

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 17日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790468

研究課題名（和文） IL-17 産生 gdT 細胞による免疫制御と治療への応用

研究課題名（英文） Immunoregulation and therapeutic application of IL-17-producing gamma delta T cells

## 研究代表者

柴田 健輔（SHIBATA KENSUKE）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：50529972

## 研究成果の概要（和文）：

我々は感染防御や自己免疫疾患の病態形成に重要な役割を担う IL-17 産生 gd T 細胞の機能制御機構を解析した結果、Notch-Hes1 シグナルが関与することを見出し、その前駆細胞を特定した。さらに日和見感染の主な病原体である *Candida albicans* を用いた解析により、IL-17 産生 gd T 細胞は好中球浸潤を介した感染早期の菌排除に重要であった。このように IL-17 産生 gd T 細胞の機能制御機構と感染防御における新たな役割が明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

IL-17-producing gd T cells are involved in not only host defense against pathogens but also pathogenesis of various autoimmune diseases. We found that Notch-Hes1 pathway is critically involved in the development of IL-17-producing gd T cells. Furthermore, in infection mouse model with an opportunistic fungi, *Candida albicans*, IL-17-producing gd T cells had a protective role in the early stage of host defense by inducing neutrophil infiltration. Thus, our study provides a novel insight of development and function of IL-17-producing gd T cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫、IL-17 産生 gd T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

好中球は様々な病原体に対して最も早期に誘導される自然免疫担当細胞で、その細胞が欠損もしくは機能不全に陥ると日和見感染症を引き起こす。近年、腸管上皮間、生殖器官上皮内、肺といった粘膜組織に存在する gd

T 細胞が炎症性サイトカインである IL-17 を産生することで好中球浸潤を誘導し、獲得免疫確立前の感染初期防御に中心的な役割を担っていることが明らかとなってきた (Lockhart, E., et al. 2006. J Immunol 177:4662-4669, Umemura, M., et al. 2007.

J Immunol 178:3786-3796., Shibata, K., et al. 2007. J Immunol 178:4466-4472)。さらに IL-17 産生 gd T 細胞は、多発性硬化症、リウマチ、炎症性腸疾患に代表される自己免疫疾患や脳梗塞の病態形成に関わることも報告されている (Roark, C. L., et al. 2007. J Immunol 179:5576-5583., Romani, L., et al. 2008. Nature 451:211-215., Jensen, K. D., et al. 2008. Immunity 29:90-100., Shichita, T., et al. 2009. Nat Med 15:946-950)。以上のことから、IL-17 産生 gd T 細胞機能獲得機構の解明に基づく機能制御法の確立は、難治性感染症のみならず自己免疫疾患・脳梗塞の治療法の開発といった幅広い分野への応用が期待される。

そこで我々は、IL-17 産生 gd T 細胞の機能についてさらに詳しく解析するため、その機能獲得機構の解析を行った結果、世界に先駆けて IL-17 産生 gd T 細胞は胸腺において IL-17 産生能を獲得していることを発見した (Shibata, K. et al. 2008. J Immunol 181, 5940-7.)。この IL-17 産生 gd T 細胞独自の胸腺における機能獲得機構により、獲得免疫が確立される前に自然免疫機構を惹起することで感染防御に働くことができると考えられた。

胸腺は胸腺上皮細胞を介したシグナルにより T 細胞を分化成熟させる。ab T 細胞においては正の選択と負の選択により自己抗原に対する免疫寛容が確立される。さらに胸腺は T 細胞に対し機能的刷り込みをする能力を有する。たとえば、免疫寛容を確立するために必須である制御性 T 細胞は胸腺において抑制機能を獲得するし、gd T 細胞もまた胸腺において免疫制御に重要な炎症性サイトカインである IL-17 を産生する能力を獲得することが分かってきた。つまり、胸腺における機能的刷り込みは、免疫寛容の確立や免疫制御に極めて重要な役割を有していることが明らかとなってきたが、その分子機構は不明である。特に gd T 細胞は、胸腺において gd T 細胞受容体を介した刺激により分化誘導されるが、胸腺における機能的刷り込みに gd T 細胞受容体を介したシグナルが関わっているのか、もしくはその他の分子が関わっているのか不明な点が多い (Jensen, K. D., et al. 2008. Immunity 29:90-100., Ribot, J. C., et al. 2009. Nat Immunol 10:427-436.)。

## 2. 研究の目的

IL-17 産生 gd T 細胞の機能制御による難治性感染症や自己免疫疾患に対する新規治療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) gd T 細胞の胸腺内における IL-17 産生能獲得機構の解明

### ① IL-17 産生能獲得に関わる分子の同定と生体における役割

IL-17 産生 gd T 細胞および IL-17 非産生 gd T 細胞を clone 化し microarray を行い、IL-17 産生 gd T 細胞特異的に発現する候補分子を探索した。それら候補分子の役割について明らかにするため、候補分子の発現と機能解析を行った。次に候補分子が実際に IL-17 産生 gd T 細胞において発現しているかを調べるため、様々な組織における (胸腺および末梢組織) より IL-17 産生および非産生 gd T 細胞を精製し、mRNA の発現を調べた。

次に候補分子の生体における役割を解析するため遺伝子欠損マウスを用いた。また Cre-loxp system を用いて、polyI:C 投与により目的遺伝子の欠損を誘導させるマウスを作製した。

gd T 細胞の胸腺内機能分化機構を解析するため、胎児胸腺由来 T 細胞分化支持細胞 D114 発現 Tst4 を用いた (理化学研究所・河本宏先生より試薬および技術提供)。

### ② gd T 細胞の抗原認識機構と生体における役割

IL-17 産生 gd T 細胞抗原認識機構を解析するため、マウスにおいて主な IL-17 産生 gd T 細胞レパトアである Vg6Vd1 陽性 gd T 細胞クローンを作製した。そのクローンに TCR 刺激依存性に誘導される NFAT に対する応答配列とレポーター分子 (GFP や luciferase) をつないだ配列を遺伝子導入した (Ohtsuka, M., et al. 2004. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8126-8131.)。

### (2) IL-17 産生 gd T 細胞機能制御による治療への応用

#### *Candida albicans* 感染マウスモデル

*Candida albicans* (ATCC. 10261) を用いた経膣内もしくは全身感染マウスモデルにて IL-17 産生 gd T 細胞機能制御による治療法の開発を検討した。

## 4. 研究成果

IL-17 産生 gd T 細胞分化機構を明らかにするため、IL-17 産生 gd T 細胞をクローン化し microarray 解析を行った結果、Notch シグナルの下流で発現誘導される Hes1 の発現が特異的に上昇していることを見いだした。実際野生型マウスに存在する IL-17 産生 gd T 細胞においてもその発現が高かった。そこで次に、IL-17 産生 gd T 細胞分化における Hes1 の役割を明らかにするため、Hes1 欠損マウスを用いて解析した。Hes1 欠損マウスは周産期において死亡することから胎生期より胸腺において分化する IL-17 産生 gd T 細胞について解析した。その結果、IL-17 産生 gd T 細胞数の顕著な減少を認めた。さらに成体マウ

スにおける Hes1 の役割を解析するため、薬剤により Hes1 遺伝子を欠損させることのできるマウスを作製した。その結果胎生期と同様、IL-17 産生 gd T 細胞は Hes1 欠損下において顕著な細胞数の減少が認められた。以上のことから Hes1 が IL-17 産生 gd T 細胞分化に重要であることが明らかとなった。Hes1 は Notch シグナルの下流で働く分子であることが明らかとなっている。したがって次に IL-17 産生 gd T 細胞においても Notch シグナルが Hes1 誘導に関わるかを調べた。その結果胸腺および末梢組織に存在するいずれの IL-17 産生 gd T 細胞においても IL-17 非産生 gd T 細胞より高い Notch1 の発現が認められた。さらに、胸腺に特異的に発現し Notch1 のリガンドである delta-like 4 を介した刺激により Hes1 の発現の上昇が認められ、IL-17 産生 gd T 細胞分化が誘導された。このように Notch-Hes1 経路は胸腺における IL-17 産生 gd T 細胞分化のみならずそれらの末梢組織における維持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

次に IL-17 産生 gd T 細胞の胸腺内機能分化機構を解析した。まず、gd T 細胞の前駆細胞が含まれる細胞群 (double-negative (DN)2 及び DN3 stage) を分取後 in vitro にて T 細胞へ分化誘導し gd T 細胞の IL-17 産生能について解析した。その結果、IL-17 産生 gd T 細胞は DN2 細胞から Notch シグナル依存性に分化することが明らかとなった。興味深いことに DN3 細胞からは Notch シグナル存在下においても IL-17 産生 gd T 細胞分化は認められなかった。さらに単細胞レベルで解析を行った結果、確かに一つの DN2 細胞より IL-17 産生 gd T 細胞の分化が認められた。以上より IL-17 産生 gd T 細胞は DN2 細胞より Notch シグナル依存性に分化することが明らかとなった。

日と見感染を引き起こす病原性真菌である *Candida albicans* を用いて IL-17 産生 gd T 細胞の感染防御における役割を検討した。IL-17 及び gd T 細胞いずれの欠損マウスにおいても感染 24 時間後の肺において顕著な菌排除の低下を認めた。さらに感染後に gd T 細胞より誘導される IL-17 産生には TLR2-MyD88 経路を介して産生される IL-23 が関わっていた。そして gd T 細胞による IL-23 誘導性 IL-17 産生には tyrosine kinase 2 が必須の役割を担っていた。このように病原性真菌に対する IL-17 産生 gd T 細胞の感染防御における新たな役割が明らかとなった。

## 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 8 件)

(1) Sakuraba K, Shibata K, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. 2013. Naturally occurring PD-1+ memory phenotype CD8 T cells belong to nonconventional CD8 T cells and are cyclophosphamide-sensitive regulatory T cells. *J Immunol* 190: 1560-6. [jimmunol.1202464](https://doi.org/10.1093/jimmunol.1202464)

[pii]10.4049/jimmunol.1202464, 査読有

(2) Umeda K, Sun X, Guo Y, Yamada H, Shibata K, Yoshikai Y. 2011. Innate memory phenotype CD4+ T cells play a role in early protection against infection by *Listeria monocytogenes* in a CD30L-dependent manner. *Microbiol Immunol* 55: 645-56. [10.1111/j.1348-0421.2011.00362.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00362.x), 査読有

(3) Takeuchi A, Dejima T, Yamada H, Shibata K, Nakamura R, Eto M, Nakatani T, Naito S, Yoshikai Y. 2011. IL-17 production by gammadelta T cells is important for the antitumor effect of *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin treatment against bladder cancer. *Eur J Immunol* 41: 246-51. [10.1002/eji.201040773](https://doi.org/10.1002/eji.201040773), 査読有

(4) Shibata K, Yamada H, Sato T, Dejima T, Nakamura M, Ikawa T, Hara H, Yamasaki S, Kageyama R, Iwakura Y, Kawamoto H, Toh H, Yoshikai Y. 2011. Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing gammadelta T cells. *Blood* 118: 586-93. [blood-2011-02-334995](https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-334995) [pii] 10.1182/blood-2011-02-334995, 査読有

(5) Fuchiwaki T, Sun X, Fujimura K, Yamada H, Shibata K, Muta H, Podack ER, Kawauchi H, Yoshikai Y. 2011. The central role of CD30L/CD30 interactions in allergic rhinitis pathogenesis in mice. *Eur J Immunol* 41: 2947-54. [10.1002/eji.201141423](https://doi.org/10.1002/eji.201141423), 査読有

(6) Dejima T, Shibata K, Yamada H, Hara H, Iwakura Y, Naito S, Yoshikai Y. 2011. Protective role of naturally occurring interleukin-17A-producing gammadelta T cells in the lung at the early stage of systemic candidiasis in mice. *Infect Immun* 79: 4503-10. [IAI.05799-11](https://doi.org/10.1128/IAI.05799-11) [pii] 10.1128/IAI.05799-11, 査読有

(7) Sun X, Yamada H, Shibata K, Muta H, Tani K, Podack ER, Yoshikai Y. 2010. CD30 ligand/CD30 plays a critical role in Th17 differentiation in mice. *J Immunol* 185: 2222-30. [jimmunol.1000024](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000024) [pii] 10.4049/jimmunol.1000024, 査読有

(8) Sun X, Yamada H, Shibata K, Muta H, Tani K, Podack ER, Iwakura Y, Yoshikai Y. 2010. CD30 ligand is a target for a novel

biological therapy against colitis associated with Th17 responses. J Immunol 185: 7671-80. jimmunol.1002229 [pii] 10.4049/jimmunol.1002229, 査読有

(3)連携研究者  
なし

〔学会発表〕(計5件)

(1) 柴田健輔、『The Basic Helix-Loop-Helix protein HES1, is required for the differentiation of naturally occurring interleukin(IL)-17-producing gd T cells.』, gd T cell conference, 2010年5月19日, Kiel, Germany

(2) 柴田健輔、『The Basic Helix-Loop-Helix protein HES1 controls the differentiation of naturally occurring interleukin (IL)-17-producing  $\gamma$   $\delta$  T cells』14th International Congress Of Immunology, 2010年8月27日, 神戸、日本

(3) 中村真隆、柴田健輔、『IL-7-receptor- $\alpha$ -mediated signaling is required for the development of naturally occurring IL-17-producing  $\gamma$   $\delta$  T cells in the adult thymus』, 日本免疫学会, 2011年11月27日, 千葉、日本

(4) 柴田健輔、『Intrathymic programming of murine gd T cells by Notch signaling』, gd T cell conference, 2012年6月1日, Freiburg, Germany

(5) 柴田健輔、『Notch-RBP-J  $\kappa$  -IL-7 receptor alpha axis is essential for the maintenance of IL-17-producing  $\gamma$   $\delta$  T cells』, 日本免疫学会, 2012年12月7日, 神戸、日本

〔図書〕(計1件)

柴田健輔、『IL-17 産生 gd T 細胞の分化と活性化』, 臨床免疫・アレルギー科, vol. 58, No. 5, 2012年11月25日発行、5ページ、査読無

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柴田 健輔 (SHIBATA KENSUKE)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：50529972

### (2)研究分担者

なし