



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 [全文の要約]
Author(s)	山本, 励志
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2791 他
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/2115/90039
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Reiji_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

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 nervous system and joints)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

山 本 励 志

学 位 論 文 (要 約)

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 nervous system and joints)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

山 本 励 志

近年の研究で慢性炎症が種々の疾患の発症、症状進行に関与していることが示唆されている。加齢と慢性炎症の関連性を指摘する研究も多数あり、「加齢」、「慢性炎症」は部位別に細分化された各科領域を超えて取り組むべき重要な医学研究のテーマである。慢性炎症の機構を解明することは、種々の慢性炎症性疾患の治療につながり医学の発展に寄与することが期待される。慢性炎症の一機構としてIL-6経路の増幅とNF- κ B 経路の持続的亢進を中心とした「IL-6 amplifier」が知られている。関節リウマチはこれまで IL-6 amplifier 機構に基づき発症メカニズムが解明されてきた。関節リウマチ様関節炎モデルである 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ある。この点変異のため、SOCS3 抑制機構が gp130 に結合してネガティブフィードバックをかけられず、その結果過剰な IL-6 が発現される。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、NF- κ B 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。分泌されたこれらの因子は Th17 細胞を誘導し、IL-17 は非免疫細胞の NF- κ B 経路を一層活性化させる。NF- κ B 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、増幅された IL-6、NF- κ B によって F759 マウスは関節リウマチ様関節炎を発症する。また、ヒトの GWAS 解析では、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と考えられている。事実、近年の報告で慢性中枢神経炎症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) は IL-6 amplifier が活性化することで発症することが証明された。マウスのヒラメ筋には平時より重力刺激がかかっており、この刺激が第5腰髄の後神経節、さらに近傍の交感神経幹へ伝えられ、交感神経から第5腰髄の背側血管内皮細胞へノルエピネフリン (NE) が分泌されている。NE は血管内皮細胞に対し STAT3 経路と NF- κ B 経路の活性作用を有するが、正常では IL-6 amplifier を発生するにいたらない。EAE 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を自己抗原 (中枢神経) に感作させるモデルであるが、感作された Th17 細胞が血管内皮へ集積することで血管内皮細胞は STAT3 経路、NF- κ B 経路が爆発的に増幅され、大量のケモカイン放出と更なる免疫細胞の遊走を誘導し、遂には血液脳関門の機能が破綻し免疫細胞の侵入路が完成する。IL-6 amplifier は、その本質である非免疫細胞における NF- κ B と STAT3 経路の同時活性化について多くが研究されてきたが、IL-6 amplifier を促進する因子についての研究報告は少ない。これらを同定することが種々の慢性炎症疾患の制御や創薬につながると考えられる。本研究は、F759 をコンピュータシミュレーションで再現し IL-6 amplifier が関節炎を発症させる必要最低要件を検証した。また、加齢が慢性炎症性疾患を増悪させる因子は何か検証を試みた。本研究では慢性中枢神経炎症モデルの EAE を用い、EAE に「加齢」の条件を加えることで炎症に起こる変化とその原因解明を行った。

コンピュータシミュレーションは、過去に報告された結果をもとに F759 及び B6 マウスとその細胞のシグナル経路、濃度、係数、反応式を入力し IL-6 amplifier の発生環境を模倣した。シミュレーションの結果、STAT3 と NF- κ B の転写因子は単体で各々転写を行うより、複合体として共同的に転写するほうが効率よく IL-6 を産生することがわかった。F759 マウスにおける IL-6 amplifier 活性化の推移を時間経過でシミュレーションすると、生後 20 日頃から IL-6 をはじめとしたサイトカイン、転写因子、炎症産物が増加していった。この F759 シミュレーションマウスに抗 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 IL-6 amplifier を抑制したのに対し、抗 IL-17 抗体は早期にのみ炎症抑制効果を示した。このことから、初期の IL-6 amplifier 発症、発展には IL-6 と IL-17 が重要である一方、IL-6 amplifier が完成した後期には IL-6 のみで炎症持続が可能であることが示唆された。IL-6 amplifier にとってどの因子がより重要か、模擬的に各々のパラメーターを 1/10~10 倍に変動させ 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/NF- κ B 複合体の形成、Th17 細胞と CCL20 の結合と関節内への遊走、IL-17 生成、IL-17 と IL-17 受容体の結合、IL-6 と IL-6 受容体の結合、STAT3 リン酸化であった。これらの反応を阻害することで効果的に IL-6 amplifier を抑制できる可能性が示唆され、創薬の新たなターゲットになると考えられた。

次に、加齢と若年の B6 マウスにそれぞれ EAE を発症させ加齢が中枢神経に及ぼす影響を評価した。

In vivo における実験の結果、加齢マウスで有意に臨床スコアの悪化が認められた。加齢による慢性炎症は液性因子やミクログリア関連であることが既報にあるため、これらの因子のEAEへの関与を検証した。まず血液や液性因子が物理的に交流する Parabiosis モデルを応用し液性因子の関与を検証した。作成した加齢/若年 Parabiosis マウスにEAEを発症させ臨床スコアの推移を観察したところ、両マウスのスコアに変化はなく、液性因子の関与は否定的であることがわかった。次に、それぞれ若年、加齢 EAE マウスにミクログリア活性阻害剤を投与すると、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。このことから、全身性の液性因子やミクログリアに依存的ではないことが示唆された。一方、第5腰髄を中心に脊髄の免疫染色を行うと、免疫細胞は加齢、若年マウスとも著明な浸潤がみられ、時間の経過とともに若年マウスの脊髄は免疫細胞が減少するものの加齢マウスは免疫細胞、特にMHC class II 陽性細胞が脊髄内に長く留まることがわかった。若年と加齢 EAE マウスにMHC class II 陽性細胞を阻害するCSFファミリーの抗体を投与したところ、抗GM-CSF、抗M-CSF抗体では有意差がみられなかったが、抗IL-34抗体で加齢マウスの臨床スコアの改善が有意にみられた。そこで脊髄に浸潤したMHC class II 陽性CD11b 陽性細胞のみを採取しIL-34と混合培養すると、コントロールに比べ細胞の活性化が認められた。このことからIL-34がMHC class II 陽性細胞を介して加齢マウスのEAE症状悪化に寄与していることがわかった。

本研究ではIL-6 amplifier 機構の発生最低要件についてシミュレーションを用いて検討してきた。転写因子であるSTAT3とNF- κ Bは個々で転写するより複合体を形成し転写を行うほうが炎症を効率的に発生させ、複合体が存在することで実際のF759マウスの炎症と近似する炎症を示した。実際、STAT3とNF- κ Bはターゲットが近傍であることや、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。また、これまでIL-17はIL-6 amplifierの炎症維持に重要なサイトカインと考えられていたが、本研究のシミュレーション結果では、炎症維持に必ずしも必要ではなく、起爆剤としての役割を担っていることが示唆された。IL-6 amplifierにとって重要な因子を網羅的に検証したシミュレーションでは、いくつかの重要因子が特定され、創薬の新たなターゲットになることが期待された。加齢による慢性中枢神経炎症増悪の原因検索では、全身性の加齢による液性因子や加齢ミクログリアではなく、外部より脊髄内に浸潤したMHC class II 陽性細胞によることがわかった。また、IL-34は加齢マウスにおいてMHC class II 陽性細胞の活性化と維持に重要なサイトカインであることが証明された。IL-34は腫瘍との関連などで報告があるもののIL-34の機能の全容はまだ明らかになっておらず、EAEとの関連性もこれまで報告されていない。今後は、IL-34が加齢のMHC class II 陽性細胞にどのように作用しているのか、IL-34の下流やIL-6 amplifierとの関連性を探求していく必要があると考える。