

学 位 論 文 要 旨

氏 名 迎 学



論 文 題 目

「Regulation of tumor necrosis factor- α by peptide Lv in bone marrow
macrophages and synovium」

(骨髄マクロファージ及び滑膜における TNF- α 発現に対する Peptide Lv の作用)

指 導 教 授 承 認 印

高 桐 淑 士



Regulation of Tumor Necrosis Factor- α by Peptide Lv in Bone Marrow Macrophages and Synovium (骨髄マクロファージ及び滑膜における TNF- α 発現に対する Peptide Lv の作用)

氏名 迎 学

【背景】変形性膝関節症（KOA）の特徴は、関節軟骨の変性、骨のリモデリング、骨棘形成、線維化、および滑膜の過形成などである。過去の報告から、滑膜の炎症が KOA の進行に関与している可能性が示唆されている。

マクロファージおよび単球などの骨髄細胞は、滑膜炎における tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインの産生に寄与している。これらの炎症性サイトカインは、変形性関節症の軟骨破壊および痛みを促進することが知られている。また、骨髄由来の単球/マクロファージは滑膜組織に動員され、炎症性サイトカインの産生を通じて変形性関節症の滑膜の炎症に寄与することが報告されている。さらに、我々は過去に、骨髄由来の骨髄球系細胞が KOA マウスモデルの滑膜に動員されることを報告した。従って、単球/マクロファージが分泌する炎症性サイトカインの調節は、滑膜の炎症を治療するための効果的な治療戦略になる可能性がある。

V-Set and transmembrane domain-containing (VSTM) family は、T 細胞活性、腫瘍成長、及び脂肪細胞分化制御など、体内で多様な役割を果たしていることが知られている。

V-Set and transmembrane domain-containing 4 (VSTM4) は 320 アミノ酸 (aa) で構成される膜貫通タンパク質である。VSTM4 のフラグメントである Peptide Lv (ヒト aa 55-94、マウス aa 55-103) は、L 型電位依存性カルシウムチャネルを増強し、vascular endothelial growth factor (VEGF) 様の生物学的作用を有することが報告されている。

VEGF は、M1 マクロファージの M2 マクロファージへの極性化の促進や、TNF- α を介したアポトーシスを阻害することにより、炎症プロセスを調節すると考えられている。そこで Peptide Lv が VEGF と同様にマクロファージ活性を調節し、滑膜の炎症に役割を果たすと仮定した。

本研究では、マクロファージと滑膜の炎症における炎症性サイトカインの発現に対する Peptide Lv の役割を検討した。

【方法】 Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM) の調製

C57BL / 6J マウス的大腿骨から分離した骨髓細胞を、100 ng / ml Monocyte colony-stimulating factor (M-CSF)を含む α -MEM で培養した。培養 4 日目に、非接着細胞を除去し、新鮮な M-CSF を含む α -MEM でさらに 3 日間培養した。

LPS を介した炎症性サイトカインの発現に対する Peptide Lv の影響

BMM は、上記のように C57BL / 6J マウスから分離した。合成 Peptide Lv は、Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA) から購入した。パイロット研究では、1 μ g / ml の Peptide Lv が *Tnfa* の発現を抑制したのに対し、0.1 μ g / ml の Peptide Lv は抑制しなかったため、本研究では 1 μ g / ml の Peptide Lv を使用した。BMM は、vehicle (α -MEM)、1 μ g / ml lipopolysaccharide (LPS)、1 μ g / ml LPS + 1 μ g / ml Peptide Lv で 6 および 24 時間刺激した。その後、RNA を BMM から抽出し、cDNA 合成に使用した。*Tnfa*、*Il1b*、*Il6*、および *Ifng* の発現を qRT-PCR を使用して測定した。また、処理の 24 時間後の上清中の TNF- α および IFN- γ 濃度を、ELISA にて測定した。

LPS を介した TNF- α および IFN- γ 産生に対する Peptide Lv 欠失の影響

BMM は、上記のように C57BL / 6J マウスと *peptide Lv* 欠失マウスから分離した。BMM を vehicle (α -MEM) または 1 μ g / ml LPS で 6 時間および 24 時間刺激後、qRT-PCR を用いて *Tnfa* および *Ifng* の発現を評価した。LPS 処理の 24 時間後の上清中の TNF- α および IFN- γ 濃度を ELISA にて評価した。

滑膜炎の誘発

10 週齢の野生型 (C57BL / 6J) および *peptide Lv* 欠失マウスは、12 時間の明暗サイクルの下、23°C \pm 2°C および 55 \pm 10% の湿度のセミバリアシステムで飼育された。麻酔下に野生型および *peptide Lv* 欠失マウスの片方の膝に medial parapatellar approach で侵入し、膝蓋骨を外側に脱臼させ恒久性膝蓋骨脱臼を作製することで滑膜の炎症モデルを作製した。損傷の 1 週間後、滑膜標本を採取し、RNA 抽出液中でホモジナイズした (n = 5)。 *Tnfa* および *Ifng* の RNA 抽出、cDNA 合成、および qPCR は、上記のように実行した。

統計分析

一元配置分散分析を使用した Bonferroni 多重比較検定を使用して、vehicle、LPS、および LPS+Peptide Lv 群間の差を決定した。Kolmogorov-Smirnov 検定に続いて、t 検

定または Mann–Whitney U 検定を使用して、野生型マウスと *peptide Lv* 欠損マウスの平均値 (SD) の差を比較した。P < 0.05 は統計的に有意であるとした。

【結果】BMMにおけるLPS誘発炎症性サイトカイン発現に対するPeptide Lvの効果

BMMに対するPeptide Lvの効果を検討した。LPS刺激6時間で*Tnfa*、*Il1b*、*Il6*、および*Ifng*は有意に上昇をした (*Tnfa*、p = 0.004; *Il1b*、p < 0.001; *Il6*、p < 0.001; *Ifng*、p = 0.010)。24時間でも同様に*Tnfa*、*Il1b*、*Il6*、および*Ifng*は有意に上昇をした (*Tnfa*、p = 0.009; *Il1b*、p = 0.001; *Il6*、p < 0.001; *Ifng*、p = 0.0109)。Peptide Lvは、6時間 (*Tnfa*、p = 0.015; *Ifng*、p = 0.011) および24時間 (*Tnfa*、p = 0.002; *Ifng*、p = 0.049) でLPSを介した*Tnfa* および*Ifng*発現の上昇を抑制した。対照的に、Peptide Lvの存在下で*Il1b* 及び*Il6*の発現に変化は認めなかった。LPSは、上清中のTNF- α およびIFN- γ 濃度を有意に増加させた (TNF- α 、p < 0.001; IFN- γ 、p = 0.012)。これらの上昇したTNF- α およびIFN- γ は、Peptide Lvの存在下で有意に減少した (TNF- α 、p = 0.029; IFN- γ 、p = 0.044)。

TNF- α 発現に対するPeptide Lv欠失の影響

Peptide LvがBMMにおけるLPSを介したTNF- α およびIFN- γ の産生を減少させるといふ今回の発見を踏まえて、*peptide Lv*欠失がマクロファージおよび滑膜炎に及ぼす影響を検討した。

*peptide Lv*遺伝子のエクソン2上にgRNAを設計後、CRISPR/Cas9システムを用いて*peptide Lv*欠失マウスを作製した。得られ遺伝子改変個体をC57BL/6Jマウスと交配して、F1マウスを得た。Genotypingにより、すべてのF1マウスにPeptide Lv遺伝子のエクソン2が欠落していることを確認した。また、RT-PCRにより、Peptide Lv欠失マウスのBMM、滑膜組織において*peptide Lv mRNA*が発現していないことを確認した。

6時間および24時間Vehicle刺激を行った野生型マウス由来のBMMと*peptide Lv*欠失マウス由来のBMMで*Tnfa*と*Ifng*の発現に有意差は認めなかった。(6時間 (*Tnfa*、p = 0.917; *Ifng*、p = 0.602)、24時間 (*Tnfa*、p = 0.917; *Ifng*、p = 0.175))。対照的に、LPSによるBMMの刺激は、野生型マウスと比較して、*peptide Lv*欠失マウスに由来するBMMの*Tnfa*発現を有意に増加させた (6時間、p = 0.009; 24時間、p = 0.009)。

qRT-PCRの結果と一致して、TNF- α 濃度は、野生型マウスと比較して、*peptide Lv* 欠失マウスに由来する BMM で有意に増加した ($p = 0.001$)。LPS 刺激は、6 時間で *peptide Lv* 欠失マウスと比較して野生型マウス由来の BMM で *Ifng* 発現を有意に増加させ ($p = 0.009$)、24 時間で野生型マウスと比較して *peptide Lv* 欠失マウス由来の BMM で *Ifng* 発現を有意に増加させた ($p = 0.047$)。IFN- γ 濃度は、野生型マウスと比較して、*peptide Lv* 欠失マウス由来の BMM で有意に増加した ($p = 0.028$)。

滑膜炎での *Tnfa* および *Ifng* 発現に対する *Peptide Lv* 欠失の影響

損傷していない野生型マウスの滑膜における *Tnfa* 発現は、損傷していない *peptide Lv* 欠損マウスの *Tnfa* 発現に有意差はなかった ($p = 0.713$)。滑膜における *Tnfa* 発現は、損傷していない滑膜と比較して、野生型マウスと *peptide Lv* 欠失マウスの両方で損傷後に有意に増加した (それぞれ $p = 0.009$, $p = 0.009$)。ただし、損傷後の滑膜における *Tnfa* 発現は、野生型マウスよりも *peptide Lv* 欠失マウスで有意に増加していた ($p = 0.011$)。損傷の前後で野生型マウスと *peptide Lv* 欠失マウスの間で *Ifng* 発現に有意差は認めなかった (0 日目、 $p = 0.347$; 7 日目、 $p = 1.000$)。

【考察】過去に、VSTM family のタンパク質が T 細胞を抑制し、組換え VSTM タンパク質が *in vitro* で T 細胞の機能を阻害することが報告されている。組換え VSTM4 は、T 細胞による IFN- γ 、IL-2、IL-17 などの炎症性サイトカインの産生を減少させることが報告されている。今回、*Peptide Lv* は LPS を介した TNF- α および IFN- γ の産生を阻害し、*Peptide Lv* の欠損によって、LPS で刺激された BMM の TNF- α および IFN- γ の産生が増加した。この結果から、*Peptide Lv* がマクロファージに抗炎症作用を与える可能性がある。

Peptide Lv は VEGF 受容体と相互作用し、心筋細胞の下流シグナル伝達を引き起こすことが報告されている。また、炎症性刺激に対する VEGF の保護効果が報告されている。VEGF は内皮細胞で LPS を介したアポトーシスを抑制し、ヒト単球細胞株で LPS を介した M1 polarization を抑制することが報告されている。本研究において *Peptide Lv* が TNF- α を調節するメカニズムは不明なままだが、*Peptide Lv* の VEGF 様作用が関与している可能性がある。

TNF- α は nerve growth factor、calcitonin gene-related peptide、cyclooxygenase-2 などの疼痛関連分子の産生を調節している。今回、*Tnfa* 発現レベルは *peptide Lv* 欠失マウスの

滑膜で増加していた。TNF- α は OA の主要な分子成分であり、創薬ターゲットである。TNF- α 阻害剤は、KOA 患者の滑膜炎と痛みを改善することが知られている。さらに、最近のパイロット研究において、抗 TNF- α 抗体の関節内注射は、KOA の症状と進行を改善することが示された。Peptide Lv が TNF- α の発現を抑制することから、Peptide Lv は OA の有用な治療標的となる可能性がある。

IFN- γ は主に T 細胞と NK 細胞によって産生され、マクロファージの活性化に寄与する。一方、マクロファージも IFN- γ を産生し、LPS によって刺激されることが知られている。また、Fc に融合した VSTM4 の細胞外ドメインを含む融合タンパク質

(VSTM4-Fc) がヒト T 細胞での IFN- γ 産生を阻害することが報告されている。本研究では、マクロファージでの IFN- γ 発現に対する VSTM4 フラグメントの効果を検討した。Peptide Lv は IFN- γ 産生を抑制し、Peptide Lv の欠失がマクロファージの IFN- γ 産生を増加させることを発見した。細菌感染に関する研究で、マクロファージ由来の IFN- γ がオートクリン/パラクリン経路を介してマクロファージを活性化することが報告されている。今回の結果から、Peptide Lv が IFN- γ 産生を介したマクロファージの活性化を抑制する可能性がある。しかし、本研究では、滑膜の *Ifng* 発現は、野生型、*peptide Lv* 欠失マウスのいずれにおいても損傷後に増加しなかった。従って、滑膜炎時の IFN- γ 発現における Peptide Lv の役割は不明なままであり、さらなる研究が必要である。

本研究の限界を述べる。第一に、*in vitro* 研究で Peptide Lv の作用の濃度依存性は検討していない。第二に、TNF- α に対する Peptide Lv の効果を BMM のみを用いて調べており、滑膜マクロファージでの効果は不明である。第三に、Peptide Lv がマクロファージの TNF- α に影響を与えるメカニズムは不明なままである。最後に、滑膜の *Tnfa* 発現は *peptide Lv* 欠失マウスで上昇したが、この結果がマクロファージの影響によるものかどうかは不明なままである。

【結語】マクロファージは、VSTM4 とそのフラグメントである Peptide Lv を発現する。Peptide Lv は、マクロファージにおける TNF- α および IFN- γ の産生を抑制し、Peptide Lv の欠失は、滑膜炎における *Tnfa* の発現を増加させた。従って、Peptide Lv は滑膜炎の治療標的となる可能性がある。