

## 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24年5月28日現在

機関番号：18001  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21390132  
 研究課題名（和文）細胞内寄生性細菌に対するインターロイキン-17 の新規感染防御機能の  
 解明と応用  
 研究課題名（英文）New role of interleukin-17 in protective immunity against  
 intracellular bacterial infections and its application  
 研究代表者  
 松崎 吾朗（MATSUZAKI GORO）  
 琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授  
 研究者番号：30229455

研究成果の概要（和文）：インターロイキン(IL)-17 は、好中球性炎症を誘導するサイトカインとして同定されたが、申請者らは、細胞内寄生性細菌の感染に対する感染防御においても IL-17 が重要な役割を果たすことを明らかにした。結核菌肺感染では、感染防御を担う成熟肉芽腫の形成に  $\gamma\delta$  型 T 細胞が産生する IL-17 が必須であり、IL-17 により誘導される接着分子が成熟肉芽腫形成に関与する可能性も示唆された。IL-17 産生細胞の制御が新たな結核予防と治療の方法になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：IL-17 was identified as a proinflammatory cytokine which induce generation and migration of neutrophils. We demonstrated that IL-17 also participate in protective immunity against intracellular bacterial infection in neutrophil-independent manner. To address the mechanism of IL-17-mediated protection, IL-17-deficient mice infected with mycobacteria were analyzed. In the absence of IL-17 produced by  $\gamma\delta$  T cells, mature granuloma formation in the lung was impaired, with attenuated protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Induction of adhesion molecules by IL-17 was indicated to be important in the mature granuloma formation. All the results suggest that regulation of IL-17-producing cells would be a new approach to enhance protective immunity against tuberculosis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 7,700,000  | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 2010年度 | 2,900,000  | 870,000   | 3,770,000  |
| 2011年度 | 2,700,000  | 810,000   | 3,510,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 13,300,000 | 3,990,000 | 17,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

CD4<sup>+</sup> Th17 型 T 細胞の産生する IL-17 は、近年注目されているサイトカインである。IL-17 は好中球の誘導を介して自己免疫疾患の病態形成や細胞外寄生性細菌に対する感染防御に重要な役割を果たすことが明らか

かとなっていた。申請者らは、世界に先駆けて、IL-17 が細胞内寄生性細菌感染に対する防御免疫にきわめて重要なことを見出し、報告してきた。しかし、IL-17 が細胞内に寄生した細菌を排除するメカニズムは明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、IL-17 による細胞内寄生性菌に対する感染防御メカニズムを解明することを目的として遂行された。

## 3. 研究の方法

(1) マイコバクテリア感染肺に形成される Th1 依存性肉芽腫形成における IL-17 の役割：IL-17 遺伝子欠損 (KO) マウスに *Mycobacterium bovis* BCG あるいは結核菌を肺感染させ、経時的に肺での肉芽腫形成および Th1 型 T 細胞誘導を解析した。また、感染防御を感染臓器内菌数を指標に検討した。

(2) マイコバクテリア感染肺で IL-17 を産生する細胞の同定：  
感染肺より分離した白血球分画に対して、フローサイトメトリー (FCM) 法により IL-17 産生細胞を解析した。

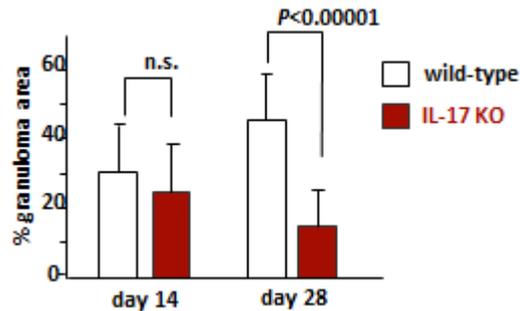
(3) IL-17 によりマイコバクテリア感染肺に誘導される遺伝子の同定：  
IL-17 により誘導されることが推定される遺伝子について、野生型マウスと IL-17KO マウス間での発現を比較した。

(4) 腸管における IL-17 の生体防御機能：  
細胞内寄生性を有する *Salmonella enterica* serovar Typhimurium は腸管を侵入門戸とする病原体である。また IL-17 は腸管免疫系により恒常的に発現される。そこで、腸管感染および生体防御における IL-17 の役割について *S. Typhimurium* 感染系などを用いて検討した。

## 4. 研究成果

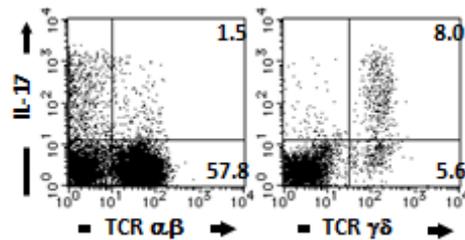
(1) マイコバクテリア感染肺に形成される Th1 依存性肉芽腫形成における IL-17 の役割：正常マウスの肺に BCG を感染させると、約 2 週間でマクロファージを中心とする初期肉芽腫病変が肺に形成される。その後、感染 4 週以降にマイコバクテリア抗原特異的 Th1 型 T 細胞が肺に誘導され、感染マクロファージを T 細胞が取囲む成熟肉芽腫の構造が形成される。IL-17KO マウスに BCG を肺感染させると、初期肉芽腫の形成には野生型マウスと同程度であったが、成熟肉芽腫の形成は著しく低下した。しかしながら、マイコバクテリア抗原特異的 Th1 細胞の誘導は両群間で有意な差は認められなかった。結核菌肺感染においても、ほぼ同様な結果が認められ、かつ IL-17KO マウスでは、感染肺内の菌数が著しく増加していた。従って、感染マクロファージと抗原特異的 Th1 細胞がコンパクトに集簇しマイコバクテリアの排除に働く成熟肉芽腫の形成に IL-17 が重要であること

が示された。この所見から、IL-17 産生細胞を誘導する新しいタイプのワクチンは、肉芽腫形成増強を介して肺結核に対する防御免疫をより強く誘導する可能性が示唆された。



(2) マイコバクテリア感染肺で IL-17 を産生する細胞の同定：

IL-17 産生細胞としては、T 細胞レセプター (TCR)  $\alpha\beta$  型 CD4+Th17 細胞が最初に同定された。しかしながら、BCG および結核菌肺感染では CD4+T 細胞からの抗原特異的 IL-17 産生はほとんど認められなかった。一方、通常の末梢 T 細胞の数%を示すに過ぎない TCR  $\gamma\delta$  型 T 細胞は強い IL-17 産生を示した。その TCR の多様性を検討したところ、TCR の多様性を決定する V 領域遺伝子に関して  $V\gamma 4$  あるいは  $V\gamma 6$  を発現する細胞のみが IL-17 を産生することが明らかとなった。ヒトにおいても、特定の V 領域遺伝子を発現する TCR  $\gamma\delta$  型 T 細胞による IL-17 産生が報告されていることから、このような IL-17 産生 T 細胞を人為的に誘導することが新しい結核予防・治療の方法論になるものと期待された。



(3) IL-17 によりマイコバクテリア感染肺に誘導される遺伝子の同定：

IL-17 により誘導される遺伝子として、好中球誘導と遊走、あるいは抗菌性物質が良く知られている。それ以外に、各種のケモカインと接着分子の誘導も知られており、それが IL-17 依存的な成熟肉芽腫形成に関与すると推定した。この観点から、野生型マウスあるいは IL-17KO マウスに BCG を肺感染させ、経時的にケモカインと接着分子の遺伝子発現レベルを realtime RT-PCR 法で検討した。その結果、接着分子 LFA-1 および ICAM-1 の

発現が IL-17KO マウスで遅延することが明らかとなった。これらの接着分子に対する抗体を成熟肉芽腫形成直前に投与すると成熟肉芽腫の形成が阻害されることから、これらの接着分子が IL-17 依存性成熟肉芽腫形成に関与する可能性が示唆された。

(4) 腸管における IL-17 の生体防御機能：IL-17 は腸管上皮面および腸管免疫系においては恒常的に発現されていることを見出した。そこで、*S. Typhimurium* を野生型マウスの腸管内に感染させる実験系を用いて IL-17 の腸管感染における役割を検討した。抗 IL-17 中和抗体を全身的に投与しても菌の排除には影響は認められなかった。一方、腸管内に *S. Typhimurium* とともに抗 IL-17 中和抗体を投与すると、腸管内の *S. Typhimurium* 菌数の著名な増加と腸管上皮組織の破壊が数時間後に認められた。さらに、*S. Typhimurium* と抗 IL-17 中和抗体の腸管内接種では、抗菌ペプチド  $\beta$ -defensin 3 の消失が認められた。したがって、恒常的に腸管上皮で産生される IL-17 は腸管上皮の抗菌ペプチド産生誘導を介して病原細菌の侵入を防いでいるものと考えられた。

一方、腸管における恒常的な IL-17 は必ずしも宿主に有利ではない可能性も示唆された。腸管壁に腫瘍を接種するマウス担癌システムを用いて解析を行った結果、IL-17 存在下では腫瘍の進展が加速し、抗 IL-17 中和抗体投与によりそれが抑制されることが明らかとなった。

これらの結果から、IL-17 の誘導は細胞内寄生性細菌に対する防御には重要であること、しかし、その発現の場とタイミングによっては、腫瘍の進展を増強するリスクともなることが明らかとなった。

## 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 9 件)

① Miyata T., Harakuni, T., Taira, T., Matsuzaki, G., Arakawa, T. Merozoite surface protein-1 of *Plasmodium yoelii* fused via an oligosaccharide moiety of cholera toxin B subunit glycoprotein expressed in yeast induced protective immunity against lethal malaria infection in mice. *Vaccine* 30, 948-958, 2012. (査読有)

② Oshiro, K., Kohama, K., Umemura, M., Uyttenhove, C., Inagaki-Ohara, K., Arakawa, T., Harada, H., Nakae, S., Iwakura, Y., Nishimaki, T., Matsuzaki, G.

Interleukin-17A is involved in enhancement of tumor progression in murine intestine. *Immunobiology* 217(1): 54-60, 2012. (査読有)

③ Miyata, T., Harakuni, T., Tsuboi, T., Aattabongkot, J., Ikehara, A., Tacibana, M., Torii, M., Matsuzaki, G., Arakawa, T. Tricomponent immunopotentiating system as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. *Infect. Immune*. 79: 4260-4275, 2011. (査読有)

④ Ma, Y., Aymeric L., Locher, C., Mattarollo, S. R., Delahaye, N., F., Pereira, P., Boucontet, L., Apetoh, L., Ghironghelli, F., Casares, N., Lasarte, J. J., Matsuzaki, G., Ikuta, K., Ryffel, B., Benlagha, K., Tensiere, A., Ibrahim, N., Déchanet-Merville, J., Chaput, N., Smyth, M. J., Kroemer, G., Zitvogel, L. Contribution of IL-17-producing  $\gamma \delta$  T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J. Exp. Med.* 208: 491-503, 2011. (査読有)

⑤ Mayuzumi, H., Inagaki-Ohara, K., Uyttenhove, C., Okamoto, Y., Matsuzaki, G. Interleukin-17A is required to suppress invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to enteric mucosa. *Immunology*. 131 (3): 377-385, 2010. (査読有)

⑥ Miyata, T., T. Harakuni, T. Tsuboi, J. Sattabongkot, H. Kohama, M. Tachibana, G. Matsuzaki, M. Torii, and T Arakawa. Plasmodium vivax ookinete surface protein Pvs25 linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization. *Infect. Immun.* 78: 3773-3782, 2010. (査読有)

⑦ Okamoto, Y. Y., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R. L. Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y. and Matsuzaki, G. Essential role of interleukin-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol.* 184(8):4414-4422, 2010. (査読有)

⑧ Yahagi, A. Umemura, M., Tamura, T., Kariyone, A., Begum, M. D., Kawakami, K., Okamoto, Y., Hamada, S., Oshiro, K., Kohama, H., Arakawa, T., Ohara, N., Takatsu, K. and Matsuzaki, G. Suppressed

induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. *Int. Immunol.* 22(4): 307-318, 2010. (査読有)

⑨Begum, M. D., Umemura, M., Yahagi, A., Okamoto, Y., Hamada, S., Ohshiro, K., and Matsuzaki, G. Accelerated induction of mycobacterial antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the Mycobacterium tuberculosis-infected lung by subcutaneous vaccination with Mycobacterium bovis bacilli Calmette et Guérin. *Immunology* 128:556-563, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

①當山清吾、梅村正幸、芳田裕子、矢作綾野、安田直子、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗。慢性結核感染におけるインターロイキン-17 の役割。第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 27-29 日、長崎。

②Matsuzaki, G., Umemura M. Regulation of immune response against Mycobacterium infection by IL-17-producing gamma/delta T cells. (International Symposium 2, “Recognition and regulation of innate immunity against pathogenic bacteria using various infection models”) 第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 27-29 日、長崎。

③梅村正幸、當山清吾、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗。結核菌感染における IL-17A および IL-17F の役割。第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 27-29 日、千葉。

④ Matsuzaki, G., Okamoto Yoshida, Y., Umemura, M. Role of IL-17-producing gamma/delta T cells in granuloma formation of mycobacteria-infected lung. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo)*. 6-10 Sep, 2011.

⑤Umemura M., Okamoto Y, Yahagi A, Toma N, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of interleukin-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo)*. 6-10 Sep, 2011.

⑥梅村正幸、當山清悟、岡本祐子、矢作綾野、當眞奈海、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗。

結核菌に対する感染防御における IL-17 ファミリーの役割。第 22 回日本生体防御学会学術総会、2011 年 6 月 29 日-7 月 1 日、那覇。

⑦Umemura M., Yoshida YO, Yahagi A, Nakane S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of interleukin-17A in the formation of mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. 14th International Congress of Immunology (Kobe) 23-26 Aug, 2010.

⑧Yahagi a, Umemura M, Tamura T, Kariyone A, Begum DM, Yoshida, YO, Ishihara K, Takatsu K, Matsuzaki G. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (Kobe) 23-26 Aug, 2010.

⑨梅村正幸、岡本祐子、矢作綾野、本田尚子、當眞奈海、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗。マイコバクテリア感染肺における IL-17A 依存性肉芽腫形成メカニズムの解析。第 21 回日本生体防御学会学術総会 (仙台) 2010 年 7 月 22-24 日。

⑩宮田健、原國哲也、池原歩、坪井敬文、J. Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武。三部構成免疫賦活システム (TIPs) 第 21 回日本生体防御学会学術総会 (仙台) 2010 年 7 月 22-24 日。

⑪松崎吾朗、岡本祐子、梅村正幸。結核菌肺感染に対する防御免疫におけるインターロイキン-17A (IL-17A) の役割。第 85 回日本結核病学会総会、2010 年 5 月 20-21 日、京都

⑫矢作綾野、梅村正幸、田村敏生、D. M. Begum、岡本裕子、新城紀久子、刈米アイ、高津聖志、松崎吾朗。肺におけるマイコバクテリア抗原特異的 Th1 型免疫応答制御への肺内 CD11c<sup>+</sup> 細胞の関与の検討。第 39 回日本免疫学会総会 (大阪) 2009 年 12 月 2-4 日

⑬岡本裕子、梅村正幸、矢作綾野、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗。結核菌感染肺における IL-17A 産生 T 細胞の防御機構の解明。第 39 回日本免疫学会総会 (大阪) 2009 年 12 月 2-4 日

⑭松崎吾朗、矢作綾野、Dilara Mst. Begum、梅村正幸。結核菌感染した肺における防御免疫誘導の制御機構。第 50 回日本熱帯医学会シンポジウム 7 「結核と腸管感染症の新知

見」(沖縄) 2009年10月23日

⑮岡本裕子、梅村正幸、矢作綾野、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗。Mycobacterium tuberculosis 感染に対する IL-17 産生 T 細胞の防御機構の解明。第 20 回日本生体防御学会学術総会(東京) 2009年7月25-26日

⑯矢作綾野、D. M. Begum、梅村正幸、岡本裕子、松崎吾朗。Mycobacterium tuberculosis (Mtb) 感染肺への Mtb 抗原特異的 CD8+T 細胞誘導に対する BCG 接種の効果の検討。第 20 回日本生体防御学会学術総会(東京) 2009年7月25-26日

[その他]

ホームページ等

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/hostdefense/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 吾朗 (MATUZAKI GORO)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授  
研究者番号：30229455

### (2) 研究分担者

梅村 正幸 (UMEMURA MASAYUKI)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教  
研究者番号：90359985

新川 武 (ARAKAWA TAKESHI)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：50305190