

氏 名 (本籍)	かわ 川	せ 瀬	ゆう 裕	すけ 介
学位の種類	博 士 (薬 学)			
学位記番号	薬 第 500 号			
学位授与年月日	平成 18 年 1 月 18 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			

学位論文題目

IL-18 の免疫系細胞，骨代謝性疾患及び皮膚炎症における役割
解析— IL-18 トランスジェニックマウスを用いた解析—

論文審査委員	(主 査) 教 授	大 内 和 雄
	教 授	福 永 浩 司
	教 授	永 沼 章

論文内容要旨

サイトカインは細胞間の情報伝達を担う分子量1万~数万のタンパク質で、免疫・生体防御、炎症・アレルギー、発生・分化、造血系、内分泌系及び神経系に直接的あるいは間接的に関与することが知られている。サイトカインの特徴的な性質としては、1種類のサイトカインが複数の機能を示す多様性と、複数のサイトカインが同じ機能を示す重複性を兼ね備えていることがあげられる。また、サイトカインはネットワークを形成して、生体内での恒常性を維持しているため、その破綻は各種疾病にも大きく関係していると考えられている。

獲得免疫の中核を担う helper T (Th) 細胞は、産生するサイトカインプロファイルによって interleukin (IL) -2 及び interferon (IFN) - γ を産生する Th1 細胞と、IL-4, IL-5 及び IL-13 を産生する Th2 細胞に分類される。Th1 型及び Th2 型の反応は相互に排他的で、Th1 サイトカインは Th2 サイトカインの産生を抑制し、反対に Th2 サイトカインは Th1 サイトカインの産生を抑制する。アレルギー性疾患の進展には IL-4 及び IL-5 などの Th2 サイトカインが主要な役割を占めていると考えられてきており、実際にアレルギー性喘息患者やアトピー性皮膚炎患者由来の末梢血白血球ではこれらのサイトカイン産生能が亢進していることが数多く報告されている。

IL-18 はマウスの *Propionibacterium acnes* 誘導ショックモデルにおいて IFN- γ を産生させる因子として Okamura らによって発見されたサイトカインである。IL-18 はその発見の経緯から IFN- γ の作用を介する Th1 型の反応を誘導すると考えられた。しかし、Hoshino らの研究により、IL-18 と IL-2 との共存下で細胞を培養すると IL-4 や IL-13 の産生が誘導されることや、同様の組み合わせで動物に投与すると血清中の immunoglobulin (Ig) E や IgG1 の濃度が上昇することが示され、IL-18 は Th2 型の反応も惹起することが明らかになった。このように IL-18 は Th1 型及び Th2 型の相反する性質を持つサイトカイン産生を誘導し、多くの種類の細胞から産生され、さらにその受容体も幅広い細胞で発現しているため、ある種の疾患においては IL-18 が病態の進展にどのような形で関与するかについて明らかにすることは困難であった。

例えば、アレルギー性疾患の動物実験モデルとして汎用されるマウスの喘息モデルにおいて、recombinant IL-18 を吸入投与すると気道への好酸球浸潤が亢進して気道炎症が悪化することが報告されている。一方、IL-18 遺伝を欠失したマウスを用いて喘息モデル実験を行っても、気道への好酸球の浸潤が亢進し、結果的に肺障害を増悪する傾向があることも報告されている。そのため、IL-18 がアレルギー性炎症の病態を改善するのか、増悪させるのかについては一致した結論が得られていない。また、IL-18 が *in vitro* で granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) の作用を介して破骨細胞の分化を抑制することや、osteoprotegerin の作用を介して破骨細胞の成熟を阻害することが報告されているため、IL-18 が骨代謝性疾患に関与する可能性も示唆されている。しかし、骨のリモデリングは破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスによって制御されているため、IL-18 により破骨細胞の分化や成熟が抑制されると、骨破壊のみが抑制されて骨の過形成が引き起こされるのか、あるいは

IL-18 が骨芽細胞を抑制して骨形成阻害が引き起こされるのかについては、先に述べた *in vitro* 実験で得られた結果から推定することは困難であった。

そこで本研究では、IL-18 の *in vivo* における免疫・アレルギーおよび骨代謝における役割を解析する目的で、リンパ球系及びその前駆細胞である骨髄細胞が IL-18 を過剰に分泌するトランスジェニック (transgenic, TG) マウス、及び主に皮膚に分布するケラチノサイトが IL-18 を過剰に分泌する TG マウスを作製し、その phenotype をワイルドタイプ (wild type, WT) マウスと比較検討した。リンパ球系及びその前駆細胞である骨髄細胞が IL-18 を過剰産生する TG マウス (Ig/IL-18 TG マウス) は、Ig promoter 下流にマウス mature IL-18 の遺伝子を導入し、ケラチノサイトが IL-18 を過剰産生する TG マウス (K5/IL-18 TG マウス) は、keratin 5 promoter 下流にマウス mature IL-18 の遺伝子を導入して作製した。

第 1 章には、Ig/IL-18 TG マウスについて免疫学的解析を行った結果を述べた。脾臓細胞の構成割合の解析を行った結果、Ig/IL-18 TG マウスにおいては、WT マウスと比較して、CD8⁺T 細胞及びマクロファージが増加しており、B 細胞が減少していた。また、脾臓と同様に骨髄においても B 細胞数が減少していた。脾臓細胞を PMA, ionomycin あるいは抗 CD3 抗体及び IL-2 の存在下で培養すると、Ig/IL-18 TG マウスの脾臓細胞では、WT マウスと比較して、IL-4, 5, 13 及び IFN- γ の産生亢進が認められた。また、Ig/IL-18 TG マウス血清中のサイトカイン濃度及び抗体価を測定した結果、WT マウスにおいては極めて微量しか検出できない血清中の IL-4, IFN- γ 及び IgE の濃度が上昇していた。さらに、Ig/IL-18 TG マウスの血清中の IgG1 濃度は加齢に伴って上昇した。IL-18 には免疫系の細胞に対して Th1 型あるいは Th2 型のサイトカイン、GM-CSF, tumor necrosis factor- α 及び IL-1 β などのサイトカイン産生を誘導する作用があることが報告されている。そのため、Ig/IL-18 TG マウスにおいて観察された脾臓細胞の構成割合の変化、血清中の IL-4 及び IFN- γ 濃度及び IgE 及び IgG1 抗体価の上昇には、IL-18 単独の作用に加えて、IL-18 によって誘導される他のサイトカインが間接的に関与している可能性も考えられた。

第 2 章には、Ig/IL-18 TG マウスの骨髄細胞及び骨形成について解析した結果を述べた。WT マウスと比較して、Ig/IL-18 TG マウスにおいては骨髄細胞中の IFN- γ の mRNA レベルが上昇し、IL-4 の mRNA レベルは低下していた。さらに骨病理組織学的解析により、Ig/IL-18 TG マウスにおいては WT マウスと比較して、大腿骨における皮質骨面積及び腰椎における海綿骨体積が減少していることも明らかにした。さらに、骨吸収と骨形成のパラメータを解析した結果、Ig/IL-18 TG マウスにおける骨形成不全の原因は、破骨細胞の減少に伴う骨吸収及び骨形成速度の低下であることを示唆した。

これらの結果から、Ig/IL-18 TG マウスにおいては、リンパ球系細胞および骨髄細胞から過剰に産生された IL-18 が、直接的、あるいは IL-18 によって誘導されるサイトカインを介して間接的に、局所的な変化あるいは全身作用をもたらし、その結果、脾臓においては細胞の構成割合の変化及びサイトカイン産生能の変化を引き起こしたと考えられた。また、骨においては骨髄細胞の構成割合の変化と骨髄細胞におけるサイトカイン mRNA レベルの変化、及びそれらに伴う破骨細胞数の減少によって骨代謝回転の低下を誘導し、結果として骨形成不全を生じさせると考えられた。

第 3 章には、K5/IL-18 TG マウスの皮膚を croton oil あるいは trinitrochlorobenzene (TNCB) などの起炎

剤で刺激した際の反応を、WT マウスあるいは Ig/IL-18 TG マウスにおける反応と比較し、皮膚における IL-18 過剰産生の影響について検討解析した結果を述べた。K5/IL-18 TG マウスにおいては、TNCB によって誘発される接触性皮膚炎が増強され croton oil によって誘発される急性炎症及び TNCB の反復塗布による慢性炎症は WT マウスの場合よりも強い反応が誘発された。また、K5/IL-18 TG マウスの皮膚に croton oil あるいは TNCB を塗布することにより誘発される反応は Ig/IL-18 TG マウスの皮膚に塗布した場合に比べてより強かった。これらの結果から、IL-18 は皮膚炎を悪化させること、及び皮膚炎においては循環血中の IL-18 よりも局所で高濃度に産生される IL-18 が炎症反応の誘導に強く関与することが示唆された。K5/IL-18 TG マウスに TNCB を反復塗布することによって誘発される慢性炎症においては、皮膚の表皮肥厚及び炎症局所への好中球、好酸球及び肥満細胞の浸潤が認められ、また、炎症局所において IFN- γ 、IL-4 及び CCL20 の mRNA レベルが上昇していた。IL-18 には好中球遊走作用、好酸球による IL-8 産生を亢進させる作用、及び好塩基球細胞による IL-4 の産生やヒスタミンの放出を亢進させる作用があることが報告されているため、皮膚で過剰産生された IL-18 が炎症局所の細胞に作用し、TNCB の反復塗布による炎症を増幅させた可能性が考えられた。さらに、TNCB の反復投与により、K5/IL-18 TG マウスにおいては所属リンパ節の B 細胞数が増加し、血清中の IgE 濃度の上昇も認められた。これらのことから、K5/IL-18 TG マウスにおいてはケラチノサイトにより過剰産生される IL-18 が、起炎剤の刺激によって引き起こされる炎症反応を直接的に、あるいは IL-18 によって産生されるサイトカインやケモカインを介して間接的に炎症局所で作用し、炎症を悪化させることが考えられた。さらに、起炎剤による炎症の悪化は全身性の変化をもたらし、その結果、所属リンパ節の B 細胞の増加及び血清中 IgE 濃度の上昇につながったと考えられた。

本研究により、免疫系細胞、骨代謝性疾患及び皮膚炎症における IL-18 の役割を部分的に解明することができた。すなわち、リンパ球系及びその前駆細胞である骨髄細胞において IL-18 を過剰に産生させると、免疫系の細胞の構成割合が変化して、IFN- γ などの Th1 型サイトカイン及び IL-4 などの Th2 型サイトカインの産生が誘導され、骨形成に対しては骨代謝回転の低下を誘導し、骨形成不全が生じた。また、皮膚で IL-18 を過剰に産生させると、croton oil 及び TNCB の刺激によって引き起こされるアレルギー性及び非アレルギー性の炎症が悪化した。これらの作用は IL-18 単独あるいは IL-18 によって誘導されるサイトカインを介して発現されたと考えられ、IL-18 を中心としたサイトカインネットワークの異常が骨代謝性疾患及び皮膚炎症の病態の進展に関与している可能性が示唆された。以上の結果から、IL-18 の過剰な産生を抑制する薬剤は、骨形成不全あるいは皮膚炎に対する有用な治療薬になり得る可能性が示唆された。

審査結果の要旨

IL-18 の生体内での役割や病態への関与を解析する研究は、培養細胞を用いた *in vitro* 実験、リコンビナント IL-18 や抗 IL-18 抗体をマウスに投与する *in vivo* 実験、あるいは IL-18 遺伝子を欠失させたマウスを用いる実験などによって行われてきた。しかし、骨代謝性疾患やアレルギー性疾患において IL-18 がどのような形で病態の進展に関与するかについては必ずしも明確ではない。そこで本研究では、2 種類のトランスジェニック (TG) マウスを作製して、その表現型を野生型マウスと比較することにより、IL-18 の免疫・アレルギー及び骨代謝における役割を *in vivo* 実験で解析した。

リンパ球系の細胞及び骨髄細胞が IL-18 を過剰に産生する TG マウスにおいては、血清中の IL-4, IFN- γ , IgE 及び IgG1 の濃度が上昇し、脾臓細胞における IL-5, IL-13 及び IFN- γ の産生亢進が誘導されることを示し、また、このマウスの脾臓においては CD8⁺CD44⁺ T 細胞及びマクロファージが増加すること、及び B 細胞が減少することを示した。また、骨髄細胞においては IFN- γ の mRNA 発現が上昇すること、及び IL-4 の mRNA レベルが低下することを示した。さらに、骨組織においては破骨細胞数の減少によって骨代謝回転の低下が誘導され、皮質骨及び海綿骨の減少を伴う骨形成不全が生じることを明らかにした。すなわち、TG マウスを用いた本研究により、IL-18 がリンパ球系及びその前駆細胞から過剰に分泌されると脾臓細胞の構成割合が変化すること、及び、骨形成不全が誘導されることを初めて明らかにした。

一方、皮膚に分布するケラチノサイトが IL-18 を過剰に分泌する TG マウスにおいては、croton oil や TNCB などの起炎刺激による炎症反応が悪化することを示し、皮膚において IL-18 が過剰に産生されると、非アレルギー性及びアレルギー性接触皮膚炎がさらに増悪されることを初めて明らかにし、IL-18 の過剰な産生を抑制する化合物を見い出すことにより、皮膚炎に対する有用な治療薬を開発できる可能性を示唆した。

また、IL-18 TG マウスにおける以上の変化は、IL-18 単独あるいは IL-18 によって誘導されるサイトカインを介して発現されたと考えられ、IL-18 を中心としたサイトカインネットワークの異常が骨代謝性疾患及び皮膚炎の病態に関与している可能性を示唆した。

以上の一連の研究成果により、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。