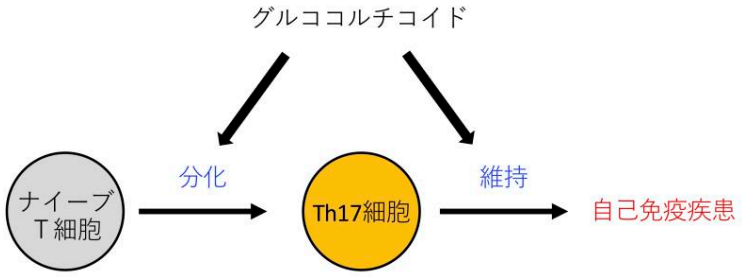
21　グルココルチコイドによる免疫活性化機能の解明	生田　宏一

【目的】グルココルチコイド（糖質コルチコイド）は副腎皮質ホルモンの一つであり、グルココルチコイド受容体（GR）を介して広汎な生体防御機能を発揮する重要なステロイドホルモンである。グルココルチコイドの血中濃度は、ヒトでは昼に高く夜に低い概日変動をする（マウスでは逆転）。免疫系との関係では、グルココルチコイドの抗炎症効果や免疫抑制効果などの薬理作用が注目され広く治療に用いられているが、その生理的な機能についてはほとんど不明であった。我々は、グルココルチコイド濃度の日内変動がインターロイキン７受容体（IL-7R）とケモカイン受容体 CXCR4 の発現を誘導することで、T 細胞のリンパ器官への再配置と免疫応答能を高めることを明らかにした。本研究では、グルココルチコイドが炎症誘導性の Th17 細胞の働きを高め、感染免疫応答や自己免疫疾患の発症を促進することを明らかにする。本研究により、強い抗炎症効果で知られるグルココルチコイドが、生理的な濃度では逆に炎症性免疫応答を高め免疫疾患を誘導するという新たな概念を確立する。

【方法】本研究では、まず、T 細胞特異的 GR 欠損マウスのナイーブ T 細胞を培養して、Th17 細胞への分化誘導が障害されるかを解析した。次に、T 細胞ならびに Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスの腸管粘膜固有層の Th17 細胞が減少しているかを、フローサイトメトリーにて解析した。さらに、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにミエリン塩基性タンパク質ペプチドを免疫して実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を誘導し、その神経症状が軽減するかどうかを解析した。

【結果】まず、T 細胞特異的 GR 欠損（CD4-Cre x GR-flox）マウスのナイーブ T 細胞を IL-1β、IL-23、IL-6 存在下で Th17 細胞に分化誘導した。その結果、IL-17A を発現する Th17 細胞の割合が野生型 T 細胞に比べて激減した。次に、T 細胞ならびに Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスの腸管粘膜固有層の Th17 細胞を調べたところ、野生型マウスと比べて 30～40%減少していた。以上の結果から、グルココルチコイドはナイーブ T 細胞からの Th17 細胞の分化と維持を促進する働きを持つことが示された。さらに、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにミエリン塩基性タンパク質ペプチドを免疫して実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を誘導したところ、野生型マウスと比べて神経症状が劇的に軽減した。また、脊髄に浸潤しているリンパ球を解析すると、IL-17A を発現する Th17 細胞の割合が野生型マウスと比較して 40%減少していた。以上の結果から、グルココルチコイドは Th17 細胞の分化と維持を促進することで、自己免疫疾患の発症を高める働きを持つことが明らかになった。本研究により、強い抗炎症効果で知られるグルココルチコイドが、生理的な濃度では逆に炎症性免疫応答を高め免疫疾患を誘導するという新たな概念が確立された。

グルココルチコイドによる Th17 細胞誘導を介した自己免疫応答の亢進機構



21. グルココルチコイドによる免疫活性化機能の解明

生田　宏一

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 免疫制御分野

Key words：グルココルチコイド，免疫系，Th17 細胞，自己免疫疾患，体内時計

緒　言

グルココルチコイド（糖質コルチコイド）は副腎皮質から産生されるステロイドホルモンのひとつである。グルココルチコイドは、脂肪組織での脂肪の分解と肝臓での糖新生を促し、脳に働いて認知機能を高め、交感神経の作用を高めるなど多岐にわたる生体防御機能を持つ。さらに、強い抗炎症作用と免疫抑制作用を持ち、抗炎症剤や免疫抑制薬としてアレルギーや自己免疫疾患などのさまざまな病気の治療に用いられている。グルココルチコイドの産生は、概日リズムとストレスにより誘導されることが知られている。グルココルチコイドの濃度は、ヒトでは通常早朝にピークとなり昼間に高く夜間に低下するという日内変動をしているが、マウスは夜行性のために周期が逆転している。また、さまざまなストレスの刺激により短期間スパイク状に産生される。したがって、グルココルチコイドはストレスにより誘導されるストレスホルモンの一つであり、生体防御ホルモンと考えられてきた。しかしながら、抗炎症作用や免疫抑制作用というグルココルチコイドの機能は生体防御とは矛盾しており、いまだ統一的な理解にはほど遠い。

インターロイキン７（IL-7）は、初期の B 細胞と T 細胞において増殖や生存に必須であるだけでなく、免疫グロブリン重鎖や T 細胞受容体（TCR）γ鎖の DNA 組換えを誘導することでリンパ球の分化を促進している［1, 2］。また、IL-7 は自然リンパ球の分化と維持にも重要な働きをしているため、リンパ器官の形成にも関係している。さらに、 IL-7 はナイーブ T 細胞と記憶 T 細胞の維持にも必要である。IL-7 はリンパ球が発現する IL-7 受容体（IL-7R）と結合することで作用する。IL-7R の発現はリンパ球の分化段階で厳密に制御されており、概ね IL-7Rα鎖遺伝子の転写レベルで調節されている。我々は、まず、IL-7Rα鎖遺伝子座のプロモーターの上流 3.6 kb にエンハンサーが存在し、NF-κB やグルココルチコイド受容体（GR）などの転写因子がエンハンサーに結合することで、IL-7Rα鎖遺伝子の転写を誘導することを示した［3, 4］。さらに、日内変動する生体内のグルココルチコイドが T 細胞の IL-7R の発現を誘導することでケモカイン受容体 CXCR4 の発現を上昇させ、T 細胞のリンパ器官への集積を促すことで免疫応答能を高めることを明らかにした［5］。この結果は、強い免疫抑制作用を持つとされる従来のグルココルチコイドが、日内変動する生理的な濃度では免疫機能を亢進させるという、これまでの概念を覆す大きな発見であった。また、同時に、グルココルチコイドが免疫機能の日内変動を誘導することも示された。

Th17 細胞は、病原微生物の感染初期において上皮細胞などの破壊によって放出されるサイトカインにより活性化され、IL-17 を分泌することで周辺の繊維芽細胞を刺激しさまざまなサイトカインやケモカインを放出させ、結果として好中球を誘引して炎症を誘導する。また、Th17 細胞は真菌に対する感染防御に必要であることが知られている。さらに、Th17 細胞は、乾癬などの炎症性疾患や自己免疫疾患の一部でその関与が示唆されている。マウスでは、Th17 細胞が自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の誘導に関与していることが報告されている。Th17 細胞は、ナイーブ T 細胞から IL-6 と TGF-β などのサイトカインの存在下で誘導され、その分化には転写因子 RORγt が重要な働きをする。レチノイン酸や腸内細菌が Th17 細胞の誘導に関係することが知られている。しかしながら、生体内においてどのようなシグナルが Th17 細胞の分化を引き起こすのかについては、よく分かっていない。グルココルチコイド分泌低下症（Addison 病）において真菌感染症が増加することから、グルココルチコイドが Th17 細胞の誘導に関与する可能性が示唆されるが、このメカニズムに関しては不明である。

本研究では、T 細胞ならびに Th17 細胞特異的な GR 欠損マウスを用いて、グルココルチコイドが Th17 細胞の分化と機能を高め自己免疫疾患の発症を促進するという仮説を検証した。その結果、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて

Th17 細胞の分化と維持が障害され、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）の発症が減弱することが示された。したがって、強い抗炎症作用で知られるグルココルチコイドが、生理的な濃度では逆に自己免疫疾患を誘導する働きを持つという逆説的な概念が確立された。

方　法

1. マウス

CD4-Cre、IL-17-Cre、GR-flox マウスは、C57BL/6 の遺伝的背景で 8～12 週齢の同腹で同性のマウス間で比較した。動物実験は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の動物実験委員会の承認の下に、京都大学の動物実験に関する規定に従って行った。

2. フローサイトメトリー

以下の蛍光色素ならびにビオチンで標識された抗体を使用した。TCR β（H57-597）、CD3 ε（145-2C11）、CD4（RM4.5）、CD8 α（53-6.7）、CD25（7D4）、CD44（IM7）、NK1.1（PK136）、$\gamma\delta$ TCR（GL-3）、IFN-γ（XMG1.2）、IL-4（11B11）、IL-17A（TC11-18H10.1）、IL-17RB（MUNC33）、Bcl-2（A19-3）、Ki-67（SolA15）、Foxp3（FJK-16s）。標識抗体は BDBioscience、eBioscience、BioLegend、TONBOBiosciences から購入した。

マウスを麻酔下で安楽死させ、各臓器より細胞を単離し、抗体を添加した染色バッファー（PBS、0.1% BSA、0.05% NaN_3）に懸濁し、4℃で 20 分間染色した。細胞内染色では、FoxP3、Ki67 を検出する際には FoxP3 Staining Buffer Set（Invitrogen）、サイトカインを検出する際には IC Fixation Buffer（Invitrogen）を用いて細胞を固定し、Permeabilization Buffer（Invitrogen）で浸透処理と染色を行った。フローサイトメトリー解析は、FACS Verse と LSR Fortessa（BD Bioscience）を使用し、FlowJo ソフトウエアを用いて解析を行った。

3. ナイーブ CD4 T 細胞の培養によるヘルパーT 細胞分化

リンパ節細胞からナイーブ CD4 T 細胞を MojoSort Mouse CD4 Naïve T Cell Isolation Kit（BioLegend）を用いて分離した。ナイーブ T 細胞を RPMI 培地（10%FBS、50 μM 2-mercaptethanol）で 7 日間培養した。5 μg/ml 抗 CD3 抗体（3C11）と 10 μg/ml 抗 CD28（37.51）で固層化した。Th1 細胞分化条件では上記抗体に加えて、20 ng/ml human IL-2（BioLegend）、10 ng/ml mouse IL-12 p70（PEPROTECH）、5 μg/ml 抗 IL-4 抗体を加えて培養した。Th2 細胞分化条件では 20 ng/ml human IL-2（BioLegend）、10 ng/ml mouse IL-4（BioLegend）、5 μg/ml 抗 IFN-γ 抗体を加えた。また、細胞内サイトカインを検出するため、分化培養後の細胞を 50 ng/ml PMA（Cayman）と 2 μg/ml ionomycin（Cayman）を加え 37℃で 1 時間刺激した後に、サイトカインの分泌を阻害するため 20 μg/ml brefeldin A（Cayman）を添加して 3 時間培養した。

4. 実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導

8～12 週齢の雌マウスに MOG ペプチドとジフテリア毒素を腹腔内投与し、2 日後にさらにジフテリア毒素を投与し、神経症状を経時的にモニタリングした。また、14 日後に脊髄を取り出して、コラーゲナーゼにて消化後にリンパ球を単離した。

結　果

1. グルココルチコイドは Th17 細胞の分化を促進する

グルココルチコイドが Th17 細胞の分化にどのような影響を与えるのかを解析した。まず、T 細胞特異的 GR 欠損（CD4-Cre GR-flox/flox）マウスとコントロール（GR-flox/flox）マウスからナイーブ T 細胞を調製し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激するとともに IL-6 と TGF-β を添加して 4 日間培養することで、Th17 細胞への分化を誘導した。培養した細胞における細胞内の IL-17A をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、GR 欠損 T 細胞からの Th17 細胞の分化が、コントロール T 細胞と比較して大きく減少した（図 1）。また、IL-1β、IL-23、IL-6 を添加して pathogenic な Th17 細胞を誘導したところ、これも約 3 分の 1 に減少した。以上の結果から、*in vitro* においてグルココルチコイドが Th17 細胞の分化を促進することが示唆された。

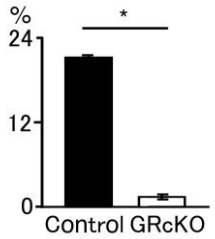


図 1. グルココルチコイドは Th17 細胞の分化を促進する

T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスのナイーブ T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激するとともに IL-6 と TGF-β を添加して 4 日間培養することで、Th17 細胞への分化を誘導した。細胞をフローサイトメトリー解析して、IL-17A を発現する細胞のパーセントを算出した（n = 3）。Student's t-test で検定した。* $p < 0.05$。

2. T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて Th17 細胞が減少する

次に、グルココルチコイドが生体内において Th17 細胞の分化にどのような影響を与えるのかを解析した。腸管粘膜固有層に多い Th17 細胞は腸内細菌叢によって誘導されることが知られている。そこで、まず、T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスの小腸粘膜固有層のリンパ球を単離し、PMA とイオノマイシンにて刺激した後に、IL-17A の発現を細胞内染色とフローサイトメトリーにて解析した。その結果、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて IL-17A 陽性の Th17 細胞の割合が約 40%減少していた（図 2）。一方、IFN-γ を産生する Th1 細胞の分化には有意な違いはなかった。したがって、生体内においてグルココルチコイドが Th17 細胞の分化を亢進する働きを持つことが明らかになった。

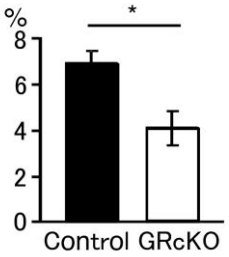


図 2. T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて Th17 細胞が減少する

T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスのナイーブ T 細胞の小腸粘膜固有層のリンパ球を単離し、PMA とイオノマイシンにて刺激した後に細胞内染色とフローサイトメトリーにて IL-17A の発現を解析した（n = 3）。Student's t-test で検定した。* $p < 0.05$。

続いて、グルココルチコイドが生体内において Th17 細胞の維持にどのような影響を与えるのかを解析した。Th17 細胞特異的 GR 欠損（IL-17-Cre GR-flox/flox）マウスとコントロール（GR-flox/flox）マウスの小腸粘膜固有層のリンパ球を単離し、PMA とイオノマイシンにて刺激した後に細胞内染色とフローサイトメトリーにて IL-17A の発現を解析した。その結果、Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて Th17 細胞の割合が約 30%減少していた。したがって、グルココルチコイドが生体内において Th17 細胞の維持を高める働きを持つことが明らかになった。

リンパ球を欠損する RAG2 ノックアウトマウスに野生型マウスから単離した制御性 T 細胞を欠くナイーブ CD4 T 細胞を移入すると、約 4 週間後に慢性の炎症性大腸炎を発症する。そこで、T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスからナイーブ CD4 T 細胞を単離して、それぞれ RAG2 ノックアウトマウスに移入して炎症性大腸炎を誘導した。その結果、GR 欠損 T 細胞を移入したマウスにおいて体重減少が軽減して、大腸炎の症状も弱くなった。さらに、大腸の粘膜固有層における IL-17A を産生する Th17 細胞の頻度が 5 分の 1 に減少していたが、IFN-γ を産生する Th1 細胞の頻度には変化がなかった。

3. T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて実験的自己免疫性脳脊髄炎が軽減する

グルココルチコイドが炎症誘導性の Th17 細胞の分化と維持を亢進することから、Th17 細胞が発症に関わる炎症性疾患や自己免疫疾患の発症にも関係していることが考えられる。そこで、T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスに MOG ペプチドとジフテリア毒素を投与し、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を誘導した。その結果、コントロールマウスでは、13 日目から 17 日目にかけて神経症状が増悪し 21 日目以降なだらかに減弱した（図 3)。一方、GR 欠損マウスでは時間的経過は変わらないものの、神経症状の程度がコントロールの 5 分の 1 に著減した。さらに、脊髄に浸潤したリンパ球を単離しフローサイトメトリー解析したところ、T 細胞特異的 GR 欠損マウスでは Th17 細胞の割合が約 40%減少していた。以上の結果から、グルココルチコイドが Th17 細胞の分化と維持を亢進し、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を促進することが明らかとなった。

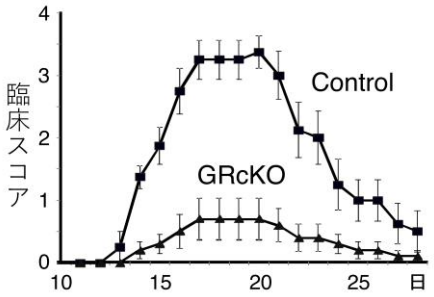


図 3. T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて実験的自己免疫性脳脊髄炎が軽減する
T 細胞特異的 GR 欠損（GRcKO）マウスとコントロール（Control）マウスに MOG ペプチドとジフテリア毒素を投与し、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を誘導した。

考　察

近年、グルココルチコイドが IL-7R と CXCR4 の発現を誘導することで、T 細胞の再循環と免疫応答能を高めることが明らかとなった［5]。これは、強い免疫抑制作用を持つグルココルチコイドが、日内変動する生理的な濃度では免疫機能を亢進させる機能を持つというこれまでの概念を覆す発見であった。本研究ではこのグルココルチコイドの免疫賦活機能を発展させ、グルココルチコイドが Th17 細胞の機能を亢進することで自己免疫疾患の発症を促進するという新たな概念を確立した（図 4)。グルココルチコイドはその免疫抑制作用から自己免疫疾患の治療によく使用されるが、内在性グルココルチコイドがそれに相反する機能を持つということには注意する必要がある。本研究では、ヒト多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎を実験系として用いたが、今後は、同様に Th17 細胞の関与が示唆される関節リウマチに関しても研究を進めることが期待される。また、体内のグルココルチコイド濃度が日内変動することが、一日の時間帯による自己免疫病の症状の変化とも関係する可能性がある。

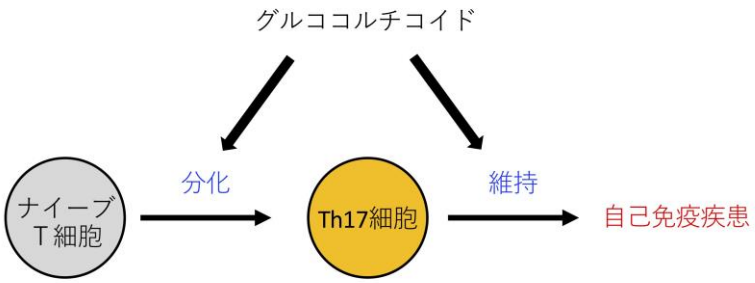


図 4. グルココルチコイドによる Th17 細胞誘導を介した自己免疫応答の亢進機構
グルココルチコイドは Th17 細胞の分化と維持を亢進することで、自己免疫疾患の発症を促進する。

また、Th17 細胞は炎症誘導性の機能を持つことから、グルココルチコイドが Th17 細胞を介して感染免疫応答を賦活する作用を持つことが期待される。グルココルチコイド分泌低下症（Addison 病）において真菌感染症が増加すること、ならびに Th17 細胞が真菌感染に対する免疫応答に重要であることから、グルココルチコイドが Th17 細胞の亢進を介して抗真菌免疫応答を亢進させる可能性が考えられる。さらに、ストレスもグルココルチコイドの分泌を引き起こすため、さまざまなストレスによって発症する消化管の炎症についても、グルココルチコイドによる Th17 細胞の亢進を介した炎症応答が上昇することが関係している可能性が考えられ、今後の研究が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学大学院医学研究科の榛葉旭恒博士、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の廣田圭司博士、ドイツ癌研究センターの Günther Schütz 博士である。

文　献

1) Ye SK, Maki K, Kitamura T, Sunaga S, Akashi K, Domen J, Weissman IL, Honjo T, Ikuta K. Induction of germline transcription in the TCRγ locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. Immunity. 1999 11(2):213-23. Epub 1999/09/15. PMID: 10485656 DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80096-5

2) Ye SK, Agata Y, Lee HC, Kurooka H, Kitamura T, Shimizu A, Honjo T, Ikuta K. The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCRγ locus by Stat5 and histone acetylation. Immunity. 2001 15(5):813-23. Epub 2001/12/01. PMID: 11728342 DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00230-8

3) Lee HC, Shibata H, Ogawa S, Maki K, Ikuta K. Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor α promoter by glucocorticoid receptor. J Immunol. 2005 174(12):7800-6. Epub 2005/06/10. PMID: 15944284 DOI: 10.4049/jimmunol.174.12.7800

4) Abe A, Tani-ichi S, Shitara S, Cui G, Yamada H, Miyachi H, Kitano S, Hara T, Abe R, Yoshikai Y, Ikuta K. An enhancer of the IL-7 receptor α-chain locus controls IL-7 receptor expression and maintenance of peripheral T cells. J Immunol. 2015 195(7):3129-38. Epub 2015/09/04. PMID: 26336149 DOI: 10.4049/jimmunol.1302447

5) Shimba A, Cui G, Tani-ichi S, Ogawa M, Abe S, Okazaki F, Kitano S, Miyachi H, Yamada H, Hara T, Yoshikai Y, Nagasawa T, Schutz G, Ikuta K. Glucocorticoids drive diurnal oscillations in T cell distribution and responses by inducing interleukin-7 receptor and CXCR4. Immunity. 2018 48(2):286-98 e6. Epub 2018/02/06. PMID: 29396162 DOI: 10.1016/j.immuni.2018.01.004