

論文の内容の要旨

論文題目：過剰な IL-1 シグナルによる Th17 細胞分化機構の解析
(The mechanism of Th17 cell development induced by excess IL-1 signaling)

氏名 池田 聡史

【背景と目的】

関節リウマチは自己免疫疾患の一つで全身性慢性炎症性疾患であり、関節の腫れを主徴とする難病である。遺伝的要因、環境要因、感染などが発症の原因と考えられているが、発症機構は完全には明らかとなっていない。多くの炎症性サイトカイン、ケモカイン、成長因子が発症した関節で発現しており、複雑なサイトカインネットワークを形成している。IL-1 や IL-6 は関節リウマチ発症に重要な炎症性サイトカインの一つだと考えられており、関節炎モデルマウスでその重要性が示されている。例えば申請者の所属する研究室で樹立された IL-1 レセプターアンタゴニスト欠損マウス(*Il1rn*^{-/-} mouse)は関節炎を自然発症する。しかし、IL-1 や IL-6 の関節炎発症における役割は完全には明らかにされていない。

Th17 細胞は IL-17 を産生する新しい CD4⁺ヘルパーT 細胞サブセットである。Th17 細胞はマウス自己免疫疾患モデルで重要な役割をしており、ヒトの関節リウマチでも同様に重要な役割を果たすと考えられる。Th17 細胞は naïve T 細胞から TGF- β 、IL-6 または IL-21 で誘導される。TGF- β は Foxp3 と Th17 細胞分化のマスターレギュレーターである retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) γ t を誘導し、IL-6・IL-21・IL-23 は STAT3 を活性化する。STAT3 は IL-17 プロモーターに ROR γ t と共に結合して直接 IL-17 の発現を活性化し、さらに ROR γ t の発現や IRF-4 の発現も活性化して間接的に IL-17 発現を促進する。Foxp3 は制御性 T(Treg)細胞分化のマスターレギュレーターであり、Treg 特異的遺伝子の発現を制御している。Th17 細胞分化条件下において、TGF- β は Foxp3 と ROR γ t を誘導するが、TGF- β により誘導された Foxp3 は ROR γ t に結合して ROR γ t の機能を抑制して Th17 細胞分化を抑制する。IL-6、IL-21、IL-23 はこの Foxp3 による ROR γ t の抑制を解除して Th17 細胞分化を促進すると考えられている。そのため、炎症性の Th17 細胞分化と抑

制的な Treg 細胞分化は相互排他的であると考えられている。

IL-1 β は IL-17 産生細胞の分化、生存、増殖を促す。IL-1 は下流で PI3K、NF- κ B、PKC θ といったシグナル伝達因子を介して IL-17 産生を促進し、IL-6 と協調的に IRF-4 発現を亢進させる。しかし、IL-1 による Th17 細胞分化の詳細について完全には明らかになっていない。

申請者の研究室では、これまでに *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症が IL-17 に依存する事や、関節炎局所で IL-1 β 、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの発現が亢進している事を報告してきた。*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症における IL-6 の役割を明らかとする為に、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスを作成した。興味深い事に、IL-6 の欠損は関節炎の発症に殆ど影響を与えなかった。そして、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-} マウスでも *Il1rn*^{-/-} マウスと同様に Th17 細胞が分化していた。そこで、過剰な IL-1 シグナルによる Th17 細胞分化機構の解明を行った。

【実験方法】

Il1rn^{-/-}マウスと *Il6*^{-/-}マウスを交配させて *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスを作成し、関節炎の発症率や重症度を観察した。マウスリンパ節細胞や脾臓細胞の解析は、FACS により行った。またリンパ節から細胞を MACS や cell sorter により精製し、*in vitro* で anti-CD3、anti-CD28、anti-IFN- γ 、anti-IL-4 存在下でサイトカイン刺激を加える事で Th17 細胞分化誘導実験を行った。分化誘導した細胞の遺伝子発現は、リアルタイム PCR 法や FACS により解析した。

【結果と考察】

観察の結果、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスは *Il1rn*^{-/-}マウスと同様に関節炎を発症し、脾臓のリンパ球数が増加していた事から免疫反応が亢進している事が明らかとなった。また *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスのリンパ節でも Th17 細胞が分化している事が明らかとなった。そこで、IL-6 非依存的 Th17 細胞分化機構を解析した。

Il6^{-/-}CD4⁺T 細胞を MACS で精製して IL-1 で刺激したところ、IL-6 非依存的に Th17 細胞分化が亢進する事が分かった。さらに cell sorter で精製した *Il6*^{-/-}naïve CD4⁺T 細胞は、TGF- β +IL-1+IL-21 刺激により効率的に Th17 細胞に分化した。また naïve T 細胞には IL-1R1(IL-1 受容体)は発現していないが、IL-21 により発現が誘導される事を見出した。これらの結果は、IL-1 は Th17 細胞に分化しつつある細胞に作用して、IL-17 産生や Th17 細胞の分化を亢進させる事を示唆している。

Th17 細胞分化における IL-1 の作用を解析したところ、IL-1 は ROR γ t の発現には影響を与

えないが、Th17細胞分化に重要な *Batf* や *Nfkbiz* といった転写因子の発現を亢進させることを見出した。次に、Th17細胞分化と相互排他的な *Foxp3*⁺細胞分化を解析したところ、Th17細胞分化誘導条件下では IL-1 が *Foxp3* の発現を抑制する事を見いだした。この *Foxp3* の発現抑制は、IL-1 シグナル伝達因子である MyD88 の欠損マウス由来 T 細胞では完全に喪失した。また、mTOR 阻害剤でも IL-1 による *Foxp3* の発現抑制が緩和された。これらの結果から、IL-1 は IL-1R1-Myd88-mTOR シグナル経路を介して *Foxp3* を抑制する事が示唆された。さらに、この IL-1 による *Foxp3* 発現抑制は細胞増殖非依存的であること、Th17細胞分化条件下の *Foxp3*⁺細胞にも IL-1R1 が発現していることから、IL-1 が *Foxp3*⁺細胞に直接的に作用していると考えられた。次に IL-1 による *Foxp3* 抑制において、*Foxp3* の発現を抑制する事が知られている IL-6 や IL-21 の関与を検討した。IL-6 欠損マウス由来 naïve T 細胞や IL-21R-Fc タンパク質を用いた IL-21 阻害実験から、IL-1 による *Foxp3* 発現抑制は IL-6 や IL-21 非依存的である事が明らかとなった。

IL-1 が Th17細胞の維持にも関与するかを解析したところ、TGF- β と IL-1 により効果的に Th17細胞が維持された。この結果から、IL-1 が Th17細胞分化初期だけでなく Th17細胞の維持にも関与していると考えられた。

生体内における IL-1 シグナルの Th17細胞分化における役割を解析する為に、IL-1R1 欠損 naïve T 細胞を *Rag2*^{-/-}マウスに移植したところ、末梢で誘導される Th17細胞の割合が野生型に比べて有意に減少することを見いだした。この結果は、生体内でも IL-1 シグナルが Th17細胞分化に重要な役割を果たしている事を示唆している。

これらの結果から、過剰な IL-1 シグナルは *Foxp3*⁺細胞への分化を抑制と Th17細胞分化転写因子の発現を制御する事によって、Th17細胞の分化を誘導している事が示唆された。