

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・ 	第 384 号	氏 名	佐 知 望 美
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	花 田 礼 子 	
	副査氏名	緒 方 正 男 	
	副査氏名	黒 川 竜 紀 	
<p>論文題目</p> <p>CCL20/CCR6 chemokine signaling is not essential for pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis (CCL20/CCR6 ケモカインシグナルは、多発性硬化症の実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデルにおける病態形成に必須ではない)</p> <p>論文掲載雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications</p> <p>論文要旨</p> <p><b>【背景と目的】</b> 多発性硬化症は、免疫系が神経のミエリン鞘を攻撃する自己免疫疾患である。ケモカイン受容体 CCR6 を発現する病原性 Th17 細胞と制御性 Treg 細胞のバランスは、病態進行度を決定する上で重要である。血液脳関門から産生されるケモカイン受容体 CCR6 の同族リガンドである CCL20 が、これらの免疫細胞を中枢神経系に誘引していると推測されている。しかし、多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における CCL20 の病態進行における役割について、CCL20-ノックアウト (KO) マウスを用いて解析された報告はない。さらに、遺伝背景が均一ではない CCR6-KO マウスの EAE の表現型は研究グループ間で一致していない。本研究では、C57BL/6 を遺伝背景とする CCL20-KO、CCR6-KO マウスを作製し EAE を誘導することで、多発性硬化症における CCL20/CCR6 の役割を解明することを目的とした。</p> <p><b>【研究対象・方法】</b> CRISPR/Cas9 システムを用いて、C57BL/6 を遺伝背景とする CCL20-KO、CCR6-KO マウスを作製した。作製した CCL20-KO マウスと CCR6-KO に EAE を誘導し、体重、病態スコア、組織学的評価を野生型と比較した。両マウスにおける EAE 発症の原因を明らかにするために、フローサイトメトリー法と Real-time 法を用いて EAE 誘発マウスの中枢神経系 (CNS) における細胞浸潤およびサイトカイン産生、ならびに脾臓における制御性樹状細胞 (DC) の割合を検討した。</p> <p><b>【結果と考察】</b> CCL20-KO、CCR6-KO マウスでの胸腺の T 細胞と骨髄の B 細胞、脾臓の構造および細胞集団は正常であった。慢性期の EAE の臨床的表現型は、両 KO マウスにて病態悪化を認めた。一方で、CNS の炎症性細胞浸潤と脱髄は、KO、野生型マウス間に有意差は認めなかった。CNS の CD4+T 細胞、Th17 と Treg 細胞の割合、IL-17 と TGF-<math>\beta</math> mRNA の発現、および脾臓における DC とマクロファージの割合にも有意な差は認められなかった。これらの知見から、CCL20/CCR6 を介した細胞遊走は必ずしも EAE の発症に必要ではなく、他のケモカインシグナルによって代償されている可能性が示唆された。</p> <p>本研究は、C57BL/6 を遺伝背景とした CCL20-KO、CCR6-KO を独自に樹立し解析することで CCL20/CCR6 の EAE における役割を検討した研究である。CCL20-KO、CCR6-KO では EAE 回復期の病態の悪化を認めるものの、EAE 病態の進行に関しては、CCL20/CCR6 を介した細胞遊走は必要ではないことが明らかとなり、EAE 発症に他のケモカインの関与の可能性が示唆された。以上より、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384号	氏名	佐知望美
審査委員会委員	主査氏名	花田礼子	
	副査氏名	緒方正男	
	副査氏名	黒川竜紀	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、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> <ul style="list-style-type: none"> <li>・今回モデルとして用いたマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎と疾患としての多発性硬化症の類似性と相違点はなにか？</li> <li>・今回リンパ球サブセットとして T reg, Th17 に着目しているが Th1, Th2 の関与は？</li> <li>・ヒトの多発性硬化症においても CCL20/CCR6 の関与は指摘されているか？</li> <li>・マウスの体重減少と臨床スコア悪化は神経障害を反映しているか、また臨床スコアの評価は客観的か？</li> <li>・CCL20、および CCR6 ノックアウトマウスにおいて胸腺、骨髄、脾臓、リンパ節におけるリンパ球の分布などに差がなかったとされているが、これは炎症状態では変わるのではないか？</li> <li>・制御性 dendritic cell が増えているのに神経学的障害が悪化しているのは矛盾しているのではないか？</li> <li>・今回確立したノックアウトマウスは CCL20 を発現するとされる皮膚や腸管における炎症性疾患の解明にも使えるのではないか？</li> <li>・これまで報告された CCR6-KO マウスの EAE の反応がグループごとで違う点について、遺伝的背景以外に要因はないのか？</li> <li>・ES を用いた方法と CRISPR/Cas9 を用いた方法でフェノタイプに違いが出たという報告はあるのか？</li> <li>・2020 年以降には CCR6-KO マウスに EAE 処置をした報告は無いのか？</li> <li>・EAE 誘導について性差はあるのか？（多発性硬化症では 15 歳から 50 歳の女性に好発）</li> <li>・CCL6-KO のデザインについて、ストップコドンはどこに入るのか？短いペプチドは発現しないのか？</li> <li>・Fig1G は CCR6 なのでは？</li> <li>・Fig4AB について、CCL20KO に比べて CCR6KO の方が症状はひどいのか？</li> <li>・Fig4A について、CCL20KO の体重は回復し始めている様に見えるが、飼育期間を延ばすと回復するのか？</li> <li>・Fig6E について、CCR6-KO では PD-L1 は増えているのか？</li> <li>・ヒトの多発硬化症では CCL20 や CCR6 の変異は認めているのか？</li> <li>・なぜ、C57BL/6 の遺伝背景を選択したのか？炎症や EAE に対する感受性の違いなどはあるのか？</li> <li>・i-GONAD 法を用いたのはなぜか？インジェクション法にくらべて何か利点があるのか？</li> <li>・Fig3C について、定常状態ではなく、EAE を誘導した際の脾臓の T cell, B cell, マクロファージの微小構造に変化はあるのか？</li> <li>・EAE の急性期と回復期ではそれぞれどのような分子メカニズムが働いているのか？</li> <li>・他の論文で報告されている CCR6-KO への EAE 誘導でも、回復期のみ表現型が認められるのか？</li> <li>・Fig3D について、LFB 染色にてピンクに染色されているのは何か？</li> <li>・EAE 病態には CCL20 や CCR6 以外のケモカインが関与していると考えているが、どのようなケモカインを想定しているのか？</li> </ul> <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 佐知 望美

## 論 文 題 目

CCL20/CCR6 chemokine signaling is not essential for pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis

(CCL20/CCR6 ケモカインシグナルは、多発性硬化症の実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデルにおける病態形成に必須ではない)

## 要 旨

目的: 多発性硬化症は、免疫系が神経のミエリン鞘を攻撃する自己免疫疾患である。ケモカイン受容体 CCR6 を発現する病原性 Th17 細胞と制御性 Treg 細胞のバランスは、疾患活動性を決定する上で重要である。血液脳関門から産生される CCR6 の同族リガンドである CCL20 が、これらの免疫細胞を中枢神経系に誘引していると推測されている。しかし、多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における CCL20 の病態的役割は、CCL20-ノックアウト (KO) マウスを用いて解析されていない。さらに、胚性幹 (ES) 細胞を介した相同組換えにより作製した CCR6-KO マウスの EAE の表現型は研究グループ間で一致していない。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、CCL20-KO マウスと CCR6-KO マウスを作製し EAE を誘導することで、多発性硬化症における CCL20/CCR6 の役割を解明することを目的とした。

方法: CRISPR/Cas9 システムを用いて、C57BL/6 を遺伝背景とする CCL20-KO マウスと CCR6-KO マウスを作製した。CCL20/CCR6 が胸腺、骨髄、脾臓の免疫細胞の遊走を制御しているかどうかを調べるために、フローサイトメトリーで細胞の割合を解析した。作製した CCL20-KO マウスと CCR6-KO に EAE を誘導し、体重、病態スコア、組織学的評価を野生型と比べた。さらに、CCL20-KO および CCR6-KO マウスにおける EAE 発症の原因を明らかにするために、フローサイトメトリー法と Real-time 法を用いて EAE 誘発マウスの中樞神経系 (CNS) における細胞浸潤およびサイトカイン産生を解析した。さらに、フローサイトメトリー法により、EAE 誘発マウスの脾臓における制御性樹状細胞 (DC) の割合を検討した。

結果: CCL20 欠損マウスと CCR6 欠損マウスにおける胸腺の T 細胞と骨髄の B 細胞の発生は正常であった。さらに、脾臓の構造および細胞集団も正常であった。慢性期の EAE の臨床的表現型は、野生型マウスに比べて両変異マウスでわずかに悪化していた。CNS の炎症性細胞浸潤と脱髄は、KO マウスと WT マウスで同様であった。CNS の CD4<sup>+</sup>T 細胞数は、両変異マウスと WT マウスで同じであった。両変異マウスと WT マウスにおける、Th17 と Treg 細胞の割合、CNS における IL-17 と TGF- $\beta$  mRNA の発現、および脾臓における DC とマクロファージの割合には有意な差は認められなかった。

考察: 同系統の C57BL/6 バックグラウンドで CRISPR/Cas9 を介した CCL20-KO および CCR6-KO マウスを用い、EAE の発症を調べたところ、野生型マウスと同様の病態形成を認めた。これらの知見は、CCL20/CCR6 を介した細胞遊走は必ずしも EAE の発症に必要ではなく、他のケモカインシグナルによって代償されている可能性が示唆された。自己免疫疾患におけるケモカインシグナルを介した EAE 発症の分子制御機構を解明するためには、さらなる研究が必要である。