

論文の内容の要旨

論文題目 The role of Interleukin-1 receptor type 2 in the development of collagen-induced arthritis and helper T cell differentiation
(コラーゲン誘導関節炎およびヘルパーT細胞分化における IL-1R2 の役割)

氏名 清水謙次

第1章 コラーゲン誘導関節炎における IL-1R2 の役割

▼背景

Interleukin-1 (IL-1) は主要な炎症性サイトカインの1つであり、発熱誘導、急性期タンパク質の産生誘導、リンパ球、単球、顆粒球などの増殖・活性化・遊走促進などの多様な生理活性を持つ。IL-1には IL-1 α と IL-1 β の2種類があり、どちらも IL-1 receptor type I (IL-1R1) を介してシグナルを伝達する(図1)。もう1つの IL-1 の受容体として IL-1 receptor type II (IL-1R2) が存在する。IL-1R2 は細胞内のシグナル伝達ドメインを欠いており、IL-1 に結合するがシグナルを伝えないデコイ受容体として働き、IL-1 シグナルを抑制するということが *in vitro* の実験から示唆されていた。しかし、実際に生体においてどのような生命現象に関与するかは知られていなかった。

関節リウマチは関節における炎症を主徴とする炎症性自己免疫疾患で、患者は人種にかかわらず世界中に分布し、日本では約70万人の患者がいると見られている。関節リウマチ患者では IL-1R2 プロモーター領域の脱メチル化と血中 IL-1R2 濃度が有意に亢進していることが報告されており、IL-1R2 が関節リウマチに関与することが示唆されている。今回我々は IL-1R2 KO マウスを作製することにより、関節炎の発症における IL-1R2 の役割を検討した。

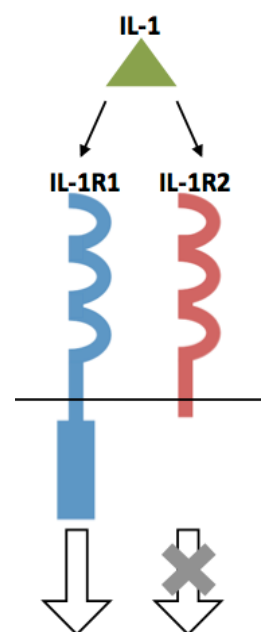


図1. インターロイキン-1とその受容体

▼結果

IL-1R2 KO マウスは、外見上異常はなく、健康で繁殖にも異常はなかった。

骨髄、胸腺、リンパ節、脾臓における白血球の組成も正常だった。

IL-1R2 KO マウスは GFP ノックインマウスになっている。GFP の発現をフローサイトメトリーで確認すると、好中球で強い発現が、炎症部位に浸潤している単球、マクロファージで弱い発現が確認された(図2)。

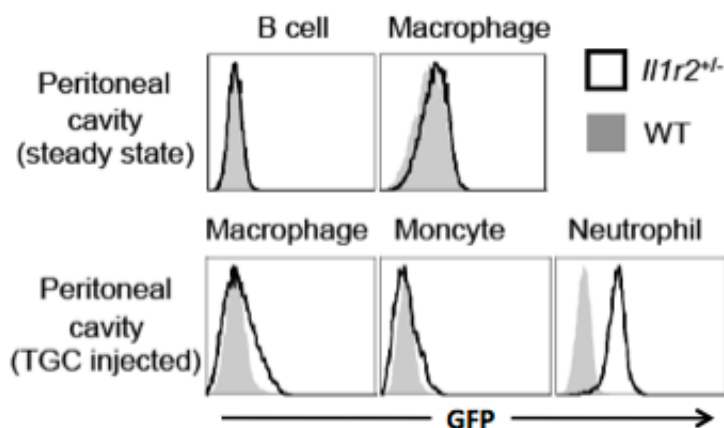


図2. IL-1R2発現細胞

関節炎の発症に IL-1R2 がどのように関与するか調べるため、コラーゲン誘導関節炎を誘導すると、IL-1R2 KO マウスは野生型マウスに比べて高い重症度と発症率を示した(図3)。また誘導40日目で関節の切片を作製し、病理学的に重症度を評価してみたところ、顆粒球の浸潤と骨破壊がKOマウスで顕著に亢進していた。パンス形成と軟骨破壊も亢進傾向にあった。

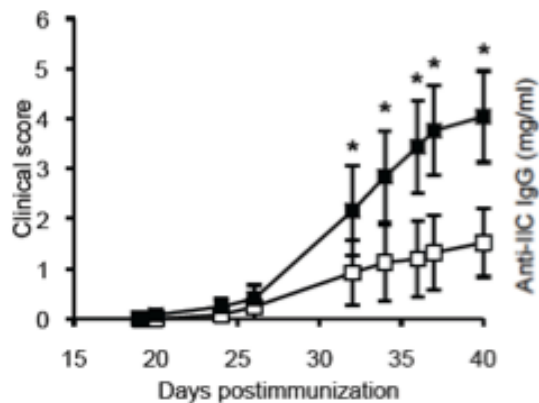


図3. コラーゲン誘導関節炎

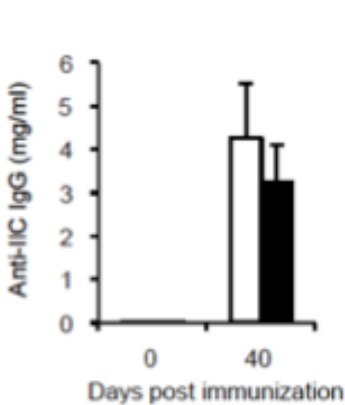


図4. 抗コラーゲン抗体濃度

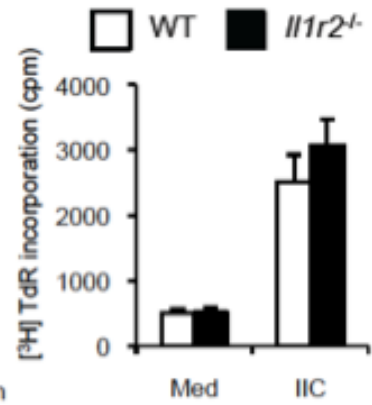


図5. リンパ球増殖

関節炎の発症にはB細胞からの抗コラーゲン抗体の産生と、コラーゲン特異的なT細胞の増殖が必要である。まず、血中の抗コラーゲン抗体量をELISAで測定したところ、IL-1R2 KOマウスにおいても野生型マウスと同程度の量が分泌されていた(図4)。また、抗体のサブクラスごとの抗コラーゲン抗体価にも差はなかった。

次にコラーゲン免疫部位の所属リンパ節の細胞をコラーゲン存在下で培養し、コラーゲンに反応するリンパ球の応答を調べたが、これもIL-1R2 KOマウスと野生型マウスで同程度の増殖応答が確認された(図5)。また、そのときのIFN- γ 、IL-17A、TNFの産生量にも差はなかった。同様にそのときのリンパ節中のTh1、Th17、Treg、Tc1、Bcellの細胞数にも差はなかった。

以上の結果から、IL-1R2 KOマウスにおいてもB細胞からの抗コラーゲン抗体の産生と、コラーゲン特異的なT細胞の増殖は正常に起きていることがわかった。

よってIL-1R2 KOは関節局所における炎症の進行に関与していると考えられた。実際に関節局所における遺伝子発現を調べてみたところ、IL-1R2 KOでは*Il6*、*Cxcl2*、*Nos2*、*Il1b*などの炎症誘導因子の発現が亢進していた(図6)。

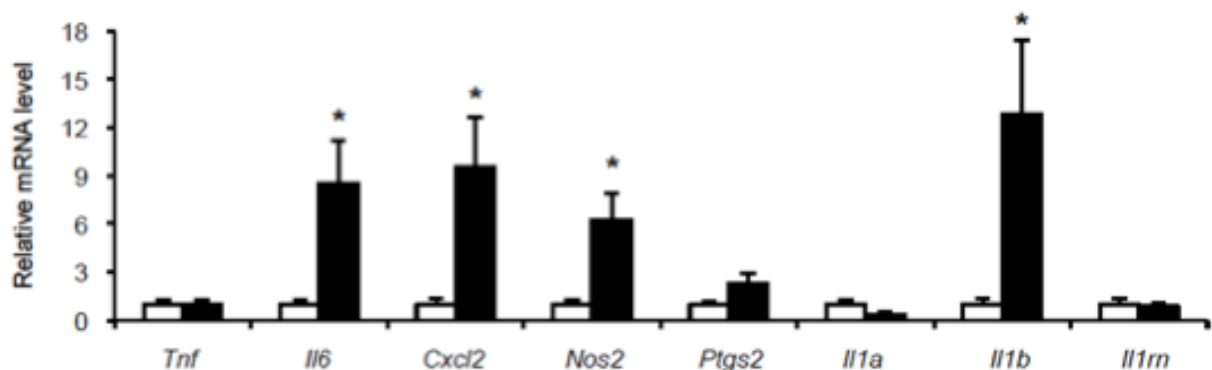


図6. 関節での遺伝子発現

好中球で IL-1R2 が高発現していることから、IL-1R2 KO の好中球が IL-1 に高感受性になっているか調べた。予想に反して、WT の好中球においても、KO の好中球においても IL-1 の添加で生存は維持されなかった (図7)。ポジティブコントロールの GM-CSF では WT と KO で同程度に生存が維持された。同様に、IL-1 を添加ではサイトカイン産生も誘導されなかった。ポジティブコントロールの LPS では WT と KO で同程度にサイトカイン産生が誘導された。

In vivo の炎症時には IL-1 以外にも様々なサイトカインが分泌されており、そのようなサイトカインとの組み合わせが IL-1 の効果を発揮するために必要であると予想し、in vivo で好中球の生存能をみてみた。放射線照射することで白血球とその前駆体を除いたマウスに WT と KO の骨髄を 1:1 に混ぜて移植し、骨髄キメラマウスを作製した。このマウスに IL-1 α を腹腔投与して炎症を誘導し、6 時間後に腹腔内、血中、骨髄内の好中球、単球、マクロファージ、B 細胞における WT と KO の構成比を調べた。しかし、どの組織のどの細胞においても WT と KO の構成比はほぼ 1:1 で、好中球の生存に IL-1R2 は関与していないことがわかった (図8)。

次に、炎症部位に浸潤する細胞として単球に注目した。WT および KO の単球を IL-1 で刺激してみたが、サイトカイン産生は誘導されなかった (図9)。一方で CD40 の発現は IL-1 で誘導され、さらに KO では発現が WT よりも強かった (図10)。コントロールの LPS、Pam3CSK4 に対する応答は WT と KO で差はなかった。

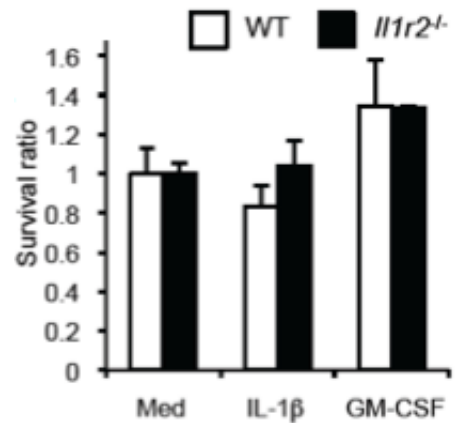


図7. 好中球の生存能 (in vitro)

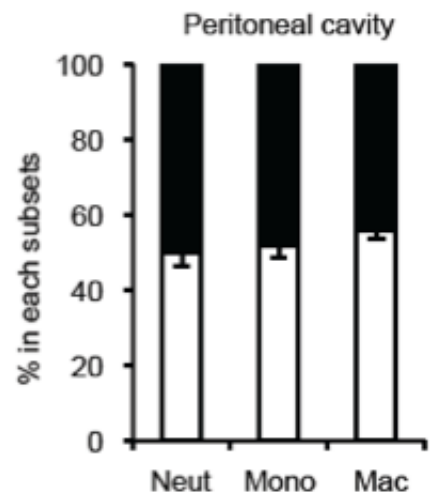


図8. 好中球の生存能 (in vivo)

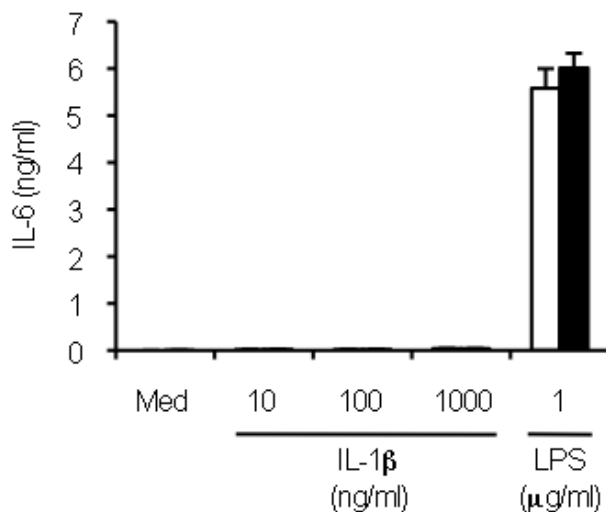


図9. 単球のIL-6産生

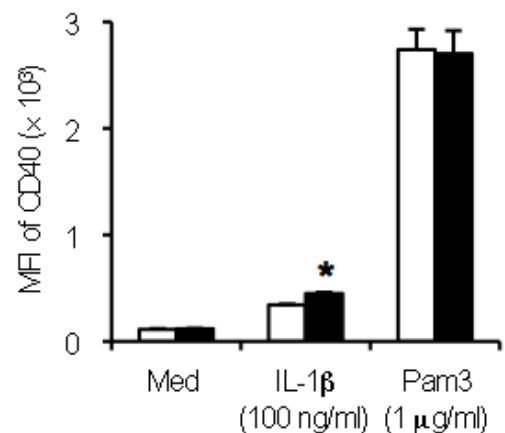


図10. 単球のCD40発現

次にマクロファージに注目した。WTのマクロファージをIL-1で刺激してもサイトカイン産生は確認されなかったのに対し、KOのマクロファージをIL-1で刺激するとサイトカイン産生が確認された。同様に、炎症誘導因子のmRNA発現も、WTではIL-1によってわずかにしか誘導されないのに対して、KOでは強く誘導された(図11)。もし、IL-1R2がデコイ受容体として働いているならばKOではIL-1シグナルが強く入っていると考えられる。ウエスタンブロッティングによりNF- κ BおよびMAPKの活性化をみたところ、IL-1刺激時においてKOではI κ B α の分解およびMAPKのリン酸化がWTよりも亢進していた。LPS刺激時はWTとKOで差は認められなかった。(図12)

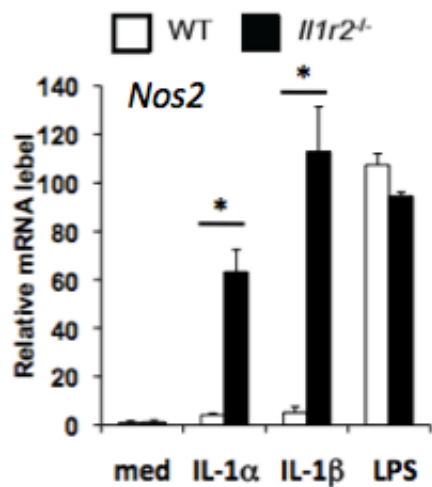


図11. マクロファージの*Nos2*発現

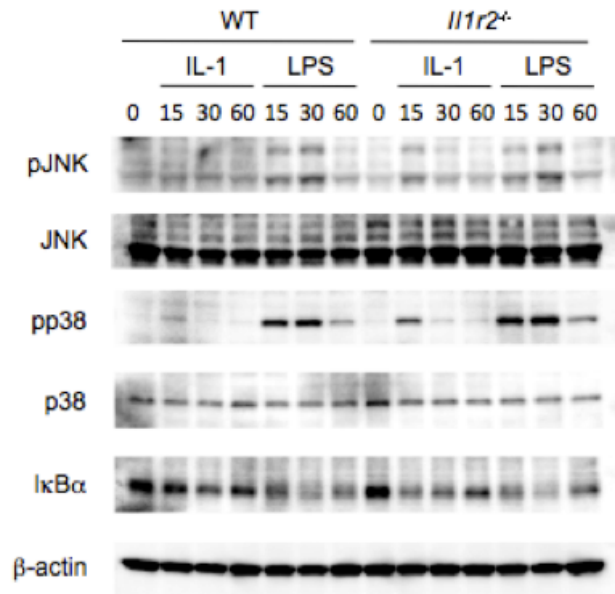


図12. シグナル分子のウエスタンブロッティング

▼考察

本研究により、IL-1R2はIL-1のデコイ受容体として働き、関節炎の増悪を抑制していることがわかった。また、その機能は単球とマクロファージでのみ発揮されていた。

同じく、IL-1の内在性の阻害因子であるIL-1Raの欠損は関節炎を自然発症させるのに対し、IL-1R2の欠損では関節炎は自然発症しなかった。この理由は、IL-1Raは分泌されて周辺の細胞全てに影響を及ぼすのに対し、IL-1R2は特定の細胞でのみIL-1シグナルを抑制するためだと考えられる。

他のIL-1の内在性の阻害因子として、SIGIRR、ST2といった受容体型のものや、IRAK-M、A20などの細胞内シグナルを抑制するものも存在する。IL-1は感染防御に欠かせないサイトカインだが、過剰に存在すると自己免疫疾患の原因になりうる。IL-1の内在性阻害因子が何種類もあるのは、IL-1が厳密に制御される必要があることを示している。

(第2章は未公開データを含むためインターネット公表しない。)