シンポジウム I

サイトカインと疾患

4. IL-6 遺伝子異常発現と疾患

大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍病理 平野 俊夫

はじめに

インターロイキン6 (IL-6) は、免疫応答に重要な役割を果たしているだけでなく、急性期反応や、造血幹細胞の増殖分化にも関与している生体防御にとって中心的役割を果たしている多機能なサイトカインである¹⁾。我々は、IL-6遺伝子の異常発現により、自己免疫疾患や、腎炎および種々の癌が発生しうることを提唱してきた。すなわち、慢性関節リウマチ (RA) 等の自己免疫疾患、心房内粘液腫、Castleman 病、およびエイズ患者にみられる高ガンマグロブリン血症は、IL-6遺伝子異常発現の結果であることを示唆してきた²⁾。さらに、IL-6は、多発性骨髄腫の増殖因子であり、IL-6異常発現によって、ポリクローナルなB細胞異常のみならず、抗体産生細胞の癌化も発生しうることを提唱してきた³⁾。実際、IL-6トランスジェニックマウスにおいては、高ガンマグロブリン血症が発症するとともに、最終的に、形質細胞腫の発生に至ることを示した³⁾。このように、IL-6異常産生が、慢性炎症を伴う種々の疾患の発症に関与している可能性と、これらの疾患が何らかのウイルス感染と関連している可能性を考えると、IL-6が結核性胸膜炎患者胸水浸潤細胞が産生するB細胞分化因子の一つとして見いだされたことや⁴⁾⁵⁾、インターフェロン β_2 として報告されたこと⁶⁾、さらに HTLV-1感染T細胞株よりヒト IL-6が精製され、その cDNA がクローニングされた事実は非常に興味深い⁷⁾⁸⁾。

1. IL-6産生異常と自己免疫疾患

IL-6は種々の細胞に作用しうる多機能なサイトカインであるが、もう一つの特徴は、IL-6というのは種々の細胞によって産生されるということである(図1)。我々は、IL-6をTリンパ球から精製し、そのTリンパ球由来 IL-6をクローニングしたが、その後Tリンパ球だけでなく、マクロファージやBリンパ球が IL-6を産生することが分かった。さらに、これら免疫系の細胞だけでなく、例えばアストロサイトやグリア細胞、あるいは骨髄のストローマ細胞、そして線維芽細胞も IL-6を産生するし、最近では血管内皮細胞も IL-6を産生することが明らかとなっている。あるいはメサンギウム細胞も IL-6を産生することもわかってきている。このように IL-6はいろいろな細胞に作用し、しかもいろいろな細胞が産生する。この IL-6の産生は普通は非常に正確に制御されているが、これが何らかの原因で異常産生を起こしたらどうなるのであろうか。

我々は5年程前に、IL-6の異常産生によって、ポリクローナルな抗体産生細胞の異常が起こるのではないかとすることを示唆するデータを初めて得た。

心房内粘液腫という病気がある。これは外科では緊急手術の対象となる良性腫瘍であるが、内科的に見ると面白いことに、この患者は種々の自己免疫様の症状を呈する。すなわち関節痛や筋肉痛、あるいは不明熱、血沈の亢進、高ガンマグロブリン

Symposium on cytokines and diseases.

Abnormal expression of Interleukin 6 and diseases.

Tosio HIRANO, Division of Molecular Oncology, Biomedical Research Center, Osaka University Medical School.

ン血症,そして抗核抗体 (ANF) や抗 DNA, リウマチ因子というような自己抗体陽性あるいは急性期タンパクの異常高値といった症状を呈する.ところが手術で粘液腫細胞を除去することによってこういう症状は完全に消失する.すなわち,これらの症状は粘液腫があることによって誘導されるということを意味する.そして,この粘液腫が産生する何らかの物質がこれらの症状を誘導している可能性がある.そこで当時我々は,この粘液腫が IL-6 を産生しているのではないかと考え,粘液腫の培養上清中の IL-6 活性を調べたところ, IL-6 活性が認められた.しかもこの活性は IL-6 に対する抗体で吸収され,またそのカラムから溶出された.このデータから我々は,粘液腫が産生する IL-6 によって上に述べた種々の症状が起こっているのではないかとすることを初めて考えたわけである⁹⁾.

Castleman 病,これはリンパ節が腫脹し高ガンマグロブリン血症が起こり,しかも急性期タンパクが高値を示すとともに血小板の増加もきたす.

またある種の患者では単クローン性高 IgG 血症,あるいは形質細胞腫へと進行する例もあるといわれている.しかも,この患者においても先程の心房内粘液腫と同様,腫脹リンパ節を除去することによってこれらの症状は消失する.そこで,やはりこれらのことは IL-6 の産生と関係するのではないかという考えで,この患者の術前または術後の血清中の IL-6 を測定した.その結果,術前はガンマグロブリン,CRP,血小板,血沈すべて高値を示しているが,術後のこれらの値は全て正常化し,血清中の IL-6 はやはり術前に高く,術後には低くなっていた.この例でもやはり IL-6 が高いということと,様々な症状および腫脹リンパ節があるということが相関した.実際に手術でとったリンパ節の培養上清中の IL-6 活性を測定してみると,確かに免疫グロブリン産生を誘導する活性があり,その活性は抗 IL-6 抗体で中和された.この症例において,リンパ節中のどういう細胞が IL-6 を作っているかを検討するために,手術で得た標本を抗 IL-6 モノクローナル抗体で染色してみた.

図1. インターロイキン6(IL-6)の機能多様性

その結果、ジャーミナルセンターに一致してBリンパ球が検出でき、またこのBリンパ球に一致してIL-6抗体で染まる細胞、すなわちIL-6を産生している細胞が検出できた。以上のことから、Castleman病では、何らかの原因でジャーミナルセンターにある活性化されたBリンパ球が生体内でIL-6を産生していることが明らかになった¹⁰⁾。

次に、ポリクローナルな抗体産生細胞異常を呈する慢性関節リウマチ(RA)に注目した。RAの関節液中のIL-6を測ったところ、コントロールの変形性関節症(OA)に比べてRAの関節液中には大量のIL-6が認められた。実際に関節の滑膜組織を採取し、その滑膜組織の培養上清を、例えばBリンパ球に加えると濃度依存的に免疫グロブリン産生が誘導された。またIL-6依存的なマウスのハイブリドーマに加えるとそのマウスのハイブリドーマの増殖が濃度依存的に誘導され、しかもそれらの活性はIL-6に対する抗体を加えることによって完全に中和できた。すなわち滑膜組織に浸潤しているある種の細胞がIL-6を産生しているということが明らかとなった¹¹⁾。

IL-6の異常産生によって、RAにみられる症状がある程度説明しうる。IL-6が産生されると当然急性期タンパクが高値を示す。そして、ポリクローナルのプラズマサイトーシスが起こり、リウマチ因子が産生されるということもIL-6異常産生で説明できると思われる。さらに、なぜ血小板が増加するのかということも説明でき、またリウマチ患者ではEBウイルス陽性のBリンパ球が増えているということが報告されているが、IL-6はEBウイルス陽性のリンパ球の増殖を誘導し、EBウイルスでBリンパ球をトランスフォームするその効率をIL-6は非常に高めることができる。すなわち、IL-6が高いということで、EBウイルス陽性Bリンパ球がリウマチ患者で多いことがある程度説明つくのではないかと考えられる。

以上は全て臨床的なデータであり、IL-6の異常産生がポリクローナルなB細胞異常に関係しているのではないかとすることを示唆するデータである。

2. 形質細胞腫へのIL-6の関与

さらに、すでに述べた様にIL-6がモノクローナルな、すなわち抗体産生細胞の癌である多発性骨髄腫や形質細胞腫の発症に関係する可能性がある。IL-6は患者から採ったミエローマ細胞の増殖因子である。しかも患者から採ったミエローマ細胞はIL-6に対するレセプターを発現しており、さらに興味深いことはミエローマ細胞自身がIL-6を産生していることである。これらの事実から、IL-6はミエローマのオートクライン増殖因子だということが示唆される。もしそうであれば、IL-6に対する抗体を加えることによってミエローマの増殖を阻止できるはずである。実際にやってみると、ミエローマの自然増殖はIL-6に対する抗体を加えることによって抑制され、しかもこの抑制はIL-6特異的である。すなわち、過剰量のIL-6を加えることによってこの抑制効果は解除される。同様に、他の症例から得たミエローマの自然増殖も抗IL-6は抑制した。

以上のことを全てまとめると、IL-6の異常産生によって、ポリクローナルな抗体産生細胞異常、あるいは抗体産生細胞の癌の発症にIL-6の産生異常が関係しているのではないかとすることが示唆される。

RAのような慢性炎症を有している患者は、形質細胞腫の発症率が高いという統計がある。この統計は有意でないという反論もあるが、こういう統計があるということも事実である。さらに、結核性胸膜炎に長期間罹患している患者には高率にBリンパ腫が発症することが報告されている。しかも、動物実験においてはプリステンあるいはミネラルオイルをマウスに投与すると慢性炎症が誘導されて腹腔に肉芽組織ができるが、その肉芽組織の中にはプラズマサイトーシスが起こり、最終的には形質細胞腫が発症することがマウスで報告されている。この場合にこのプリステンの処理によってIL-6産生が誘導されることがわかっており、このIL-6は前述したように強力なプラズマサイトーマあるいはミエローマの増殖因子である。

さらに我々は、IL-6の異常産生がRAや心房内粘液腫、あるいはCastleman病でみられ、ポリクローナルプラズマサイトーシスと関係があるということを発見した。そして、これらのこういう患者においては、非常にまれではあるにしても、ミエローマかプラズマサイトーマが発症する例が報告されている。

さらに、IL-6というのはミエローマのオートクライン増殖因子であるということが判明し、これらのことをすべて考え併せてみると次のような仮説が提唱される。すなわち、何らかの原因でIL-6遺伝子の異常発現があるとポリクローナルなプラズマサイトーシスが起るのではないかと。プラズマサイトーシスが起って長年続いていると種々の癌遺伝子の変化が起こり、最終的にミエローマやプラズマサイトーマが発症するのではないかと、いうことをである(図2)。

これが事実かどうか証明するために、実際にIL-6の異常産生が起こるマウス、すなわちIL-6トランスジェニックマウスを作成した¹²⁾(図3)。ヒトの染色体遺伝子上流に、イムノグロブリンのヘビーチェーンのエンハンサーを結合し、マウスの受精卵に入れてトランスジェニックマウスをつくっ

てみると、全てのマウスが10週位で死んでしまうが、死ぬ前に開腹してみると非常に大きな脾臓と腫脹したリンパ節が発見された。図4はそのリンパ節の組織像であるが、形質細胞が密に詰まっている。病理学的には形質細胞腫といってもよい所見である。さらにこのプラズマセルの浸潤がリンパ組織だけでなく、肺や肝臓あるいは腎臓にもみられた。

また、血清中のタンパクの電気泳動をすると、4週、7週、10週と週齢がすすむにつれてイムノグロブリンフラクションが著明に増加していた。コントロールのマウスは遺伝子が入っていない兄弟であるが、これに比べると免疫グロブリン分画が著明に増加していた。逆に、ネガティブに制御されている急性期タンパクであるアルブミンは減っていた。他のトランスジェニックマウスも同様に、程度の差はあるがすべて免疫グロブリン分画が増加し、アルブミンが低下していた。

次に、実際に増加しているイムノグロブリンはどのようなものであるかをELISAで測定した。その結果IgG₁が増えていた。IgG₁が正常に比べて40倍から400倍にも増えているが、IgMやIgAや他のクラスのものは(中には10倍位増えているもの

図2. IL-6遺伝子異常発現とB細胞異常

Illustrated by T.Matsuda

図3. IL-6トランスジェニックマウス

図4. IL-6トランスジェニックマウスのリンパ節の組織像 (HE×200)

もあるが) IgG₁に比べてそれほど著明には増えていない。現在のところ理由は不明だが、C57BL/6マウスではIL-6トランスジェニックマウスを作った時にIgG₁が特異的に増えることがわかっている。しかもこれはポリクローナルに増えていることがわかっている。さらにトランスジェニックマウスの血清中の自己抗体を調べると、例えばリウマチ因子や1本鎖DNAに対する抗体価がコントロールに比べて上がっている。すなわち、単にポリクローナルに活性化が起こっているだけではなく、自己抗体の出現もみられることがわかった。ところがプラズマ細胞はポリクローナルであり、決して同系のマウスに移植できない。すなわち生

物学的にはおそらく癌ではないと思われる。病理学的には癌と診断してもよいであろうし、臨床的には癌といってもいいかもしれないが、生物学的にはまだ癌とはいえないだろうということがわかっている。そして、同系のマウスにプラズマ細胞自身は移せないが、レントゲン照射した同系マウスに骨髓細胞を移植することによって同様の症状、すなわちポリクローナルなIgG₁プラズマサイトーシスを誘導することができる。

現在、以上のことからIL-6の異常産生が起れば確かにポリクローナルなプラズマサイトーシスが起ることは証明できたと考えられる(図2)。そしてそれは、リウマチなどの種々のポリクローナルなプラズマサイトーシスを呈するような患者では多かれ少なかれIL-6の異常産生が関与しているであろう。ところがトランスジェニックマウスにおいては、ポリクローナルなプラズマサイトーシスが起るがどうもまだ癌にはなっていないであろうと思われる。プリステンを腹腔に投与すると慢性炎症が起こり、その中からポリクローナルプラズマサイトーシスが起り、最終的に移植可能なプラズマサイトーマが出現してくる。プリステンで誘導されるプラズマサイトーマとIL-6トランスジェニックマウスにみられるプラズマサイトーシスの違いについては、プリステンで誘

導されたプラズマサイトーマには全て c-myc の遺伝子の再構成が検出されるのに対してトランスジェニックマウスでは c-myc 再構成は起こっていないことである。一方、プリステンで誘導されるプラズマサイトーマの発生には、何らかの遺伝子的要因が関係していることが知られている。すなわち、プリステンによって、BALB/c マウスには高率に形質細胞腫が発生するが IL-6 トランスジェニックマウスの作製に用いた C57BL/6 マウスには、プリステン処理によって形質細胞腫は発生しない。最近、C57BL/6 由来の IL-6 トランスジェニックマウスを BALB/C マウスに戻し交配することによって、c-myc 遺伝子の再構成を有する移植可能なモノクローナル形質細胞腫が発症した。この事実は、IL-6 遺伝子異常発現によって最終的に、悪性形質細胞腫が発生することを証明している。

3. メサンギウム増殖性腎炎への IL-6 の関与

以上が IL-6 とポリクローナル B 細胞の異常あるいはモノクローナル B 細胞異常との関係であるが、IL-6 トランスジェニックマウスでわかったことを少し説明する。骨髄の線維像では成熟した巨核球の増加が認められたが、これは IL-6 が巨核球の成熟因子であるということの意味している。

さらに面白いことは IL-6 トランスジェニックマウスの腎臓の所見である。糸球体にメサンギウム細胞が非常に増えていてメサンギウム基質の増加がみられる。これはメサンギウム増殖性腎炎といってよい症状である。この所見が全てのトランスジェニックマウスにみられ、その全てのマウスは 10 週目で死んでしまい、強陽性の蛋白尿、メサンギウム細胞の増殖がある。そして IgM の軽度の沈着がみられ、全例においてメサンギウム増殖性腎炎が発症している。これらの事実は、メサンギウム増殖性腎炎の発症機序を考える上で非常に大きな所見であったと思う。

では IL-6 はどういうメカニズムでこの増殖性腎炎を発症するかということについて考えると、

一つの考えは IL-6 がメサンギウム細胞の増殖因子であろうということである。ラットのメサンギウム細胞を低濃度の FCS (ウシ胎仔血清) で培養すると増殖しないが、その状況下で IL-6 とともに培養するとその量依存的にメサンギウム細胞の増殖が誘導される。確かに IL-6 はメサンギウム細胞の増殖因子であることがわかった。さらに、メサンギウム細胞そのものが IL-6 の mRNA を発現し、しかもその培養上清中に IL-6 活性があるということがわかった。すなわち IL-6 はメサンギウム細胞のオートクライン増殖因子である¹³⁾。

実際に *in situ* の実験では、培養しているラットのメサンギウム細胞の細胞質中に IL-6 の mRNA が検出できる。また、メサンギウム増殖性腎炎の患者のバイオプシーで得た組織を IL-6 に対するモノクローナル抗体で染めると IL-6 陽性細胞が検出できる。すなわち、メサンギウム領域にある細胞が IL-6 を産生しているのではないかと考えられる。これにラットメサンギウム細胞の結果を併せて考えると、メサンギウム細胞自身が IL-6 をつくっているのではないかと考えられた。そして、腎炎の患者の尿中 IL-6 を測ってみると、メサンギウム増殖性腎炎のみに IL-6 活性が認められる。膜型腎炎やリポイドネフローゼの患者の尿中には、例外もあるが、IL-6 活性はほとんど認められない。もちろん健康人では認められない。メサンギウム増殖性腎炎のみに IL-6 活性が認められ、この病気との相関が認められた。さらに、メサンギウム増殖性腎炎が進行すると尿中に IL-6 が増加する。対照的に、IL-1 の場合は全く病気とは相関せず、健康人であろうがどのような種類の腎炎であろうが尿中に IL-1 が検出される。

以上の結果から、現在我々は IL-6 の異常産生、遺伝子の異常発現が、おそらくメサンギウム細胞に何らかの原因で誘導され、その結果メサンギウム増殖性腎炎が起きるのではないかと考えているわけである。

表1. IL-6と疾患

Polyclonal B cell abnormalities or autoimmune diseases
Cardiac myxoma
Rheumatoid arthritis
Castleman's disease
Alcoholic liver cirrhosis
Type 1 diabetes
Thyroiditis
Chronic proliferative diseases
Mesangial proliferative glomerulonephritis
Psoriasis
Malignancies
Plasmacytoma and myeloma
Lymphoma and leukemia
Renal cell carcinoma
Others
AIDS
Sepsis
Arteriosclerosis

4. 各種疾患へのIL-6の関与

表1はIL-6異常産生と関係している病気をまとめたものである。心房粘液腫、RA、あるいはある種の子宮頸癌やCastleman病などの患者にみられるポリクローナルB細胞異常はIL-6異常産生によって起こるのではないかと、あるいはAIDSの患者にみられるポリクローナルB細胞異常もIL-6の異常産生によるのではないかと、さらにアルコールで誘導される肝硬変においてみられるポリクローナルB細胞異常もIL-6異常産生だろうという報告があり、このようにIL-6とポリクローナルB細胞異常とは関連深いということが一層明らかになってきた。さらに多発性骨髄腫や、今回は触れなかったがある種のT細胞リンパ腫、あるいは腎細胞癌の増殖因子であり、こういう癌の発症にIL-6が関係していると考えている。

まとめ

このように、IL-6遺伝子異常発現によって自己免疫疾患や腎炎などの慢性増殖性疾患、あるいは癌などが発生すると考えられる。これらの疾患は、持続する慢性炎症によりIL-6等の増殖因子が持続的に産生され、慢性的な標的細胞の増殖が起こり、種々の病態を呈すると考えられる。一方、こ

の間に種々の癌遺伝子の活性化が発生すると考えられる。現在、自己免疫疾患や腎炎は、その発症にウイルスが関与している可能性が考えられており、持続的ウイルス感染によってIL-6等のサイトカイン遺伝子の活性化や、免疫応答の標的になりうる自己抗原をコードする遺伝子の活性化が誘導される結果、これらの疾患が発症する可能性が十分考えられる。

1978年～1980年にかけて、大阪府立羽曳野病院の結核病棟で、結核性胸膜炎の患者胸水リンパ球が、多量のB細胞分化因子を産生することを発見し⁴⁾、その一分子がIL-6であったこと⁵⁾を考えると、過去10年間のIL-6に関する我々の一連の研究が常に疾患と深く結びついていたことに深い感慨を覚える。現在我々は阪大医学部において、RA等の自己免疫疾患組織におけるIL-6遺伝子を活性化する分子を同定する努力を行っており、この研究が1日も早く成功することを夢見るものである。

本研究は、大阪大学細胞工学センター（岸本忠三教授）にて、多くの共同研究者となされたものである。岸本教授をはじめ、これらの共同研究者に深謝します。トランスジェニックマウスの研究は、熊本大学遺伝研の山村研一教授らとの共同研究である。

文 献

- 1) Hirano T, Kishimoto T. Chapter 14: Interleukin 6. In Handbook of Experimental Pharmacology vol. 95/I "Peptide Growth Factors and Their Receptors" edited by M. B. Sporn and A. B. Roberts, Springer-Verlag, p633, 1990.
- 2) Hirano T, et al: Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunology Today 11 : 443-449, 1990.
- 3) Hirano T: Interleukin 6(IL-6) and its receptor: Their role in plasma cell neoplasias. Int. J. Cell Cloning 9 : 166, 1991.
- 4) Hirano T, et al: Human helper T cell factor(s) (ThF). I. Partial purification and characterization. J Immunol 126 : 517, 1981.
- 5) Teranishi T, et al: Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lympho-blastoid cell lines and identification of T cell replacing factor-(TRF) like factor(s). J. Immunol. 128 : 1903, 1982.

- 6) Weissenbach J: Two interferon mRNA in human fibroblasts: In vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 126 : 517, 1980.
 - 7) Hirano T: Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 5490, 1985.
 - 8) Hirano T, et al: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324 : 73, 1986.
 - 9) Hirano T, et al: Human B cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 228, 1987.
 - 10) Yoshizaki K, et al: Pathological significance of interleukin 6(IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* 74 : 1360, 1989.
 - 11) Hirano T, et al: Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 18 : 1793, 1988.
 - 12) Suematsu S, et al: IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 7547, 1989.
 - 13) Horii Y, et al: Involvement of interleukin-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 143 : 3949, 1989.
-