

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、“MHC クラス2拘束性の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 アンプの暴走による STAT3 の過剰な活性化が、臓器特異的に生じれば、抗原特異的 CD4+T 細胞の活性化に関わらず、MHC クラス2拘束性の臓器特異的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 アンプが増強している 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。この考えをより発展させるために、本クレスト研究にて始めた研究が、今年度論文発表された。関節抗原とは無関係のペプチド抗原を認識する1種類の T 細胞受容体を CD4+T 細胞上に持つ 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 CD4+T 細胞による認識が F759 マウスの MHC クラス2拘束性の関節炎の引き金にはなっていないことが判明した。その後、詳細な検討を行って、MHC クラス2拘束性の臓器特異的自己免疫疾患には4つのステップが進めば CD4+T 細胞による臓器特異的な抗原認識無しでも病気が発症することを実際のデータにて証明し、なぜ、非常に多くの MHC クラス2拘束性の臓器特異的自己免疫疾患で臓器特異的な認識抗原が単離されていないかの1つの理由を提唱した。さらに、IL-6 アンプの活性化に関してゲノムワイドのスクリーニングを進めて遺伝子欠損によって IL-6 アンプの活性化が抑制される遺伝子 400 個ほどと、逆に、遺伝子欠損によって IL-6 アンプの活性化が誘導される遺伝子 40 個ほどを同定することができた。そのうちいくつかは、可溶性や細胞膜面の分子であることが判った。また、いくつかは NFkB や STAT3 分子と直接会合する分子であることが判ってきた。重要なことはいくつかの分子がその欠損によってサイトカイン誘導性の関節炎を F759 マウスの生体内にて抑制あるいは促進したことである。今後、より詳細な検討を行って創薬の対象になる分子を慎重に解析している。亜鉛が STAT3 分子に直接会合して構造変化を誘導して IL-6 依存性の信号を阻害していることが、亜鉛による自己免疫疾患の抑制分子メカニズムの一端であることを明らかにできた。現在、亜鉛の STAT3 結合部位、様式に関して解析中である。

肝細胞由来の IL-7 が自己免疫疾患に重要であることを示してきた。引き続いて行っている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。TLR 刺激にて肝臓で発現

されて siRNA によるノックダウン法にて自己免疫疾患への関与が示唆されている分子の flox-ノックアウトマウスを共同研究として得ることができた。今後アルブミンプロモーター Cre マウスとかけあわせて自己免疫疾患発症の解析を続ける。

## § 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(大阪大学大学院生命機能研究科・免疫発生学 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

### 1. IL-6 アンブを形成できる細胞、制御する細胞の同定

生体内で IL-6 アンブを形成できる細胞の同定は、主として細胞株を用いた実験を行った。これまでに、効率的に IL-6 アンブを形成できる細胞として線維芽細胞と血管内皮細胞、関節滑膜細胞を同定した。現在、マウス生体内の同種の細胞でも同様かどうかを免疫組織、サイトカイン、サイトカイン標的分子のモニターマウスを作製して検証中である。“10. IL-6 アンブとそのターゲットのイメージング”の項目の実験と合わせて NFkB のルシフェーセンスレポーターマウスを導入予定である。検出系としてすでに PCR を用いてのモニターが完成した。今後はルシフェーセンスにてイメージングできる系を早急に立てる。

### 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 (文献1)

これまで、免疫学では、“MHC クラス 2 拘束性の臓器特異的自己免疫疾患の発症は、CD4+T 細胞あるいは、CD4+T 細胞のヘルプを受けた 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。しかし、数多くの自己免疫疾患が MHC クラス 2 に拘束されているにもかかわらず、組織特異的抗原が同定されていないものが非常に多い。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、臓器特異的自己免疫疾患を誘導することができる”との仮説を立てて、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 を用いて実験を続けてきた。これまでに、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 CD4+T 細胞上に持つ F759 マウスを作製して研究を行った。その結果、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。その後、MHC クラス 2 拘束性の臓器特異的自己免疫疾患の発症を 4 つのステップに分解して、臓器抗原の CD4+T 細胞による認識が無くても MHC クラス 2 拘束性の臓器特異的自己免疫疾患が発症することを実際のデータとして証明して、5 番の“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”と合わせて論文発表をした。今後本研究は、終息して、同様の研究は、10 番の研究にて F759 の病態以外のモデルを用いて行われる。

### 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 および IL-17 刺激時に STAT3-NFκB 複合体に会合する新たな分子を、タグ付きの STAT3 と NFκB を導入した線維芽細胞株を作製して免疫沈降後の LC-MSMS にて同定した。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。今後個々のデータをより詳細に検討して順次論文発表する予定である。

### 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、作製した細胞株のほとんどすべてに IL-6 アンブが存在した。その後、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が完了して、試験管内とマウス生体内にて IL-6 アンブのエフェクター分子として機能するものを同定している。実際に 5 種類ほどの分子が、そのノックダウンでは IL-6 アンブの活性化に影響を及ぼさないが、F759 マウスのサイトカイン誘導性の関節炎を抑制できることが証明された。今後、それらの抑制メカニズムを解析する。

### 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 (文献 1)

2 番の項目で関節抗原の CD4+T 細胞による認識が MHC クラス 2 拘束性の 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。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のはじめのステップとして、我々は 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 細胞を若年の 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。その後、項目 2 番の“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”の研究結果と合わせて MHC クラス 2 拘束性の臓器特異的自己免疫疾患の発症における CD4+T 細胞の臓器特異的抗原認識の有無にかかわらずこれらの病気が発症する可能性を論文発表した。今後本研究は、終息して、同様の研究は、10 番の研究にて F759 の病態以外のモデルを用いて行われる。

#### 6. NFκB 信号の解析

T 細胞内での解析を停止して、実験が非常に進んだ1型コラーゲン陽性細胞内での NFκB 信号に関与する分子に的を絞った実験を行っている。現在、実験“4. IL-6 アンブのターゲット分子の同定”から NFκB あるいは STAT3 に会合する分子4つに関して実験を行ってその全てで少なくとも F759 マウスでのサイトカイン誘導性関節炎は有意に抑制できることを示した。現在、その抑制の分子メカニズムを詳細に検討している。今後、順次論文にまとめて、NFκB 研究に新しい風を導入できればと考えている。

#### 7. IL-6 アンブによる糖尿病、肝炎さらに炎症反応の制御

NOD マウスとインシュリンプロモーター-OVA トランスジェニックマウスの系にて IL-6 アンブの関与を示そうと実験系の立ち上げを行っている。現在までに、NOD F759 マウスは10回の NOD バックグラウンドへの変換が終了した。NOD F759 IL-6KO マウス、NOD F759 IL-17KO マウスの NOD バックグラウンドへの置換を急いでいる。現在8回なので近日中に実験開始予定である。IKKgfloxRip-Cre/Rip-OVA、STAT3floxRip-Cre/Rip-OVA マウスも作製した。IL-17 産生能を持つエフェクターT 細胞等を OT1 細胞あるいは OT2 細胞から作製して移入することで B 細胞での IL-6 アンブが糖尿病の発症に関与するかの検討を行う。

#### 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みそれら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。しかし、試験管内の Th17 分化系とコントロールレトロウイルスによる shRNA の導入を組み合わせる Th17 細胞にレトロウイルスを導入する系の完成に手間取った。他の研究項目に格段の進展が認められたものが出てきたので本研究項目は続行を保留

中である。

#### 9. TLR シグナルと自己免疫疾患

TLRシグナルにて誘導されるサイトカイン依存性に肝臓から分泌される 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。TLR 依存性に肝臓にて発現される分子で自己免疫疾患に関与するものを検索して、一つの有望な分子を見いだした。この分子は自己免疫疾患モデル、EAE の免疫時に肝臓にて早期から発現される可溶性の分子で肝臓にて強制発現すると血中に分泌された。この分子を siRNA とハイドロダイナミック法にて肝臓にてノックダウンすると EAE の病態が緩和された。この分子に関してイギリスから共同研究としてコンディショナル能を持つノックアウトマウスを導入した。近日中に本分子の自己免疫疾患への関与を解析する。

#### 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た。F759 マウスの系では 2 光子顕微鏡による系の確立を急いでいる。EAE の病態に関しては中枢神経系と免疫系の関係を IL-6 アンブの活性化を介して融合できないか検討している。

#### 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

論文 3 にて亜鉛の経口投与がどのようなメカニズムにて自己免疫疾患を抑制するのかを検討した。亜鉛は直接 STAT3 に結合してその高次構造に変化を誘導すること、亜鉛によって構造変化した STAT3 は IL-6 信号にて活性化されないこと、さらに、T 細胞においては病原 T 細胞である CD4+T 細胞サブタイプ Th17 細胞の誘導が抑制されること、その結果、自己免疫疾患が抑制されることを証明した。今回、亜鉛の直接結合による STAT3 の構造変化は CD 法にて解析した。その結果、亜鉛は1つの STAT3 に1つ以下の割合で結合していることが明らかとなった。今後その結合部位を明らかとすることを旨としてスイスの研究者と共同研究をはじめた。

#### 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。しかし、その表現型自体はそれほど強くないので 2 重変異体を作製して検討を行っている。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Murakami, M., Y. Okuyama, H. Ogura, S. Asano, Y. Arima, M. Tsuruoka, M. Harada, M. Kanamoto, Y. Sawa, Y. Iwakura, K. Takatsu, D. Kamimura, T. Hirano. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. **J. Exp. Med.** 208: 103-114, 2011.

**DOI:** 10.1084/jem.20100900

2. Hojyo, S., T. Fukada, S. Shimoda, W. Ohashi, B-H. Bin, H. Koseki, T. Hirano. The Zinc Transporter SLC39A14/ZIP14 Controls G-Protein Coupled Receptor-Mediated Signaling Required for Systemic Growth. **PLoS ONE** 6(3): e18059.

**DOI:** 10.1371/journal.pone.0018059

3. Nakaoka, Y., W. Shioyama, S. Kunimoto, Y. Arita, K. Higuchi, K. Yamamoto, Y. Fujio, K. Nishida, T. Kuroda, H. Hirota, K. Yamauchi-Takihara, T. Hirano, I. Komuro, N. Mochizuki. SHP2 mediates gp130-dependent cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of skeletal alpha-actin gene. **J Mol Cell Cardiol.** 49(2):157-64, 2010.

**DOI:** 10.1016/j.yjmcc.2010.03.001

4. Kitabayashi C., T. Fukada, M. Kanamoto<sup>1</sup>, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Atsumi, N. Ueda, I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami, and T. Hirano. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. **Int. Immunol.** 22(5): 375-386, 2010.

**DOI:** 10.1093/intimm/dxq017

### (4-2) 特許出願

① 平成 22 年度特許出願内訳(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)