

感染症リスクを低減できる自己免疫疾患治療法の確立

東京大学大学院 医学系研究科 免疫学

岡本 一男

1. はじめに

IL-17を産生するヘルパーT細胞サブセット「Th17細胞」は、関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患の病態形成に深く関わる (Korn et al, *Annu. Rev. Immunol.*, 2009)。その治療標的としての有望性故に、昨今Th17細胞研究は国際競争が激しく、抗IL-23p40抗体 (Ustekinumabなど)、抗IL-17抗体 (AIN457)などのTh17細胞特異的抗体製剤や (Takatori et al., *Mod. Rheumatol.* 2008)、分化必須因子・ROR γ tに対する低分子阻害剤の開発 (Huh et al., *Nature* 2011; Solt et al., *Nature* 2011)が急速に進んでいる。一方、Th17細胞とは別に、IL-17を産生する自然免疫系細胞が近年続々同定され、感染防御にはTh17細胞といった獲得免疫細胞ではなく、細菌に応答して迅速にIL-17を産生できる自然免疫系細胞が菌体排除に重要であるという、新たな概念が提起された (Cua, D.J., *Nature, Rev., Immunol.*, 2010)。これら「IL-17産生性自然免疫系細胞」は、Th17細胞と酷似して、IL-23依存性に生体内で発生し、ROR γ tを高く発現している。そのため上記の抗体製剤やROR核内受容体阻害剤といった治療戦略では、Th17細胞に加えてIL-17産生性自然免疫系細胞も標的にされ、感染症リスクを高める可能性が指摘されている。そこで本研究では、Th17細胞とIL-17産生性自然免疫系細胞における性質上の相違点を明らかにすることで、自己免疫性Th17細胞に特化した治療法開発の分子基盤を築くことを目指した。

2. 方法

IL-17と、IL-17ファミリーに属するIL-17Fは表皮細胞などに作用し、抗菌タンパク質やケモカインを誘導し菌体排除に働く。実際、IL-17とIL-17Fの二重欠損マウスはSPF環境下でも眼瞼・鼻腔・口腔周囲に黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*)の定着が起り、著明な感染症病態を呈することが報告されている (Ishigame, *Immunity*, 2009)。しかしながら、どのような細胞がIL-17を産生して菌体排除に携わるかは不明である。申請者はこれまでに、1) 野生型マウスの眼瞼にSAを人為的に播種すると、結膜内 $\gamma\delta$ T細胞とTh17細胞がIL-17/IL-17Fを強く産生すること、2) 一方で、Rag1欠損マウス (T・B細胞を欠損している)の眼瞼にSAを播種すると、リンパ組織誘導 (LTi)様細胞に類似するCD3-Thy1+細胞が高くIL-17を産生する、という知見を見出している。以上の結果より、SA感染防御で働くLTi細胞などの自然免疫系細胞の細菌感知機構を理解し、Th17細胞との相違点を見出すことで、新たなTh17細胞特異的な制御法の確立に繋がると考えられた。そこで、①*S. aureus*感染に応答するTh17細胞とIL-17産生性自然免疫系細胞の遺伝子発現プロファイルを作成し、双方の遺伝子発現レベルでの特性の相違を解析する。②*S. aureus*応答性IL-17産生細胞におけるサイトカインの効果を検証し、さらに③Th17細胞を用いたプロテオーム解析を通じて、Th17細胞を特異的に制御できるような創薬ターゲットの探索に取り組んだ。

3. 研究成果

①Th17細胞とIL-17産生性自然免疫系細胞における遺伝子発現解析

マウスの *I17a* 遺伝子座に eGFP 遺伝子を組み込んだレポーターマウス (*I17a*-eGFP KI マウス; 米国 BIOCOTYGEN 社より購入)を用いることで、IL-17産生細胞を固定することなくセル・ソーターを用いて分離精製することが可能である。実際、*I17a*-eGFP KI マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)を施すと、脾臓・リンパ節にて GFP 陽性 CD4 T細胞が多く認められ、さらに脊髄においても GFP 陽性細胞の浸潤が病態の重症度と相関して認められることを確認した。そこで *I17a*-eGFP KI マウスの脾臓・リンパ節より、Th17細胞を eGFP 発現を指標にしてセル・ソーターを用いて単離した。また *I17a*-eGFP KI マウスより naïve CD4⁺ T細胞を単離し、*in vitro*培養系にて IL-6、TGF- β 、IL-23 存在下で CD3/28 刺激を行い、Th17細胞に分化誘導させた。さらに *I17a*-eGFP KI マウスの眼瞼部に黄色ブドウ球菌感染を施し、眼瞼粘膜組織より IL-17産生性 $\gamma\delta$ T細胞を回収した。また T・B細胞を欠損する *Rag1*欠損

バックグラウンドの *Il17a*-eGFP KI マウスに、同様に黄色ブドウ球菌感染を施し、眼瞼結膜組織における eGFP 陽性細胞を単離した。以上の eGFP 陽性細胞を各種細胞膜マーカーに体する抗体により染色し、フローサイトメトリーで解析を行い、また RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行うことにより、遺伝子発現プロファイルの作成を試みた。その結果、*S. aureus* 感染に応答する IL-17 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞は、V γ 4 陽性もしくは V γ 6 陽性の $\gamma\delta$ T 細胞であることが判明した。このことは、上皮組織に存在する $\gamma\delta$ T 細胞 (V γ 5 陽性)とは異なる細胞集団であることを意味し、またこのような $\gamma\delta$ T 細胞が結膜組織に存在することはこれまで報告がなされていない。また、結膜組織内の eGFP 陽性 IL-17 産生性自然免疫系細胞は、LTi 様細胞とは性質を異にし、CD3⁻CD4⁻Thy1⁺CCR6⁺という独特な性質を有する自然免疫系細胞であることが判明した。なお、この性質に類似する自然免疫系細胞は、過去に腸管粘膜固有層に存在することが報告されているが (*Buonocore, S. et al. Nature* 464, 1371- 1375, 2010)、他の粘膜組織での検出はまだ報告がない。さらに Th17 細胞で選択的に発現が認められる新規遺伝子の選定を行った。

② *S. aureus* 応答性 IL-17 産生細胞におけるサイトカインの効果

S. aureus 感染後の結膜組織で発現増強されるサイトカインを網羅的に解析し、 $\gamma\delta$ T 細胞、Th17 細胞、IL-17 産生性自然免疫系細胞への影響を *in vitro* 培養系にて検討を行った。その結果、UV 照射後の *S. aureus* 菌体添加により、 $\gamma\delta$ T 細胞と IL-17 産生性自然免疫系細胞の IL-17 産生が増強すること、さらにその産生が IL-23 添加により促進されることが認められた。また、UV 照射済み *S. aureus* 菌体添加による IL-17 産生誘導は、Myd88 欠損マウス由来の細胞では完全に抑えられたため、Toll 様受容体を介したシグナルが関与していることが示唆された。

③ Th17 細胞を用いたプロテオーム解析

ABSCIEX 社 四重極飛行時間型質量分析装置 TripleTOF™ 5600 を用いて、Th17 細胞特異的に発現が認められるタンパク質を網羅的に解析した。なお本機器は所属教室に既存し、他の細胞種を用いた解析系は当教室内で確立済みである。また、本質量分析装置では iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation)法により、発現タンパク質の網羅的同定だけでなく、多検体間の比較定量解析が可能である。そこで野生型マウス及び ROR γ 欠損マウスよりナイーブ T 細胞を精製し、*in vitro* 培養系により分化誘導させた Th17 細胞からタンパク質を抽出し、タンパク質の発現網羅解析を実施した。得られた結果より、Th17 細胞特異的遺伝子を選定し、retrovirus vector を用いて、naïve CD4⁺ T 細胞に過剰発現させ、Th17 細胞分化や、生存・増殖、および IL-17、IL-22 といった Th17 細胞特異的サイトカイン産生に対する影響を検討した。

4. まとめ

本研究により、*S. aureus* 感染応答性の結膜浸潤性 IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞および自然免疫系細胞を単離することができ、Th17 細胞とは異なる性質を有することが遺伝子発現解析に示唆された。またそれらが *S. aureus* 構成成分に強く反応し、さらに IL-23 に対しても高感受性を示すことが分かり、今後どのような細胞内因子・転写因子を介して IL-17 産生が誘導されるのか、詳細な分子機構の解析が必要である。本研究期間中に、所属研究室の高柳教授が東京大学 大学院医学系研究科 免疫学に異動となり、それに伴い研究室が東京医科歯科大学より東京大学へ移転することとなった。大々的な移転作業の故、研究の一時中断が余儀なくされ、当初の計画通りには進展しなかった項目もある。特に当初の計画では、Th17 細胞を選択的に阻害する薬剤のスクリーニングを実施することを目指していたが、東京医科歯科大学所有の化合物ライブラリーの使用が困難となり、代わりに薬剤スクリーニングの標的因子の探索に繋げるべく、プロテオーム解析による新規制御因子の探索に着手した。四重極飛行時間型質量分析装置を用いたプロテオーム解析は、トランスクリプトーム解析よりも安価で実施することができる上、トランスクリプトーム解析では認められなかった発現変動が判明し、非常に重要な実験結果が得られたと考えられる。今後は、同定ペプチド数および検出感度の向上を目指し、細胞分画の生化学的精製、もしくは細胞膜タンパク質の Biotin 処理法を用いた膜タンパク質濃縮法などを駆使し、より Th17 細胞に最適の解析条件で実施する予定である。また、トランスクリプトーム解析・プロテオーム解析を引き続き進展させ、Th17 細胞関連因子が特定され次第、ノックアウトマウスの作製を進め、その生理的意義・病理的意義を確かめるとともに、低分子阻害剤のスクリーニングへと円滑に移行することを目指していく。最後に、ややチャレンジングなプロジェクトであるものの、本課題を評価し、助成頂きましたことに、心より御礼申し上げます。

5. 発表論文、参考文献

【総説】

- ・岡本一男、高柳広 南山堂 免疫学 update - 分子病態の解明と治療への展開- 第 IV 部 学術的免疫研究の展開 26. 骨免疫学の新展開、2012 年、p217-p224
- ・岡本一男 医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ 骨免疫学-研究最前線 骨と免疫系のクロストーク 3. 転写因子 NFATc1 と破骨細胞、2012 年、242 巻、p655-p659
- ・岡本一男、高柳広 医薬ジャーナル社 CLINICAL CALCIUM 骨免疫学 - オーバービュー、2012 年、22 巻、p1641-1649
- ・岡本一男、高柳広 ライフサイエンス領域融合レビュー 骨免疫学の歴史と新たな展開：<http://leading.lifesciencedb.jp/1-e003/>

【学会発表】

- ・岡本一男、小松紀子、高柳広 Study on the potential of IkBz as a target for the treatment of inflammatory bone destruction 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸
- ・Matteo Maurizio Guerrini、岡本一男、中島友紀、高柳広 RANKL expressed by T lymphocytes is needed for development of experimental autoimmune encephalomyelitis 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5 日、神戸
- ・Jun-ichi Furusawa, Kazuyo Moro, Yasutaka Motomura, Masato Kubo, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi & Shigeo Koyasu Critical role of GATA3 in the differentiation and Th2 cytokine production of natural helper cell 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 7 日、神戸
- ・岡本一男、高柳広 骨リモデリングの制御機構- 骨免疫学の視点から 日本食品免疫学会 2012 年度大会、2012 年 10 月 16 日、東京
- ・Matteo Maurizio Guerrini、岡本一男、Lynett Danks、寺島明日香、小松紀子、中島友紀、高柳広 RANKL expressed by T lymphocytes is required for full development of experimental autoimmune encephalomyelitis 4th International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems、2012 年 7 月 21 日、ギリシャ
- ・小野岳人、岡本一男、岩倉洋一郎、高柳広 マウス大腿骨骨損傷モデルにおける骨再生に対する IL-17 の作用 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 07 月 06 日、福岡