

[350]

氏 名 (本籍)	近 <sup>こん</sup> 藤 <sup>どう</sup> 裕 <sup>ゆう</sup> 也 <sup>や</sup> (長野県)		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博 甲 第 6225 号		
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis</b> (T-bet 過剰発現による自己免疫性関節炎の制御機構)		
主査	筑波大学教授	医学博士	落 合 直 之
副査	筑波大学准教授	医学博士	坂 本 透
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	鈴 川 和 己
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	田 原 聡 子

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

関節リウマチ (RA) の病態形成で CD4<sup>+</sup> T 細胞の分化と機能を解明するために、RA 疾患モデルのコラーゲン誘導関節炎 (CIA) を用いて転写因子 T-bet の関与を解析する。

### (対象と方法)

IFN $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup> T 細胞 subset の Th-1 分化の master regulator T-bet を T 細胞のみに過剰発現させた T-bet 遺伝子改変マウス (T-bet Tg) と野生型 (WT) に抗原の collagen type II (CII) を投与し CIA を作製し、臨床像を比較した。またリンパ節を採取し、in vitro で CII と培養し、ELISA による培養上清中のサイトカイン量の測定、培養後の細胞を回収し FACS や定量 PCR によるサイトカイン、転写因子発現の評価を行った。抗原特異的サイトカイン産生、転写因子発現の評価は、各マウスから分離した CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞の criss-cross co-culture で検討した。

WT と T-bet Tg の脾臓 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を MACS を用いて分離し、in vitro で T 細胞分化を誘導して、サイトカイン産生パターン、転写因子発現について FACS で解析した。また T-bet Tg と IFN $\gamma$  欠損マウス (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>) を交配した T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> マウスを作成し、上記と同様の解析を行った。

### (結果)

WT に比し T-bet Tg は、発症率、重症度で有意に減少、関節も病理学的に炎症所見は T-bet Tg で有意に抑制された。抗原 CII 反応性サイトカイン産生は、in vitro では T-bet Tg で IL-17 産生が有意に抑制されたが、IFN $\gamma$  は有意差なかった。抗原反応性転写因子発現では、T-bet Tg で T-bet の発現は亢進、Th-17 分化に重要な転写因子の ROR $\gamma$ t の発現は抑制された。Criss-cross co-culture で、T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞は WT、T-bet Tg いずれの CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞を使用しても、WT 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた場合と比べ、IL-17 産生と ROR $\gamma$ t 発現は有意に抑制された。

脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた in vitro での Th-17 分化誘導実験では、T-bet Tg は WT と比較して IL-17<sup>+</sup> 細胞は減少し IFN $\gamma$ <sup>+</sup> 細胞は増加した。また T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞では Th-17 分化誘導条件でも T-bet<sup>+</sup> 細胞の

増加と ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> 細胞の減少があり、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> 細胞からの IL-17 産生は低下した。T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> マウス由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた Th-17 分化誘導実験では IFN $\gamma$  産生細胞はなかったが、IL-17 産生細胞は減少した。

#### (考察)

CD4<sup>+</sup> T 細胞はサイトカイン産生パターンにより subset に分類され、RA では IFN $\gamma$  を産生する Th-1、IL-17 を産生する Th-17 の重要性が示唆されている。この点は RA 動物モデルで詳細に解析され、IL-17 欠損マウスでは CIA が減弱し、IFN $\gamma$  欠損マウスでは CIA の増悪と抗原反応性 Th-17 の増加が報告されており、関節炎発症での IL-17 と Th-17 の重要性が注目されているが、疾患形成における CD4<sup>+</sup> T 細胞分化制御機構に関する知見はいまだ乏しい。

本研究では、T-bet Tg は WT と比べ CIA 関節炎は有意に抑制された。in vitro での抗原反応性のサイトカイン産生、転写因子発現の評価では、T-bet Tg で IL-17 産生の低下と ROR $\gamma$ t 発現の抑制があり、抗原特異的な Th-17 分化が抑制された。T-bet Tg では抗原反応性の T-bet は発現亢進したが、IFN $\gamma$  の産生亢進はなかった。T-bet による関節炎原性の Th-17 分化の抑制には、従来の報告とは異なり IFN $\gamma$  の関与が乏しいことが示唆された。

T-bet による Th-17 細胞分化制御については、脾臓 naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて in vitro の分化誘導実験で評価した。T-bet Tg 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞は、WT と比較して T-bet<sup>+</sup> 細胞が増加するも IL-17<sup>+</sup> 細胞および ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> 細胞は減少しており、T-bet の発現で、ROR $\gamma$ t により誘導される Th-17 分化が抑制された。IFN $\gamma$  は STAT-SOCS 経路を介して STAT3 のリン酸化を抑制し ROR $\gamma$ t 発現および Th-17 分化を抑制すると報告されており、T-bet による Th-17 分化抑制が IFN $\gamma$  を介しているかを確認したところ、T-bet Tg/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> マウス由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた検討で、IFN $\gamma$  の欠損にも関わらず Th-17 分化は誘導されず、T-bet が IFN $\gamma$  を介さずに Th-17 分化を抑制していることが示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

T 細胞における T-bet の過剰発現は、IFN $\gamma$  を介さずに抗原反応性の Th-17 分化を抑制し自己免疫性関節炎発症を抑制する新たな機構の可能性を示した価値ある論文である。

平成 23 年 12 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。