

論文の内容の要旨

論文題目 関節炎モデルにおける *Peptidylarginine deiminase type 4* の機能解析

氏名 瀬理 祐

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis ; RA) は破壊性の多関節炎を特徴とする疾患で、免疫の異常が原因と考えられている。RA の病因については、完全には明らかとなっていないが複数の環境因子、遺伝的因子の関与が示唆されている。近年、RA においても一塩基多型のゲノムワイド関連解析を用いた遺伝子探索が行われ、HLA-DR を始めとした様々な RA の疾患感受性遺伝子が報告されている。ペプチジルアルギニンデイミナーゼ タイプ 4 (*Peptidylarginine deiminase type 4* ; *PADI4*) 多型は non-MHC 遺伝子の RA の疾患感受性遺伝子としては初めて報告され、現在ではアジア人、欧米人に共通した RA に特異的な疾患感受性遺伝子の一つと認識されている。

PADI4 は蛋白質のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する翻訳後修飾能を有する PAD4 蛋白をコードしている。脊椎動物では *PADI1*~4, 6 の 5 種類の *PADI* 遺伝子が報告されているが、免疫系細胞において重要な *PADI* サブセットは生体内で広範囲の細胞に恒常的に発現する *PADI2* と主に骨髄球、顆粒球を始めとした血球系の細胞に局限して発現し、炎症により発現誘導される *PADI4* とが考えられる。RA において高い特異度を有する自己抗体として anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) が知られている。*PADI4* の RA 感受性アレルでは mRNA の安定性が増すことが示されており、*PADI4* の RA 感受性アレル保持者では PAD4 蛋白の増加によってシトルリン化蛋白産生が亢進し、ACPA の出現に寄与するといった仮説が議論されている。一方で、*PADI4* は核内移行シグナルを有し、PAD4 はヒストンなどの核内蛋白のシトルリン化による遺伝子発現の制御の結果、細胞増殖等の多彩な現象に関与することが報告されていることや、ACPA 陰性の RA 患者においても *PADI4* 遺伝子が骨破壊の独立したリスクであることが報告されていることから、RA の病態形成における *PADI4* の役割についても従来のシトルリン化自己抗原の過剰産生以外の役割が示唆されている。

今回、我々はヒト *PADI4* のカウンターパートであるマウス *Padi4* のエクソン 1 を欠損した *Padi4* knockout (KO) マウスを用いて、炎症性関節炎モデルにおける *Padi4* の役割を検討した。ヒトと同様にマウスにおいても *Padi4* は骨髄球系、顆粒球系、単球系の細胞で主に発現しているが他の細胞群では低発現であることがわかっている。マウス自己免疫疾患モデルとして Recombinant human Glucose-6-phosphate isomerase (rhGPI) 誘導性関節炎モデルを用いた。Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) は K/BxN 関節炎モデルにおける関節炎誘発原性を有する自己抗体の抗原として同定された普遍的に存在する解糖系酵素の一つであり、DBA1/J マウスへの rhGPI の免疫によって約 7 日後より発症して約 14 日後に関節炎のピークとなった後は自然軽快する RA 類似の関節破壊を伴う四肢関節炎を惹起できる。rhGPI 誘導性関節炎は CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、抗 rhGPI 抗体が発症・重症化に重要であることが証明されており、特に関節炎の発症から増悪において IL-6, IL-17 の重要性が明らかとなっている関節炎モデルである。

まず、rhGPI 誘導性関節炎における臨床的、病理的評価を行った。DBA1/J wild type (WT) マウスに比して *Padi4* KO マウスは関節炎の発症率は同等であったが、関節炎の臨床的重症度と組織における炎症細胞浸潤、軟骨破壊、骨びらんスコアの有意な改善を認めた。また、*Padi4* KO マウスでは免疫 7 日後における脾細胞の増加が WT マウスと比べて有意に抑制されていた。血清抗 rhGPI 抗体価(ELISA)は、*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して抗 rhGPI IgM, IgG 抗体価の減少を認め、抗原特異抗性的な抗体の産生能の低下が示唆された。脾臓、鼠径リンパ節における B 細胞数は WT マウス、*Padi4* KO マウスで差は見られなかったが、鼠径リンパ節においては *Padi4* KO マウスで免疫後 14 日後の胚中心(Germinal center)B 細胞(B220⁺GL-7⁺CD95⁺)の有意な減少を認めた。

次に、免疫前後における T 細胞の動態を検討した。*Padi4* KO マウスは WT マウスと比して総 T 細胞数、CD4⁺CD62L⁻CD44⁺、CD4⁺CD62L⁻CD69⁺ T 細胞といった活性化 CD4⁺ T 細胞数は同等であり、また CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞も同等であった。免疫 7 日後の鼠径リンパ節細胞を *ex vivo* にて rhGPI 存在下で 3 日間の培養後に CFSE 希釈による CD4⁺ T 細胞の増殖、細胞内サイトカイン染色により T helper 1 (Th1), Th17 細胞への分化を検討したところ、*Padi4* KO マウスでは WT マウスと比して細胞増殖は同程度であったが、Th17 細胞の有意な減少を認めた。一方、Th1 細胞の分化は同等であった。そして、同様の結果を免疫 14 日後にも得られた。また、免疫 7 日後の鼠径リンパ節での Th17 細胞の遊走に参与する *Ccl20* の発現を定量的 PCR で検討したところ、その発現は *Padi4* KO マウスは WT マウスに比して亢進していた。更に、*Padi4* KO-CD4⁺ T 細胞自身の分化能の障害を検討するため、免疫前の WT マウス、*Padi4* KO マウスの脾臓 CD4⁺ T 細胞を *in vitro* の Th1, Th17 分化誘導条件で培養したが、Th1 細胞, Th17 細胞への分化に差を認めなかった。

そこで、rhGPI 誘導性関節炎の発症、増悪に重要とされる炎症性サイトカインである IL-6 について検討した。免疫 2 日後に血清 IL-6 濃度は最初のピークを認めるが、この際は *Padi4* KO マウスが WT マウスに比して高値であった。そして、WT マウスでは血清 IL-6 濃度が免疫 7 日後にかけて低下した後に 14 日後に再増加しているものの、*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して免疫 7, 14 日後の血清 IL-6 濃度が著明に低下していた。しかし、免疫 2 日後の免疫部位の所属リンパ節である傍大動脈リンパ節における炎症性サイトカイン発現を定量的 PCR で評価したところ、*Padi4* KO において、WT と比べて *Il-12p40* 発現が低下し、*Il-1a*, *Il-6* 発現は増加しており、*Il-23*, *Tgfb* 発現は同等であった。また、概ね同様の結果を免疫 2, 7, 14 日後における鼠径リンパ節、脾臓、関節、骨髄、肝臓、小腸でも認めた。

最後に、rhGPI 誘導性関節炎における IL-6 の重要な産生源である顆粒球系細胞、単球系細胞、樹状細胞について検討を行った。顆粒球系細胞として CD11b^{hi}Ly-6G^{hi}Ly-6C^{im}P-linea^{e-} 細胞、単球系細胞として CD11b^{hi}Ly-6G^{lo}Ly-6C^{hi}P-linea^{e-} 細胞および樹状細胞として CD11b⁺CD11c^{hi}Ly-6g⁻B220⁻CD8⁻ 細胞を評価した。免疫前の WT マウスと *Padi4* KO マウスでは脾臓におけるこれらの細胞数は同等であった。しかし、免疫 7 日後には *Padi4* KO マウスの脾臓にて顆粒球系細胞、単球系細胞の著明な減少を認めた。また、樹状細胞数には差が見られなかった。さらに、免疫前後における骨髄における成熟好中球の細胞数にも差を認めなかった。以上より、

Padi4 KO マウスでは顆粒球系細胞, 単球系細胞の生存に問題がある可能性が考慮された。そこで免疫前の骨髄好中球を比重遠心法で分離した後に無刺激, LPS, TNF α , GM-CSF, G-CSF 存在下で 48 時間の培養を行い、培養終了後に Propidium Iodide-Annexin V 生細胞の割合を生細胞率として評価したところ、*Padi4* KO マウス由来の好中球は何れの条件においても生存率が著明に低下していた。以上より、*Padi4* KO マウスの好中球では寿命の短縮を示しており、結果として rhGPI 誘導性関節炎における顆粒球系細胞の減少する原因の一つと考えられた。

今回の *Padi4* KO マウスを用いた rhGPI 誘導性関節炎モデルにおける *Padi4* の機能の検討では、*Padi4* KO マウスにおいて関節炎重症度、病理学的所見の著明な改善を認めるとともに、血清抗 GPI 抗体価の低下、Th17 細胞の減少、血清 IL-6 濃度の低下、顆粒球系細胞, 単球系細胞の減少といった多彩な免疫系への直接的、間接的な影響が観察され、関節炎の軽減に関与していると考えられた。RA において IL-6, Th17 細胞の病態における重要性は、中和抗体の臨床的有効性により明らかであるが、今回のマウスを用いた検討により *PADI4* 遺伝子がこれらの制御に関与している可能性が示唆された。*PADI4* による翻訳語修飾としてのシトルリン化がこれらの免疫機構の制御にどう関与しているかに関する分子生物学的な解析とともに、RA 患者における遺伝子多型と遺伝子発現の関連に関する解析が今後重要であると考えられる。