

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第692号	氏名	有木晋平
審査委員会委員	主査氏名	猪股雅史	
	副査氏名	安部隆三	
	副査氏名	北谷正明	
論文題目			
<p>GM-CSF-producing CCR2+CCR6+ Th17 cells are pathogenic in dextran sodium sulfate-induced colitis model in mice (GM-CSF 産生性 CCR2+CCR6+ Th17 細胞は、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルにおいて病原性である)</p>			
論文掲載雑誌名 Genes to Cells			
論文要旨			
<p>炎症性腸疾患 (IBD) の病態には、ヘルパーT細胞サブセットである Th17 細胞による過剰な免疫反応が関与しているが、炎症を起こした大腸でのその局在がどのように制御されているかは未だ不明である。ケモカインとその受容体は IBD の病態に関与しているが、Th17 細胞における各受容体の相対的な意義も明らかにされていない。著者らは、CRISPR/Cas9 システムを用いて、C-C モチーフケモカイン受容体 2 (CCR2) ノックアウト (KO) マウスおよび CCR6 KO マウスを同 C57BL/6 系統で作成作製し、両 KO マウスにおいて実験的大腸炎の表現型が野生型に比べて悪化することを明らかにした。さらに、CCR2/CCR6 ダブル KO (CCR2/6 DKO) マウスを作製して実験的大腸炎を誘発したところ、単一欠損マウスとは逆に表現型が有意に軽快していた ($p < 0.05$)。同様の軽快傾向は、CCR2 阻害剤であるプロパゲルマニウムを投与した CCR6 KO マウスにおいても観察された。大腸 CCR2+CCR6+ Th17 細胞は、潜在的に病原性のあるサイトカイン GM-CSF を産生し、その腸内レベルは CCR2/6 DKO マウスで著しく減少した ($p < 0.05$)。これらの結果は、GM-CSF を産生する CCR2+CCR6+ Th17 細胞は病原性であり、CCR2 または CCR6 のリガンド勾配によって炎症を起こした結腸に引き寄せられ、その後、マウスの実験的大腸炎を増悪させることを示唆する結果である。</p> <p>本研究は、国内外で増え続ける IBD の発生メカニズムにおいて、細胞表面マーカーで炎症性 Th17 細胞を識別できることを明らかにしており、IBD の病態解明を大きく前進させ、さらに新たな治療戦略開発につながる重要な知見も示している。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第692号	氏名	有木晋平
審査委員会委員	主査氏名	猪股雅史 	
	副査氏名	安部隆三 	
	副査氏名	北谷正阿 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. CCR2およびCCR6に着目した理由は何か。 2. Double Knock out mouse 作製の成功率はどのくらいか。 3. DSS大腸炎モデルを選択した理由は何か。 4. DSS大腸炎モデルの再現性を向上させるための工夫点は何か。 5. ヒト潰瘍性大腸炎とDSS大腸炎の類似点と相違点を述べよ。 6. CCR2阻害剤として現在臨床使用されていないプロパゲルマニウムに着目した理由は何か。 7. CCR6阻害剤として用いられる薬剤の候補はあるか。 8. CCR6ノックアウトマウスのDSS誘発腸炎のフェノタイプが既報と異なっていたのはなぜか。 9. Th17細胞以外でCCR2やCCR6を発現する細胞にはどのようなものがあるか。 10. CCR2およびCCR6のリガンドはどのような細胞から産生されるか。 11. ケモカイン受容体とそれらのリガンドの発現動態は、フィードバック機構によって制御されているのか。 12. 本研究は、炎症性腸疾患のうち潰瘍性大腸炎とクローン病に共通する病態の研究か、潰瘍性大腸炎に限った病態の研究か。 13. CCR2/CCR6 ダブルノックアウトマウスは、申請者自身が作製したものか、すでに保有していたものか。 14. CCR2, CCR6というケモカインレセプターに介入した研究であり、ノックアウトマウスにおいてIL-6, IL-1β, TNDαというケモカイン以外のサイトカインのmRNAレベル測定の意義は何か。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 有 木 晋 平

論 文 題 目

GM-CSF-producing CCR2⁺CCR6⁺ Th17 cells are pathogenic in dextran sodium sulfate-induced colitis model in mice

(GM-CSF 産生性 CCR2⁺CCR6⁺ Th17 細胞は、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルにおいて病原性である)

要 旨

ア. 緒言 (目的)

炎症性腸疾患(IBD)は再燃寛解を繰り返し慢性に経過する自己免疫疾患であり、IL-17 産生を特徴とする Th17 細胞が病態形成に関与している。Th17 細胞は腸管組織に豊富に存在し、複数のケモカイン(CCL)/ケモカイン受容体(CCR)に制御される。例えば CCR2 や CCR6 などを発現し、CCL2 や CCL20 などの濃度勾配に従って標的組織へ遊走する。過去に CCR2 欠損(KO)マウスも CCR6KO マウスもデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎に部分的に耐性であるとの報告があり、これらのケモカイン/ケモカイン受容体が DSS 腸炎の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されるが、腸炎時の Th17 細胞においてそれぞれのケモカイン受容体の相対的重要性は不明なままである。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて近交系の CCR2KO マウスと CCR6KO マウスを作出し、DSS 腸炎の表現型を比較した。

イ. 研究対象および方法 (材料を含む)

野生型(WT)、CCR2KO、CCR6KO、および CCR2/6 二重欠損(CCR2/6DKO)の各マウスに 2%DSS で腸炎を誘発した。体重と臨床症状を評価し、10 日目に犠死後、結腸の長さを測定し、組織学的解析と遺伝子発現解析を行った。結腸粘膜固有層リンパ球の割合はフローサイトメトリーで解析した。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を GM-CSF と共にリポポリサッカライド(LPS)で 24 時間刺激後 RNA を回収した。各 mRNA は real-time PCR で発現量を解析した。

ウ. 結果

①結腸において CCR2 および CCR6 のリガンドの発現は DSS 投与で増加した。Th17 細胞数も増加し、CCR2/CCR6 の発現パターンで分けた 4 つの亜集団もそれぞれ増加していた。②WT、CCR2KO、CCR6KO、CCR2/6DKO マウスの 4 群の DSS 腸炎は、WT マウスと比較し、既報と異なり CCR2KO マウスの病態は軽減せず、CCR6KO マウスは重篤な腸炎を呈した。一方 CCR2/6DKO マウスは最も軽症であった。③CCR2 阻害剤であるプロパゲルマニウム(PG)による薬理的な再現性評価では、CCR6KO マウスの腸炎は PG 投与で改善したが、WT マウスでは改善しなかった。④CCR2/CCR6 発現に基づいた Th17 細胞の 4 つの亜集団で GM-CSF 産生レベルを平均蛍光強度で比較すると、CCR2+CCR6+集団において最も高かった。GM-CSF は RAW 細胞の LPS 依存的な炎症性サイトカイン産生を有意に増強した。結腸における GM-CSF 発現レベルと GM-CSF 産生 Th17 細胞の割合は WT マウスと比較して CCR2/6DKO マウスで有意に減少していた。

エ. 考察

CCR2 または CCR6 単欠損で悪化したマウスの腸炎が、二重欠損では逆転して軽症化したことから、腸炎を悪化させる炎症性 Th17 細胞の遊走は CCR2/CCR6 の両者に依存的と考えられた。炎症性 Th17 細胞は炎症によって誘導されたケモカイン勾配に従って腸管組織へ遊走し、GM-CSF 産生を介してマクロファージなどの免疫細胞と協働し、DSS 腸炎の病態悪化に寄与していると考えられた。

オ. 結語 (まとめ)

本研究は、細胞表面マーカーで炎症性 Th17 細胞を識別できる可能性を示唆しており、IBD の新たな治療戦略開発に寄与することが期待される。