

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15184

研究課題名(和文) グルココルチコイドがTh17細胞の機能を促進し腸管免疫を制御する機構の解明

研究課題名(英文) Glucocorticoids enhance the differentiation and function of Th17 cells and cause colitis

研究代表者

榛葉 旭恒 (Shimba, Akihiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30812242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドは免疫抑制剤として炎症性疾患の治療に用いられるが、申請者は炎症性疾患の発症に寄与するインターロイキン17産生性T細胞(Th17細胞)に対するグルココルチコイドの作用について解析を進めた。その結果、分化培養系や自己免疫疾患マウスモデルにおいて、グルココルチコイドがTh17細胞の解糖系やそれに関連する遺伝子発現を誘導することで、Th17細胞の分化や機能を促進し、病態の進行に寄与することを発見した。またストレスにより誘導されるグルココルチコイドがTh17細胞の分化を促進し、十二指腸における好中球の浸潤や炎症に貢献することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制剤として炎症性疾患の治療に用いられているグルココルチコイドが病原性のあるTh17細胞の機能をむしろ促進する働きを持つという知見は、他の研究とは一線を画する。Th17細胞がグルココルチコイド耐性を持つことやグルココルチコイドにより機能が促進されることで、喘息や大腸炎の病態の再燃化や慢性化に繋がる機構が考察できることが期待される。また、免疫抑制効果のあるグルココルチコイドが産生されるストレス状況下において、炎症性疾患が惹起される機構について、グルココルチコイドがTh17細胞の発生を促進するという機構により、この疑問が解決されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids are a class of steroid hormone produced from adrenal cortex and have the strong immunosuppressive effects and used for clinical treatment on inflammatory diseases. Interleukin-17-producing helper T cells (Th17 cells) are critical to exacerbate inflammatory diseases but the effects of glucocorticoids on Th17 cells remain unclear. We found that glucocorticoids enhanced the differentiation and function of Th17 cells via promoting glycolysis and glycolysis-associated gene expression in vitro and in inflammatory disease mouse models such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and colitis. Furthermore, stress-induced glucocorticoids also enhanced Th17 cell generation in duodenum to promote neutrophil infiltration and inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：グルココルチコイド ストレス Th17細胞 大腸炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイドは副腎から産生されるステロイドホルモンのひとつで、細胞質に存在するグルココルチコイド受容体 (GR) に結合して、GR が転写因子として働くことでその効果を発揮する。グルココルチコイドは炎症性サイトカインの発現の抑制やリンパ球の細胞死の誘導など、強力な免疫抑制作用を持つことが知られ、慢性炎症や自己免疫疾患などの炎症性疾患の治療に用いられる。インターロイキン 17 産生性ヘルパー T 細胞 (Th17 細胞) は炎症性サイトカインを発現することや好中球の浸潤を誘導することで、脳脊髄炎や大腸炎などの自己免疫疾患の病態の増悪に大きく貢献する。自己免疫疾患の治療には Th17 細胞の機能を抑制することが必須と考えられるが、Th17 細胞はグルココルチコイドに対する耐性を持ち、炎症抑制効果が作用されにくいことが知られる。しかし、Th17 細胞がなぜグルココルチコイド耐性を持つのか、どのような機構で耐性を持つのか、不明であった。

申請者は、副腎で産生される内在性のグルココルチコイドが T 細胞の組織への集積を誘導して T 細胞免疫応答を亢進するなどの、グルココルチコイドが免疫応答を促進する正の作用を持つことを見出していた。そこで、グルココルチコイドは Th17 細胞の機能を促進する作用を持つことで、グルココルチコイド耐性を獲得しているのではないかと発想し、Th17 細胞におけるグルココルチコイドの機能の解析に取り組むことにした。

## 2. 研究の目的

本研究は、T 細胞特異的 GR 遺伝子破壊マウス (CD4Cre-GRcKO マウス) および IL-17 産生細胞特異的 GR 遺伝子破壊マウス (IL17Cre-GRcKO マウス) を用いて、グルココルチコイドが Th17 細胞の分化や維持、機能を促進する分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

CD4Cre-GRcKO マウスから未感作 T 細胞を単離し、Th17 細胞への分化培養実験を行い、GR が Th17 細胞への分化を促進するか検証した。また GR 遺伝子発現や代謝を制御するか調べるために、遺伝子発現の定量化および解糖能を解析した。

CD4Cre-GRcKO マウスおよび IL17Cre-GRcKO マウスにおいて腸管に常在する Th17 細胞の細胞数をフローサイトメトリー解析し、GR が末梢組織における Th17 細胞の維持を促進するか、また GR が Th17 細胞の分化や維持を介して腸内環境に影響するか調べた。

CD4Cre-GRcKO マウスおよび IL17Cre-GRcKO マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) や大腸炎を誘導し、病態組織における Th17 細胞の割合や病態の進行を評価することで、GR が Th17 細胞の病原性を促進するか解析した。

精神的なストレスはグルココルチコイドの急速な分泌を誘導すると同時に、胃潰瘍や十二指腸潰瘍を惹起する。ストレスによるグルココルチコイドが Th17 細胞の分化を促進することで腸管炎症に寄与するか検証するために、マウスにストレス負荷した後に免疫応答を惹起し、Th17 細胞が誘導されるか検証した。

#### 4 . 研究成果

CD4Cre-GRcKO マウスの未感作 T 細胞は、Th17 細胞分化培養においてコントロールマウスに比べ、Th17 細胞への分化が著しく障害された。また CD4Cre-GRcKO マウスの T 細胞において Hif1 $\alpha$  や解糖系関連遺伝子の発現量が減少しており、細胞内への糖の取り込みや細胞分裂が障害されることがわかった。この結果より、グルココルチコイドが解糖系を促進して Th17 細胞への分化を促進することがわかった。

CD4Cre-GRcKO マウスおよび IL17Cre-GRcKO マウスの腸管に常在する Th17 細胞および 3 型自然リンパ球 (ILC3) が減少しており、グルココルチコイドが 3 型免疫応答を担う免疫細胞の分化および維持を促進することがわかった。また、CD4Cre-GRcKO マウスでは腸内細菌叢の多様性に変化が見られたことから、Th17 細胞を介して腸内環境に影響を与えることが示唆される。

CD4Cre-GRcKO マウスに EAE を誘導したところ、中枢神経叢に浸潤した Th17 細胞がコントロールマウスに比べ減少しており、病態の進行や程度も低かった。また大腸炎を誘導したところ、同様に Th17 細胞の減少と軽度の病態が見られた。一方で、IL17Cre-GRcKO マウスに大腸炎を誘導したところ、Th17 細胞の減少は見られたが、病態の進行はコントロールマウスと同程度だった。以上から、グルココルチコイドは Th17 細胞の分化を促進することで病態の増悪に寄与するが、Th17 細胞に分化後の病原性には大きな作用はないことが示唆される。

ストレスによるグルココルチコイドが Th17 細胞の分化や機能に影響するか調べるために、マウスに睡眠障害ストレスと拘束ストレスを負荷した後、抗 CD3 抗体を投与して十二指腸における Th17 細胞の分化を検出した。まず、ストレス未負荷のマウスに比べ、ストレス負荷したマウスの十二指腸において Th17 細胞や好中球が顕著に増加した。しかし、CD4Cre-GRcKO マウスではこの増加が見られなかったことから、ストレスの際にはグルココルチコイドが Th17 細胞の発生を介して炎症の発症に寄与する可能性があることが示唆された。

以上の知見から、グルココルチコイドが Th17 細胞の分化や維持、機能を促進することで病態の増悪に寄与することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Cui Guangwei, Shimba Akihiro, Ma Guangyong, Takahara Kazuhiko, Tani-ichi Shizue, Zhu Yuanbo, Asahi Takuma, Abe Akifumi, Miyachi Hitoshi, Kitano Satsuki, Hara Takahiro, Yasunaga Jun-ichirou, Suwanai Hirotsugu, Yamada Hisakata, Matsuoka Masao, Ueki Kohjiro, Yoshikai Yasunobu, Ikuta Koichi	4. 巻 204
2. 論文標題 IL-7R $\alpha$ -Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Competes with the STAT5 Signal to Modulate T Cell Development and Homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 844 ~ 857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inokawa Hitoshi, Umemura Yasuhiro, Shimba Akihiro, Kawakami Eiryu, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Ohashi Munehiro, Minami Yoichi, Cui Guangwei, Asahi Takuma, Ono Ryutaru, Sasawaki Yuh, Konishi Eiichi, Yoo Seung-Hee, Chen Zheng, Teramukai Satoshi, Ikuta Koichi, Yagita Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59541-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榛葉旭恒
2. 発表標題 Glucocorticoids enhance T cell immune response.
3. 学会等名 日本免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本語総説として申請者の研究成果について、アンチ・エイジング（14;p489-493, 2018）、医学のあゆみ（216(11);p865-866,2018）、生体の科学（70(2);p102-108,2019）、実験医学（37(3);p392-396,2019）にて紹介した。また、研究成果が評価され、第35回井上研究奨励賞を受賞した。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	生田 宏一  (Ikuta Koichi)  (90193177)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授    (14301)	