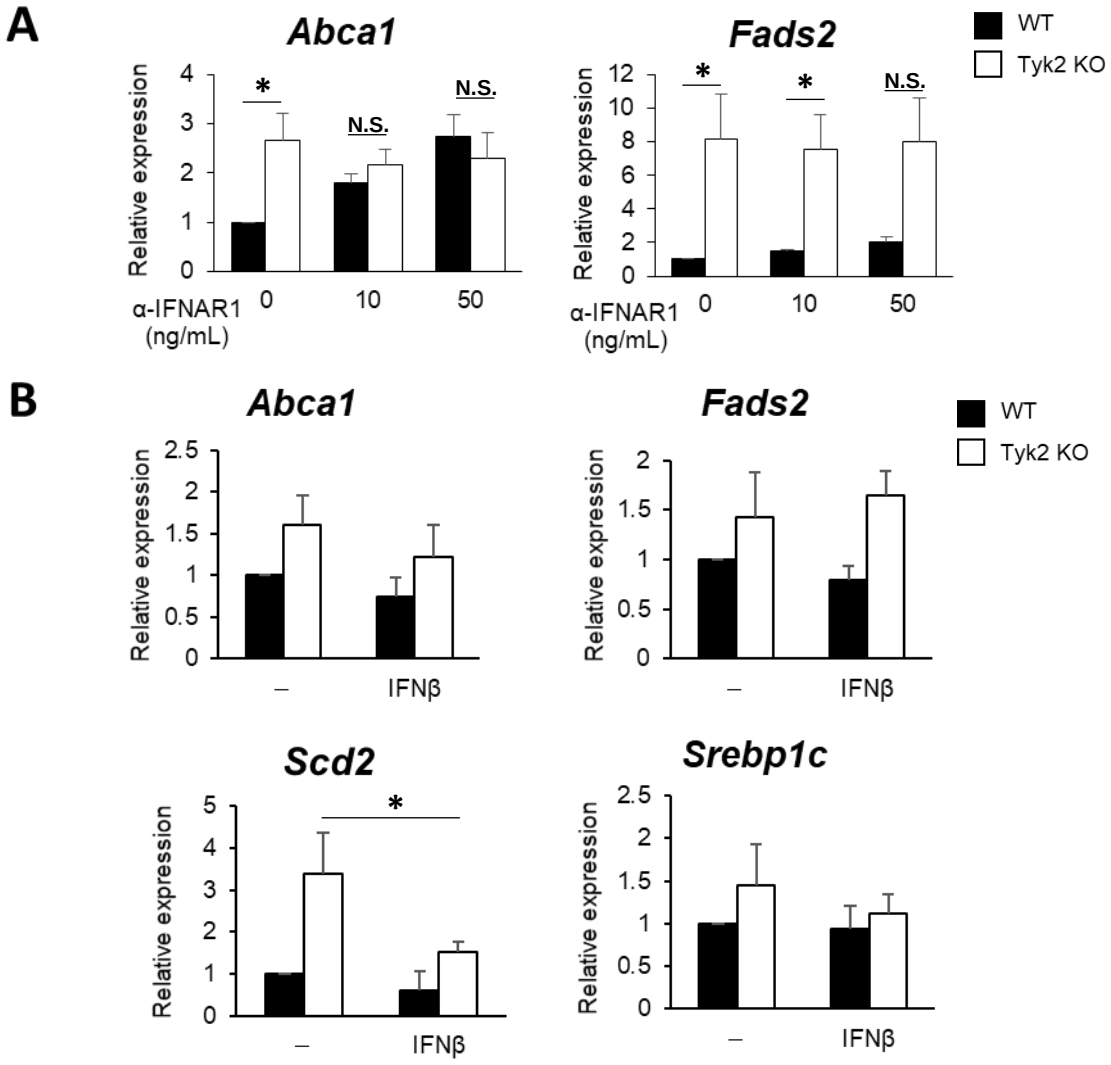

Figure 4.　脂質代謝関連遺伝子発現における IFN 経路の影響

A) BMDM に対し抗 IFNAR1 中和抗体で 24 時間処理を行い, total RNA を抽出し, *Abca1*, *Fads2* 遺伝子発現について定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=3) を示している。有意差は Student's t-test により検定した (*: $P < 0.05$, N.S.: not significant)。

B) BMDM に対し IFN-β (20 U/mL)で 4 時間刺激を行い, total RNA を抽出し, *Abca1, Fads2, Scd2, Srebp1c* 遺伝子発現について定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (*: $P < 0.05$)。

4-4　マクロファージの IL-10 産生における Tyk2 の影響

抗炎症性サイトカインである IL-10 は T 細胞等の免疫細胞の活性を抑制することやマクロファージの炎症抑制性性質を誘導することが知られ, 現在までに IL-10 欠損マウスを用いて様々な炎症性疾患が増悪化する報告が数多くなされている (Kühn et al., 1993; Latifi et al., 2002)。IL-10 産生制御機構の理解は炎症をコントロールするうえで重要と考えられる。マクロファージからの IL-10 産生には I 型 IFN 受容体 IFNAR1 を介したシグナルを必要とする報告がなされているものの (Chang et al., 2007), Tyk2 の関与については検討されていなかった。

マクロファージの IL-10 産生における Tyk2 の寄与を調べるため, BMDM を *P. acnes* で 6 時間刺激した際の培養上清中 IL-10 産生量を定量した。その結果, Tyk2 欠損マクロファージでは刺激誘導性の IL-10 産生が増加していた (Figure 5)。

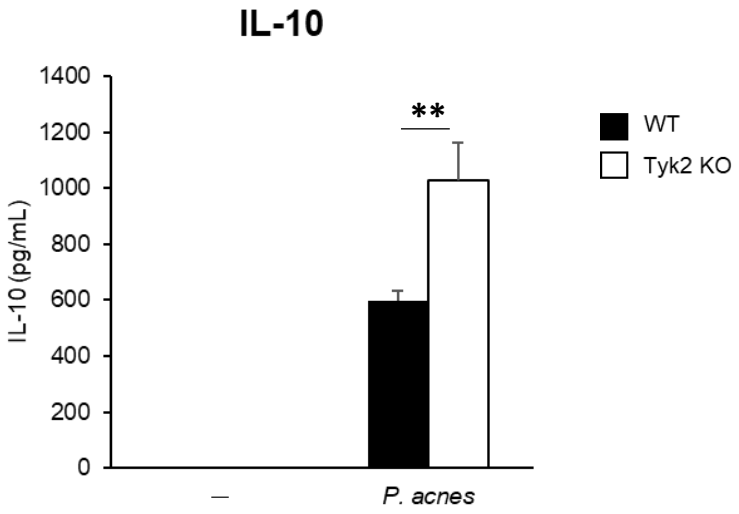

Figure 5. マクロファージの IL-10 産生における Tyk2 の関与

BMDM に対し *P. acnes* (20 μg/mL) で 6h 刺激を行い, 培養上清中の IL-10 産生量を ELISA 法により定量した。グラフは Mean+SD (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$)。

4-5　*P. acnes* 誘導性腹腔内炎症における Tyk2 の関与

炎症応答における Tyk2 の役割を調べるために, マウス腹腔に *P. acnes* 死菌を投与することで誘導される急性腹腔内炎症モデルを用いた検討を行った。腹腔内への好中球 (Gr-1 陽性, CD11b 陽性細胞) の浸潤数を炎症のパラメータとして評価した。その結果, *P. acnes* 投与 12 時間後に観察される腹腔内好中球数の増加は Tyk2 欠損マウスで有意に抑制された (Figure 6A)。*P. acnes* 投与による好中球浸潤について, 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による IFN シグナルの阻害は影響を与えなかった (Figure 6B)。また腹腔洗浄による細胞の回収後, その腹腔洗浄液中に含まれるサイトカイン量を ELISA 法により定量した。その結果, 炎症性サイトカイン IL-6, TNF-α の量は野生型マウスで *P. acnes* 投与による産生が見られたが Tyk2 欠損マウスでは有意に抑制された。一方で, 抗炎症性サイトカイン IL-10 量については野生型マウスでは *P. acnes* 投与後においても検出限界以下だったが Tyk2 欠損マウスでは産生が認められた (Figure 6C)。

Tyk2 欠損マウスにおいてのみ見られた腹腔内 IL-10 量の増加が Tyk2 欠損マウスにおける炎症抑制の原因であるかを調べるために, 抗 IL-10R 中和抗体を用いて IL-10 シグナルを阻害する実験を行った。Tyk2 欠損マウスに対し *P. acnes* 投与前に抗 IL-10R 中和抗体を投与した群において, *P. acnes* 投与により誘導される腹腔内総細胞数および好中球数がいずれも野生型における応答と同程度まで増加した (Figure 6D)。

また, Tyk2 欠損マウスの腹腔内において IL-10 産生が変化している細胞を同定するために, 細胞表面マーカーと細胞内サイトカインを同時に染色することで解析を行った。その結果, B 細胞 (B220 陽性細胞) 群においては野生型と Tyk2 欠損マウス間で IL-10 陽性細胞割合に差が見られなかったが, マクロファージ (F4/80 陽性細胞) 群において Tyk2 欠損による IL-10 陽性細胞割合の増加が観察された (Figure 6E)。

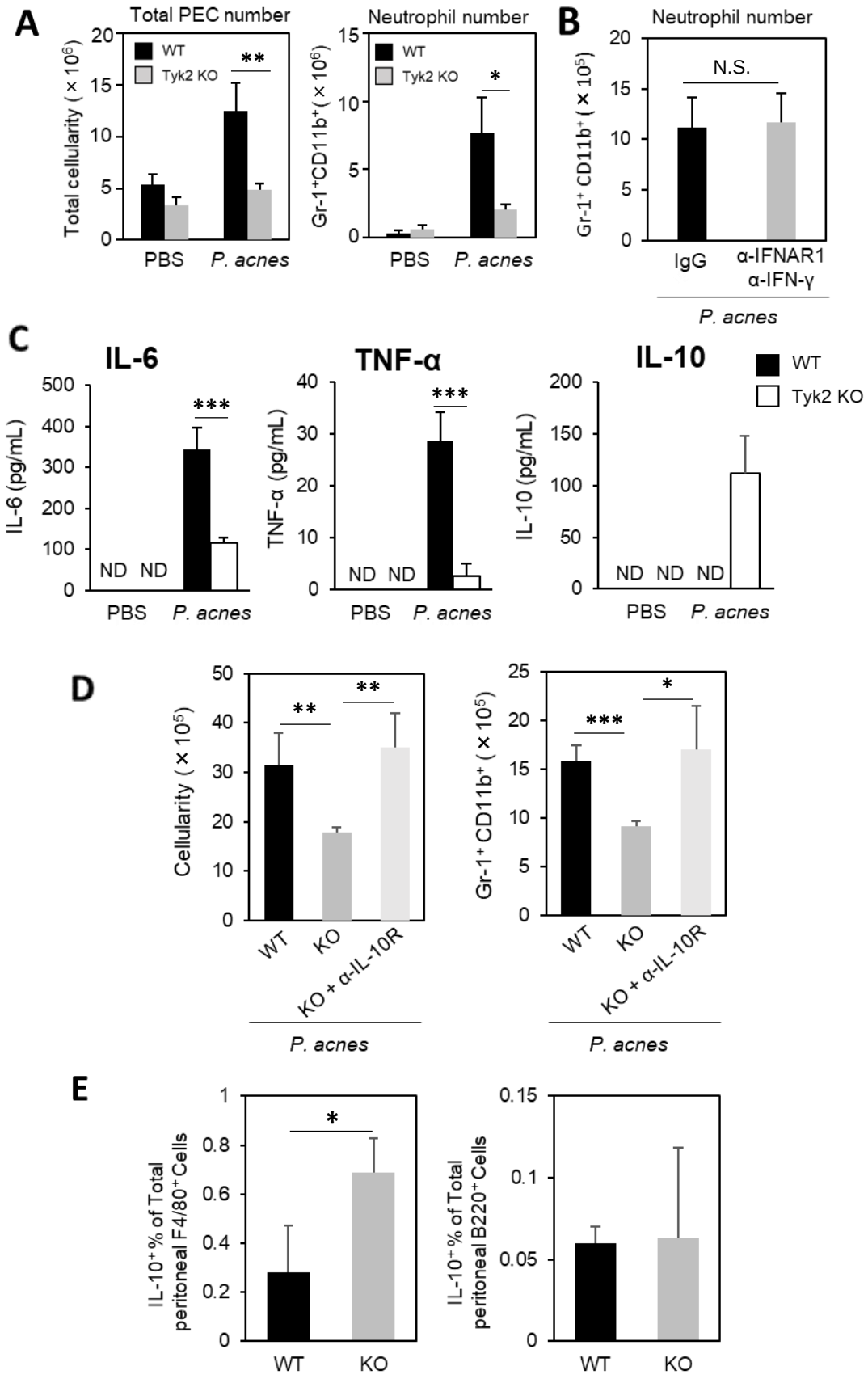
A
Total PEC number
Total cellularity (×10⁶)
WT
Tyk2 KO
**
PBS
P. acnes
Neutrophil number
Gr-1⁺CD11b⁺(×10⁶)
*
B
Neutrophil number
Gr-1⁺ CD11b⁺ (×10⁵)
N.S.
IgG
α-IFNAR1
α-IFN-γ
P. acnes
C
IL-6
TNF-α
IL-10
IL-6 (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
***
ND
D
Cellularity (×10⁵)
Gr-1⁺ CD11b⁺ (×10⁵)
WT
KO
KO + α-IL-10R
E
IL-10⁺% of Total peritoneal F4/80⁺Cells
IL-10⁺% of Total peritoneal B220⁺Cells

Figure 6. *P. acnes* 誘導性腹腔内炎症における Tyk2 の関与

(A) 野生型および Tyk2 欠損マウスに対し *P. acnes* (500 μg/head)または PBS を腹腔内投与し, 12 時間後に腹腔洗浄を行い細胞を回収し, 腹腔総細胞数, 腹腔好中球数についてフローサイトメトリーにより解析した。グラフは Mean+SD (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)。

(B) 野生型および Tyk2 欠損マウスに対し抗 IFNAR1 中和抗体(α-IFNAR1, 200 μg/head)および抗 IFN-ɤ 中和抗体(α-IFN-ɤ, 200 μg/head)を腹腔内投与した。その 3 時間後に *P. acnes* (500 μg/head)を腹腔内投与し, 12 時間後に腹腔洗浄を行い細胞を回収し, 腹腔好中球数についてフローサイトメトリーにより解析した。グラフは Mean+SD (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (N.S. not significant)。

(C) 野生型および Tyk2 欠損マウスに対し *P. acnes* (500 μg/head)または PBS を腹腔内投与し, 12 時間後に腹腔洗浄を行い洗浄液中の各サイトカイン量を ELISA 法により定量した。グラフは Mean+SD (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (***: $P < 0.001$, ND: not detected)。

(D) 野生型および Tyk2 欠損マウスに対し抗 IL-10R 中和抗体(α-IL-10R, 300 μg/head) を腹腔内投与した。その 3 時間後に *P. acnes* (500 μg/head)を腹腔内投与し, 12 時間後に腹腔洗浄を行い細胞を回収し, 腹腔総細胞数, 腹腔好中球数についてフローサイトメトリーにより解析した。グラフは Mean+SD (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$)。

(E) 野生型および Tyk2 欠損マウスに対し *P. acnes* (500 μg/head)を腹腔内投与し, 2 時間後に BFA (100 μg/head) を腹腔内投与し, さらに 3 時間後に腹腔細胞を回収し「実験方法 3-10 (2)」に記述した方法により IL-10 陽性細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。グラフは Mean+SD (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (*: $P < 0.05$)。

4-6　マクロファージの IL-10 産生経路における Tyk2 の役割

マクロファージにおける IL-10 産生に寄与するキナーゼとして protein kinase A (PKA) が知られる。PKA は転写因子 CREB を介した *Il-10* mRNA の転写促進 (Alvarez et al., 2009) や, 転写により生じた mRNA の安定化制御に寄与することで IL-10 産生を正に制御する(Nemeth et al., 2005)。PKA を活性化する上流の因子としては, 細胞外に存在するアデノシンとその受容体を介したシグナル, および prostaglandin E_2 (PGE_2) とその受容体を介したシグナルが知られており, そのどちらも菌体刺激時のマクロファージにおける IL-10 産生を促進することが報告されている (MacKenzie et al., 2013; Nemeth et al., 2005)。

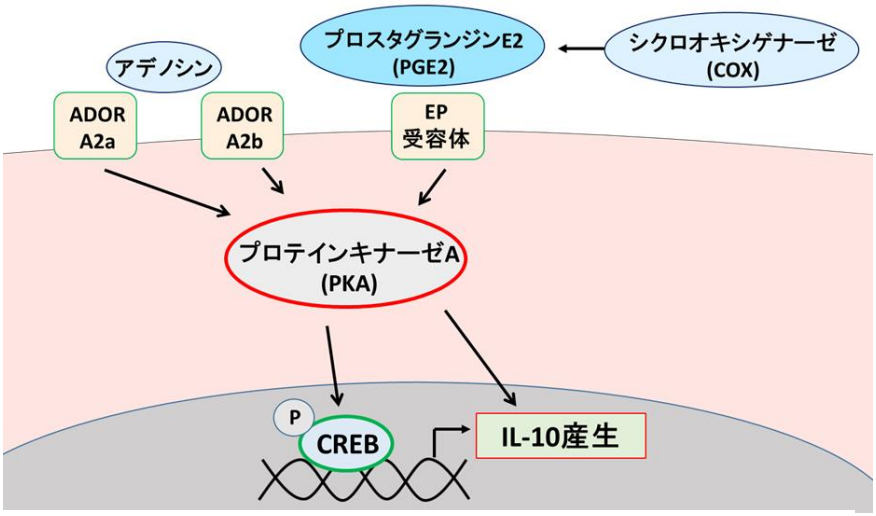

Figure 7. アデノシンおよび PGE_2 による IL-10 産生経路

まずアデノシンを介する経路において Tyk2 が関与するかを調べた。アデノシンは細胞表面上に局在する CD39/CD73 によって細胞外 ATP から変換され, ADORA1/A2a/A2b/A3 受容体に作用し PKA 活性化を介したシグナルを伝達する。腹腔常在細胞を未刺激または *P. acnes* 存在下で 6 時間培養した際の A2a, A2b 受容体の mRNA (*Adora2a, Adora2b*) 発現を調べたところ, A2a 受容体については Tyk2 の有無による影響が見られない一方で A2b 受容体については Tyk2 欠損による mRNA 発現亢進が観察された (Figure 8A)。

Tyk2 欠損細胞において外因性のアデノシン添加によるシグナル伝達が亢進するかどうかを調べるため, BMDM に対して *P. acnes*, アデノシンそれぞれ単独および共刺激を行い, 受容体下流の PKA の活性化の指標として CREB のリン酸化をウエスタンブロット法により検出した。PKA 活性化の阻害には PKA 阻害剤 H-89 Dihydrochloride (H-89)を用いた。その結果, *P. acnes* とアデノシンを共刺激した条件下において, Tyk2 欠損 BMDM では野生型と比較して CREB リン酸化が亢進した (Figure 8B)。マクロファージの自己分泌・傍分泌アデノシンシグナルがマクロファージの IL-10 産生に影響を及ぼすかを検討するため, BMDM に対し *P.*

acnes, アデノシン A2a 受容体阻害剤 ZM-241385 (Poucher et al., 1995), アデノシン A2b 受容体阻害剤 MRS1754 (Ji et al., 2001) をそれぞれ組み合わせて処置し, 培養上清中への IL-10 産生を ELISA 法により検出した。その結果, *P. acnes* 刺激下の Tyk2 欠損 BMDM における IL-10 産生増強はアデノシン受容体阻害剤 2 種の併用による影響が見られなかった (Figure 8C)。

次に PGE_2 を介する経路において Tyk2 が関与するかを調べた。PGE_2 は, 細胞膜等に存在するアラキドン酸から cyclooxygenase (COX) を介して細胞内で生合成されるエイコサノイドであり, その受容体である EP1/2/3/4 を介してシグナルを伝達する。EP 受容体のうち IL-10 産生に関わると考えられているのは EP2 および EP4 であり, cyclic AMP を介した PKA 活性化および下流の CREB リン酸化が行われる (MacKenzie et al., 2013)。

PGE_2 はマクロファージの菌体成分刺激時における IL-10 産生を促す先行研究 (Strassmann et al., 1994) があることから, 定常時のマウス腹腔洗浄液中に含まれる PGE_2 量を調べた。その結果, Tyk2 欠損マウス腹腔では野生型に比較して PGE_2 量の有意な増加が見られた (Figure 9A)。次に PGE_2 産生に関わる COX の mRNA 発現に Tyk2 の影響があるかを調べた。主に菌体刺激のない定常状態において発現が高い COX である *Cox-1* の mRNA 発現は, Tyk2 欠損腹腔常在細胞において有意に増強していた (Figure 9B 左)。また菌体刺激等に応じて誘導される *Cox-2* の発現については, 腹腔常在細胞を in vitro で *P. acnes* 刺激した際に Tyk2 欠損細胞において増強する傾向が見られた (Figure 9B 右)。

Tyk2 欠損細胞において PGE_2 によるシグナル伝達が亢進しているかどうかを調べるため, BMDM に対して *P. acnes*, PGE_2 それぞれ単独および共刺激を行い, 受容体下流の PKA の活性化の指標として CREB のリン酸化をウエスタンブロット法により検出した。その結果, *P. acnes* と PGE_2 を共刺激した条件下において, Tyk2 欠損 BMDM では野生型と比較して CREB リン酸化が亢進した (Figure 9C)。

PGE_2 経路に関わる因子の阻害が IL-10 産生に影響を及ぼすかを検討するため, 腹腔常在細胞に対し *P. acnes*, COX 阻害剤 Diclofenac ナトリウム, PKA 阻害剤 H-89 をそれぞれ組み合わせて処置し, 培養上清中への IL-10 産生を ELISA 法により検出した。その結果, *P. acnes* 刺激により誘導される IL-10 産生は Diclofenac および H-89 で顕著に抑制され, 特に PKA 阻害である H-89 の効果が強く観察された (Figure 9D)。

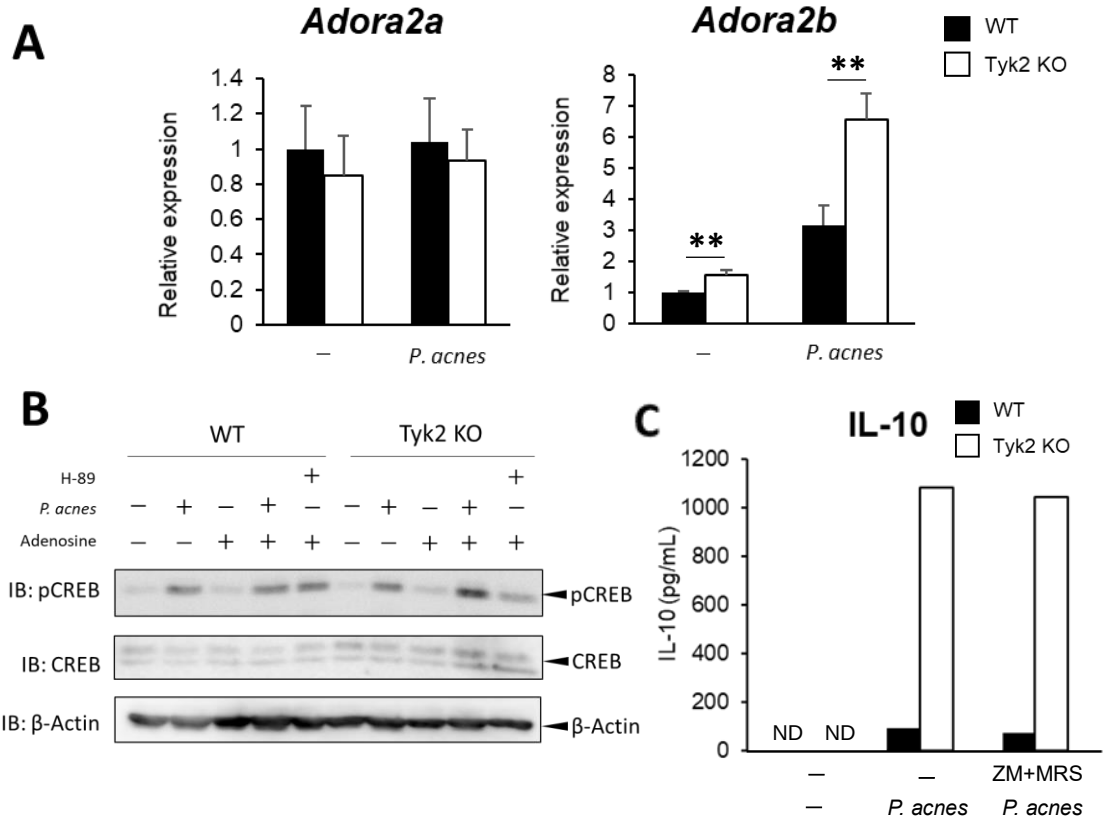

Figure 8.　アデノシン経路における Tyk2 の役割

A) 野生型および Tyk2 欠損マウスの腹腔常在細胞を採取し, *P. acnes* 20 μg/mL で 6 時間刺激した後細胞を回収し total RNA を抽出し，定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$)。

B) BMDM に対し H-89 10 μM を 1 時間前処置した後, *P. acnes* 20 μg/mL, Adenosine 100 μM を 30 分間処置し細胞ライゼートを回収し，ウエスタンブロット法により検出した。

C) BMDM に対し ZM-241385 (ZM) 10 μM, MRS1754 (MRS) 10 μM を 1 時間前処置した後, *P. acnes* 20 μg/mL を 6 時間処置し，培養上清中の IL-10 量を ELISA 法により定量した。グラフには独立した 2 回の実験のうち代表の 1 回分のデータを示した。(ND: not detected)

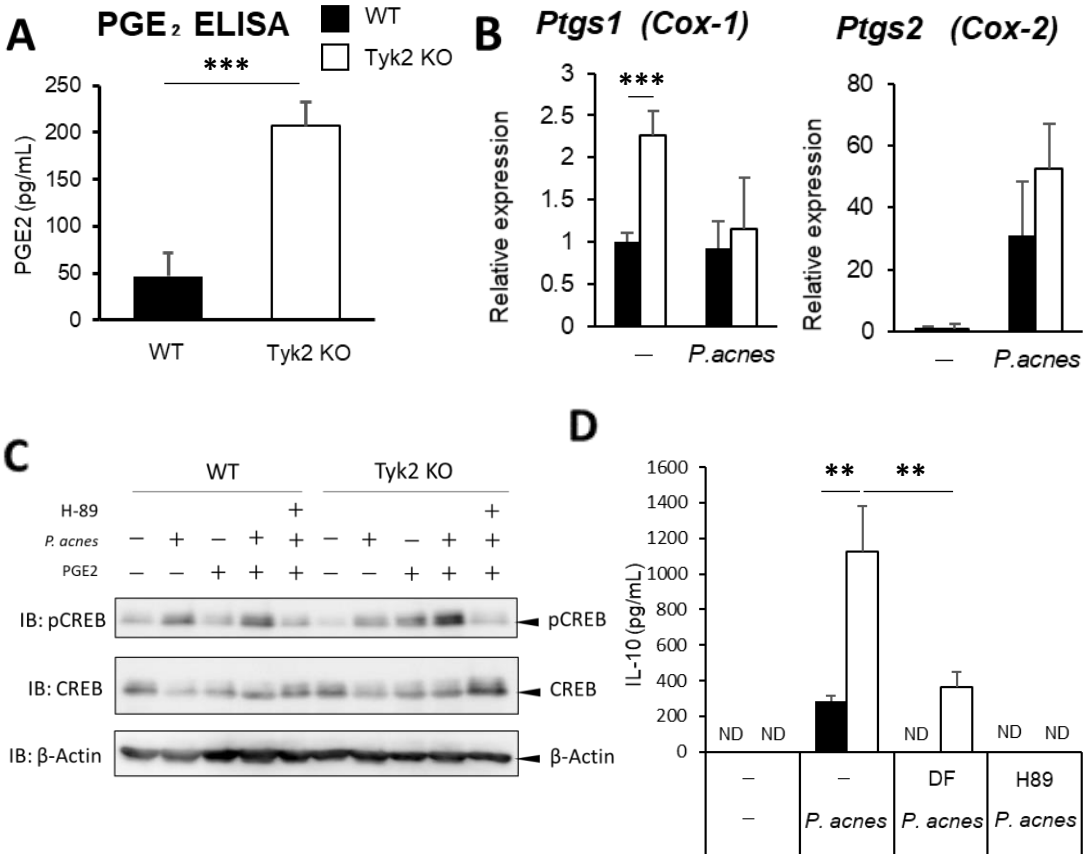

Figure 9.　COX-PGE$_2$ 経路における Tyk2 の役割

A) 野生型および Tyk2 欠損マウスの腹腔を PBS 3mL で洗浄し，洗浄液中の PGE$_2$ 量を ELISA 法で定量した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (***: $P < 0.001$)。

B) 野生型および Tyk2 欠損マウスの腹腔常在細胞を採取し, *P. acnes* 20 μg/mL で 6 時間刺激した後細胞を回収し total RNA を抽出し，定量的 PCR 法により検出した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (***: $P < 0.001$)。

C) BMDM に対し H-89 10 μM を 1 時間前処置した後, *P. acnes* 20 μg/mL, PGE$_2$ 10 μM を 30 分間処置し細胞ライゼートを回収し，ウエスタンブロット法により検出を行った。

D) 腹腔常在細胞(3.0×10^5 cells)に対し Diclofenac ナトリウム (DF) 10 μM, H-89 10 μM を 1 時間前処置した後, *P. acnes* 刺激を 6 時間行い培養上清中の IL-10 量を ELISA 法で定量した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$, ND: not detected)。

4-7　Tyk2 の PGC-1α を介した IL-10 産生への影響

前項で Tyk2 が COX-PGE_2-PKA 経路を介した IL-10 産生に抑制的に関与する結果を得た。Tyk2 がどのようなタンパク質を介して COX 発現量や PKA 活性化を抑制するのかを調べるために, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α (PGC-1α) に着目した。PGC-1α は核内受容体に結合する転写コアクチベータであり, LXR を含む広範な核内受容体に対してその活性を補助する役割を担う (Finck and Kelly, 2006)。PGC-1α により発現が誘導される標的遺伝子に COX-1 が含まれる (Casuso et al., 2017) ことや, Tyk2 と PGC-1α は直接結合する (Raje et al. 2017) ことから, Tyk2 欠損細胞では PGC-1α の量や活性化状態が変動している可能性が考えられる。

PGC-1α の mRNA 発現量について定量的 PCR 法により検出したところ Tyk2 欠損 BMDM において PGC-1α 発現の有意な増強が観察された (Figure 10A)。一方で PGC-1α のファミリータンパク質である PGC-1β の発現には Tyk2 欠損による影響はなかった。また, BMDM における PGC-1α タンパクの発現量をウエスタンブロット法により調べたところ Tyk2 欠損細胞において PGC-1α 量が増加した (Figure 10B)。

Tyk2 欠損マクロファージにおける IL-10 産生増強に PGC-1α 機能の増強が関与しているかを調べるために, PGC-1α 活性を阻害することが報告 (Sharabi et al., 2017) されている化合物 SR-18292 を用いて検討した。その結果, *P. acnes* 刺激で誘導される BMDM からの IL-10 産生は SR-18292 処置によって抑制された (Figure 10C)。特に Tyk2 欠損 BMDM において野生型と比較して阻害剤による抑制効果が大きく表れ, SR-18292 存在下においては野生型と Tyk2 欠損 BMDM 間での IL-10 産生量に差が見られなくなった。

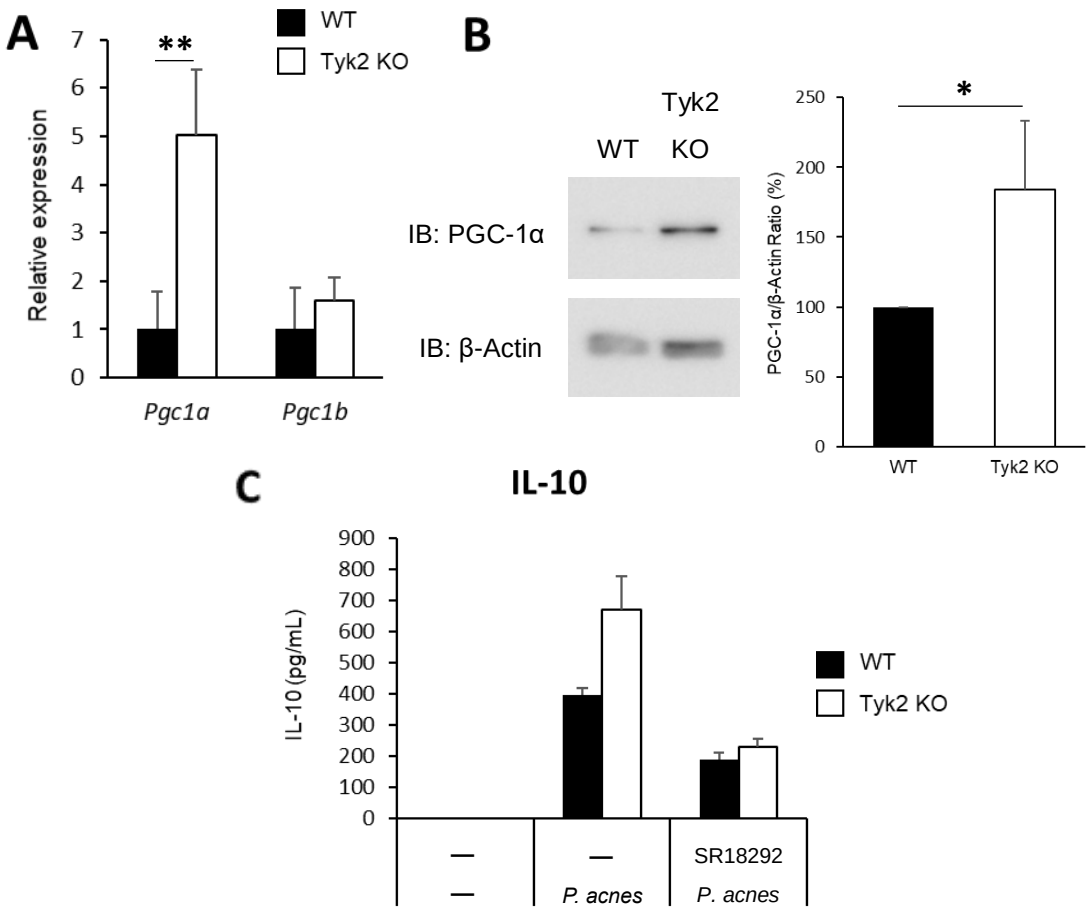

Figure 10.　Tyk2 の PGC-1α を介した IL-10 産生への影響

A) BMDM から total RNA を抽出し定量的 PCR 法により解析した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (**: $P < 0.01$)。

B) BMDM 細胞ライゼートでウエスタンブロットを行い PGC-1α タンパク量を検出した。さらに β-Actin を基準とした際の PGC-1α の Intensity Ratio を算出した。グラフは Mean+SEM (n=3)を示している。有意差は Student's t-test により検定した (*: $P < 0.05$)。

C) BMDM に対し SR-18292 (20 μM)を 16 時間前処置した後, *P. acnes* 20 μg/mL を 6 時間処置し, 培養上清中の IL-10 量を ELISA 法により定量した。グラフには 1 回の実験を triplicate で測定した際のエラーバーを示した。

5. 考察, 結論

本研究ではマクロファージ細胞機能調節における Tyk2 の役割の解明を目的とし, ケモカイン CXCL10 の発現制御, LXR 標的である脂質代謝関連酵素群の発現制御, 抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生制御に Tyk2 が役割をもつことを見出した。

CXCL10 発現制御における Tyk2 の役割

マウス骨髄由来マクロファージを用いた解析により, Tyk2 が IFN シグナルを介してマクロファージの遺伝子発現に対し役割をもつことが確かめられた。

Tyk2 欠損マクロファージの *Cxcl10* mRNA 発現は *P. acnes*, LPS といった菌体刺激がない未刺激定常状態において減弱した (Figure 2A) ことから, *Cxcl10* の恒常的な発現量は Tyk2 によって一定量に維持されていることが示唆された。同時に I 型 IFN 標的遺伝子である *Irf7* の発現が Tyk2 欠損マクロファージにおいて低下していた (Figure 2B) こと, *Cxcl10* は I 型 IFN である IFN-α により誘導される報告がある (Mori et al., 2004) ことから, *Cxcl10* 発現における Type I IFN 経路の重要性が確認された。ただし, Tyk2 欠損マクロファージでは IFN-β 刺激に応答して *Irf7, Cxcl10* mRNA 誘導が野生型マクロファージと同等に見られたことから, 外因性的な IFN 添加によるシグナル伝達は Tyk2 欠損によって完全に障害されないことが示された。このことはマウス由来細胞における IFN 応答における Tyk2 の寄与が部分的なものであり, ファミリー分子である他の JAK によって代償されるとする先行研究の観察とも一致している (Karaghiosoff et al., 2000; Shimoda et al., 2000)。未刺激時の野生型と Tyk2 欠損間の *Cxcl10* 発現量の差が IFN-β 刺激後の条件下における発現量の差に反映されていると考えられた。抗 IFNAR1 中和抗体処理により野生型マクロファージの未刺激下における *Cxcl10* 発現が減弱したこと (Figure 2C), Tyk2 は IFN-α および IFN-β の産生に関与する (Karaghiosoff et al., 2003) ことに加え, I 型 IFN 産生の転写誘導を司る役割をもつ転写因子 *Irf7* の発現 (Honda et al., 2005) が Tyk2 欠損マクロファージで顕著に減少していたことから, これらを総合すると Tyk2 は恒常的な IFN 産生に寄与することで tonic IFN シグナリングを媒介しており, *Cxc10* 等の IFN 応答性遺伝子発現を維持することが確かめられた。

脂質代謝関連遺伝子発現制御における Tyk2 の役割

骨髄由来マクロファージにおける LXR 標的遺伝子発現の解析により, マクロファージの遺伝子発現制御において Tyk2 は *Abca1*, *Scd2*, *Fads2*, *Srebp1c* の発現を異なった様式で抑制することが示された。*Abca1* は JAK キナーゼ活性により, *Scd2* は IFN-β により強く発現抑制を受けており, *Fads2* および *Srebp1c* は JAK キナーゼ活性・Type I IFN のどちらによる影響も受けていないことを明らかにした。

JAK 阻害剤による JAK ファミリーキナーゼ阻害実験の結果, *Abca1*, *Fads2*, *Scd2* 発現に対

する JAK キナーゼ活性が重要であることが示唆され, 遺伝子ごとに JAK キナーゼ活性の寄与度が異なることが示唆された (Figure 3B)。抗 IFNAR1 中和抗体処理による恒常的な IFN シグナルの阻害実験の結果, *Abca1*, *Scd2* 発現は Tyk2 および IFNAR1 を介した恒常的なシグナルによって負に制御されており, *Fads2* 発現は恒常的な IFN シグナルによる抑制は見られないことが示唆された (Figure 4A)。外因的 IFN-β 添加により脂質代謝関連遺伝子発現への IFN シグナルの寄与を確かめた結果, Tyk2 欠損マクロファージの *Scd2* 発現が IFN-β 処理により発現が抑制され, 野生型マクロファージとの発現差が縮小した (Figure 4B)。したがって *Scd2* は, IFN-β による恒常的な発現抑制を強く受ける遺伝子であることが示唆された。*Fads2* および *Srebp1c* の発現については, IFN シグナルの阻害や IFN-β 添加による影響をほとんど受けず, *Srebp1c* については JAK 阻害の影響も受けなかったことから, Tyk2 がキナーゼ活性および IFN 非依存的にこれらの遺伝子発現を抑制する機構の存在が示唆され, 今後解析が望まれる。

マクロファージの IL-10 産生, *P. acnes* 誘導性腹腔内炎症における Tyk2 の役割

マウスへの *P. acnes* 投与による腹腔内炎症モデルを用いた解析により, Tyk2 はマクロファージからの IL-10 産生を抑制し菌体刺激に対する生体防御に必要な炎症応答を誘導する役割を担うことが示された。またマウス骨髄由来マクロファージおよび腹腔常在細胞を用いた解析により, Tyk2 はマクロファージにおいて PGC-1α 発現, COX-1 発現, および PGE_2 量とそのシグナル経路に抑制的に寄与することで IL-10 産生誘導機構を抑制することが新たに示された。

Tyk2 欠損 BMDM では野生型と比較して *P. acnes* 刺激で誘導される IL-10 産生が有意に増強していた (Figure 5)。上述のようにマクロファージにおいて恒常的あるいは菌体成分刺激時の I 型 IFN 応答は Tyk2 欠損により有意に減弱するため，IL-10 産生増加が IFN シグナリング低下の結果として起こった可能性が考えられた．しかしながら，Chang らによる先行研究では IL-10 産生における IFN シグナルの必須性が示されている。すなわちマクロファージにおける LPS 誘導性の IL-10 産生には, LPS 受容体である TLR4 依存性の I 型 IFN 産生経路ならびに産生された IFN によるシグナルが必要であることが，インターフェロン誘導に関わるアダプタータンパク質 TRIF および転写因子 IRF3, インターフェロン受容体 IFNAR1 の各欠損マウスを用いた実験により示されている (Chang et al., 2007)。Tyk2 が IFN 産生やシグナル伝達に役割をもつことは広く認められた概念であるが，この考えのみでは Tyk2 欠損と IFNAR1 欠損マクロファージで異なる結果が得られた理由を説明できない。従って本研究の結果からは，Tyk2 が IFN シグナルとは独立に IL-10 産生に関与する機構の存在が示唆される。ただし筆者のこの仮定は IL-10 産生増加に菌体成分刺激誘導性の IFN が必須であること

を否定するものではない。本研究の結果では，Tyk2 欠損マクロファージにおいて tonic IFN シグナルの低下により IFN 応答遺伝子である *Cxcl10* や *Irf7* mRNA 発現量のベースライン低下が認められていた一方で，これらの mRNA 発現量は菌体成分刺激 (*P. acnes* 及び LPS) や IFN-β 刺激後には Tyk2 欠損マクロファージにおいても増加が見られた (Figure 2A, B)。これらの結果は Chang らの研究で示された IL-10 産生の必要条件である菌体成分刺激時の IFN 産生及び IFN シグナルが Tyk2 欠損により消失しているわけではないことを担保している。

野生型マウスにおいて抗 IFNAR1 中和抗体および抗 IFN-γ 中和抗体の併用投与によって IFN シグナルの阻害を行っても *P. acnes* 投与後の腹腔好中球浸潤は正常に起こった (Figure 6B)ため, 腹腔内炎症において誘導性 IFN とは独立した Tyk2 の役割が存在することが考えられる。Tyk2 欠損マウスに対して IL-10 受容体中和抗体の前処置を行うと, *P. acnes* 投与後の腹腔内好中球浸潤は野生型マウスと同程度に見られた (Figure 6D) ことから腹腔内炎症において IL-10 量の増加が Tyk2 欠損マウスにおける炎症抑制を引き起こしていると考えられる。また腹腔細胞のうち B220 陽性 B 細胞集団では IL-10 陽性細胞割合に差がなく F4/80 陽性マクロファージ集団では Tyk2 欠損によって IL-10 陽性細胞割合が増加した (Figure 6E) 結果から, 腹腔に存在するマクロファージにおいて Tyk2 が IL-10 産生を抑制する役割を担うと考えられる。

Tyk2 を欠損した腹腔常在細胞では野生型と比較して定常状態および *P. acnes* 刺激後の *Adora2b* mRNA 発現が亢進していたこと (Figure 8A), および BMDM に対するアデノシンと *P. acnes* 共刺激時に Tyk2 欠損 BMDM では野生型と比較して CREB リン酸化が増強された (Figure 8B) ことから, Tyk2 欠損細胞においてアデノシン曝露時の応答性が亢進していることが示唆される。一方でアデノシン受容体の阻害剤は BMDM を *in vitro* で刺激した際の IL-10 産生に影響を与えなかった (Figure 8C)。このことは培養した BMDM からは機能するために十分な量のアデノシン産生が起きておらず, その培養条件下での野生型と Tyk2 欠損 BMDM 間の IL-10 産生の差はアデノシンシグナルが理由ではなかったことを示している. しかしながら, 生体の炎症組織局所などアデノシン産生が亢進する環境下においては, Tyk2 がアデノシン応答性を抑制的に調節する役割を果たしている可能性が考えられる。

Tyk2 欠損腹腔常在細胞では野生型と比較して定常状態の *Cox-1* mRNA 発現が増加していたこと (Figure 9B), および Tyk2 欠損マウス腹腔では野生型マウスと比較して COX により産生されるエイコサノイドである PGE_2 の量が増加していた (Figure 9A) ことから, Tyk2 は COX を介した PGE_2 産生に抑制的に関与することが示唆される。また BMDM に対する PGE_2 と *P. acnes* 共刺激時に Tyk2 欠損 BMDM では野生型と比較して CREB リン酸化が誘導された (Figure 9C) ことから, Tyk2 欠損細胞において PGE_2 シグナル伝達が亢進していることが

示唆される。さらに Tyk2 欠損細胞で観察される IL-10 産生促進は COX および PKA の阻害剤処置により顕著に抑制された (Figure 9D) ことから, Tyk2 欠損細胞では COX-PGE_2-PKA 経路を介した IL-10 産生誘導が亢進していることが考えられる。

COX-1 の転写誘導を制御する因子として核内受容体に結合する転写コアクチベータである PGC-1α に着目した。Tyk2 欠損細胞で PGC-1α の mRNA およびタンパク量が増加していた結果 (Figure 10A, 10B), および PGC-1α は *Cox-1* mRNA 発現を正に制御する (Casuso et al., 2017) ことから, Tyk2 欠損細胞では PGC-1α を介した COX-1 発現誘導が促進されていると考えられる。PGC-1α は核内受容体 LXR の転写活性を促進する報告がある (Oberkofler et al., 2003) ことから, Tyk2 欠損マクロファージにおける LXR 標的遺伝子群の発現増加 (Figure 3A) にも PGC-1α が関与している可能性が考えられる。また, PGC-1α 活性を阻害すると報告されている化合物 SR-18292 の処置により Tyk2 欠損細胞における *P. acnes* 刺激時の IL-10 産生量が減少した (Figure 10C) ことから, Tyk2 欠損細胞において発現増加がみられた PGC-1α が, 菌体刺激に応じた IL-10 産生誘導の強度に対して実際に寄与していることが示唆された。Tyk2 は自身のキナーゼ活性に非依存的に PGC-1α とタンパク質ータンパク質相互作用することが報告 (Raje et al. 2017) されており, Tyk2 は PGC-1α と直接相互作用してその機能を抑制する可能性も考えられるが本研究での解明には至らなかった。今後検証が望まれる。

- **結論**

本研究では, マクロファージにおいて I 型 IFN を介した Tyk2 の機能を解析し, Tyk2 は恒常的な IFN シグナルに寄与することで Cxcl10 発現の維持や LXR 標的遺伝子の抑制に関与し, マクロファージの炎症性性質の維持に役割をもつことが示唆された。また I 型 IFN を介さない Tyk2 の役割について解析し, Tyk2 は腹腔常在性マクロファージからの IL-10 産生を抑制することで生体防御に必要となる炎症応答を誘導する役割を担うことが明らかとなった。さらに Tyk2 は COX-PGE_2-PKA 経路を抑制し, 炎症応答時におけるマクロファージの IL-10 産生を制御する役割を担うことが, 本研究で新たに明らかとなった。

本研究から, マクロファージにおける Tyk2 阻害が, マクロファージを炎症抑制性の形質へと変化させて効果的な炎症収束を誘導する手段となりうることが示唆され, 炎症性疾患に対する新規治療アプローチとして有望である可能性が示された。

6．参考文献

Alvarez, Y., Municio, C., Alonso, S., Sanchez Crespo, M., and Fernandez, N. (2009). The Induction of IL-10 by Zymosan in Dendritic Cells Depends on CREB Activation by the Coactivators CREB-Binding Protein and TORC2 and Autocrine PGE2. J. Immunol. *183*, 1471–1479.

Casuso, R.A., Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Aragón-Vela, J., Robles-Sanchez, C., Nordsborg, N.B., Hebberecht, M., Salmeron, L.M., and Huertas, J.R. (2017). High-intensity high-volume swimming induces more robust signaling through PGC-1α and AMPK activation than sprint interval swimming in m. triceps brachii. PLoS One *12*, 1–16.

Chang, E.Y., Guo, B., Doyle, S.E., and Cheng, G. (2007). Cutting Edge: Involvement of the Type I IFN Production and Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Production. J. Immunol. *178*, 6705–6709.

Changelian, P.S., Flanagan, M.E., Ball, D.J., Kent, C.R., Magnuson, K.S., Martin, W.H., Rizzuti, B.J., Sawyer, P.S., Perry, B.D., and Brissette, W.H. (2003). Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor. Science (80-.). *302*, 875–878.

Cho, H.P., Nakamura, M., and Clarke, S.D. (1999). Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human Δ-5 desaturase. J. Biol. Chem. *274*, 37335–37339.

Dennis, E.A., Deems, R.A., Harkewicz, R., Quehenberger, O., Brown, H.A., Milne, S.B., Myers, D.S., Glass, C.K., Hardiman, G., and Reichart, D. (2010). A mouse macrophage lipidome. J. Biol. Chem. *285*, 39976–39985.

Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. J. Clin. Invest. *116*, 615–622.

Fleetwood, A.J., Dinh, H., Cook, A.D., Hertzog, P.J., and Hamilton, J.A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on Type I interferon signaling. J. Leukoc. Biol. *86*, 411–421.

Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F.S., Albrecht, M., Nothnagel, M., and Ellinghaus, D. (2008). Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. Nat. Genet. *40*, 1319.

Ghoreschi, K., Laurence, A., and O'Shea, J.J. (2009). Janus kinases in immune cell signaling. Immunol. Rev. *228*, 273–287.

Gough, D.J., Messina, N.L., Clarke, C.J.P., Johnstone, R.W., and Levy, D.E. (2012). Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. Immunity *36*, 166–174.

Graham, D.S.C., Akil, M., and Vyse, T.J. (2007). Association of polymorphisms across the tyrosine kinase gene, TYK 2 in UK SLE families.

Hamilton, T.A., Bredon, N., Ohmori, Y., and Tannenbaum, C.S. (1989). IFN-gamma and IFN-beta independently stimulate the expression of lipopolysaccharide-inducible genes in murine peritoneal macrophages. J. Immunol. *142*, 2325–2331.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka,

A., and Yoshida, N. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature *434*, 772.

Ishizaki, M., Akimoto, T., Muromoto, R., Yokoyama, M., Ohshiro, Y., Sekine, Y., Maeda, H., Shimoda, K., Oritani, K., and Matsuda, T. (2011). Involvement of Tyrosine Kinase-2 in Both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 Axes In Vivo. J. Immunol. *187*, 181–189.

Ishizaki, M., Muromoto, R., Akimoto, T., Sekine, Y., Kon, S., Diwan, M., Maeda, H., Togi, S., Shimoda, K., Oritani, K., et al. (2014). Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation. Int. Immunol. *26*, 257–267.

Ji, X., Kim, Y.-C., Ahern, D.G., Linden, J., and Jacobson, K.A. (2001). [3H] MRS 1754, a selective antagonist radioligand for A2B adenosine receptors. Biochem. Pharmacol. *61*, 657–663.

Kalis, C., Gumenscheimer, M., Freudenberg, N., Tchaptchet, S., Fejer, G., Heit, A., Akira, S., Galanos, C., and Freudenberg, M.A. (2005). Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of Propionibacterium acnes. J. Immunol. *174*, 4295–4300.

Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Matsuda, T., Nakayama, K.I., and Harada, M. (2004). The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. Int. Immunol. *16*, 1173–1179.

Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., and Brem, G. (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. Immunity *13*, 549–560.

Karaghiosoff, M., Steinborn, R., Kovarik, P., Kriegshäuser, G., Baccarin, M., Donabauer, B., Reichart, U., Kolbe, T., Bogdan, C., Leanderson, T., et al. (2003). Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. Nat. Immunol. *4*, 471–477.

Kotlarz, D., Beier, R., Murugan, D., Diestelhorst, J., Jensen, O., Boztug, K., Pfeifer, D., Kreipe, H., Pfister, E., and Baumann, U. (2012). Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. Gastroenterology *143*, 347–355.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell *75*, 263–274.

Latifi, S.Q., O'Riordan, M.A., and Levine, A.D. (2002). Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. Infect. Immun. *70*, 4441–4446.

Leonard, W.J., and O'Shea, J.J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. Annu. Rev. Immunol. *16*, 293–322.

Luster, A.D., Unkeless, J.C., and Ravetch, J. V (1985). γ-Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. Nature *315*, 672–676.

MacKenzie, K.F., Clark, K., Naqvi, S., McGuire, V.A., Nöehren, G., Kristariyanto, Y., van den Bosch, M., Mudaliar, M., McCarthy, P.C., Pattison, M.J., et al. (2013). PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. J. Immunol. *190*, 565–577.

Majno, G., and Joris, I. (2004). Cells, tissues, and disease: principles of general pathology (Oxford

University Press).

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. *25*, 677–686.

Minegishi, Y., Saito, M., Morio, T., Watanabe, K., Agematsu, K., Tsuchiya, S., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., et al. (2006). Human Tyrosine Kinase 2 Deficiency Reveals Its Requisite Roles in Multiple Cytokine Signals Involved in Innate and Acquired Immunity. Immunity *25*, 745–755.

Mori, Y., Hirose, K., Suzuki, K., Nakajima, H., Seto, Y., Ikeda, K., Shimoda, K., Nakayama, K., Saito, Y., and Iwamoto, I. (2004). Tyk2 is essential for IFN-α-induced gene expression in mast cells. Int. Arch. Allergy Immunol. *134*, 25–29.

Mosman, T.R. (1994). Properties and functions of interleukin-10. In Advances in Immunology, (Elsevier), pp. 1–26.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. Nature *420*, 846.

Nemeth, Z.H., Lutz, C.S., Csoka, B., Deitch, E.A., Leibovich, S.J., Gause, W.C., Tone, M., Pacher, P., Vizi, E.S., and Hasko, G. (2005). Adenosine Augments IL-10 Production by Macrophages through an A2B Receptor-Mediated Posttranscriptional Mechanism. J. Immunol. *175*, 8260–8270.

Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., and Patsch, W. (2003). Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha. Biochem. J. *371*, 89–96.

Oishi, Y., Spann, N.J., Link, V.M., Muse, E.D., Strid, T., Edillor, C., Kolar, M.J., Matsuzaka, T., Hayakawa, S., Tao, J., et al. (2017). SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. Cell Metab. *25*, 412–427.

Pascual-García, M., Rué, L., León, T., Julve, J., Carbó, J.M., Matalonga, J., Auer, H., Celada, A., Steffensen, K.R., and Pérez-Navarro, E. (2013). Reciprocal negative cross-talk between liver X receptors (LXRs) and STAT1: effects on IFN-γ–induced inflammatory responses and LXR-dependent gene expression. J. Immunol. 1201393.

Poucher, S.M., Keddie, J.R., Singh, P., Stoggall, S.M., Caulkett, P.W.R., Jones, G., and Collis, M.G. (1995). The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine, A2a selective adenosine receptor antagonist. Br. J. Pharmacol. *115*, 1096–1102.

Raje, V., Derecka, M., Cantwell, M., Meier, J., Szczepanek, K., Sisler, J.D., Strobl, B., Gamero, A., Harris, T.E., and Larner, A.C. (2017). Kinase inactive tyrosine kinase (Tyk2) supports differentiation of brown fat cells. Endocrinology *158*, 148–157.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie *86*, 807–815.

Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat. Rev. Immunol. *8*, 349.

Sharabi, K., Lin, H., Tavares, C.D.J., Dominy, J.E., Camporez, J.P., Perry, R.J., Schilling, R., Rines, A.K., Lee, J., Hickey, M., et al. (2017). Selective Chemical Inhibition of PGC-1α Gluconeogenic Activity

Ameliorates Type 2 Diabetes. Cell *169*, 148–160.e15.

Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., and Kobayashi, S. (2000). Tyk2 plays a restricted role in IFNα signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. Immunity *13*, 561–571.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J. Clin. Invest. *122*, 787–795.

Sigurdsson, S., Nordmark, G., Göring, H.H.H., Lindroos, K., Wiman, A.-C., Sturfelt, G., Jönsen, A., Rantapää-Dahlqvist, S., Möller, B., and Kere, J. (2005). Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. Am. J. Hum. Genet. *76*, 528–537.

Simopoulos, A.P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. J. Am. Coll. Nutr. *21*, 495–505.

Strassmann, G., Patil-Koota, V., Finkelman, F., Fong, M., and Kambayashi, T. (1994). Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. J. Exp. Med. *180*, 2365–2370.

Thompson, J.E., Cubbon, R.M., Cummings, R.T., Wicker, L.S., Frankshun, R., Cunningham, B.R., Cameron, P.M., Meinke, P.T., Liverton, N., Weng, Y., et al. (2002). Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycle: A Jak protein kinase inhibitor. Bioorganic Med. Chem. Lett. *12*, 1219–1223.

Tsutsui, H., Matsui, K., Kawada, N., Hyodo, Y., Hayashi, N., Okamura, H., Higashino, K., and Nakanishi, K. (1997). IL-18 accounts for both TNF-alpha-and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. J. Immunol. *159*, 3961–3967.

Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 4560–4565.

Vogl, C., Flatt, T., Fuhrmann, B., Hofmann, E., Wallner, B., Stiefvater, R., Kovarik, P., Strobl, B., and Müller, M. (2010). Transcriptome analysis reveals a major impact of JAK protein tyrosine kinase 2 (Tyk2) on the expression of interferon-responsive and metabolic genes. BMC Genomics *11*.

Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature *496*, 445.

Xu, W., Joo, H., Clayton, S., Dullaers, M., Herve, M.-C., Blankenship, D., De La Morena, M.T., Balderas, R., Picard, C., and Casanova, J.-L. (2012). Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10. J. Exp. Med. *209*, 1813–1823.

7. 謝辞

本研究の遂行にあたり，熱心な御指導，御助言を賜りました北海道大学大学院生命科学院衛生化学研究室の松田 正 教授，室本 竜太 講師，柏倉 淳一 講師，鍛代 悠一 助教に深く御礼申しあげます。

本論文を審査していただきました本学研究院薬物動態学研究室の菅原 満 教授，宮崎大学医学部の下田 和哉 教授に御礼申し上げます。下田教授には Tyk2 遺伝子改変マウスを提供していただいたこと，重ねて御礼申し上げます。

実験材料を快く御提供してくださいました兵庫医科大学の筒井 ひろ子 名誉教授に深く感謝申し上げます。

研究面のみならず，様々な面でお世話になりました衛生化学研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に，ここまでの学生生活・研究活動を支えていただきました家族，友人に心から感謝いたします。

2019 年 3 月