

氏名(本籍)	いわ なみ けい いち 岩 波 慶 一 (茨 城 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5088 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 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	Crucial Role of the Interleukin-6/Interleukin-17 Cytokine Axis in the Induction of Arthritis by Glucose-6-Phosphate Isomerase (Glucose-6-Phosphate Isomerase 誘導性関節炎におけるインターロイキン 6 / インターロイキン 17 の役割)		
主 査	筑波大学教授	博士 (医学)	山 縣 邦 弘
副 査	筑波大学教授	博士 (医学)	澁 谷 彰
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)	小 田 竜 也

論 文 の 内 容 の 要 旨

目的

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; 以下 RA) は、本邦で約 100 万人の患者が罹患する原因不明の自己免疫疾患である。これまで関節特異的抗原に対する自己免疫応答が RA の発症機序として考えられていたが、病変が必ずしも関節に留まらない全身疾患であることから、この仮説に関しては未だ異論のあるところである。関節炎を自然発症する K/BxN マウスの解析により、全身に存在する解糖系酵素 glucose-6-phosphate isomerase (GPI) に対する自己免疫応答が関節炎発症の機序であることが判明し (Matsumoto I et al. *Science* 1999)、全身性の自己免疫応答が関節炎の原因になり得ることが明らかになった。実際、RA の解析においても抗 GPI 抗体陽性患者が存在し、特に血管炎や Felty 症候群など関節外病変を合併する例に高頻度に存在することが明らかになった (van Gaalen FA et al. *Arthritis Rheum.* 2004)。また、我々の解析により抗 GPI 抗体陽性者の中には、GPI 反応性 CD4 陽性 T 細胞が存在することも明らかになった (Kori Y et al. *Ann. Rheum. Dis.* 2004)。

近年 recombinant human GPI を DBA/1 マウスに免疫することにより関節炎が発症することが報告された (GPI 誘導性関節炎) (Schubert D et al. *J Immunol.* 2004)。これまでの報告より、TNFRp75-IgG-Fc 融合蛋白 (Etanercept)、抗 CD4 抗体の治療効果を認めることから、このモデルは T 細胞及びサイトカインの重要性が示唆されヒト RA に近いモデルと考えられるが、T 細胞が病態に関与する詳細な機序については未だ明らかなでなかった。本研究では GPI 誘導性関節炎を用いて病態に関与する T 細胞 lineage を明らかにし、その制御機構を調べることを目的とした。

対象と方法

1) リコンビナントヒト GPI (rhGPI) 300 μ g と完全 Freund アジュヴァントとのエマルジョンを作成し、DBA/1 マウスに皮内注射 (免疫) して関節炎を誘導した。2) 免疫 7 日後、14 日後の脾臓を採取した。magnetic-activated cell sorting (MACS) を用いて CD4 陽性 T 細胞を分離し、MACS カラムの flow through をマイトマイシン C 処理した抗原提示細胞 (APC) とともに rhGPI を抗原として培養したときのサイトカイン

産生を ELISA で測定した。3) 免疫 7 日後, 14 日後に抗 IFN γ 抗体, 抗 IL-17 抗体を腹腔内投与し, 関節炎に対する影響を観察した。抗 GPI 抗体価に対する影響を ELISA で解析した。4) 抗 IL-6 受容体抗体 (MR16-1) を免疫 0 日後, 3 日後, 8 日後, 14 日後に腹腔内投与し, 関節炎に対する影響を観察した。抗 GPI 抗体価に対する影響を ELISA で解析した。5) MR16-1 を免疫 0 日後, 3 日後に腹腔内投与し, 7 日後に所属リンパ節を採取し, rhGPI を抗原として培養したときのサイトカイン産生を指標に CD4 陽性 T 細胞の分化への影響を flow cytometry で解析した。6) MR16-1 を免疫 0 日後, 3 日後, 8 日後に腹腔内投与し, 10 日後に所属リンパ節を採取し, rhGPI を抗原として培養したときの増殖反応を CFSE の蛍光強度を指標に flow cytometry で解析した。

結果

1) rhGPI 免疫により 167/177 匹 (94.4%) に関節炎を誘導できた。2) 免疫 7 日後の脾臓より分離した CD4 陽性 T 細胞では免疫 14 日後と比して IL-17 産生が有意に高値であった ($P<0.05$)。一方, 免疫 7 日後の IFN γ 産生は免疫 14 日後と比して有意に低値であった ($P<0.05$)。3) 免疫 7 日後に抗 IL-17 抗体を投与した群ではコントロール群と比して関節炎は有意に抑制された ($P<0.01$)。免疫 14 日後に抗 IL-17 抗体を投与した場合は無効であった。一方, 抗 IFN γ 抗体を投与した場合, 免疫 7 日後, 14 日後に投与したいずれの群においてもコントロール群と比して関節炎は悪化する傾向にあった。抗 GPI 抗体価は, 抗 IL-17 抗体投与による影響を認めなかった。4) MR16-1 を免疫 0 日後, 3 日後に投与した場合, 関節炎発症はほぼ完全に抑制された。免疫 8 日後に投与した場合, コントロール群と比して関節炎は有意に抑制された ($P<0.05$)。免疫 14 日後に投与した場合は無効であった。MR16-1 投与のタイミングによらず, 抗 GPI 抗体価はコントロール群に比して低い傾向にあり, 免疫 3 日後, 8 日後, 14 日後に投与した群では抗体価が有意に低値であった (それぞれ $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$)。5) MR16-1 を免疫 0 日後, 3 日後に投与した場合, 所属リンパ節中の Th17 細胞はコントロール群と比して有意に少なかった ($P<0.05$)。Th1 細胞, Th2 細胞, 制御性 T 細胞に対する影響は認められなかった。6) MR16-1 を免疫 0 日後, 3 日後, 8 日後に投与した場合, 所属リンパ節中の T 細胞の増殖能は invitro で有意に低下していた ($P<0.05$)。

考察

Th17 は Th1, Th2 とは異なる新しい T 細胞サブセット, 2005 年に Chen Dong らによって報告された。これまでコラーゲン誘導性関節炎, methylated bovine serum albumin を免疫して誘導する抗原誘導性関節炎, SKG マウスにおいて Th17 が重要な役割を果たすことが分かっている。今回, 我々は GPI 誘導性関節炎においても Th17 が重要な役割を果たすことを明らかにし, その制御機構として IL-6 が重要であることを示した。IL-6 を標的とした治療は関節リウマチにおいて有用性が示されているが, 今後は IL-17 の関節リウマチにおける役割の検討が望まれる。

結論

本研究において GPI 誘導性関節炎において IL-6/IL-17 が重要な役割を果たしていることが示された。

審査の結果の要旨

審査会においては, 主論文にとどまらず, 副論文や現在執筆準備中の実験結果なども示され, 大学院在学中に非常に精力的に実験に取り組んだ姿勢が理解できた。関節炎の程度と広がりにおける抗 GPI 抗体価ならびに抗体価を低下させることの意義について, また本関節炎モデルにおける IL17 の関節での炎症への関与の有無などが質疑に上げられた。さらにこの研究成果をヒト関節リウマチ診療に具体的にどのように役立つのか, 期待を込めて討論が行われた。

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。