

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791573

研究課題名(和文) 移植片拒絶応答におけるインターロイキン17の機能解析

研究課題名(英文) Interleukin-17 Accelerates Allograft Rejection by Suppressing Regulatory T Cell Expansion

研究代表者

伊藤 智 (Itoh, Satoshi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30382881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：移植片の拒絶応答において、これまで免疫応答はTh1-Th2細胞のバランスでその分子機構が説明されてきた。近年Th1細胞やTh2細胞とは異なり、IL-17を産生する新たなT細胞が同定された。本研究では、急性拒絶応答におけるIL-17の役割を解明することを目的とした。移植心では、IL-17の発現が増加しT細胞がIL-17産生細胞と判断され、炎症細胞の浸潤を惹起するとともに、制御性T細胞の誘導抑制をもたらすことにより、急性拒絶応答を悪化させることが明らかになった。これらの結果は薬物や遺伝子治療によるIL-17の中和が、臨床心臓移植成績の改善に有効的な新しい治療法である可能性を提起する。

研究成果の概要(英文)： Interleukin-17 (IL-17), which is predominantly produced by T helper 17 cells distinct from T helper 1 or T helper 2 cells, participates in the pathogenesis of infectious, autoimmune, and allergic disorders. However, the precise role in allograft rejection remains uncertain. In the present study, we investigated the role of IL-17 in acute allograft rejection using IL-17-deficient mice. During heart transplantation, (1) IL-17 is crucial for acceleration of acute rejection; (2) IL-17-deficiency enhances regulatory T cell expansion; and (3) gamma delta T cells rather than CD4 T and CD8 T cells are a potential source of IL-17. IL-17 neutralization may provide a potential target for novel therapeutic treatment for cardiac allograft rejection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科

キーワード：心臓移植 インターロイキン 17 移植免疫 急性拒絶応答

### 1. 研究開始当初の背景

インターロイキン 17(IL-17)は、近年、様々な免疫応答でその役割が注目を集めている炎症誘導性サイトカインである。移植片の拒絶応答において、これまで免疫応答は Th1-Th2 サイトカイン/細胞のバランスでその分子機構が説明されてきた。近年 Th1 細胞や Th2 細胞とは異なり、IFN- $\gamma$  や IL-4 を産生せず、主に IL-17 を産生する新たな T 細胞「Th17 細胞」が同定された。しかしながら、移植片の拒絶応答における IL-17 の役割については、その他の免疫応答における IL-17 の機能解析に比べ遅れており、今日に至っても明確になっていない。今回、異所性心移植モデルにおける IL-17 の機能解析に関して IL-17 欠損マウスを使用し検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、IL-17 がどのような分子機構で移植片の拒絶応答の際、急性期炎症を誘導し、拒絶を促進するのか、分子・細胞・個体レベルでの解析で明らかにすることを目的とした。研究の具体的な目的は以下の2点である。

(1) 移植心の急性期拒絶応答における IL-17 の役割の解明。

これまでにおける申請者の解析において、レシピエントが C57BL/6 背景の IL-17 欠損マウスの場合、急性期拒絶応答が抑制される。レシピエントとして、IL-17 欠損マウスを使用し、急性期拒絶応答における IL-17 の関与と役割の相違について免疫学的、病理学的、分子生物学的手法により明らかにする。

(2) 移植心の急性期拒絶応答における IL-17 産生細胞の同定。

急性期の拒絶応答を促進させる IL-17 の産生細胞を明らかにする。

Th17 細胞では IL-17 と IL-17F の両方が産生されることが知られている。一方、ある種の

細胞ではどちらか一方しか産生していない。したがって、移植片の急性期の拒絶応答では、IL-17 産生細胞と IL-17F 産生細胞が異なる可能性も考えられる。そのため、IL-17 欠損マウスと同様に、IL-17F 欠損マウスを用いた場合でも移植片の拒絶応答が抑制される結果が得られた場合、急性期の拒絶応答に関する IL-17F 産生細胞の同定を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 移植心の急性期拒絶応答における IL-17 の役割の解明

レシピエントとして C57BL/6 野生型マウス、IL-17 欠損マウスを用い、それらマウスの腰の大動脈に、FVB マウスの心臓の大動脈に移植する異所性移植を行う。移植された FVB マウスの心臓で生じる急性期拒絶応答の表面的な差異を、下記の一般的な免疫学的および病理学的な解析により把握する。

移植心の生着率(拍動の有無)の経時的追跡

リンパ組織における免疫細胞のプロファイル評価(FACS)

白血球混合培養試験での T 細胞の増殖応答(BrdU 取り込み)やサイトカイン産生測定(ELISA や FACS)

移植心の病理像解析(H&E および TUNEL 染色)

移植心での遺伝子発現変化(アポトーシス関連遺伝子などの Real-time PCR)

移植心の浸潤細胞のプロファイル評価(FACS、免疫染色による免疫細胞種・数の定量)

また、IL-17 欠損マウスに FVB の心臓を移植すると、制御性 T (Treg) 細胞の数が野生型マウスに比べて増加していることが分かっている。IL-17 欠損マウスをレシピエントとした場合、移植片の拒絶がされにくくなるのは、その Treg 細胞の増加に依存している可能性が考えられる。

(7) 抗 CD25 抗体を投与して Treg 細胞を除去した IL-17 欠損マウスをレシピエントとして移植を行う。この解析により、その可能性を明らかにする。

#### (2) 移植心の急性期拒絶応答における IL-17 産生細胞の同定

1. 移植心の急性期拒絶応答における IL-17 の役割の解明の(2)および(6)の解析結果より、免疫細胞での IL-17 および IL-17F 産生

細胞の同定がされる。予備検討では、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、 $\gamma\delta$  T 細胞が IL-17 産生細胞の候補となっている。

C57BL/6 背景の Rag-2 欠損マウス (T/B 細胞欠損) に、C57BL/6 野生型、IL-17 欠損マウスの TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> T 細胞を移入する。このマウスに FVB マウスの心臓を移植し、生着率を評価する。

(1)の結果次第で、TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> T 細胞を CD4<sup>+</sup> T 細胞および CD8<sup>+</sup> T 細胞に変えて、同様の実験を行う。

IL-17 欠損マウスに、C57BL/6 野生型、IL-17 欠損マウスの TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> T 細胞を移入する。このマウスに FVB マウスの心臓を移植し、生着率を評価する。

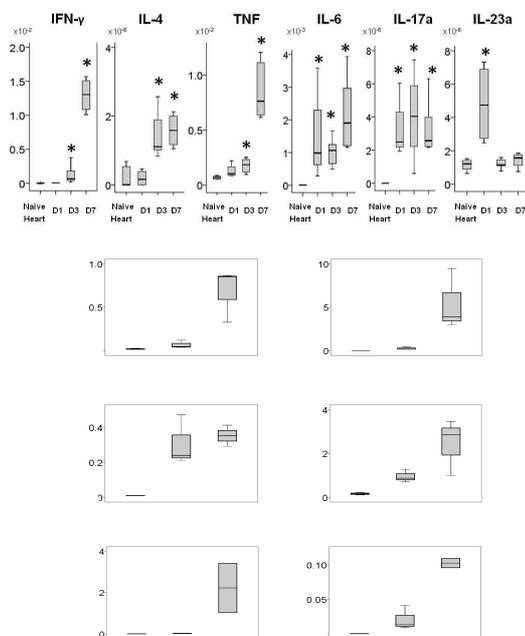
上記 ~ の実験で Th17 細胞、Tc17 細胞あるいは  $\gamma\delta$  T 細胞が産生する IL-17 が移植心の急性拒絶反応の誘導に關与しているかが判断されるが、 の実験で TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> T 細胞の十分な細胞数の抽出が困難であったため、 $\gamma\delta$  T 細胞から産生される IL-17 が重要な検討するために、 $\gamma\delta$  T 細胞欠損マウスをレシピエントとして、移植心の生着率を比較検討した。

C57BL/6J 背景の野生型マウス、 $\gamma\delta$  T 細胞欠損マウス、および、IL-17 欠損マウスに FVB マウスの心臓を移植し、移植片の生着率を比較した。

#### 4. 研究成果

##### 急性拒絶時の移植心における IL-17 発現の経時的変化

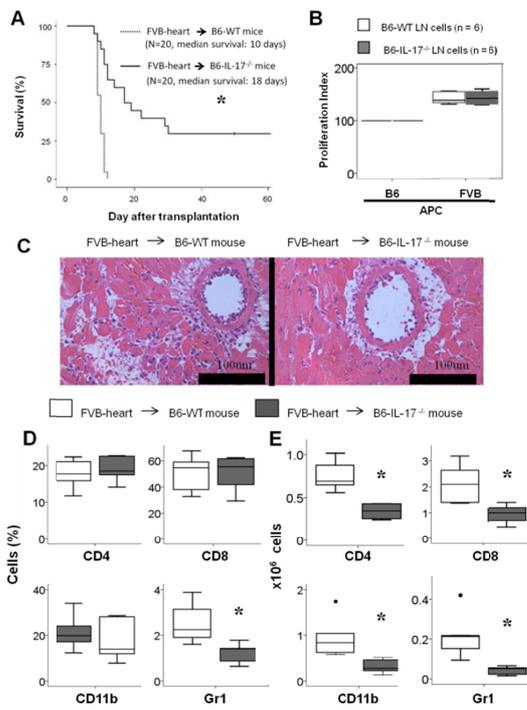
急性拒絶時の移植心における遺伝子発現と浸潤細胞の経時的変化を検討した。IL-6、IL-17 および IL-23 の mRNA 発現の増加は、術後 1 日目よりみられ、術後 3 日目には、IFN- $\gamma$ 、IL-4、TNF の mRNA の発現も有意に増加した。IL-17 の mRNA レベルは、術後 1 日目と 7 日目で有意な変化はなかったが、IFN- $\gamma$ 、TNF および IL-6 の mRNA は、術後 7 日目でもっとも高値となった。



##### 移植心の急性拒絶反応の惹起における IL-17 の関与

野生型マウスと IL-17 欠損マウスの 2 群間で比較検討した。移植心の生着率は、野生型マウス群に対し IL-17 欠損マウス群で有意な延長を認めた。術後 7 日目の移植片局所の病理像では、野生型マウス群と比較して、IL-17 欠損マウス群で顕著に浸潤細胞の抑制を認め、浸潤細胞中の CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、および、CD11b 陽性細胞 (マクロファージ) などの細胞数は IL-17 欠損マウス群で有意に減少していた。炎症細胞の浸潤低下に相関して、移植心の組織抽出液中における炎症誘導性サイトカインやケモカイン量が、野生型マウス群に比べて IL-17 欠損マウス群では有意に低値を示した。

ここまで得られた結果より、急性拒絶応答時の移植心局所において、IL-17 の発現増強が認められた。移植後、早期に発現する IL-17 が、移植片内においてその後に発現が強く誘導される TNF などの炎症誘導性サイトカインを誘導することにより、炎症細胞の浸潤を促進し、急性拒絶応答を促進していることが示唆された。

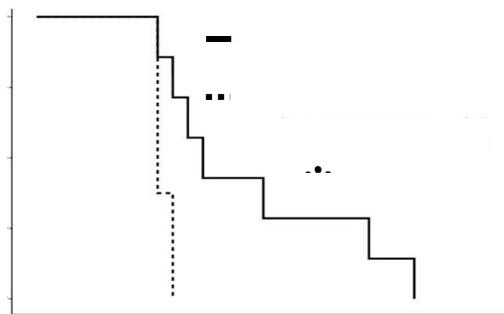


### 急性拒絶における移植心の生着率延長における制御性T細胞の関与

FVB マウスの心臓を C57BL/6J 背景の IL-17 欠損マウスに移植した場合、移植心の生着率が顕著に延長できることを既に示した。野生型マウス群では、移植後 11 日以上、生着する移植心は稀少なために評価が不可能であったが、IL-17 欠損マウス群において、移植 10、20、50、100 日後に移植心と脾臓摘出し、移植心中の浸潤細胞と脾細胞における制御性 T 細胞の含有率をフローサイトメトリーを用いて解析した結果、移植心の組織中において制御性 T 細胞の増加が認められた。制御性 T 細胞は、急性拒絶や慢性拒絶応答において、移植片の生着率の延長に関与していることが報告されており、IL-17 欠損マウス群で見られる移植心の長期生着は、移植心および宿主脾臓内での制御性 T 細胞の増加と何らかの相関があると推測された。

これらの仮説を証明するために、抗 CD25 抗体を投与して、制御性 T 細胞を除去した IL-17 欠損マウスとコントロール IgG 抗体を投与した IL-17 欠損マウスに FVB マウスの心臓を移植し、移植心の生着率を比較した。

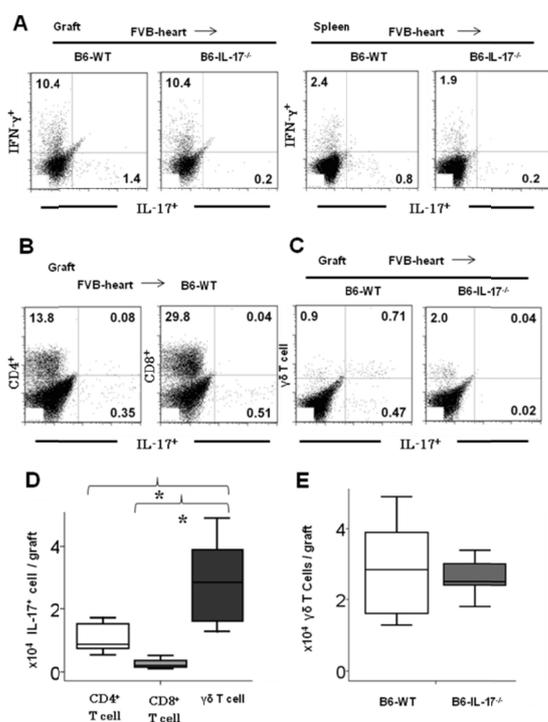
その結果、コントロール IgG 抗体投与群 (生存中央値 11 日: n=8) と比較して、抗 CD25 抗体投与群 (生存中央値 8 日: n=8) では移植片の生着率の悪化が認められた。以上より、IL-17 欠損マウスにおける移植心の生着率の延長に制御性 T 細胞が重要であることが明らかになった。言い換えれば、IL-17 は、IL-6 産生を促進することにより、制御性 T 細胞の分化を抑制し、移植片の拒絶を促進する炎症誘導性サイトカインであることが明確になった。



### 急性拒絶時の移植心内における IL-17 産生細胞の同定

C57BL/6J 背景の野生型マウスと IL-17 欠損マウスに FVB マウスの心臓を移植後、2 日目と 7 日目に移植心と宿主脾臓を摘出し、フローサイトメトリー解析や免疫染色法により、IL-17 産生細胞の同定を試みた。フローサイトメトリー解析において、術後 2 日目の移植片からは、IL-17 陽性細胞として、少数の CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、そして  $\gamma\delta$  T 細胞が検出された。術後 7 日目の移植心と脾臓からは、CD45 陽性のリンパ球・白血球のうち、野生型マウス群と IL-17 欠損マウス群で同様の比率で IFN- $\gamma$  陽性細胞が同定された。マウス関節炎や脳脊髄炎等の自己免疫疾患の発症に関わる IL-17 産生細胞は Th17 細胞であることが知られるが、興味深いことに、本移植モデルにおいては、野生型マウスに移植した移植心であっても、IL-17 陽性の Th17 細胞含む CD4 陽性細胞や Tc17 細胞を含む CD8

陽性細胞はわずかに存在するに留まり、一方で、主要な IL-17 陽性細胞は  $\gamma\delta$  T 細胞であることが明らかになった。しかしながら、野生型マウスおよび IL-17 欠損マウスに移植した移植心に浸潤している  $\gamma\delta$  T 細胞の数に有意な差は認められなかった。以上より、本移植モデルにおいては、Th17 細胞や Tc17 細胞ではなく、 $\gamma\delta$  T 細胞が産生する IL-17 が移植片の急性拒絶反応の誘導に重要であることが示唆された。



次に、急性拒絶の進行において、 $\gamma\delta$  T 細胞から産生される IL-17 が重要な役割を担っていることを検討するために、 $\gamma\delta$  T 細胞欠損マウスをレシピエントとして、移植心の生着率を比較検討した。 $\gamma\delta$  T 細胞欠損マウス群では、全体の 17% (18 匹中 3 匹) が 30 日以上に及ぶ移植心の生着率の著明な延長を認め、観察の最終日まで移植片の生着が確認された。また、 $\gamma\delta$  T 細胞欠損マウス群の 28% (18 匹中 5 匹) では、12 日から 30 日まで移植心の生着率の部分的な延長を認め、55% (18 匹中 10 匹) が 8 日から 11 日までであり、野生型マウス群との間で有意差を認めなかった。以上の平均結果として、野生型マウス群 (生存中央値 10 日 : n=18)

と比較して、 $\gamma\delta$  T 細胞欠損マウス群 (生存中央値 11 日 : n=20) では、有意に移植心の生着率の延長が認められた。また、移植心の生着率は、IL-17 欠損マウス群と比較した場合には、 $\gamma\delta$  T 細胞欠損マウス群との間に有意な差を認められなかった。以上の結果より、移植心の急性拒絶反応において、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞由来の IL-17 よりも、 $\gamma\delta$  T 細胞から産生される IL-17 が重要であることが示唆された。

## 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 3 件)

Kimura N, Nakae S, Itoh S, Merk DR, Wang X, Gong Y, Okamura H, Chang PA, Adachi H, Robbins RC, Fischbein MP.

Potential role of  $\gamma\delta$  T cell-derived IL-17 in acute cardiac allograft rejection.

**Ann Thorac Surg.** 査読有

2012 Aug;94(2):542-8.

doi: 10.1016/j.athoracsur.2012.03.049.

Itoh S, Kimura N, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Bos EJ, Merk DR, Gong Y, Okamura H, Nagamine CM, Adachi H, Kornfeld H, Robbins RC, Fischbein MP

Interleukin-16 deficiency suppresses the development of chronic rejection in murine cardiac transplantation model.

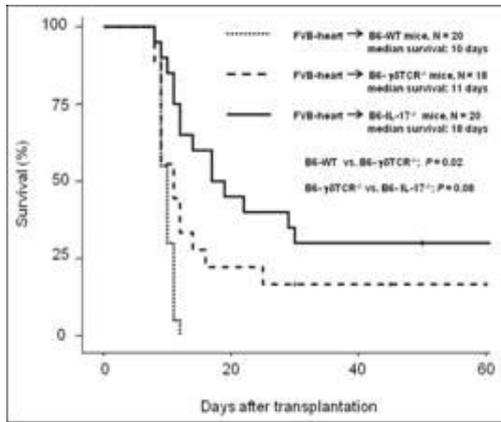
**J Heart Lung Transplant.** 査読有

2011 Dec;30(12):1409-17.

doi: 10.1016/j.healun.2011.08.017.

Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura N, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP.

Interleukin-17 Accelerates Allograft Rejection by Suppressing Regulatory T Cell Expansion.



## Circulation. 査読有

2011 Sep 13;124(11):S187-96.

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014852.

〔学会発表〕(計 4 件)

第 44 回日本心臓血管外科学術総会 2014.  
2.19-21 (熊本)

第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会  
2013.10.16-18 (仙台)

第 27 回日本冠疾患学会学術集会  
2013.12.13-14 (和歌山)

第 76 回日本循環器学会学術集会  
2012.3.16-18 (福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 智 (Satoshi Itoh)

研究者番号 : 30382881