

論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨


学位申請者氏名：大熊 範和

学位の種類：博士（薬学）

学位記番号：博（薬）甲第七号

学位授与年月日：令和6年3月3日

審査委員

主査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 常岡 誠 

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 森 哲哉 

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科准教授 本間成佳 

論文題目

インターフェロン- γ のプライミングによるヒト気道上皮細胞における poly(I:C) 誘発インターロイキン-6 産生の増強

Amplification of poly(I:C)-induced interleukin-6 production in human airway epithelial cells by priming with interferon- γ

【論文の内容の要旨】

インターロイキン (IL) -6 は、慢性関節リウマチをはじめとする様々な自己免疫性疾患や、サイトカイン放出症候群 (CRS) と言われる炎症性疾患の病態形成に関与することが明らかになっている。また、最近大きな問題となった重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) によって引き起こされる新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症患者では、CRS を併発しており放出される炎症性サイトカインの中でも IL-6 レベルが重症度と相関すると報告されている。ウイルスに応答した IL-6 産生は、炎症部位に動員された免疫細胞が大きな供給源であると考えられている。一方、気道を標的とするウイルスは、まず気管支上皮細胞に感染し免疫系に影響を与える。通常、ウイルス感染初期ではパターン認識受容体がウイルス由来の核酸を認識し、抗ウイルス作用を示す I 型や III 型のインターフェロン (IFN) の産生を誘導することによりウイルスを排除する。しかし、重度の COVID-19 患者では血清中の IFN- α や IFN- β など I 型 IFN レベルは低く、逆に II 型の IFN- γ が他の炎症性サイトカインと共に上昇していることが報告されている。IFN- γ は、免疫および炎症反応などにおいて重要な役割を持ち、マクロファージではリポ多糖 (LPS) によるサイトカイン産生を増強するプライミング効果が知られている。しかし、ウイルス感染における気道上皮細胞での炎症性サイトカイン産生におよぼす IFN- γ の作用は明らかではない。そこで、本研究ではウイルスが最も初期に影響する気道上皮細胞に焦点を当て、ヒト気道上皮細胞 (NCI-H292) を用いて RNA ウイルスを模倣した 2 本鎖 RNA アナログである poly(I:C) の刺激による IL-6 産生におよぼす IFN- γ の影響について検討した。

Poly(I:C)による刺激はNCI-H292細胞のIL-6遺伝子発現や蛋白質分泌への作用は弱かったが、これらの反応はIFN- γ で前処理した細胞では顕著に増大した。このIFN- γ のプライミング効果は、ヒト初代培養気管支上皮細胞やA549肺胞上皮細胞でも観察された。また、同様なプライミング効果はIL-1 β やTNF- α など他の炎症性サイトカインやLPSでは認められず、IFN- γ に特徴的な反応であると考えられた。

IFN- γ のプライミング効果の機序としては、IFN- γ が細胞のpoly(I:C)を認識する受容体であるToll様受容体(TLR)3の発現を亢進することが判明した。また、siRNAを用いて細胞のTLR3をノックダウンすると、poly(I:C)誘発IL-6産生に対するIFN- γ のプライミング効果は減少した。これらのことからIFN- γ のプライミング効果の機序として少なくとも一部はTLR3発現上昇が関与すると考えられた。

IFN- γ は受容体に結合し、ヤヌスキナーゼ(JAK)および転写活性化因子1(STAT1)経路を活性化し、IFN刺激遺伝子発現を誘導することで自然免疫および炎症反応を強力に促進する事が知られている。IFN- γ のプライミングによるTLR3発現上昇およびpoly(I:C)誘発IL-6産生増大はJAK阻害薬のトファシチニブにより抑制された。また、IFN- γ はIL-6遺伝子座に関連するヒストン修飾を刺激することが明らかとなった。すなわち、IFN- γ の刺激によりJAK依存性にIL-6遺伝子座のヒストンH3のリシン残基K4トリメチル化やK27アセチル化の亢進が認められ、このIL-6遺伝子座のクロマチンリモデリングとpoly(I:C)刺激によるNF κ Bの活性化がIL-6産生の顕著な増大に関与する可能性が考えられた。

さらに、IFN- γ のプライミング効果は、生体においても確認された。すなわち、マウスにpoly(I:C)を経気道投与して誘発した気管支炎症モデルにおいて、肺組織のIL-6 mRNAおよび肺胞洗浄液中のIL-6タンパク質レベルはIFN- γ の前投与により有意に増加し、トファシチニブの投与によって抑制された。

以上の結果は、気管支上皮細胞においてIFN- γ プライミングがpoly(I:C)誘導性のIL-6産生を顕著に増強することを示唆するものである。これらのメカニズムは、コロナウイルスをはじめインフルエンザウイルスなどの気道感染後のIL-6の過剰産生を伴う重度の呼吸器炎症に関与している可能性があり、その制御は新たな治療アプローチにつながると期待される。

【論文審査の結果の要旨】

インターロイキン-6(IL-6)は、新型コロナウイルスSARS-CoV-2感染症(COVID-19)患者の重症度と関連することが示されている。しかし、SARS-CoV-2感染によるIL-6産生のメカニズムは不明な点が残されている。呼吸器ウイルスは、最初に鼻または気管支の上皮細胞に感染するが、気管支上皮細胞でのIL-6産生についてはこれまで余り検討されていない。本博士論文で大熊氏は、ヒト気道上皮細胞(NCI-H292)を用いて、ウイルス感染を模したPoly(I:C)曝露によって誘導されるIL-6の産生機序について検討した。まず、インターフェロン- γ (IFN- γ)による前処理が、Poly(I:C)曝露によるIL-6産生を顕著に増加することを示した。同様の効果は初代気管支上皮細胞等でも観察された。Poly(I:C)はToll様受容体

-3 (TLR3) のアゴニストとして作用するが、NCI-H292 細胞において IFN- γ 前処理は TLR3 発現を上昇し、TLR3 発現上昇は Poly(I:C)による IL-6 産生を増強した。さらに IFN- γ 下流の JAK を阻害するトファシチニブより TLR3 の発現上昇が抑えられ、Poly(I:C)誘導による IL-6 産生も抑制された。また IFN- γ 前処理細胞で IL-6 遺伝子発現調節領域でのヒストン修飾の変化が誘導されたが、これもトファシチニブにより抑制された。これらのことは、TLR3 増加と IL-6 遺伝子でのヒストン修飾変化が IFN- γ 前処理の効果を構成することを示唆している。生体内での IL-6 産生に関して情報を得るため、マウス気管内に IFN- γ を投与し、その後 Poly(I:C)曝露を行った結果、JAK 依存性の TLR3 と IL-6 発現増加が観察された。以上の結果より、大熊氏は気管支上皮細胞において IFN- γ 前処理と Poly(I:C)曝露により IL-6 産生が強く誘導されることを示し、さらにその機序を説明する知見を提供した。今回報告された結果はウイルス感染による重度の呼吸器炎症治療への JAK 阻害剤利用の新しい理論的裏付けとなる。

論文精査の結果、審査員よりいくつか意見が寄せられた。主な点として、まず採用したモデルが COVID-19 の重症化を模したものであるかについて追加の説明が求められた。第 2 点目として IL-6 発現までの pathway について仮説が述べられているが、その根拠の正当性への説明が求められた。再投稿された修正論文では十分な改善がなされた。本研究はよく計画されており、個々の実験結果もクリアーである。さらに感染症治療への応用の可能性をも示唆する研究結果であった。そのため、公開発表会において多くの質問がなされたが、大熊氏はそれらに対して的確に説明した。

以上により、論文審査および最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が博士（薬学）の学位に十分値するものであると判断した。

【学力の確認の結果の要旨】

本論文の審査を通して学位申請者の学力の確認を行ったところ、博士として十分な学識を有していることが確認できた。また、外国語については本論文中に多数の英語文献を適切に引用しており、審査の結果、十分な語学力が確認できた。

以上により、本学位申請者は博士課程を修了した者と同等以上の学力を有すると判断した。