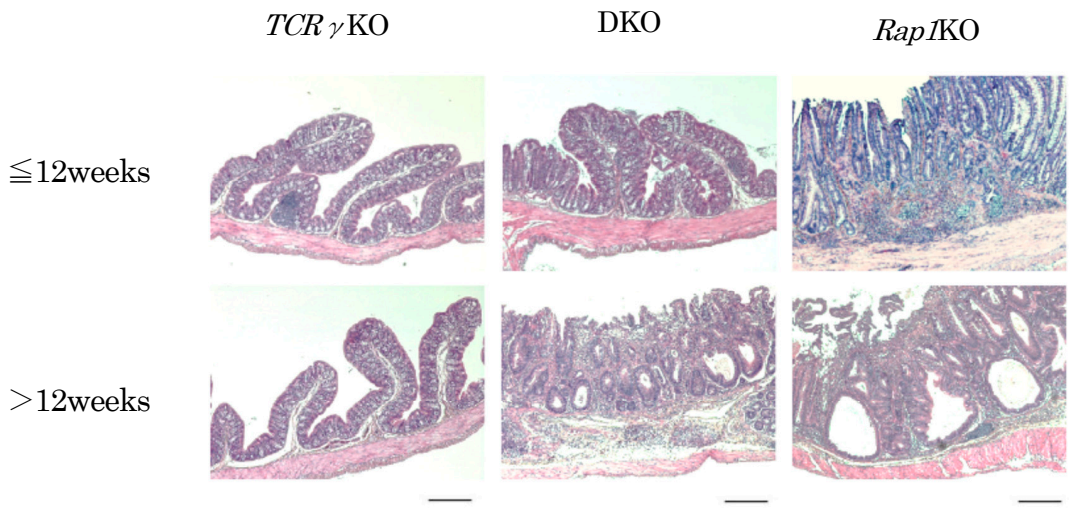
117　CD4⁺細胞特異的*Rap1*欠損による大腸炎・がんの発症機構	石原　沙耶花

【目的】潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患は、腸内細菌に対する過剰応答によって引き起こされる自己免疫疾患であることが示唆されているが、原因不明の難病で新規治療法の開発が求められている。生涯にわたって炎症の再燃と寛解を繰り返し、高い確率で多発性大腸がんを発症する。我々は、T 細胞特異的に *Rap1* を欠損した conditional knockout マウス（*Rap1* KO マウス）を作製したところ、生後数週間で大腸炎及び高度異型腫瘍を自然発症し、速やかに大腸がんへ進展することがわかった。本研究課題ではこの大腸炎自然発症モデルマウスを用いて、γδ T 細胞の大腸炎発症における役割について解析を行った。

【方法】*Rap1* KO マウスと *TCRγ* KO マウスを掛け合わせ、全身で γδ T 細胞を欠損させた double knockout マウス（DKO マウス）を作製し、体重の増減、炎症スコアを比較した。また、フローサイトメトリーを用いて、*Rap1* 欠損マウスで増加していた γδ T 細胞のサブセット解析を行った。

【結果】*Rap1* KO マウスでは、大腸炎発症時に腸管膜リンパ節や大腸の粘膜固有層で γδ T 細胞が著しく増加していた。DKO マウスでは大腸炎の発症時期が遅れたことから、γδ T 細胞は大腸炎の発症初期の悪化に関与している可能性が示唆された。また、増加した γδ T 細胞のサブセット解析を行ったところ、mLN では Vγ4 が増加し、LI-LP では Vγ6 が減少しており、それぞれのサブセット中の IL-17A 産生細胞の割合は増加していることが明らかとなった。

12 週齢以下ならびに 12 週齢以上の *TCRγ* KO マウス、*Rap1* KO マウス、DKO マウスの大腸組織の HE 染色像



117. CD4^{+}細胞特異的 *Rap1* 欠損による大腸炎・がんの発症機構

石原　沙耶花

北里大学 理学部 生物科学科 免疫学講座

Key words：大腸炎，γδ T 細胞

緒　言

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Diseases: IBD）は、腸内細菌に対する免疫寛容が破綻し、共生関係にある腸内細菌に対し、免疫応答が生じることで引き起こされる自己免疫性疾患である。原因不明の難病であり、厚生労働省の特定疾患に指定されているが、決定的治療法は見出されていない。生涯にわたって炎症の再燃と寛解を繰り返し、発症から 10 年を経過すると高い確率でがんを発症する。現在のところ、デキストラン硫酸塩（DSS）をマウスに摂取させることにより、大腸粘膜を直接損傷させバリア機能を低下させることで潰瘍性大腸炎を誘導するモデルが広く利用されているが、大腸粘膜のバリア機能を直接障害することで炎症反応を惹起するため、免疫応答は関与しておらず、根本的な発症機構の解明に至っていない。

γδ T 細胞は γδ TCR を発現する T 細胞サブセットで、主に皮膚や腸管に存在し、自然免疫と適応免疫の両方で重要な役割を果たす。γδ T 細胞は TCRγ 鎖として Vγ1/2/4/5/6/7 のいずれかを発現し、発現する TCRγ 鎖によって細胞の局在や産生するサイトカインが異なる。近年 IBD に γδ T 細胞の関与を示した報告が数多くあるが［1〜4］、大腸炎の促進または抑制のどちらに働くのかは不明な点が多く、既存の DSS モデルでは大腸炎発症の初期において γδ T 細胞がどのように機能するのかはわかっていなかった。

我々は、CD4 陽性細胞特異的に低分子量 G タンパク質である *Rap1 a* 及び *b* を欠損した conditional knockout マウス（*Rap1* KO マウス）を作製したところ、生後数週間で下痢、血便に伴う体重減少が認められ、高度異型腫瘍を伴う激しい大腸炎を自然発症し、速やかに大腸がんへ進展することを見出した［5］。*Rap1* KO マウスでは γδ T 細胞が腸管関連組織で顕著に増加していたことから、大腸炎の発症に γδ T 細胞が関与している可能性が考えられた。そこで本研究課題では、独自に開発した大腸炎自然発症モデルマウスを用いて、γδ T 細胞の大腸炎発症における役割について解析を行った。

方法および結果

野生型（f/f）または *Rap1* KO（-/-）マウスの腸管膜リンパ節（Mesenteric lymph nodes: mLN）及び、大腸粘膜固有層（Large intestine lamina propria: LI-LP）の細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて γδ T 細胞の割合、細胞数に変化が生じている可能性を検討した。その結果、*Rap1* KO マウスでは、mLN、LI-LP の両方で γδ T 細胞の割合、細胞数の顕著な増加が認められた（図 1）。

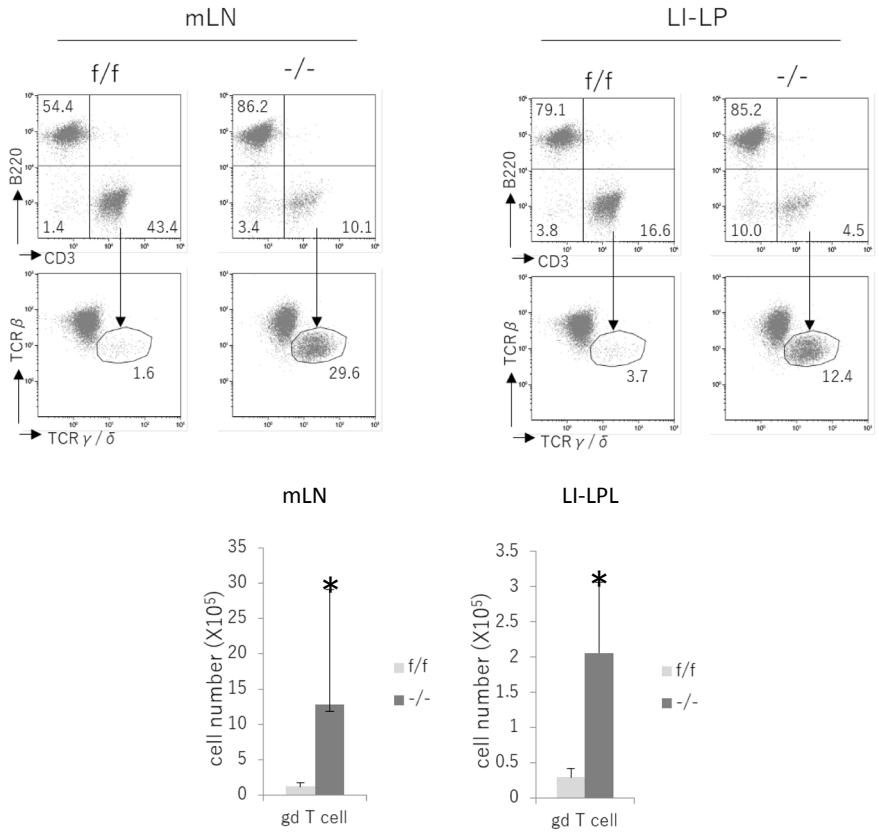


図 1. *Rap1* KO マウスの mLN 及び LI-LP では γ δ T 細胞が顕著に増加する

野生型（-/-）及び *Rap1* KO（-/-）マウスの mLN 及び LI-LP から細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて γ δ T 細胞の割合と細胞数を解析した。上のプロット図は各組織の CD3 陽性細胞中の γ δ T 細胞の割合を、下のグラフは細胞数を示す。*P < 0.02（student's t-test）。

次に、*Rap1* KO マウスで増加していた γδ T 細胞が、大腸炎の促進、または抑制のどちらに関与するのかを検討するため、*Rap1* KO マウスと *TCRγ* KO マウスを掛け合わせ、γ δ T 細胞が全身で欠損した *Rap1* KO マウスである double knockout マウス（DKO マウス）を作製した。作製した *TCRγ* KO マウス、*Rap1* KO マウス、DKO マウスの体重を 4 週齢から 12 週齢にかけて測定したところ、DKO マウスは *Rap1* KO マウスと比べて有意な体重減少は認められなかった（図 2-A）。また 12 週齢までは、DKO マウスでは下痢や血便の症状もほとんど見られなかった。しかしながら、12 週齢以上になると DKO マウスでも下痢や血便の症状が見られたため、12 週齢以下のマウスと、12 週齢以上のマウスの 2 群に分けて、大腸をホルマリン固定し HE 染色した組織像の炎症スコアを比較した。その結果、12 週齢以下では *Rap1* KO マウスと DKO マウスとで炎症スコアに有意な差が認められたが、12 週齢以上になるとその差はほとんどなくなった（図 2-B, C）。以上の結果より、DKO マウスで大腸炎の発症が遅れたことから、γ δ T 細胞は、大腸炎の発症初期において炎症の促進に関与している可能性が示唆された。

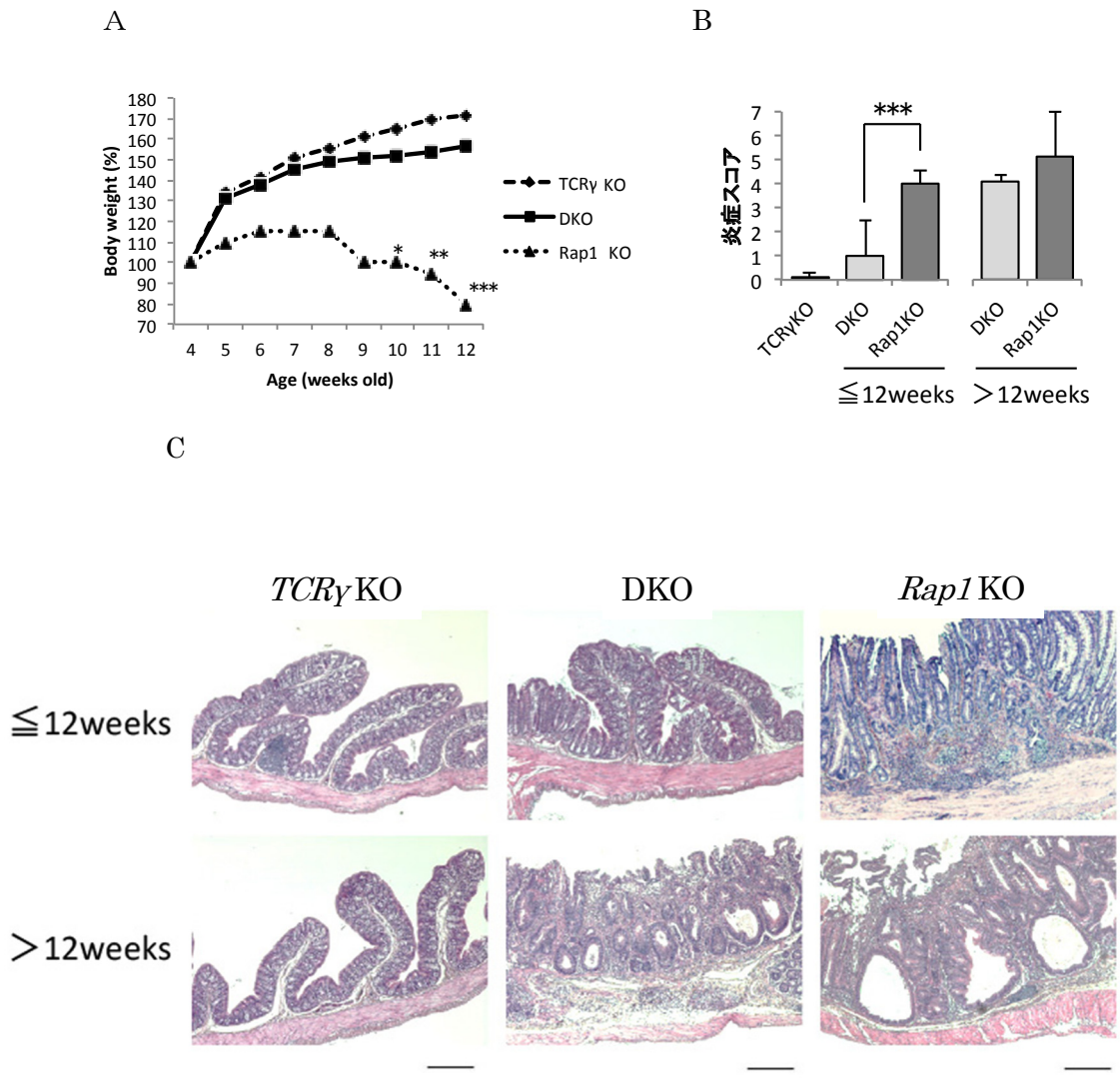


図 2. DKO マウスは Rap1 KO マウスと比較して大腸炎の発症が遅れる

A）*TCR*γKO マウス、*Rap1* KO マウス、DKO マウスの 4 週齢から 12 週齢までの体重測定の結果を示す。

B）それぞれのマウスの結腸の HE 染色像を観察し、炎症スコアを測定した。

C）それぞれのマウスの結腸を摘出し、ホルマリン固定後、HE 染色を行った。

*P < 0.02, **P < 0.01, ***P < 0.001（student's t-test）. Scale bar: 200 μ m。

Rap1 KO マウスで増加していた γ δ T 細胞が大腸炎の促進に関与している可能性が考えられたことから、続いて増加していた γ δ T 細胞のサブセットを、フローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、mLN では Vγ4 が増加しており、LI-LP では Vγ6 が減少していることがわかった（図 3）。

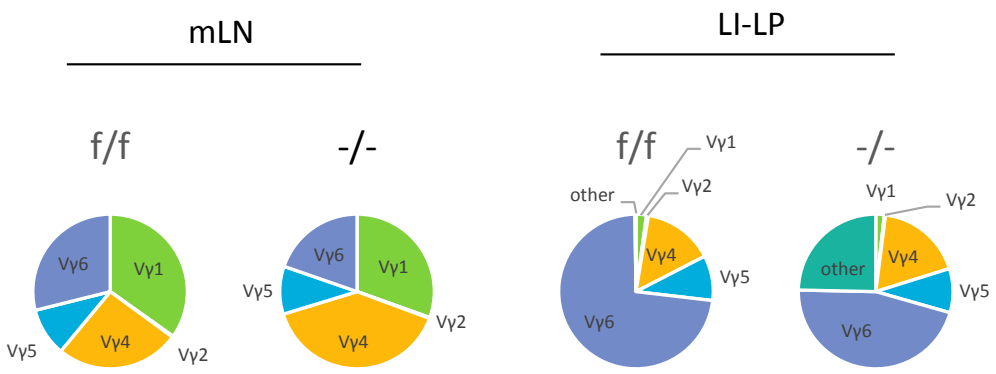


図 3. *Rap1* KO マウスでは、mLN と LI-LP の γδ T 細胞のサブセットが変化する

野生型（-/-）及び *Rap1* KO（-/-）マウスの mLN 及び LI-LP から細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて Vγ1/2/4/5/6 の割合を解析した。グラフはそれぞれの Vγ 鎖を発現する γδ T 細胞のサブセットの割合を示す。

mLN と LI-lP で Vγ4 と Vγ6 の割合に大きく変化が生じていた。この二つのサブセットは IL-17A を産生するサブセットとして知られている。そこで、Vγ4 と Vγ6 の IL-17A 産生細胞の割合に変化が生じている可能性を検討した。mLN または LI-LP より細胞を単離し、PMA（phorbol 12-myristate 13-acetate）と ionomycin を添加し、4 時間 37℃で刺激後、細胞を固定し、IL-17A 抗体を用いて細胞内染色することで、それぞれのサブセット中の IL-17A 産生細胞の割合を解析した。その結果、どちらの組織においても、Rap1 KO マウスの Vγ4 と Vγ6 サブセット中の IL-17A 産生細胞の割合が増加していることがわかった（図 4）。

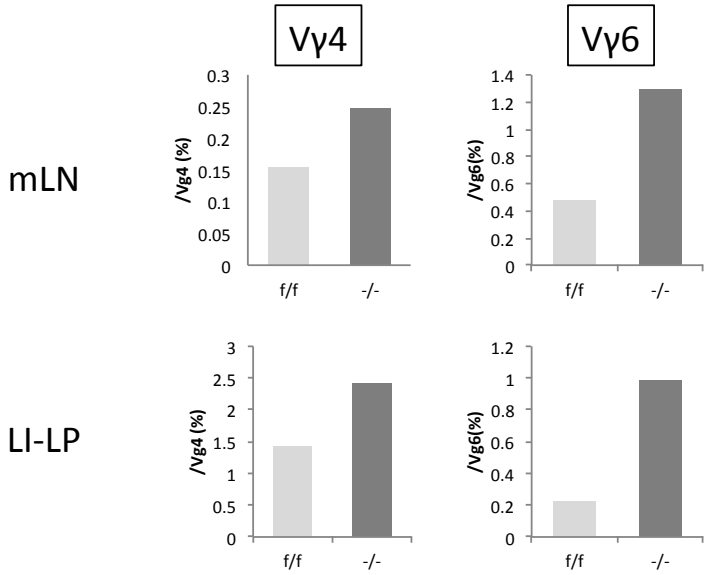


図 4. *Rap1* KO マウスでは、mLN と LI-LP 内の IL-17A 産生 Vγ4, Vγ6 細胞の割合が増加する

野生型（-/-）及び *Rap1* KO（-/-）マウスの mLN 及び LI-LP から細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて Vγ4, Vγ6 サブセット中の IL-17A 産生細胞の割合を解析した。グラフはそれぞれの組織中の各サブセットの IL-17A 産生細胞の割合を示す。

考　察

Rap1 KO マウスでは大腸炎発症時に mLN と LI-LP 内の γδ T 細胞が顕著に増加しており、γδ T 細胞を欠損させた DKO マウスでは大腸炎の発症が遅れたことから、γδ T 細胞は大腸炎の発症初期において悪化に関与する可能性が示唆された。また、増加した γδ T 細胞のサブセット解析を行ったところ、mLN では Vγ4 が増加し、LI-LP では Vγ6 が減少しており、それぞれのサブセット中の IL-17A 産生細胞の割合は増加していることが明らかとなった。Vγ4 は実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）や関節炎（CIA）モデルなどの自己免疫疾患マウスモデルにおいて、IL-17A を産生することで症状を悪化させているという報告がある［6］。今回 *Rap1* KO マウスの γδ T 細胞において IL-17A 産生能が上昇していたことから、大腸炎の発症初期に γδ T 細胞が IL-17A を産生して好中球・マクロファージを誘引することによって炎症を促進し、T 細胞と相互作用することでさらに大腸炎を悪化させている可能性が考えられた。今後は γδ T 細胞と T 細胞との関係性について検討していくことで、IBD の発症原因・病態形成機構の解明へとつながっていくことが期待される。

謝　辞

最後に、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Kühl A.A et al. Role of Gamma Delta T Cells in Inflammatory Bowel Disease. Pathobiology. 2002–03;70:150–155. DOI: 10.1159/000068147. PMID: 12571419
2) Kadivar M et al. CD8αβ+ γδ T Cells: A Novel T Cell Subset with a Potential Role in Inflammatory Bowel Disease. J Immunol. 2016 Dec 15;197(12):4584-4592. DOI: 10.4049/jimmunol.1601146. PMID: 27849165
3) Takahiro Tsuchiya et al. Role of γδT Cells in the Inflammatory Response of Experimental Colitis Mice J Immunol November 15, 2003, 171 (10) 5507-5513. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5507. PMID: 14607957
4) Noriyuki Fujikado et al. Aire Inhibits the Generation of a Perinatal Population of Interleukin-17A-Producing γδ T Cells to Promote Immunologic Tolerance Immunity. 2016 Nov 15; 45(5): 999–1012. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.023. PMID: 27851927
5) Ishihara S., et al. Dual functions of Rap1 are crucial for T-cell homeostasis and prevention of spontaneous colitis. Nat Commun. 2015 Dec 4;6:8982. DOI: 10.1038/ncomms9982. PMID: 26634692
6) Christina L. Roark et al. γδ T cells clonally expand, produce IL-17, and are pathogenic in collagen-induced arthritis. J Immunol. 2007 Oct 15; 179(8): 5576–5583. PMCID: PMC2768546. PMID: 17911645.