

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790681
 研究課題名（和文） 自己免疫疾患発症における IL-21 の役割の解明

研究課題名（英文） Role of IL-21 in autoimmune diseases

研究代表者

氏名（ローマ字）：須藤 明（Suto, Akira）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：50447306

研究成果の概要：

本研究は、自己免疫疾患の病態への関与が示唆されている IL-21 の T 細胞における産生制御機構を明らかにすることを目的とした。可溶性 IL-21 レセプターを用いた細胞内 IL-21 染色法を確立し、CD4 陽性 T 細胞における IL-21 産生制御機構を解析したところ、IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞と Th17 細胞は異なる細胞分画であること、IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞と Th17 細胞は、共に IL-6 或は IL-21 を分化誘導因子として必要とするが、TGF- β と IL-2 に対する反応性は異なることが明らかとなった。これらの結果は、IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞と Th17 細胞は、自己免疫病態において異なる役割を果たしている可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：IL-21, IL-6, TGF- β , 可溶性 IL-21 レセプター, 細胞内サイトカイン染色法, Th17 細胞, ヘルパー T 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

IL-21 受容体 α 鎖 (IL-21R α) は、T 細胞、B 細胞、および NK 細胞に発現するクラス 1 サイトカインレセプターとして 2000 年に単離された。そしてそのリガンドである IL-21 は、T 細胞、B 細胞、および NK 細胞の分化、活性化、生存、及び増殖に多彩な作用を有することが示されている。さらに近年、1) 1 型糖尿病モデルである NOD マウスの糖尿病発

症に IL-21 によるリンパ球のホメオスタティックな増殖が関与していること、2) ループスモデルである *Sanroque* マウスにおける自己抗体の産生に濾胞ヘルパー T 細胞が産生する IL-21 が関与していること、3) IL-21 を中和するとマウスの関節炎モデルやループス腎炎モデルが改善することが報告され、自己免疫病態への IL-21 の関与が示唆された。さらに、ヒトにおいてもクローン病などの炎症性

腸疾患で腸管粘膜の CD4 陽性 T 細胞が IL-21 を産生することが報告されている。以上のように、自己免疫疾患への IL-21 の関与が明らかになりつつあるが、IL-21 産生細胞の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

そこで本申請研究では、自己免疫疾患の病態への関与が示唆されている IL-21 の CD4 陽性 T 細胞における産生制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) IL-21 産生細胞同定法の確立

IL-21 発現レトロウイルス (pMX-IL-21-IRES-GFP) を感染させた BAF3 細胞を陽性コントロールとして、可溶性 IL-21R Fc 融合蛋白 (sIL-21R Fc) と抗 Fc 抗体を用い細胞内 IL-21 を検出する方法を確立する。

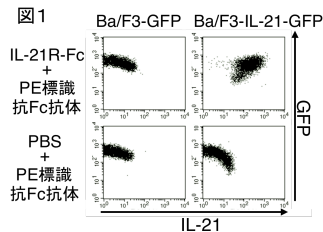
2) IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞の分化機構の解明

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th1 条件、Th2 条件、Treg 条件、Th17 条件の各条件下で抗 CD3 抗体/CD28 抗体で刺激し、細胞内 IL-21 染色法を用いて、如何なる条件下で IL-21 産生細胞が分化するのかを検討する。さらに IL-21 と他のサイトカイン (IL-4, IFN- γ , IL-17) との細胞内 2 重染色を行い、活性化 CD4 陽性 T 細胞の如何なる分画が IL-21 を産生するのかを詳細に検討する。

4. 研究成果

1) IL-21 産生細胞同定法の確立

IL-21 発現レトロウイルスを感染させた Ba/F3 細胞 (Ba/F3-IL-21-GFP) を陽性コントロールとして、可溶性 IL-21R Fc 融合蛋白 (sIL-21R Fc) と抗 Fc 抗体を用いた細胞内 IL-21 染色法を確立した (図 1)。



2) IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞の分化機構の解明

IL-21 産生細胞の同定法を用いて、如何なる条件下で分化した CD4 陽性 T 細胞が IL-21 を産生するのかを検討した (図 2)。その結果、

既報の通り、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 細胞分化誘導条件 (IL-6, TGF- β , 抗 IL-4 抗体, 抗 IFN- γ 抗体) 下で刺激した際にもっとも多く IL-21 産生細胞が認められた (図 2)。しかし興味深いことに、IL-21 産生細胞の多くは IL-17A と IL-17F の発現を欠いていた (図 2)。すなわち、CD4 陽性 T 細胞は、Th17 細胞分化誘導条件下で IL-21 を産生するが、IL-21 を産生している細胞は、Th17 細胞とは異なる細胞集団である可能性が示唆された。

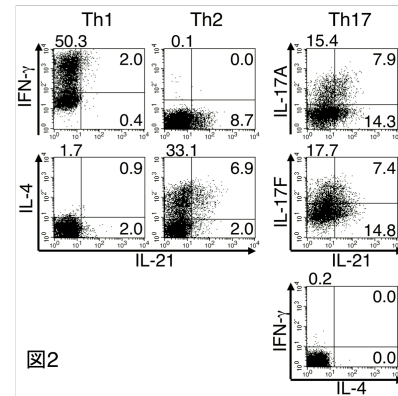


図2

次に Th17 細胞分化誘導条件に含まれるサイトカイン (IL-6 と TGF- β) の IL-21 産生に対する作用を検討した。その結果、IL-6 は IL-21 産生細胞の分化に必須であるが、TGF- β は濃度依存的にその分化を抑制した (図 3)。一方、既報の通り、Th17 細胞は IL-6 と TGF- β の共存下で分化した (図 3)。すなわち、IL-21 産生 T 細胞と Th17 細胞は、ともにその分化に IL-6 を必要とするが TGF- β に対する反応性は異なることが明らかとなった。

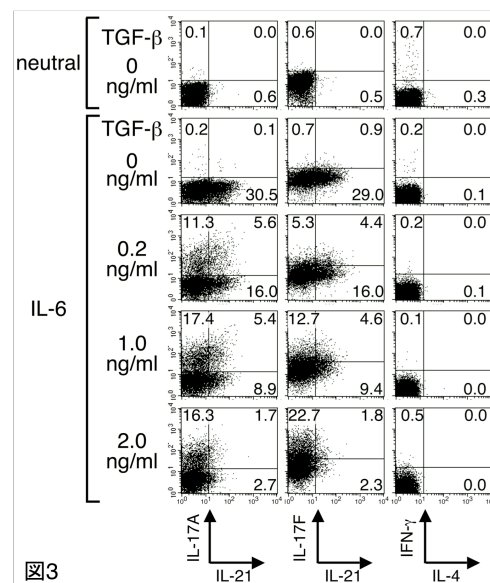


図3

次に IL-21 産生 T 細胞の分化における IL-21 の役割を検討した。その結果、IL-21 も IL-6 と同様に CD4 陽性 T 細胞による IL-21 の産生を誘導した (図 4A)。さらに、可溶性 IL-21 受容体で IL-21 を中和すると IL-6 で誘導される IL-21 の産生も有意に抑制された (図 4B)。

すなわち、IL-21 は IL-21 産生 T 細胞の自己増殖因子として機能していることが示唆された。一方、既報の通り、IL-21 を中和すると Th17 細胞の分化が抑制されるとより (図 4B)、IL-21 は Th17 細胞の分化にも重要な役割を果たしていることが確認された。

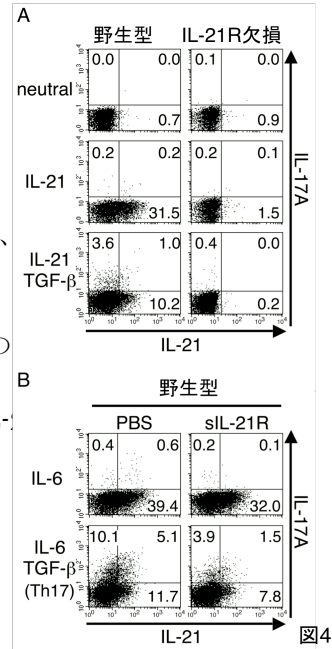


図4

最後に、IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞が Th1 細胞や Th2 細胞のように安定した形質を獲得しているか否かを検討した (図 5)。その結果、分化した IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞分化誘導条件下で再刺激しても IL-21 産生能は維持され、IFN-γ 産生は誘導されなかったが、Th2 細胞分化誘導条件下で再刺激すると IL-21 産生能を維持したまま IL-4 産生が誘導された (図 5)。一方、分化した IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞を Th17 細胞分化誘導条件下で再刺激すると、IL-21 の産生は抑制され、IL-17A の産生が誘導された (図 5)。

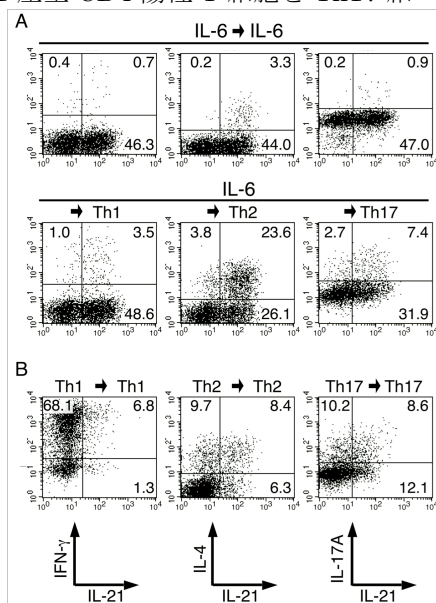


図5

以上より、IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞は IL-6 の存在下で安定して IL-21 を産生するが、IL-4 や IL-17A を産生する能力は保持していることが示唆された。今回我々が明らかにした IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞の分化制御機構と、これまでに明らかにされている Th17 細胞及び制御性 T (Treg) 細胞の分化制御機構とを考えると、IL-21 産生 CD4 陽性 T 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞の分化は、IL-6+IL-21 と TGF-β のバランスにより制御されていることが示唆される (図 6)。

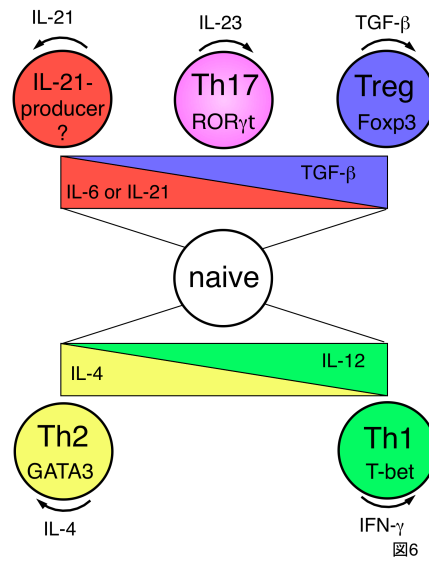


図6

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL, Suto A, Michaud M, Zhang D, Grusby MJ, von Herrath M. IL-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. **Diabetes**. 2009 in press 査読有
2. Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S-I, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, Saito Y, Nakayama T, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells. **J. Exp. Med.** 205:1369-1379, 2008. 査読有
3. Furuta S, Kagami S-I, Tamachi T, Ikeda K, Fujiwara M, Suto A, Hirose K, Watanabe N, Saito Y, Iwamoto I, Nakajima H. Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation. **J. Immunol.** 180: 6656-6662, 2008. 査読有

4. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S-I, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H. IL-23 and Th17 cells enhance Th2 cell-mediated eosinophilic airway inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 178:1023-1032, 2008. 査読有
5. 須藤明、中島裕史 CD4 陽性 T 細胞における IL-21 産生制御機構 医学のあゆみ 227:373-378, 2008 査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 柏熊大輔、須藤 明、岩本逸夫、中島裕史(2008 年 12 月) CD4 陽性 T 細胞における IL-21 産生制御機構 第 38 回日本免疫学会総会 京都
2. 古田俊介、加々美新一郎、須藤 明、廣瀬晃一、渡邊紀彦、岩本逸夫、中島裕史(2007 年 11 月) アレルギー性気道炎症における Stat4 と T-bet の役割の解明 第 37 回日本免疫学会 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 明 (Suto Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50447306

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし