

71. サイトカインによる生体恒常性維持機構の解明

西城 忍

Key words : サイトカイン, 自己免疫疾患, 感染防御

千葉大学 真菌医学研究センター
感染免疫分野

緒 言

近年, Interleukin (IL)-17 A を産生する CD4⁺T 細胞サブセットの 1 つである Th17 を中心とした感染防御や種々の疾患との関連が注目されている. 我々はこれまでに, IL-1 α , β , $\alpha\beta$, receptor antagonist (IL-1Ra), IL-17A などのサイトカイン KO マウスを用い, これらのサイトカインが関節リウマチなどの炎症や自己免疫の発症において重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた^{1,3)}. さらに, 樹状細胞やマクロファージで発現が見られる C 型レクチンファミリーのメンバーである Dectin-1 や Dectin-2 の KO マウスを作製し, これらがそれぞれ真菌の膜成分である β グルカン, α マンナンのセンサー分子であることを明らかにするとともに, これらのシグナルの下流で活性酸素種の発現を誘導することにより直接真菌を殺す一方で, IL-1, IL-6, IL-23 などのサイトカイン分泌を促し, Th17 細胞の分化を誘導することにより, 産生された IL-17 A が抗真菌活性を発揮することを明らかにした^{2,3)}. これらの結果は, 真菌感染が Th17 細胞の分化誘導を介して, 自己免疫やアレルギーの発症に関与している可能性も示唆している. しかしながら, たとえば, 関節リウマチの発症過程において, 何が引き金となり関節に対する自己免疫が誘導され, IL-1 や IL-17 など種々のサイトカインがどの細胞で作られ, どのようにお互いの発現を制御しながら病態を形成するのか, など詳細なメカニズムはほとんど分かっていない. そこで本研究では, 自己免疫性関節炎発症における組織特異性がどのようにして決定されるかを解明することを目的とした.

IL-17A の産生細胞として, Th17 細胞以外に T 細胞受容体 (TCR) が γ 鎖と δ 鎖で構成される $\gamma\delta$ T 細胞が知られている. マウスでは, TCR γ 遺伝子座は 7 個の $V\gamma$ ($V\gamma 1$ - $V\gamma 7$) 遺伝子がコードされている. これらのレパートリーのうち, $V\gamma 4$ ⁺細胞と $V\gamma 6$ ⁺細胞から IL-17A が分泌されることが知られている. $V\gamma 6/V\delta 1$ ⁺細胞は, 発生後期の胸腺で成熟し, 子宮, 膣, 肺, 表皮, 腹腔などに局在する. 一方, $V\gamma 4$ ⁺細胞はどちらかというところ広範なレパートリーを持ち, 胎児と成体のどちらの胸腺でも成熟し, 血流にのり表皮や 2 次リンパ組織に局在する. しかし, これらの細胞の詳細や役割, 特に炎症性疾患における役割に関してはほとんど明らかとなっていない. さらに, $\gamma\delta$ T 細胞で, CCR6, CCR2, CXCR6 などのケモカインレセプターの発現が亢進しているという報告もあるが, 炎症局所へ遊走するメカニズムなどに関しても十分な知見はない. そこで本研究では, IL-1Ra KO マウス関節炎のモデルマウスとして用い, IL-17A 産生メカニズムに関して解析を行うことにより, 炎症反応の誘導機構を解明した.

方 法

1. 関節炎モデルマウス

関節炎のモデルマウスとして, IL-1Ra KO マウスを使用した. 関節炎の発症は, 目視により点数化した. 0 点, 変化なし; 1 点, 軽度の腫脹; 2 点, 明らかな腫脹; 3 点, 重度の腫脹と関節の強直, とし, 四肢それぞれ 3 点を満点とした (1 個体あたり 12 点満点).

2. IL-17A レポーターマウスの作製

IL-17A の発現に伴い EGFP を発現するレポーターマウスを作製した⁴⁾ (図1)。また、そのマウスを BALB/cA 背景に8世代戻し交配を行い、IL-1Ra KO マウスと交配した。

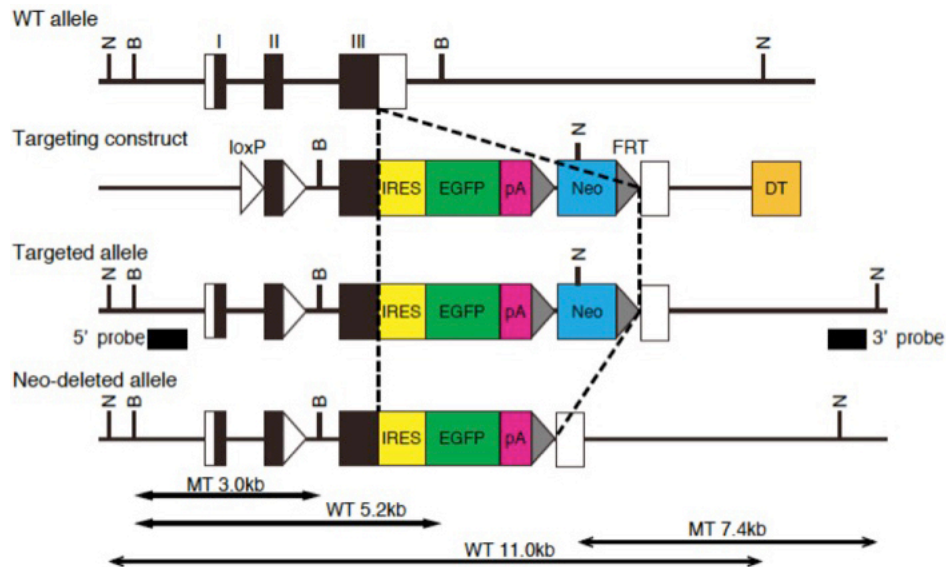


図1. IL-17A レポーターマウスの作製.

Internal ribosome entry site (IRES)-EGFP-polyadenylation signal (pA)とネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) を含む断片を、IL-17A 遺伝子のストップコドンの直下に挿入したものをベクターとして用いた。Neo の前後には FLP リコンビナーゼ認識標識 (FRT) を挿入しており、FLP リコンビナーゼの導入により、Neo を除去した。

3. FACS 解析

関節浸潤細胞の解析は、マウスより関節を採取、ヒアルロニダーゼとコラゲナーゼで処理を行い、単一細胞に分離後、各種抗体を用いて行った。

4. 抗体投与

4週齢の IL-1Ra KO マウス (関節炎未発症) に抗 TCR $\gamma\delta$ 抗体 (UC7-13D5) を $400\mu\text{g}$ 、あるいは抗 CD4 抗体 (GK1.5) を $250\mu\text{g}$ を1週間に2回腹腔投与し、関節炎の発症率と重症度を観察した。

結果

IL-1Ra は、内在性の IL-1 抑制因子であり、I 型 IL-1Ra KO マウスは4週齢頃より自己免疫性の関節炎を自然発症し、8週齢から10週齢で100%の個体に病変が見られる。ところが、IL-17A KO マウスと交配すると、関節炎の発症はほぼ完全に抑制されることから、IL-17A 依存性であることが示された⁵⁾。そこで、IL-17A 産生細胞を同定する目的で、リンパ節及び炎症局所である関節における IL-17A 産生細胞の解析を行った。その結果、IL-17A 産生細胞は、CD4⁺のいわゆる Th17 だけではなく $\gamma\delta$ T 細胞からも産生されていることがわかった^{6,7)}。興味深いことに、リンパ節では IL-17A 産生細胞として、Th17 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞が同程度であるのに対し、関節では IL-17A 産生細胞のほとんどが $\gamma\delta$ T 細胞であることがわかった。そこで、Th17 と $\gamma\delta$ T 細胞のどちらがより強く病態形成に関与しているのかを明らかにする目的で、抗体を投与することにより各々の細胞を除去し、関節炎の発症率を検討した。Th17 細胞を除去するために抗 CD4 抗体、 $\gamma\delta$ T 細胞を除去するために抗 TCR- $\gamma\delta$ 抗体を投与した。その結果、抗 CD4 抗体、抗 TCR- $\gamma\delta$ 抗体のどちらの抗体を投与しても、IL-1Ra KO マウスの関節炎の発症率は有意に低下した。このことから、IL-17A の産生細胞として Th17 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞のどちらも重要であることが示された (図2)。

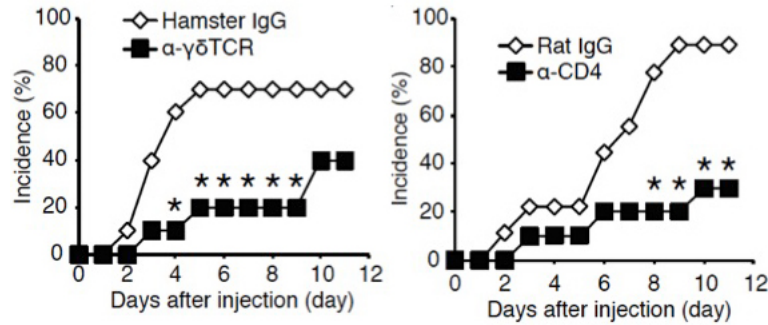


図2. 細胞除去による関節炎発症抑制効果.

IL-1Ra KO マウスに抗 $\gamma\delta$ 抗体,あるいは抗 CD4 抗体を投与することより各々の細胞の除去を行った. その結果, どちらの細胞を除去しても関節炎の発症は有意に低下した. * $p < 0.05$ (χ^2 test).

次に, 関節で主要な IL-17A 産生細胞である $\gamma\delta$ T 細胞をより詳細に検討する目的で, 種々の表面マーカーの発現を検討した. その結果, CCR2, CXCR6, CCR6 などのケモカインレセプターが発現していること, とくに約 95% の $\gamma\delta$ T 細胞で CCR2 を発現しているが, CCR5, CXCR4, CCR9 は発現していないことが明らかとなった. そこで, これらの $\gamma\delta$ T 細胞がリガンド特異的に関節へ遊走している可能性を検討する目的で, 関節におけるケモカインリガンドの発現を検討した. その結果, CCR2 リガンドである CCL2, CXCR6 リガンドである CXCL16, CCR5 リガンドである CCL5, CXCR4 リガンドである CXCL12 の発現が IL-1Ra KO マウスの関節で亢進していることがわかった. これらの結果から, CCL2-CCR2 axis が IL-17A 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞の遊走に関与している可能性が示された.

次に $V\gamma$ サブセットを解析したところ, IL-17A 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞の $V\gamma$ サブセットは約 63% が $V\gamma 6^+$ で, 約 37% が $V\gamma 4^+$ であった. さらに, このどちらのサブセットも CCR2 を発現していた. そこで, 同じケモカインレセプターを発現しながら, 炎症局所である関節では, IL-17A 産生は主に $V\gamma 6^+$ である点に注目し, 以下の解析を行った. まず, IL-1R の発現の検討を行ったところ, IL-1Ra KO マウスでは, リンパ節と関節の両方で IL-1R の発現が亢進していることが見出された. さらに, 関節では IL-17A を産生している $\gamma\delta$ T 細胞はほとんどの細胞が IL-1R を発現していること, この IL-1R を発現している細胞は $V\gamma 6^+$ であることが明らかとなった. 興味深いことに, この IL-1R の発現は, IL-1Ra KO マウスの新生児の胸腺ですでに確認され, その細胞は $V\gamma 6^+$ であることがわかった. また, IL-1R の発現にともない, CCR2 が発現してくることもわかった. また, リガンドの IL-1 β に関しては, 正常なマウスでも関節で発現しているが, 関節炎を発症するとその発現が顕著に亢進することが確認された. 以上の結果から, IL-1Ra KO マウスで見られる関節へ浸潤している CCR2 $^+$ $V\gamma 6^+$ 細胞は, 元々 IL-1R を発現しているため, IL-1 β と IL-23 の刺激により IL-17 を産生し, 関節炎の発症へとつながっている可能性が示された.

考 察

本研究では, IL-1Ra KO マウスを関節炎モデルマウスに用い, IL-17A 産生細胞の解析を行った. その結果, CD4 $^+$ の Th17 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の両方が重要であることが明らかとなった. さらに, SCID マウスを用いた細胞移植の系では CD4 $^+$ 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の両方を同時に移植した時にはじめて関節炎の発症が認められた. 関節炎を自然発症した IL-1Ra KO マウスでは, 関節に $\gamma\delta$ T 細胞の集積が認められるのに対し, SCID マウスに $\gamma\delta$ T 細胞のみを移植しても, 関節への浸潤はみられず, CD4 $^+$ 細胞とともに移植した場合は, $\gamma\delta$ T 細胞が関節へ集積した. これらの結果から, おそらく CD4 $^+$ 細胞は $\gamma\delta$ T 細胞の局在化に必須であることが考えられる.

$\gamma\delta$ T 細胞の炎症部位への集積に関し, ケモカインレセプターの発現を解析したところ, $\gamma\delta$ T 細胞では CCR2 の発現し, 関節局所ではそのリガンドである CCL2 が発現していることがわかった. さらに, 抗 CCL2 抗体の投与でも関節炎の発症は抑制できることから, CCR2-CCL2 axis を介した $\gamma\delta$ T 細胞の関節への集積が病態形成に重要であることが示唆される.

IL-17A 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞に関し, IL-1Ra KO マウスでは $V\gamma 6^+$ の $\gamma\delta$ T 細胞が主要な産生細胞であることを見出した. $V\gamma 6^+$ 細胞は, これまで組織に定着している細胞であると考えられてきた. しかし, 今回, 抗 CCL2 抗体投与に

より関節炎の発症が一部抑制できたこと、また $\gamma\delta$ T 細胞の SCID マウスへの移植実験から、CCR2⁺V γ 6⁺細胞が関節へ遊走することが示されたことなどから、CCR2-CCL2 axis の重要性が示唆されたが、抗 CCL2 抗体投与では完全に発症を抑制することができなかった。従って、組織に定着している V γ 6⁺細胞も関節炎に関与している可能性は排除できない。しかしながら、本研究で IL-17A 産生細胞に関し、特に $\gamma\delta$ T 細胞に関して詳細な解析を行ったことで、関節炎発症の新しいメカニズムが提唱された。そのことは、新しい治療戦略へと結びつく可能性を示している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京理科大学生命医科学研究所の岩倉洋一郎および秋津 葵である。

文 献

- 1) Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M. & Iwakura, Y. : Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.*, **19** : 313-320, 2000.
- 2) Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S. & Ishigame, H. : The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.*, **226** : 57-79, 2008.
- 3) Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. : Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*, **34** : 149-162, 2011.
- 4) Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S. H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K. & Iwakura, Y. : Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat. Immunol.*, **8** : 39-46, 2007.
- 5) Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S. H., Komatsu, R., Miura, N., Adachi, Y., Ohno, N., Shibuya, K., Yamamoto, N., Kawakami, K., Yamasaki, S., Saito, T., Akira, S. & Iwakura, Y. : Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity*, **32** : 681-691, 2010.
- 6) Akitsu, A., Kakuta, S., Saijo, S. & Iwakura, Y. : Rag2-deficient IL-1 receptor antagonist-deficient mice are a novel colitis model in which innate lymphoid cell-derived IL-17 is involved in the pathogenesis. *Exp. Anim.*, **63** : 235-246, 2014.
- 7) Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. : Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.*, **171** : 6173-6177, 2003.
- 8) Ikeda, S., Saijo, S., Murayama, M. A., Shimizu, K., Akitsu, A. & Iwakura, Y. : Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *J. Immunol.*, **192** : 1449-1458, 2014.
- 9) Akitsu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Chung, S. H., Ikeda, S., Shimizu, K., Kubo, S., Liu, Y., Umemura, M., Matsuzaki, G., Yoshikai, Y., Saijo, S. & Iwakura, Y. : IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2⁺V γ 6⁺ $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Commun.*, **6** : 7464, 2015.
- 10) Haas, J. D., Ravens, S., Düber, S., Sandrock, I., Oberdörfer, L., Kashani, E., Chennupati, V., Föhse, L., Naumann, R., Weiss, S., Krueger, A., Förster, R. & Prinz, I. : Development of interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity*, **7** : 48-59, 2012.