



Title	パイロトシスを介した炎症を制御する新たな分子の機能解析
Author(s)	生駒, 健太
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105577
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (生駒 健太)

論文題名 パイロトーシスを介した炎症を制御する新たな分子の機能解析

論文内容の要旨

自然免疫は感染防御に不可欠である一方、外因性微粒子や内因性結晶、ならびに病原体成分によって過剰に活性化すると、細胞死を伴う炎症反応を介して組織障害や致死性病態をひきおこしうる。例えば、シリカ粒子などの刺激性微粒子は炎症性サイトカイン放出を伴う細胞死を惹起して組織障害をひきおこし、またグラム陰性菌由来成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) はパイロトーシスを誘導してエンドトキシンショックや急性肺障害などの病態に関与する。本論文は二章からなり、第一章では刺激性微粒子による細胞死およびインターロイキン1 α

(interleukin-1 α ; IL-1 α) 放出を抑制する天然化合物Oridoninの抗炎症効果と作用機序を解析した。第二章では、LPS誘導性パイロトーシスに伴い細胞外へ放出される生体内分子に着目し、その炎症病態における新たな機能的役割を明らかにすることを目的として解析を行った。

第一章では、黄砂、シリカ粒子、ならびに尿酸塩結晶・コレステロール結晶などの刺激性微粒子が、マクロファージに貪食されることでファゴリソーム膜損傷を契機に細胞死と炎症性メディエーター放出をひきおこし、組織障害に至る点に着目した。刺激性微粒子は、NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) インフラマソームを介したInterleukin-1 β (IL-1 β) 放出を誘導することが知られている。しかし、微粒子刺激ではNLRP3非依存的機序によりIL-1 α などの炎症性メディエーターが放出される可能性があり、IL-1 α はIL-1 β と同一受容体を介して炎症性シグナルを伝達する。したがって、微粒子誘導性炎症の制御には、NLRP3経路の遮断に加えて、細胞死およびIL-1 α 放出を含む上流過程を抑制する介入が有効であると考えられる。

所属研究室の先行研究により、延命草由来化合物Oridoninがシリカ粒子刺激によるIL-1 α およびIL-1 β 放出を強力に阻害することが見出されていた。そこで本章では、Oridoninが (i) 微粒子刺激による細胞死とIL-1 α 放出を介した炎症をどの程度抑制しうるか、(ii) その抑制がいかなる機序により成立するか、を中心に解析した。野生型およびNlrp3欠損(Nlrp3^{-/-}) マウス由来初代培養マクロファージにおいて、Oridoninはシリカ粒子刺激による細胞死およびIL-1 α 放出を抑制した。さらに、シリカ粒子刺激で上昇するファゴリソーム膜損傷の指標がOridoninにより低下した。加えて、Nlrp3^{-/-}マウスを用いたシリカ粒子誘導性肺炎モデルにおいて、Oridoninの気管内投与はIL-1 α 放出および肺組織傷害を抑制した。以上より、OridoninはNLRP3依存性に限定されない形で、微粒子刺激による細胞死とIL-1 α /IL-1 β 放出を抑え、微粒子誘導性炎症に対して抗炎症効果を示すこと、またその作用はファゴリソーム膜損傷に関連する上流過程の抑制に起因することが示唆された。Oridoninは微粒子誘導性疾患に対する新たな予防・治療薬開発のリード化合物として有望である。

第二章では、LPS誘導性パイロトーシスに伴い放出される分子群が炎症を制御するという観点から、放出分子の同定と機能解析を行った。パイロトーシスは細胞膜孔形成と膜破裂を特徴とし、IL-1 β やInterleukin-18 (IL-18)などの放出を介して炎症反応を惹起する。ノンカノニカルインフラマソーム経路では、細胞質内LPSによりCaspase-4/5 (マウスではCaspase-11) が活性化し、Gasdermin Dの切断を介して細胞膜に小孔が形成される。小孔形成に続き、膜タンパク質Ninjurin-1が膜破裂に関与し、細胞質成分が細胞外へ放出される。しかし、パイロトーシスに伴い放出される分子の全体像、および放出分子が炎症を増悪させるだけでなく制御因子として機能しうるかについては十分に解明されていない。

そこで、マウスマクロファージの細胞質にLPSをトランスフェクションしてパイロトーシスを誘導し、培養上清の質量分析により放出分子 (タンパク質) を網羅的に探索した。その結果、IL-1ファミリー (IL-1 α 、IL-1 β 等) を含む821種の分子が、LPS刺激によるパイロトーシスに伴い細胞外に検出されることが明らかとなった。検出分子群には免

疫・炎症との関連が既知の分子に加え、免疫・炎症制御における役割が未解明の分子が複数含まれていた。そこで、未解明分子の中から、(i) 典型的な分泌シグナルを有さないこと、(ii) 細胞外に検出されることの報告が乏しいこと、(iii) 細胞外で機能しうるドメイン構造を有すること、を基準に候補分子を選定した。

候補分子について、候補分子の遺伝子欠損マウスおよび候補分子に対する抗体を作製し、培養細胞系 (*in vitro*) および生体内 (*in vivo*) で機能解析を行った。その結果、候補分子はLPS誘導性パイロトーシスに伴い細胞外へ放出されることがWestern blottingおよびEnzyme-linked immunosorbent assayにより確認された。また、候補分子はグラム陰性細菌によるエンドトキシンショックモデルにおいて生存率の上昇に寄与した。さらに、候補分子はLPS誘導性肺障害モデルにおいて、炎症症状である血管透過性亢進および好中球浸潤の軽減に寄与した。これらの結果は、パイロトーシスに伴い放出される分子の中に、炎症を増幅させる因子のみならず、過剰炎症を抑制する保護的因子が含まれることを示し、候補分子がLPS誘導性炎症病態における新たな制御因子として機能する可能性を示唆する。

本研究は、第一章において刺激性微粒子により誘導される細胞死とIL-1 α 放出を抑制する化合物Oridoninの抗炎症効果と作用機序の一端を明らかにした。第二章においては、LPS誘導性パイロトーシスに伴う放出分子の全体像を提示するとともに、放出される生体内分子の一部が炎症を抑制的に制御するという概念を支持する知見を得た。これらの成果は、細胞死を介した炎症の制御機序の理解を深化させ、パイロトーシスが関与する疾患に対する新しい治療戦略の確立および治療薬開発につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (生 駒 健 太)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	齊藤 達哉
	副 査	教授	水口 裕之
	副 査	教授	岡田 欣晃

論文審査の結果の要旨

自然免疫は病原体から身を守る重要な防御機構であるが、大気中のシリカや体内で生じる尿酸塩結晶・コレステロール結晶などの刺激性微粒子に対しても過剰に活性化し、炎症性疾患を引き起こす。これらの微粒子はマクロファージに貪食されるとファゴリソソーム膜の損傷を引き金として interleukin-1 α (IL-1 α) や IL-1 β の放出を誘導する。IL-1 β の放出を制御する NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームは治療標的として注目されているが、NLRP3 のみの制御では NLRP3 非依存的に放出される IL-1 α を抑えられず不十分となり得る。一方、プログラム細胞死の一つであるパイロトーシスは、Gasdermin D による形質膜の小孔形成およびNinjurin-1 (NINJ1) による形質膜破裂を特徴とし、IL-1ファミリーのサイトカインに加え高分子量の細胞内分子を放出して炎症を惹起する。しかしながら、細胞死に伴い放出される分子の全容やその生理的機能は十分に解析されていなかった。

生駒氏は、刺激性微粒子による炎症応答を阻害する生薬由来化合物の解析（第一章）と、パイロトーシスを介した炎症を制御する新たな分子の機能解析（第二章）の2つの研究を行った。生駒氏の行った研究の成果は、下記（１）～（６）の通りである。

（１）延命草などのシソ科植物に含まれるジテルペン化合物Oridoninが、シリカ粒子刺激により野生型およびNlrp3欠損マウスマクロファージから誘導される IL-1 α および IL-1 β の放出をいずれも抑制することを明らかにした。その作用機序として、Oridoninがファゴリソソーム膜の損傷を上流で抑えることにより、下流の炎症性サイトカイン放出を阻害していることを示した。

（２）マウス塵肺モデルにおいて、シリカ粒子により誘導される好中球浸潤および組織損傷が IL-1 α 依存的かつ NLRP3 非依存的に生じること、Oridoninの経気管投与によりこれらが有意に抑制されることを明らかにし、Oridoninが微粒子誘導性の NLRP3 非依存的な肺炎に対して抗炎症効果を発揮することを示した。

（３）マウスマクロファージの細胞質に lipopolysaccharide (LPS) をトランスフェクションにより導入してパイロトーシスを誘導し、培養上清の質量分析により821種類の放出タンパク質を同定した。その中から、機能解析がほとんど進んでいない von Willebrand factor A domain-containing protein 5A (VWA5A) を見出した。

（４）遺伝子欠損マウス由来マクロファージを用いた解析により、VWA5Aの放出がCaspase-11、Gasdermin D および NINJ1 に依存する一方、NLRP3 には依存しないことを明らかにし、VWA5Aが Non-canonical インフラマソームの最下流である NINJ1 依存的な形質膜破裂を介して放出されることを

示した。また、VWA5Aの欠損はサイトカイン産生やパイロトーシスの誘導に影響を与えないことを確認した。

(5) LPS腹腔内投与によるエンドトキシンショックモデルにおいて、血中VWA5A濃度がNINJ1依存的に上昇すること、Vwa5a欠損マウスが高感受性を示し生存率が有意に低下することを明らかにした。さらに、Vwa5a欠損マウスへのリコンビナントマウスVWA5Aの静脈内投与により生存率が有意に改善すること、LPS誘導性肺炎モデルにおいて好中球浸潤が抑制されることを示した。

(6) VWA5Aのドメイン欠失変異体を用いた解析により、LPS誘導性肺炎の抑制にはvon Willebrand factor type Aドメイン以降のC末端領域が必要であることを明らかにした。C末端領域にはヒアルロン酸結合モチーフおよびヘパラン硫酸結合様モチーフが存在し、VWA5Aがヘパラン硫酸と構造的に近縁なヘパリンにC末端領域を介して結合することを示した。Vwa5a欠損マウスではエンドトキシンショック時にグリコカリックス層破綻マーカーである血中ヒアルロン酸およびSyndecan-1濃度が有意に上昇しており、VWA5Aがグリコカリックス層の保護に寄与する可能性を示した。

生駒氏の研究は、第一章においてOridoninがファゴリソソーム膜損傷の抑制を介して微粒子誘導性のNLRP3依存的・非依存的な炎症応答を双方ともに抑えることを示し、第二章においてNINJ1依存的な形質膜破裂を介して放出される新規の内因性抗炎症因子としてVWA5Aを同定したものである。Damage-associated molecular pattern (DAMP) は一般に炎症惹起性の因子として知られるが、VWA5Aは炎症を抑制する方向に働くanti-inflammatory DAMPとして機能し、エンドトキシンショックの重症度を左右する重要な因子であることを明らかにした。本研究は、ファゴリソソーム膜損傷および形質膜破裂という膜破綻のイベントを介した炎症制御の理解に新たな分子基盤を与えるものである。

以上より、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。