

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」

平成 20 年度採択研究代表者

平野 俊夫

大阪大学大学院生命機能研究科・教授

臓器特異的自己免疫疾患・炎症疾患の制御機構の理解とその人為的制御

## § 1. 研究実施の概要

これまで、免疫学では、“臓器特異的自己免疫疾患は、T 細胞あるいは B 細胞による臓器特異的な抗原の認識が必須である”と考えられていた。最近我々は、“T 細胞あるいは B 細胞の抗原認識に関わらずに、ウイルス等の環境因子と個人の遺伝的要因により IL-6 アンブの暴走による STAT3 の過剰な活性化が、臓器特異的に生じれば、抗原特異的 T 細胞の活性化に関わらず、自己免疫疾患を誘導することができる”との仮説を主に IL-6 アンブが増強している F759 マウスと正常マウスにて発症する多発性硬化症モデル EAE を用いて証明してきた。平成21年度は、この考えをより発展させるために、関節抗原とは無関係のペプチドを認識する1種類の T 細胞受容体を持つ F759 マウスを作製して研究を行った。これまでに、このような変異 F759 マウスでも関節炎が、通常の F759 マウスと同様に発症することが明らかとなり、関節抗原の T 細胞による認識が F759 マウスの関節炎の引き金にはなっていないことが判明した。さらに、IL-6 が CD8+Foxp3+T 細胞の産生を正に制御することで F759 関節炎を抑制していることも示した。また、亜鉛が IL-6 の信号を分子レベルにて抑制して、IL-6 信号依存性の Th17 細胞の発生が抑制されてコラーゲン誘導性関節炎が抑制されることを示すことができた。

試験管内での IL-6 アンブのターゲット分子の網羅的スクリーニングの系およびそのマウス生体内でのスクリーニングの両者は順調に進行している。現在までに、200近い分子が IL-6 アンブの活性化に関与することが判ってきた。これらはすべて創薬の対象になる可能性があり慎重に解析を進めている。F759 マウスの関節炎発症を指標にした生体内でのスクリーニング法も完成した。肝臓特異的なノックダウン法を用いた新たな分子の解析も順調に進んでいる。今後、T 細胞の活性を直接コントロールすることのできる新たな肝臓由来の分子が同定されることが期待できる。さらに、亜鉛トランスポーター・亜鉛関連分子欠損マウスでの自己免疫疾患、EAE 発症の増悪あるいは抑制を示すものも得られてきた。今後のメカニズム解析が待たれる。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「大阪大学」グループ

① 研究分担グループ長:平野 俊夫(大阪大学大学院、教授)

② 研究項目

1. IL-6 アンブを形成できる細胞、制御する細胞の同定
2. F759 関節炎発症における関節特異的抗原認識の不必要性の証明
3. IL-6 と IL-17 刺激による相乗的 IL-6 発現の分子機構の解明
4. IL-6 アンブのターゲット分子の同定
5. F759 関節炎発症における関節局所での F759 変異の重要性の証明
6. NFkB 信号の解析
7. IL-6 アンブによる糖尿病、肝炎さらに炎症反応の制御
8. Th17 細胞分化に関与する膜タンパクの同定
9. TLR シグナルと自己免疫疾患
10. IL-6 アンブとそのターゲットのイメージング
11. 亜鉛投与マウスでの自己免疫疾患の抑制とそのメカニズム解析
12. 亜鉛トランスポーター・亜鉛関連分子欠損マウスでの自己免疫疾患の発症の増悪/抑制とそのメカニズム解析

## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

### 1. IL-6 アンブを形成できる細胞、制御する細胞の同定

F759 関節炎を制御する CD8+Foxp3+T 細胞の発生と機能(論文4)

F759 関節炎は CD4+T 細胞によって増悪し、CD8+T 細胞によって抑制されることが CD4 および CD8 分子のノックアウトマウスと F759 マウスを掛け合わせることによって判明していた(J. Exp. Med. Sawa et al. 2004)。これまでの報告から CD8+Foxp3+T 細胞がいくつかの疾患発症時に存在して T 細胞の活性化を抑制する活性があることが示されていた。しかし、CD8+Foxp3+T 細胞が生体内でどのような刺激で発生して、生体内にてどのような役割を持っているのかは不明であった。私たちは、CD8+Foxp3+T 細胞と F759 関節炎を抑えている可能性を仮定して実験を行った。ナイーブ CD8+T 細胞を単離して低濃度から高濃度までの IL-6 の刺激存在下に TCR および TGFb の刺激にて培養した。その結果、低濃度の IL-6 存在下で CD8+Foxp3+T 細胞の発生が IL-6 非存在下に比較して有意に増加することが判明した。一方、CD4+Foxp3+T 細胞は、少しでも IL-6 が存在すればその発生が抑制された。IL-6 存在下で誘導された CD8+Foxp3+T 細胞が他の T 細胞の活性化を抑制することを(i)試験管内での CD4+T 細胞増殖と IL-2 産生の抑制および(ii)マウス生体内での CD4+T 細胞依存性の腸炎の抑制にて示した。IL-6 の存在下にて誘導した CD8+Foxp3+T 細胞は、IL-6 の存在しない環境にて誘導された CD8+Foxp3+T 細胞よりも、試験管内での CD4+T 細胞増殖と IL-2 産生の抑制活性が高いことも判った。

F759 マウスでは加齢とともに Th17 細胞が増加してそれに伴って線維芽細胞からの IL-6 の産生が IL-6 アンブの活性化にて増加する (Immunity Ogura et al. 2008)。実際、加齢した F759 マウスでは CD8+Foxp3+T 細胞数が増加していて、IL-6 を欠損させることでその数が正常マウスレベルまで減少した。それでは、F759 関節炎の発症を CD8+Foxp3+T 細胞は制御しているのであらうか？ F759 マウスに IL-6 とともに培養して誘導した CD8+Foxp3+T 細胞を移入することで関節炎発症が押さえられ、逆に、CD8+T 細胞から Foxp3+分子の機能を欠損させるとその関節炎発症が早期化して重症化した。以上の結果から CD8+Foxp3+T 細胞は生体内にて低濃度の IL-6 存在下に発生して自己免疫疾患を抑制していることが証明された。これらの細胞は IL-6 アンブによる IL-6 産生にて増加して活性化 T 細胞数を抑制させることがから、生体内にて IL-6 アンブのネガティブフィードバック機構の一つを担うことが示唆された。

## 2. F759 関節炎発症における関節特異的抗原認識の不必要性の証明

これまで、免疫学では、“臓器特異的自己免疫疾患の発症は、T 細胞あるいは B 細胞による臓器特異的な抗原の認識が必須である”と考えられていた。最近我々は、“T 細胞あるいは B 細胞の抗原認識に関わらずに、IL-6 アンブの暴走が、臓器特異的に生じれば、抗原特異的 T 細胞の活性化に関わらず、自己免疫疾患を誘導することができる”との仮説を主に F759 マウスに発症する関節炎と正常マウスにて発症する多発性硬化症モデル EAE を用いてその仮説を証明してきた。今年度は、この考えをより発展させるために、関節抗原とは無関係の抗原ペプチドを認識する1種類の T 細胞受容体を持つ F759 マウスを作製して研究を行い、関節抗原の T 細胞による認識が F759 マウスの関節炎の引き金にはなっていないことを示した。

## 3. IL-6 と IL-17 刺激による相乗的 IL-6 発現の分子機構の解明

IL-6 と IL-17 刺激の後に STAT3 と NFkB が会合することは証明した。現在、IL-6 および IL-17 刺激時に STAT3-NFkB 複合体に会合する新たな分子を、タグ付きの STAT3 と NFkB を導入した線維芽細胞株を作製して免疫沈降後の LC-MSMS にて同定している。さらに、IL-6 アンブが存在する細胞株に shRNA 搭載のレンチウイルスライブラリーを感染させて IL-17 と IL-6 刺激にて相乗的に発現する IL-6 が有意に減少あるいは亢進する分子を多数同定した。

## 4. IL-6 アンブのターゲット分子の同定

F759 マウスと正常コントロールマウスの滑膜組織から線維芽細胞株を樹立した。実際に、これらの細胞株に IL-6 アンブが存在するかを確かめたところ、作製した細胞株すべてに存在した。これらの細胞株を用いて DNA array 解析を行って、IL-6 アンブのターゲット分子の候補分子リストを作製した。一方、マウス生体を用いた IL-6 アンブのターゲット分子の候補分子の解析系も作製も完了した。

## 5. F759 関節炎発症における関節局所での F759 変異の重要性の証明

2番の項目で関節抗原の T 細胞による認識が F759 マウスの関節炎の引き金にはなっていないことが判明したので、次の疑問は何が F759 関節炎の引き金になりうるかであった。この問いに答えるためにはじめのステップとして、我々ははじめに F759 関節炎発症における関節局所での F759 変異の重要性、言い換えると関節局所での IL-6 アンブの活性化と病気の発症の関連を解析した。Th17 細胞を F759 マウスの関節に投与すると有意に関節炎が発症した。一方、コントロールの C57BL6 マウスでは病気の発症は認められなかった。IL-17A を欠損した Th17 細胞では関節炎の発症が有意に抑制され、正常の Th17 細胞の投与でも IL-6 を欠損した F759 マウスや線維芽細胞特異的に STAT3 を欠損した F759 マウスでは病気がほとんど発症しなかった。これらの実験結果から F759 関節炎発症における関節局所での F759 変異依存性の IL-17A 誘導性の IL-6 アンブの活性化の重要性が証明された。

#### 6. NFκB 信号の解析

本解析では T 細胞内の NFκB 信号に関与する分子に的を絞った実験系の立ち上げをめざした。T 細胞ハイブリドーマを用いて shRNA 搭載のレンチウイルスライブラリー感染後、TCR から信号を導入して産生される IL-2 を指標に TCR 信号特に TCR 依存性の NFκB 信号に関与する分子の同定を試みた。しかし、この系では shRNA による標的分子 mRNA の切れ具合と IL-2 産生の相関が一定せず、抗生物質による選択から生じたクローンの性質の差が IL-2 産生に反影される可能性が非常に高いことがわかった。

#### 7. IL-6 アンブによる糖尿病、肝炎さらに炎症反応の制御

これまでに、私たちは IL-6 アンブが関与する疾患として F759 関節炎と EAE を同定した (Immunity Ogura et al. 2008)。他の疾患と IL-6 アンブとの関係を証明する目的で、薬剤誘導性糖尿病 (STZ 誘導性糖尿病) の検討を行った。はじめに F759 マウス、IL-6KO マウスとコントロールマウスを用いて糖尿病を誘導し、血中のグルコース濃度を測定した。その結果、F759 マウスで最も症状が重く、IL-6KO マウスで症状が軽かった。しかし、症状自体は F759 マウスにおいても非常に弱く、それぞれの変異マウスの差も小さく、その後のメカニズム解析を継続することは難しいと判断した。

#### 8. Th17 細胞分化に関与する膜タンパクの同定

これまでに DNA array と LC-MSMS 解析にて Th17 細胞分化に関与する膜タンパクの候補遺伝子を絞り込んだ。特定の分子のノックダウンにて試験管内での Th17 分化が減少する可能性がある分子を複数個同定した。

#### 9. TLR シグナルと自己免疫疾患 (論文1)

これまで、IL-7 はリンパ球、T 細胞および B 細胞の恒常性に重要である事が示されてきたが、生体内におけるその発現レベルは一定に保たれている事、リンパ球の IL-7 への反応性は IL-7 受容

体遺伝子の発現レベルの変動によって制御されている事が示されてきた。今回我々は TLR 信号にて肝臓から発現される IL-7 が T 細胞の恒常性および反応性に大きな影響を与えている事を示した。マウスの系において生体の IL-7 を検出する良い方法が無かったので我々は市販の抗体を用いて高感度の ELISA 法とウエスタンブロット法を作製した。これらの方法によって LPS 刺激後肝臓と腎臓から IL-7 が有意に発現されることがわかった。一方、脾臓、リンパ節ではその発現の減弱が観察された。さらに、肝臓切除術を施すと LPS を投与しても血中にほとんど IL-7 が認められないことがわかった。LPS 信号は TLR4 のアダプター分子である TRIF と Myd88 にて信号が伝えられ、TRIF 分子の下流のエフェクター分子として 1 型 IFN(IFN-I)がしられている。これら分子のノックアウトマウスを用いた解析から、IL-7 分子は LPS 刺激後、TRIF-IFN-I 依存的に肝臓から発現していることが判明した。以上の結果から、LPS-TRIF-IFN-I 依存的に肝臓から IL-7 分子が発現される事が判った。肝臓由来の IL-7 発現の機能を調べるために肝臓特異的な IL-7 のノックダウン法を作製した。用いた方法はハイドロダイナミック法と shRNA を組み合わせた方法で、この方法にて我々は80%以上の効率で IL-7 分子の発現を抑制できた。この方法を用いて LPS 投与後の肝臓由来の IL-7 発現の機能を調べた。LPS 投与にて T 細胞、B 細胞、マクロファージ、NK 細胞等の数が増えたが、肝臓由来の IL-7 にてその数が増えるのは T 細胞のみであった。T 細胞の中では CD4+、CD8+、メモリー、ナイーブとも LPS 依存性の増加に肝臓由来の IL-7 が関わっていた。実際、メモリー CD8+ T 細胞の CTL 機能や CD4+ T 細胞の実験的脳脊髄炎のモデルの誘導に肝臓由来の IL-7 が関わっていることが判明した。以上の結果から、肝臓由来の IL-7 をはじめとする多くの分子が T 細胞の活性化状態を制御できる可能性が示唆され、それらの分子を同定する事で新たな免疫系の人為的制御が可能となる事が示された。

#### 10. IL-6 アンブとそのターゲットのイメージング

2つの疾患、F759 関節炎、EAE をモデルに IL-6 アンブのイメージングを行っている。F759 マウスに関しては IL-6 アンブの関節内でのイメージングを、EAE の系では IL-6 アンブがどの時期にどの組織、どの細胞で活性化して EAE の病態に関与しているか MOG 特異的な Th17 細胞の移入の系を用いて解析している。

#### 11. 亜鉛投与マウスでの自己免疫疾患の抑制とそのメカニズム解析

亜鉛は Th17 細胞の発生を STAT3 活性を直接抑制することで制御している。(論文5)  
これまで亜鉛の経口投与がある種の腸炎等の炎症性疾患を抑制することが示唆されてきた。しかし、その抑制メカニズムの解析は行われてこなかった。我々は STAT3 信号が亜鉛トランスポーター Zip6 の発現を上昇させて亜鉛の細胞内恒常性を変化させ、Snail1-Cadherin を介する細胞接着を緩和して細胞運動を誘導することを示したので、亜鉛による STAT3 信号のネガティブフィードバック機構の存在を想定していた。実際に亜鉛の飲料水投与にて抗原特異的 Th17 依存性の自己免疫疾患、コラーゲン誘導性関節炎および多発性硬化症モデルの EAE が有意に抑制された。EAE は病原性 Th17 細胞の移入にて発症させることができる。亜鉛投与マウス、コントロー

ルマウスとも全く同様に EAE が発症したことから病原性 Th17 の発生過程での亜鉛の関与が想定された。実際に、亜鉛投与マウス生体内に IL-6 を投与すると CD4+T 細胞中の STAT3 のリン酸化がコントロールマウスに比較して有意に抑制されていた。試験管内の Th17 分化系に亜鉛を共存させると Th17 細胞の分化が抑制されて Foxp3 の発現が上昇した。また、IL-6 依存性の STAT3 のリン酸化は亜鉛の共存にて有意に抑制されたが、JAK1 の活性化は正常に生じていた。これらの結果から亜鉛は IL-6 依存性の STAT3 の活性化を抑制することで Th17 細胞の分化を抑制していることが証明された。亜鉛が STAT3 に直接作用しているか否かをネイティブページと円偏光二色性分光法にて調べた。細胞株のライセートを亜鉛処理有る無しの場合にネイティブページにて STAT3 分子の移動度を調べてみると亜鉛処理した場合移動度が速くなることが判った。実際に亜鉛処理にて STAT3 の2次構造に変化が有るか否かを円偏光二色性分光法にて調べてみると  $\alpha$  ヘリックス構造が減少していることが判明した。以上の実験結果は亜鉛が STAT3 分子に直接結合して構造変化を引き起こして IL-6 刺激後もリン酸化されずに信号を伝えられないことが亜鉛による Th17 細胞の誘導抑制とその後の自己免疫疾患の発症抑制の原因であることを強く示唆している。

## 12. 亜鉛トランスポーター・亜鉛関連分子欠損マウスでの自己免疫疾患の発症の増悪/抑制とそのメカニズム解析

亜鉛トランスポーター・亜鉛関連分子の欠損マウスを用いて自己免疫疾患の発症を検討した。その結果、複数の亜鉛トランスポーター・亜鉛関連分子欠損マウスで EAE の発症が増悪あるいは抑制されることが判明している。現在、その現象の分子メカニズムの解析を行っている。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ・論文詳細情報

1. Nishida K\*, A. Hasegawa\*, S. Nakae, K. Oboki, H. Saito, S. Yamasaki, and T. Hirano. (\*equal contribution) Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. **J. Exp. Med.** 206:1351-1364, 2009(doi: 10.1084/jem.20082533)
2. Nakagawa T.\*, M. Tsuruoki\*, H. Ogura, Y. Okuyama, Y. Arima, T. Hirano, and M. Murakami. (\*equal contribution) IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. **Int. Immunol.** 22(2):129-39, 2010(doi:10.1093/intimm/dxp1199)
3. Chika Kitabayashi\*, Toshiyuki Fukada\*, Minoru Kanamoto, Wakana Ohashi, Shintaro Hojyo, Toru Atsumi, Naoko Ueda, Ichiro Azuma, Hiroshi Hirota, Masaaki

Murakami\*, and Toshio Hirano. (\*equal contribution) Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. **Int. Immunol.** in press([doi:10.1093/intimm/dxq017](https://doi.org/10.1093/intimm/dxq017))