

# 論文内容の要旨

申請者氏名 長山 瑞佳

インターロイキン 33 (IL-33) は、IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、最近の研究から寄生虫感染や花粉暴露時にみられるアレルギー性炎症の誘導に重要な役割を果たしていることが示されている。IL-33 は主に上皮細胞に発現し、感染や細胞障害に伴い細胞外へと放出されると考えられているがその詳細な分子機構は不明である。申請者は、IL-33 放出機構の解明を目指し解析を行った。まず、IL-33 発現ベクターを導入したヒト胎児腎細胞株 HEK293 を様々な抗がん剤や自然免疫活性化剤、細胞死誘導剤で刺激し、IL-33 の放出を ELISA にて測定を行った。その結果、放線菌由来の抗生物質として知られる Nigericin により IL-33 が放出されることが見出された。さらに、Nigericin 刺激で細胞が膨潤化し死滅することが観察され、これは核の断片化を伴うアポトーシス像とは異なっており、ネクローシス様の細胞死であることが示唆された。これまで、Nigericin はマクロファージや樹状細胞において NLRP3 インフラマソームを介したタンパク質分解酵素 Caspase-1 を活性化し、Gasderimin D (GSDMD) と呼ばれる膜タンパク質を切断することが示されている。切断された GSDMD は細胞膜で孔を形成し、その結果パイロトーシスと呼ばれる炎症を伴うネクローシス様細胞死が誘導される。そこで GSDMD と IL-33 放出の関連性を調べたところ、HEK293 細胞においても Nigericin 刺激により GSDMD が切断されることが見出された。さらに、切断型 GSDMD の過剰発現により細胞死と IL-33 放出が誘導されること、GSDMD のノックダウンにより IL-33 放出が抑制されることが判明した。興味深いことに、Nigericin 刺激に伴い IL-33 が核から細胞質へ局在が変化すること、さらに GSDMD のノックダウンでこの変化が抑制されたことから、GSDMD 依存的なパイロトーシスが IL-33 の核外への移行に重要な役割を担っていることが示唆された。HEK293 細胞では NLRP3 や Caspase-1 の発現が認められないことが報告されており、Caspase-1 非依存的な GSDMD 切断機構が HEK293 細胞に存在することが示唆された。阻害剤を用いた検討から、Calpain 阻害剤により IL-33 放出が抑制されることが示された。このことから Nigericin 刺激により Calpain が活性化され、これが IL-33 放出に寄与する可能性が示唆された。

以上の結果から、IL-33 が Nigericin 刺激に伴い核から細胞質に移行し、最終的に GSDMD 依存的な細胞死により細胞外へと放出されること、また GSDMD の切断には Calpain が関与する可能性が示され、新たなサイトカイン放出機構の存在が示唆された。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 長山 瑞佳

インターロイキン 33 (IL-33) は、寄生虫感染や花粉暴露時にみられるアレルギー性炎症の誘導に重要な役割を果たしていることがマウスを用いた研究から示されている。また、花粉症、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎の患者において、IL-33 の過剰産生が認められる報告があり、アレルギー性疾患における IL-33 の役割が注目されている。IL-33 は感染や細胞障害を受けた上皮細胞から放出され、自然免疫系、獲得免疫系の様々な細胞に作用することで、アレルギー応答に中心的な役割を果たす IgE 抗体の産生を誘導する。アレルギー応答に至る細胞間ネットワークに関する知見は増えつつある一方で、IL-33 放出機構については未だ不明な点が多い。申請者は IL-33 の放出機構を制御する分子機構の理解を目指し解析を行った。まず、薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングにより放線菌由来の抗生物質である Nigericin の刺激に伴い IL-33 を強制発現させたヒト胎児腎細胞株 HEK293 から IL-33 が放出されることを見出した。次に、細胞形態の観察から、Nigericin 刺激により細胞が膨潤化し死滅することを明らかにし、これが核の断片化を伴うアポトーシス像とは異なるネクローシス様の細胞死である可能性を見出した。申請者は、この細胞死の誘導に関連する分子として Gásdernin D (GSDMD) と呼ばれる膜タンパク質に着目した。GSDMD はタンパク質分解酵素 Caspase-1 によって切断され、切断された GSDMD は細胞膜で孔を形成し、その結果パイロトーシスと呼ばれる炎症関連細胞死を誘導する。そこで GSDMD と IL-33 放出の関連性を調べたところ、Nigericin 刺激により GSDMD が切断されること、切断型 GSDMD の細胞内過剰発現により細胞死が誘導され IL-33 が放出すること、GSDMD のノックダウンにより Nigericin 刺激による IL-33 放出が抑制されることを見出した。さらに、Nigericin 刺激に伴い IL-33 が核から細胞質へ移行し、これが GSDMD のノックダウンで抑制されたことから、GSDMD 依存的な細胞死と IL-33 放出が密接に関連していることが示唆された。申請者はさらに解析を深め、HEK293 細胞においては、GSDMD 切断にタンパク質分解酵素 Calpain が関与する可能性を示した。このように申請者は IL-33 が Nigericin 刺激により核から細胞質に移行し、最終的に GSDMD 依存的なパイロトーシスに伴い細胞外へと放出されること、また GSDMD の切断には Calpain が関与する可能性を見出し、サイトカイン放出の新たな機構の存在を示唆した。

以上のように、本論文は細胞死に関連した新たなサイトカイン放出機構の存在を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他（ ） ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】