

審査の結果の要旨

氏名 三枝 良輔

本研究は全身性強皮症の病態において転写因子 IRF5 が果たす役割を明らかにするために、ブレオマイシン誘発強皮症マウスモデルを用いて *Irf5* 欠損マウスの表現型を解析し、さらに全身性強皮症患者における IRF5 の発現とその臨床所見との相関を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 無刺激状態の *Irf5*^{-/-}マウス皮膚では組織学的に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強皮症由来の線維芽細胞と逆の性質を示した。さらに転写因子 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、プロモーターアッセイによって用量依存的に IRF5 が *COL1A2* プロモーター活性を高めることを示した。加えて、TLR4 リガンドを含む向線維性刺激によって IRF5 の *COL1A2* 遺伝子プロモーターへの結合が増強され、TLR4 の欠損によってその結合が著明に減弱することが示された。
2. 強皮症に類似した皮膚や肺の線維化(2-1)、免疫異常(2-2)および血管障害(2-3)が誘導される強皮症の主要なマウスモデルであるブレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルを作成し IRF5 の役割について検討を行った。
 - 2-1. 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。
 - 2-2. *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に比較して有意に抑制されていた。強皮症においては、Th2 優位な環境が誘導されているが、*Irf5* の欠損は BLM 誘発強皮症モデルで Th1 優位な環境を誘導していた。免疫沈降法あるいはレポーター遺伝子アッセイで、CD4 陽性 T 細胞において Th1 細胞のマスター制御因子である *Tbet* 遺伝子プロモーター領域への IRF5 の結合が示され、IRF5 が *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。また、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免疫沈降法などによって示された。
 - 2-3. 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において上昇していた。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。

3. 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。

4. 強皮症において重篤な臨床所見の軽減との相関が報告されているIRF5プロモーター上の単一塩基多型rs4728142について検討を行った。‘A’アリルを持つ強皮症患者において、IRF5 mRNAレベルはCOL1A2 mRNAレベルなどとともに発現が低下しさらに、全身性強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、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すものであり、学位の授与に値するものと考えられる。