

学位論文題名

Evaluation of the roles for IL-17-producing helper
CD4⁺ T(Th17) cells and the therapeutic
application to the immune diseases

(免疫疾患におけるIL-17産生CD4⁺ヘルパー T細胞 (Th17)の関与
およびその治療法開発に関する研究)

学位論文内容の要旨

研究の背景と目的

現在、癌や感染症の克服の為に、より強力で持続的な免疫応答を誘起する免疫療法の開発が精力的に進められている。とりわけ CD4 陽性ヘルパー T 細胞(Th 細胞)による効率的な免疫システムの活性化が注目されており、その制御機構の詳細な解明が重要課題である。これまで Th 細胞にはいくつかのサブセットが報告され、細胞性免疫を担う Th1 細胞と体液性免疫に重要な Th2 細胞の 2 種が存在し、互いにバランスをとりながら免疫系を抑制している事が広く知られている。さらに近年、リウマチ関節炎や実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症に強い関与が認められる IL-17 産生 Th17 細胞の発見や、自己免疫疾患の抑制を担う CD25⁺ Foxp3⁺ 陽性 制御性 T 細胞 (Treg)といった新しい Th 細胞サブセットの生理的意義が解明された。現在では Th1/Th2 バランスのみでは生体内における免疫応答の制御は完全に説明し得ず、これら Th17 細胞、Treg を含めた新たな免疫バランスのパラダイムが構築されつつある。

Th 細胞は免疫バランスの制御を強く司っている一方で、その機能制御の破綻は時として生体に癌、アレルギーや自己免疫疾患といった重篤な疾患をもたらす。免疫疾患の発症メカニズムは未だ不明な部分も多く、効果的な免疫療法を患者に施す上で、Th 細胞の制御機構を詳細に解明する事は非常に重要な意味を持つ。今回、私は自己免疫疾患の発症に強く関与が考えられる Th17 細胞、また炎症性サイトカインであり、且つ Th17 細胞の誘導に必須である IL-6 に着目し、疾患の評価と Th17 細胞の生体内での機能について検討を行った。本研究では、第 1 章にて Th 細胞依存性の慢性大腸炎モデルマウス、第 2 章では当研究室で樹立した新規の Th 細胞依存性の移植片対宿主疾患(GVHR)モデルマウスを用い、Th 細胞を介した生体内の免疫バランス制御と疾患発症メカニズムとの関連について検討を行うと同時に、免疫疾患の新しい治療法開発を目指した。

実験方法と結果・考察

第 1 章；野生型 BALB/c マウスの脾臓より CD45RB^{hi}CD62L⁺ナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、免疫不全である同系統の RAG2 遺伝子欠損 BALB/c マウスの尾静脈内に移入をした。その結果、末梢のリンパ節よりも腸間膜リンパ節において有意に CD4⁺T 細胞の分裂が認められ、エフェクター型の細胞が多くみられた。また、移入後 2 週における各リンパ器官の CD4⁺T 細胞のサイトカイン産生を細胞内染色、ELISA 法で評価したところ、IFN- γ や IL-17

などのサイトカインを高産生する Th 細胞が誘導されており、またこれらのマウスは組織切片の HE 染色法等による病理学的診断から、慢性的な大腸炎を発症している事が確認された。さらに、IL-6 のシグナルを遮断するアンタゴニスト抗体(抗 IL-6R 抗体)をナイーブ CD4⁺T 細胞移入と共に投与する事で、大腸炎の発症や起因する体重減少の抑制などが有意に認められた。さらに詳細な解析を進めるため、IL-17 欠損マウス由来のナイーブ CD4⁺T 細胞を用いて同様の解析を行ったところ、CD4⁺T 細胞から IL-17 の産生が無い条件でも大腸炎の発症が認められた。抗 IL-6R 抗体の投与により、各リンパ器官の IL-17 産生 CD4⁺T 細胞は減少していたが、同時に IL-4 や IL-10 を高産生する Th2 細胞サブセットが増加している事が明らかとなった。以上の結果より Th17 細胞は大腸炎発症の必要条件ではない事、抗 IL-6R 抗体によるシグナルの遮断が Th 細胞分化のバランスを是正し Th1 細胞、Th17 細胞の誘導を抑制するとともに Th2 細胞、Treg の誘導を促進する事で大腸炎の発症を制御しているという事が示唆された。

第 2 章;本研究でまず始めに野生型 B10D2 系統マウスの脾臓より CD45RB^{hi}CD62L⁺ナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、メジャー抗原(MHC)が適合する RAG2 遺伝子欠損 BALB/c マウスの尾静脈内に移入した。その結果、系統差異とマイナー抗原の認識を利用した CD4⁺T 細胞依存的に発症する GVHR の病態が生ずる事を見いだした。宿主の BALB/c マウスは、T 細胞を移入後 1 週間ほどで重篤な GVHR を発症し、7~10 日ほどで全てのマウスが死亡した。これらのマウスは眼瞼の炎症、下痢・血便、体毛の乱れや行動の低下などの著明な GVHR 症状を示していた。病態発症マウスの組織を病理学的に診断した結果、肝実質細胞の変性・腎臓や大腸へのリンパ球集積などの著しい組織異常が起きていたほか、肝機能障害を示す GOT/GPT 値の上昇も確認された。リンパ節や脾臓などのリンパ器官における、移入 CD4⁺T 細胞の表現型を用いて解析したところ、Vβ3 T 細胞レセプターを持つ CD4⁺T 細胞のみが異常に増殖している事が判明した。これらの CD4⁺T 細胞は、IFN-γ や TNF-α、IL-17 を高産生する Th1 細胞、Th17 細胞といった Th 細胞へと分化している事も明らかとなった。一方この疾患モデルマウス内においては IL-4 産生 Th2 細胞や Foxp3 陽性の Treg などのサブセットはごく少数しかみられなかった。さらに、抗 IL-6R 抗体をナイーブ CD4⁺T 細胞移入とともに投与する事で、病態の著しい改善と生存の延長が確認され、この病態の発症に IL-6 のシグナルが強く関与している事が示唆された。本研究で構築した急性 GVHR モデルは宿主の CD8⁺T 細胞や B 細胞など他のリンパ球の影響や相互作用を交えない系であるため、病態の発症は CD4⁺T 細胞の活性化のみに起因する。また同系統の RAG2 遺伝子欠損 B10D2 マウスを宿主に用いた場合には、この急性 GVHR は発症しない事から、本疾患モデルマウスに移入されたナイーブ CD4⁺T 細胞は、BALB/c に発現しているマイナー抗原を認識して急激に増殖し、IL-6 の作用により病原性の Th1 細胞、Th17 細胞へと偏向して分化し、宿主に臓器不全と死をもたらす事が示唆された。

結論および展開

ナイーブ CD4⁺T 細胞はその中に自己応答性の細胞群を含み、その異常な増殖や活性化によって Th1 細胞や Th17 細胞等の炎症性エフェクター Th 細胞が誘導され、慢性的な大腸炎、急性 GVHR 等の免疫疾患を惹起する事が示された。またこれらの病態発症は IL-6 によってもたらされ、このアンタゴニスト抗体を用いる事により病態を著しく軽減する事が可能であり、Th 細胞の異常分化と免疫バランスを是正する事が確認された。

今回の研究で用いた慢性大腸炎や GVHR は著しく QOL の低い疾患であり、発症に至るメカニズム解析および治療法開発などの意義は大変深いものと考えられる。本研究の遂行により、IL-6 シグナルを介した T 細胞機能の制御機構の解明、T 細胞以外の細胞群との関与、GVHR を抑制する最終的なエフェクター因子の同定がなされることで、生体内でのサイトカインとシグナル伝達経路が明確化され、病態発症との関連性が示される事により、さらなる新しい免疫療法への応用が期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 野 口 昌 幸
副 査 教 授 清 野 研 一 郎

学 位 論 文 題 名

Evaluation of the roles for IL-17-producing helper CD4⁺ T(Th17) cells and the therapeutic application to the immune diseases

(免疫疾患におけるIL-17産生CD4⁺ヘルパーT細胞(Th17)の関与
およびその治療法開発に関する研究)

本研究において発表者は自己免疫疾患の発症に強く関与が考えられる Th17 細胞、また炎症性サイトカインであり、且つ Th17 細胞の誘導に必須である IL-6 に着目し、第 1 章にて Th 細胞依存性の慢性大腸炎マウスモデル、第 2 章では当研究室で樹立した新規の Th 細胞依存性の急性移植片対宿主疾患(GVHR)マウスモデルを用い、Th 細胞を介した生体内の免疫バランス制御と疾患発症メカニズムとの関連について検討を行った。

リウマチ関節炎や実験的自己免疫性脊髄炎(EAE)の発症に Th17 が関与しているという報告はすでになされていたが、慢性大腸炎の発症と Th17 の関連や影響については明らかにされていなかった。発表者はナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、免疫不全である同系統の RAG2 遺伝子欠損 BALB/c マウスの尾静脈内に移入を行って発症する大腸炎モデルでその関与を評価した。その結果、Th17 細胞は大腸炎発症の必要条件ではない事、抗 IL-6R 抗体によるシグナルの遮断が Th 細胞分化のバランスを是正し Th1 細胞、Th17 細胞の誘導を抑制するとともに Th2 細胞の誘導を促進する事で大腸炎の発症を制御しているという事が示された。

B10D2 マウスよりナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、主要組織適合抗原(MHC)が適合する RAG2 遺伝子欠損 BALB/c マウスの尾静脈内に移入する事により、系統差異とマイナー組織適合抗原の認識を利用した CD4⁺T 細胞依存的に急性の GVHR が生ずる事を見いだした。宿主マウスは、T 細胞を移入後 1 週間ほどで著明な GVHR を発症し全てのマウスが死亡した。宿主マウス組織を病理学的に解析した結果、肝実質細胞の変性・腎臓や大腸へのリンパ球集積などの著しい組織異常が起きていたほか、肝機能障害を示す GOT/GPT 値の上昇も確認された。宿主マウス生体内では Vβ3 T 細胞レセプターを持つ CD4⁺T 細胞のみが異常に増殖している事が判明し、これらの CD4⁺T 細胞は IFN-γ や TNF-α、IL-17 を高産生する Th1 細胞、Th17 細胞といった Th 細胞へと分化していた。さらに抗 IL-6R 抗体をナイーブ CD4⁺T 細胞移入とともに投与する事で、病態の著しい改善と生存の延長が確認され、この病態の発症に IL-6 のシグナルが強く関与している事が示唆された。

発表終了後、副査の今村教授より慢性大腸炎と急性 GVHR 両モデルの共通点を問われ、発表者はナイーブ CD4⁺T 細胞はその中に自己応答性の細胞群を含み、リンパ球減少症と抗原刺激によって異常な増殖や活性化が起こり、炎症性エフェクター Th 細胞が誘導されて免疫疾患を惹起する点、また病態発症は IL-6 シグナルによってもたらされ、IL-6 レセプターのアンタゴニスト抗体を用いる事により病態を著しく軽減できる点が共通すると返答した。野口教授から IL-6 レセプターの一部である gp130 に対する抗体やシグナル効果などに関する質問を受け、発表者は gp130 が様々なシグナルのアダプターであり、ノックアウトマウスが胎生致死でもあることからその機能が多岐に渡り、今回と同様の表現型を示す事は困難であろうと返答した。清野教授よりこの研究と他の知見との差異・本研究の独創的な点について、またヒトへの応用に関する質問を受け、発表者は本研究にて慢性大腸炎疾患モデルが Th17 に依存しないで発症するという事を初めて報告した点、また、ヒトへの応用として骨髄移植や T 細胞の養子免疫療法を行う上で、副作用としての免疫疾患発症の抑制に寄与するであろう事を示した点で新規性があると回答した。西村教授より IL-6 で、CD4⁺T 細胞からの IL-10 産生が抑制される理由を問われ、発表者は IL-6 と IL-10 はシグナルの下流分子として共に STAT3 を共有している事が理由として考えられ、これらが競合してネガティブな影響が起きる可能性があるかと返答した。主査である笠原教授より急性 GVHR での組織傷害をもたらすエフェクター細胞は何が考えられるか、また他の臓器での病変は起きるのかという質問を受け、発表者は IFN- γ や TNF- α を高産生する Th1 による直接の傷害効果、あるいは宿主に豊富に存在する炎症性のマクロファージなどがエフェクターとして考えられる事、肝臓以外では腎臓にやや異常は見られるものの大腸や肺などでは組織所見で大きな変化は見られないと返答した。

この論文は生体内での IL-6 シグナルを介した T 細胞機能の制御機構と病態発症との関連性を解明した事が高く評価され、今後の慢性大腸炎や GVHR 等、著しく QOL の低い疾患の治療への応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。