

学 位 論 文 題 名

The mechanism of regulation of eotaxin production by Th1/Th2 cytokines

(Th1/Th2 サイトカインによるエオタキシン産生制御機構)

学位論文内容の要旨

アレルギー疾患は、侵入した異物を除去しようとする過剰な免疫反応によるものであるが、わが国を含む先進諸国における罹患率の増加は著しく、現代病の一つに数えられている。アレルギー疾患として代表的なものに、気管支喘息があるが、次のようなメカニズムで発症に至ることがわかっている。

抗原吸入により、樹状細胞などの抗原提示細胞がその抗原を貪食し、未感作 CD4 陽性 T 細胞へと提示する。抗原を提示された未感作 T 細胞は刺激を受け、また、サイトカインの刺激を受けることによりタイプ 2 ヘルパー T 細胞 (Th2) へと分化する。この Th2 細胞は IL-4、IL-13 などのサイトカインを産生し、周囲の細胞に影響を与える。B 細胞では、これらのサイトカインを受け取ることにより IgE へのクラススイッチが起こり、抗原特異的な IgE を産生ようになる。この IgE が肥満細胞表面の Fc レセプターに結合し、さらに抗原が結合することにより肥満細胞の活性化、化学伝達物質や炎症性サイトカインの産生を引き起こし、気道平滑筋の収縮、血管透過性亢進、粘液分泌亢進を惹起する。また、IL-4、IL-13 が気道上皮細胞、血管内皮細胞に作用すると、好酸球の遊走を促すケモカインであるエオタキシン、RANTES、MCP-3、MCP-4 の産生、血管外浸潤に重要な細胞接着分子である VCAM-1 の発現増強が起こり、気道への好酸球の浸潤、集積が起こり、活性化した好酸球が脱顆粒することにより、気道粘膜上皮の損傷、気道閉塞、気道過敏性の亢進が引き起こされる。

このように、実際の気道アレルギーの症状を引き起こすのは肥満細胞や好酸球であるが、これらの細胞の活性化を制御しているのは Th2 細胞である。我々の研究室では、気道アレルギーにおける Th1、Th2 細胞およびそれらが産生するサイトカインのさらに詳細な解析を行うため、独自に開発したマウス気道アレルギーモデルを用いて実験を行った。その結果、気管支喘息のような Th2 主体の気道アレルギーだけではなく Th1 型の気道アレルギーにおいても気道過敏性の上昇を誘導したが、浸潤細胞をみると Th2 型では好酸球の、Th1 型では好中球の浸潤が主にみられた。また、IFN- γ 遺伝子を欠損したマウス由来の未感作 T 細胞より誘導した Th1 細胞を移入した Th1 型気道アレルギーモデルでは野生型ではみられなかった好酸球の浸潤が認められた。これにより Th1、Th2 細胞は気道アレルギーにおいて異なる病態を誘導し、また、これらの細胞が産生するサイトカインが重要な役割を果たしていることが示唆された。

そこで本研究では、それらのサイトカインが炎症部位においてどのように周囲の細胞に影響を与えているかについて調べるため、炎症部位を想定したモデルを用いて実験を行った。炎症部位における気道上皮細胞等のモデルとしてマウス胎児繊維芽細胞を用い、好酸球の遊走

を最も強く誘導するケモカインであるエオタキシンの産生における IL-4 (Th2 サイトカイン) と IFN- γ (Th1 サイトカイン) の影響を調べた。野生型の繊維芽細胞を IL-4 および TNF- α で刺激すると、サイトカインを単独で用いたときに比べ、相乗的なエオタキシン産生の上昇がみられるが、同時に IFN- γ を加えると、高いエオタキシン産生上昇が抑制されることが認められた。では、IFN- γ は IL-4 と TNF- α のシグナル伝達のどちらを抑制しているかを確かめるために IL-4 と TNF- α それぞれと IFN- γ により細胞を刺激し、エオタキシンの mRNA の発現を RT-PCR により確認した。この結果、IFN- γ は IL-4 によるエオタキシンの発現を抑制していることが確認された。また、このときの IL-4 シグナル伝達について調べるため、IL-4 の下流分子である STAT6 のリン酸化をウエスタンブロット法で調べた。その結果、IL-4 および TNF- α で刺激した時にみられる STAT6 のリン酸化は IFN- γ を加えることにより抑制されていることが認められた。この抑制効果は IFN- γ の下流分子である STAT1 を欠損したマウスの繊維芽細胞ではみられなかったため、IFN- γ から STAT1 を経由する経路が必須である。IFN- γ により IL-4 のシグナルを抑制するものとして、SOCS1 が関わっているという報告があり、この場合においても SOCS-1 が関与しているかを次に調べた。刺激時における SOCS-1 遺伝子の発現をノーザンブロット法により確認した結果、IFN- γ で誘導されることが確認された。次に IFN- γ によるエオタキシン産生抑制における SOCS-1 の関与について調べるために SOCS-1 欠損マウスの繊維芽細胞を用いて実験を行った。すると、野生型繊維芽細胞でみられる IFN- γ による抑制は SOCS-1 欠損マウスの繊維芽細胞ではみられなかった。逆に SOCS-1 の遺伝子を導入し SOCS-1 を恒常的に発現する繊維芽細胞ではエオタキシンの産生を測定すると、IL-4 および TNF- α で刺激をしてもエオタキシンが抑制されていることが確認された。以上により IFN- γ は、SOCS-1 の発現を誘導することにより IL-4 シグナル伝達の抑制を引き起こしエオタキシンの発現を抑制しているということが証明された。

また、IFN- γ は同様の経路を介し、IL-4 により誘導されるさまざまな遺伝子の発現を抑制し、Th2 により引き起こされる反応を抑制しているものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 西 村 孝 行 (遺伝子病制御研究所)
副 査 教 授 幸 田 敏 明
副 査 助教授 渡 邊 信 久
副 査 助教授 福 原 法 夫

学 位 論 文 題 名

The mechanism of regulation of eotaxin production by Th1/Th2 cytokines

(Th1/Th2 サイトカインによるエオタキシン産生制御機構)

申請者は本論文において、喘息等の気道アレルギー疾患における好酸球遊走を促す因子の一つであるエオタキシンの、Th1/Th2 サイトカインによる産生制御機構を明らかにした。通常、エオタキシンはサイトカインの刺激により主に気道上皮細胞から産生されることがわかっているが、実際にこの細胞のみを採取するのは技術的に困難なため、代わりにマウス胎児繊維芽細胞を用い、サイトカイン刺激時におけるエオタキシンの産生制御機構について解析を行った。Th2 サイトカインである IL-4 や炎症性サイトカインである TNF- α で刺激するとわずかにエオタキシンの産生が確認されたが、IL-4 と TNF- α で共刺激すると、相乗的な産生上昇が確認された。このとき Th1 サイトカインである IFN- γ を加えるとエオタキシンの産生が強く抑制されていることが確認された。サイトカイン刺激時におけるエオタキシン遺伝子の発現を RT-PCR 法を用い確認した結果、エオタキシン産生と同様に IL-4、TNF- α で刺激時には高いエオタキシン mRNA の発現が確認されたが、IFN- γ 添加時には、これが強く抑制されていることが確認された。次に IFN- γ が IL-4 と TNF- α のどちらのシグナル伝達系に影響を与えることにより、抑制効果を示しているかを確認するために、それぞれのサイトカインと IFN- γ で刺激時におけるエオタキシン mRNA の発現を確認した結果、TNF- α により誘導されるエオタキシン mRNA の発現は抑制されなかったが、IL-4 により誘導されるエオタキシン mRNA の発現が IFN- γ により抑制されていることが確認された。次に、IFN- γ はどのように IL-4 のシグナル伝達系を抑制し、エオタキシンの発現を抑制しているかを調べるために、IL-4 の主要なシグナル伝達系である STAT6 のリン酸化についてウエスタンブロット法を用い確認した結果、IFN- γ 添加時に STAT6 のリン酸化が抑制されていることが確認された。また、エオタキシン産生における STAT6 の重要性を確認するために STAT6 ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞を用いエオタキシン産生を確認した結果、IL-4 と TNF- α で刺激しても相乗的なエオタキシン産生上昇が見られなかった。これにより、STAT6 によるシグナル伝達がエオタキシンの産生に重要であることが確認された。次に、IFN- γ がどのようにエオタキシン産生抑制を引き起こすかを調べるために、IFN- γ の主要なシグナル伝達タンパク質である STAT1 を欠損したマウスの繊維芽細胞を用い、同様の実験を行った。その結果、STAT1 を欠損すると、IFN- γ により引き起こされるエオタキシンの産生抑制が起こらないことが確認され、また、このとき、IL-4

により誘導される STAT6 のリン酸化も抑制されないことが確認された。IFN- γ により STAT1 を介して STAT6 のリン酸化を抑制するタンパク質として SOCS1 があるが、マウス胎児繊維芽細胞においても IFN- γ により SOCS1 の発現が誘導されるかを確認するためにノーザンブロット法を用いた。その結果、IFN- γ 添加時には SOCS1 が強く誘導されるが、STAT1 が欠損した繊維芽細胞では誘導が見られないことが確認された。IFN- γ により誘導されるエオタキシン産生抑制における SOCS1 の関与について確認するために、SOCS1 ノックアウトマウスの繊維芽細胞を用い実験を行った。SOCS1 ノックアウトマウスの繊維芽細胞では IL-4 により誘導される STAT6 のリン酸化やエオタキシン産生の IFN- γ による抑制が確認されなかった。また、レトロウイルスを用い SOCS1 の遺伝子を導入することにより恒常的に SOCS1 を発現させた繊維芽細胞では、IFN- γ 非存在下でも STAT6 のリン酸化およびエオタキシン産生が抑制されていることが確認された。

発表後、SOCS1 のシグナル伝達阻害機構について、本実験においてマウス胎児繊維芽細胞を用いた理由、マウス胎児繊維芽細胞と気道上皮細胞のシグナル伝達経路における同一性、STAT1 ノックアウトマウスと SOCS1 ノックアウトマウスの繊維芽細胞の違い、本実験に関わるシグナル伝達タンパク質における構造解析等の状況についての質問があり、いずれに対しても申請者は、自身の実験データや論文報告等を引用し、概ね適切な回答をした。

この論文は、エオタキシンの産生制御における SOCS1 の重要性について新たに解析を行ったものであり、これにより、喘息などの疾患における症状の改善に SOCS1 の発現誘導や STAT6 を分子標的とすることの有効性が示唆され、新たな分子標的薬の開発に貢献するところが大きいものと考えられる。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。