

氏名(本籍)	よし だ ひろ と 吉 田 広 人 (神奈川県)			
学位の種類	博 士 (生物科学)			
学位記番号	博 甲 第 6118 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	生命環境科学研究科			
学位論文題目	<b>Studies on Effect of IL-6 Blockade on T Cell Activation and Differentiation</b> (IL-6 阻害の T 細胞の活性化と分化に及ぼす影響に関する研究)			
主査	筑波大学教授	博士(理学)	中 田 和 人	
副査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一	
副査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治	
副査	筑波大学教授	博士(医学)	千 葉 智 樹	

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

関節リウマチ (RA) は原因不明の全身性の炎症性疾患であり、関節破壊の慢性進行をみる。RA の病型形成における初期変化は、RA の原因となる何らかの抗原が抗原提示細胞により CD4 陽性 T 細胞に提示され、これを活性化することに始まると考えられている。このため、CD4 陽性 T 細胞は RA の病態発症において重要な役割を果たすと思われる。一方、RA の治療においては、活性化した T 細胞やマクロファージなどの炎症性細胞から放出される IL-6 や TNF- $\alpha$  をターゲットとした薬剤が使用され、優れた効果が得られている。これらの薬剤の開発においては、マウス等を用いた非臨床での研究が進められ、マウス RA 病態モデルであるマウスコラーゲン誘導関節炎 (CIA) における抗 IL-6 受容体抗体の効果が注目を集めている。CIA モデルでは、マウスにウシタイプ 2 コラーゲンを 2 度 (Day0 と Day21) 免疫すると、Day25 以降から関節炎の発症がみられる。このような CIA モデルに対し、抗 IL-6 受容体抗体を 1 次免疫直後の Day3 までに投与した場合は関節腫脹が抑制される。この現象は抗原特異的な T 細胞の活性化抑制によると考察されている。一方、CIA モデルに対し、Day7 以降に抗 IL-6 受容体抗体を投与しても効果がみられないことが知られていたが、その原因機構は不明であった。さらに最近、自己免疫疾患への関与が示唆されている新たなヘルパー T 細胞サブセットである Th17 が発見されたことをうけ、RA の発症における T 細胞に対する IL-6 阻害の影響に関して、Th17 を含めた検討の必要性が生じてきた。そこで本研究では、T 細胞の増殖や分化などの活性化に及ぼす IL-6 阻害の影響を解析することで、抗 IL-6 受容体抗体による CIA の抑制機序の全貌解明を目的とした。

まず、マウス脾臓細胞を用いて T 細胞の増殖に及ぼす IL-6 阻害の影響について検討した。抗 IL-6 受容体抗体は T 細胞と抗原提示細胞が共存する whole spleen の系と脾臓細胞から CD4 陽性 T 細胞を分離した条件においても抗原刺激による細胞増殖を弱くではあるが有意に抑制することが分かった。次に、T 細胞の細胞増殖抑制機序を解明するために活性化抑制と細胞死の誘導という 2 つの側面から検討した。活性化抑制解析においては、IL-2 と regulatory T 細胞 (Treg) について着目し、詳細解析した。IL-2 は抗原認識後の T 細胞から産生されクローン拡大を行う T 細胞の増殖因子であり、Treg はエフェクター T 細胞に対して抑制作用

をもつ T 細胞サブセットである。結果として、抗 IL-6 受容体抗体は T 細胞からの IL-2 産生を有意に抑制し、Treg の分化誘導が増強された。また、細胞死誘導に関しては、抗 IL-6 受容体抗体は死細胞の割合は増加させたものの、死細胞におけるアポトーシスの割合には影響しなかった。これらの結果から、1) 抗 IL-6 受容体抗体が CD4 陽性 T 細胞の細胞増殖を抑制する効果をもち、2) またその機序は IL-2 の産生抑制と Treg の分化誘導によると結論することができた。

前述の培養細胞からの所見をもとに、IL-6 阻害の効果とヘルパー T 細胞分化に対する影響に関して、マウス CIA モデルを駆使した検討を行った。CIA モデルにおいて一次免疫後の様々なタイミング (Day0, 3, 7, 14, 28) で脾臓から CD4 陽性 T 細胞を単離・培養し、細胞培養上清における各ヘルパー T 細胞サブセットの代表的なサイトカインである IFN- $\gamma$  (Th1) および IL-4 (Th2)、IL-17 (Th17) の量を測定することで、ヘルパー T 細胞の分化段階を詳細解析した。1 次免疫 (Day0) から 3 日後 (Day3) までのサイトカイン産生は対象である正常マウスと同等であったが、Day7 以降は調べたすべてのサイトカイン産生量が増加した。一方、抗 IL-6 受容体抗体を Day0 に投与すると、無処置 CIA マウスに比べて有意に関節腫脹が抑制され、関節腫脹ピーク時 (Day35) における脾臓細胞からのサイトカイン産生は IL-17 のみ有意に抑制された。しかし、2 次免疫当日 (Day21) における抗 IL-6 受容体抗体の投与では関節腫脹に対して抑制効果はなかった。また、Day35 の無処置 CIA マウスから脾臓を採取し、培養時に抗 IL-6 受容体抗体を添加しても IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 の産生に影響は観察されなかった。これらの結果により、1) CIA モデルにおいて 1 次免疫 3 日後から 7 日後までの間にヘルパー T 細胞が分化する、2) 抗 IL-6 受容体抗体は Th17 サブセットの分化のみを抑制することで関節腫脹の抑制効果を発揮している、3) ヘルパー T 細胞の分化後におけるサイトカイン産生に抗 IL-6 受容体抗体は影響しないことが明らかとなり、4) 抗 IL-6 受容体抗体が CIA モデルにおいて Day7 以降に関節腫脹抑制効果がないという先行研究の原因究明につながった。

本研究の遂行によって、抗 IL-6 受容体抗体は T 細胞の活性化における増殖と分化の一部を抑制する効果を有し、そのうち Th17 への分化を抑制することが CIA モデルにおける関節腫脹の発症を抑制する機序であることが明らかとなった。これは RA 発症に Th17 の分化が深く関与していることを示しており、Th17 をターゲットとした新規薬剤開発の可能性をも示唆している。また、ヘルパー T 細胞は個体の感染防御に重要な役割を果たしているが、抗 IL-6 受容体抗体は関節炎の病態に関与していないヘルパー T 細胞 (Th1, Th2) の分化には影響しないことを示すことができた点は、RA の抗 IL-6 受容体抗体療法の安全性評価においても重要な知見となる。

## 審査の結果の要旨

本論文では、関節リウマチの病態形成に対する細胞生物学的な研究結果の裏づけをもとに、抗 IL-6 受容体抗体の作用機序とその治療効果を証明し、関節リウマチの基礎研究ならびに広く免疫生物学の飛躍に貢献している。特に、抗 IL-6 受容体抗体が、感染防御に寄与する Th1 や Th2 には影響せず、関節リウマチの病態形成に寄与する Th17 にのみ作用する事実を明確にしたことは、独創性に秀でており、学問的価値が高いと判断できる。

平成 24 年 1 月 30 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の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物科学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。