

審査の結果の要旨

氏名 瀬理 祐

本研究は関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) の疾患感受性遺伝子であるペプチジルアルギニンデアミナーゼ タイプ 4 (*Peptidylarginine deiminase type 4*; *PADI4*) の機能解析を目的として、ヒト *PADI4* のカウンターパートであるマウス *Padi4* を Knock out (KO) したマウスを用いて Recombinant human Glucose-6-phosphate isomerase (rhGPI) 誘導性関節炎モデルを解析し、下記の結果を得た。

1. *Padi4* KO マウス, WT マウスとも rhGPI 誘導性関節炎の発症率はほぼ全ての個体で認められたことから同等であったが、*Padi4* KO マウスは WT マウスに比して臨床的重症度, 組織学的重症度の著明な改善を認めた。さらに、rhGPI の免疫によって脾細胞, リンパ細胞の著明な増加を認めるものの、*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して免疫 7 日後の時点で既に脾細胞の増加が軽度であった。また、免疫 14 日後には *Padi4* KO マウスは WT マウスに比して脾細胞, 鼠径リンパ節細胞とも著明に減少していた。

2. *Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して免疫 14 日後の血清抗 rhGPI IgM, IgG の抗体価が減少していた。また、経過中の脾臓, 鼠径リンパ節の B220+ B 細胞数は同等であった。しかし、両系統の免疫 7 日後の鼠径リンパ節の CXCR5+ PD-1+ CD4+ Follicular helper T 細胞は同等であるものの、*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して免疫 14 日後の GL-7+ CD95+ B220+ Germinal center B 細胞の減少を認めた。*Padi4* KO マウスでは抗原特異的な抗体産生の低下を呈しているものの、同抗体は関節炎の発症には重要であるが、抗体価は関節炎の重症度には相関せず、*Padi4* KO マウスにおける関節炎の改善を説明し難いと考えられた。

3. 両系統の経過中の CD3+ T 細胞数は同等であり、さらに活性化フェノタイプとしての CD62L⁻ CD44⁺ CD4⁺ T 細胞, CD62L⁻ CD69⁺ CD4⁺ T 細胞や制御性フェノタイプとしての CD25⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞も同等であった。しかし、免疫 7 日後の鼠径リンパ節細胞を rhGPI 存在下で培養した後の CD4⁺ T 細胞の増殖は両系統で同程度であるものの、*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して IL-17⁺ CD4⁺ Th17 細胞の減少を認めた。免疫 14 日後でも鼠径リンパ節における Th17 細胞の減少についても同様の結果を得た。しかし、免疫前の脾臓の CD4⁺ T 細胞における Th17 分化条件下での培養では両系統とも同等の Th17 細胞分化を認めた。*Padi4* KO マウスにおいては活性化, 制御性 T 細胞の分化, 増殖は障害されていないものの、免疫後 7, 14 日後の所属リンパ節における関節炎の発症, 増悪に重要な Th17 細胞の減少を認め、これは CD4⁺ T 細胞以外の原因によることが考慮された。

4. 免疫後の血清 IL-6 濃度を ELISA にて測定したところ、免疫 2 日後にピーク濃度となった際に *Padi4* KO マウスが WT マウスに比して高値であった。しかし、免疫 7 日後にかけて WT マウス、*Padi4* KO マウスとも濃度が低下するものの、*Padi4* KO マウスがより低値であった。さらに、免疫 14 日後にかけて WT マウスは再び濃度の増加を認めるが、*Padi4* KO マウスでは更に低下していた。本モデルでは IL-6 の阻害によって関節炎の発症、増悪が著明に改善することから、*Padi4* KO マウスにおける関節炎の改善の重要な要因であると考えられた。しかし、免疫後 2, 7, 14 日後の鼠径リンパ節、脾臓等の様々な臓器において quantitative PCR で *Il-6* の発現を検討したところ、何れの臓器においても *Padi4* KO マウスにおいて発現の著明な低下は認めなかった。以上より、個々の細胞における *Il-6* の発現低下は示唆されなかったが、総蛋白量としての IL-6 の減少が示唆された。

5. 顆粒球系細胞として FSC^{hi} SSC^{hi} CD11b⁺ Ly-6G⁺ Ly-6C^{int} P-lineage⁻ 細胞、単球系細胞として FSC^{int} SSC^{int} CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{hi} P-lineage⁻ 細胞および樹状細胞として FSC^{int} SSC^{int} CD11c^{hi} Ly-6G⁻ B220⁻ CD8⁻ 細胞数を検討した。*Padi4* KO マウスは WT マウスに比して免疫後の細胞数の増加は *Padi4* が高発現である顆粒球系細胞、単球系細胞において著しく少なかったが、*Padi4* を発現していない樹状細胞は同等であった。また、骨髄での顆粒球系細胞数は免疫前後において両系統とも同等であった。以上より、rhGPI 誘導性関節炎モデルにおける IL-6 重要な産生源とされている CD11b⁺ 細胞の主なサブセットである顆粒球系細胞、単球系細胞が、免疫後に *Padi4* KO マウスは WT マウスに比して著明に減少していることが IL-6 蛋白量の原因の一つと考えた。さらに、免疫前の骨髄成熟好中球を *in vitro* で LPS, マウス TNF α , マウス GM-CSF, マウス G-CSF 存在下で培養後に Ly-6G⁺ 好中球の生存率を Propidium Iodide/Annexin V にて解析したところ、*Padi4* KO マウスは WT マウスに比して何れの条件においても生存率が低下していた。以上より *Padi4* KO マウスの顆粒球系細胞では寿命の低下を呈しており、炎症環境下において細胞数の減少として顕在化することが示唆された。

本研究によって rhGPI 誘導性関節炎における *Padi4* の欠損が炎症状態で顆粒球系細胞、単球系細胞の末梢での生存や血清 IL-6, Th17 細胞分化、抗体産生といった多彩な免疫機構を制御していることが証明された。これらの新たな知見は、従来の RA における *PADI4* の役割として考えられてきたシトルリン化蛋白の過剰な産生に伴う抗シトルリン化蛋白抗体の産生以外にも、*PADI4* が様々な免疫系細胞の動態に影響を与えることで関節炎の免疫応答における重要な役割を担う可能性が示唆され、学位の授与に値するものと考えられる。