

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲 第 号
------	--------

氏 名 篠田 祥希

論 文 題 目

腎線維化を誘導する M2 マクロファージの極性化機構の解析

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	人見清隆
委 員	名古屋大学教授	大嶋篤典
委 員	名古屋大学教授	菅波孝祥
委 員	名古屋大学助教	辰川英樹
委 員	名古屋大学助教	辻 徳治

論文審査の結果の要旨

本論文は慢性腎臓病から腎不全への病態進行過程で生じる線維化を対象として、免疫系細胞のひとつである M2 型マクロファージがその誘導を引き起こす現象を解析し、その機構においてタンパク質架橋化酵素(トランスグルタミナーゼ)の関与を示したものである。

本論文ではまず、腎線維化を誘導する M2 型マクロファージの極性化機構を解析するうえで、タンパク質架橋化酵素のアイソザイムのひとつ、TG2 に着目した理由について述べている。マクロファージは大きく分けて M1 型と M2 型に極性化されて、炎症や感染防御においてそれぞれ異なる作用をもたらすが、腎の線維化には M2 型が関与することがこれまでに明らかになっている。そのうえで M2 型マクロファージの極性化に際し、ヒトとマウスで共通する極性化マーカー遺伝子として TG2 が見出されていることに着目した。TG2 は生体内に存在する基質となる様々なタンパク質を、カルシウムイオン依存的に架橋してその構造や機能を修飾する多機能酵素であり、これまでも腎臓の他、肝臓や肺などの組織でも線維化に密接に関与することが知られている。

これらを踏まえ、まず論文では個体レベル (*in vivo*) で、線維化進行における TG2 の発現パターンについて、マウスの腎線維化モデル系を用いて生理学および生化学的な解析手法で検証している。その結果、線維化の進行と共に TG2 の発現量が増加をすることや、TG2 ノックアウトマウスでは線維化に伴う発現タンパク質が減少するなど、その病態進行と関与することを初めて示した。この現象はさらに TG2 の酵素活性に対する特異的な阻害剤を用いても示している。腎の線維化進行に TG2 がその酵素活性を通じて関与することを明らかにしたことは、タンパク質架橋化酵素としての機能面からも、また腎線維化の病態形成過程からも重要な知見を与えるものである。

また M2 型マクロファージの関与については、線維化病変部に伴う集積を示すと共に M2 型マクロファージのサブタイプをフローサイトメトリーによって明らかにした。さらに、この線維化を誘導する M2 型マクロファージが骨髄に由来するものであり、線維化への病態進展に関わることを、マウスの骨髄細胞の移植実験によって明確に示すことに成功している。またこの場合の線維化における M2 型マクロファージ誘導で TG2 の発現が関与することを、TG2 ノックアウトマウスでの骨髄移植の場合との比較検討によって示した。これにより、腎の線維化進行においては、骨髄に由来する M2 型マクロファージが TG2 を介した極性化により必須であることを初めて証明した。本論文において、個体での線維化の発症から進展に至る過程で、タンパク質架橋化酵素と M2 型マクロファージの関与を明確に示したことの意義は大きい。

さらに本論文では、細胞レベル(*in vitro*)での研究にも展開をしている。M2 型マクロファージについては、骨髄細胞および細胞株を用いて分化増殖因子による誘導を行い、培養細胞として極性化を再現することができるため、TG2 の関与についてさらに

分子生物学的および細胞生物学的な解析を進めた。

すなわち M2 型マクロファージに分化したヒトおよびマウスの培養細胞を用いて、TG2 の活性阻害や発現抑制が、極性を抑制することを示し、両者の関連性があることを細胞レベルでも明らかにした。そこで続いて、TG2 に依存してなぜ M2 型マクロファージへの極性が誘導されるのかを、特異的な転写産物の網羅的な探索により取り組んだ。その結果、TG2 によって極性が生じる際に有意に変動するいくつかの遺伝子群を明らかにした。このうち、arachidonate-15-lipoxygenase (ALOX15) の発現は M2 型マクロファージ極性化時に増加が再現し、かつ TG2 の活性阻害によって発現が減少した。酵素としての ALOX15 の活性阻害では M2 型マクロファージマーカーの発現は減少し、反応産物としての 15(S)-HETE 処理でマーカー発現が増加した。このことは TG2 が ALOX15 の発現を介して極性を引き起こすことを示すものであり、細胞レベルでの誘導機構を知る上で重要な知見を提供する。またこの知見を個体レベルにあてはめ、線維化させた腎臓で検討したところ、ALOX15 を介しての TG2 による M2 型マクロファージ極性化誘導は再現され、細胞レベルで考えられたメカニズムが正しいことが示された。

以上のように、本論文では、TG2 による M2 型マクロファージの誘導機構が ALOX15 を介し、線維化の病態を進行させることを明らかにした。これまでは細胞外マトリクスを安定化させることが主なタンパク質架橋化酵素の線維化への関与として報告されていたが、本論文での内容は線維化の発症進行における新たな知見を与えるものである。従って本研究内容は関連する病態の進行を防ぐ創薬シーズ開発にも大きく寄与するものであり、本論文が創薬科学の博士学位論文として十分な内容を有すると評価した。