

## 論文内容の要旨

論文題目 疾患モデルマウスを用いた関節炎発症機構の解析

氏名 西城 忍

### 序論

関節リウマチ(RA)は多発性関節病変を主徴とする全身の異常を伴う炎症性疾患で、自己免疫疾患の一つである。患者は人種にかかわらず世界中に分布しており、人口の約1%、日本では約70万人程度の患者がいるとみられている。RAは代表的な多因子疾患で、いくつかの要因が組み合わさって発症していると考えられ、遺伝的要因としてこれまで連鎖が示された遺伝子座はヒトではHLA-DR4、HLA-DR1などの特定のクラスII主要組織適合抗原(MHC)、またPADI4などが挙げられる。環境要因として、ウイルスや細菌、マイコプラズマなどの感染も発症に関与しているのではないかと考えられている。しかし、病態については未だ不明な点を多く残し、根本的な治療法は存在しない。

本研究では、RAの治療薬の新しい標的を見いだすことを最終目的とし、成人T細胞白血病ウイルス(Human T-cell Leukemia Virus Type 1; HTLV-I)の*tax*を発現するトランスジェニック(Tg)マウス(HTLV-I-Tgマウス)およびInterleukin 1 receptor antagonist(IL-1Ra)の遺伝子欠損(KO)マウス(IL-1Ra KOマウス)の2種類の関節炎モデルマウスを用い、関節炎の発症機構の解析を行った。その結果、主に1) HTLV-I-Tgマウスでは骨髄細胞が関節炎の発症に重要であること、2) HTLV-I-Tgの関節炎の発症はIL-1の欠損により抑制されること、3) C型レクチンの一つであるDectin-1は真菌感染防御に重要であると共に、関節炎の発症にも関与していること、の3点を明らかにした。

HTLV-Iは成人T細胞白血病の原因ウイルスとして知られるレトロウイルスで、そのゲノム中にはLTR, *gag*, *pol*, *env*といったレトロウイルスに共通な遺伝子の他にこのウイルスに特徴的な*pX*と呼ばれる領域が存在する。この*pX*領域にコードされるTaxタンパク質は転

写活性化能を持ち、ウイルス自身の LTR に働き転写を活性化させる他、サイトカインやサイトカインレセプターを始めとする種々の宿主遺伝子の転写も活性化することが報告されている。そこで、この Tax が宿主に与える影響を調べる目的で、Tax を発現する Tg マウスを作製したところ、このマウスが RA 様の関節炎を発症することが明らかとなった。HTLV-I-Tg マウスは4週齢を過ぎる頃から関節炎を自然発症し、その病理像はヒトの RA と良く似ており、関節滑膜細胞の増殖と炎症性細胞の浸潤、骨、軟骨の破壊などが観察され、いわゆるパンヌスを形成していた。また、血中ではリウマチ因子 (RF) などの自己抗体が検出されると共に、関節局所で TNF や IL-1、IL-6 といった炎症性サイトカインの発現が亢進しており、病態形成との関与が示唆された。

RA の発症におけるサイトカインの重要性は多くの研究者によって指摘されて来た。実際、TNF や IL-1、IL-6 などを標的とした生物製剤の有効性が報告されている。また IL-1Ra KO マウスは関節炎を自然発症することを宝来らと共に報告した。しかし、これらのサイトカインが単独で、あるいは互いに誘導することにより相乗効果を発揮する、いわゆる「サイトカイン・ネットワーク」を形成することにより病態形成に関与しているのか、またはこれらのサイトカインが免疫担当細胞で発現することが重要なのか、あるいは局所での炎症反応に関わっていることが重要なのかといった問題はまだ解決されていない。そこで、本研究では疾患モデル動物を用い、関節炎発症機構の解析を行った。

## 方法

**動物**：HTLV-I-Tg マウスは Iwakura らによって作製されたものを BALB/c に 12 世代以上戻し交配したものを使用した。IL-1KO マウスは Horai、Asano らによって作製されたものを BALB/c に 4 世代以上戻し交配したものを使用した。Dectin-1 KO マウスは ES 細胞を用い定法に従い作製し、C57BL/6J あるいは BALB/cA マウスに 8 世代以上戻し交配を行い、使用した。

**骨髄細胞の移植**：6~8 週齢の HTLV-I-Tg マウスと野生型マウスを骨髄細胞のドナーとして使用した。レシピエントマウスはドナーマウスと週齢、性をそろえ、7.5 Gy の放射線を照射し、6 時間後に  $10^7$  個の骨髄細胞を尾静脈より移植した。

**関節炎の評価**：マウスは 1 週間に 1 回観察を行い、肉眼的に関節炎の程度を評価した。四肢それぞれに 0 点から 3 点の点数で評価し、その後合計した。

## 結果および考察

まず、HTLV-I-Tg マウスの免疫担当細胞を野生型に置き換えることにより、関節炎の発症を抑えることが可能であるかどうかを検討する目的で、致死量の放射線を照射した HTLV-I-Tg マウスに野生型マウスの骨髄細胞を移植した ([non-Tg→Tg] マウス)。その結果、[non-Tg→Tg] マウスでは、関節炎の発症を完全に抑えることが示され、また逆に HTLV-I-Tg マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植 ([Tg→non-Tg] マウス) ことにより、病態を再現出来ることが明かとなり、HTLV-I-Tg マウスの異常は骨髄細胞にあることが示された。次に、この移植された細胞がどのような臓器に分布したのかを確認するために、レシピエントマ

ウスにおける導入遺伝子の発現を移植後 6 ヶ月の時点で確認した。その結果、[Tg→non-Tg] マウスの T 細胞、腹腔マクロファージで、導入遺伝子の強い発現が認められたが、[non-Tg→Tg] マウスでの発現は消失していることが示された。一方で、関節での発現を調べたところ、[Tg→non-Tg] マウスでは発現が確認されたものの、[non-Tg→Tg] マウスでの発現は完全に消失しておらず、関節の滑膜細胞は一部がドナー由来の骨髄細胞から置換されるに過ぎないと考えられる。これらの結果から、関節滑膜に常在する細胞ではなく、T 細胞、B 細胞、マクロファージなどの骨髄由来細胞が関節炎発症の原因となっていることが示唆された。さらに、HTLV-I-Tg マウスとヌードマウスの交配実験(HTLV-I-Tg-*nu/nu*)の結果、コントロールの HTLV-I-Tg-*nu/+* の発症率が 5 ヶ月齢で約 84%であったのに対し、胸腺を欠損する HTLV-I-Tg-*nu/nu* の発症率は約 14%と有意に低下し、骨髄由来細胞のうち、特に T 細胞の異常が関節炎発症の原因となっていることが強く示唆された。

次に、HTLV-I-Tg の関節で発現の亢進していた IL-1 に着目し、IL-1 KO マウスと交配し、IL-1 の欠損が関節炎の発症に及ぼす影響を検討した。その結果、6 ヶ月齢での関節炎発症率は野生型の HTLV-I-Tg で約 80%であったのに対し、HTLV-I-Tg-IL-1 KO マウスの発症率は約 53%で、有意に低下すると共に、RF や抗 2 型コラーゲン抗体と言った血中の自己抗体の量も低下し、さらにリンパ節細胞の 2 型コラーゲンに対する反応性も低下していた。これに関連し、当研究室の Nakae らは、IL-1 が T 細胞上の CD40L や OX40 といった副シグナル分子の発現を高めることにより、T 細胞の反応性を高めることを報告している。そこで、HTLV-I-Tg マウスの関節炎発症における IL-1 の役割を検討する目的で T 細胞上の CD40L と OX40 の発現を確認した。その結果、野生型マウスのリンパ節細胞は、2 型コラーゲンに反応し、CD40L と OX40 の発現が亢進していたが、HTLV-I-Tg-IL-1 KO マウスでは、これらの分子の発現亢進がみられず、IL-1 は T 細胞の活性化を介して、関節炎の発症に関与している可能性が示唆された。また、これらの結果から、IL-1 は治療薬の標的となり得ることが示された。

次に、HTLV-I-Tg マウスと IL-1Ra KO マウスの 2 種類の関節炎モデルマウスを用い、新たな治療薬の標的分子を見いだす目的で、マイクロアレイを用いた関節炎発症関連遺伝子の網羅的な探索を行い、その結果関節炎発症との関連が示唆された Dectin-1 に注目し、Dectin-1 の KO マウスを作製することにより、生理的・病理的役割を検討した。

Dectin-1 は C 型レクチンファミリーの一員で、細胞外に糖鎖認識領域を一つ、細胞内に活性化シグナルを伝える immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 領域を有する。マウスでは 6 番染色体のテロメア側に位置し、近傍では樹状細胞 (DC) やマクロファージに発現する C 型レクチン遺伝子が多くコードされ、クラスターを形成している。C 型レクチンの役割は多岐に渡るが、微生物由来の糖鎖をパターン認識分子 (Pathogen Associated Molecular Pattern; PAMPs) として認識する分子や、自己の分子を認識することにより、自己・非自己の区別を担っている分子などが存在することが知られる。Dectin-1 も当初、T 細胞上の未知のリガンドに結合し、増殖刺激を伝えていることが示唆されたが、その後、真菌類の細胞壁の構成成分の一部である、βグルカンを認識していることが示された。

βグルカンはキノコ、酵母を含む真菌類の細胞壁の主要な構成成分である。キノコや酵母から抽出されたβグルカンは、免疫調節物質として古くから使用され、特に、βグルカンとマンナン、キチンを主成分とする混合物であるザイモサンは DC やマクロファージに対し、

サイトカイン産生を促進することが報告されている。このザイモザンを用いた実験で、Dectin-1 は TLR2/MyD88 と協調して、TNF や IL-12 といった炎症性サイトカインの分泌に関与している可能性があること、Syk のリン酸化を介して、IL-10 や IL-2 の分泌に関与している可能性があることが報告されていた。そこで、本研究では、Dectin-1 KO マウスの骨髄由来 DC (BMDC) と、*Sparassis crispa* (*S. crispa*)から抽出したβグルカンである SCG を用い、Dectin-1 の DC におけるサイトカイン産生と DC の成熟化における役割を検討した。その結果、野生型の DC では SCG の用量依存的に TNF、IL-12、IFN-γの産生が見られたのに対し、Dectin-1 KO マウス由来の BMDC では、これらのサイトカイン産生は全く見られなかった。さらに、MyD88 KO マウス由来 DC では、野生型の DC と同等にサイトカイン産生が見られたことから、DC では、Dectin-1 がβグルカンの単一のレセプターであることが示唆された。

また、βグルカンは病原性真菌の細胞壁にも存在し、PAMPs として感染免疫応答との関与が注目されている。そこで、Dectin-1 の真菌感染における役割を明らかにする目的で、*Pneumocystis carinii* (*P. carinii*)の感染実験を行った。マウスを免疫不全の状態にするため、酢酸コルチゾン投与したマウスに経鼻的に  $1.7 \times 10^4$  の *P. carinii* シストを感染させ、その 42 日後に肺中でのシスト数を計数した。その結果、野生型マウスでは、平均  $2.6 \times 10^4$  のシストが検出されたのに対し、Dectin-1 KO マウスの肺では、平均  $9.3 \times 10^5$  のシストが検出され、Dectin-1 は *P. carinii* の排除に重要な役割を果たしていることが示された。また、*in vitro* での共培養の実験結果から、マクロファージに発現する Dectin-1 は *P. carinii* による活性酸素種 (ROS) の産生に必須であることが示され、自然免疫においても重要な分子であることがわかった。

次に Dectin-1 の関節炎発症における役割を検討する目的で、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) の誘導を行った。その結果、野生型マウスでは、約 67%のマウスが関節炎を発症したのに対し、Dectin-1 KO マウスでの発症率は約 21%と、有意に抑制していることが示された。ところが、抗原として用いた、2 型コラーゲンに対する抗体価や、リンパ球の反応性などは野生型マウスと Dectin-1 KO マウスでの差は認められず、Dectin-1 は、抗原特異的な液性免疫、細胞性免疫を介さずに関節炎の発症に関与していることが示唆された。

## 結論

疾患モデル動物を用いた一連の研究から、1) HTLV-I-Tg マウスの関節炎発症には骨髄由来細胞が重要であること、特に T 細胞の異常に関与している可能性があること、2) HTLV-I-Tg マウスの関節炎は IL-1 を介した T 細胞の活性化が重要であること、3) 関節炎発症関連遺伝子の網羅的探索によって見いだされた Dectin-1 は真菌感染防御に重要であると同時に関節炎の発症にも関与していること、を明らかにした。これらの結果から IL-1 や Dectin-1 は関節炎治療薬の標的となる可能性が示唆された。