

論文の内容の要旨

論文題目 全身性強皮症の病態における転写因子 IRF5 の役割についての検討

氏名 三枝 良輔

全身性強皮症は線維化、免疫異常および血管障害を 3 主徴とする原因不明の自己免疫疾患である。病因学および遺伝学的な検討により、強皮症は遺伝的要因と環境要因の複合的な要因による多因子疾患であると考えられているが発症のメカニズムについて詳細は明らかにされていない。近年 Toll 様受容体(Toll-like receptors; TLRs)を介した自然免疫におけるシグナル伝達が様々な疾患の病因として注目されており、その中でも細菌性リポ多糖(bacterial lipopolysaccharide; LPS)の受容体として同定された Toll 様受容体 4(TLR4)を介したシグナル伝達が強皮症の病因として中心的な役割を果たしている可能性がこれまで指摘されている。TLR4 を介したシグナル伝達経路がどのように強皮症の発症機序に寄与しているかは未だ不明であるが、いくつかの独立した症例対照研究やゲノムワイド関連解析によって interferon regulatory factor (IRF) ファミリーの一つである IRF5 が全身性強皮症の疾患感受性遺伝子の一つとして同定されている。IRF は自然免疫および適応免疫反応の制御において機能的多様性を持つことが示されている。このような IRF の性質から、IRF の単一塩基多型は様々な免疫、炎症疾患の発症に関連しており、IRF5 は特に多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、そして全身性強皮症の発症に関連が想定されている。さらに、一部の IRF5 遺伝子プロモーター領域の単一塩基多型と強皮症の発症リスクおよび重症度との関連が報告されているが、IRF5 がどのようにその発症に寄与しているのかは未だ明らかでない。IRF5 は樹状細胞などにおいて TLR によって活性化され炎症性サイトカインを誘導することから、TLR4 を介した IRF5 の活性化が強皮症の病態に関与している可能性が想定される。全身性強皮症の感受性および重症度に関連する様々な分子の制御において IRF5 が果たす役割を、TLR4 を介したシグナル伝達との関連にも注目し、IRF5 欠損マウス(*Irf5*^{-/-}マウス)を用いて主に強皮症の主要 3 病態である線維化、免疫異常、血管障害に着目して検討を行い、その知見と強皮症の臨床との関連を考察した。

まず皮膚の恒常性維持機能における IRF5 の役割について組織学的に検討を行ったが、*Irf5*^{-/-}マウス皮膚では細いコラーゲン線維が目立ち、さらに電子顕微鏡による検討では高次構造の異常も見られた。*Irf5* を欠損した線維芽細胞では、I 型コラーゲン産生の低下やコラーゲン高次構造の構築に関わる分子の発現に変化が見られ全身性強皮症由来の線維芽細胞と逆の性質を示した。さらに免疫沈降により IRF5 が I 型コラーゲンをコードする主要な遺伝子である *COL1A2* のプロモーター領域に作用している可能性

があることを示した。皮膚線維芽細胞における IRF5 の COL1A2 遺伝子発現に対する影響を検討するため、ヒト皮膚線維芽細胞に COL1A2 遺伝子プロモーター-ルシフェラーゼ遺伝子構築物を用いてレポーター遺伝子アッセイを行い、用量依存的に IRF5 が COL1A2 プロモーター活性を高めることを示した。さらに、LPS と transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)は I 型コラーゲンの発現を上昇させるが、それらの刺激はさらにレポーター遺伝子の発現を高めた。このことは TLR4 を介したシグナリングが IRF5 の転写活性を高めている可能性を示唆した。実際に IRF5 の COL1A2 遺伝子プロモーターへの結合が LPS と TGF- β 1 刺激によって増強された。さらに、TLR4 のリガンドとして生体内活性を持つ high-mobility group box 1 を用いて刺激すると同様の結合の増強が見られた。さらに、ここまでの結果と合致するように、Tlr4 欠損線維芽細胞において Col1a2 プロモーターへの IRF5 結合が著明に低下していた。このことから線維芽細胞において TLR4-IRF5 軸が COL1A2 遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。

全身性強皮症の主要なマウスモデルであるブレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルでは、全身性強皮症に類似した皮膚や肺の線維化、免疫異常および血管障害が誘導される。続いて、Irf5^{-/-}マウスを用いてそのモデルを作成し、全身性強皮症の主要 3 病態における役割について検討した。まず BLM によって誘導される皮膚および肺の線維化は Irf5^{-/-}マウスで野生型マウスと比較して有意に抑制されていた。

続いて同モデルマウスを用いて、IRF5 欠損が強皮症における免疫異常に及ぼす影響について検討した。Irf5^{-/-}マウスでは BLM 投与による組織への炎症細胞浸潤が野生型マウスと比較して有意に抑制されていた。多くの自己免疫性疾患で Th1 優位な環境が誘導されているが、強皮症においては、Th2 優位な環境が誘導されている。BLM 誘発モデルマウスにおいて Irf5 の欠損は CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現を上昇させることによって Th1 優位な環境を誘導しており、さらに Th1 のマスター制御因子である、T-box expressed in T cells(T-bet)に関しても Irf5^{-/-}マウスで上昇が見られた。また、免疫沈降法で CD4 陽性 T 細胞における Tbet 遺伝子プロモーター領域への IRF5 の結合が示され、IRF5 は Tbet 遺伝子の抑制因子として働いている可能性が示唆された。IRF5 はこれまで免疫細胞において正の制御因子として報告されているが、負の制御因子としての報告はなされていないため、さらなる検討のためレポーター遺伝子アッセイを行った。HEK293T 細胞において、恒常的に活性化した IRF5 のアイソフォームである IRF5A と TBET-ルシフェラーゼ遺伝子構築物を共発現させると、IRF5A 用量依存的にルシフェラーゼ活性が抑制されていた。TLR4 は T 細胞の炎症反応を促進することがこれまで報告されており、T 細胞においても TLR4-IRF5 軸が BLM の誘導する免疫応答に関与している可能性が考えられた。

次に IRF5 が全身性強皮症の血管障害の側面にどのように関与しているか検討を行った。BLM 投与マウスにおいて、野生型マウスで血管透過性が上昇し色素が漏出しているのに対し、Irf5^{-/-}マウスでは色素の血管外漏出がみられず、血管がより安定化して

いることが示唆された。BLM を投与した *Irf5*^{-/-}マウスにおいて成熟血管のマーカールと成りうる皮膚小血管における α -smooth muscle actin の発現が上昇していることが皮膚免疫染色によって示され、さらに血管安定性に寄与していると考えられている VE-cadherin の発現が *Irf5*^{-/-}マウスから単離した血管内皮細胞で上昇していた。また、IRF5 は血管内皮細胞において *Cdh5*(VE-cadherin をコードする遺伝子)のプロモーター領域に作用し、さらに *Tlr4* 欠損血管内皮細胞において *Cdh5* 遺伝子プロモーター領域への IRF5 結合が著明に低下しており、血管内皮細胞においても TLR4 シグナリングが IRF5 の転写活性に重要な役割を果たしている可能性が示された。

最後にマウスの実験結果をふまえ、強皮症患者皮膚における IRF5 の発現とその臨床所見との関連を検討した。IRF5 の mRNA の発現は有意に強皮症皮膚で健常人と比較し上昇しており、さらに皮膚硬化範囲のより広い群や血管障害としての手指潰瘍がある群で IRF5 mRNA レベルがより上昇していた。免疫組織化学では皮膚線維芽細胞および内皮細胞において IRF5 が発現上昇していることを確認した。さらに IRF5 の mRNA レベルは強皮症皮膚線維芽細胞で健常人皮膚線維芽細胞に比較し上昇しており、COL1A2 mRNA レベルと正の相関があった。このように、強皮症患者で IRF5 の発現量と臨床症状に相関が見られ、マウスでの検討の結果と矛盾しない結果が得られた。

単一塩基多型 rs4728142 は IRF5 プロモーターに位置し、そのマイナーアリルである 'A' アリルと重篤な臨床所見の軽減の相関が報告されている。IRF5 mRNA レベルは GG 遺伝子型を持つ強皮症患者皮膚に比較し AA 遺伝子型を持つ強皮症患者で低下していた。同様に COL1A2 mRNA レベルは AA 遺伝子型を持つ強皮症患者皮膚で低下していた。さらに、'A' アリルを持つ群で、全身性强皮症に合併する重要な予後因子である間質性肺病変が比較的軽症である傾向がみられた。このことから rs4728142 'A' アリルをもつ強皮症患者では、線維化の誘導に関与する分子発現の低下とともに、臨床症状の軽減が見られ、IRF5 がその過程に深く関与している可能性が示された。

以上まとめると、本研究は BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて *Irf5*^{-/-}マウスでは強皮症の主要な 3 病態である皮膚および肺の線維化、血管障害、免疫異常が野生型マウスに比較して抑制されることを見出した。それらの機序の一つとして、内因性リガンドによる TLR4 を介したシグナル経路によって活性化した IRF5 が様々な細胞において強皮症に特徴的な遺伝子発現様式を制御していることを明らかにした。これまで TLR4 シグナルの活性化が強皮症の病態に重要であることが知られていたがその詳細な機序は明らかでなく、本研究はこれまで強皮症の病態理解に不可欠と考えられてきた TLR4 および IRF5 の意義を明らかにし、これらを新たな標的とする治療の可能性を示した。