

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860618

研究課題名(和文) レジオネラ肺炎の感染ステージ別にみたIL-17Fの分子動態解析

研究課題名(英文) Molecular dynamics analysis of IL-17F by infection stage of Legionella pneumonia

研究代表者

梶原 千晶 (KAJIWARA, Chiaki)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80638883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウス、IL-17A欠損マウス、IL-17F欠損マウス、IL-17AF欠損マウスでレジオネラ感染における生存率を比較したところ、野生型マウス群に比べてIL-17AF欠損マウス群で有意に生存率が低下した。

この時IL-17A欠損マウスにおいて、感染後IL-17Fが過剰産生されることから、IL-17Aと同様にIL-17Fもレジオネラ感染防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、IL-17Fは感染急性期において、自然リンパ球であるガンマデルタ()T細胞から主に産生されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Comparison of survival rates in Legionella infection in wild type mouse, IL-17A deficient mice, IL-17F deficient mice, IL-17AF deficient mice showed a significant survival rate in IL-17AF deficient mice group compared with wild type mouse group. Decreased. At this time, it was suggested that IL-17F plays an important role in defense against Legionella infection as IL-17A, because IL-17F is overproduced after infection in IL-17A deficient mice. In addition, IL-17F was found to be mainly produced from gamma delta () T cells which are natural lymphocytes in the acute stage of infection.

研究分野：感染免疫

キーワード：レジオネラ 肺炎 インターロイキン17A インターロイキン17F

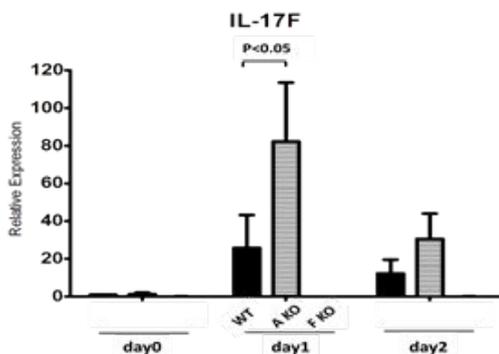
1. 研究開始当初の背景

レジオネラ属細菌は自然界に広く分布している細胞内寄生性のグラム陰性桿菌である。ヒトに対する病原性が最も強いのは *Legionella pneumophila* であり、レジオネラ肺炎における起炎菌の 50~70% を占めることが知られている(1)。本菌は健常者に対しての感染性は低く、通常は何らかの基礎疾患を有する者や、乳幼児、高齢者、喫煙者などが多く感染し、比較的男性の罹患者が多いことが本症の特徴とされており、*L. pneumophila* の病原因子のみでは本感染症を説明できない部分も多いのが現状である。

これまで、細胞内寄生細菌の感染防御には Th1 型免疫応答が重要であると考えられてきたが、1995 年の IL-17A の発見を機に、感染防御における Th17 型免疫応答の関与が明らかになってきた(2)。IL-17A は、Th17 細胞が産生する代表的なサイトカインであり、様々な細胞に作用して炎症性メディエーターを誘導し、好中球の走化性亢進などを介して感染防御に関与していることが知られている。IL-17A には、相同性を持つ 6 個のファミリー分子が存在することが知られており、中でも IL-17F は IL-17A との相同性が最も高く、共通の受容体を介して機能している。よって IL-17F も炎症誘導に重要であること推察されているが、これまでの報告数はわずかである。

2. 研究の目的

これまでに代表者らの研究グループは、*L. pneumophila* を経気道的にマウスに感染させると、IL-17A のみならず IL-17F の産生も誘導されることを報告しているが(3)、両サイトカインの機能的な差異については不明である。代表者らの検討により、IL-17A 欠損マウスにレジオネラを感染させると、代償的に IL-17F が過剰産生されるという興味深い結果を得ており(図1)、レジオネラ肺炎においては、IL-17A と同様に IL-17F も感染防御に寄与している可能性が高い。そこで本研究は、両サイトカインの代償的な産生性に着目し、レジオネラ感染における IL-17F の感染防御への関与を明らかにすることを目的として行う。



(図1)

3. 研究の方法

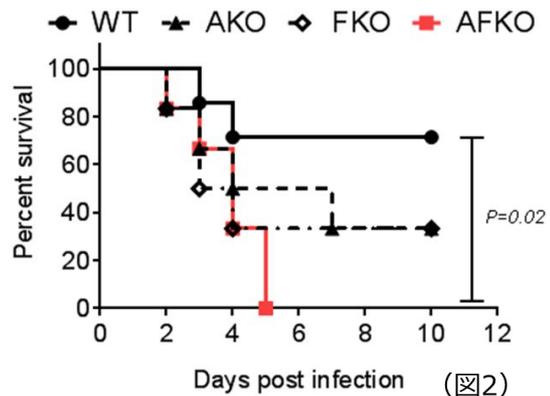
本研究では、レジオネラ肺炎マウスモデルを用いて、感染急性期(感染~3日)と感染亜急性期(3日~7日)とにステージを分け、フローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡などを用いて IL-17F の機能解析を行う予定である。野生型(BALB/c) IL-17A 欠損、IL-17F 欠損、IL-17AF 欠損マウスを比較検討する。

主な検討項目は以下の通りである。

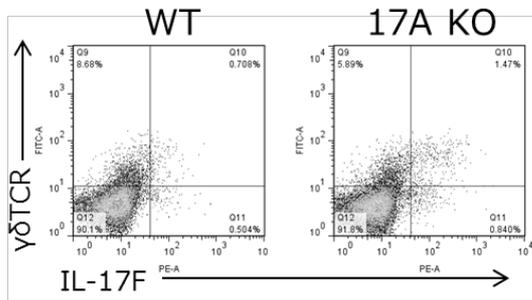
- 各種系統間のレジオネラ感染後の生存率の比較検討と、感染急性期および亜急性期における IL-17F の産生細胞の特定：フローサイトメトリー解析
- 感染急性期における IL-17A と IL-17F の産生性と機能評価：リアルタイム PCR、ELISA 法、フローサイトメトリー解析
- 亜急性期における IL-17 のマクロファージ活性化に対する作用：フローサイトメトリー解析

4. 研究成果

野生型、IL-17A 欠損、IL-17F 欠損、IL-17AF 欠損マウスにレジオネラを 10^7 CFU/マウスで経気管的に感染させ、生存率を観察した。野生型マウスに比べ IL-17AF 欠損マウスは有意に生存率が低下したが、IL-17A 欠損マウスおよび IL-17F 欠損マウスは有意な低下は認められなかった(図2)。



レジオネラを 10^7 CFU/マウスで経気管的に感染させ、24 時間後のマウス肺から細胞を回収し、IL-17F の産生源をフローサイトメトリーにて解析したところ、自然免疫担当細胞に属するガンマデルタ($\gamma\delta$)T 細胞であった(図3)。野生型マウスに比べ、IL-17A 欠損マウスにおいて、その産生性が有意に上昇していた。ガンマデルタ T 細胞以外の IL-17F 産生源は、F4/80 陽性細胞(マクロファージ)であった。IL-17F 欠損マウスにおいて、IL-17A が過剰に産生するという現象が見られなかった。

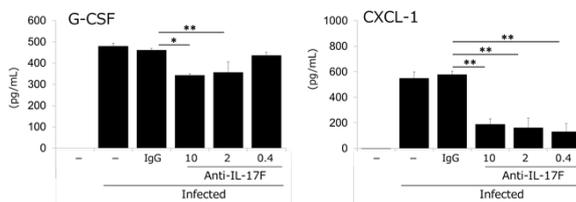


(図3)

野生型マウス由来骨髓由来マクロファージにレジオネラを感染させ、洗浄後、リコンビナント IL-17A および IL-17F を添加し、24 時間培養後、培養液を回収して炎症性メディエーター濃度を ELISA 法にて測定した。その結果、炎症性メディエーター誘導能は IL-17A の方が強かったが、IL-17F にも IL-17A と同様の生理活性があることがわかった。

野生型マウスと IL-17A 欠損マウスから骨髓由来マクロファージを樹立し、レジオネラを感染させた。洗浄後、24 時間培養し、培養上清を回収して好中球関連因子を ELISA 法にて測定した。その結果、野生型に比べ、IL-17A 欠損マウス由来マクロファージにおいて G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子)、CXCL-1、CXCL-2 (ケモカイン) の分泌量が有意に増加していた。

IL-17A 欠損マウスにおいて IL-17F が過剰に産生されたことで、その下流の因子の発現が誘導されていると予想し、IL-17F の阻害実験を行った。IL-17A 欠損マウスから骨髓由来マクロファージを樹立し、レジオネラを感染させた。洗浄後、抗 IL-17F 抗体 (0.4, 2, 10 μ g/mL) を添加した培養液で 24 時間培養し、上清を回収した。G-CSF、CXCL-1 を ELISA 法にて測定した。その結果、抗 IL-17F 抗体添加でこれらの産生が阻害された (図 4)。このことから、IL-17A 欠損マウスにおいて過剰に産生された IL-17F は、G-CSF および CXCL-1 の産生を促進することが示唆された。



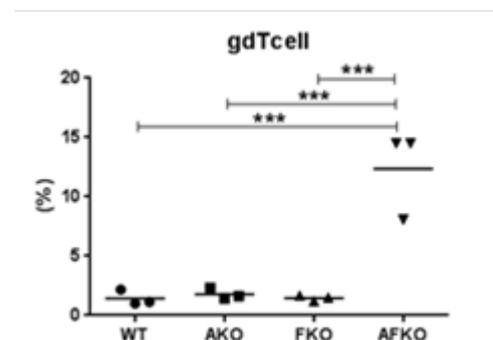
(図4)

野生型、IL-17A 欠損、IL-17F 欠損、IL-17AF 欠損マウスにレジオネラを 10⁶CFU/マウスで経気管的に感染させた。肺から細胞を回収し、好中球 (Ly6G 陽性、CD11b 陽性)、マクロファージ (Ly6G 陰性、F4/80 陽性、CD11b 陽性)、樹状細胞 (Ly6G 陰性、F4/80 陰性、CD11c 陽性、MHC classII 陽性) の分画

について、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、野生型、IL-17A 欠損、IL-17F 欠損マウス間で肺組織から回収された総細胞数に変化は無かったが、IL-17AF 欠損マウスにおいて少ない傾向があった。また、好中球、マクロファージ、樹状細胞の細胞数の割合は、IL-17AF 欠損マウスにおいて減少していた。

ガンマデルタ ($\gamma\delta$) T 細胞は、細胞表面に普通の T 細胞とは異なったタイプの T 細胞受容体を持つ細胞集団である。ほとんどの T 細胞は α 鎖、 β 鎖と世慣れる 2 つの糖タンパク質から構成される T 細胞受容体を持つ。それに対し、ガンマデルタ T 細胞は、 γ 鎖と δ 鎖からなる T 細胞受容体を持つ。このグループの T 細胞は、 $\alpha\beta$ T 細胞と比べると、はるかに少数であるが、腸粘膜や皮膚に多く存在することが知られている。また、 $\gamma\delta$ T 細胞の反応を導く状況は完全には理解されていない。また $\gamma\delta$ T 細胞の反応を導く状況は完全には理解されていない。 $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺や末梢において他の白血球の影響下で分化するリンパ球の働き全体を形作っている。成熟 $\gamma\delta$ T 細胞は機能的に異なった亜型に分化し、健康な組織や免疫細胞、病原体や宿主、その防御反応に直接、もしくは間接的に無数の影響を与える。CD1d 拘束性 NKT 細胞などの他の多様性の乏しい T 細胞受容体を持つ「非定型的」T 細胞と同様に、 $\gamma\delta$ T 細胞は進化学的に原始的で早期に迅速に様々な異物と反応する自然免疫系と、再度の侵入に際した B 細胞と T 細胞による、時間を要するが抗原特異的で長期の記憶に基づく反応である獲得免疫系の境界に位置する。

IL-17AF 欠損マウスにおいて、この $\gamma\delta$ T 細胞の割合が、有意に増加していた (図 5)。これらの結果から、好中球やマクロファージのような自然免疫担当細胞の数が減少し、病原体に対する生体反応が不十分な場合、 $\gamma\delta$ T 細胞が代償的に肺に集積し、重要な役割を果たしていることが示唆された。



(図5)

本研究により、IL-17F は IL-17A と同様にレジオネラ感染防御に寄与し、好中球やマクロファージの遊走に寄与していることがわ

かった。さらにレジオネラ感染防御には、 $\gamma\delta$ T細胞も重要な役割を持つ可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Palusinska-Szyszl *et al.* *Arch Immunol Ther Exp* 2009, 57:279

2. Yao *et al.* *J Immunol* 1995, 155:5483

3. Kimizuka *et al.* *Infect Immun* 2012, 80:1121

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 0件)

[学会発表](計 1件)

第88回日本感染症学会学術講演会
梶原 千晶、他 2014年
「レジオネラ肺炎マウスモデルにおけるIL-17AとIL-17Fの機能的・代償的役割」

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶原 千晶 (KAJIWARA, Chiaki)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：80638883

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

鷓殿 平一郎 (UDONO, Heiichiro)