

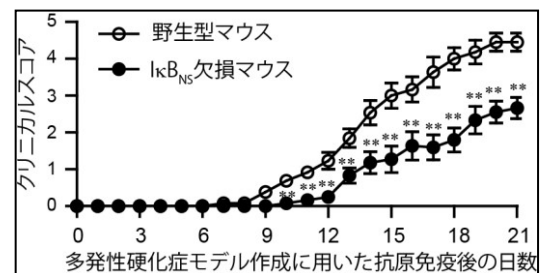
I κ Bファミリー分子による多発性硬化症の制御

岐阜大学 医学系研究科
丸山 貴司

1. 目的

多発性硬化症は、増悪と寛解を繰り返す難病である。その原因については、ミエリン産生細胞の変異なども言われているが、炎症性サイトカインIL-17の関与も示唆されている。多発性硬化症におけるIL-17のソースは、T細胞であることが知られており、近年、転写因子I κ B- ζ がIL-17産生に重要な役割を担う事が明らかとされた。そのため、I κ B- ζ を欠損したマウスは多発性硬化症に抵抗性を有するものの、I κ B- ζ 欠損マウスは加齢に伴い別の自己免疫様疾患を自然発症することから、I κ B- ζ を標的とした多発性硬化症の治療応用が難しいことが示唆される(参考文献①)。

そこで本研究では、I κ B- ζ と最も構造の類似したI κ B_{NS}に着目し、その生理学的な意義を含めて検討を行うこととした。申請時においては、すでにI κ B_{NS}欠損マウスを用いた多発性硬化症モデルを作成しており、野生型マウスと比較したところ、その症状が軽い事が明らかとなっていた(右図参照：クリニカルスコアが低いことがわかる)。



また、I κ B_{NS}欠損マウスは、加齢に伴う自己免疫疾患を引き起こさないことから、生体恒常性を維持したままに多発性硬化症に抵抗性を有することが示唆された。そこで申請者は、I κ B_{NS}が新しい治療の標的分子となりうるか、またそのメカニズムについて明らかとする目的で研究を行った。

2. 方法

I. I κ B_{NS}欠損マウスおよび野生型マウスに対して、脳抗原であるMOG peptideと完全フロイトアジュバントのエマルジョンを免疫し、多発性硬化症モデルを作成する。免疫12日後、マウスの鼠径リンパ節を摘出し、IL-17産生能について、フローサイトメトリー解析を行った。

II. I κ B_{NS}欠損マウスおよび野生型マウスの脾臓より、ナイーブT細胞を精製し、試験管内においてIL-17を産生するT細胞の分化誘導能について、ELISA法にて検討を行った。また、転写制御因子ROR γ tなど、T細胞におけるIL-17産生に寄与する複数の分子の発現について、フローサイトメトリー解析を行った。

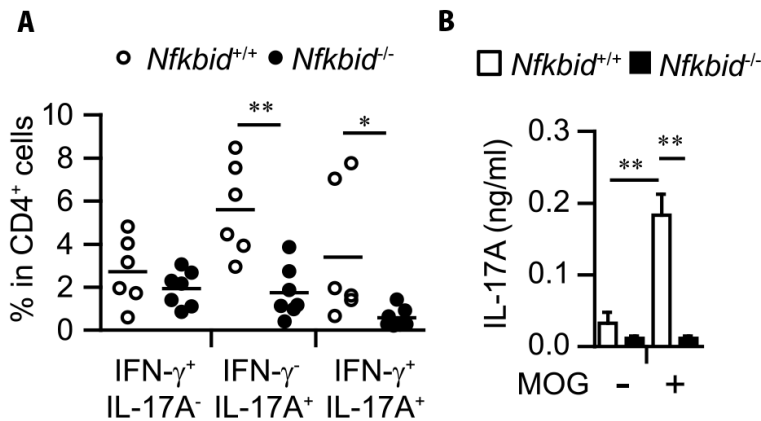
III. IL-17の遺伝子発現領域(約6KB)をpGL4ベクターにクローニングし、HEK293細胞内においてリポーターアッセイを行った。この時、I κ B_{NS}およびI κ B- ζ の発現ベクターを用いて、それぞれの転写制御因子のIL-17発現における役割について検討を行った。

IV. Crisper/Cas9を用いてI κ B_{NS}リポーター細胞株を作成し、I κ B_{NS}の転写に影響を与える化合物のスクリーニングを行った。

3. 結果

I. フローサイトメトリー解析の結果、 $I\kappa B_{NS}$ 欠損マウス由来(●*Nfkbid*^{-/-})の鼠径リンパ節においては、IL-17を産生するT細胞の割合は、野生型マウスと比較し(○*Nfkbid*^{+/+})、顕著に低下していることが明らかとなった(下図A参照)。

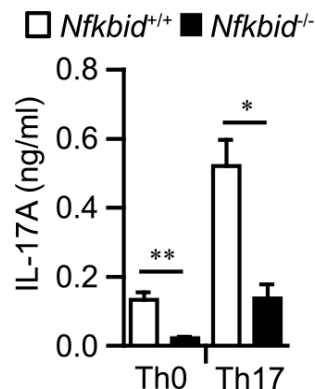
さらに、鼠径リンパ節細胞に対し、脳抗原(MOG peptide)にて再刺激したところ、 $I\kappa B_{NS}$ 欠損マウス由来(●*Nfkbid*^{-/-})の鼠径リンパ節細胞(■*Nfkbid*^{-/-})においては、IL-17産生能が顕著に低下していることも突き止めた(下図B参照)。



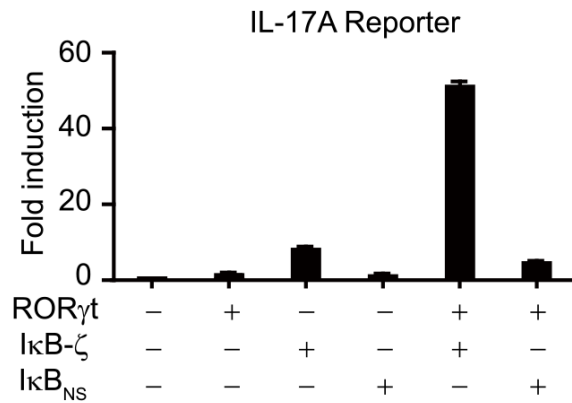
(A, B) Analysis of mice 12 days after immunization. (A) Cytokine profile of CD4⁺ cells in draining LNs. (B) Measurement of IL-17A supernatant concentrations by ELISAs (*Nfkbiz*^{+/+}: n=5; *Nfkbiz*^{2/2}: n=6), using cultured draining LNs incubated in the presence or absence of MOG

II. 試験管内において、T細胞をCD3およびCD28抗体で刺激した場合(Th0)、あるいはサイトカインであるTGF- β +IL-6で刺激した場合(Th17)のIL-17産生能について検討を行った結果、 $I\kappa B_{NS}$ 欠損マウス由来(■*Nfkbid*^{-/-})のT細胞においては、Th0およびTh17のどちらの培養条件においても、IL-17の産生能が顕著に低下していることが明らかとなった(下図参照)。

また、IL-17の発現調整を行う転写制御因子ROR γ tの発現についても、顕著に低下していることが明らかとなった(参考文献①参照)。



III. これまで、IL-17リポーターの活性は、ROR γ tと $I\kappa B$ - ζ の共発現により上昇することが知られており、本研究においてもその事実についての確認が取れた。しかし、 $I\kappa B_{NS}$ においては、ROR γ tとの共発現によるIL-17リポーター活性の上昇は認められなかった(下図参照)。また、ROR γ tと $I\kappa B$ - ζ の共発現により上昇するリポーター活性について、 $I\kappa B_{NS}$ を強制発現させ、その影響を検討したが、変化は認められなかった。



IL-17A promoter activity presented as the fold-increase over that observed in HEK293 cells transfected with the empty vector. Data shown are the mean + S.D. of duplicate samples and are representative of three independent experiments.

IV. I κ B_{NS}の3' -UTR配列の前に、IRES-GFP配列を挿入したEL4細胞を作成した。しかし、EL4におけるI κ B_{NS}の発現が極めて弱く、GFPの発現がモニターできなかつた。また、イオノマイシンやCD3などの刺激においてGFP発現が誘導される性質も認められなかつたため、I κ B_{NS}の遺伝子発現制御領域をクローニングしたpGL4リポーターを用いた研究に切り替えた。化合物のスクリーニング系については、これまでの実験系および結果を参照し(参考論文②)、検討を行ったところ、いくつかの候補化合物がリストアップされた。これら化合物につき、Western Blotting法によって、刺激依存的なI κ B_{NS}の発現制御がなされているか、検討を行っている最中である。

4. 考察

I κ B_{NS}欠損マウスは、加齢に伴う自己免疫疾患の自然発症は認められず、また①多発性硬化症には抵抗性を有すること、②T細胞からのIL-17産生が顕著に低下していることから、I κ B_{NS}は新しい自己免疫疾患の治療の標的分子となると考えられる。

I κ B_{NS}そのものの発現については、mRNAの安定化が重要であるとの報告もあるが、未だ明らかとされていない部分も多い。今回行った化合物スクリーニングの結果を参照し、候補化合物がどのような機構でI κ B_{NS}の発現を制御しているか、また、実際の自己免疫疾患への治療に利用できるかについて、今後のさらなる検討が必要となってくる。

I κ B- ζ とI κ B_{NS}は、タンパクの1次構造が類似しているため、その役割とメカニズムは同様と考えられる。IL-17の発現制御という観点においては、どちらもその発現を正に制御するという共通点が明らかとなったが、そのメカニズムについては全く異なる事が示唆された。

5. 参考文献

- ① Kobayashi S., et al. *PLOS One* 2014 Vol.9 e110838
- ② Maruyama T., et al. *BBRC* 2016 Vol. 429 711-715.
- ③ Maruyama T., et al. *J Leukoc Biol* 2015 Vol. 95 385-393.