

Title	Th17細胞による心筋炎制御に関する研究
Author(s)	山下, 朋美
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60078
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山 下 朋 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (臨床薬学)
学位記番号	第 25981 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	Th17細胞による心筋炎制御に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 藤尾 慈 (副査) 教授 堤 康央 教授 辻川 和丈 教授 橋本 均

論文内容の要旨

<背景>近年、慢性炎症が心不全の病態形成に重要な役割を担うことが明らかになってきた。様々な動物モデルを用いた研究から、心不全病態に関与する免疫細胞およびその産生サイトカインが提案されるに至っている。臨床においても心不全患者の血中に炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-6が増加し、その血中濃度が予後と相関することが報告されている。炎症は急性期において免疫反応を増強し組織修復に重要な役割を担うが、一方で慢性的に持続すると組織障害を誘導する。心臓においても持続的な炎症はリモデリングを進行させ心機能低下を誘発すると考えられる。

これまで慢性炎症において、ヘルパーT細胞のうちTh1/Th2バランスの破綻が重要視されてきたが、近年新たなT細胞サブセットとしてTh17細胞が同定され、その重要性に注目が集まっている。心臓においてもTh1欠損マウスでは炎症の増悪が認められることから、心臓における炎症反応をTh1/Th2バランスの破綻のみで説明することは困難である。

そこで本研究では、Th17細胞の心筋炎における意義の解明を目的として、Th17細胞の炎症発症に対する役割を、抗IL-6受容体抗体やROR γ t-gfpノックイン (ROR γ t^{gfp/+}) マウスを用いて明らかにし、さらには、Th17細胞の炎症制御機構についてTreg細胞との相互作用の観点から解明を試みた。また炎症過程におけるTh17細胞の性質変化について、ROR γ t^{gfp/+}マウスを用いたDNAマイクロアレイにより得られた解析結果を報告する。

<方法・結果>心臓における炎症発症に対するTh17細胞の果たす役割について、実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) モデルを用いて検証した。心筋炎誘導マウスは誘導3週後に炎症がピークとなり、その後炎症は緩やかに終息した。そこで、炎症発症に決定的役割を担うとされるヘルパーT細胞サブセットの浸潤について検討した結果、Th17細胞の浸潤を明らかにした。加えて、Th17細胞のマスター遺伝子であるROR γ t^{gfp/+}マウスを用い解析したところ、Th17細胞は正常心筋細胞の間質に比較して炎症性細胞が凝集した傷害領域に局在することが確認された。

そこで次に、抗IL-6受容体抗体を用いTh17細胞の心臓への浸潤の意義を検討した。IL-6はTh17細胞の分化に必須のサイトカインであり、抗体投与群では非投与群で認められた炎症性細胞の浸潤が顕著に抑制されていた。さらに、Th17欠損マウスを用いて心筋炎を誘導した際の表現型について解析を行った。その結果、Th17欠損マウスの心臓では炎症性細胞の浸潤がほぼ認められず、心筋炎に対し抵抗性を示すことが明らかになった。以上の結果より、IL-6/ROR γ tによるTh17細胞の分化誘導ならびにTh17細胞の心臓への浸潤はEAM形成に必須であることを明らかにした。

Th17細胞はIL-6とTGF- β の存在下でnaive T細胞から分化するが、IL-6の非存在下では制御性T (Treg)

細胞が分化誘導されることが知られている。Treg細胞とTh17細胞とのバランスについては、Treg細胞を軸とした検討が主であり、Th17細胞側からのTreg細胞制御について詳細な検討は行われていない。そこで、心筋炎における炎症終息期に制御性T細胞がどのように関与しているか、Th17細胞との相互作用の観点から検討した。EAM心筋においてTreg細胞の組織内局在を確認した後、抗CD25抗体を用いてTreg細胞を枯渇させたところ、心臓組織中に多数の炎症性細胞の残存が認められた。またこのときTh17/Treg細胞比は抗体投与群で顕著に増加していた。そこで次に、Treg細胞移植を行い細胞動態とその役割について評価を行った。EAMドナーマウスより単離したTreg細胞を、レシピエントマウスに移植したところ、EAM誘導心へのTreg細胞の顕著な浸潤が認められ、重症度が有意に低下することが明らかになった。

上述のTh17欠損マウスを用いたEAM誘導実験より、Th17細胞は炎症発症に重要な役割を担うことが明らかになったが、このときTh17欠損マウスの心臓においてTreg細胞の発現が顕著に抑制されていた。一方、野生型マウスでは炎症の増悪とともに発現増加していたIL-17が、Th17欠損マウスでは抑制されていることが明らかになった。そこで次にTh17細胞の主な産生サイトカインであるIL-17の中和抗体を用いた検討を行った。その結果、IL-17中和抗体投与による重症度の改善は認められなかったが、興味深いことにTreg細胞の発現がコントロール群と比較して顕著に抑制されていた。以上の結果から、Treg細胞はIL-17依存性に心臓へ浸潤する可能性が示唆された。そこで、Treg細胞の心臓への浸潤メカニズムを明らかにするためにDNAマイクロアレイ解析を行い、種々のケモカインに着目して解析を行ったその中からEAMで発現増加する因子を同定し、さらにIL-17依存性に発現増加している因子を探索した結果、Cxcl1、Cxcl16、Ccl5そしてCcl8を同定した。そこらからさらにCcl5 (RANTES)とCcl8に絞り、これらリガンドに対する受容体の発現を解析したところ、Treg細胞上でCcr5のドミナントな発現が認められた。そこで次に、Ccr5のアンタゴニストであるMet-RANTESを用いたTreg移植実験を行った。その結果、移植したTreg細胞の肝臓および脾臓への非特異的な集積が認められたが、Met-RANTES処置による差は認められなかった。しかし一方で、心臓においてはMet-RANTES処置により対照群と比較してTreg細胞遊走が顕著に抑制されていた。以上の結果から、Treg細胞はTh17細胞が産生するIL-17依存性に、Ccl5/Ccr5シグナルを介して心臓へ浸潤する可能性が示唆された。

<結論>本研究では、Th17細胞の心筋炎制御に関する役割を炎症の発症、終息という2つの観点から解析し以下の結果を得た;1) 心筋炎発症時、IL-6はROR γ tの発現増強を介してTh17細胞分化を誘導し、炎症カスケードを誘発する。2) 心筋炎の炎症鎮静化過程において制御性T細胞は炎症抑制機構を増強する。3) Th17細胞はIL-17産生を介してCcl5発現を増強させ、Ccr5を発現する制御性T細胞の心臓への遊走を促進する。

以上の結果は、Th17細胞が心筋炎においてその病期によって炎症の“アクセル”と“ブレーキ”という、相反する2つの制御機構に関与する可能性を示すものである。本研究の結果は、心筋炎の発症から終息に至る一連の炎症反応におけるTh17/Treg相互作用について新たな知見を提示しており、心疾患における炎症の持続はTh17細胞を中心とした炎症制御機構の破綻が原因である可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、自己免疫性心筋炎が発症から自然治癒にいたる過程を分子生物学的に解析したものであり、前半では発症機構に関して、後半では自然治癒機構に関して多くの興味深い知見が述べられている。

まず、その発症機構の解析については、学位申請者は、極めて緻密にTh17細胞の重要性を示すとともに、IL-6受容体抗体を用いた新規治療法の提案を行っている。自己免疫性心筋炎はウイルス性心筋炎のモデルであり臨床的示唆に富むこと、提案している治療法が実際に臨床への橋渡し可能なものであることから、極めて重要な発見といえる。この研究については、既にCardiovascular Research誌に掲載されている。

また、自然治癒機構の解析については、従来、拮抗的な役割を果たすと考えられてきたTh17細胞とTreg細胞の相互作用を示唆するものである。既成概念にとらわれない、極めてユニークな内容であり、申請者の知見が、自己免疫性心筋炎のみならず様々な炎症反応の理解に意義を有するものとなることと期待される。

以上、本論文は、その臨床科学的にも、基礎科学的にも極めて意義深いものであり、学位に値するものとする。