



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	中枢神経と関節における慢性炎症モデルの増悪因子の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山本, 励志
Description	配架番号 : 2791
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15473号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90020
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Reiji_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学）

氏 名 山本 勵志

学 位 論 文 題 名

中枢神経と関節における慢性炎症モデルの増悪因子の解明

(Investigation for factors that accelerate inflammation in chronic inflammation model of central niveous system and joints)

【背景と目的】

様々な疾患が慢性的な炎症との関連性を指摘されている。関節リウマチは代表的な慢性炎症疾患であり、その炎症機構として IL-6 amplifier が重要とされている。F759 マウスは、IL-6 受容体を構成するサブユニット gp130 に点変異を起こしたマウスで、点変異のため SOCS3 抑制機構が破綻し過剰な IL-6 が発現され、IL-6 amplifier を自然発症させるモデルである。線維芽細胞や血管内皮細胞などの非免疫細胞に過剰な IL-6 が暴露されると、NK-kB と STAT3 の活性化と種々のケモカイン、成長因子が分泌される。その結果、Th17 細胞が分泌する IL-17 が NF-kB 経路を一層活性化させる。NFkB 経路活性化で生産されるケモカインは STAT3 活性化と Th17 細胞を誘導するループを繰り返し、結果的に F759 マウスは関節リウマチ様関節炎を発症する。

ヒトの GWAS の解析で、IL-6 amplifier は関節リウマチのみならず、アレルギー性疾患、神経変性疾患、癌など多岐にわたって関連があることがわかり、IL-6 amplifier は多くの疾患病態に関与していることが考えられる。動物モデルでは、IL-6 amplifier は F759 関節炎のほか実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症と関連がある。EAE モデルは、中枢神経の髄鞘ミエリンを皮下注射することで、免疫細胞が自己抗原に感作され中枢神経に集積、炎症を起こすモデルである。重力刺激でマウスのヒラメ筋が刺激され、第 5 腰髄の後神経節、さらに近傍の交感神経幹へ興奮が伝えられ、第 5 腰髄の背側血管内皮細胞へノルエピネフリン (NE) が分泌される。NE は血管内皮細胞の STAT3 経路と NFkB 経路を活性化させることで IL-6 amplifier を形成する。IL-6 amplifier による大量のケモカイン放出と免疫細胞遊走の結果、血液脳関門の機能が破綻し免疫細胞の侵入路 (ゲートウェイ) が完成する。

IL-6 amplifier 機構は多く研究されてきたが、個々の F759 関節炎と EAE において炎症機序がすべて解明されたわけではない。本研究では、上記 IL-6 amplifier を発端とする動物モデルの慢性炎症について、これまでの知見を踏まえさらなる解明を目的とした。

【方法と結果】

F759 における IL-6 amplifier の炎症に関わる因子について、シミュレーションを用いて関節炎発症の最低要因が何か検証を行った。シミュレーションは、過去に報告された結果をもとに濃度、係数、反応式を入力し、IL-6 amplifier の発生環境を模倣した。その結果、STAT3 と NFkB の転写因子は単体で各々転写を行うより、核内で局在化し共同して転写するほうが効率よく IL-6 amplifier の炎症を再現することができた。F759 マウスの IL-6 amplifier の自然発症をシミュレートすると、生後 20 日頃を境にサイトカイン、転写因子、炎症産物が増量していった。抗 IL-6 抗体、抗 IL-17 抗体を模擬的に投与すると、抗 IL-6 抗体は炎症を抑制したのに対し、抗 IL-17 抗体は早期にしか効かなかった。このことから、IL-6 amplifier 早期は IL-6 と IL-17 が重要なサイトカインであることが示唆された。IL-6 amplifier にとってどの因子が重要か、模擬的に個々の因子を変動させ IL-6 amplifier 活性の変化を検証した。その結果、特に重要な反応は

STAT3-NfB 複合体の形成速度や STAT3、NFkB のリン酸化速度、IL-6 と IL-17 の産生速度などが大きく影響した。

次に、IL-6 amplifier を契機に発症する EAE を用いて、中枢神経炎症を悪化させる要因の探求を試みた。本研究では、加齢が慢性炎症との関係が深い臨床的な事実から、加齢に焦点をあて検討を行った。加齢マウスと若年マウスで EAE を発症させたところ、加齢マウスで有意に臨床スコアの悪化が認められた。加齢液性因子が原因の可能性を想定し、加齢/若年マウスの Parabiosis を作成し EAE を発症させて液性因子の関与を検証した。その結果、両マウスのスコアに変化なく、液性因子の関与は否定的であることがわかった。次に加齢ミクログリアの影響を考え、ミクログリア抑制剤を投与したところ、若年マウスはスコアの改善がみられたものの、加齢マウスには改善がみられなかった。そこで、炎症の程度を確認するため脊髄の免疫染色を行った。免疫細胞は加齢、若年とも著名な浸潤がみられたが、時間の経過とともに若年は浸潤が軽減するものの加齢マウスは遷延することがわかった。特に MHC class II 細胞の遷延が著しいことから、当細胞を抑制することで症状が軽減するか検証を行った。CSF ファミリーの抗体を投与していったところ、抗 IL-34 抗体で加齢マウスの臨床スコアの改善がみられた。脊髄に浸潤した MHC class II+CD11b+ 細胞を採取し、IL-34 と混合培養してみると、有意に細胞の増殖が認められた。このことから IL-34 が加齢マウスの臨床スコアに寄与していることがわかった。

【考察】

IL-6 amplifier 機構で STAT3 と NFkB は核内へ移行し IL-6 を始めとするサイトカイン、ケモカインを産生するが、転写因子が個々で転写するより共同的に作用するほうがより効率的で合理的である。シミュレーションでは、共同的に転写する方が、より現実の F759 マウスの炎症に類似した結果となり、STAT3-NFkB 複合体の存在が強く示唆された。また、抗体を投与したシミュレーションでは、IL-17 は初期のみで重要なことや、STAT3-NFkB 複合体形成の速度など、特定の因子が炎症の強度に強く影響することがわかった。これらの結果は新薬開発の一助になる可能性がある。

EAE も IL-6 amplifier を引き金に発症する。本研究では加齢と炎症の関係の解明を試みた。過去の報告でいわれる加齢の液性因子やミクログリアは直接的な関与はないことが証明され、脊髄へ局所的に浸潤している MHC class II 細胞が IL-34 依存的に活性化し脊髄浸潤が遷延する事が示唆された。IL-34 はこれまで EAE や加齢関連での報告はなく、加齢における中枢神経炎症の重要な物質の可能性が考えられた。一方で IL-34 はどのように作用しているのかまだ不明な点が多く、本研究でも明らかにならなかった。IL-34 の下流シグナルで IL-6 amplifier との関連も考えられ、今後の解明が待たれる。

【結論】

IL-6 amplifier の分子機構として STAT3-NFkB が核内で局在化し複合体として機能、転写することが示された。IL-6 amplifier の維持は、全炎症期間を通して IL-6 が重要な一方、IL-17 は発症初期の作用がより重要であることが示された。加齢 EAE の炎症悪化の要因として、脊髄における IL-34 による MHC class II+, CD11b+ 細胞の活性維持が強く関与していることが示唆された。