

## 論文内容の要旨

論文題目 IL-17 ファミリーのコラーゲン誘発性関節炎に対する影響

指導教員 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

山口 優美

### 【目的】

インターロイキン 17A ( IL-17A ) は、T 細胞由来の炎症性サイトカインであり、関節リウマチ ( RA ) の進展に関与すると言われている。IL-17A は RA 患者の滑膜および滑液中に高濃度に存在し、*in vitro* で RA 滑膜細胞において IL-1 を介する IL-6 産生を促進させる。また、*in vivo* ではコラーゲン誘発性関節炎 ( CIA ) マウスの全身または局所に IL-17A を過剰発現させると関節炎が早期発症し、関節病変を悪化させることが知られており、さらに抗 IL-17A 抗体による治療で、関節の炎症や病理組織所見における軟骨破壊を減少させるとの報告がある。これらのことより IL-17A が関節炎の病態形成に深く関与していることが示唆される。

## [別紙 1]

最近の報告で、IL-17 ファミリーが IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、および IL-17F の 6 つの遺伝子で成り立っていることがわかった。IL-17F は IL-17A に高い相同性を持つが、IL-17F の関節炎に及ぼす影響に関して詳細はわかっていない。また、IL-17A および IL-17F はヒトの線維芽細胞に働いて IL-6 や IL-8 の産生を亢進させるが、一方、IL-17B と IL-17C はヒト単球様細胞株である THP-1 に働いて TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の産生を亢進させる。また、*in vivo* において IL-17A、IL-17B、IL-17C、および IL-17F とともに、好中球遊走作用を認め、これらのことより、IL-17 ファミリーが関節炎に関与するサイトカインの産生や好中球遊走作用を亢進させ、関節炎の病態形成に深く関与していることが示唆される。

そこで、私はレトロウイルスベクターによる T リンパ球および骨髄前駆細胞への遺伝子導入システムを用いて、IL-17 ファミリーの関節炎進展に対する影響を調べた。

### 【方法と結果】

RA のモデルマウスとして、CIA マウスを用いた。まず、定量的 PCR にてマウスの炎症肢での IL-17 ファミリーおよび IL-17 レセプター発現を測定したところ、IL-17 ファミリー (IL-17A、IL-17B、IL-17C、および IL-17F) の mRNA 発現がコントロールに比し約 100 倍高く、IL-17 レセプター (IL-17AR、IL-17Rh1) も同様に高かった。これらより、関節炎において IL-17 ファミリーがある種の正のフィードバック機構に関与することが示唆された。次に、CIA マウスの炎症肢に集積した各種細胞群での IL-17 ファミリーの発現を定量的

## [別紙 1]

PCRにて検討した。CD4陽性T細胞においてはIL-17AおよびIL-17Fの発現が有意に高く、IL-17BはCIAマウスの炎症軟骨組織にのみ強く発現を認め、一方で、IL-17CはCD4陽性T細胞、マクロファージおよび樹状細胞といった、幅広い細胞群において発現を認めた。これらの結果より、関節炎の炎症局所においてCD4陽性T細胞がIL-17ファミリー、特にIL-17A、IL-17C、およびIL-17Fを発現することが示唆された。

次に、*in vitro*でマウス線維芽細胞株である3T3およびマウス腹腔マクロファージ(PECs)に対するIL-17ファミリーの影響を調べたところ、3T3では、IL-17AはIL-1 $\beta$ およびIL-6のmRNAレベルでの発現を有意に亢進させ、IL-17B、IL-17C、およびIL-17Fもまた、IL-1 $\beta$ の発現を亢進させた。PECsにおいては、IL-17AはIL-1 $\beta$ 、IL-6、およびIL-23のmRNAレベルでの発現を有意に亢進させ、興味深いことに、IL-17BもまたIL-1 $\beta$ 、IL-6、およびIL-23の発現を、IL-17CはIL-1 $\beta$ およびIL-23の発現を有意に亢進させた。さらに、PECs上清では、IL-17AおよびIL-17Bを添加した場合にIL-6蛋白産生が有意に増加し、TNF- $\alpha$ 蛋白産生においてはIL-17A、IL-17B、IL-17C、およびIL-17Fいずれを添加した場合でもコントロールに比し有意に高値を示した。これらの結果より、*in vitro*においてIL-17A、IL-17B、IL-17C、およびIL-17Fは線維芽細胞やマクロファージに作用して、炎症性サイトカインの産生を亢進させることが示唆された。

また、*in vivo*でレトロウイルスベクターシステムを用いた遺伝子導入によりIL-17ファミリーを過剰発現させた脾臓由来のCD4陽性T細胞を、ウシII型コ

## [別紙 1]

ラーゲンで免疫したマウスに関節炎発症前に養子移入した結果、関節炎スコアおよび病理組織学所見からも明らかな症状増悪を認めた。これらのマウスの血清で抗Ⅱ型コラーゲン抗体価を測定したところ、いずれもコントロールと同程度に上昇しており、IL-17 ファミリーによる関節炎の増悪は、抗Ⅱ型コラーゲン抗体を介さない反応であることが示唆された。

そして、同システムを用いて IL-17 ファミリー (IL-17A、IL-17B、IL-17C、および IL-17F) を骨髄前駆細胞に遺伝子導入し、これらの細胞を放射線照射したレシピエントマウスに静脈注射することで、骨髄キメラマウスを作製した。これらのマウスに CIA を誘導し、その発症率および関節炎スコアを評価した。IL-17A および IL-17F の骨髄キメラマウスに CIA を誘導したところ、コントロールに比し関節炎の早期発症と関節炎スコアの悪化を認めた。また、IL-17B および IL-17C の骨髄キメラマウスに CIA を誘導したところ、興味深いことに、関節炎発症率に有意な差は見られなかったものの、関節炎の悪化を有意に認めた。このことより、IL-17B および IL-17C は関節炎を発症する induction phase よりも、むしろ滑膜増殖、炎症細胞浸潤および骨破壊を来たす effector phase に働いていることが示唆された。また、免疫していない IL-17C 骨髄キメラマウスの脾臓において、pMIG (空ベクター) コントロール骨髄キメラマウスに比し TNF- $\alpha$  の mRNA 発現が増強していた。さらに、CIA 誘導後においては、IL-17B 骨髄キメラマウスで IL-6 の有意な mRNA 発現の亢進を認め、IL-17C 骨髄キメラマウスでは、TNF- $\alpha$ 、IL-6、および IL-23 の発現がコントロールに比し有意に亢進していた。さらに、これらのマウスにおける血清 TNF- $\alpha$  および IL-6 の蛋

## [別紙 1]

白産生を ELISA 法にて測定したところ、TNF- $\alpha$ 産生は IL-17B、IL-17C、および IL-17F 骨髄キメラマウスにおいてコントロールに比し有意な増加を認め、IL-6 産生は IL-17A および IL-17B 骨髄キメラマウスで有意な増加を認めた。

以上の結果より、IL-17B および IL-17C は過剰発現によりマクロファージなどからの TNF- $\alpha$ 産生を誘導することで、関節炎の悪化に対して影響を及ぼしている可能性が示唆された。

### 【結論】

IL-17A をはじめとする IL-17 ファミリーは、今まで炎症性サイトカイン産生能や好中球遊走作用を亢進させるため、炎症性自己免疫疾患に関与すると考えられているが、関節炎における IL-17 ファミリーの関与は、IL-17A 以外については詳しくわかっていなかった。今回、私は IL-17 ファミリーの関節炎に対する影響について CIA モデルマウスを用いて研究したところ、IL-17B、IL-17C、および IL-17F に関しても、IL-17A と同様に関節炎の増悪に関与することがわかった。

CIA マウスにおいて関節炎の炎症局所で IL-17 ファミリーおよびそのレセプターの発現がコントロールに比し有意に亢進しており、*in vitro*にてマウス線維芽細胞やマクロファージに IL-17 ファミリーを添加することにより IL-1 $\beta$ 、IL-6、および IL-23 などの炎症性サイトカインの mRNA 発現の亢進を認めた。また、レトロウイルスベクターシステムを用いて IL-17 ファミリー各々を遺伝子導入した CD4 陽性 T 細胞を CIA 発症前のマウスに養子移入したところ、関節炎スコアおよび病理組織学所見においても症状増悪を認め、同システムを用いて作

## [別紙 1]

製した骨髄キメラマウスにおいて CIA を誘導したところ、関節炎症状の悪化を認めた。

本研究に用いた IL-17 ファミリーの骨髄キメラマウスに関して、いままでは IL-17A トランスジェニックマウスの作製は胎性致死となり成功には至らなかったが、今回私はレトロウイルスベクターシステムにより、持続的に IL-17 ファミリーを強制発現させることの出来る骨髄キメラマウスを作製した。その際、発現レベルの適切なコントロールが非常に重要であり、本研究では、IL-17A の骨髄キメラマウスにおいて、血清 IL-17A 濃度は約 600 pg/mL に上昇しており、この血清 IL-17A 濃度は RA や炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases ; IBD)、家族性地中海熱 (familial Mediterranean fever)、川崎病の急性期などの炎症性疾患の患者で見られる血中濃度と同程度と考えられた。これらのことから、私が確立した骨髄キメラマウスの手法は、通常のトランスジェニックマウス作製において胎性致死を来すフェノタイプを呈するような、炎症性サイトカインの生理学的作用を解明するのに役立つと考えられる。

これらの結果より、IL-17A のみでなく、その他の IL-17 ファミリーである IL-17B、IL-17C、および IL-17F も、炎症性関節炎の病態において重要な役割を担っていることが示唆され、関節炎に対する新たな治療のターゲットになることが期待される。