

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成13年度博士課程 入学

氏名 中嶋明子

指導教官 岩倉洋一郎

論文題目 炎症性疾患における IL-1/IL-1 レセプターアンタゴニスト システムの役割

炎症反応は、免疫系の活性化を伴う生体防御機構の一つであり、細菌やウイルスなどの感染源除去や外傷による組織損傷の修復過程に必要な生体応答で、生理的メディエーターであるサイトカインやケモカインが関与することが知られている。生体内では様々なサイトカイン、ケモカインがネットワークを形成しており、相乗的あるいは拮抗的に作用することにより生体の恒常性(ホメオスタシス)を維持している。ところが、これらのサイトカインネットワークの均衡が崩れると、サイトカインの産生異常や自己抗原に反応する過剰な免疫応答が誘導され、様々な炎症性疾患、自己免疫性疾患が惹起される。特にインターロイキン-1 (IL-1)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、IL-6などに代表されるサイトカインは、その誘導過程において様々な炎症応答を促すことから炎症性サイトカインと呼ばれている。また、これらの炎症性サイトカインにより惹起された炎症応答を鎮静化する機構として、IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) や IL-10 などの抗炎症性サイトカインを誘導することが知られている。

IL-1 は、炎症応答や免疫応答のメディエーターとして知られているが、近年、免疫系のほかに神

経系・内分泌系など広範な調節を司っていることが明らかとなってきた。IL-1 の作用に拮抗する分子として IL-1Ra や II 型 IL-1 レセプター (IL-1RII) が知られており、IL-1/IL-1R システムは IL-1Ra や IL-1RII といった負の制御機構を利用してホメオスタシスが維持される。ところが、何らかの要因でその均衡が破綻すると、慢性炎症を伴う全身性あるいは臓器特異的な自己免疫性疾患や炎症性疾患が惹起されると考えられており、病態形成には複雑なサイトカインネットワークの関与が示唆される。当研究室で作製された IL-1Ra 遺伝子欠損マウス (IL-1Ra KO) は、BALB/cA 背景に 8 代以上戻し交配すると、ヒト関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) に酷似した慢性関節炎と大動脈炎を自然発症することが宝来、松木らにより報告された。しかし、関節炎の発症機構に関してその詳細は明らかではなかった。更に、新たにヒト尋常性乾癬 (psoriasis vulgaris : PS) に類似した皮膚炎を発症することを見出した。

そこで本研究では、自己免疫疾患ならびに炎症性疾患における IL-1 の役割を総合的に理解するために、1) IL-1Ra 遺伝子欠損マウスにおける慢性関節炎と自己免疫について、2) IL-1Ra 遺伝子欠損マウスにおける乾癬様皮膚炎の発症機構と炎症性サイトカインの役割について、3) IL-1 の活性を制御する機構に着目し、II 型 IL-1 レセプター (IL-1R2) 遺伝子欠損マウスを作製し基礎解析を行い、IL-1/IL-1R システムと疾患との関与について総合的に考察した。

RA は、筋骨格系といった運動器が系統的に侵襲される疾患であり、患者の日常生活を中心とする生活の質 (quality of life : QOL) が著しく低下するため、心理的損失だけでなく社会的損失の大きい疾患である。先進諸国において、リウマチ性疾患は高齢化社会や環境要因の変化により、増加の一途をたどっており、その発症機構の解明は急務とされている。RA は好中球、II 型コラーゲン (IIC) などを自己抗原として認識する自己反応性 T 細胞の浸潤を認める自己免疫性疾患である。近年、関連遺伝子座の連鎖解析が行われているが、多因子性疾患であるため一遺伝子変異で説明できないことから、治療の現状は炎症抑制を目的とした対症療法が中心となっており、軽快はしても完治させることのできない難治性疾患である。第一章では、IL-1Ra KO の慢性関節炎の発症機構においてその病因細胞を免疫学的手法ならびに病理学的手法を用いて解析した。

IL-1Ra KO は、3-4 週齢から四肢関節 (手首、踵) に慢性関節炎を発症し、加齢に伴い増悪化した。発症個体の骨髄細胞から致死量放射線照射した野生型マウス (wild type : WT) への骨髄移植により関節炎病態を誘導することができ、逆に WT から関節炎未発症 IL-1Ra KO への骨髄移植により関節炎病態は完全に抑制された。以上の結果から、造血幹細胞が関節炎の病因細胞であることが判明した。更に、免疫不全モデルマウスに CD4 陽性 T 細胞、脾臓細胞、T 細胞を除いた脾臓細胞をそれぞれ移植したところ、CD4 陽性 T 細胞、脾臓細胞で関節炎が誘導され、脾臓細胞移植の重症度が高かった。また、胸腺細胞移植では骨破壊を伴う関節炎は誘導されなかった。以上の結果から、慢性関節炎の病因細胞は、末梢 CD4 陽性 T 細胞であることが示され、IL-1Ra の欠損により IL-1 の過剰応答が起こり、自己

反応性を持った細胞が負の選択を受けずに増殖し恒常的に活性化状態にあることが示唆された。

PS は炎症性角化症の代表的例で、一見単純に見えるが何にでも陽性所見が得られるため、病態的にも治療の面においても大変難しく、RA 同様 QOL の低下が著しい疾患である。本邦では、白色人種に比べ罹患率は 0.02% と非常に低いが、年々、生活環境の欧米化に伴い、増加の一途をたどっている。近年、PS が自己免疫疾患であるという仮説が立てられ、T 細胞の機能を選択的に抑制する cyclosporin A (CyA) の PS 患者への投与により皮疹の軽快が認められるが、角化細胞には CyA レセプターが発現しており、増殖が直接抑制されていることも知られている。また、自己抗原が特定されておらず、その発症機構は未だ不明な点が多く、発症機構の解明は急務とされている。第二章では、IL-1Ra KO マウスの乾癬様皮膚炎の発症機構においてその病因細胞を免疫学的手法ならびに病理学的手法を用いて解析した。

IL-1Ra KO は、5-6 週齢から被毛の少ない耳介、尾部に慢性皮膚炎を発症し、加齢に伴い増悪化した。重症例では、5-6 ヶ月齢個体で眼瞼周縁や趾間部に脱毛、糜爛を伴う皮疹が生じるが、体幹には認められなかった。病理組織像は、過角化、表皮肥厚、好中球浸潤、膿瘍形成、血管新生が認められ、PS の病理像と酷似し、接触性皮膚炎 (contact hypersensitivity : CHS) のようなアレルギー性皮膚炎とは異なっていた。しかし、PS のような CD8 陽性 T 細胞の表皮内浸潤は認められなかった。また、関節炎とは異なり、発症個体の骨髓細胞から致死量放射線照射した WT への骨髓移植による皮膚炎病態の誘導と WT から皮膚炎未発症 IL-1Ra KO への骨髓移植による関節炎病態の抑制は殆ど認められず、移植後 2-4 週間で置換される造血幹細胞ではなくレシピエントの皮膚に病因細胞が存在することが示唆された。更に、免疫不全モデルマウスに発症個体由来の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、胸腺細胞をそれぞれ移植したが、いずれの場合においても皮膚炎は誘導されなかった。以上の結果から、慢性皮膚炎の病因細胞は、T 細胞以外の皮膚に存在する細胞であり、この細胞での IL-1Ra の欠損が IL-1 の過剰応答を介した角化細胞の増殖異常と好中球の表皮層への浸潤を惹起しており、結果的に自己免疫とは無関係に乾癬様病態形成されていることが示唆された。これらの現象は、IL-1 が表皮角化細胞の中でも基底細胞において高いレベルで発現していることが知られており、角化細胞特異的に IL-1 α を発現する IL-1 α 遺伝子導入マウス (IL-1 α Tg) において角化症を発症することからも説明できる。

RA や PS は、様々な炎症性サイトカインがその病態形成に関与していると考えられており、近年、炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインを制御するようなサイトカイン療法が多数報告されている。しかし、多因子性疾患であるという一面から、全ての患者に効果が見られるわけではない。そこで、疾患モデル動物を用いた、治療法の評価系が有用であると考えられているため、IL-1Ra KO マウスで発症する疾患に関与する炎症性サイトカインについて免疫学的手法を用いて解析した。

IL-1Ra KO における慢性関節炎や皮膚炎は、TNF- α の欠損で完全に抑制され、IL-6 の欠損で増悪

化した。発症個体の骨髄細胞から TNF- α 欠損 IL-1Ra KO への骨髄移植と TNF α 欠損 IL-1Ra KO から皮膚炎未発症 IL-1Ra KO への骨髄移植により両病態が誘導され、関節炎では両者に大差がなく、T 細胞の IL-1Ra 欠損が必須で、TNF- α の供給源は問われないことが示された。一方、皮膚炎は、後者で増悪化したことから、レシピエント角化細胞の IL-1Ra 欠損が必須で、レシピエント皮膚の好中球や角化細胞からの TNF- α 供給が重要であると考えられた。また、IL-1Ra KO の CD4 陽性 T 細胞や表皮角化細胞で TNF- α の産生が亢進しているため、TNF- α は IL-1 シグナルの下流に位置すると考えられる。一方、IL-6 は炎症性作用だけでなく抗炎症性作用も示す。IL-1Ra KO では IL-6 が炎症だけでなく抗炎症応答に重要で、IL-6 の欠損により抑制応答が減弱し、増悪化したと考えられ、今後は IL-6 の抗炎症応答についての解析を進める予定である。

IL-1 には IL-1Ra 以外にも IL-1R2 を介した負の制御システムが存在する。IL-1R2 は、細胞内ドメインを欠き、IL-1 リガンドからのシグナルを細胞内に伝達することができない。また、全身のあらゆる組織・細胞に広範に発現していることから、恒常的な IL-1 の制御を担っていると考えられる。第三章では、IL-1R2 遺伝子欠損マウス(IL-1R2 KO)を作製し、組織・細胞レベルでの基礎解析を行い、IL-1 との連鎖が報告されている疾患との関与について考察した。

IL-1R2 遺伝子欠損マウス (IL-1R2 KO) における基礎解析を行ったところ、リンパ球のプロファイルや臓器形成における異常は確認されなかった。しかし、本論文にて報告した IL-1R2 KO マウスは 129/Sv x C57BL/6 の交雑背景であり、IL-1Ra KO の自己免疫・炎症性疾患は BALB 背景のみで観察されたことから、IL-1R2 KO マウスを BALB 背景に戻し交配する必要性が考えられる。また、IL-1 は先述のような免疫系疾患のほか、虚血性脳卒中やアルツハイマー病の病態形成に関与していることが報告されている。本章では、免疫系の炎症性疾患に関する考察を行ったが、今後は神経系の炎症性疾患への寄与と治療への有効性も視野に含めた解析を行う必要があると考えている。

以上の結果から、IL-1Ra KO では、IL-1/IL-1R システムの均衡が崩れ、サイトカインネットワークを介して TNF- α 依存的に自己免疫や炎症応答を惹起した。しかし、RA のような全身性自己免疫モデルであるにもかかわらず、自己免疫に非依存的な PS 様の病態も発症したことから、今後は IL-1Ra を利用したサイトカイン療法の適用範囲が広がることが期待される。また、IL-1R2 KO は、交雑系での病態誘導は認められなかった。しかし、戻し交配により BALB 背景にすることで、IL-1Ra KO のような様々な炎症性疾患の誘導が期待される。さらに、IL-1R2 の神経系炎症性疾患治療への寄与が報告されていることから、創薬の標的分子を探索するツールとしての可能性も期待される。