

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07488

研究課題名(和文)自己反応性Th17ヘルパーT細胞の長期生存機構の解析

研究課題名(英文)Mechanisms of long-term survival of self-reactive helper T cells

研究代表者

竹馬 俊介(CHIKUMA, Shunsuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：50437208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患の多くに、IL-17産生性ヘルパーT細胞(Th17)が関与するが、なぜ、Th17が自己免疫の主要なリンパ球であるのか、また、Th17が他のヘルパーT細胞に比べて、体内で長期生存するのかは知られていない。本研究の結果、自己反応性Th17は、内在性のT細胞が減少した、いわゆる lymphopeniaの状態でもっとも良く生存する事、lymphopeniaにおいては、自己反応性T細胞の増殖を伴う数の維持が行われる事を見出した。また、自己反応性Th17は、腸内細菌依存性に生存する事がわかり、腸内細菌をターゲットにすることで、自己免疫疾患の新規治療法となりえ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

乾癬、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症といった慢性の自己免疫疾患は近年増加の一途をたどり、この病態解明は社会的に緊急かつ重要な課題である。マウスを用いて自己反応性Th17が長期生存し、慢性皮膚炎を起こすモデルを確立できた。今後は、このモデルを用いて自己免疫疾患の新規治療法を研究する予定である。また、Th17の生存や活性化に関わる菌およびその抗原などを同定できれば、自己免疫疾患のさらなる理解や治療法につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：IL-17 producing helper T cells (Th17) are suggested in persistent autoimmune diseases. We found that autoreactive Th17 are preferentially maintained and activated in lymphopenic mice and caused severe autoimmune diseases. In addition, mice treated with a cocktail of antibiotics that depleted intestinal microbiota showed almost complete protection from Th17-mediated autoimmunity. Our current data suggest that autoreactive T cells are maintained by intestinal microbiota. Modulating particular intestinal bacteria may provide novel therapy for many autoimmune diseases.

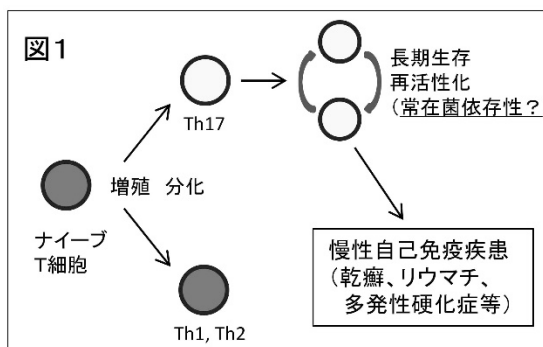
研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 ヘルパーT細胞

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の多くは、自己反応性の IL-17 産生性ヘルパーT 細胞 (Th17) が関与するが、なぜ、Th17 が自己免疫の主要なリンパ球であるのか、また、Th17 が他のヘルパーT 細胞に比べて、体内で長期生存するのかは知られていない。私は以前に、自己免疫疾患を自然発症する PD-1 ノックアウトマウスにおいて、細菌抗原に対する自然免疫系の活性化が亢進し、結果として Th17 の分化と自己免疫疾患の増悪が起こることを報告した。(Rui, Honjo and Chikuma. PNAS 110(40):16073-8, 2013)

また、細菌の構成成分である LPS 暴露により惹起する肺炎モデルにおいて、Th17 は自然免疫細胞のごとく IL-17 および IL-22 を急速に産生する。(Sakaguchi, Chikuma et al. Int Immunol. 28, 233-43, 2015) Th17 は、本来細胞外細菌や真菌と戦うために特化したヘルパーT 細胞の一種であり (図1)、この分化、生存、増殖および病原性に常在細菌が関与することが考えられるが、例えば腸内細菌叢の Th17 への影響は不明である。



## 2. 研究の目的

本研究では、(1)Th17 が関わる自己免疫疾患モデルを樹立し、(2)当該モデルにおける常在細菌の関与を検討し、(3)既存の免疫抑制剤などの効果を検討することで、慢性自己免疫疾患の病態を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス慢性皮膚炎モデルを用い、自己反応性 Th17 の体内での維持機構と慢性炎症の成立過程を解析した。具体的には、皮膚の単一のタンパク (デスモグリン3) に特異性を持つ H1 TCR Tg (CD45.1) マウス (Takahashi et al. J. Clin. Invest. 121: 3677-88, 2011) に、シクロフォスファミドを投与し、このマウスに見られる自己寛容が破綻するかどうかを検討した。

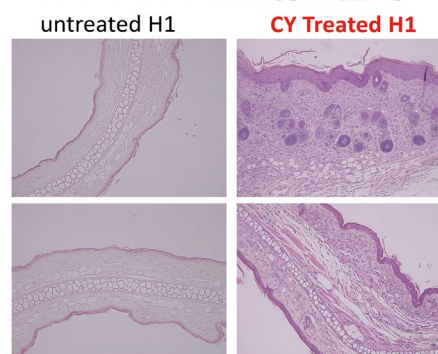
また、H1 TCR Tg よりナイーブ T 細胞を精製し、病原性 Th17 分化誘導法 (Muranski et al. Immunity 35: 972-85, 2011 より改良) を用いて生体内で長期生存し、かつ高度に病原性を持つ Th17 へと分化させた。これを同系統である野生型 C57BL/6 マウス (CD45.2) に移入して、マウスに皮膚炎を惹起することを試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 皮膚反応性 TCR Tg マウスでの免疫寛容機構

H1 TCR Tg マウスは、体内のすべての T 細胞が MHC クラス II 拘束性に皮膚の単一のエピトープペプチドを認識するにも関わらず、皮膚炎を発症しない。自己免疫性糖尿病モデルマウスである NOD マウスに、I 型糖尿病を誘導する活性が知られているシクロフォスファミドを H1 TCR Tg マウスに投与すると、2~4 週間後、皮膚の顕著な肥厚と単核球浸潤を伴う皮膚炎を発症する事を見出した。(図2) シクロフォスファミドは一時的な T 細胞減少の後、T 細胞増殖と制御性 T 細胞 (Treg) の除去を行う効果がある。以上のデータより、H1 TCR Tg マウスに起こっている免疫寛容は、Treg 細胞によって維持されている事が考えられた。

図2 シクロフォスファミド投与による H1 マウスの皮膚炎誘導



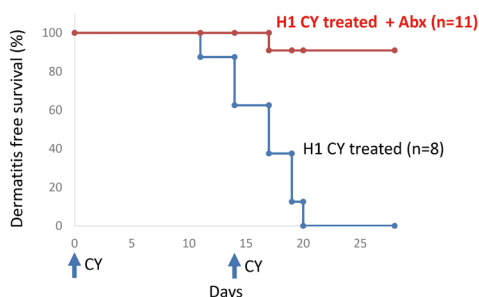
### (2) 自己免疫性皮膚炎における常在菌の関与

上記の、シクロフォスファミド誘発性皮膚炎モデルにおいて、常在菌の関与を検討した。H1 TCR Tg マウスに、腸内細菌を大幅に除去することが知られる、抗生物質 (アンピシリン、ネオ

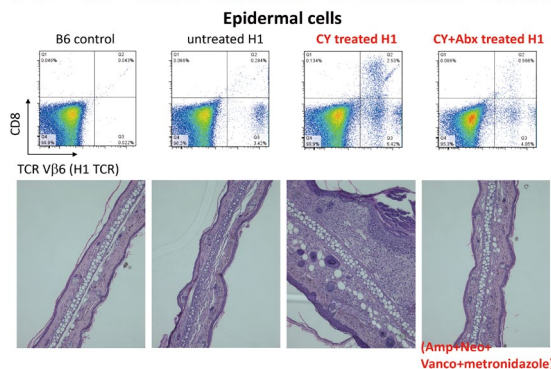
マイシン、バンコマイシンおよびメトロニダゾール4剤のカクテル)の投与実験を行った。10日間の投与の後、シクロフォスファミドで皮膚炎の誘導を行った。シクロフォスファミドのみを投与したマウスにおいては重度の皮膚炎が発症したのに対し、抗生物質カクテル投与群では発症がほぼ完全に抑制されることが分かった(図3および図4)。このことより、当モデルにおける腸内細菌の関与が示された。

### (3) 自己反応性 Th17 移入による皮膚炎モデルの試み

**図3 抗生物質4剤併用による皮膚炎の抑制**

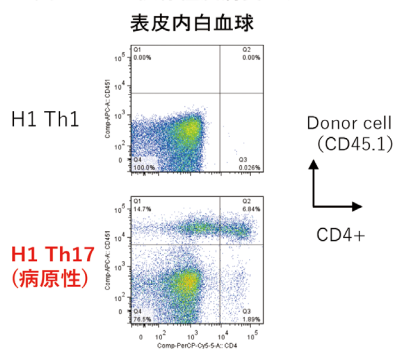


**図4 抗生物質4剤併用による皮膚炎の抑制**



病原性の Th17 を試験管内で誘導する方法について検討した。H1 TCR Tg マウスのリンパ節から、ナイーブ T 細胞を 98%以上の純度で分離し、T 細胞レセプター (TCR) 刺激、および炎症性サイトカインの存在下で活性化させた。従来 Th17 を誘導するとされていた条件では、6 日間培養した T 細胞からの IL-17 産生が弱く、これをマウスに移入しても Th17 の生存及び自己免疫疾患の発症が認められなかった。そこで、サイトカインの条件、および TCR 刺激後の培養条件を検討し、一定の条件で高度に病原性のある Th17 を作る事ができた。この細胞はマウスに自己免疫疾患を誘導し、コントロールの Th1 によっては発症しなかった(図5)。

**図5 Th17依存性皮膚炎モデル**



### (4) 自己反応性 Th17 の長期生存機構

上記の実験系で、実際に病原性の Th17 が長期生存するメカニズムを解析した。その結果、① 自己反応性 Th17 は、内在性の T 細胞が減少した、いわゆる lymphopenia の状態でもっとも良く生存する事、② lymphopenia においては、自己反応性 T 細胞の増殖を伴う数の維持が行われる事、③ 既存のいくつかの免疫抑制剤が、この増殖抑制を行い、自己免疫症状の発症を抑制状態に保つこと ④しかしながら、そのような抑制状態でも、自己反応性 Th17 は、リンパ節、脾臓、および皮膚で、活性化が抑制されながらも生存している事がわかった。以上より Th17 は、体内で長期生存し、免疫抑制剤の投与中止に伴い、再び活性化して自己免疫疾患の発症に貢献する事、自己反応性 Th17 の生存を、マウス体内で長期間にわたり観察する実験系を立ち上げられたと考える。

(5)免疫抑制を行ったマウス体内に残存した Th17 をより詳細に解析した。免疫抑制剤を打って抑制されたと考えられた投与7日後、FACSによって残存したT細胞を回収し、RNAシーケンス解析を試みたところ、免疫抑制剤を投与しなかったマウスの細胞と比較して、これらの細胞では生存に必要なATPを得る細胞内経路に特徴的な変化が見られた。特に、ミトコンドリアにおける代謝亢進が予測されたことから、これに関わる酵素群に着目した。免疫抑制剤と、ミトコンドリア関連酵素の阻害剤を共に作用させると、少なくとも試験管内では、Th17 の相乗的な抑制が見られた。本研究から、Th17 は他のヘルパーT細胞に見られない独特な代謝経路を使って長期生存する事、この経路を阻害すれば、自己反応性T細胞の長期生存を断ち切ることができると可能性が示唆された。

### (得られた成果の位置づけとインパクト)

乾癬、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症といった慢性の自己免疫疾患は近年増加の一途をたどり、この病態解明は社会的に緊急かつ重要な課題である。マウスを用いて自己反応性 Th17 が長期生存し、慢性皮膚炎を起こすモデルを確立できた。今後は、このモデルを用いて自己免疫疾患の新規治療法を研究する予定である。

また、当初予期していないことだが、本研究の皮膚炎モデルは常在菌を除去する抗生物質カクテル療法によってほぼ完全に発症抑制されることがわかった。特定の腸内細菌が食物を代謝し、機能的産物が Th17 の分化を規定するという成果が他の研究者によって提唱され、極めて高い注目を浴びている。T 細胞はきわめて多様な TCR を表出し、クローン選択によって生成される。末梢においても T 細胞は TCR を介した何らかの抗原刺激により影響を受けると考えられるが多くが不明である。また、Th17 の体内での維持には、TCR を介した持続的な抗原刺激が必要であることが示唆されているが (Levine et al. *Nat Immunol.* 15: 1070-78, 2014)、この抗原についても不明である。本研究の結果、Th17 が常在菌由来の抗原刺激を受け生存している可能性が示された。今後、独自開発した皮膚抗原特異的 Th17 を用い、この生存や活性化に関わる菌およびその抗原などを同定できれば、自己免疫疾患のさらなる理解や治療法につながると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chikuma S, Yamanaka S, Nakagawa S, Ueda MT, Hayabuchi H, Tokifuji Y, Kanayama M, Okamura T, Arase H, Yoshimura A	4. 巻 206
2. 論文標題 TRIM28 Expression on Dendritic Cells Prevents Excessive T Cell Priming by Silencing Endogenous Retrovirus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1528-1539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2001003	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 Nagai T, Chikuma S, Hanaoka K	4. 巻 17
2. 論文標題 Detection of singularity in immunity and cancer by novel imaging techniques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophys Physicobiol	6. 最初と最後の頁 98-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.BSJ-2020018	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 -
1. 著者名 Sakai R, Ito M, Yoshimoto K, Chikuma S, Kurasawa T, Kondo T, Suzuki K, Takeuchi T, Amano K, Yoshimura A	4. 巻 9
2. 論文標題 Tocilizumab monotherapy uncovered the role of the CCL22/17-CCR4+ Treg axis during remission of crescentic glomerulonephritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Transl Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cti2.1203	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 -
1. 著者名 Kondo T, Ando M, Nagai N, Tomisato W, Srirat T, Liu B, Mise-Omata S, Ikeda M, Chikuma S, Nishimasu H, Nureki O, Ohmura M, Hayakawa N, Hishiki T, Uchibori R, Ozawa K, Yoshimura A	4. 巻 80
2. 論文標題 The NOTCH-FOXM1 Axis Plays a Key Role in Mitochondrial Biogenesis in the Induction of Human Stem Cell Memory-like CAR-T Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 471-483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-1196	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 該当する

1. 著者名 Kondo T, Imura Y, Ando M, Chikuma S, Yoshimura A	4. 巻 2048
2. 論文標題 In Vitro Conversion of Activated T Cells into Stem Cell Memory-Like T Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 41-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9728-2_4	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 該当する

1. 著者名 Nakatsukasa H, Oda M, Yin J, Chikuma S, Ito M, Koga-Iizuka M, Someya K, Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada YI, Yamanaka S, Takamura-Enya T, Lu Q, Yoshimura A	4. 巻 31
2. 論文標題 Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization and IL-17 expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 335-347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz008	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹馬俊介
2. 発表標題 内在性レトロウイルス抑制機構を標的とした免疫治療法を目指す
3. 学会等名 第19回日本免疫治療学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹馬俊介
2. 発表標題 エピゲノム因子による、自己免疫寛容、がん免疫寛容の調節
3. 学会等名 文科省先端モデル動物支援プラットフォーム 特別プログラム講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	時藤 夕紀子  (Tokifuji Yukiko)		
研究協力者	早瀬 帆高  (Hayabuchi Hodaka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------