

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	吉岡 佑弥
論文題目	結核肉芽腫におけるS100A9タンパク質の発現と機能に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>結核では、結核菌に対する炎症応答の結果、肉芽腫が形成される。結核肉芽腫は、類上皮細胞が多層かつ同心円状に配置され、中心部に乾酪壊死を伴うことが特徴である。結核肉芽腫の形成においては、一般的な炎症で誘導されるサイトカインやケモカインだけでなく、結核肉芽腫に特有の制御因子が存在する可能性が考えられる。申請者は、そのような制御因子が肉芽腫中心に持続的に発現すると仮定し、検証を進めた。</p> <p>申請者の所属研究室では、ウシ型結核菌弱毒株であるBCGを皮内感作したモルモットにBCGを経静脈的にチャレンジすることにより、肺に肉芽腫が生じるモデルを確立した。さらに、この肉芽腫をラットへ接種し、肉芽腫に対するモノクローナル抗体を作製してきた。申請者は作製された抗体の中から、肉芽腫の中心部に特異的な反応性を示す抗体クローン (G213) に着目した。はじめに、肉芽腫組織を用いた免疫電子顕微鏡法による観察を行い、G213抗体によって認識される細胞が多形核球であることを見出した。さらに、BCG非接種モルモットの骨髄多形核球においてもG213抗原が発現していること、また、骨髄が他の臓器・組織に比して高いレベルでG213抗原を発現していることを確認した。そこで、骨髄細胞をソースとした免疫沈降を行い、SDS-PAGEで展開し、銀染色法を実施した結果、16 kDaの特異的なバンドを検出した。バンドからタンパク質を抽出し、そのペプチド断片をLC-MS解析に供した結果、S100ファミリー分子に属するS100A8およびS100A9のペプチド配列が同定された。抗原を確定するために、S100A8、S100A9各々を発現した細胞株を用い、Western blotting法によりG213抗体の反応性を検証した結果、S100A9がG213抗原として同定された。S100A9陽性多形核球は、BCGだけでなく、病原性結核菌の感染で生じるモルモット肉芽腫においても中心部に存在した。ヒト結核肉芽腫においても、中心部壊死領域の周囲にS100A9発現多形核球の存在が確認されたことから、結核病態に深く関与している可能性が考えられた。S100A9の肉芽腫形成における役割を追求するため、モルモット肉芽腫モデルに対して、S100A9阻害剤であるTasquinimodを投与し、肉芽腫形成を組織学的に評価した。その結果、阻害剤投与群において形成される肉芽腫の数が減少し、類上皮細胞を伴わない細胞集塊の数が、非投与群に比べて有意に増加した。従ってS100A9は肉芽腫形成を制御する因子であると結論づけた。S100A9は結核患者の血清中において増加することが知られている。その意義を明らかにした本研究は、結核病態の理解に大きく貢献するものである。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

炎症局所に集積する多種の免疫細胞群は、相互に作用しながら炎症病態を構築すると考えられる。結核においては、マクロファージやリンパ球、多形核球が集積し、さらに活性化したマクロファージが類上皮細胞として同心円状に配置された肉芽腫の形成が特徴的である。しかし、このような結核特有の病理組織の構築を統御する細胞や因子はほとんど不明である。本学位論文は、結核肉芽腫の中心領域にS100A9発現多形核球の存在を見だし、S100A9阻害剤の効果検証を通して、S100A9が結核肉芽腫形成を統御する因子として機能することを明らかにしたものである。

申請者はまず、BCGを用いたモルモット結核肉芽腫モデルにおいて、肉芽腫の中心部領域に特異的な反応性を示すラットモノクローナル抗体 (G213) に着目し、その基本解析を行った。G213抗体で標識したモルモット結核肉芽腫の組織化学的解析および電子顕微鏡解析から、結核肉芽腫の中心部乾酪壊死領域の周囲に集簇した多形核球がG213抗原を発現することを見いだした。またG213抗原を多量に発現した骨髄細胞をソースとしてG213抗体を用いた免疫沈降を行い、SDS-PAGEで分離した16kDaの特異的バンドのシーケンス解析から、G213抗原候補としてS100A8およびS100A9を絞り込んだ。それぞれの遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞のWestern blotting解析を実施し、G213抗体の標的抗原がS100A9であることを示した。

さらに申請者は、S100A9陽性多形核球がBCG誘発肉芽腫だけでなく、病原性結核菌の感染によって形成される肉芽腫においても同様に観察されたこと、S100A9が自然免疫受容体を介してマクロファージの活性化に関わること、またS100A9は結核患者の血清中において増加することから、S100A9が結核病態とりわけ肉芽腫形成に深く関与する可能性を想起した。そこで、モルモット結核肉芽腫モデルに対してS100A9の特異的阻害剤であるTasquinimodの投与を行い、病理組織学的検証を行った。その結果、阻害剤投与群においては、コントロール群に比して形成される肉芽腫の数が減少するとともに類上皮細胞を伴わない細胞集塊の数が有意に増加することを見いだした。以上の結果から、マクロファージ応答が主体と考えられてきた肉芽腫の形成において、多形核球が産生するS100A9が重要な役割を担うことが明らかとなった。

本論文は、炎症の組織応答における細胞間相互作用の観点から多形核球の機能を解明したものであり、結核研究領域のみならず、生命科学の理解と発展に寄与する重要な発見を包含している。また学位論文は論理的かつ一貫性をもって記述されている。以上の理由から、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものである。平成31年1月29日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日