

氏 名	吉 崎 隆 道
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 577 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	大動脈炎モデルマウスの病態機序における IL-25 の機能解析
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 高 橋 将 文 (委 員) 准教授 長 嶋 孝 夫 講 師 早 川 盛 禎

論文内容の要旨

1 研究目的

高安動脈炎と巨細胞性動脈炎を代表とする血管炎症候群は、免疫応答の異常で全身の様々な血管に炎症が起り、時に致命的な状態となる疾患である。炎症の局所において免疫細胞が、IL-6、IL-17A、TNF- α などの炎症誘導性サイトカインの過剰な産生を介して病態形成に関わっている。薬物治療に加えて外科的治療が有効であるものの、再燃の抑制については未だ十分に制御できていない。血管炎の発症機構の解明のためのマウスモデルとして、大動脈炎を自然発症する IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) 欠損 (*Il1rn*^{-/-}) マウスが利用されており、IL-17A がこのマウスの大動脈炎の増悪に関わっていることが知られている。近年、IL-25 (IL-17E) は、様々なマウスの疾患において、3 型 (Th17 型) 免疫応答の増悪あるいは抑制に関わることが報告されている。本研究では、*Il1rn*^{-/-} マウスにおける IL-17A 依存的な大動脈炎の発症及び病態形成における IL-25 の関与及び機能解析を行うことを目的とした。

2 研究方法

Il1rn^{-/-} マウスと IL-25 遺伝子欠損 (*Il25*^{-/-}) マウスの交配により *Il25*^{-/-} *Il1rn*^{-/-} マウスを作成した。マウスの大動脈を回収し、凍結切片を作成後、病理学的評価 (発症率、病状のスコア、疾患部位面積) を行った。大動脈への浸潤細胞を免疫染色法にて同定、及び、サイトカインやサイトカイン受容体の発現を免疫染色法あるいは定量的 PCR 法によって評価を行った。大動脈炎の発症に関わる IL-25 産生細胞は骨髄由来の血球系細胞か、それ以外の非血球系細胞かを明らかにするために、*Il1rn*^{-/-} マウス及び *Il25*^{-/-} *Il1rn*^{-/-} マウスを用いた骨髄移植実験を行った。

3 研究成果

大動脈炎を発症した *Il1rn*^{-/-} マウスの大動脈周辺において、IL-1 β は樹状細胞、好中球、マクロファージで発現が認められ、IL-1Ra は樹状細胞、好中球、 $\gamma\delta$ T 細胞で発現が認められた。

大動脈炎の発症率は、12 週齢と 16 週齢の *Il1rn*^{-/-} マウスでは 36.4%、51.7%であったのに対し、*Il25*^{-/-} *Il1rn*^{-/-} マウスでは 5.6%と 21.8%と低下していた。大動脈炎を発症した *Il1rn*^{-/-} マウスの大動脈では、正常な野生型マウスの大動脈と比較して *Il17a*、*Tnfa*、*Il17rb* mRNA 発現が亢進していた。*Il1rn*^{-/-} マウスの大動脈と *Il25*^{-/-} *Il1rn*^{-/-} マウスの大動脈における遺伝子発現を比較したところ、*Il25*^{-/-} *Il1rn*^{-/-} マウスでは *Il6*、*Il17a*、*Tnfa*、*Il17rb* mRNA 発現が低下していた。

大動脈炎を発症した *Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈周辺において、IL-25 受容体 (IL-17RB)の発現細胞は、樹状細胞、マクロファージ、 $\gamma\delta$ T 細胞であったが、IL-25 の発現細胞は、蛍光免疫染色法では同定出来なかった。そこで、*Il1rn*^{-/-}マウスと *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス間での骨髄移植実験を行った。その結果、*Il1rn*^{-/-}マウス骨髄細胞を移植した *Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈炎の発症率は 38.5% (n=5/13)であったが、*Il1rn*^{-/-}マウス骨髄細胞を移植した *Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈炎の発症率は 7.1% (n= 1/14)と低く、非血球系細胞から産生される IL-25 が大動脈炎の病態形成に関わることが明らかになった。

IL-17RB 発現細胞に対する IL-25 の機能を評価するために、骨髄誘導樹状細胞、骨髄誘導マクロファージ、脾臓由来 B 細胞、脾臓由来 $\gamma\delta$ T 細胞を調製し、これら細胞を IL-25 の存在下で培養を行ったが、それぞれの細胞で *Il17rb* mRNA 発現が認められず、炎症性サイトカインの産生も検出できなかった。そこで、大動脈炎を発症した *Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈を酵素処理し、大動脈細胞を回収した。大動脈細胞を IL-25 の存在下及び非存在下で培養したところ、IL-25 で刺激した場合において、IL-17RB 陽性樹状細胞では IL-1 β の発現が亢進し、IL-17RB 陽性マクロファージでは TNF- α の発現が亢進した。

4 考察

Il25^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈炎発症率が低下したことから、*Il1rn*^{-/-}マウスでは IL-25 が大動脈炎の発症を促進することが明らかになった。*Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈炎は、IL-1 及び TNF- α 依存的に発症し、IL-17A によって炎症が増悪することが分かっている。*Il25*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスの大動脈で *Il17a* 及び *Tnfa* mRNA の発現低下が認められたことから、IL-25 がこれら炎症性サイトカインの発現を誘導することで大動脈炎の増悪に関わることが示唆された。これらの所見は、in vitro において、IL-25 は IL-25 受容体 (IL-17RB)を発現する樹状細胞及びマクロファージから IL-1 β 及び TNF- α の産生をそれぞれ誘導できることから支持されるが、樹状細胞やマクロファージ特異的に IL-17RB を欠損させたマウスを作成、利用することで個体レベルでの詳細な解析が今後必要であると思われた。

5 結論

本研究により、IL-25 は *Il1rn*^{-/-}マウスにおける大動脈炎の増悪に関わることが初めて明らかになった。その機序として、非血球系細胞が産生する IL-25 が IL-25 受容体 (IL-17RB)を発現する樹状細胞やマクロファージからの IL-1 β や TNF- α の産生を誘導することにより増悪することが示唆された。この結果から、大動脈炎発症例に対する IL-25 を標的とした新たな治療戦略の可能性を示すことができた。

論文審査の結果の要旨

血管における炎症は、高安動脈炎や巨細胞性動脈炎といった血管炎症候群のみならず、動脈硬化においても重要な役割を果たしていることから、その分子機序の解明と新たな治療標的の同定は重要な課題となっている。

申請者は、大動脈炎を自然発症する IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) 欠損 (KO) マウスでは、その病変部位において IL-25 (別名 IL-17E) の発現が亢進していることから、IL-1Ra と IL-25 の二重欠損 (IL-1Ra/IL-25-DKO) マウスを作製して、IL-25 の役割を検討し、以下の結果を得た。

IL-1Ra 欠損マウスにおける大動脈炎の発症率や炎症の重症度、各種炎症細胞の浸潤は、

IL-1Ra/IL-25-DKO マウスにおいて有意に改善した。病変部位における IL-17A、IL-6、TNF α の発現も IL-1Ra/IL-25-DKO マウスにおいて有意に低下した。骨髓移植実験により、非骨髓由来のレジデント細胞の IL-25 が、大動脈炎の発症に寄与していることが示された。IL-1Ra-KO マウスの大動脈から単離した細胞を IL-25 で刺激したところ、CD11c 陽性細胞において IL-1 β の発現が増加していた。

以上の結果から、IL-25 が IL-1Ra 欠損マウスにおける大動脈炎の発症と病態に寄与していることが明らかになり、IL-25 が血管炎における新たな治療標的となる可能性が示された。ヒトでの大動脈炎の発症機序は未だ明らかではないことから、これらの研究結果は医学的にも重要であり、また、IL-25 の新たな役割を解明したことから、学術的にも価値があると考えられる。一方、審査の結果、それぞれの審査員から研究デザインや方法、研究結果の解析と考察、学位論文の記載や誤字・脱字などにおいて数多くの問題点が指摘され、申請者に修正を求めた。これらについて適切に修正することを条件として、審査委員全員で合格と判定した。なお、指摘された問題点については、後日適切な修正が行われたことを審査委員全員によって確認した。

最終試験の結果の要旨

本学論文は、大動脈炎を自然発症する IL-1Ra 欠損マウスと IL-1Ra/IL-25 二重欠損マウスを用いて、大動脈炎の発症における IL-25 の役割を研究した論文である。IL-25 が IL-1Ra 欠損マウスにおける大動脈炎の発症と病態に寄与していることが明らかになり、IL-25 が血管炎における新たな治療標的となる可能性が示された。

申請者は、研究背景や目的、方法、結果、考察について、決められた時間内で要領よく説明した。結果については、提出された学位論文作製以降に得られた新たなデータも提示され、その内容の骨子は「論文審査の結果」に記載したとおりである。なお、審査委員からなされた主な質問は以下の通りである。

- 1) IL-1Ra 欠損マウスでの炎症は、大動脈のどの部分に起こるのか。また、他の臓器・組織において炎症が起こっているのか？
- 2) このモデルにおける大動脈炎の発症機序において、IL-25 は IL-1 β の下流に位置するのか、あるいは上流に位置するのか？
- 3) 骨髓移植実験では、骨髓由来細胞よりも非骨髓由来細胞が発症に寄与していることが示唆されているが、組織に存在するマクロファージおよび DC の役割はどうか？放射線照射によって、組織マクロファージや DC も消失するのか？
- 4) IL-1Ra は IL-1 β だけでなく、IL-1 α の作用も抑制するが、この大動脈炎モデルにおける IL-1 α の役割はどうか？
- 5) ヒトの動脈炎でもある高安動脈炎や巨細胞性動脈炎における IL-1Ra や IL-1 β 、IL-25 の関与はどうか？

申請者は、ほとんどの質問に対して的確に返答したが、一部は検討されていない、あるいは分かっていないとのことで、申請者の仮説を交えて適切に答えることができた。また、提出された学位論文には、字句の表記の誤りや用語の不適切な使用なども多数指摘されたが、審査委員から指摘された諸点に従って、学位論文および論文要旨が適切に修正、加筆された。

以上の発表および質疑応答から、申請者が十分な資質と能力を有していることが明らかになり、審査委員全員一致で合格と判断された。