

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 野口 大輔

### 学位論文題名

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

[免疫疾患における IL-17 産生 CD4<sup>+</sup>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]

### 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<sup>+</sup> 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<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup>ナイーブ CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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- $\gamma$  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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞を用いて同様の解析を行ったところ、CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup>ナイーブCD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。