

学位論文題名

サルコイドーシスにおける IL-18 と
その受容体の遺伝学的・細胞生物学的研究

学位論文内容の要旨

サルコイドーシスは全身に非乾絡性類上皮肉芽腫が発生する疾患で、発症に関する現在の見解は、遺伝素因を有する個体が何らかの外因の暴露を受けることによって発症するといふものである。近年は毎年 20% 近くの増加率を示しており、重要な間質性肺疾患の一つである。

サルコイドーシスの免疫病態は、CD4+ T 細胞と活性化された単球・マクロファージ系細胞の集積、および豊富なサイトカイン産生で特徴づけられる。特にサルコイドーシスの気管支肺胞洗浄液(BALF)には、多くの CD4+ T 細胞が回収され、それは IFN- γ と IL-2 を産生することやケモカイン受容体である CXCR-3 と CCR-5 を発現することなどから、サイトカインとその受容体のプロフィールはいわゆる Th1 タイプであると考えられている。

いわゆるサイトカインネットワークの中で、ある種のサイトカインは他のサイトカインの上位に位置し、そのサイトカインの誘導や抑制作用を発揮する指揮者的役割を持つ。サルコイドーシスにおける IFN- γ 産生に関しては、IL-12 と IL-18 がその役割を担う。すなわち IL-18 は IL-12 共存下で、強力に IFN- γ 産生を誘導する。実際サルコイドーシスにおいて、血清や気管支肺胞洗浄液(BALF)中の IL-12 や IL-18 濃度が上昇している。

本研究では、わが国の研究者によって発見された IL-18 のサルコイドーシスにおける役割を、遺伝因子としての意義と受容体の動向の二つの観点から検討した。

研究 1: サルコイドーシスにおける IL-18 遺伝子多型の意義

IL-18 遺伝子にはプロモーター領域に-137 (G/C)、-607 (C/A)、-656 (G/T)の三つの一塩基多型(以下 SNP)、エクソンに二つの同義置換 SNP が存在する。近年の報告によると、-137 (G/C)は IL-18 の転写活性や IFN- γ 産生と相関していることが報告されている。我々はまず、176名の健常対照者と161名のサルコイドーシス患者を対象として、プロモーター領域の三つの SNP とサルコイドーシスの発症や臨床像との相関を検討した。しかしながら、いずれの SNP の遺伝子型頻度や対立遺伝子頻度も、対照群と患者群で有意差を認めなかった。臨床経過との関連では、-607 (C/A)、-656 (G/T)のヘテロ個体では、単変量解析にて

寛解が遅延するとの結果が得られたが、性、発症年齢、罹患臓器数などを含めた多変量解析では、両多型とも独立した経過因子であるとは言えなかった。

一方、-607 (C/A)と-656 (G/T)はサルコイドーシス患者の血清 IL-18 濃度と有意な相関を認め、遺伝子型 CC、CA、AA あるいは GG、GT、TT の順に中央値が高値を示した。健常者では同様な相関を認めなかった。-607 (C/A)と-656 (G/T)の間には $D_s=0.986$ の強い連鎖不平衡が存在した。サルコイドーシス患者において三つの SNP のハプロタイプ推定値を求めた。その中で最も頻度の高い二つのハプロタイプ(-137G/-607C/-656G および -137G/-607A/-656T)を含む、4種類のルシフェラーゼレポーターベクターを作製し、培養細胞 THP-1 を用いて転写活性を測定した。その結果ハプロタイプ G/C/G を含むプロモーターの転写活性は、他方のハプロタイプを含むプロモーターのそれより有意に高く、血清 IL-18 濃度と遺伝子多型の結果と符合した。

以上より IL-18 プロモーター領域多型のハプロタイプ G/C/G を有しているサルコイドーシス患者では、IL-18 プロモーター活性が高く、遺伝子転写とさらに蛋白産生量の増強を通して、サルコイドーシスの病態に影響を与えると推測される。

研究 2:サルコイドーシスにおける IL-18 受容体の発現増強

IL-18 受容体は IL-18 α と IL-18 β の二つの subunit から構成されており、構造と機能が IL-1 受容体と類似している。IL-12 は IL-18 α の発現を誘導し、逆に IL-18 は IL-12 の受容体発現を誘導すると報告されており、相互増強関係にある。我々は BALF リンパ球と末梢血リンパ球について、21 名のサルコイドーシス患者と 8 名の健常者を対象に、IL-18 α 鎖の発現をフローサイトメーターにて検討した。

その結果、サルコイドーシスの BALF と末梢血の CD4+T 細胞では、対照者に比して有意に高い IL-18 α の発現比率を示した。またサルコイドーシスでは、BALF CD4+ T 細胞は BALF CD8+ T 細胞に比べて IL-18 α の発現比率が上昇していたが、健常者で同様な現象はみられなかった。

健常者末梢血リンパ球を用いた *in vitro* の実験で、CD4+ T 細胞は IL-2、IL-12、TNF- α などサルコイドーシスで発現が報告されているサイトカインにより IL-18 α の発現が誘導されたが、CD8+ T 細胞では IL-2 のみにより発現誘導が観察された。一方、サルコイドーシス患者、対照者ともに BALF 中の CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞の IL-18 α 発現比率は、末梢血のそれらに比して上昇していた。その機序として、BALF T 細胞での CD45RO+細胞の増加が考えられた。

結論としてサルコイドーシスにおける CD4+ T 細胞優位の IL-18 α の発現増強は、本疾患での IL-18/IL-18R 系に果たす Th1 細胞の重要な役割を強調するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

サルコイドーシスにおける IL - 18と その受容体の遺伝学的・細胞生物学的研究

サルコイドーシスは全身に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が発生する疾患で、その免疫病態は、Th1 細胞と活性化された単球・マクロファージ系細胞の集積、および豊富なサイトカイン産生で特徴づけられる。近年日本人により発見された IL-18 は、IL-12 共存下で、強力に IFN- γ 産生を誘導する。IL-18 遺伝子にはプロモーター領域に-137 (G/C)、-607 (C/A)、-656 (G/T)の三つの一塩基多型(以下 SNP)が存在する。そこで 176 名の健常対照者と 161 名のサルコイドーシス患者を対象として、これらの SNP とサルコイドーシスの発症や臨床像との相関を検討したが、有意な結果は得られなかった。

一方、-607 (C/A)と-656 (G/T)はサルコイドーシス患者の血清 IL-18 濃度と有意な相関を認め(-607: $p=0.021$ 、-656: $p=0.006$)、遺伝子型 CC、CA、AA あるいは GG、GT、TT の順に中央値が高値を示した。健常者では同様な相関を認めなかった。三つの SNP で構成されるハプロタイプの中で、最も頻度の高い二つのハプロタイプ(-137G/-607C/-656G および -137G/-607A/-656T)を含むプロモーター配列の転写活性は、ハプロタイプ G/C/G で他方のハプロタイプより有意に高く($p=0.001$)、血清 IL-18 濃度と遺伝子多型の相関と符合した。

IL-18 受容体は IL-18R α と IL-18R β の二つのサブユニットから構成されている。21 名のサルコイドーシス患者と 8 名の健常者を対象に、気管支肺胞洗浄液(BALF)リンパ球と末梢血(PB)リンパ球について、IL-18R α 鎖の発現をフローサイトメーターにて検討した。その結果、サルコイドーシス患者の BALF と PB の CD4+T 細胞では、健常者に比して有意に高い IL-18R α の発現比率を示した(BALF: $p=0.0002$ 、PB: $p=0.005$)。またサルコイドーシス患者では、BALF CD4+ T 細胞は BALF CD8+ T 細胞に比べて IL-18R α の発現比率が上昇していたが($p=0.001$)、健常者で同様な現象は観察されなかった。

健常者 PB リンパ球を用いた *in vitro* の実験で、CD4+ T 細胞は IL-2、IL-12、TNF- α などサルコイドーシスで発現が報告されているサイトカインにより IL-18R α の発現が誘導されたが、

CD8+ T細胞ではIL-2のみにより発現誘導が観察された。一方、サルコイドーシス患者、対照者ともにBALF中のCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞のIL-18R α 発現比率は、PBのそれらに比して上昇していた(サルコイドーシスCD4+ T細胞: $p=0.0001$ 、サルコイドーシスCD8+ T細胞: $p=0.023$ 、健常者CD4+ T細胞: $p=0.012$ 、健常者CD8+ T細胞: $p=0.012$)。その機序として、BALF T細胞でのCD45RO+細胞の増加と並行した、肺という臓器特異的な影響が反映されていると考えられた。

以上より、本研究によりIL-18遺伝子プロモーター多型はサルコイドーシス患者の血清IL-18濃度の規定因子のひとつであることが明らかとなった。またサルコイドーシスにおけるCD4+ T細胞優位のIL-18R α 発現増強は、本疾患でのIL-18/IL-18R系に果たすTh1細胞の重要な役割を、あらためて強調するものである。

審査にあたり、副査上出教授より 1)IL-18遺伝子多型とサルコイドーシス患者血清IL-18濃度の相関が、サルコイドーシスの活動性と関連しているか否か、2)他疾患において同様な相関が観察される可能性、3)IL-2によるIL-18R α 発現増強の機序などについて、副査清水教授より、1)皮膚病変のみのサルコイドーシス患者における、肺胞T細胞のIL-18R α の発現、2)IL-18遺伝子多型研究の展望と今後の方向性などについての質問があった。次いで主査の西村教授より、1)健常者とサルコイドーシス患者に共通した、肺胞T細胞によるIL-18R α 発現亢進の意義について質問があった。申請者はこれらの質問に対し、自験データと文献を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、IL-18遺伝子多型の意義をサルコイドーシスにおいて詳細に検討し、血清IL-18蛋白との相関の機序を遺伝子転写レベルで解明した点、IL-18R α の発現をサルコイドーシスで初めて詳細に解析した点で高く評価される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに、十分な資格を有するものと判定した。