The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	自己免疫疾患発症におけるEpiregulin-EGFR信号系の役割
Author(s)	原田, 誠也
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34589
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

平成 25 年度　博士論文

自己免疫疾患発症における Epiregulin-EGFR 信号系の役割

大阪大学大学院　生命機能研究科

免疫細胞生物学研究室

原田　誠也

自己免疫疾患発症における Epiregulin-EGFR 信号系の役割

T 細胞由来の IL-17 が IL-6 と共に線維芽細胞に働くと相乗的な IL-6 やケモカイン産生の亢進（IL-6 増幅ループ）が起こり、F759 関節炎モデルや多発性硬化症モデル EAE 等の自己免疫疾患が発症する。しかし、この IL-6 増幅ループの分子メカニズムに関しては、IL-17 信号下流の NF-κB と IL-6 信号下流の STAT3 に依存すること以外明らかとなっていない。本研究では、上皮成長因子受容体（EGFR）信号伝達系が IL-6 増幅ループの活性化を亢進することを明らかにした。さらに、EGFR のリガンドの一つである Epiregulin の発現が IL-6 増幅ループによって誘導され、Epiregulin は自身の増幅ループを形成して IL-6 増幅ループをさらに増強し、自己免疫疾患モデルの発症に寄与することを発見した。

免疫発生学研究室では、IL-6 増幅ループを制御する分子を同定するために、65,500 種類の shRNA ライブラリー（約 16,000 個のマウス遺伝子に相当）を用いて血管内皮細胞の IL-6 産生を指標にゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、IL-6 増幅ループを制御する遺伝子の候補として、1,289 個の遺伝子が同定された。私は、スクリーニングの結果を IPA（Ingenuity pathway analysis）を用いて解析し、いくつかの増殖因子信号伝達系が IL-6 増幅ループの活性化に関与する可能性を導き出した。そして、I 型コラーゲン陽性細胞である線維芽細胞 MEF や血管内皮細胞 BC-1 で EGFR の発現をノックダウンすると、血清存在下で IL-6 と IL-17 刺激によって誘導される IL-6 産生が顕著に抑制されることを見出した。同様に、EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤処理によっても IL-6 産生が抑制された。一方で、BC-1 細胞を IL-6、IL-17 と共に EGFR のリガンドで刺激すると、IL-6 や Th17 細胞を動員するケモカイン CCL20 の産生が相乗的に亢進した。以上の結果から、EGFR 信号伝達系が IL-6 増幅ループの活性化を亢進することが分かった。

興味深いことに、BC-1 細胞を IL-6 と IL-17 で刺激すると、6 種類ある EGFR のリガンドのうち Epiregulin の発現のみが相乗的に亢進した。すなわち、Epiregulin は IL-6 増幅ループの標的分子であることが分かった。さらに、Epiregulin は MEF や BC-1 細胞において自身の遺伝子発現を亢進し、正のフィードバックループを形成することも明らかとなった。

また、ウエスタンブロッティングやレポーターアッセイ等のメカニズム解析の結果から、Epiregulin-EGFR 信号系は PI3Kα/Akt 経路を介して NF-κB の活

性化を亢進することが分かった。重要なことに、生体内で Epiregulin-EGFR 信号系を遮断すると、IL-6 増幅ループ依存性の自己免疫疾患モデルである F759 関節炎や EAE の発症が有意に抑制された。さらに、Epiregulin-EGFR 信号系による IL-6 増幅ループの増強は、ヒトの滑膜細胞においても認められた。これに加えて、関節リウマチ患者、多発性硬化症患者及び動脈硬化患者では、健常者に比べて血清中の Epiregulin 濃度が高値を示した。

本研究で得られた成果により、線維芽細胞や血管内皮細胞において Epiregulin が IL-6 や IL-17 と協調して炎症の増悪に寄与することが明らかとなった。Epiregulin は NF-κB の活性化を亢進することで IL-6 増幅ループを増強する役割を担うことから、Epiregulin の阻害によって自己免疫疾患における過剰な IL-6 産生が正常レベルに戻ることが期待される。IL-6 が B 細胞の増殖など種々の生命現象に重要であることや IL-6 受容体に対する中和抗体トシリズマブが日和見感染等の副作用を示すことを考えると、IL-6 の産生及び信号伝達は完全に抑制すべきではないのかもしれない。将来的には、Epiregulin がより副作用の少ない自己免疫疾患の新規創薬標的もしくは診断マーカーになる可能性があり、今後、Epiregulin 阻害剤と既存治療薬の比較等の臨床応用へ向けた知見が注目される。

目次

第１章　概論..... 1

第２章　序論..... 3

第３章　実験材料及び実験方法..... 11
　第１節　実験材料..... 11
　第２節　実験方法..... 14

第４章　実験結果..... 24
　第１節　EGFR 信号伝達系による IL-6 増幅ループ活性化の亢進..... 24
　第２節　IL-6 増幅ループ活性化における Epiregulin の役割..... 26
　第３節　Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化亢進の
　　分子メカニズム..... 29
　第４節　自己免疫疾患モデルの発症における Epiregulin-EGFR 信号系の
　　役割..... 32
　第５節　ヒトの疾患における Epiregulin-EGFR 信号系の関与..... 34

第５章　考察..... 35

第６章　結論..... 41

第７章　図表及び図表の解説..... 44

謝辞..... 77

参考文献..... 79

第 1 章　概論

免疫系は、細菌やウイルスなどの病原体が体内に侵入した際に、非自己である異物を認識して排除するための生体防御機構である。自律神経系や内分泌系による体温調節、エネルギー代謝等と並び、生体の恒常性維持において重要な役割を担っている。しかしながら、本来自分の身体を守るべき免疫系が自己の正常な細胞や組織を攻撃してしまう場合があり、損傷を受ける臓器によって様々な症状を来すことがある。このような疾患の例としては、関節リウマチや多発性硬化症等があり、総じて自己免疫疾患と称される。自己免疫疾患は原因不明の難病とされてきたが、これまでの研究により免疫系によって誘導される「炎症」が組織破壊や痛みを引き起こすことが分かってきた。実際に、炎症を引き起こす炎症性サイトカインの一つである IL-6 の受容体に対する中和抗体トシリズマブが、関節リウマチの症状を抑制することが報告されている。

免疫発生学研究室では、IL-6 や免疫細胞を引き寄せるケモカインの産生を増幅する炎症誘導機構として「IL-6 増幅ループ」を発見した。IL-6 増幅ループは、免疫系の T 細胞から産生された IL-17 が非免疫系の線維芽細胞や血管内皮細胞の IL-6 産生を誘導し、その IL-6 が IL-17 と共に非免疫系細胞に働いて相乗的に IL-6 やケモカインの産生を亢進する現象である。この IL-6 増幅ループは、関節リウマチモデルである F759 関節炎や多発性硬化症モデル EAE の発症に重要であったが、その分子メカニズムは炎症のキープレーヤーである転写因子 NF-κB と STAT3 に依存すること以外明らかとなっていなかった。当研究室では、IL-6 増幅ループの詳細な分子メカニズムを解明するために、65,500 種類（マウスの 16,000 遺伝子に相当）の shRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、IL-6 増幅ループを制御する候補遺伝子として 1,289 個の遺伝子が同定された。

私は、スクリーニングの結果をもとに IPA 解析を行い、いくつかの増殖因子の信号が IL-6 増幅ループの活性に関与している可能性を見出した。そして、上皮成長因子受容体（EGFR）の信号が IL-6 増幅ループの活性化に重要であることを明らかにした。さらに、非免疫系の細胞において、6 種類ある EGFR のリガンドのうち Epiregulin の発現のみが IL-6 と IL-17 の刺激によって相乗的に誘導され、Epiregulin が自身の遺伝子発現の正のフィードバックループを形成

することを発見した。これに加えて、Epiregulin-EGFR 信号系がマウスの F759 関節炎モデル及び EAE の発症に重要であることを証明した。すなわち、私は、「IL-6 増幅ループの活性化によって、Epiregulin の発現が誘導され、Epiregulin は自身の増幅ループを形成してさらに IL-6 増幅ループの活性化を亢進し、自己免疫疾患の発症に寄与する」という新規概念を示した。また、Epiregulin が PI3Kα/Akt 経路を介して NF-κB の活性化を亢進することを明らかにしたことから、IL-6 増幅ループの分子メカニズム解明において、PI3Kα/Akt 経路の関与を示した点においても本研究は意義深いものである。重要なことに、関節リウマチ、多発性硬化症及び動脈硬化患者では血清中 Epiregulin 濃度が高値を示すことも分かった。この結果から、マウスの自己免疫疾患モデルを用いて証明した Epiregulin-EGFR 信号系の役割がヒトの自己免疫疾患でも見られる可能性が示唆される。また、Epiregulin が自己免疫疾患だけでなく動脈硬化等の様々な慢性炎症性疾患の病態に関与する可能性が考えられる。

Epiregulin は、IL-6 増幅ループの活性化を増強することで炎症を増悪させる役割があることから、Epiregulin の阻害によって自己免疫疾患における過剰な IL-6 産生が正常レベルに戻ることが期待される。IL-6 が B 細胞の増殖など種々の生命現象に重要であることやトシリズマブが日和見感染等の副作用を示すことを考えると、IL-6 の産生及び信号伝達は完全に抑制すべきではないのかもしれない。将来的には、Epiregulin がより副作用の少ない自己免疫疾患の新規創薬標的もしくは診断マーカーになる可能性があり、今後、臨床応用へ向けた知見が注目される。本研究は、自己免疫疾患の発症原因及び IL-6 増幅ループの分子メカニズムに関して新規概念を提唱し、自己免疫疾患の新規創薬標的を提案した点において非常に意義深いものである。

第２章　序論

免疫系は、自然免疫系と適応免疫系の大きく二つに分類される。病原体が皮膚や粘膜等の物理的な障壁を突破すると、即座に自然免疫系が発動し、Toll 様受容体等によって病原体のパターンを認識して抗原非特異的な応答を行う。マクロファージと好中球は多数の一般的微生物に対する感染防御の第一線で働いており、貪食により病原体を取り込んで消化する。しかし、食細胞のみで病原体が常に除去されるわけではなく、一部の病原体は自然免疫系によって認識されない。適応免疫系のリンパ球は、抗原特異性の高い免疫反応により多様な感染防御のために進化したものであると同時に、持続的な免疫記憶により再感染に対してより強力な防御を可能にする。また、適応免疫系が自然免疫系の樹状細胞等によって誘導される一方で、適応免疫系のリンパ球の活性化により局所への好中球の遊走が起こることが知られている。このように、免疫系は複雑多様な細胞間コミュニケーションによって制御されている[1]。

適応免疫の中心となるリンパ球にはT細胞とB細胞があり、それぞれ胸腺と骨髄で分化する。これらの細胞は、体細胞遺伝子組み換えにより、多様な抗原に対応した異なるT細胞受容体（TCR）とB細胞受容体（BCR）を発現している。この多様な抗原を認識できるリンパ球のうち、自己の体内に存在する自己抗原と強い親和性を持つものはアポトーシスにより除去される（負の選択）[2]。しかし、何らかの異常によりこの機能が破綻すると、自己抗原に対するリンパ球が活性化し、組織が破壊されて種々の病的な状況が生じる。このような疾患は、総じて「自己免疫疾患」と呼ばれている。ヒトの自己免疫疾患には、関節リウマチ（RA）や全身性エリトマトーデス（SLE）等の全身性の機能不全を生じるものと、1型糖尿病（DM）、バセドウ病及び多発性硬化症（MS）等の臓器特異的疾患がある[3]。

適応免疫において重要な役割を担う T 細胞は、機能の異なる二つの細胞集団に大別される。この二つのクラスは、CD4 及び CD8 と称される糖タンパク質の細胞表面における発現によって区別され、CD4 陽性 T 細胞は他の B 細胞や CD8 陽性 T 細胞を活性化する役割を持つのに対し、CD8 陽性 T 細胞はウイルス感染細胞等を破壊するキラーT 細胞として機能することが知られている。

胸腺で分化したナイーブ T 細胞は、血中を循環して末梢リンパ組織へと移行する。病原体が感染すると、樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞が提示する抗原ペプチド・主要組織適合遺伝子複合体（MHC）及び補助刺激分子によって TCR シグナルが活性化され、ナイーブ T 細胞はエフェクターT 細胞へと分化する[4]。

活性化した CD4 陽性 T 細胞はヘルパーT 細胞と呼ばれ、抗原提示細胞の MHC クラス II 分子と抗原ペプチドの複合体を認識し、免疫応答の司令塔としての役割を果たす。ヘルパーT 細胞にはいくつかのサブセットがあり、従来、細胞性免疫を担う 1 型ヘルパーT（Th1）細胞と、体液性免疫を担う 2 型ヘルパーT（Th2）細胞がよく知られていた[5]。Th1 細胞は、IFN-γ（interferon-γ）や IL-2（interleukin-2）を産生し、マクロファージや細胞傷害性 CD8 陽性 T 細細を活性化することで細胞内寄生体の排除に関与する。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞からの Th1 細胞分化は、TCR 刺激と IL-12-STAT4（signal transducer and activator of transcription 4）信号によって IFN-γ が産生されることで始まる。IFN-γ が STAT1 を活性化することにより、転写因子 T-bet の発現を誘導して Th1 細胞に特異的な遺伝子発現を亢進する。一方、Th2 細胞分化は、TCR 刺激と IL-4-STAT6 信号によって誘導される転写因子 GATA-3（GATA binding protein 3）の発現により、IL-4、IL-5、IL-10 及び IL-13 等の Th2 細胞特異的な遺伝子発現が亢進することで起こる。これらのサイトカインは、B 細胞の増殖、分化及び抗体産生を誘導し、体液性免疫や細胞外寄生体に対する感染防御に関与する。また、GATA-3 は STAT4 の発現を抑制することで Th1 細胞特異的な遺伝子の発現を抑制し、反対に T-bet が Th2 細胞分化を抑制することで、互いに制御し合いバランスをとっている。この他にも、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞は TCR 刺激と TGF-β の刺激による FOXP3 の発現誘導によって制御性 T 細胞（Treg）へと分化し、IL-6+TGF-β の刺激により RORα（Retinoic acid receptor-related orphan receptor α）及び RORγt を特徴的に発現する Th17 細胞へと分化する。これら二つの活性化 CD4 陽性 T 細胞については、自己免疫疾患の病態に関与するという報告が近年数多くなされている。Treg 細胞は、IL-10 や TGF-β 等の抗炎症性サイトカインを産生することで自己免疫疾患の病態に抑制的に働くのに対して、Th17 細胞は自己免疫疾患の発症・増悪に関わると考えられている[6]。

Th17 細胞は、2000 年に Infante Duarte 博士らによって、Th1 や Th2 細胞とは機能が異なる新規 CD4 陽性 T 細胞サブセットとして報告された[7]。Th17

細胞のマスター転写因子であるRORα及びRORγtは、STAT3によって発現誘導され、IL-17やIL-21、IL-22等のサイトカイン産生を誘導する[8]。また、典型的なTh1型自己免疫疾患モデルと考えられていた実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）やコラーゲン誘導性関節炎（CIA）の発症、増悪化にはTh1細胞とは異なるIL-17産生性T細胞が必要であることが示された[9-11]。その後、複数のグループの報告によりIL-17産生性CD4陽性T細胞という概念が定着し、Th17細胞と称されるようになった[12, 13]。また、Th17細胞は細胞膜上にケモカイン受容体であるCCR6（chemokine (C-C motif) receptor 6) を特異的に発現し、リガンドであるケモカインCCL20（chemokine (C-C motif) ligand 20) の濃度勾配に従って、血管から脊髄や関節等の各炎症部位に動員されることが明らかとなっている[14, 15]。

IL-17（IL-17A）は1993年にマウスの活性化T細胞からクローニングされ、CTLA-8（cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 8）と称されていた[16]。その後1995年に、ヒト末梢血中のCD4陽性メモリーT細胞におけるIL-17の発現、IL-17によるNF-κB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells）活性化能及びIL-6産生誘導能が示され、新規サイトカインとして同定された[17, 18]。IL-17は分子量20-30 kDaのペプチドからなるホモダイマーの糖タンパク質であり、現在IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E（IL-25）及びIL-17Fの6個の相同性を持つファミリー分子が同定されている。そのうち、IL-17AとIL-17Fは相同性が高く、活性化T細胞に発現することが知られている[19-21]。特にIL-17A（以下、IL-17と称す）は、IL-17受容体ファミリーのうちIL-17RAとIL-17RCの複合体に結合し、上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ及び血管内皮細胞等において炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子などの発現を誘導して炎症反応を誘発する[21]。IL-17の信号伝達に関しては、IL-17刺激によって、アダプター分子であるAct-1（NF-κB activator 1）がIL-17受容体に会合し、TRAF6（TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase) を介して下流のNF-κB経路やMAPK（mitogen-activated protein kinase）経路、C/EBP（CCAAT/enhancer binding

protein) 経路等を活性化することが報告されている[22]。現在、IL-17 及び Th17 細胞が自己免疫疾患の治療標的になり得るとして、多くの研究成果が報告されている。

関節リウマチは、全身の関節に左右対称性の炎症を生じる慢性的な炎症性自己免疫疾患である[23]。滑膜、軟骨組織、骨組織が不可逆的に破壊される膠原病の一種で、リウマトイド因子（変形IgGのFc部分に対する自己抗体）の発現を特徴とし、30~50歳代の女性に多い。原因としては、遺伝的素因や環境要因が示唆されているが、はっきりとした病因は明らかとなっていない。これまでの研究から、III型アレルギーの自己免疫説が有力とされており、自己抗原は特定されていないが、MHCクラスII分子のHLA-DR4の陽性率と関節リウマチ発症に相関があること等から、ウイルスや細菌が関節炎発生性抗原となる可能性が指摘されている。この他にも、II型コラーゲンやCCP（cyclic citrullinated peptide）、GP39（cartilage glycoprotein 39）等が自己抗原の候補であると示唆する報告がなされており、喫煙、歯周病、薬剤及び性ホルモン等が環境要因になると考えられている[24]。また、関節リウマチにおける免疫異常、炎症及び関節破壊には TNF-α（tumor necrosis factor α ）、IL-1及びIL-6といった炎症性サイトカインが深く関わっていることが明らかとなっている[25, 26]。

近年、自己免疫疾患の治療は飛躍的に進歩している。2008 年には、中外製薬株式会社が大阪大学と共同開発したトシリズマブが、抗リウマチ薬（DMARDs；メトトレキサート等）やインフリキシマブ（抗ヒト TNF-α モノクローナル抗体）等の既存治療で効果不十分な関節リウマチや若年性特発性関節炎への適応を承認され、多くの患者でその効能が認められている [27]。トシリズマブは、炎症性サイトカイン IL-6 の受容体に対するヒト化モノクローナル抗体である [28]。IL-6 は分子量 21-28 kDa の糖タンパク質であり、1986 年に大阪大学の平野俊夫博士らによってクローニングされた [29]。T 細胞やマクロファージ、線維芽細胞等から産生されて、神経細胞、血球系細胞といった多様な細胞に作用し、細胞増殖、分化、生存、運動といった種々の生命機能の制御に重要な役割を果たすことが知られている [30]。その一方で、自己免疫疾患との関わりについても多くの報告

があり、関節リウマチ患者では血中及び滑液中の IL-6 濃度が高いことも分かっている [31]。また、2013 年にはノバルティス ファーマ株式会社により IL-17 に対する中和抗体セクキヌマブが乾癬の治療薬として承認申請され、現在関節リウマチ及び多発性硬化症を対象とした臨床開発が進行中である [32]。

このように、自己免疫疾患の発症に関与する因子は、Th17細胞のような細胞群からIL-6 やIL-17といった炎症性サイトカインに至るまで多岐にわたる。トシリズマブは関節リウマチの治療に効果をあげているものの、IL-6が関節炎発症に寄与するメカニズムについての理解は十分ではなく、間質性肺炎や日和見感染等の高齢者にとって重篤な副作用も報告されている[33]。これらの知見から、現在IL-6が自己免疫疾患発症に寄与する詳細な分子メカニズムの解明とより副作用の少ない新規創薬標的の同定が求められている。

IL-6 は、細胞膜表面の IL-6 受容体及び IL-6 ファミリーに共通の信号伝達分子 gp130（glycoprotein 130）と複合体を形成し、その下流で大きく二つの信号伝達経路を活性化する。一つは gp130 のチロシン 767、824、905、915 の YXXQ モチーフを介した STAT3 の活性化経路であり、もう一つは gp130 の 759 番目のチロシン残基（Y759）を介した SHP-2（src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-2）、Gab1/2（GRB-associated binder 1/2）及び ERK1/2（extracellular signal-regulated kinase 1/2）の活性化経路である [34]。この二つ目の経路の下流の分子である SOCS3（suppressor of cytokine signaling 3）は、JAK2（Janus kinase 2）の活性化を抑制することで STAT3 活性化経路を負に制御している [30]。

免疫発生学研究室では、ヒト gp130 の 759 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異型 gp130 分子（F759）を全身で発現する F759 ノックインマウスを作製した [35]。その結果、F759 マウスは生後 1 年から 1 年半以内に、ほぼ 100％の個体において自己免疫性の関節炎を自然発症することが明らかとなった [36]。免疫系の異常としては、ガンマグロブリン高値、リウマトイド因子等の自己抗体形成、脾腫大、リンパ節肥大、記憶・活性化 T 細胞の増加が見られた。関節炎は慢性的かつ進行性であり、好中球や破骨細胞の浸潤、滑膜線維芽細胞の過形成、パンヌス形成、関節破壊、強直性変異を伴う。この関節炎はヒトの

慢性関節リウマチの病態に酷似しており、関節リウマチの発症機構を研究する上で有用な動物モデルである。興味深いことに、F759 マウスでは SOCS3 による STAT3 活性化経路のネガティブフィードバックが阻害されており、STAT3 の活性化が増強されていた（Fig. S1）。その後の解析から、F759 関節炎の発症には MHC クラス II 分子を認識する CD4 陽性 T 細胞が必要であることが示されたが、骨髄細胞の移植実験により造血系ではなく非造血系細胞における F759 変異が重要であることが明らかとなった。さらに、線維芽細胞における F759 変異依存性の STAT3 の過剰な活性化により大量の IL-7 が産生され、末梢 CD4 陽性 T 細胞の恒常的な増殖（HP : homeostatic proliferation）が起こることが F759 関節炎の発症に重要であることも分かった（Fig. S2）[37]。2008 年には、HP によって増殖及び活性化した Th17 細胞により産生された IL-17 が、線維芽細胞の IL-6 産生を誘導し、その IL-6 が IL-17 と共に線維芽細胞に作用して相乗的に IL-6 産生を亢進する「IL-6 増幅ループ」を形成することが示された。この IL-6 増幅ループは、F759 関節炎及び多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発症に重要であることも明らかとなった（Fig. S3）[38]。2011 年には、一つの外因性抗原のみを特異的に認識する T 細胞を持つマウスと F759 マウスを掛け合わせて F759/Rag2 KO/OTII Tg 及び F759/Rag2 KO/P25 Tg マウスを作製し、これらのマウスでも関節炎が自然発症することが証明された。これに加えて、F759 関節炎の発症は、関節局所に微小出血誘導性の IL-6 増幅ループの活性化が生じることが原因である可能性も示唆された [39]。これまで、MHC クラス II 拘束性の組織特異的自己免疫疾患の発症には、CD4 陽性 T 細胞による組織特異的な自己抗原の認識が必須であると考えられてきた。しかし、これらの結果は病巣の組織抗原に特異的でない CD4 陽性 T 細胞の活性化でも、IL-6 増幅ループの活性化がその組織に生じれば自己免疫疾患が発症する可能性を示し、自己免疫疾患の発症原因における新規概念を生み出した（Fig. S4）[40]。さらに 2012 年には、重力によるヒラメ筋の活性化が感覚神経と交感神経を介して、第 5 腰椎（L5）の背側の血管における IL-6 増幅ループの活性化を誘導することが示された [41-44]。私達は、血管内皮細胞における IL-6 増幅ループの活性化によって Th17 細胞を引き寄せるケモカイン CCL20 の産生が増加し、血液中の Th17 細胞が L5 背側の血管から脳脊髄内に侵入するという「ゲート理論」を提唱した（Fig. S5）[45-47]。この IL-6 増幅ループによる免疫細胞のゲート形成は EAE の発症に重要であり、自己免疫疾患の発症における様々な IL-6

増幅ループの役割が明らかとなってきている[48, 49]。

当研究室では、IL-6 増幅ループの詳細な分子メカニズムを解明するために、65,500 種類（マウスの 16,000 遺伝子に相当）の shRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。IL-6 増幅ループが生じることを確認したマウス血管内皮細胞由来の BC-1 細胞を用いて各遺伝子のノックダウン細胞株を作製し、IL-6 と IL-17 刺激による IL-6 産生が抑制されるか検討した結果、IL-6 増幅ループを制御する候補遺伝子として 1,289 個の遺伝子が同定された（Fig. S6）。本研究では、1,289 個の候補遺伝子のうち、上皮成長因子受容体（EGFR 又は ErbB1）に着目して詳細な解析を行った[50]。

細胞の増殖は、増殖因子が細胞膜上の受容体に結合することで起こる。増殖因子には、上皮成長因子（EGF : epidermal growth factor）、インスリン様増殖因子（IGFs : insulin-like growth factors）、線維芽細胞増殖因子（FGFs : fibroblast growth factors）、血管内皮細胞増殖因子（VEGFs : vascular endothelial growth factors）、血小板由来成長因子（PDGFs : platelet-derived growth factors）といった様々な種類があり、これらの因子がそれぞれの受容体に結合すると、細胞内で信号伝達が起こり細胞増殖に関わる種々の遺伝子発現が誘導される[51]。

上皮成長因子受容体（EGFR 又は ErbB1）は、分子量 170 kDa の膜透過型糖タンパク質で、ヒトでは HER（human epidermal growth factor receptor）ファミリーに属する分子として知られている。HER ファミリーは、HER1（EGFR）、HER2（ErbB2）、HER3（ErbB3）及び HER4（ErbB4）からなる受容体型チロシンキナーゼであるが、HER3 のみアミノ酸配列の置換によりチロシンキナーゼ活性を持たない。HER2 のリガンドは同定されていないが、EGFR、HER3 及び HER4 はそれぞれ結合するリガンドが異なり、EGFR は EGF、HB-EGF（heparin-binding EGF-like growth factor）、Amphiregulin、Betacellulin、TGF-α 及び Epiregulin と結合する[52]。リガンドが結合すると、EGFR はホモもしくは他の HER ファミリーとのヘテロ二量体を形成し、細胞内領域のチロシン残基を自己リン酸化してリン酸化チロシンを含んだ配列を生成する。その配列を Shc（src homology 2 domain containing adaptor protein）、Grb（growth factor receptor-bound protein）、Crk（v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog）、PLC-γ（phospholipase C γ）及び SHPs 等のアダプター

分子が認識して結合し、リン酸化を受ける。その結果、下流の Ras/Raf/MAPK 経路、PI3K/Akt 経路及び JAK/STAT 経路等が活性化して、細胞分裂や生存に関与する遺伝子発現を誘導し、アポトーシスに関与する遺伝子発現を抑制して細胞が増殖する [53]。EGFR は上皮系、間葉系及び神経系起源の多様な細胞に発現しており、ノックアウトマウスは胎生致死あるいは皮膚、肺及び消化管等の上皮に重度の発達障害を起こす [54-56] ことから、生命機能を維持する上で重要な役割を担っていることが知られている。しかし、EGFR に遺伝子変異や構造変化が生じて活性化が起こると、発癌、癌の増殖、浸潤及び転移に関与するようになることが報告されており、非小細胞肺癌、胃癌、乳癌といった様々な悪性腫瘍において EGFR の変異や過剰発現が見られる [57-59]。これらの知見から、EGFR は癌治療の標的とされており、これまでに EGFR を標的にした多くの抗癌剤が開発されている。アストラゼネカ株式会社によって開発されたゲフィチニブは、EGFR のチロシンキナーゼに選択的な分子標的治療薬であり、チロシンキナーゼの ATP 結合部位に ATP と競合的に結合することで EGFR の自己リン酸化を阻害し、信号伝達を遮断する。非小細胞肺癌に対して腫瘍縮小効果があり、患者の延命効果も認められている [60-62]。また、炎症において EGFR 信号系は促進と抑制の両方の機能を持つことが報告されている。皮膚炎において損傷した組織を修復し炎症を収束する一方で、TNF-α や IL-6 等の炎症性サイトカインの発現を誘導し、炎症を促進する役割を持つ可能性が示唆されている [63]。

このような背景のもと、私は EGFR 信号系が IL-6 増幅ループの活性化を亢進することを見出し、自己免疫疾患において炎症を促進することを証明した。さらに、EGFR 信号系が IL-6 増幅ループを活性化する分子メカニズム及び自己免疫疾患の発症機序を明らかにする上で有用な知見が得られたため、以下に詳細を記す。

第３章　実験材料及び実験方法

第１節　実験材料

第１項　細胞株

・BC-1（マウス血管内皮細胞；宮坂昌之博士より御供与頂いた）
・MEF（マウス胎児線維芽細胞；参考文献 38）
・W26（マウス膝滑膜細胞；参考文献 39）
・IKKα KO MEF（審良静男博士より御供与頂いた）
・IKKγ KO MEF（審良静男博士より御供与頂いた）
・Hela（ヒト子宮頸癌細胞；ATCC）
・ヒト線維芽細胞様滑膜細胞（参考文献 31）

第２項　実験動物

・C57BL/6 マウス（CLEA Japan）
・F759 ノックインマウス（参考文献 35）
・NF-κB reporter Tg/F759 マウス（参考文献 64）
マウスは大阪大学医学部附属動物施設のガイドラインに従って、SPF 環境下で飼育した。

第３項　ヒト血清試料

・ 関節リウマチ患者及び年齢と性別を一致させた健常者の血清試料（東京医科歯科大学医学部附属病院/膠原病・リウマチ内科 宮坂信之博士及び上坂等博士より御供与頂いた）

・ 多発性硬化症患者及び年齢と性別を一致させた健常者の血清試料（大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 中辻裕司博士及び木下允博士より御供与頂いた）
・ 動脈硬化患者及び年齢と性別を一致させた健常者の血清試料（大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学/保健センター 瀧原佳子博士及び西田誠博士より御供与頂いた）

本研究に際し、個々の患者及び健常者からインフォームド・コンセントを取得し、本研究は東京医科歯科大学医学部附属病院及び大阪大学病院の倫理委員会によって承認された。

第４項　抗体

a）Flow cytometry

抗マウス CD4 抗体（Clone RM4-5）、抗マウス CD19 抗体（Clone MB19-1）、抗マウス NK1.1 抗体（Clone PK136）（以上、BioLegend）、抗マウス CD8（Ly-2）抗体（Clone 53.6.7）、抗マウス CD11c（p150/90）抗体（Clone N418）、抗マウス MHC クラス II（I-A/I-E）抗体（Clone M5/114.15.2）、抗マウス IL-17 抗体（Clone eBio17B7）、抗マウス IFN-γ 抗体（Clone XMG1.2）、ラット IgG2a アイソタイプコントロール抗体（Clone eBR2a）、ラット IgG1 アイソタイプコントロール抗体（Clone eBRG1）（以上、eBioscience）、抗マウス CD11b 抗体（BECKMAN COULTER）、抗マウス FcγRII・III 抗体（2.4G2）

b）Western blotting 及び EMSA

抗マウス phospho-p65（Ser536）抗体（93H1）、抗マウス phospho-Akt（Ser473）抗体（193H12）、抗マウス phospho-STAT3（Tyr705）抗体、抗マウス phospho-p44/p42 MAPK（Thr202/Tyr204）抗体（E10）、抗マウス Akt 抗体（以上、Cell signaling）、抗マウス STAT3 抗体、抗マウス ERK1 抗体（以上、BD Bioscience pharmingen）、抗マウス p65 抗体（C-20、SantaCruz）、抗マウス α-tublin 抗体（Sigma）、HRP 標識抗ラビット IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG 抗体（以上、SouthernBiotech）

c）マウス関節炎

抗マウス Epiregulin 中和抗体（R&D systems）、ラット血清由来 IgG コントロ

ール抗体（Sigma）

第５項　試薬

PMA、ionomycin、LPS（lipopoly saccharide）、$CaCl_2$、Chloroquine、MTT（thiazolyl blue tetrazolium bromide）、Chloroform、Isopropanol、DNaseI（Amplification Grade）、Oligo dT primer、Deoxynucleotide Mix、Puromycin、Polybrene、MOG（myelin-oligodendrocyte glycoprotein）peptide（33-55）、Incomplete Freund's Adjuvant、Protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail 2、Phosphatase inhibitor cocktail 3、BSA（Bovine Serum Albumin）、shRNAs specific for Ereg, Egfr (Erbb1), Erbb4, Pik3ca, Rela, Adam12, Adam15, Adam17, or Nontarget sequence、Collagenase（Clostridiopeptidase）、Tween20、paraformaldehyde、bornyl formate、sodium citrate、Acetylcholine、Dopamine、Epinephrine、Norepinephrine、GABA、Serotonin、Bradykinin、CGRP、VIP、Periostin、ATP、cAMP、Prostaglamdin E2、Urotensin II、α-MSH、Neurokinin A、Neuroligin 1、Progesterone、S100A、C1q、S1P（以上、Sigma）、Human soluble IL-6 receptor α、Recombinant mouse IL-23、Amphiregulin、Betacellulin、Epiregulin、EGF、FGF2、FGF7、PDGF-CC、IGF-1、IGF-2、$VEGF_{120}$、VEGF-CC、PLGF2、Recombinant human HB-EGF、Epiregulin、TGF-α、Tenascin C、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3（以上、R&D systems）、Recombinant murine TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-17A、IFN-γ、Recombinant human IL-17A（以上、PeproTech）、RPMI1640 medium、2-ME（2-Mercaptoethanol）、0.05% /0.53 mM EDTA solution、Triton X-100、Chemi-Lumi One L、Sepasol-RNA I（以上、nacalai tesque）、PD153035、PD168393、ErbB2 inhibitor II、LY294002、PD98059、PIK75、TGX221（以上、Calbiochem）、Human IL-6、Recombinant mouse IFN-β（TORAY）、Mouse CD4 (L3T4) microbeads、LS Column（以上、Miltenyi Biotec）、Illustra NICK Columns、Percoll（以上、GE Healthcare）、Penicillin、Streptomycin

（以上、明治製菓株式会社）、Mayer's Hematoxylin Solution、1% Eosin Y Solution（以上、Wako）、Recombinant mouse IL-27 p28（Imgenex）、M-MLV Reverse Transcriptase（Promega）、FBS（Fetal bovine serum）（Japan Bioserum）、Saline（大塚製薬株式会社）、Mycobacterium Tuberculosis H37 Ra（DIFCO）、Pertussis toxin（List Biological Labolatories）、Recombinant mouse IL-6（ProSpec）、5 × NF-κBluciferase reporter gene（Add gene）、Skim milk（雪印乳業株式会社）、Gefitinib（TOCRIS）、GM-CSF（参考文献 65）

第２節　実験方法

第１項　細胞株培養及び試薬処理

BC-1 細胞及び MEF 細胞の培養には、RPMI1640 培地に 10% FBS 及び抗生物質（Penicillin（100 units/ml）、Streptomycin（100 μg/ml））を添加したものを基礎培養液として使用した。

W26 細胞、Hela 細胞及びヒト線維芽細胞様滑膜細胞の培養には、DMEM 培地に 10% FBS 及び抗生物質（Penicillin（100 units/ml）、Streptomycin（100 μg/ml））を添加したものを基礎培養液として使用した。

マウス骨髄由来樹状細胞の培養には、DMEM 培地に 10% FBS、抗生物質（Penicillin（100 units/ml）、Streptomycin（100 μg/ml））及び GM-CSF（10 ng/ml）を添加したものを基礎培養液として使用した。

マウス CD4 陽性 T 細胞の培養には、DMEM 培地に 10% FBS、抗生物質（Penicillin（100 units/ml）、Streptomycin（100 μg/ml））及び 2-ME（1/250,000）を添加したものを基礎培養液として使用した。

細胞は 5% CO_2、37℃下で静置培養した。また、培養に使用した器具類はすべてオートクレーブによる滅菌処理を施し、すべての操作をクリーンベンチ内で無菌的に行った。細胞への試薬処理は、ヒト IL-6（50 ng/ml）、ヒト可溶性 IL-6 受容体 α（sIL-6Rα、50 ng/ml）、ヒト IL-17（50 ng/ml）、マウス IL-17（50 ng/ml）、マウス TNF-α（50 ng/ml）及びヒト又はマウスの各種増殖因子（100 ng/ml）を含む RPMI1640 培地又は DMEM 培地に置換して行った。各種阻害剤は、サイトカイン等を加える 30 分前に処理した。

第２項　培養細胞への遺伝子導入

a）リン酸カルシウム法

プラスミド DNA 10 μg に対し、2M $CaCl_2$ 62.5 μl、滅菌水 427.5 μl を加えた。この DNA 溶液と 2 × HBS（275mM NaCl、125mM HEPES、16mM Na_2HPO_4；pH6.96）を 1：1 で混合し、ボルテックスで撹拌した後に室温で 20 分間静置して、DNA とリン酸カルシウムの複合体を形成させた。この溶液を、Chloroquine（40 μM）と 10% FBS を含む RPMI1640 培地で 20 分間培養した Hela 細胞又は BC-1 細胞に滴下し、5% CO_2、37℃下で 24 時間培養した。その後、基礎培養液に置換してさらに 24 時間培養した。

b）レンチウイルスベクターを用いた shRNA の導入法

96-well plate（greiner bio-one）に、第 1 項で記した基礎培養液を用いて BC-1 細胞を 1.5×10^3 cells/well で播種し、一昼夜培養した。目的の shRNA を含むウイルスパーティクルスストック（-80℃）を氷上でゆっくり解凍し、MOI（multiplicity of infection）が約 50 になるように基礎培養液に Polybrene（8 μg/ml）を加えた培地で調製して、40 μl/well ずつ細胞に添加した。5% CO_2、37℃下で 24 時間培養した後、基礎培養液に Puromycin（5 μg/ml）を加えた培地を 200 μl/well ずつ加えて 3 日間培養した。この選択で生存していた細胞を一過性のノックダウン細胞株として実験に使用した。

一過性のノックダウン細胞株を 24-well plate（greiner bio-one）に播種して Puromycin（5 μg/ml）を含む基礎培養液で 3～4 日間培養し、さらに 100 mm dish（日本ジェネティクス）に播種して 3～4 日間選択を行った。この選択で確立されたクローンについて Real-time RT-PCR でノックダウン効率の検証を行い、安定ノックダウン細胞株として実験に使用した。

第 3 項　ELISA（Enzyme-linked immunosorbent assay）

96-well plate（Costar）を用いて、培養細胞上清中又はマウス血清中の IL-6、Epiregulin 及び CCL20 濃度を、Mouse IL-6 ELISA Ready-Set-Go!（eBioscience）、Mouse Epiregulin ELISA Kit（R&D systems）、Mouse CCL20/MIP-3α ELISA Kit（R&D systems）の常法に従って測定した。

第 4 項　MTT 試験

96-well plate を用いて試薬を処理した細胞から培養液を除去し、10% FBS を

含む RPMI1640 培地で希釈した MTT 溶液（500 μg/ml）を 100 μl/well で加えて、5% CO_2、37℃下で 3 時間呈色反応を行った。その後、培養上清を除去して DMSO を 100 μl/well 加えて MTT の沈殿を溶解し、550 nm の吸光度を測定した。

第５項　Real-time RT-PCR

試薬添加後の細胞から培養液を除去し、2-ME を 1/100 量添加した Lysis solution で細胞を可溶化し、Mammalian Total RNA Miniprep Kit（Sigma）を用いて total RNA を抽出した。

マウスの膝関節の滑膜組織を Sepasol-RNA Ⅰ 1 ml 中で破砕・均質化し、Chloroform 200 μl を加え室温で 15 分間遠心分離した（15,000 rpm）。上清 600 μl に isopropanol 600 μl を加えた後、転倒混和して室温で 10 分間静置した。その後、室温で 10 分間遠心分離し、沈殿物を 70%エタノールで洗浄することで total RNA を抽出した。

抽出した total RNA に DNaseI と Reaction buffer を 1/10 量ずつ加えて室温で 15 分間静置し、ゲノム DNA を切断した。その後、stop solution を 1/10 量加えて 70℃で 10 分間静置して DNaseI を失活させた。この RNA 溶液に対して Oligo dT プライマーを用いて逆転写反応（70℃ 5 分、42℃ 60 分、95℃ 5 分）を行った。得られた cDNA 産物を鋳型として、マウス Il6、Ccl20、Ereg、IκBζ、Egfr、Erbb4、Socs3、Pik3ca、Adam12、Adam15、Adam17、ヒト IL-6、CCL20、EREG 遺伝子に対する特異的なプライマーを用いて PCR（95℃ 15 秒、60℃ 1 分、40 サイクル）を行いながら、経時的な蛍光強度の変化を 7300 Real Time PCR System（Applied Biosystems）にて測定した。逆転写反応及び Real-time PCR には、それぞれ M-MLV Reverse Transcriptase、KAPA SYBR FAST ABI Prism qPCR kit（Kapa Biosystems）を使用した。マウスの遺伝子については Hprt、ヒトの遺伝子については GAPDH を内在性コントロールとして使用した。

目的の mRNA 量は、それぞれの遺伝子のプライマーを用いて BC-1 細胞又はヒト線維芽細胞様滑膜細胞から調製した cDNA を PCR で増幅し 10^{-11}~10^{-17} g/μl の 10 倍希釈系列から作成した検量線をもとに定量した。

以下に PCR に使用したプライマーの配列を記す。

Mouse Hprt Forward: 5'-GATTAGCGATGATGAACCAGGTT-3'
Mouse Hprt Reverse: 5'-CCTCCCATCTCCTTCATGACA-3'

Mouse Il6 Forward: 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'
Mouse Il6 Reverse: 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA-3'
Mouse Ccl20 Forward: 5'-CGACTGTTGCCTCTCGTACA -3'
Mouse Ccl20 Reverse: 5'-GAGGAGGTTCACAGCCCTTT -3'
Mouse Ereg Forward: 5'-CTGCCTCTTGGGTCTTGACG-3'
Mouse Ereg Reverse: 5'-GCGGTACAGTTATCCTCGGATTC-3'
Mouse Nfκbiz Forward: 5'-GTGGCAGGTAGAGCAGGAAG-3'
Mouse Nfκbiz Reverse: 5'-CCACCTGAAAGGCACTCTGT-3'
Mouse Egfr Forward: 5'-GCCATCTGGGCCAAAGATACC-3'
Mouse Egfr Reverse: 5'-GTCTTCGCATGAATAGGCCAAT-3'
Mouse Erbb4 Forward: 5'-GTGCTATGGACCCTACGTTAGT-3'
Mouse Erbb4 Reverse: 5'-TCATTGAAGTTCATGCAGGCAA-3'
Mouse Socs3 Forward: 5'-GTTGGGGCTGGATTTTTGTGCT-3'
Mouse Socs3 Reverse: 5'-ACTGTGTACTCAAGCTGGTGCA-3'
Mouse Pik3ca Forward: 5'-CCACGACCATCTTCGGGTG-3'
Mouse Pik3ca Reverse: 5'-ACGGAGGCATTCTAAAGTCACTA-3'
Mouse Adam12 Forward: 5'-AGACGTGCTGACTGTGCAAC-3'
Mouse Adam12 Reverse: 5'-CCGTGTGATTTCGAGTGAGAGA-3'
Mouse Adam15 Forward: 5'-CCGCCGCTGCCAAATATAG-3'
Mouse Adam15 Reverse: 5'-GGCCTCAGGTAAACCAGTCTG-3'
Mouse Adam17 Forward: 5'-ACCACTTTGGTGCCTTTCGT-3'
Mouse Adam17 Reverse: 5'-GTCGCAGACTGTAGATCCCTT-3'
Human GAPDH Forward: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
Human GAPDH Reverse: 5'-CGCTCCTGGAAGATGGTG-3'
Human IL6 Forward: 5'-GGAGACTTGCCTGGTGAAAA-3'
Human IL6 Reverse: 5'-GTCAGGGGTGGTTATTGCAT-3'
Human CCL20 Forward: 5'-TGCTGTACCAAGAGTTTGCTC-3'
Human CCL20 Reverse: 5'-CGCACACAGACAACTTTTTCTTT-3'
Human EREG Forward: 5'-CTGCCTGGGTTTCCATCTTCT-3'
Human EREG Reverse: 5'-GCCATTCATGTCAGAGCTACACT-3'

第６項　**DNA microarray**

6-well plate（Greiner bio-one）に BC-1 細胞、W26 細胞又はヒト線維芽細胞様滑膜細胞を播種して一昼夜培養後、IL-6（100 ng/ml）、sIL-6Rα（100 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）を 3 時間処理した。培養液を除去して 2-ME を 1/100 量添加した Lysis solution で細胞を可溶化し、Mammalian Total RNA Miniprep Kit を用いて total RNA を抽出した。Agilent RNA 6000 Nano kit（Agilent technologies）の常法に従って、Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて RNA の精度が RIN（RNA Integrity Number） 6.0 以上であることを確認し、NanoDrop（Thermo Fisher Scientific）を用いて RNA 濃度を測定した。GeneChip 3' IVT Expression kit（Affymetrix）の常法に従って、抽出した RNA から逆転写によって cDNA を合成し、これを鋳型として in vitro transcription によってビオチン標識 aRNA を合成、増幅、精製及び断片化した。GeneChip Hybridization, Wash and Stain kit（Affymetrix）の常法に従って、GeneChip Hybridization Oven 640 中で GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array（Affymetrix）又は GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array（Affymetrix）のプローブとのハイブリダイゼーションを行った（60 rpm、45℃、16 時間）。Fluidics Station 450 を使用してアレイを洗浄後、Hybridization cocktail で染色し、蛍光強度の測定を行った。

Expression Console Software（Affymetrix）及び MAS5 統計アルゴリズムを用いて、蛍光強度から対象の遺伝子の濃度を定量した。刺激条件毎に全プローブの遺伝子発現量の中央値を算出し、この中央値との比を各遺伝子の相対的発現量として解析した。

第 7 項　Western Blotting

Western Blotting に使用した細胞は、すべて 100 mm dish に播種した。試薬添加後の細胞を氷上に置き、培養液を除去してから氷冷した PBS で洗浄し、2 ml の PBS とセルスクレーパー（住友ベークライト）を用いて細胞を回収した。4℃で 3 分間遠心（1,500 rpm）して上清を除き、Protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail2 及び Phosphatase inhibitor cocktail3 をそれぞれ 1/100 量ずつ添加して氷冷した Lysis buffer（20 mM Tris-HCl（pH 7.5）、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1mM EDTA）を加えて、氷上で 10 分間静置した。4℃で 10 分間遠心（12,000 rpm）した後に回収した上清を試料とし、BSA を用いて作成した検量線をもとに Bradford 法にてタンパク質濃度を測定した。

各試料に 5 × Sample buffer（SDS、2-ME を含む）を加え、95℃、5 分間煮沸して変性させた後、5-20% ポリアクリルアミドゲル（Wako）を用いて SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。その後、PVDF 膜（Millipore）に転写（100 V、1 時間）し、5% Skim milk を含む 0.1% TBS-T（0.1% Tween20 を含む TBS）を用いて室温で 1 時間振盪してブロッキングを行った。1 次抗体反応は、室温で 1 時間振盪、もしくは 4℃で一晩振盪することにより行った。2 次抗体反応は、HRP 標識したラビットもしくはマウスの IgG に対する抗体を用いて、室温で 1 時間振盪した。ECL 反応は Chemi-Lumi One L を用いて行い、X 線フィルム（RX-U、FUJIFILM）に感光して、自動現像機（CEPROS-SV、FUJIFILM）で現像した。なお、PVDF 膜は各操作間に 0.1% TBS-T で洗浄を行った（5 分間 ×3 回）。

第８項　Reporter Gene Assay

レポーター活性の測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega）の常法に従って行った。12-well plate に 1×10^5 cells/well で播種した Hela 細胞又は BC-1 細胞を一昼夜培養した後、5 × NF-κB luciferase reporter gene（1 μg/well）及び pRL-TK （0.1 μg/well）をリン酸カルシウム法にて導入した。24 時間培養後に基礎培養液に置換し、さらに 24 時間培養した。その後、血清非存在下で 2 時間培養し、各試薬を 5 時間処理した。PBS で細胞を洗浄し、Passive lysis buffer（100 μl/well）を加えて室温で 15 分間穏やかに振盪して細胞を溶解した。その後、その細胞溶解液 20 μl と発光基質 100 μl を混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーター（Lumat LB9507 型、BERTHOLD）にて測定した。なお、細胞間の導入効率補正のために、遺伝子導入の際同時に導入した pRL-TK 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部標準とし、これとの比を算出して NF-κB luciferase activity とした。

マウスの踵関節の組織を Passive lysis buffer 中で破砕・均質化し、4 ℃で 10 分間遠心（15,000 rpm）して回収した上清を試料とした。BSA を用いて作成した検量線をもとに Bradford 法にてタンパク質濃度を測定し、各試料のタンパク質濃度を調整した。その後、その組織溶解液 100 μl と発光基質 100 μl を混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーターにて測定した。

第９項　ゲルシフトアッセイ（EMSA: Electrophoresis Mobility Shift

Assay）

EMSA は、Gel Shift Assay System（Promega）の常法に従って行った。BC-1 細胞に各試薬を添加した後、核画分を抽出し、BSA を用いて作成した検量線をもとに Bradford 法にてタンパク質濃度を測定した。IL-6 プロモーター領域の NF-κB 結合配列とそれに相補的なオリゴヌクレオチド（50 μM）10 μl ずつを 98℃で 10 分間煮沸し、ゆっくり冷却することで 5'末端が 2～4 塩基突出するようにずらしてアニールさせた。その後、[γ-^{32}P]-ATP と 37℃で 10 分間反応させ、3'末端を放射標識した。NICK columns（GE Healthcare）を用いて未反応の [γ-^{32}P]-ATP を除き、シンチレーションカウンターを用いて放射活性が標識プローブ＞未反応[γ-^{32}P]-ATP であることを確認した。この標識プローブ 2.5 μl と核抽出液 10 μl を室温で 20 分間反応させることで、DNA-タンパク質複合体を形成させた。この複合体を非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動、乾燥させた後、BAS を用いてイメージングプレートに感光させた。また、抗マウス p65 抗体を用いたスーパーシフト反応により、DNA-タンパク質複合体中に NF-κB p65 サブユニットが含まれていることを確認した。

以下に EMSA に使用したオリゴヌクレオチドの配列を記す。

5'-AATGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCA-3'
5'-TGAGACTCATGGGAAAATCCCACATT-3'

第１０項　Th17 細胞移入による EAE の誘導

a）ミエリン特異的抗原の免疫による EAE の誘導

マウスの尾根部に MOG（4 mg/ml）と Complete Freund's Adjuvant（Mycobacterium tuberculosis H37 Ra を IFA に 20 mg/ml の濃度で希釈）を 1：1 で混合してエマルジョンにしたものを 100 μl 皮下注射し、同時に 200 ng の Pertussis toxin を尾静脈へ静脈注射した。抗原免疫を行った日を 0 日目とし、2 日目、7 日目に同量の Pertussis toxin を静脈注射した。

b）マウス骨髄細胞由来樹状細胞の誘導

マウス後肢より採取した骨髄細胞を 100 μm ナイロンセルストレイナー（BD Falcon）により濾過し、0.165 M NH_4Cl を用いて溶血した。この細胞を DMEM 培地に 10% FBS、抗生物質（Penicillin（100 units/ml）、Streptomycin（100

μg/ml））及び GM-CSF（10 ng/ml）を添加した基礎培養液に懸濁し、5% CO_2、37℃下で 2 時間培養して浮遊細胞のみを回収した。この細胞を上記の培地で培養し、2 日おきに培地を交換することにより非接着系細胞を除いた。培養開始から 7 日目の接着細胞を骨髄由来樹状細胞（BMDC）とした。

c）マウスへの Th17 細胞移入

MOG を免疫して 10 日目のマウスから脾臓を回収して溶血し、900 μl の MACS buffer に懸濁後、抗 CD4 抗体を結合させたマイクロ磁気ビーズを 100 μl 加えて氷上で 30 分間静置した。洗浄後の細胞を 5 ml の MACS buffer に懸濁し、平衡化済みの MACS カラム（Miltenyi Biotec）を用いて CD4 陽性 T 細胞を単離した。CD4 陽性 T 細胞（3×10^8 cells/well）を DMEM 培地に 10% FBS、抗生物質（Penicillin（100 units/ml）、Streptomycin（100 μg/ml））及び 2-ME（1/250,000）を添加した培養液に懸濁し、24-well plate を用いて LPS（100 ng/well）で 5 時間刺激し MOG ペプチド（25 μg/ml）をパルスした BMDC（5×10^6 cells/well）とマウス IL-23（10 ng/ml）存在下で 1 日もしくは 2 日間共培養した。

共培養した細胞をピペッティングにより 50ml チューブに回収し、1,500 rpm で 5 分間遠心した。上述した方法と同様にして再度 CD4 陽性 T 細胞を単離し、RPMI1640 培地を用いて 2×10^7 cells/ml に調製して野生型マウスの尾静脈に 400 μl ずつ静脈内注射を行った。

第１１項　細胞内サイトカイン産生の解析

a）EAE の誘導に用いた Th17 細胞の解析

第 10 項 c)に記したように BMDC と共培養した CD4 陽性 T 細胞に PMA（500 ng/well）、ionomycin（500 ng/well）、GolgiPlug（1 μl/well）を加え、5% CO_2、37℃下で 4 時間静置した。その後、ピペッティングで細胞を回収し、BD Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit（BD Biosciences）の常法に従って細胞内サイトカイン産生を解析した。

b）EAE を誘導したマウスの脊髄に浸潤した細胞集団解析

Th17 細胞を移入後 13 日目のマウスから脊髄を単離し、眼科剪刀で細断後 collagenase（1 mg/ml）を処理して、5% CO_2、37℃下で 30 分間静置した。そ

の後、Percoll 密度勾配遠心（70%：30%、2,000 rpm、20 分間） により単核細胞を分離した。細胞数を計測し 24-well plate を用いて、LPS（100 ng/well）で 5 時間刺激し MOG ペプチド（25 μg/ml）をパルスした BMDC（5×10^5 cells/well）と一昼夜共培養した。この細胞に GolgiPlug（1 μl/well）を加え、5% CO_2、37℃下で 4 時間静置し、BD Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit（BD Biosciences）の常法に従って細胞内サイトカイン産生を解析した。

細胞膜の標識には、FITC 標識抗 MHC クラス II（I-A/I-E）抗体、FITC 標識抗 CD11b 抗体、FITC 標識抗 CD11c 抗体、FITC 標識抗 CD19 抗体、FITC 標識抗 CD8 抗体、FITC 標識抗 NK1.1 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD4 抗体及び抗 FcγRII・III 抗体を用い、細胞内の標識には PE 標識抗 IL-17 抗体、APC 標識抗 IFNγ 抗体、PE 標識抗ラット IgG2a アイソタイプコントロール抗体及び APC 標識抗ラット IgG1 アイソタイプコントロール抗体を用いて、フローサイトメトリー（CyAn flow cytometer、Dako Cytomation）を行った。データ解析には Summit software（Beckman Coulter）及び Flowjo software（Tree Star）を使用した。

第１２項　EAE のスコアリング

文献 66 に従って、EAE の重症度を点数化した。

0：正常、1：尾の弛緩、2：後肢の脱力もしくは歩行異常、3：両後肢の完全麻痺、4：四肢の完全麻痺、5：瀕死もしくは死亡

第１３項　マウスの関節内投与

a）サイトカイン誘導性関節炎モデルの誘導

8 週齢の F759 マウスの膝又は踵関節腔に、マウス IL-17（100 ng/dose）及びマウス IL-6（100 ng/dose）を 1 日 1 回 3 日間連続で注入した。

b）関節局所における遺伝子ノックダウン

マウスの膝又は踵関節腔に、非標的配列の shRNA 及び Ereg、Egfr 又は Rela に特異的な shRNA（3.6×10^5 TU/dose）を Polybrene（40 ug/dose）と共に 1 日おきに 3 回注入した。

c）抗体及び阻害剤の関節内投与

関節炎のスコアリングに際し、マウスの踵関節腔に DMSO 又は PD153035、PD168393、gefitinib（10 ug/dose）、ラット血清由来 IgG コントロール抗体又は抗マウス Epiregulin 中和抗体(1 μg/dose）を 1 回目のサイトカイン注入日から 2 週間毎日注入した。

関節局所の NF-κB レポーター活性の測定に際し、マウスの踵関節腔に DMSO 又は PIK75（5 ug/dose）を 1 日 1 回 3 日間連続で注入した。

第１４項　マウス関節炎のスコアリング

マウスの踵関節の可動性を指標として関節炎の重症度を点数化した。
0：正常、1：わずかな可動制限、2：軽度の可動制限、3：中程度の可動制限、4：重度の可動制限

第１５項　マウス関節の組織学的解析

マウスの踵関節を回収後、4% paraformaldehyde に浸して 4℃で一昼夜振盪し、組織を固定した。その後、Morse's solution (22.5% bornyl formate and 10% sodium acid citrate solution)中に 12 時間浸して脱灰を行い、4% paraformaldehyde に 4℃で 12 時間浸した。パラフィン包埋後、ミクロトームを用いて切片（10 μm）を作製し、Hematoxylin 及び Eosin を用いて染色して、踵関節における滑膜の過増殖を評価した。

第１６項　Multiplex Suspension Array

WideScreen BeadPlex Human Cancer Panel 2（Merck）又は Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay（Bio-Rad）の常法に従って、関節リウマチ患者、多発性硬化症患者、動脈硬化患者及び年齢と性別を一致させた健常者の血清試料中の Epiregulin 又は IL-6 濃度を Bio-Plex サスペンションビーズアレイシステム（Bio-Rad）を用いて測定した。

第１７項　統計処理

実験データは、平均値±標準偏差（Mean±SD）又は平均値±標準誤差（Mean±SEM）で示した。本研究では、2 群間の有意差検定に Student's t 検定（two-tailed）を用い、危険率は★★★$P < 0.001$、★★$P < 0.01$、★$P < 0.05$ として有意差を評価した。

第４章　実験結果

第１節　EGFR 信号伝達系による IL-6 増幅ループ活性化の亢進

第１項　血清存在下における IL-6 増幅ループ活性化の亢進

マウス血管内皮細胞由来の BC-1 細胞を用いたゲノムワイドスクリーニングの結果、IL-6 増幅ループを制御する候補遺伝子として 1,289 個の遺伝子が挙げられた。これらの遺伝子について IPA 解析を行ったところ、いくつかの増殖因子の信号伝達系が IL-6 及び IL-17 の信号伝達に関与する可能性が示唆された。血清中には、上皮成長因子（EGF）や線維芽細胞増殖因子（FGFs）、インスリン様増殖因子（IGFs）といった種々の増殖因子が含まれていることから、血清の有無によって IL-6 増幅ループの活性化に変化が見られるか検討を行った。

BC-1 細胞に、血清存在下もしくは非存在下でヒト IL-6 とマウス IL-17 を 24 時間処理し、ELISA を用いて培養上清中のマウス IL-6 濃度を測定した。その結果、血清存在下では非存在下に比べて IL-6 産生量が有意に増加した（Fig. 1A）。血清由来の刺激により細胞増殖が亢進して IL-6 産生量が増加した可能性が考えられたが、この時、細胞増殖の指標である MTT 値は血清の有無によってほとんど差がなかった。さらに、IL-6 と IL-17 を 2 時間処理後、RNA を回収して Real-time PCR により IL-6 の mRNA 発現量を調べたところ、ELISA の結果と同様に、血清存在下では IL-6 の mRNA 発現量が顕著に増加した（Fig. 1B）。以上の結果から、血清中の何らかの増殖因子の信号が IL-6 増幅ループの活性化を転写レベルで亢進する可能性が示唆された。

第２項　EGFR 信号の遮断による IL-6 増幅ループ活性化の抑制

ゲノムワイドスクリーニングの結果から、BC-1 細胞における一過性の EGFR のノックダウンによって、IL-6 と IL-17 の共刺激による IL-6 産生が抑制される可能性が示唆された。全ゲノム関連解析（GWAS）により、EGFR は SLE や喘息、心血管疾患との関連が示されているものの、それらの病態を引き起こす詳細な分子メカニズムは明らかとなっていなかった[50]。さらに、IL-6 増幅ループに依存することが明らかとなっている関節リウマチや多発性硬化症の病態にお

けるEGFRの関与については十分に解明されていなかったことから、私はIL-6増幅ループの活性化におけるEGFRの役割に着目して詳細な解析を行った。

まず、EGFRに特異的な3種類のshRNAを用いて、BC-1細胞におけるEGFRの安定ノックダウン細胞株を作製し、血清存在下におけるIL-6産生量を測定した。その結果、mockに比べて、EGFRの安定ノックダウン細胞株ではIL-6産生が顕著に抑制された（Fig. 1C）。さらに、血清存在下でEGFRチロシンキナーゼ活性の阻害剤であるPD153035又はPD168393を前処理しておくと、IL-6とIL-17によって誘導されるIL-6産生量が阻害剤の処理濃度依存的に減少した（Fig. 1D、1E）。また、BC-1細胞特異的な現象である可能性を否定するために、I型コラーゲン陽性のマウス胎児線維芽細胞（MEF）についても同様の実験を行った。その結果、MEF細胞においてもBC-1細胞と同様に阻害剤の処理濃度依存的にIL-6産生が抑制された（Fig. S7A、S7B）。以上の結果より、BC-1細胞やMEF細胞といった非免疫系細胞において、EGFRを介した信号伝達系がIL-6増幅ループの活性化を亢進する可能性が示唆された。

第3項　EGFRのリガンドによるIL-6増幅ループ活性化の亢進

EGFやHB-EGF、Amphiregulin等のEGFRのリガンドは、変形性関節症（OA）患者に比べて関節リウマチ（RA）患者の骨髄単球で発現亢進しており、関節リウマチの病態に関与する可能性が示唆されている[67]。また、がん細胞においてはEGFがIL-6産生を誘導する[68]ことから、EGFRのリガンドがIL-6増幅ループの活性化を亢進する可能性が考えられた。そこで、BC-1細胞にIL-6及びIL-17と共にEGFRのリガンドであるEGF及びHB-EGFを24時間処理し、ELISAにより培養上清中のIL-6産生量を測定した。その結果、IL-6単独刺激、IL-17単独刺激及び共刺激のいずれの条件においても、EGF及びHB-EGFを加えるとIL-6産生が相乗的に亢進した（Fig. S8A、S8B）。その他のEGFRのリガンドについても同様の結果が得られている（Table 1）。すなわち、EGFRのリガンドの刺激によってIL-6増幅ループの活性化が増強されることが明らかとなった。一方で、PDGF-CC及びFGF7はIL-6とIL-17によって誘導されるIL-6産生に影響を与えなかった（Fig. S8C、S8D）。以上の結果から、EGFファミリーに属する分子がIL-6及びIL-17と相乗的にIL-6産生を亢進し、IL-6増幅ループの活性化を亢進することが示された。

第２節　IL-6 増幅ループ活性化における Epiregulin の役割

第１項　IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導

これまでの実験結果から、EGFR のリガンドが IL-6 増幅ループの活性化を亢進することが分かった。ここで反対に、IL-6 と IL-17 の刺激によって EGF ファミリーの遺伝子発現が亢進し、EGFR 信号系と IL-6 増幅ループが互いに増幅し合っている可能性があるのではないかと考えた。BC-1 細胞に血清非存在下で IL-6 と IL-17 を共処理し、3 時間後に RNA を回収して DNA microarray を行った。その結果、興味深いことに EGFR のリガンドの中で Epiregulin の発現のみが IL-6 と IL-17 の刺激によって亢進した（Fig. 2A）。マウス膝滑膜由来の W26 細胞においても、同様の結果が得られている（Fig. S9A）。そして、IL-6 及び IL-17 の単独刺激を加えて Real-time PCR を行ったところ、BC-1 及び MEF 細胞において、IL-6 と IL-17 の刺激により Epiregulin の mRNA 発現量が相乗的に増加した（Fig. 2B、S10A）。すなわち、Epiregulin は IL-6 増幅ループの標的分子の一つであることが明らかとなった。さらに、BC-1 及び MEF 細胞において、Epiregulin を処理してから 3 時間後に、Epiregulin 自身の mRNA 発現が顕著に亢進していた（Fig. 2B、S10A）。

この IL-6 と IL-17 刺激による Epiregulin の発現誘導がタンパク質レベルにまで反映されることを確かめる目的で、ELISA を用いて培養上清中の Epiregulin 濃度を定量的に測定した。その結果、IL-6 及び IL-17 処理後 48 時間における培養液中の Epiregulin 濃度はわずかに増加する程度であった。しかしながら、さらに EGF を加えると、IL-6 と IL-17 刺激により Epiregulin 産生量が相乗的に増加した（Fig. S10B、S10C）。すなわち、Epiregulin の転写は IL-6 と IL-17 によって誘導されるが、細胞からの分泌には EGFR 信号が必要である可能性が示唆された。これらの結果から、血管内皮細胞や線維芽細胞に IL-6 と IL-17 刺激が加わると、Epiregulin の mRNA 発現が相乗的に亢進し、Epiregulin は自身の遺伝子発現及び分泌を亢進して、正のフィードバックループを形成することが明らかとなった。

第２項　Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化の亢進

第 1 節における EGF 及び HB-EGF と同様に、Epiregulin は処理濃度依存的かつ IL-6 及び IL-17 と相乗的に BC-1 細胞の IL-6 産生を亢進した（Fig. 2C）。

このEpiregulinによる相乗的なIL-6産生の亢進が転写レベルで起こるか確かめる目的で、BC-1及びMEF細胞にIL-6、IL-17及びEpiregulinを3時間処理した後、RNAを回収してReal-time PCRによりIL-6のmRNA発現を定量化した。その結果、ELISAの結果と同様に、IL-6単独刺激、IL-17単独刺激及び共刺激のいずれの条件においても、Epiregulinを加えるとIL-6のmRNA発現量が相乗的に増加した（Fig. 2D、S11A）。

IL-6増幅ループは、IL-6以外にも様々な炎症性分子の発現を相乗的に誘導するが、IL-6 増幅ループの標的分子の一つとして CCL20 が知られている [39]。CCL20はIL-17の主要な供給源であるCCR6陽性のTh17細胞を炎症部位へと誘導するケモカインであり、関節リウマチ患者の関節滑膜細胞は大量のCCL20を産生していることが報告されている [69]。そこで、CCL20のmRNA発現量を調べたところ、BC-1及びMEF細胞において、EpiregulinはIL-6及びIL-17と相乗的にCCL20のmRNA発現を亢進した（Fig. 2E、S11B）。また、IL-6の遺伝子発現にはNF-κB（p65/p50ヘテロダイマー）によって発現誘導される核内タンパク質IκBζが必須である [70] ことから、IL-6、IL-17及びEpiregulinを1時間処理した後、IκBζのmRNA発現量を調べた。その結果、IL-6と同様にIκBζのmRNA発現量もEpiregulinによって相乗的に増加した（Fig. 2F）。一方で、STAT3の下流で誘導され炎症を抑制するSOCS3の発現量は、Epiregulinを加えても変化しなかった（Fig. 2G）。以上の結果から、EpiregulinがIL-6増幅ループの標的である炎症誘導分子群の発現を転写レベルで亢進することが示された。

第3項　Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進は EGFR を介しており、ErbB2 及び ErbB4 は関与していない

EGFRはリガンドが結合すると、ホモ二量体以外にも他のErbB（HER）ファミリーの分子とヘテロ二量体を形成して細胞内に信号を伝達することが知られている [71]。関節リウマチ患者の線維芽細胞様滑膜細胞においては、EGFRファミリーの中でEGFRとErbB2（HER2）が高発現している [67] ことから、EGFRのリガンドによるIL-6増幅ループの活性化亢進にErbB2が関与する可能性が考えられた。そこで、BC-1細胞にEGFRとErbB2のチロシンキナーゼ活性阻害剤を前処理してIL-6、IL-17及びEpiregulinで24時間刺激した後に、培養上清中のIL-6濃度を測定した。その結果、EGFRの阻害剤であるPD153035

を前処理しておくと、Epiregulin による IL-6 産生の亢進が抑制されたのに対し、ErbB2 の阻害剤である ErbB2 inhibitor II を前処理しても IL-6 の産生量は変化しなかった（Fig. S12A、S12B）。また、Epiregulin は EGFR と ErbB4 に結合することが報告されている [53] ことから、Epiregulin による IL-6 産生の亢進に ErbB4 が関与するか検討した。EGFR と ErbB4 のノックダウン細胞株を作製し、IL-6、IL-17 及び Epiregulin 刺激による IL-6 産生を調べたところ、mock に比べて、EGFR のノックダウン細胞株では Epiregulin による IL-6 産生の亢進が抑制されたのに対し、ErbB4 のノックダウン細胞株では IL-6 の産生量は変化しなかった（Fig. 2H、S12C、S12D）。これらの結果から、Epiregulin は、ErbB2 及び ErbB 4 ではなく、EGFR を介して IL-6 増幅ループの活性化を亢進することが分かった。

第４項　IL-6 増幅ループの活性化における Epiregulin 増幅ループの重要性

IL-6 と IL-17 によって誘導される Epiregulin 増幅ループが IL-6 増幅ループの活性化亢進に寄与しているか調べるために、Epiregulin 特異的な shRNA を用いて BC-1 細胞における Epiregulin のノックダウンを行い、IL-6 と IL-17 を処理して培養上清中の IL-6 及び CCL20 産生量を測定した。その結果、Epiregulin のノックダウン細胞株では mock に比べて、刺激後 48 時間の IL-6 及び CCL20 産生が有意に抑制された（Fig. 2I、S12E）。Epiregulin を加えると、Epiregulin のノックダウン細胞株においても mock と同程度の IL-6 産生がみられた（Fig. 2I）ことから、IL-6 と IL-17 による Epiregulin の誘導が IL-6 増幅ループの最大限の活性化に必須であることが示された。

第３節　Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化亢進の分子メカニズム

第１項　Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化亢進における PI3Kα/Akt 経路の関与

以前の報告により、IL-6 増幅ループは IL-6 信号下流の STAT3 と IL-17 信号下流の NF-κB に依存することが明らかとなっている[38]。また、上皮細胞においては、EGFR の下流で Raf/MEK/ERK 経路、PI3K/Akt 経路、JAK/STAT 経路が活性化することが知られている[53]。そこで、IL-6 と IL-17 に加えて Epiregulin 刺激を行った際に、さらに活性化が亢進する経路を ERK1/2、Akt、STAT3 及び NF-κB サブユニット p65 のリン酸化を指標に検討した。血清非存在下で 2 時間培養した MEF 細胞に IL-6、IL-17 及び Epiregulin を処理し、30 分後の ERK1/2 (Thr202/Tyr204)、Akt (Ser473)、STAT3 (Tyr705) 及び p65 (Ser536) のリン酸化レベルを評価した結果、IL-6 と IL-17 共刺激を行った細胞に比べて、さらに Epiregulin 刺激を加えた細胞では、ERK1/2（Thr202/Tyr204）、Akt（Ser473）、p65（Ser536）のリン酸化が亢進した（Fig. 3A）。そのため、Raf/MEK/ERK 経路もしくは PI3K/Akt 経路、NF-κB 経路が Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進に関与する可能性が考えられた。まず、BC-1 細胞に ERK1/2 を活性化する MEK1 の阻害剤 PD98059 を 30 分前処理し、IL-6、IL-17 及び Epiregulin による IL-6 産生量が変化するか ELISA により調べた。その結果、PD98059 を処理しても刺激後 24 時間における IL-6 産生量はほとんど抑制されなかった（Fig. S13A）。一方で、PI3K の阻害剤である LY294002 を処理すると、Epiregulin によって亢進する IL-6、IL-17 誘導性の IL-6 産生が阻害剤の処理濃度依存的に減少した（Fig. S13B）。

PI3K は触媒サブユニットと調節サブユニットのヘテロ二量体であり、触媒サブユニットは Class IA、IB、II 及び III に分類される[72]。また、EGFR 等の受容体チロシンキナーゼの下流では Class IA の触媒サブユニットである p110α（PI3Kα）、p110β（PI3Kβ）及び p110δ（PI3Kδ）が活性化することが知られている。Class IA のうち、PI3Kα と PI3Kβ はユビキタスに発現しており、PI3Kδ は造血系の細胞に偏在している[73]ことから、非造血系の細胞における IL-6 増幅ループの活性化亢進には PI3Kα と PI3Kβ が関与する可能性が考えられた。そこで、BC-1 細胞に PI3Kα に対する選択的な阻害剤 PIK75 と PI3Kβ に対する選

択的な阻害剤 TGX221 を前処理し、IL-6、IL-17 及び Epiregulin による IL-6 産生量が変化するか ELISA により調べた。その結果、PIK75 を処理した群では、MTT 値が対照群と比べて同程度の 0.03 μM において有意に IL-6 産生の亢進が抑制された（Fig. 3B）。一方で、TGX221 を 1 μM まで処理しても、IL-6 産生量は抑制されなかった（Fig. 3C）。さらに、PI3Kα（Pik3ca）をノックダウンした BC-1 細胞において、Epiregulin による IL-6 産生の亢進が抑制された（Fig. 3D、S13C）。以上の結果から、EGFR 下流の PI3Kα/Akt 経路の活性化が IL-6 増幅ループの活性化亢進に関与することが分かった。

第２項　Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化亢進における NF-κB の関与

Fig. 3A の結果から、IL-6+IL-17 刺激によって誘導される p65（Ser536）のリン酸化が Epiregulin によってさらに亢進することが分かった。さらに、PI3K 下流の Akt は IKKα 及び IKKβ を活性化することで NF-κB の活性化を亢進することが報告されている [74-76]。そこで、Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進に NF-κB が関与しているか検討した。まず、NF-κB 結合配列を含むレポーター遺伝子を Hela 細胞に導入し、Epiregulin 及び IL-17 で 5 時間刺激して、NF-κB レポーター活性を測定した。その結果、Epiregulin と IL-17 によって NF-κB レポーター活性が相乗的に亢進した（Fig. 3E）。さらに、Epiregulin による NF-κB レポーター活性の亢進は、PI3K の阻害剤である LY294002 の前処理によって抑制された（Fig. 3F）。

次に、IL-6 プロモーター領域における NF-κB の DNA への結合が Epiregulin によって亢進されるか調べる目的で、BC-1 細胞に Epiregulin 及び IL-17 を処理してゲルシフトアッセイ（EMSA）を行った。その結果、IL-17 刺激後 30 分、60 分でみられたバンドが Epiregulin を加えることでさらに増加した（Fig. S14A）。また、p65 に対する抗体の添加でバンドのスーパーシフトが見られたことから、p65 を含んだ複合体を示すバンドであることが確認された。これらの結果から、Epiregulin は IL-17 誘導性の IL-6 プロモーターへの NF-κB の結合を亢進することが分かった。

IKKα、IKKβ 及び IKKγ から成る IKK 複合体は、IKKγ を足場として酵素活性をもつ IKKα と IKKβ が NF-κB の活性化抑制分子である IκBα をリン酸化し分解へと誘導することで、NF-κB のリン酸化及び核移行を亢進させる [77]。そこ

で、IKKα と IKKγ を欠損した MEF 細胞を用いて、Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進が NF-κB 経路を介しているか調べた。IL-6、IL-17 及び Epiregulin を 24 時間処理し、ELISA にて IL-6 産生量を測定したところ、野生型の MEF 細胞でみられた Epiregulin による IL-6 産生の亢進が IKKα をノックアウトした MEF 細胞では顕著に抑制され、IKKγ をノックアウトした MEF 細胞ではほとんど IL-6 産生が見られなかった（Fig. 3G）。また、BC-1 細胞で p65（RelA）をノックダウンすると Epiregulin による IL-6 産生の亢進が抑制された（Fig. S15A）ことから、Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進は、NF-κB 経路を介していることが明らかとなった。これに加えて、生体内においても、NF-κB reporter Tg/F759 マウスの踵関節腔に IL-6 と IL-17 を注入することで亢進する関節組織の NF-κB レポーター活性が Epiregulin によってさらに亢進し、PI3Kα の阻害剤である PIK75 によって抑制されることが分かった（Fig. 3H）。以上の結果より、Epiregulin は PI3Kα/Akt/NF-κB 経路を介して IL-6 増幅ループの活性化を亢進することが明らかとなった。

一方で、Epiregulin を加えても STAT3（Y705）のリン酸化は亢進されず（Fig. 3A）、STAT3 の標的分子である SOCS3 の発現も亢進されなかった（Fig. 2G）ことから、Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進に STAT3 は関与していない可能性が示唆された。

また、IKKγ のノックアウトにより IL-6 と IL-17 によって誘導される Epiregulin の発現が顕著に抑制され（Fig. S15B）、LY294002 の処理によって Epiregulin 誘導性の Epiregulin 発現が抑制された（Fig. S15C）ことから、Epiregulin 増幅ループの誘導にも PI3K/NF-κB 経路が関与する可能性が示唆された。

第４節　自己免疫疾患モデルの発症における Epiregulin-EGFR 信号系の役割

第１項　IL-6 増幅ループ依存性の関節炎モデルにおける Epiregulin-EGFR 信号系の役割

皮膚炎においては、EGFR 信号伝達系は炎症性サイトカインの産生を誘導して炎症を促進する役割と、組織修復により炎症を収束する役割があることが知られている [63]。そこで、EGFR 信号伝達系が自己免疫性の関節炎の発症において亢進と抑制どちらの役割を担っているか評価した。

F759 マウスは非造血系細胞における STAT3 の過剰な活性化により、生後 1 年から 1 年半以内にほぼ 100%の個体において自己免疫性の関節炎を発症する [36]。この関節炎は IL-6 増幅ループに依存しており、8 週齢の F759 マウスの関節腔に IL-6 と IL-17 を注入すると、1 週間程度で関節炎の発症を誘導することができる [39]。そこで、初めにこの実験系を用いて Epiregulin-EGFR 信号系が関節炎の発症に関与するか検討した。F759 マウスの後肢の膝関節腔に Epiregulin と EGFR に特異的な shRNA を 1 日おきに 3 回注入することで関節局所における遺伝子ノックダウンを行った後、IL-6 と IL-17 を 3 日間連続で注入して膝の滑膜組織における遺伝子発現を調べた。その結果、IL-6 と IL-17 によって滑膜組織における IL-6 と Epiregulin の mRNA 発現が亢進し、それらの発現亢進は Epiregulin と EGFR のノックダウンによって抑制された（Fig. 4A、4B）。すなわち、生体内においても、IL-6 増幅ループによって Epiregulin 増幅ループが誘導され、その Epiregulin による EGFR 信号伝達系の活性化が IL-6 の発現に重要であることが示された。

さらに、関節における局所的な Epiregulin 及び EGFR のノックダウンにより関節炎の発症が抑制されるか検討を行った。F759 マウスの後肢の踵関節腔に Epiregulin 及び EGFR に特異的な shRNA、IL-6 及び IL-17 を注入して関節炎の重症度を評価した結果、Epiregulin と EGFR の発現を関節局所でノックダウンした群では、対照群に比べて有意に関節炎の発症が抑制された（Fig. 4C、4D、S12D、S16A）。これに加えて、Epiregulin に対する中和抗体や EGFR チロシンキナーゼ活性阻害剤である PD153035、PD168393 及びゲフィチニブを関節内投与した群においても、対照群に比べて有意に関節炎の発症が抑制された（Fig. 4E、4F、S16B、S16C）。また、踵関節の組織学的解析により、Epiregulin

の中和抗体の投与により、IL-6 と IL-17 によって誘導される滑膜の過増殖が抑制されることも確認された（Fig. 4G）。以上の結果から、Epiregulin-EGFR 信号系が IL-6 増幅ループ依存性の関節炎発症を促進する役割を担っていることが明らかとなった。

第２項　多発性硬化症モデル EAE の発症における Epiregulin-EGFR 信号系の役割

多発性硬化症は、中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患の一つで、四肢の麻痺や感覚障害、視力障害等の症状が再発と寛解を繰り返す自己免疫性の難病である[78]。多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）は、神経を覆う髄鞘（ミエリン鞘）に特異的な抗原を野生型マウスに免疫することで誘導され、EAE マウスから単離した Th1 細胞もしくは Th17 細胞を野生型マウスに移入することでも多発性硬化症と類似の病態を発症する[79]。Th17 細胞の移入によって誘導される EAE は、IL-6 及び IL-17 のノックアウトマウスや I 型コラーゲン陽性細胞特異的な IKKγ 及び STAT3 のノックアウトマウスを用いた解析から、IL-6 増幅ループに依存することが明らかとなっている[38, 41]。そのため、EAE の発症に Epiregulin-EGFR 信号系が関与しているか検討した。

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）のペプチドで免疫した野生型マウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を単離し、MOG ペプチドをパルスした骨髄由来樹状細胞（BMDC）と IL-23 存在下で共培養することで EAE 誘導性の Th17 細胞を単離した。この Th17 細胞を野生型マウスの尾静脈から移入することで EAE を誘導すると、誘導後 13 日目において血清中の Epiregulin 濃度が増加していた（Fig. S16D）。また、EGFR チロシンキナーゼ活性阻害剤であるゲフィチニブを腹腔内投与した群では対照群に比べて、EAE の発症が有意に抑制された（Fig. 4H）。さらに、Th17 細胞を移入してから 13 日目にマウスの脊髄を単離し、脊髄内に浸潤した細胞数を比較検討した。その結果、ゲフィチニブを投与した群では対照群に比べて、脊髄内に浸潤した細胞数が有意に減少した（Fig. 4I）。また、細胞内サイトカイン解析により、ゲフィチニブ投与によって IL-17 産生性及び IFN-γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞の脊髄内への浸潤が有意に抑制されることが分かった（Fig. 4I、S17A）。以上の結果から、EGFR 信号系が EAE の発症及び Th17 細胞と Th1 細胞の脊髄浸潤に重要であることが示され、EAE の発症に Epiregulin-EGFR 信号系が関与する可能性が示唆された。

第５節　ヒトの疾患における Epiregulin-EGFR 信号系の関与

第１項　ヒトの滑膜細胞における Epiregulin 増幅ループの活性化及び Epiregulin-EGFR 信号系による IL-6 増幅ループの活性化亢進

これまでの解析から、Epiregulin 増幅ループがマウスの血管内皮細胞や線維芽細胞における IL-6 増幅ループの活性化亢進及び自己免疫疾患モデルの発症に重要であることが分かった。そこで、Epiregulin-EGFR 信号系による IL-6 増幅ループの活性化亢進及び Epiregulin 増幅ループがヒトの細胞においても認められるか検討した。ヒト線維芽細胞様滑膜細胞に血清存在下で EGFR のチロシンキナーゼ活性阻害剤を前処理し、ヒト IL-6 及びヒト IL-17 で刺激すると IL-6 の mRNA 発現量が著明に減少した（Fig. 5A）。また、Epiregulin の mRNA 発現は、IL-6 と IL-17 によって相乗的に亢進し、Epiregulin の刺激によっても有意に増加した（Fig. 5B）。さらに、IL-6、IL-17 及び Epiregulin を 3 時間処理すると、ヒトの細胞においても IL-6 と IL-17 による相乗的な IL-6 及び CCL20 の mRNA 発現亢進がみられ、Epiregulin によってさらに発現量が増加した（Fig. 5C、5D）。以上の結果から、ヒトの滑膜由来細胞においても Epiregulin 増幅ループの活性化及び Epiregulin-EGFR 信号系による IL-6 増幅ループの増強が生じることが明らかとなった。

第２項　自己免疫疾患及び動脈硬化患者における血清中 Epiregulin 濃度の増加

実際に、自己免疫疾患患者の病態に Epiregulin が関与するか調べるために、関節リウマチ患者及び多発性硬化症患者の血清中 Epiregulin 濃度を測定した。その結果、関節リウマチ患者及び多発性硬化症患者では、健常者に比べて血清中 Epiregulin 濃度が有意に高かった（Fig. 5E、5F）。これまでの報告[31]と一致して、本研究に用いた患者の血清試料中で IL-6 濃度が高値を示すことも確認している（Fig. S18A、S18B）。また、自己免疫疾患以外の慢性炎症性疾患の病態にも Epiregulin が関与するか調べる目的で、動脈硬化患者の血清中 Epiregulin 濃度の測定を行った。その結果、動脈硬化患者においても、血清中 Epiregulin 濃度が健常者に比べて有意に高いことが分かった（Fig. 5G）。これらの結果から、Epiregulin が自己免疫疾患を含む様々な慢性炎症性疾患の病態に重要である可能性が示唆された。

第５章　考察

本研究により、EGFR 信号系が IL-6 増幅ループの活性化を亢進することが明らかとなった。さらに、IL-6 増幅ループの活性化により EGFR のリガンドの一つである Epiregulin の発現が誘導され、Epiregulin は自身の増幅ループを形成して IL-6 増幅ループの活性化をさらに亢進し、自己免疫疾患モデルの発症に寄与することが示された。以下に、本研究で得られた結果をもとに、自己免疫疾患発症における Epiregulin-EGFR 信号系の役割と本研究の意義について考察を加える。

私は、EGFR 信号系が IL-6 増幅ループの活性化を亢進したことから、反対に IL-6 増幅ループの活性化によって EGFR のリガンドの発現が亢進する可能性もあるのではないかと考えた。BC-1 細胞を用いて EGFR のリガンドの発現を解析したところ、興味深いことに EGFR のリガンドの中で Epiregulin の mRNA 発現のみが IL-6 と IL-17 の刺激によって相乗的に亢進することが明らかとなった（Fig. 2A、2B、S9A、S9B、S10A）。

それでは、何故 Epiregulin のみが IL-6 増幅ループの標的分子なのだろうか。Epiregulin は、比較的新しく同定された EGF ファミリーの分子で、他の EGF ファミリーの分子との相同性は 24～50%である[80]。定常状態において、他の EGF ファミリーのメンバーが全身性に発現しているのに対して、Epiregulin は皮膚、胎盤及び末梢血白血球に強く発現していることが知られている。また、膵癌、結腸癌、転移性膀胱癌及び転移性乳癌において Epiregulin の発現が認められるが、その発現機構については明らかとなっていない[81]。興味深いことに、Epiregulin は EGFR と ErbB4 に結合し、ケラチン生成細胞、線維芽細胞及び血管内皮細胞の増殖を亢進するが、いくつかの上皮腫瘍細胞の増殖を阻害することが知られている。さらに、Epiregulin は、骨吸収促進や癌細胞の転移、溢出促進など他の EGF ファミリーとは異なる機能を持つことも報告されている[82]。このように、Epiregulin は他の EGF ファミリーとは異なる独特の発現パターン及び機能を示す。本研究では、IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導は、PI3K/NF-κB 経路に依存する可能性が示唆された（Fig. S15B、S15C）。他の EGF ファミリー分子の発現誘導に PI3K/NF-κB 経路が関与するか検討す

る必要があるが、この経路が Epiregulin 特異的な発現機構を解明する鍵になるかもしれない。また、がん細胞においては、転写因子 Ets-1（v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1）と ERK が Epiregulin の発現に関与する可能性が示唆されている[81]。今後、Epiregulin 発現の詳細な分子メカニズムを解析することによって、何故 Epiregulin のみが IL-6 増幅ループによって誘導されるのかという疑問の答えが明らかとなるだろう。

IL-6 と IL-17 の刺激によって Epiregulin の mRNA 発現が相乗的に亢進したのに対して、細胞培養上清中の Epiregulin 濃度は、IL-6 と IL-17 の刺激のみではわずかに増加する程度であった。しかしながら、さらに EGFR の刺激を加えると、IL-6 と IL-17 による相乗的な Epiregulin 産生の亢進が見られた（Fig. S10B、S10C）。Epiregulin は細胞核内で mRNA 合成された後、細胞膜に輸送され Proepiregulin として細胞膜表面上に蓄積する。その後、ADAM12、ADAM15 及び ADAM17 等のプロテアーゼによって細胞膜表面上の Proepiregulin が切断されて、Epiregulin として分泌されることが知られている[83, 84]。そこで、BC-1 細胞において ADAM12、ADAM15 及び ADAM17 の遺伝子ノックダウンを行ったところ、ADAM17 のノックダウン細胞株でのみ IL-6、IL-17 及び EGF 誘導性の Epiregulin の分泌が抑制された（Fig. S19A-S19C、S19E-S19G）。さらに、ADAM17 のノックダウン細胞株では IL-6 産生も抑制されたことから、ADAM17 による細胞膜表面上の Proepiregulin の切断が IL-6 増幅ループの活性化に重要であることが分かった（Fig. S19D）。また、Epiregulin 及び EGF の刺激によって ADAM17 の発現が亢進した（Fig. S19H）ことから、Epiregulin は自身の遺伝子発現を亢進するだけでなく、細胞膜表面からの分泌も亢進することで正のフィードバックループを形成することが明らかとなった。ADAMs は Ras/Raf/MAPK 経路や Shc/Src 経路によって発現が誘導される[85]ことが報告されており、BC-1 細胞において Epiregulin の刺激で ERK1/2 のリン酸化が亢進した（Fig. 3A）ことから、Epiregulin は ERK1/2 の活性化によって ADAM17 の発現を亢進する可能性が考えられる。ERK1/2 を活性化する MEK1 の阻害剤は IL-6 及び IL-17 刺激後 24 時間での IL-6 産生には影響を与えなかったが、Epiregulin の分泌は刺激後 48 時間で顕著に見られることから、IL-6 及び IL-17 刺激後 48 時間以降では ERK1/2 の阻害によって IL-6 増幅ループの活性化が抑制されるかもしれない。Epiregulin-EGFR 信号系によ

る ADAM17 発現誘導の詳細な分子メカニズムの解明に関しては今後の課題である。

EGF ファミリーに属する分子が IL-6 増幅ループの活性化を亢進したのに対して、PDGF-CC 及び FGF7 は IL-6 増幅ループの活性化に影響を与えなかった（Fig. S8A-S8D）。PDGFR 信号系や FGFR 信号系も PI3K を活性化することが知られているが、何故これらの受容体の刺激では IL-6 増幅ループの活性化が亢進されないのだろうか。BC-1 細胞には PDGFR や FGFR が発現していない可能性も考えられたが、PDGF-CC 及び FGF7 の刺激によって細胞内チロシンのリン酸化レベルが亢進していたことから、細胞内の信号伝達は起こっていると考えられる。最近の結晶構造解析等により、EGFR は二量体化したものの中でも、キナーゼ領域が特別な配置をもつ「非対称な二量体（Asymmetric dimer）」が酵素活性をもつと考えられている [86-88]。このような特殊な活性化によって、EGFR の細胞内領域に結合するアダプター分子や PI3K の修飾が他の増殖因子で刺激した場合と異なるのかもしれない。もしくは、PI3K/Akt から IKK 複合体や NF-κB の活性化への信号伝達機構が異なる可能性も考えられ、今後詳細を明らかにしていきたいと考えている。興味深いことに、増殖因子だけでなく神経伝達物質等の可溶性分子の中にも、IL-6 及び IL-17 との相乗効果を示すものとそうでないものがあり、これらの信号伝達系の詳細な分子機構の解析を行い、比較検討することによって新たな知見が得られることが期待される（Table 1）。IL-6 と IL-17 又は STAT3 と NF-κB による相乗効果のメカニズムにおいては、受容体の相互作用、標的遺伝子のプロモーター領域への STAT3 や NF-κB の結合の安定化、プロモーター領域及びエンハンサー領域のプライミングによるヒストンのアセチル化亢進、未知の第三因子が NF-κB-STAT3 複合体に結合することによるリン酸化亢進といった様々な可能性が考えられ、非常に興味深い研究課題である。

関節リウマチ患者の滑膜細胞では、EGFR ファミリーのうち EGFR と HER2（ErbB2）の発現が高いことが報告されている [67]。HER2 は胃癌、乳癌、卵巣癌といった多くの癌で過剰発現しており、HER2 に対するヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブは乳癌の治療薬として使用されている [89]。そこで、EGF ファミリーによる IL-6 増幅ループの活性化亢進が EGFR/HER2 ヘテロダイマ

ーを介している可能性を考え、検討を行った。しかし、HER2 に対する阻害剤では IL-6 増幅ループが抑制されず、Epiregulin が結合することが知られている ErbB4 の遺伝子ノックダウンによっても IL-6 産生が変化しなかった（Fig. S12A-S12D）。これらの結果から、I 型コラーゲン陽性細胞における EGF ファミリーによる IL-6 増幅ループの活性化亢進は EGFR ホモダイマーを介している可能性が考えられる。また、EGFR は ErbB ファミリーの他に IGF1R とヘテロダイマーを形成することが報告されている [71] ことから、EGFR と IGF1R のクロストークが IL-6 増幅ループの活性化に関与する可能性もある。EGFR のノックダウンと比べると弱いものの、IGF1R のノックダウンによっても血清存在下における IL-6 増幅ループの活性化及びサイトカイン誘導性関節炎の発症が抑制されたことから、今後、EGFR と IGF1R のクロストークの可能性も検討してみたい。

EGF の刺激によって IL-6Rα 及び gp130 の mRNA 発現が亢進することが知られており [90]、反対に BC-1 細胞において IL-6 の刺激によって EGFR の mRNA 発現の亢進がみられた（Fig. S20A）。これらのことから、IL-6 信号系と EGFR 信号系は受容体の発現レベルでも互いに制御し合っている可能性が考えられる。また、癌においては、EGFR に遺伝子変異や構造変化が起こると、発癌や癌の増殖に関与するようになると考えられている [57-59]。本研究により、関節リウマチモデルにおいて EGFR 及びそのリガンドの発現亢進が炎症を増幅させることが示されたが、関節リウマチにおける炎症、滑膜の過増殖及び骨破壊に EGFR の遺伝子変異が関与するかどうかは非常に興味深い。

また、EGFR チロシンキナーゼ活性の阻害剤ゲフィチニブにより EGFR 信号系を遮断すると、EAE の発症が有意に抑制された（Fig. 4H）。この時、脊髄内への Th17 細胞の浸潤が抑制されていたが（Fig. 4I）、これは、EGFR 信号系の遮断により血管内皮細胞の CCL20 の発現が減少したためであると考えられる。Th17 細胞は第 5 腰椎（L5）の背側の血管から脊髄内に浸潤することが報告されている（Fig. S5）[41] ことから、L5 の血管における Epiregulin の発現亢進や EGFR 信号系の活性化が EAE の発症に重要であるかもしれない。また、ゲフィチニブ投与によって Th1 細胞の浸潤も抑制されていたことから、EGFR 信号系は MIP-1α などの Th1 細胞を誘導するケモカインの産生にも関与する可能性が考

えられる。

中枢神経系においては、グリア細胞の一つであるアストロサイトにおける IL-17 信号が、CCL20 等のケモカインの産生及び EAE の発症に重要であることが報告されている[91, 92]。アストロサイトにおいて IL-6 増幅ループが生じる報告[93]もあることから、アストロサイトにおいて IL-6 増幅ループによる Epiregulin の誘導及び Epiregulin 増幅ループが生じる可能性が考えられ、今後明らかにすべき課題である。

Epiregulin のノックアウトマウスは、生後 8 ヶ月で重篤な皮膚炎を自然発症することから、Epiregulin は皮膚炎を抑制する役割を持つことが知られている[94]。しかしながら、本研究によって、関節炎及び多発性硬化症においては、Epiregulin-EGFR 信号系は炎症を促進する役割を持つことが明らかとなった。組織や疾患によって同一の分子が異なる機能を示すという知見は非常に興味深く、詳細な分子メカニズムが解明されれば、より効果的で副作用の少ない疾患特異的な治療薬の開発につながることが期待される。

重要なことに、ヒトの滑膜細胞においても IL-6 増幅ループの活性化、IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導及び Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進が起こり、関節リウマチ、多発性硬化症及び動脈硬化患者の血清中 Epiregulin 濃度が健常者に比べて高値を示すことが明らかとなった（Fig. 5A-5G）。本研究で用いた血清試料では、個々の患者における血清中 Epiregulin 濃度と血清中 IL-6 濃度に有意な相関関係は認められなかったが、今後試料数を増やして、個々の患者の血清中 Epiregulin 濃度が血清中 IL-6 濃度及び疾患の重症度と相関するか検討してみたい。

また、ゲノムワイドスクリーニング及び DNA マイクロアレイ解析によって同定された IL-6 増幅ループの制御遺伝子と標的遺伝子の全ゲノム関連解析（GWAS）の結果、同定された遺伝子の 15%以上が既知のヒト疾患関連遺伝子であることが分かった。この解析によって、IL-6 増幅ループは、自己免疫疾患以外にも代謝性疾患や神経変性疾患といった様々なヒトの慢性炎症性疾患に関与する可能性が示唆された[50, 95]。これに加えて、がんの発症にも IL-6 増幅ループが関与する可能性が示唆されている[96, 97]ことから、自己免疫疾患やがんを含む慢性炎症性疾患の発症において Epiregulin-EGFR 信号系による IL-6 増幅ループの増強が重要な役割を担っている可能性が考えられる。

前述のように、IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導は、PI3K/NF-κB 経路に依存する可能性が示唆された。多くの炎症性疾患で NF-κB の活性化や IL-6 産生の亢進が報告されていることから、炎症が起こると過剰な Epiregulin 産生が起こり、炎症を増悪していると考えられる。それでは、定常状態においては Epiregulin の発現を抑制する負のフィードバック機構が存在するのだろうか。がん細胞においては、Epiregulin の発現は Ets-1 によって促進されている[81]が、Ets-1 の転写活性は TGF-β の刺激によって抑制されることが報告されている[98]。TGF-β は、炎症を抑制する抗炎症性サイトカインであることが知られている[99]ことから、定常状態においては TGF-β が Epiregulin 増幅ループの発生を制御しているのかもしれない。最近、全世界の 10 万人以上を対象とした GWAS が実施され、関節リウマチの発症に関わる 101 個の感受性遺伝子領域が同定された[100]。その中には、Ets-1 の一塩基多型（SNP）も含まれており、関節リウマチ患者では Ets-1 の過剰な活性化により、Epiregulin の過剰な産生が誘導されている可能性が考えられる。今後、NF-κB と Ets-1 の関係を調べることで、新たな関節リウマチの発症メカニズム解明と創薬標的の同定につながることが期待される。

本研究の成果から、Epiregulin-EGFR 信号系が自己免疫疾患を含む慢性炎症性疾患の病態に関与する可能性が示唆された。現在、EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤は抗がん剤として使用されているが、適切な投与量と関節内注射といった投与経路の検討及び毒性メカニズムの解明が進めば、自己免疫疾患や動脈硬化等の慢性炎症性疾患の治療薬として使用することができるかもしれない。将来的には、Epiregulin が自己免疫疾患を含む慢性炎症性疾患の新規創薬標的もしくは診断マーカーになる可能性があり、今後、自己免疫疾患患者の滑液や髄液中の Epiregulin 濃度、Epiregulin 阻害剤の有効性及び安全性の既存治療薬との比較等の臨床応用へ向けた知見が注目される。

第６章　結論

IL-6 増幅ループは、血管内皮細胞や線維芽細胞等のＩ型コラーゲン陽性細胞において IL-6 と IL-17 が協調的に作用し、IL-6 やケモカイン等の炎症誘導分子群の産生を相乗的に亢進する現象である。IL-6 増幅ループの活性化によって CCL20 の過剰な発現亢進が起こると、IL-17 の主要な供給源である Th17 細胞が炎症部位に大量に集積して IL-6 増幅ループが暴走し、自己免疫性の F759 関節炎や EAE の発症を誘導する。IL-6 のレセプターに対するヒト化モノクローナル抗体トシリズマブは関節リウマチやキャッスルマン病の治療に効果をあげているものの、日和見感染等の副作用も報告されていることから、IL-6 増幅ループの詳細な分子機構を理解することは自己免疫疾患の病態解明及びより安全な治療法開発を目指す上で重要である。本研究では、IL-6 増幅ループの活性化を亢進する分子の同定を目的とし、I 型コラーゲン陽性細胞における Epiregulin の発現及び機能に着目して解析を行った。

第１節では、血清によって転写レベルで IL-6 増幅ループの活性化が亢進することが明らかとなった。さらに、血清による IL-6 増幅ループの活性化の亢進は、EGFR を介したものであることを阻害剤と shRNA を用いて証明した。また、EGFR のリガンドである EGF や HB-EGF の刺激によって、IL-6 増幅ループの活性化が亢進することも分かった。

第２節では、EGFR のリガンドの中で、Epiregulin の発現のみが IL-6 増幅ループの活性化によって亢進することが明らかとなった。さらに、Epiregulin はＩ型コラーゲン陽性細胞において自身の遺伝子発現を亢進したことから、正のフィードバックループを形成することが分かった。これに加えて、Epiregulin 増幅ループが IL-6 増幅ループの最大限の活性化に必須であることも示された。また、IL-6 と IL-17 によって Epiregulin の mRNA 発現が亢進するが、培養上清中への Epiregulin の分泌には EGFR 信号及び ADAM17 が必要である可能性が示唆された。Epiregulin は IL-6 以外にも、IL-6 の発現に必須である IκBζ や Th17 細胞の誘導に関与する CCL20 の発現も転写レベルで亢進することが示され、ErbB2 や ErbB4 ではなく、EGFR を介して IL-6 増幅ループの活性化を亢

進することが分かった。

第３節では、Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進の分子メカニズムを調べた。Epiregulin は、IL-6 と IL-17 によって誘導される NF-κB サブユニット p65、Akt、ERK1/2 のリン酸化レベルを亢進した。さらに、Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化の亢進は PI3Kα、IKKα、IKKγ 及び p65 に依存していることが明らかとなった。これに加えて、Epiregulin が IL-17 と相乗的に NF-κB のレポーター活性及び IL-6 プロモーター領域における DNA 結合を亢進したこと、In vitro 及び In vivo において Epiregulin による NF-κB のレポーター活性の亢進が PI3K 又は PI3Kα の阻害剤によって抑制されたことから、Epiregulin は PI3Kα/Akt 経路を介して NF-κB の活性化を亢進し、IL-6 増幅ループの活性化を亢進していることが明らかとなった。また、IL-6 増幅ループの活性化による Epiregulin の発現誘導にも PI3K 及び NF-κB が関与する可能性が示唆された。一方で、Epiregulin は STAT3 のリン酸化や STAT3 の標的分子である SOCS3 の発現に影響を与えなかったことから、I 型コラーゲン陽性細胞においては STAT3 信号伝達系に影響しない可能性が示唆された。

第４節では、自己免疫疾患モデルの発症における Epiregulin-EGFR 信号系の役割を調べる目的で、Epiregulin-EGFR 信号系が IL-6 増幅ループ依存性の F759 関節炎及び EAE の発症に関与するか検討を行った。その結果、膝関節の滑膜組織において IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導及び Epiregulin-EGFR 信号系による IL-6 の発現亢進が見られることが分かった。さらに、関節局所における Epiregulin 及び EGFR の遺伝子ノックダウン、中和抗体による Epiregulin の受容体への結合抑制、EGFR のチロシンキナーゼ活性阻害のいずれにおいても、F759 関節炎の発症抑制効果が認められた。さらに、EAE を誘導したマウスでは血清中 Epiregulin 濃度が増加し、EGFR のチロシンキナーゼ活性阻害剤ゲフィチニブによって EAE の発症、脊髄内への Th17 細胞及び Th1 細胞の浸潤が抑制されることが示された。

第５節では、ヒトの滑膜細胞においても IL-6 増幅ループの活性化、IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導及び Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化亢進が起こることを証明した。重要なことに、関節リウマチ、多発性硬化症及び動脈硬化患者の血清中 Epiregulin 濃度は、健常者に比べて有意に高いことが明らかとなった。

以上の結果より、私は、「I 型コラーゲン陽性細胞における IL-6 増幅ループの活性化によって Epiregulin の発現が誘導され、Epireguln は自身の増幅ループを形成してさらに IL-6 増幅ループの活性化を亢進し、自己免疫疾患の発症に寄与する」という新規概念を示した。Epiregulin は PI3Kα/Akt 経路を介して NF-κB の活性化を亢進し、IL-6 増幅ループの活性化を増強する役割を担うことから、Epiregulin の阻害によって自己免疫疾患における過剰な IL-6 産生が正常レベルに戻ることが期待される。IL-6 が B 細胞の増殖など種々の生命現象に重要であることやトシリズマブが日和見感染等の副作用を示すことを考えると、IL-6 の産生及び信号伝達は完全に抑制すべきではないのかもしれない。将来的には、Epiregulin がより副作用の少ない自己免疫疾患の新規創薬標的もしくは診断マーカーになる可能性があり、今後、臨床応用へ向けた知見が注目される。本研究は、自己免疫疾患の発症原因について新規概念を提唱し、新規治療薬の標的分子を提案した点において非常に意義深いものである（Fig. S21、S22）。

第７章　図表及び図表の解説

【Figures】

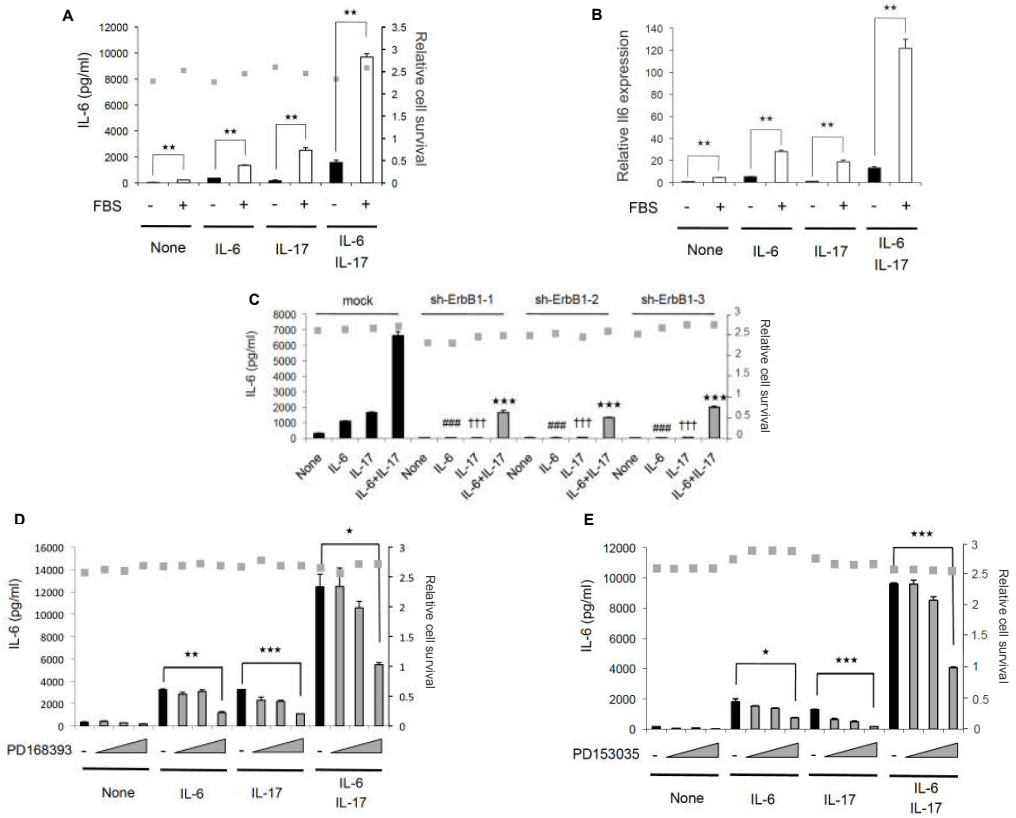

Fig. 1 EGFR 信号の遮断によって、血清存在下における IL-6 増幅ループ活性化の亢進が抑制される

(A、B) BC-1 細胞に血清存在下もしくは非存在下でヒト IL-6（50 ng/ml）、ヒト可溶性 IL-6Rα（sIL-6Rα、50 ng/ml）及びマウス IL-17（50 ng/ml）を処理し、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中のマウス IL-6 濃度を、MTT 試験により細胞の生存を測定した（A）。刺激後 2 時間 の Il6 mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した（B）。

(C) BC-1 細胞に非標的配列の shRNA 又は Erbb1 に特異的な shRNA を導入し、ノックダウン安定株を作製した。血清存在下で IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）を処理し、24 時間後に ELISA を用いて培養上

清中の IL-6 濃度を、MTT 試験により細胞の生存を測定した。
(D、E) BC-1 細胞に DMSO 又は PD168393 (D; 0.1、1、10 μM) 又は PD153035（E; 0.1、1、10 μM） を血清存在下で 30 分前処理し、IL-6 (50 ng/ml)、sIL-6Rα（50 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）で刺激して、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を、MTT 試験により細胞の生存を測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。(⋆P< 0.05、

⋆⋆P< 0.01、⋆⋆⋆ ###, †††P< 0.001)

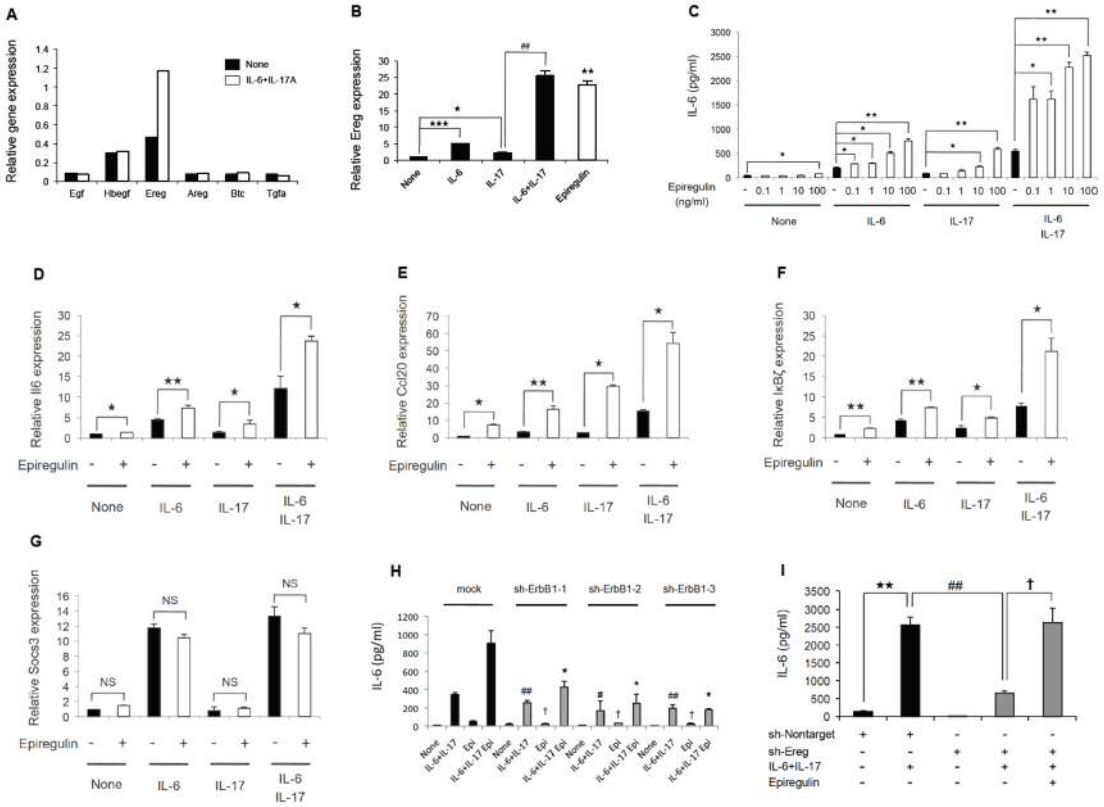

Fig. 2 IL-6 と IL-17 によって誘導された Epiregulin が正のフィードバックループを形成し、さらに IL-6 増幅ループの活性化を増強する

(A) BC-1 細胞に IL-6 (100 ng/ml)、sIL-6Rα (100 ng/ml) 及び IL-17 (50 ng/ml) を処理し、3 時間後に RNA を回収して DNA microarray を行った。

(B) BC-1 細胞に IL-6（50 ng/ml)、sIL-6Rα（50 ng/ml)、IL-17 (50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、3 時間後に RNA を回収して Ereg mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

(C)BC-1 細胞に IL-6（50 ng/ml)、sIL-6Rα（50 ng/ml)、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（0.1、1、10、100 ng/ml）を処理し、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

(D-G）BC-1 細胞に IL-6（50 ng/ml)、sIL-6Rα（50 ng/ml)、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin (100 ng/ml) を処理し、1 時間後に RNA を回収して IκBζ mRNA 発現量（F）を、3 時間後に RNA を回収して Il6（D)、Ccl20（E)、Socs3（G）の mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

(H、I) BC-1 細胞に非標的配列の shRNA、Erbb1（H）又は Ereg（I）に特異的

な shRNA を導入し、ノックダウン安定株を作製した。IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、24 時間後（H）又は 48 時間後（I）に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。（★ #, †P< 0.05、★★ ##P< 0.01、★★★P< 0.001、NS: 有意差なし）

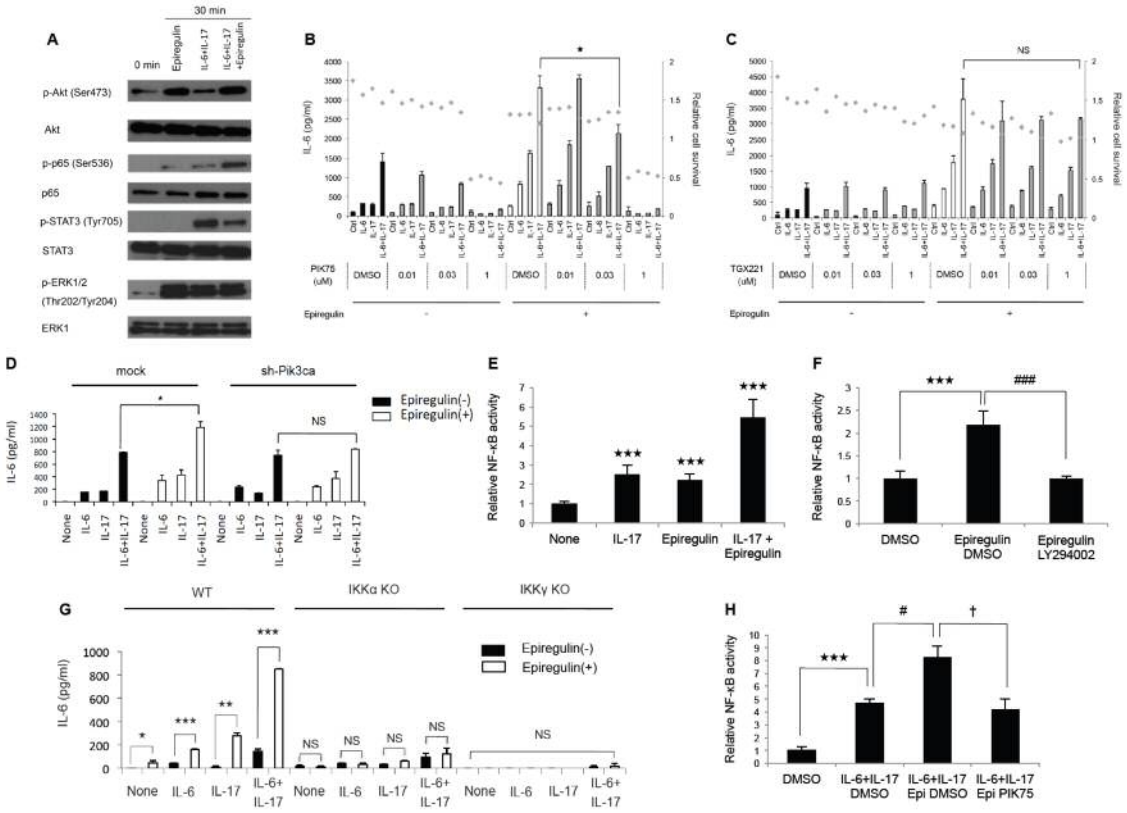

Fig. 3 Epiregulin は PI3Kα/Akt 経路を介して NF-κB の活性化を亢進することで、IL-6 増幅ループの活性化を亢進する

(A) MEF 細胞に IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を 30 分処理した後、細胞を溶解して SDS-PAGE でタンパク質を分離し、図に示した抗体でそれぞれのタンパク質量を検出した。
(B、C) BC-1 細胞に DMSO、PIK75（B; 0.01、0.03、1 μM）又は TGX221（C; 0.01、0.03、1 μM）を 30 分前処理し、IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）で刺激して、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を、MTT 試験により細胞の生存を測定した。
(D) BC-1 細胞に非標的配列の shRNA 又は Pik3ca に特異的な shRNA を導入して一過性のノックダウンを行った後、IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。
(E) Hela 細胞に 5 × NF-κB luciferase reporter gene と pRL-TK を遺伝子導入し、48 時間後にヒト IL-17（50 ng/ml）及びヒト Epiregulin（50 ng/ml）で 5

時間刺激して、NF-κB レポーター活性を測定した。

(F) BC-1 細胞に 5 × NF-κB luciferase reporter gene と pRL-TK を遺伝子導入し、48 時間後に DMSO 又は LY294002 (3 μM) を 30 分前処理して、Epiregulin（100 ng/ml）で 5 時間刺激後の NF-κB レポーター活性を測定した。

(G) 野生型、IKKα KO 及び IKKγ KO MEF 細胞に IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、12 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

(H) NF-κB reporter Tg/F759 マウスの踵関節腔に IL-6（100 ng）、IL-17（100 ng）、Epiregulin（200 ng）及び DMSO 又は PIK75（5 μg）を 1 日 1 回 3 日間連続で注入し、3 日目に踵関節の滑膜組織を回収して NF-κB レポーター活性を測定した（n=6）。

データは Means±SD（B-G）又は Means±SEM（H）で示し、有意差について t 検定により検証した。(★ #, †P< 0.05、★★P< 0.01、★★★ ###P< 0.001、NS: 有意差なし)

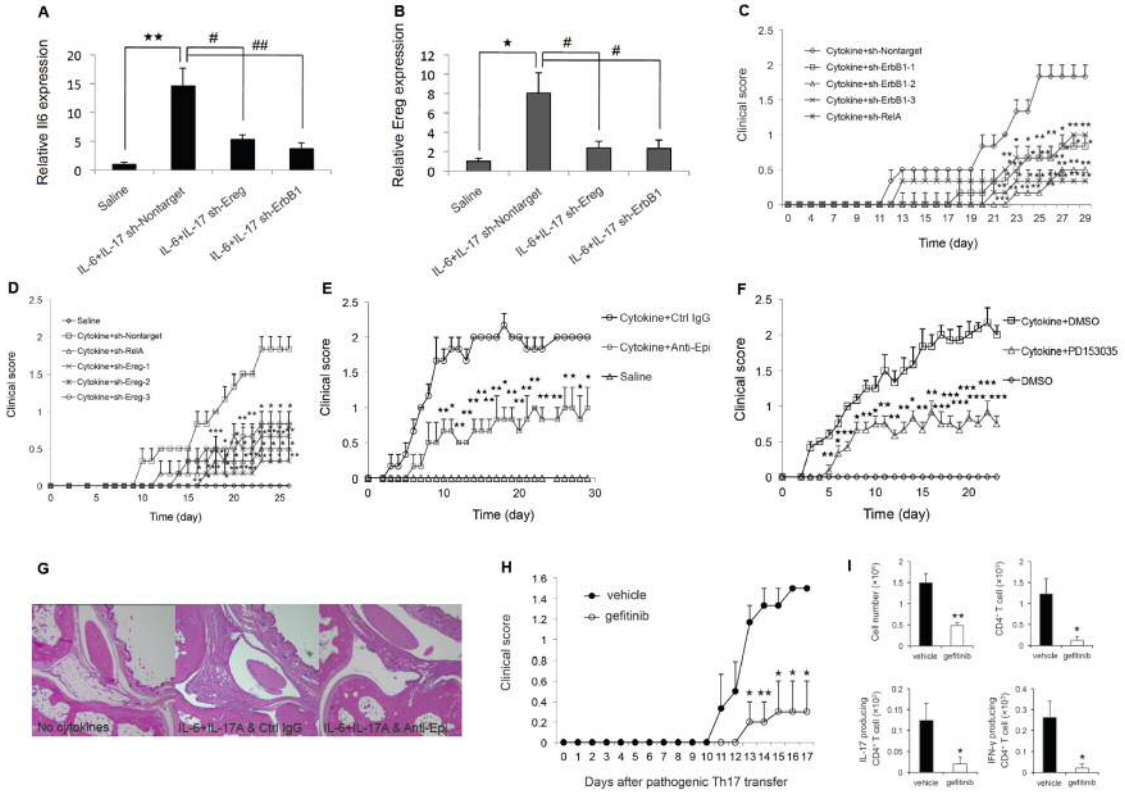

Fig. 4 Epiregulin-EGFR 信号系は自己免疫疾患モデルの発症に重要である

（A、B）非標的配列の shRNA 又は Erbb1 及び Ereg に特異的な shRNA を F759 マウスの膝関節腔に第 0、2、4 日目に注入（3.6 × 10^5 TU/dose）することで、膝関節局所での遺伝子ノックダウンを行った。第 6、7、8 日目に IL-6（100 ng）及び IL-17（100 ng）を膝関節腔に注入し、第 15 日目に膝関節の滑膜組織を回収して Il6（A）及び Ereg（B）の mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した（n=6）。

(C、D) 非標的配列の shRNA 、NF-κB p65（RelA）に特異的な shRNA 又は 3 種類の Erbb1（C）及び Ereg（D）に特異的な shRNA を F759 マウスの踵関節腔に第 0、2、4 日目に注入（3.6 × 10^5 TU/dose）することで、踵関節局所での遺伝子ノックダウンを行った。その後、第 6、7、8 日目に Saline、IL-6（100 ng）及び IL-17（100 ng）を踵関節腔に注入することで関節炎の発症を誘導し、各個体について関節炎のスコアリングを行った（n=3）。

(E、G) F759 マウスの踵関節腔に Saline、IL-6（100 ng）、IL-17（100 ng）及びコントロール IgG（1 μg/dose）又は Epiregulin 中和抗体（1 μg/dose）を 1

日 1 回 3 日間連続で注入した。その後、抗体を 2 週間毎日踵関節腔に注入し、各個体について関節炎のスコアリングを行った（E; n=3）。第 14 日目の踵関節を回収してパラフィン切片（10 μm）を作製後、HE 染色し、組織学的解析を行った（G）。

(F) F759 マウスの踵関節腔に Saline、IL-6（100 ng）、IL-17（100 ng）及び DMSO 又は PD153035（10 μg/dose）を 1 日 1 回 3 日間連続で注入した。その後、DMSO 又は PD153035 を毎日踵関節腔に注入し、各個体について関節炎のスコアリングを行った（n=5）。

(H、I) 野生型のマウスに、EAE を誘導したマウスから単離した MOG 特異的な Th17 細胞（8×10^6 cells/mouse）を静脈内注射した。その後、7 日間毎日 DMSO 又は gefitinib（5 mg/dose）の腹腔内投与を行い、各個体について EAE のスコアリングを行った(H)。MOG 特異的な Th17 細胞を移入後 13 日目のマウスの脊髄から単核細胞を単離し、細胞数を計測した。その後、MOG ペプチドをパルスした樹状細胞と共培養を行い、24 時間後に CD4 陽性 T 細胞における IL-17 及び IFN-γ の産生レベルについて細胞内サイトカイン解析を行った（n=5）。

データは Means±SEM で示し、有意差について t 検定により検証した。(⋆ #P< 0.05、⋆⋆ ##P< 0.01、⋆⋆⋆P< 0.001)

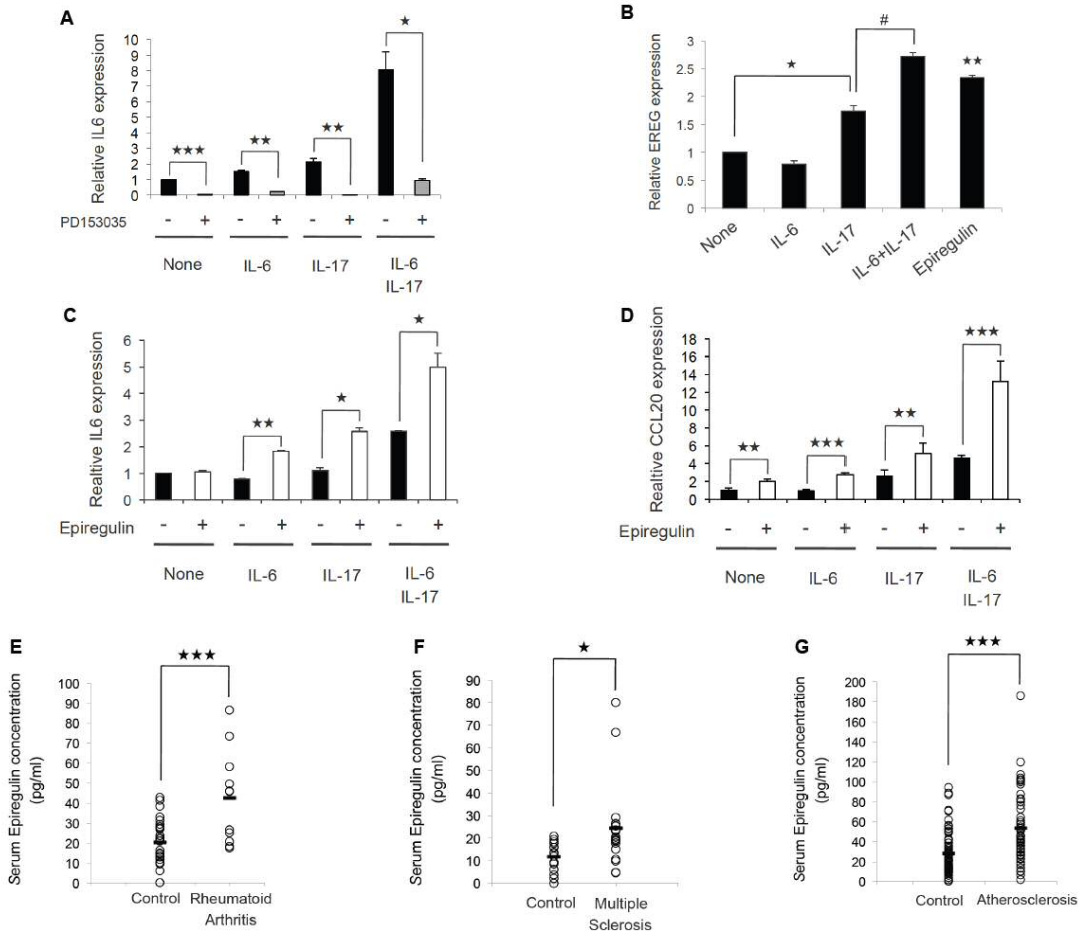

Fig. 5 Epiregulin はヒトの非免疫系細胞において IL-6 増幅ループの活性化を亢進し、関節リウマチ、多発性硬化症及び動脈硬化患者の血清中で高値を示す

(A) ヒトの線維芽細胞様滑膜細胞に、血清存在下で PD153035（10 μM）を 30 分前処理し、ヒト IL-6（50 ng/ml）、ヒト sIL-6Rα（50 ng/ml）及びヒト IL-17（50 ng/ml）で刺激して、3 時間後の IL-6 mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

(B-D) ヒトの線維芽細胞様滑膜細胞に、血清非存在下で IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、3 時間後の EREG（B）、IL6（C）及び CCL20（D）の mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

(E-G) 関節リウマチ患者（E; n=11）、多発性硬化症患者（F; n=21）、動脈硬化

患者（G; n=50）及び年齢と性別を一致させた健常者（E; n=26、F; n=15、G; n=64）の血清中 Epiregulin 濃度を Multiplex suspension array によって測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。（★ #$P<0.05$、★★$P<0.01$、★★★$P<0.001$）

【Table】

Synergy effect with IL-6 and/or IL-17

Inducible	Non-inducible	
Epiregulin	PDGF-CC	cAMP
EGF	FGF7	Bradykinin
HB-EGF	PLGF2	CGRP
Amphiregulin	Tenascin C	VIP
Betacellulin	IGF-2	Periostin
TGF-α	VEGF-CC	Progesterone
FGF2	IFN-β	Urotensin II
IGF-1	IL-1α	α-MSH
VEGF-AA	IL-27 p28	Neuroligin1
TNF-α	TGF-β1	Neurokinin A
IFN-γ	TGF-β2	PUFA
IL-1β	TGF-β3	S1P
Epinephrine	S100A8	
Norepinephrine	C1q	
Dopamine	Acetylcholine	
ATP	Serotonin	
Prostaglandin E2	GABA	

Table 1 可溶性分子の IL-6 又は IL-17 との相乗効果誘導性の評価

(Left) BC-1 細胞において、IL-6 又は IL-17 と相乗的に IL-6 産生を亢進した可溶性分子。

(Middle, Right) BC-1 細胞において、IL-6 又は IL-17 との相乗的な IL-6 産生亢進が見られなかった可溶性分子。

【Supplementary Figures】

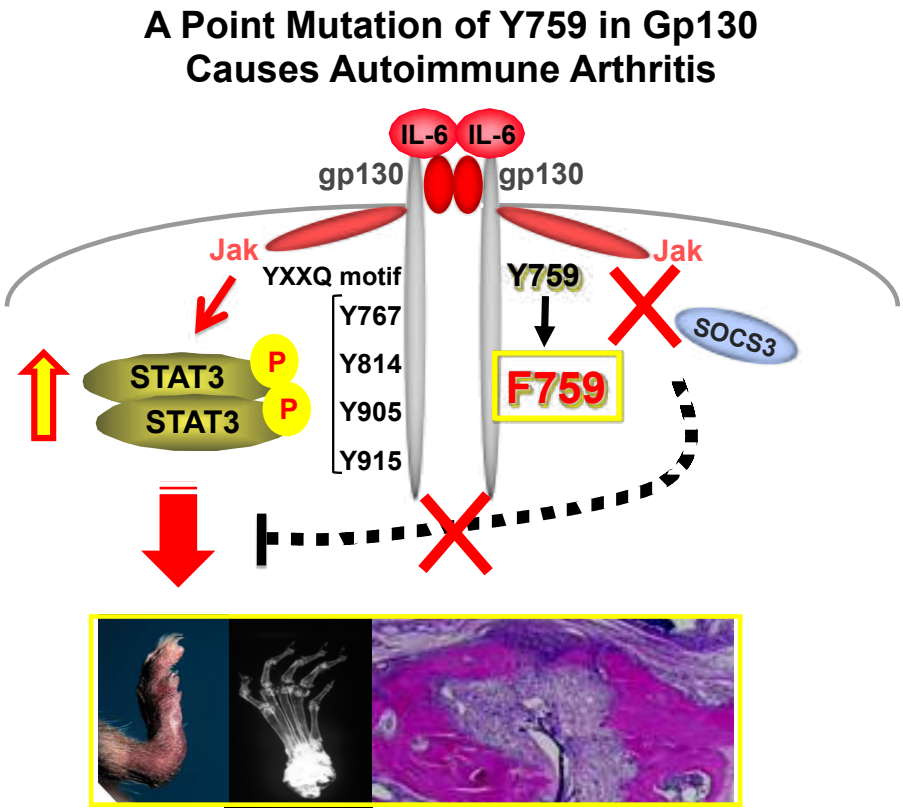

Fig. S1 F759 関節炎の模式図

gp130 に F759 変異を導入したマウスでは、SOCS3 による STAT3 活性化のネガティブフィードバックが阻害され、生後 1 年以内に自己免疫性の関節炎が自然発症する。*(Immunity. 2000., J Exp Med. 2002.)*

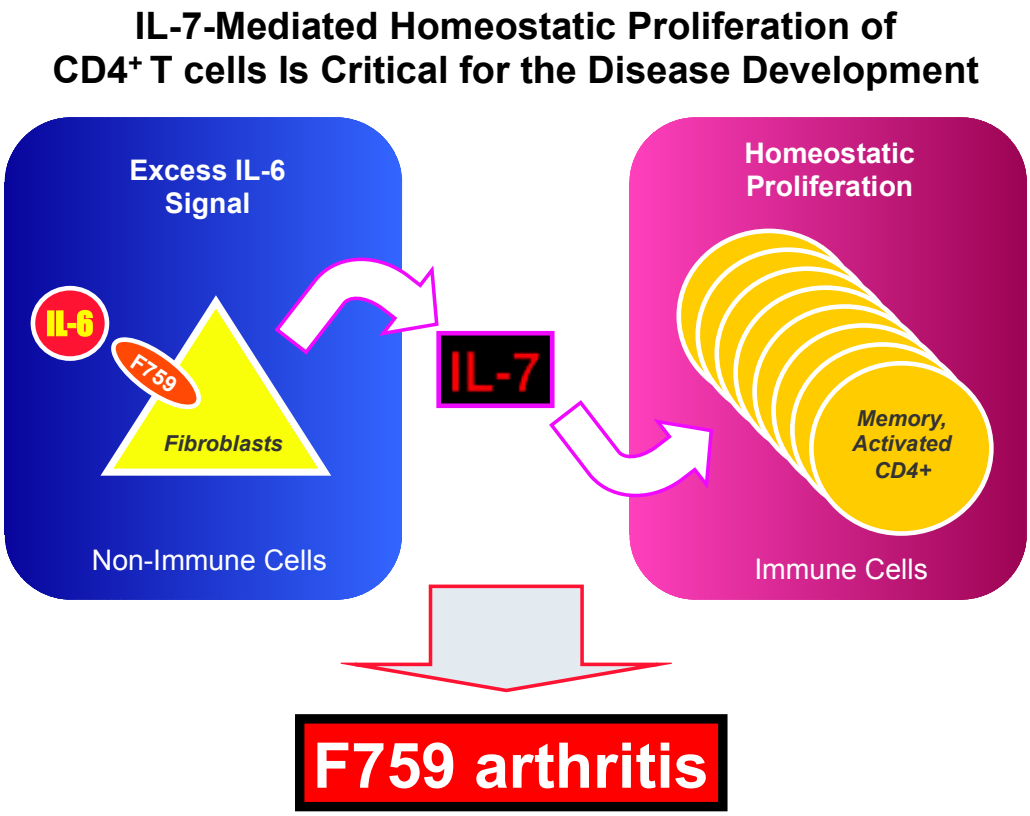

Fig. S2 非免疫系細胞における F759 変異が関節炎の発症に重要である

非免疫系細胞における F759 変異によって過剰に産生された IL-7 が CD4 陽性 T 細胞の恒常的増殖を引き起こし、F759 関節炎を発症させる。*(J Exp Med. 2006.)*

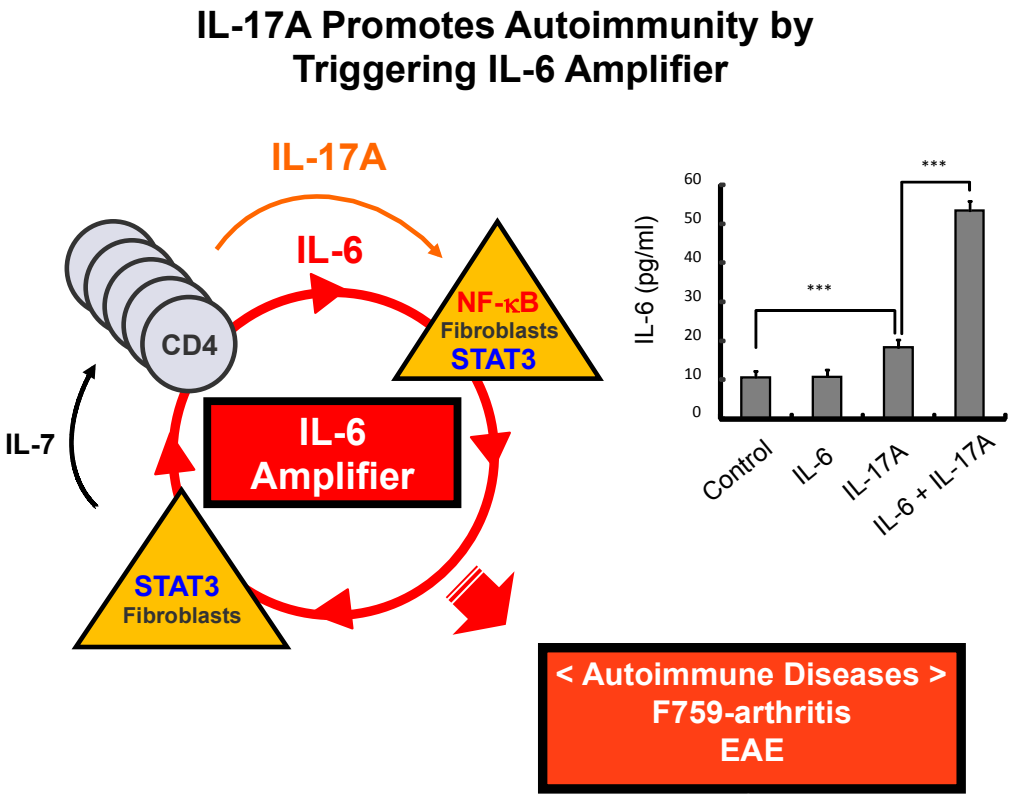

Fig. S3 IL-6 増幅ループの模式図

CD4 陽性 T 細胞由来の IL-17 が線維芽細胞に働くと IL-6 産生が誘導され、その IL-6 が IL-17 と協調的に働いて相乗的な IL-6 及びケモカイン産生の亢進を引き起こし、F759 関節炎及び多発性硬化症モデル EAE の発症を誘導する。

(Immunity. 2009.)

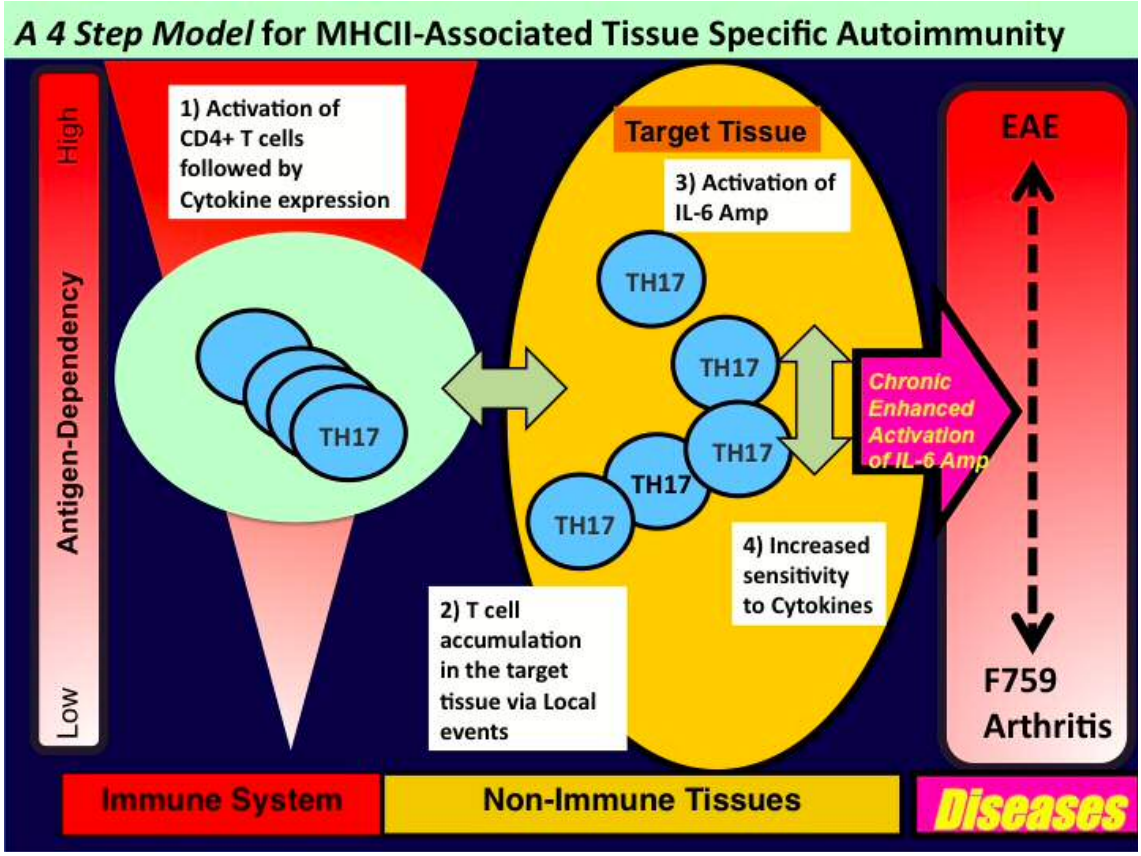

Fig. S4 MHC クラス II 拘束性の組織特異的自己免疫疾患発症の 4 ステップモデル

1）CD4 陽性 T 細胞の活性化、2）活性化 CD4 陽性 T 細胞の標的臓器への集積、3）標的臓器での一過性の IL-6 増幅ループの活性化、4）標的臓器の T 細胞由来サイトカイン感受性の亢進 *(J Exp Med. 2011., Nat Rev Immunol. 2011.)*

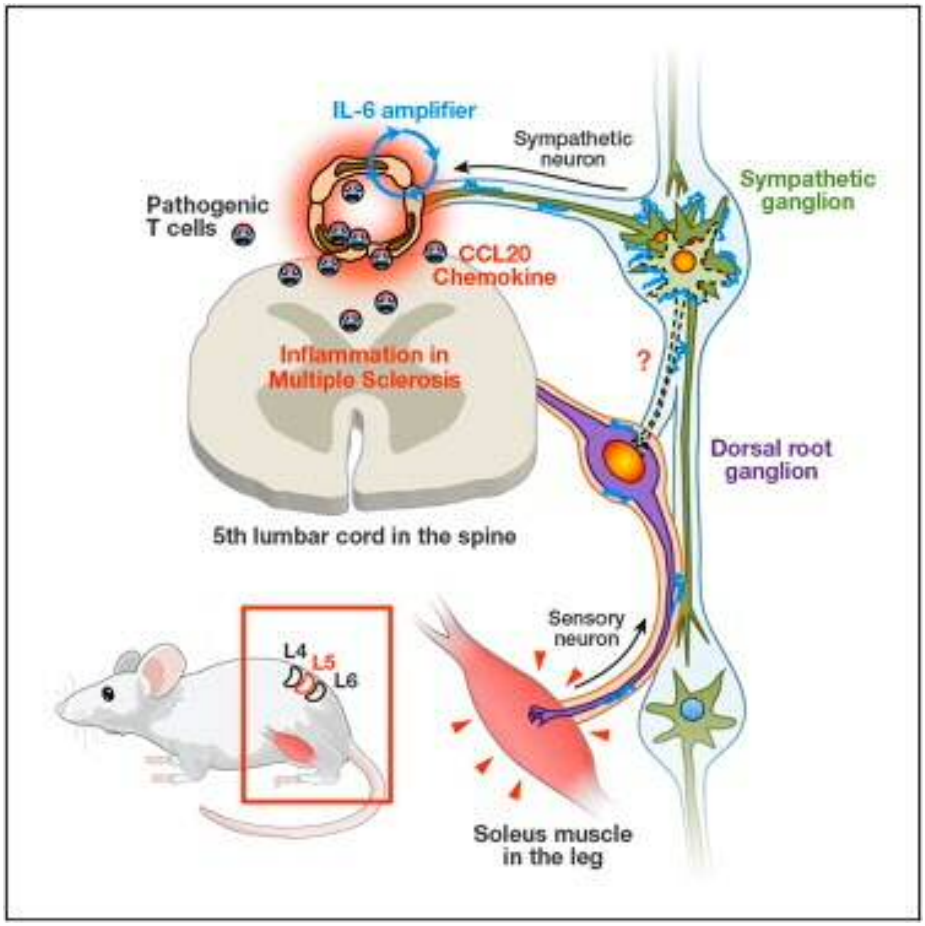

Fig. S5 局所的な神経の活性化が、血液脳関門における病原性 T 細胞の通過ゲートを形成する

重力によるヒラメ筋の活性化が感覚神経を刺激し、第５腰椎（L5）に繋がる交感神経の活性化を誘導する。交感神経の末端から放出されるノルアドレナリンは、L5背側の血管の血管内皮細胞においてIL-6増幅ループを過剰に活性化させ、ケモカインCCL20の産生を誘導し免疫細胞を引き寄せる。血液中に病原性のCD4陽性 T 細胞が存在すると、L5背側の血管から脊髄内に侵入し、神経を覆う髄鞘を破壊することで、多発性硬化症等の中枢神経系炎症性疾患が発症する。（*Cell. 2012., Nat Rev Neurosci. 2012.*）

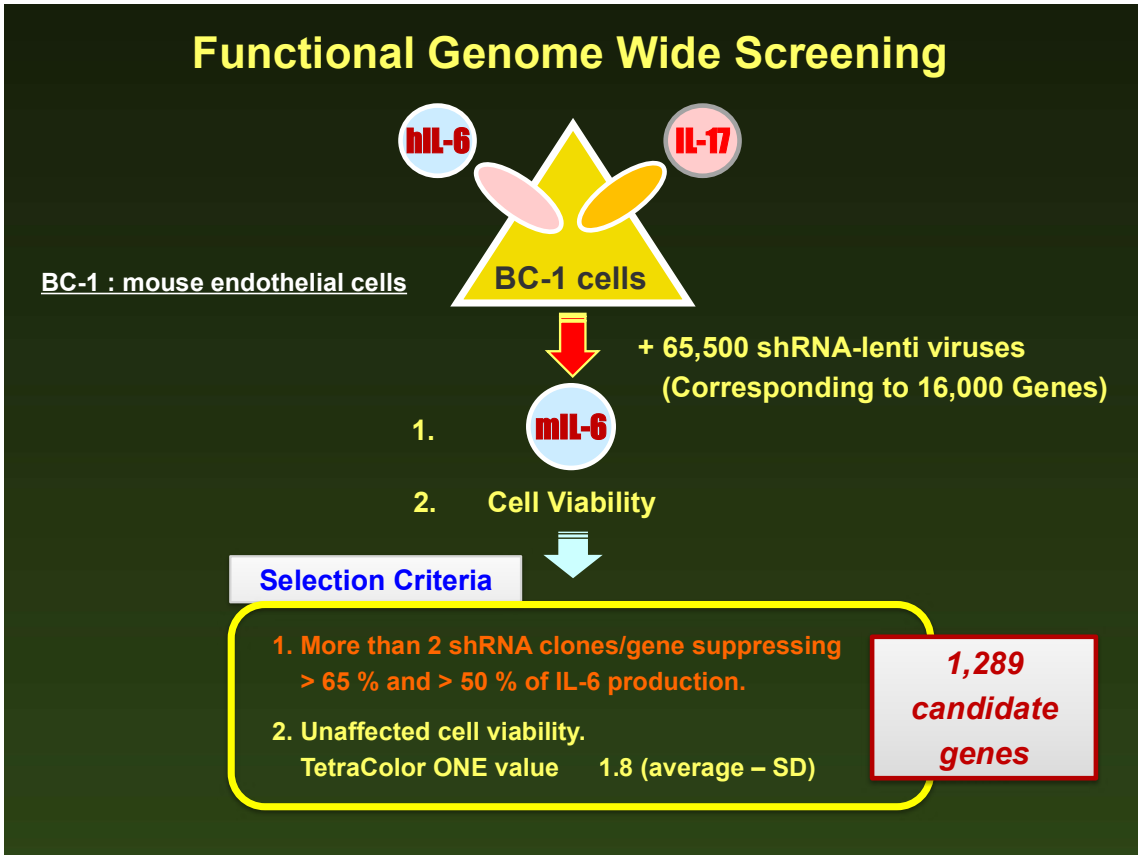

Fig. S6 ゲノムワイドスクリーニングの概略図

65,500 種類の shRNA ライブラリー（約 16,000 個のマウス遺伝子に相当）を用いて BC-1 細胞における一過性の遺伝子ノックダウンを行い、IL-6+IL-17 刺激誘導性の IL-6 産生及び細胞の生存を評価した結果、IL-6 増幅ループを制御する候補遺伝子を 1,289 個同定した。*(Cell Rep. 2013.)*

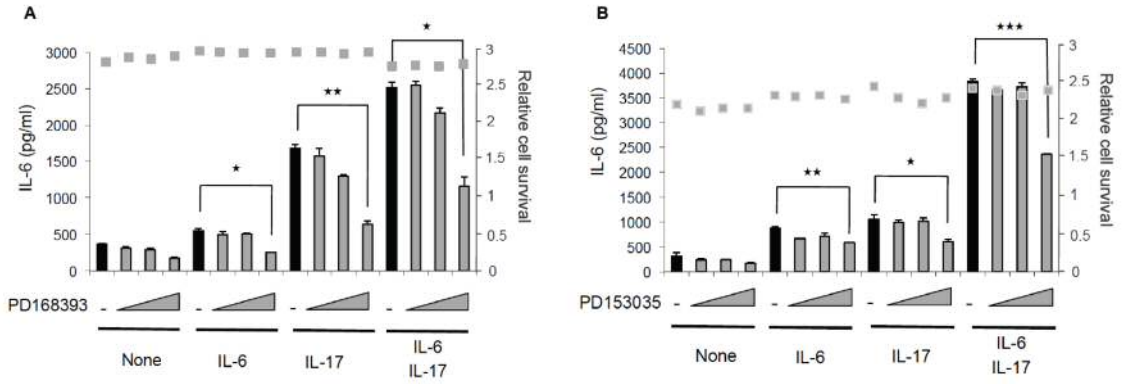

Fig. S7 MEF 細胞においても EGFR 信号の遮断により IL-6 増幅ループ活性化が抑制される （Fig. 1D 及び 1E に関連）

(A、B) MEF 細胞に DMSO 又は PD168393 (A; 0.1、1、10 μM) 又は PD153035 （B; 0.1、1、10 μM） を血清存在下で 30 分前処理し、IL-6 (50 ng/ml)、sIL-6Rα （50 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）で刺激して、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を、MTT 試験により細胞の生存を測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。(⋆P< 0.05、⋆⋆P< 0.01、⋆⋆⋆P< 0.001)

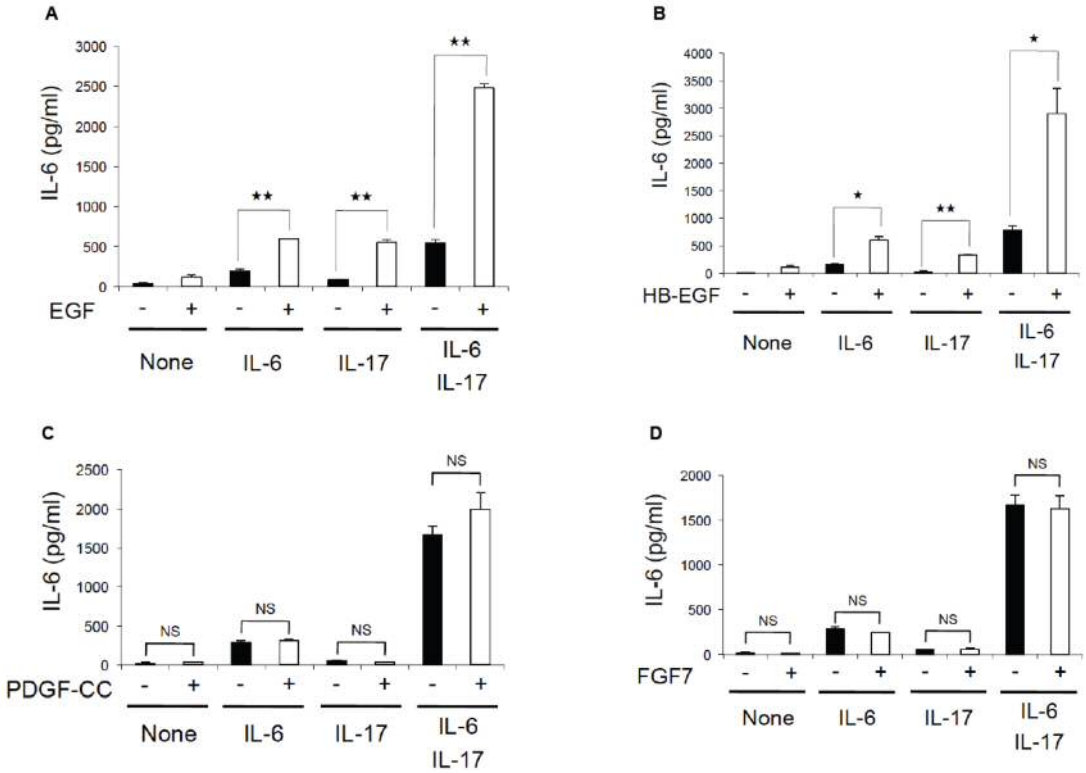

Fig. S8 EGFR のリガンドによる IL-6 増幅ループ活性化の亢進

（A-D） BC-1 細胞を IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）、EGF（A; 100 ng/ml）、HB-EGF（B; 100 ng/ml）、PDGF-CC（C; 100 ng/ml）及び FGF7（D; 100 ng/ml）で刺激し、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。（⋆P< 0.05、

⋆⋆P< 0.01、NS: 有意差なし）

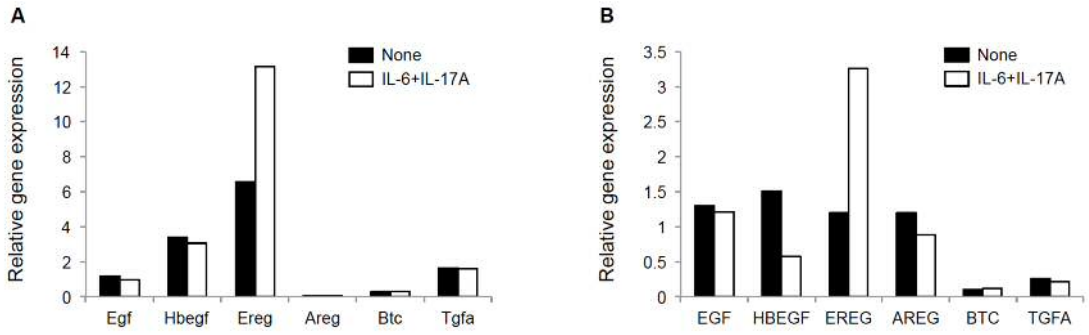

Fig. S9 IL-6 と IL-17 による Epiregulin の発現誘導（Fig. 2B に関連）
(A、B) W26 細胞 (A) 及びヒト線維芽細胞様滑膜細胞 (B) に IL-6 (100 ng/ml)、sIL-6Rα（100 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）を処理し、3 時間後に RNA を回収して DNA microarray を行った。

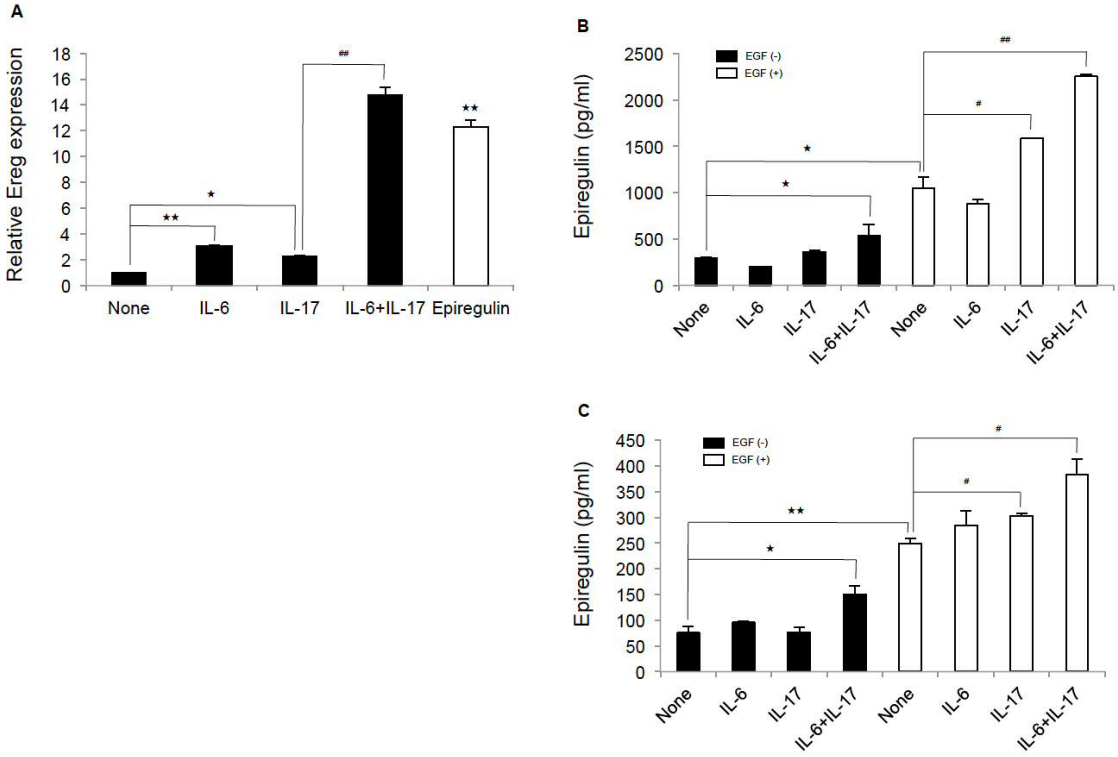

Fig. S10 IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導（Fig. 2B に関連）

(A) MEF 細胞に血清非存在下で IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、3 時間後に RNA を回収して Ereg mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

(B、C) BC-1 細胞（B）及び MEF 細胞（C）に IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び EGF（100 ng/ml）を処理し、48 時間後に ELISA を用いて培養上清中の Epiregulin 濃度を測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。（⋆　#P< 0.05、⋆⋆　##P< 0.01）

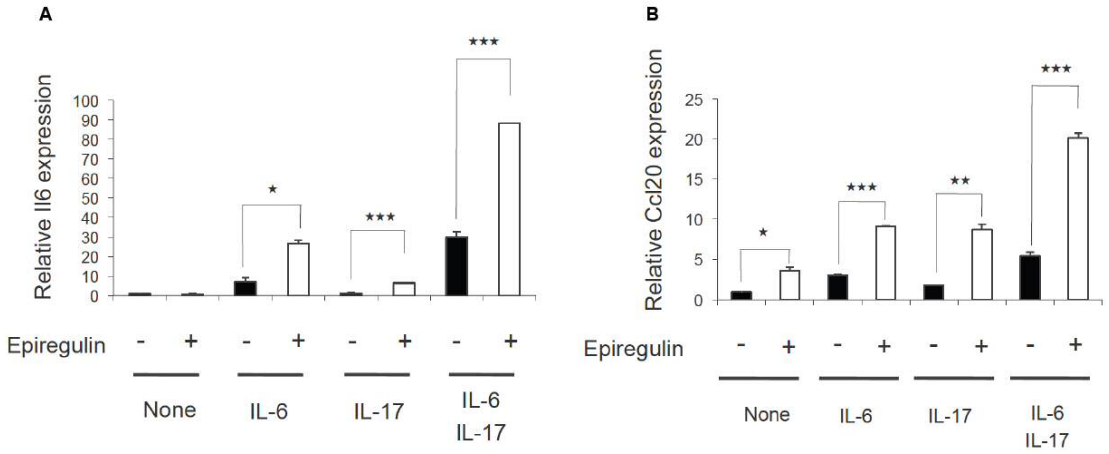

Fig. S11 Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化の亢進（Fig. 2D、2E に関連）

(A、B) MEF 細胞に IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、3 時間後に RNA を回収して Il6（A）及び Ccl20（B）の mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。(*P< 0.05、**P< 0.01、***P< 0.001)

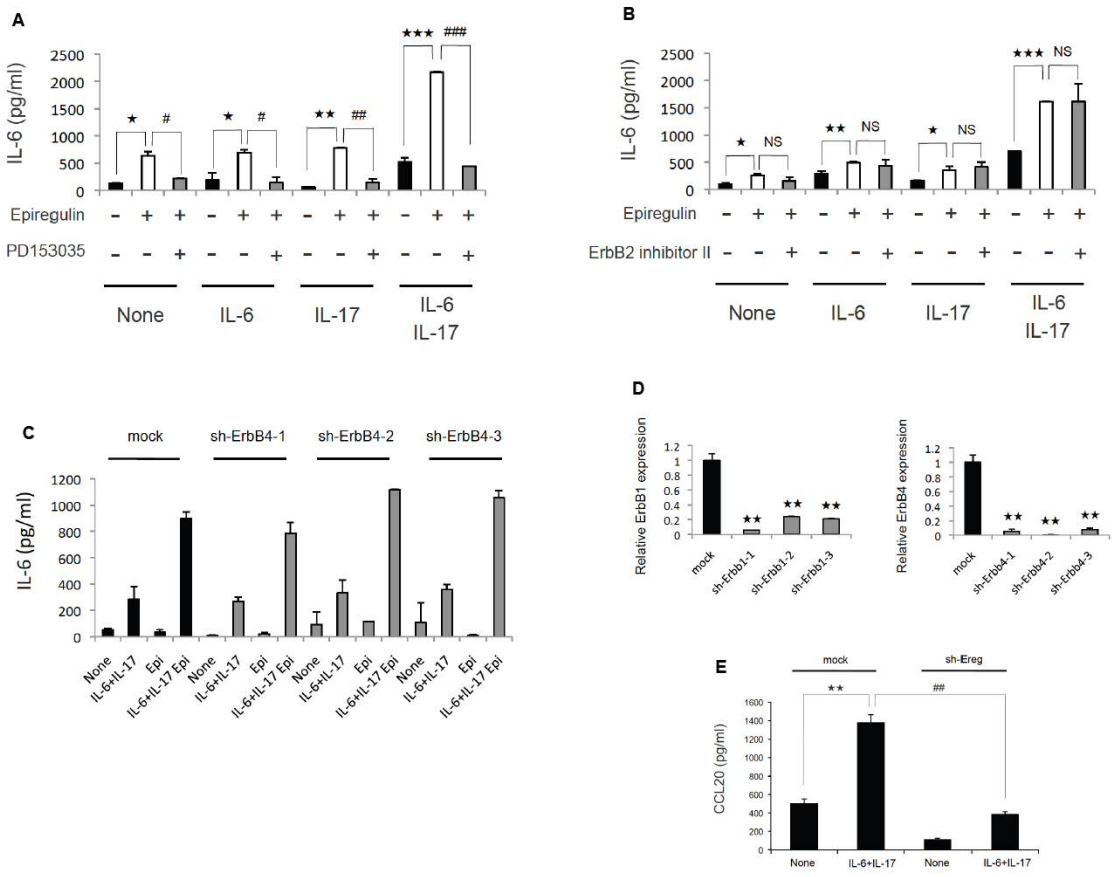

Fig. S12 Epiregulin による IL-6 増幅ループの活性化の亢進には、ErbB2 及び ErbB4 ではなく、EGFR（ErbB1）が関与する（Fig. 2 に関連）

(A、B）BC-1 細胞に DMSO 又は PD153035（A; 10 μM)、ErbB2 inhibitorII（B; 10 μM）を 30 分前処理し、IL-6（50 ng/ml)、sIL-6Rα（50 ng/ml)、IL-17 (50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）で刺激して、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

(C) BC-1 細胞に非標的配列の shRNA 又は Erbb4 に特異的な shRNA を導入し、ノックダウン安定株を作製した。IL-6（50 ng/ml)、sIL-6Rα（50 ng/ml)、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

(D)Real-time PCR により、Fig. 2H 及び S12C で用いた細胞のノックダウン効率を調べた。

(E）BC-1 細胞に非標的配列の shRNA 又は Ereg に特異的な shRNA を導入し、

ノックダウン安定株を作製した。IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）を処理し、48 時間後に ELISA を用いて培養上清中の CCL20 濃度を測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。（⋆　#$P<$ 0.05、⋆⋆　##$P<$ 0.01、⋆⋆⋆　###$P<$ 0.001、NS: 有意差なし）

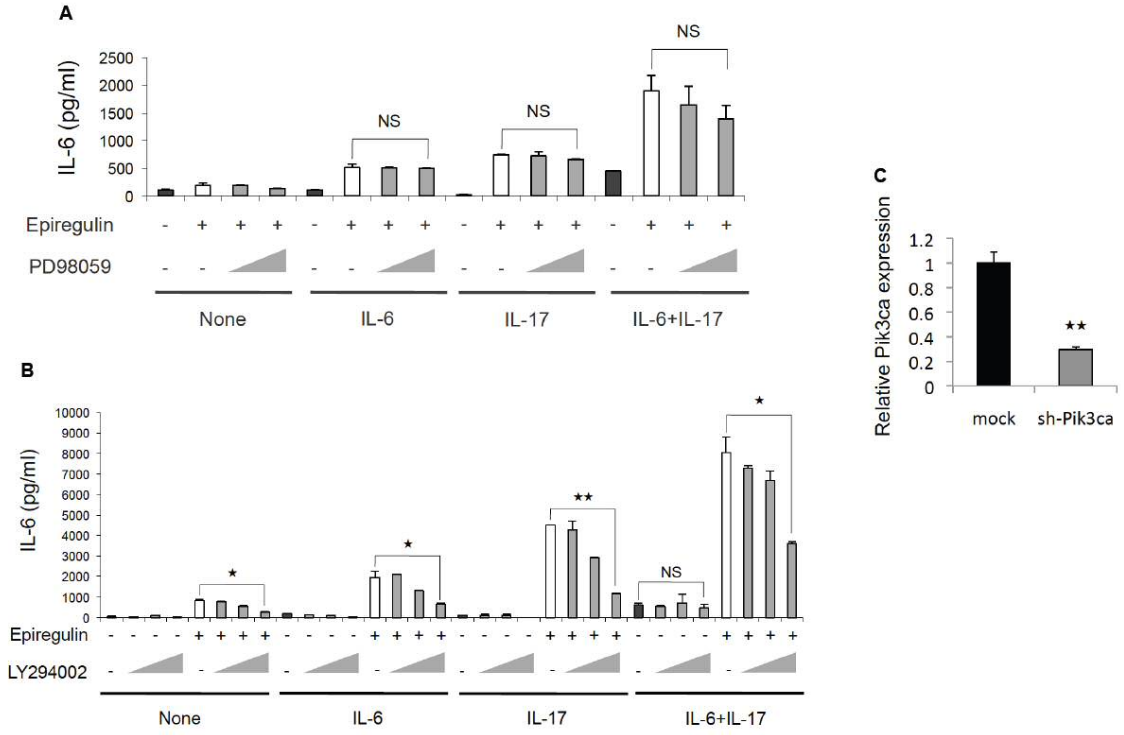

Fig. S13 Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化の亢進における PI3K の関与（Fig. 3 に関連）

(A、B）BC-1 細胞に DMSO、PD98059（A; 10、30 μM）又は LY294002 （B; 0.3、1、3 μM）を 30 分前処理し、IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）、IL-17（50 ng/ml）及び Epiregulin（100 ng/ml）で刺激して、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

(C) Real-time PCR により、Fig. 3D で用いた細胞のノックダウン効率を調べた。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。(⋆P< 0.05、⋆⋆P< 0.01、NS: 有意差なし）

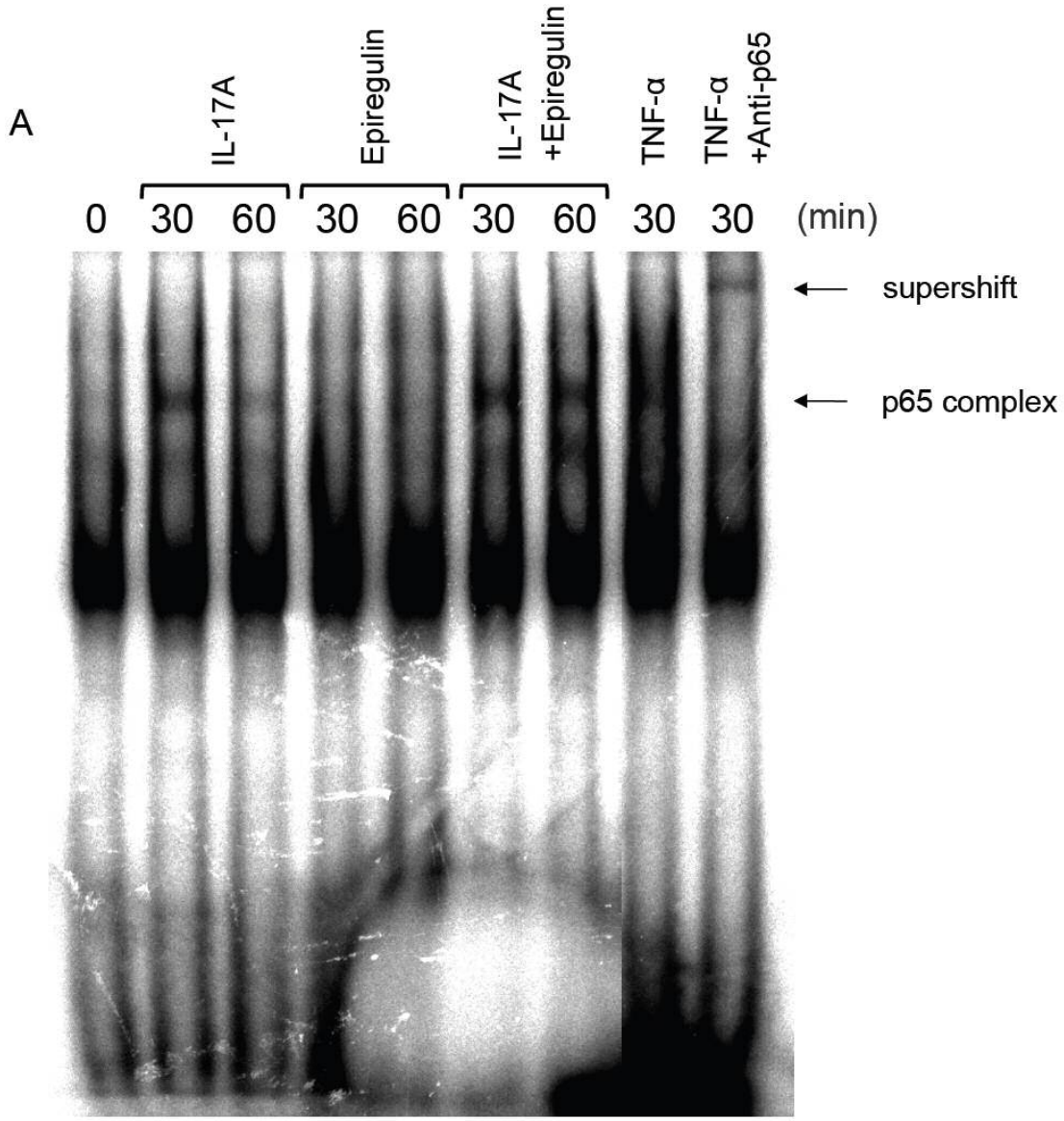

Fig. S14 Epiregulin は、IL-17 による NF-κB p65 の IL-6 プロモーター領域への結合を亢進する （Fig. 3 に関連）

(A) BC-1 細胞に IL-17（50 ng/ml）、Epiregulin（100 ng/ml）又は TNF-α（50 ng/ml）を処理し、30 分後、60 分後に核画分を抽出した。^{32}P で標識した IL-6 プロモーター領域の NF-κB 結合配列と核抽出液を反応させ、EMSA を行った。抗 p65 抗体の処理によりバンドのスーパーシフトが確認された。

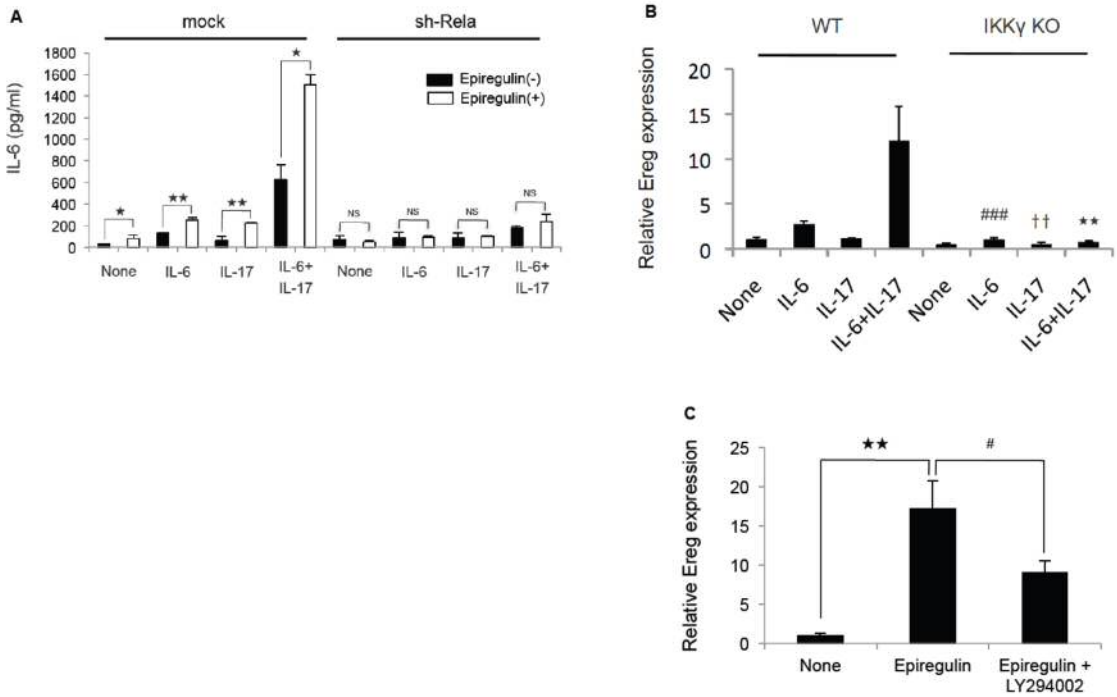

Fig. S15 Epiregulin による IL-6 増幅ループ活性化の亢進及び IL-6 増幅ループによる Epiregulin 増幅ループの誘導における PI3K/NF-κB 経路の関与 （Fig. 3 に関連）

(A) BC-1 細胞に非標的配列の shRNA 又は RelA に特異的な shRNA を導入し、ノックダウン安定株を作製した。IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）を処理し、24 時間後に ELISA を用いて培養上清中の IL-6 濃度を測定した。

(B) 野生型及び IKKγ KO MEF 細胞に IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）を処理し、3 時間後に RNA を回収して Ereg mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

(C) BC-1 細胞に DMSO 又は LY294002 （3 μM）を 30 分前処理し、Epiregulin（100 ng/ml）を処理し、3 時間後に RNA を回収して Ereg mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。（★ $^{\#}P<0.05$、★★ $^{\dagger\dagger}P<0.01$、$^{\#\#\#}P<0.001$、NS: 有意差なし）

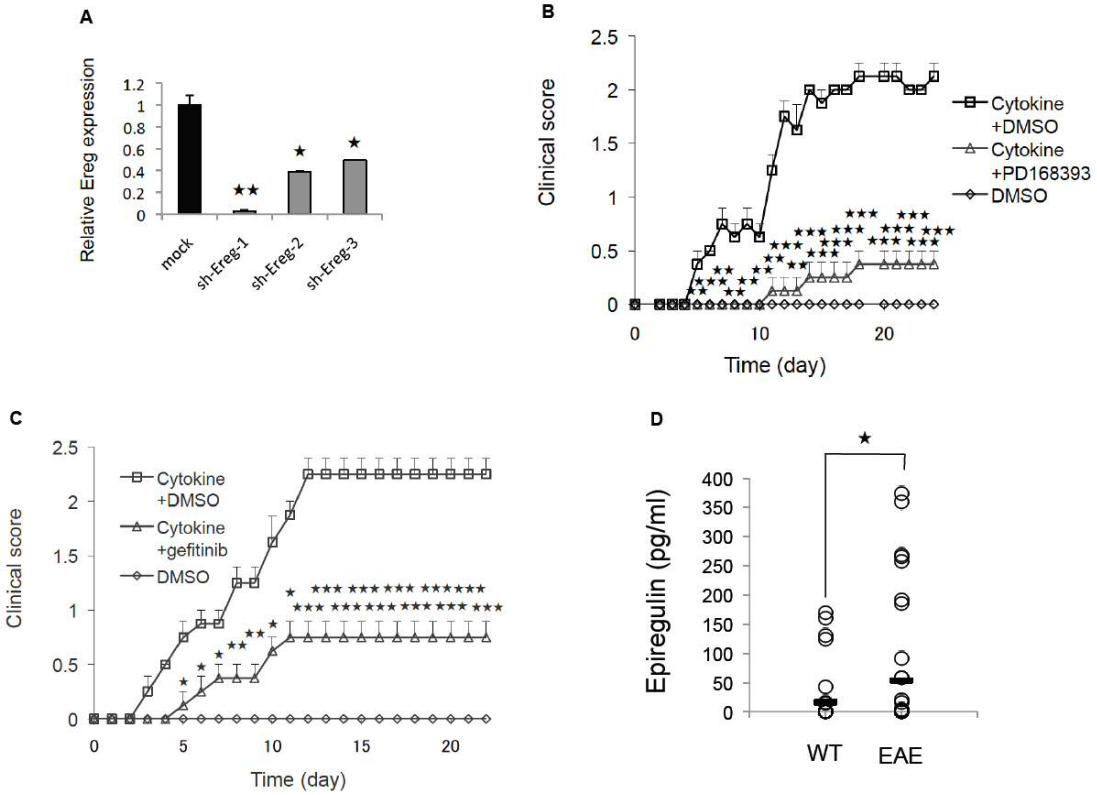

Fig. S16 自己免疫疾患モデル発症における Epiregulin-EGFR 信号系の関与 （Fig. 4 に関連）

(A) Real-time PCR により、Fig. 4D で用いた Ereg shRNA のノックダウン効率を調べた。

(B、C) F759 マウスの踵関節腔に Saline、IL-6（100 ng）、IL-17（100 ng）及び DMSO（B; n=5、C; n=4）、PD168393（B; 10 µg/dose、n=5）又は gefitinib（C; 10 µg/dose、n=4）を 1 日 1 回 3 日間連続で注入した。その後、DMSO、PD168393 又は gefitinib を毎日踵関節腔に注入し、各個体について関節炎のスコアリングを行った。

(D) 野生型のマウスに MOG 特異的な Th17 細胞を移入し、第 13 日目に ELISA を用いて血清中 Epiregulin 濃度を測定した（n=40）。

データは Means±SEM で示し、有意差について t 検定により検証した。(⋆P <

0.05、⋆⋆P< 0.01、⋆⋆⋆P< 0.001）

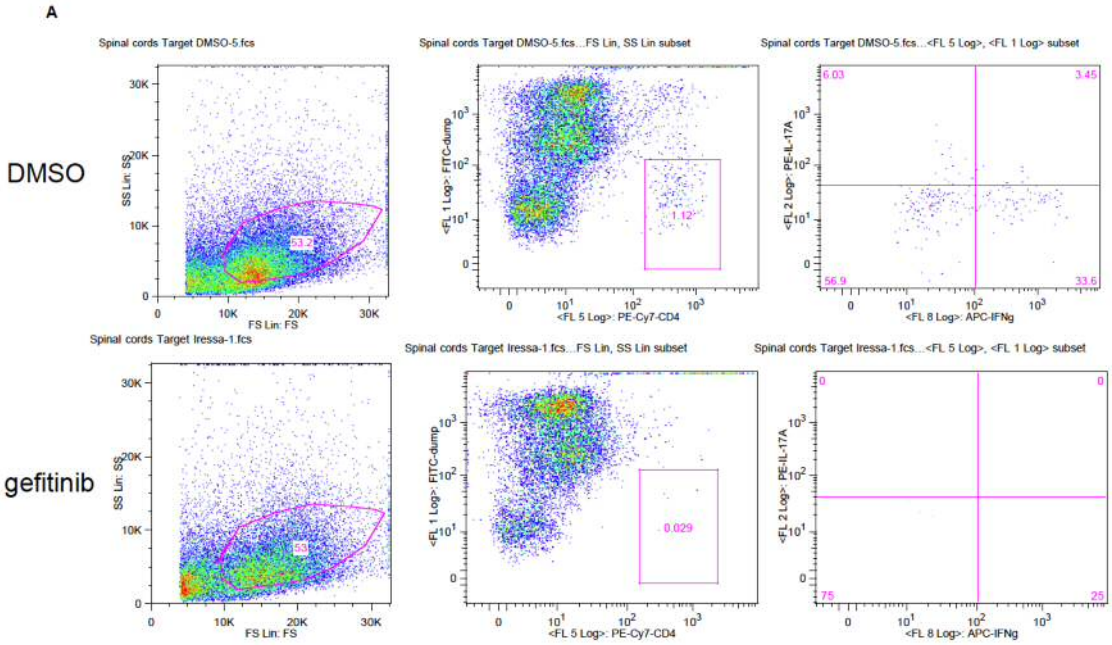

Fig. S17 EAE マウスの脊髄内に浸潤した CD4 陽性 T 細胞の細胞内サイトカイン解析　（Fig. 4I に関連）

(A) MOG 特異的な Th17 細胞を移入後 13 日目のマウスの脊髄から単核細胞を単離し、MOG ペプチドをパルスした樹状細胞と 24 時間共培養を行った。その後 CD4 陽性 T 細胞における IL-17 及び IFN-γ の産生レベルについて細胞内サイトカイン解析を行った（n=5）。

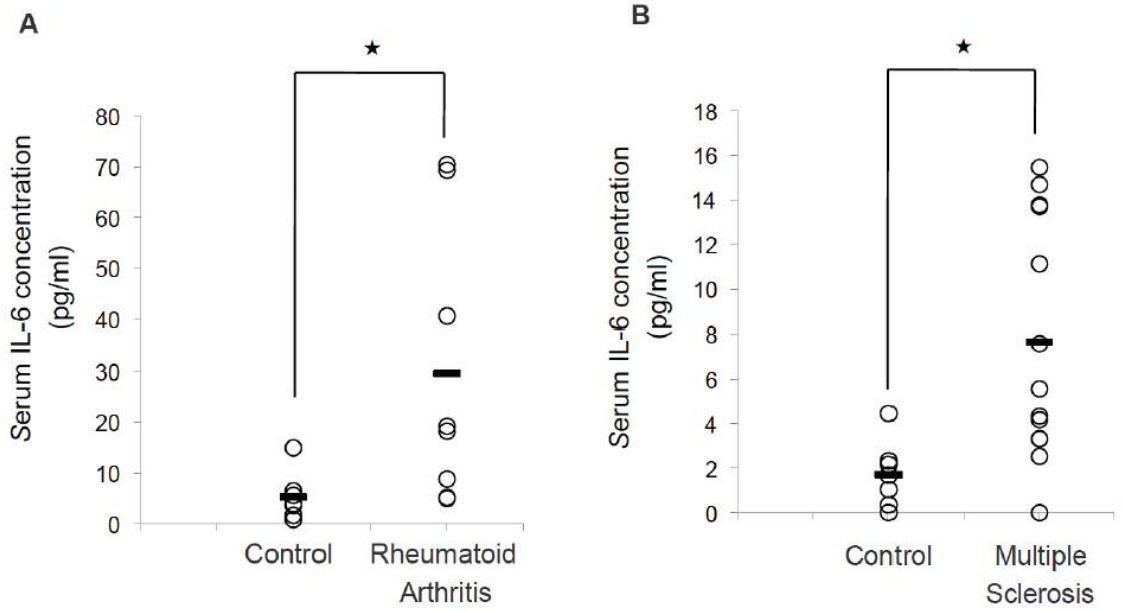

Fig. S18 本研究で用いた関節リウマチ及び多発性硬化症患者の血清中 IL-6 濃度の測定 （Fig. 5 に関連）

（A、B）関節リウマチ患者（A; n=8）、多発性硬化症患者（B; n=13）及び年齢と性別を一致させた健常者（A; n=7、B; n=7）の血清中 IL-6 濃度を Multiplex suspension array によって測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。（★P< 0.05）

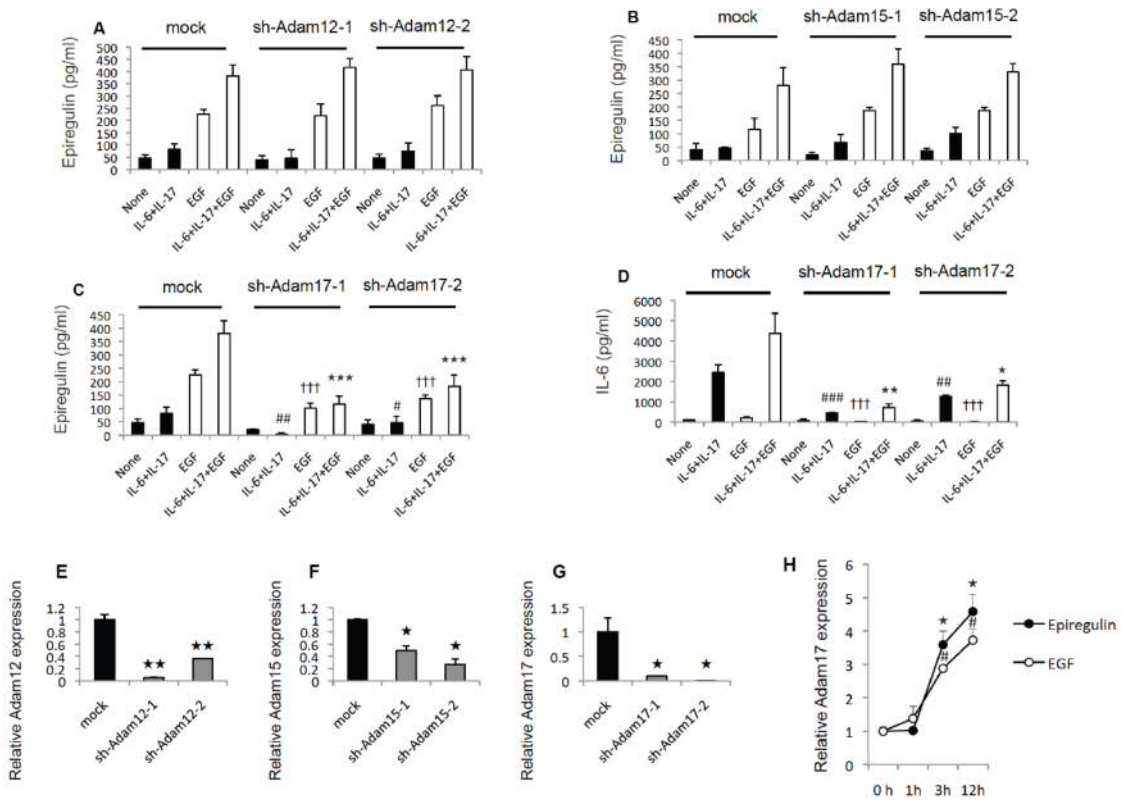

Fig. S19 Epiregulin の分泌及び IL-6 増幅ループの活性化における ADAM17 の関与

(A-D) BC-1 細胞に非標的配列の shRNA 及び Adam12（A)、Adam15（B）又は Adam17（C、D）に特異的な shRNA を導入し、ノックダウン安定株を作製した。IL-6 (50 ng/ml)、sIL-6Rα (50 ng/ml)、IL-17 (50 ng/ml) 及び EGF (100 ng/ml) を処理し、48 時間後に ELISA を用いて培養上清中の Epiregulin（A-C）及び IL-6（D）の濃度を測定した。

(E-G)Real-time PCR により、Fig. S19A-S19D で用いた細胞のノックダウン効率を調べた。

(H) BC-1 細胞に Epiregulin（100 ng/ml）又は EGF（100 ng/ml）を処理し、１、３及び 12 時間後に RNA を回収して Adam17 mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。(⋆ #$P<$ 0.05、⋆⋆ ##$P<$ 0.01、⋆⋆⋆ ###, †††$P<$ 0.001)

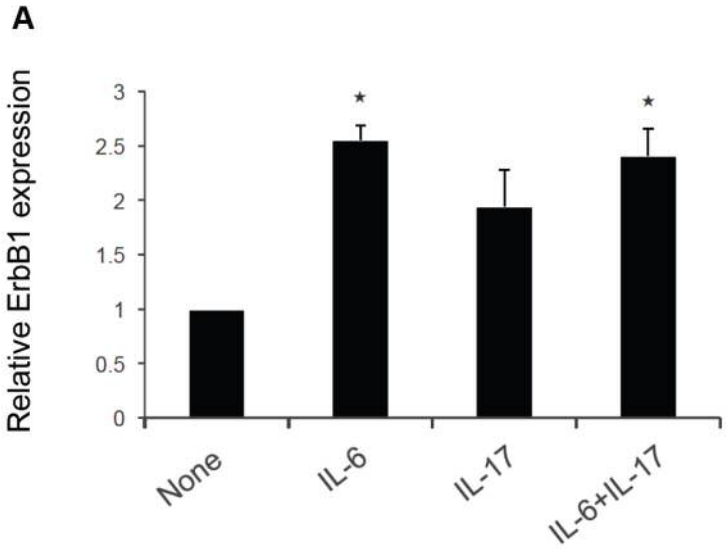

Fig. S20 BC-1 細胞において IL-6 は EGFR の発現を亢進する

(A) BC-1 細胞に IL-6（50 ng/ml）、sIL-6Rα（50 ng/ml）及び IL-17（50 ng/ml）を処理し、3 時間後に RNA を回収して Erbb1 mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。

データは Means±SD で示し、有意差について t 検定により検証した。(⋆P< 0.05)

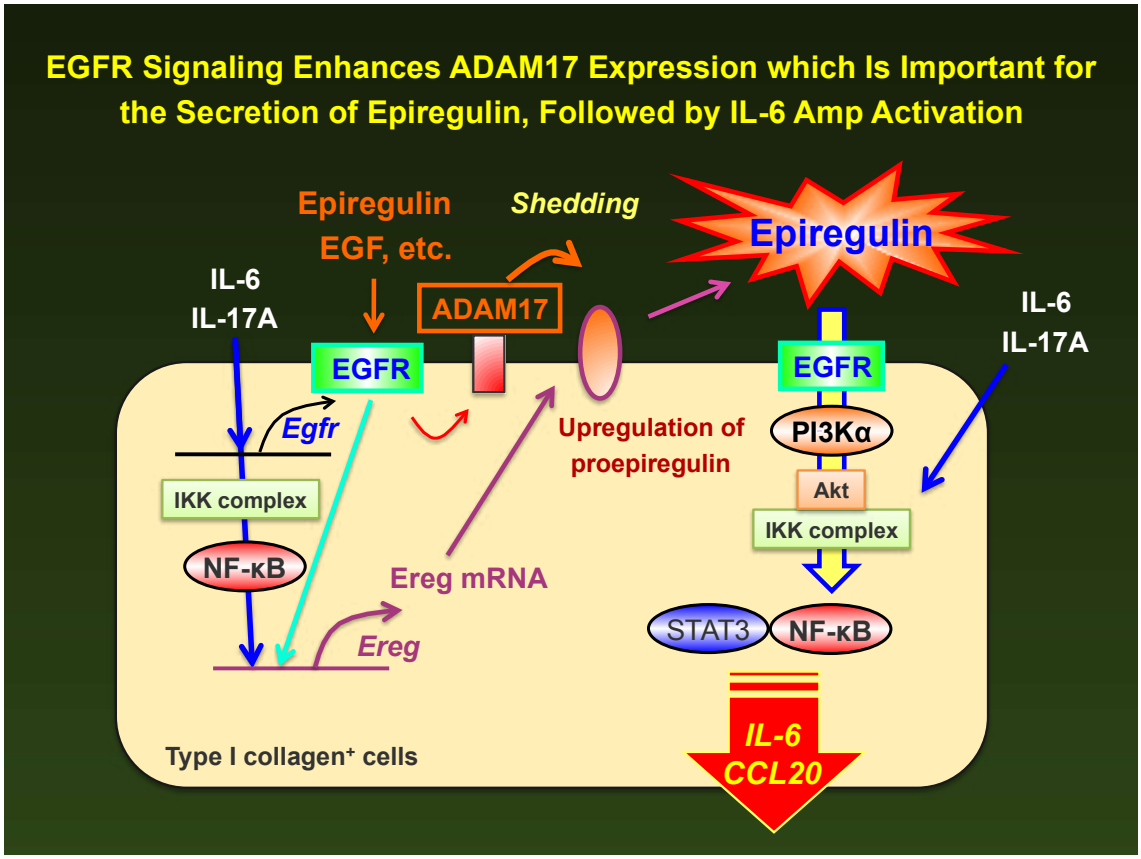

Fig. S21 Epiregulin が IL-6 増幅ループの活性化を亢進するメカニズムの模式図

I 型コラーゲン陽性細胞に IL-6 と IL-17 の刺激が加わると、EGFR 及び Epiregulin の発現が亢進し、細胞膜上の proepiregulin が増加する。EGFR のリガンドの刺激により、細胞膜上の ADAM17 の発現が亢進すると、細胞膜上の proepiregulin が切断され、Epiregulin が分泌される。Epiregulin は EGFR を介して PI3Kα/NF-κB 経路を活性化し、IL-6 及び IL-17 と相乗的に IL-6 や CCL20 等の炎症誘導分子群の産生を亢進する。

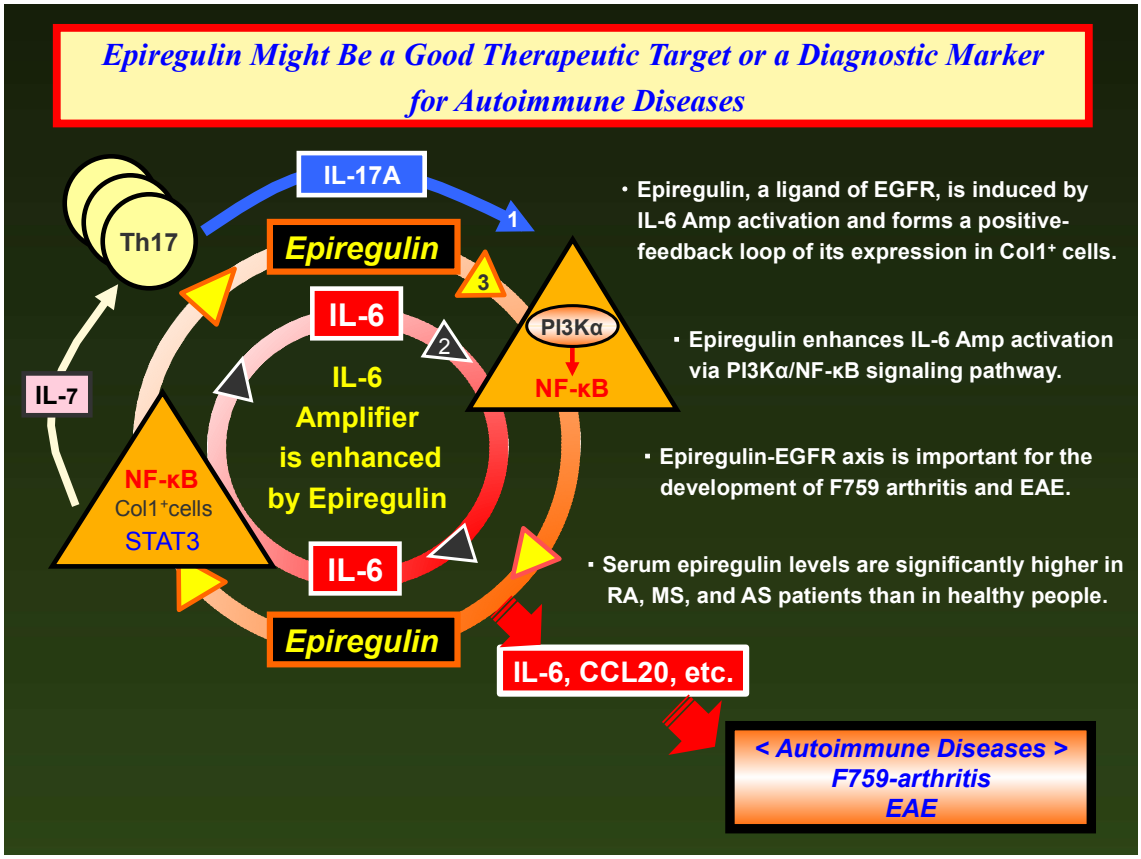

Fig. S22 自己免疫疾患発症における Epiregulin-EGFR 信号系の役割

(1) CD4 陽性 T 細胞由来の IL-17 によって、I 型コラーゲン陽性細胞における IL-6 増幅ループが活性化する。(2) IL-6 増幅ループは、I 型コラーゲン陽性細胞における Epiregulin の産生を誘導し、Epiregulin は正のフィードバックループを形成する。(3) Epiregulin は、PI3Kα を介して NF-κB の活性化を亢進することで、IL-6 及び IL-17 と相乗的に IL-6 や CCL20 等の産生を亢進し、炎症を増悪させる。

Epiregulin-EGFR 信号系は、F759 関節炎モデル及び多発性硬化症モデル EAE の発症に重要であり、関節リウマチ、多発性硬化症及び動脈硬化患者では、血清中 Epiregulin 濃度が高値を示す。

謝辞

本研究に際し、終始多大なる御指導、御鞭撻を賜りました 大阪大学大学院生命機能研究科/医学系研究科/免疫学フロンティア研究センター免疫細胞生物学研究室 石井優 教授、村上正晃 准教授、上村大輔 特任助教、小椋英樹 助教に深甚なる感謝の意を表します。

本研究科入学当初から 2 年 4 ヶ月間、指導教授として多大なる御指導、御鞭撻を賜りました 大阪大学 平野俊夫 総長に甚謝致します。

本研究に際し、IKKα 及び IKKγ を欠損した MEF 細胞を御供与頂き、さらに本論文の審査にあたって有益なる御助言と御校閲を賜りました 大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学研究室/微生物病研究所自然免疫学分野 審良静男 教授に深謝致します。

本論文の審査にあたって有益なる御助言と御校閲を賜りました 大阪大学免疫学フロンティア研究センター糖鎖免疫学研究室/微生物病研究所免疫不全疾患研究分野 木下タロウ 教授に深謝致します。

本論文の審査にあたって有益なる御助言と御校閲を賜りました 大阪大学免疫学フロンティア研究センター/微生物病研究所分子免疫制御分野 菊谷仁 教授に深謝致します。

本研究に際し、BC-1 細胞を御供与頂きました 大阪大学未来戦略機構 宮坂昌之 特任教授に深謝致します。

本研究に際し、関節リウマチ患者及び健常者の血清試料を御供与頂きました東京医科歯科大学医学部附属病院 宮坂信之 病院長、東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科 上阪等 教授に深謝致します。

本研究に際し、動脈硬化患者及び健常者の血清試料を御供与頂きました 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学/保健センター 瀧原圭子 教授、西田誠 准教授に深謝致します。

本研究に際し、多発性硬化症患者及び健常者の血清試料を御供与頂きました大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 中辻裕司 講師、免疫制御学 木下允助教に深謝致します。

本研究に際し、終始有益なる御指導と御助言を賜りました 大阪大学大学院生命機能研究科/医学系研究科/免疫学フロンティア研究センター免疫細胞生物学研究室の皆様、旧免疫発生学研究室の皆様、理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター旧サイトカイン制御研究グループの皆様に心から厚く御礼申し上げます。

最後に、ここまで私を育て支えてくれた両親、家族に心から感謝します。

本研究は、日本学術振興会特別研究員奨励費（11J00819）、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業（JST-CREST）及び大阪臨床免疫学研究奨励会の助成を受けたものです。

参考文献

1. Charles A J. Paul T. Mark W. et al. Immunobiology –The immune system in hearth and disease- 5th Edition. Garland Publishing. (2003).
2. Palmer E. Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. Nat Rev Immunol. 3, 383-91 (2003).
3. Anderton SM and Wraith DC. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. Nat Rev Immunol. 2, 487-98 (2002).
4. Miller JF. The golden anniversary of the thymus. Nat Rev Immunol. 11, 489-95 (2011).
5. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol.7, 145-73 (1989).
6. Esensten JH, Wofsy D, Bluestone JA. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 5, 560-5 (2009).
7. Infante-Duarte C. et al. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. J Immunol. 165, 6107-15 (2000).
8. Chen Dong. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat Rev Immunl. 8, 337-48 (2008).
9. Cua DJ. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature. 421, 744-8 (2003).
10. Komiyama Y et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 177, 566-73 (2006).
11. Nakae S. et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. J Immunol. 171, 6173-7 (2003).
12. Harrington LE. et al. Interleukin 17-producing CD4+effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 6, 1123-32 (2005).
13. Park H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol. 6, 1133-41 (2005).
14. Reboldi A et al. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of T_H-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. Nat Immunol. 10, 514-23 (2009).
15. Ransohoff RM. Immunology: In the beginning. Nature. 462, 41-2 (2009).

16. Rouvier E. et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. J Immunol. 150, 5445-56 (1993).
17. Yao Z. et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. Immunity. 3, 811–821 (1995).
18. Fossiez F. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J Exp Med. 183, 2593–2603 (1996).
19. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. J Leukoc Biol. 71, 1-8 (2002).
20. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity. 21, 467-76 (2004).
21. Weaver CT. et al. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. Annu Rev Immunol. 25, 821-52 (2007).
22. Gaffen SL. Structure and signaling in the IL-17 receptor family. Nat Rev Immunol. 9, 556-67 (2009).
23. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature. 423, 356-361 (2003).
24. Isaacs JD. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? Nat Rev Immunol. 10, 605-611 (2010).
25. Mclnnes IB and Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol. 7, 429-42 (2007).
26. Burmester GR. et al. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 10, 77-88 (2014).
27. Melton L. and Coombs A. Actemra poised to launch IL-6 inhibitors. Nat Biotechnol. 26, 957-9 (2008).
28. Nishimoto N. and Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. Nat Clin Pract Rheumatol. 2, 619-26 (2006).
29. Hirano T. et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature. 324, 73-76 (1986).
30. Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 86, 717-30 (2010).
31. Ishihara K. and Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. Cytokine Growth Factor Rev. 13, 357-68 (2002).

32. Langley R. FIXTURE oral presentation at EADV. (2013).
33. Campbell L. et al. Risk of adverse events including serious infections in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. Rheumatology (Oxford). 50, 552-62 (2011).
34. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. Int Rev Immunol. 16, 249-84 (1998).
35. Ohtani T. et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. Immunity. 12, 95-105 (2000).
36. Atsumi T. et al. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. J Exp Med. 196, 979-990 (2002).
37. Sawa S. et al. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7–dependent homeostatic proliferation of $CD4^+$ T cells. J Exp Med. 203, 1459-1470 (2006).
38. Ogura H. et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. Immunity. 29, 628–636 (2008).
39. Murakami M. et al. Local microbleeding facilitates IL-6–and IL-17–dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. J Exp Med. 208, 103-114 (2011).
40. Leavy O. Autoimmunity: Joint damage without antigen. Nat Rev Immunol. 11, 75 (2011).
41. Arima Y. et al. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. Cell. 148, 447-57 (2012).
42. Tracey KJ. Immune cells exploit a neural circuit to enter the CNS. Cell. 148, 392-4. (2012).
43. Welberg L. Neuroimmunology: Neural activity regulates T cell entry. Nat Rev Neurosci. 13, 153 (2012).
44. Steinman L. Inflammatory cytokines at the summits of pathological signal cascades in brain diseases. Sci Signal. 6, 1-3 (2013).
45. Kamimura D. et al. The gateway theory: bridging neural and immune interactions in the CNS. Front Neurosci. 7, 204. (2013).
46. Arima Y. et al. Regulation of immune cell infiltration into the CNS by regional neural inputs explained by the gate theory. Mediators Inflamm. 2013, ID 898165 (2013).
47. Ogura H. et al. The gateway theory: How regional neural activation creates a gateway for immune cells via an inflammation amplifier. Biomed J. 36, 269-73 (2013).

48. Murakami M. et al. IL-6 signal transduction and its physiological roles. Nihon Rinsho. 70, 192-206 (2012).
49. Murakami M. and Hirano T. The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation. Int J Biol Sci. 8, 1267-80 (2012).
50. Murakami M. et al. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. Cell Rep. 28, 946-59 (2013).
51. Blume-Jensen P. and Hunter T. Oncogenic kinase signaling. Nature. 411, 355-65. (2001).
52. Kolch W. and Pitt A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signaling pathways in cancer. Nat Rev Cancer. 10, 618-29. (2010).
53. Citri A. Yarden Y. EGF-ERBB signaling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol. 7, 505-16 (2006).
54. Threadgill DW. et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. Science. 269, 230–234 (1995).
55. Miettinen PJ. et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. Nature. 376, 337–341 (1995).
56. Sibilia M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. Science. 269, 234–238 (1995).
57. Normanno N. et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): Simple drugs with a complex mechanism of action? J Cell Physiol. 194, 13-19 (2003).
58. Selvaggi G. et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 15, 28-32 (2004).
59. Hirsch FR. et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. J Clin Oncol. 21, 3798-3807 (2003).
60. Muhsin M et al. Gefitinib. Nat Rev Drug Discov. 2 ,515-6 (2003).
61. Herbst RS. et al. Gefitinib-a novel targeted approach to treating cancer. Nat Rev Cancer. 4, 956-965 (2004).
62. Kelloff GJ. and Sigman CC. Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient. Nat Rev Drug Discov. 11, 201-14 (2012).
63. Pastore S. et al. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. J Invest Dermatol. 128, 1365-1374 (2008).

64. Sadikot RT. and Blackwell TS. Bioluminescence imaging. Proc Am Thorac Soc. 2, 537-40, 511-2. (2005).
65. Kamon H. et al. TRIF–GEFH1–RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation EMBO J. 25, 4108-4119 (2006).
66. Huseby ES. et al. Age-Dependent T Cell Tolerance and Autoimmunity to Myelin Basic Protein. Immunity. 14, 471-481 (2001).
67. Yamane S. et al. Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. J Inflamm. 5, (2008).
68. Colomiere M. et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. Br J Cancer. 100, 134-44 (2008).
69. Hirota K. et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. J Exp Med. 204, 2803-12 (2007).
70. Yamamoto, M et al. Regulation of Toll/IL-1-receptormediated gene expression by the inducible nuclear protein IκBζ. Nature. 430, 218-222 (2004).
71. Jin Q, Esteva FJ. Cross-Talk Between the ErbB/HER Family and the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Signaling Pathway in Breast Cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 13, 485-98 (2008).
72. Bader AG. et al. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. Nat Rev Cancer. 5, 921-9 (2005).
73. Romel C. et al. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? Nat Rev Immunol. 7, 191-201 (2007).
74. Ozes ON et al. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. Nature. 2, 82-5 (1999).
75. Romashkova JA et al. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. Nature. 2, 86-90 (1999).
76. Salminen A. and Kaarniranta K. Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling. Cell Signal. 22, 573-7 (2010).
77. Hayden MS. and Ghosh S, Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell. 132, 344-62 (2008).
78. McFarland HF. and Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity.

Nat Immunol. 8, 913-9 (2007).
79. Stromnes IM. and Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. Nat Protoc. 1, 1952-60 (2006).
80. Toyoda H. et al. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes, J Biol Chem. 270, 7495–7500 (1995).
81. Cho MC. et al. Epiregulin expression by Ets-1 and ERK signaling pathway in Ki-ras-transformed cells. Biochem Biophys Res Commun. 377, 832-7 (2008).
82. Nguyen DX. et al. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer. 9, 274-84. (2009).
83. Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. Nat Rev Mol Cell Biol. 6, 32-43 (2005).
84. Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer. 8, 929-41 (2008).
85. Lemmon MA. and Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Cell. 141, 1117-34 (2010).
86. Zhang X. et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. Cell. 125, 1137-49 (2006).
87. Red Brewer M. et al. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. Mol Cell. 34, 641-51 (2009).
88. Bill A. et al. Cytohesins Are Cytoplasmic ErbB Receptor Activators. Cell. 143, 201-11 (2010).
89. Slamon DJ et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 235, 177-182 (1987).
90. Colomiere M. et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. Br J Cancer. 100, 134-44 (2009).
91. Kang Z. et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. Immunity. 32, 414-25 (2010).
92. Rodgers JM. Et al. Act1, scene brain: astrocytes play a lead role. Immunity. 32, 302-4 (2010).
93. Ma X. et al. IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes. J Immunol. 184, 4898-906 (2010).

94. Shirasawa S. et al. Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. Proc Natl Acad Sci USA. 101, 13921-6 (2004).
95. Ogura H. et al. The reverse-direction method links mass experimental data to human diseases. Arch Immunol Ther Exp. 62, 41-5 (2014).
96. Yu H. et al. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. Nat Rev Cancer. 9, 798-809 (2009).
97. Atsumi T. et al. Inflammation Amplifier, a New Paradigm in Cancer Biology. Cancer Res. 74, 8-14 (2014).
98. Iwasaka-Yagi C. et al. TGF-beta attenuates the transactivation activity of Ets-1 despite its induction via the inhibition of DNA binding. Tohoku J Exp Med. (2001).
99. Rubtsov YP. and Rudensky AY. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. Nat Rev Immunol. 7, 443-53 (2007).
100. Okada Y. et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature. 506, 376-381 (2014).

研究業績

【論文発表】

1. Murakami M*, Harada M*, Kamimura D*, Ogura H, Okuyama Y, Kumai N, Okuyama A, Singh R, Jiang JJ, Atsumi T, Shiraya S, Nakatsuji Y, Kinoshita M, Kohsaka H, Nishida M, Sakoda S, Miyasaka N, Yamauchi-Takihara K, Hirano T.　(*equal contribution)
Disease-Association Analysis of an Inflammation-Related Feedback Loop
Cell Reports, 3, 946-959, 2013.

本論文への寄与

1) shRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングにおける ELISA 及び TCO データの 1/4 の Excel ファイルへの入力、1/4 の全ゲノム関連解析（GWAS）及び一部の IPA 解析（Table 1、2、S1、S2、S3）
2) マウス滑膜細胞の DNA マイクロアレイ実験、アルゴリズム解析、基準値設定及び基準を満たしたデータの 1/2 の GWAS（Table 2、S6、S8、S9）
3) ヒト滑膜細胞の DNA マイクロアレイ実験、アルゴリズム解析、基準値設定及び基準を満たした全てのデータの GWAS（Table 2、S7、S8、S9）
4) Epiregulin と EGFR に関する全ての実験及び解析（Fig. 2-Fig. 5、Fig. S7、Fig. S8）
5) shRNA と siRNA を用いたゲノムワイドスクリーニングの再現実験の一部（Fig. S1-S6 の一部、Fig. S9、Table S5 ; 具体的には、Ngp、Klf4、Hoxb3、Galnt2、Enpp5、Ddx39、Gzmm、Il4ra、Il2rg、Jak3 に関する実験及び解析）
6) Fig. 1A と 1B を除く全ての Figures、Supplemental figures、Table S5-S7 及び Table S10 の作成、Experimental procedures 及び Figure legends の執筆、実験結果の考察及び議論

2. Harada M*, Kamimura D*, Arima Y, Kohsaka H, Nakatsuji Y, Nishida M, Atsumi T, Meng J, Bando H, Singh R, Sabharwal L, Yamada M, Jiang JJ, Miyasaka N, Sakoda S, Yamauchi-Takihara K, Ogura H, Hirano T, Murakami M.　(*equal contribution)
Temporal Expression of Growth Factors Triggered by Epiregulin Regulates Inflammation Development
Submitted to Journal of Immunology

3. Harada M*, Kamimura D*, Kawano F*, Yamada M, Kawamoto T, Yull FE, Betz UA, Jiang JJ, Timothy SB, Atsumi T, Ogura H, Arima Y, Ohira Y, Hirano T, Murakami M.
(*equal contribution)
Symmetric Inflammation Is Developed by a Sensory-Sympathetic Interaction Followed by ATP Expression in a Rheumatoid Arthritis Model
Submitted to Immunity

4. Atsumi T*, Singh R*, Sabharwal L*, Bando H, Meng J, Arima Y, Yamada M, Harada M, Jiang JJ, Kamimura D, Ogura H, Hirano T, Murakami M. (*equal contribution)
Inflammation Amplifier, a New Paradigm in Cancer Biology
Cancer Research, 74, 8-14, 2014.

5. Kamimura D, Yamada M, Harada M, Sabharwal L, Meng J, Bando H, Ogura H, Atsumi T, Arima Y, Murakami M.
The gateway theory: bridging neural and immune interactions in the CNS
Frontiers in Neuroscience, 7, 204, 2013.

6. Lee J*, Nakagiri T*, Kamimura D, Harada M, Oto T, Susaki Y, Shintani Y, Inoue M, Miyoshi S, Morii E, Hirano T, Murakami M, Okumura M. (*equal contribution)
IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation
International Immunology, 25, 319-332, 2013.

7. Lee J, Nakagiri T, Oto T, Harada M, Morii E, Shintani Y, Inoue M, Iwakura Y, Miyoshi S, Okumura M, Hirano T, Murakami M.
IL-6 Amplifier, NF-κB–Triggered Positive Feedback for IL-6 Signaling, in Grafts Is Involved in Allogeneic Rejection Responses
Journal of Immunology, 189, 1928-1936, 2012.

8. Arima Y, Harada M, Kamimura D, Park JH, Kawano F, Yull FE, Kawamoto T, Iwakura Y, Betz UA, Márquez G, Blackwell TS, Ohira Y, Hirano T, Murakami M.
Regional Neural Activation Defines a Gateway for Autoreactive T Cells to Cross the Blood-Brain Barrier
Cell, 148, 447-457, 2012.

9. Murakami M*, Okuyama Y*, Ogura H*, Asano S, Arima Y, Tsuruoka M, Harada M, Kanamoto M, Sawa Y, Iwakura Y, Takatsu K, Kamimura D, Hirano T. (*equal contribution)
Local microbleeding facilitates IL-6– and IL-17–dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells
Journal of Experimental Medicine, 208, 103-114, 2011.

【国際学会発表】

1. Hideki Ogura, Masaya Harada, Eri Sanda, Yuko Okuyama, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami, and Toshio Hirano.
A zinc finger motif containing protein regulates the activation of the IL-6 amplifier, which is a critical for the development of an autoimmune arthritis
The 60th Fujihara Seminar, P2-9, Osaka, Japan, October 30, 2010.

2. Masaya Harada, **Mika Nishihara, Hideki Ogura, Arisa Moroi, Naoko Ueda, Mineko Tsuruoka, Chika Kitabayashi, Fumio Tsuji, Hiroyuki Aono, Katsuhiko Ishihara, Eric Huseby, Ulrich A. K. Betz, Masaaki Murakami** and **Toshio Hirano.**
IL-6-mediated STAT3 signaling in T cells directs the development of Th17 with a minimum effect on that of Treg in vivo
14th International Congress of Immunology, PP-014-21, Kobe, Japan, August 23, 2010.

【国内学会発表】

1. HARADA Masaya, NAKATSUJI Yuji, KOHSAKA Hitoshi, MIYASAKA Nobuyuki, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki.
Epiregulin enhances inflammation amplifier activation by inducing growth factors amplifying circuit
第 42 回日本免疫学会学術集会, 1-L-W22-10-P, 幕張メッセ, 2013 年 12 月 11 日

2. HARADA Masaya, OKUYAMA Yuko, KAMIMURA Daisuke, OGURA Hideki, NAKATSUJI Yuji, KOHSAKA Hitoshi, MIYASAKA Nobuyuki, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki.
Epiregulin is involved in inflammation development via IL-6 amplifier activation
第 41 回日本免疫学会学術集会, 1-H-W13-3-O/P, 神戸国際展示場, 2012 年 12 月 5 日

3. OGURA Hideki, KAMIMURA Daisuke, HARADA Masaya, SINGH Rajeev, OKUYAMA Yuko, ATSUMI Toru, SHIRAYA Sayaka, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki.
IL-6 amplifier, NF-κB-triggered positive-feedback for IL-6 signaling, is a key player in inflammation associated with various human diseases
第 41 回日本免疫学会学術集会, 1-H-W13-10-O/P, 神戸国際展示場, 2012 年 12 月 5 日

4. LEE Jihye, HARADA Masaya, IWAKURA Yoichiro, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki.
IL-6 amplifier activation in donors plays a role in in allogenic rejection responses
第 41 回日本免疫学会学術集会, 1-H-W13-9-O/P, 神戸国際展示場, 2012 年 12 月 5 日

5. ARIMA Yasunobu, HARADA Masaya, KAMIMURA Daisuke, Jin-Haeng Park, IWAKURA Yoichiro, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki.
Regional neural activation directly influences immune signals in the central nervous system via IL-6 amplifier activation
第 41 回日本免疫学会学術集会, 1-C-W4-4-O/P, 神戸国際会議場, 2012 年 12 月 5 日

6. 有馬康伸、原田誠也、上村大輔、朴辰幸、岩倉洋一郎、平野俊夫、村上正晃
Neural stimulation accelerates the IL-6 amplifier activation, which is critical for pathogenic CD4+T cell accumulation in the central nervous system

第 40 回日本免疫学会学術集会, 3-I-W63-1-O/P, 幕張メッセ, 2011 年 11 月 29 日

7. 奥山祐子、小椋英樹、浅野省吾、金本實、有馬康伸、原田誠也、白矢紗也佳、岩倉洋一郎、高津聖志、上村大輔、平野俊夫、村上正晃
MHC クラス２拘束性自己免疫疾患発症における４ステップモデル
第 40 回日本免疫学会学術集会, 2-I-W40-9-O/P, 幕張メッセ, 2011 年 11 月 28 日

8. 原田誠也、上村大輔、奥山祐子、中辻裕司、上阪等、宮坂信之、平野俊夫、村上正晃
Enhancement of IL-6 amplifier activation by a soluble factor, SFX, which accelerates the development of autoimmune diseases
第 40 回日本免疫学会学術集会, 2-B-W27-6-P, 幕張メッセ, 2011 年 11 月 28 日

9. 浅野省吾、有馬康伸、鶴岡峰子、奥山祐子、原田誠也、岩倉洋一郎、小椋英樹、村上正晃、平野俊夫
関節局所での IL-6 amplify loop の活性化が F759 関節炎の発症に重要である
第 39 回日本免疫学会学術集会, 2-H-W36-7-O/P, 大阪国際会議場, 2009 年 12 月 3 日

10. 笠田高志、久恒昭哲、原田誠也、磯濱洋一郎、香月博志
ミクログリアの細胞機能に対する細菌性シアリダーゼの影響
第 62 回日本薬理学会西南部会, A-2, リジュール松山, 2009 年 11 月 27 日

【受賞】

JSI Young Investigators' Travel Award for 14th ICI 受賞　2010 年 8 月

【科学研究費補助金】

平成 23 年度～平成 25 年度　日本学術振興会特別研究員（DC１）採用・特別研究員奨励費総額 190 万円獲得　「IL-17 と IL-6 信号伝達経路の相乗効果を制御する分子機構の解析」