

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790480

研究課題名（和文） 病原体成分がT細胞応答に直接及ぼす影響の解明

研究課題名（英文） Understanding of direct influence of pathogen-associated molecular patterns on T cell responses

研究代表者

今西 貴之 (IMANISHI TAKAYUKI)

独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・研究員

研究者番号：10513442

研究成果の概要（和文）：

我々はTLR2のリガンドがROR $\gamma$ tの発現誘導の増強を介して、Th17細胞への分化を促進し、これらと相関するようにTCRとTLR2の共刺激によりNF- $\kappa$ BとNFATの活性化が増強することを明らかにした。さらに分化誘導後のTh17細胞のTLR2はTCRと共刺激することにより、活性化を増強することを明らかにした。しかしながら、Th1細胞とは異なり、分化誘導後のTh17細胞はTLR2の単独刺激では活性化に至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies including ours have shown that Toll-like receptors (TLRs) are functionally expressed not only on innate immune cells, but also on T cells, and some TLR ligands exhibit costimulatory functions of T cells in response to TCR stimulation to induce cytokine production and cell survival. Particularly, we have shown only TLR2 ligands directly induce IFN- $\gamma$  production, cell proliferation, and cell survival without TCR stimulation. In this study, we demonstrated that stimulation with TLR2 ligand promoted Th17 differentiation through the enhanced induction of ROR $\gamma$ t expression. This increased Th17 differentiation is associated with an augmented activation of NF- $\kappa$ B and NFAT. And we also demonstrated that stimulation by TLR2 enhanced TCR-mediated IL-17 production and cell proliferation. However, stimulation with TLR2 ligand plus IL-2 or IL-23 did not induce cytokine production such as IL-17 and IL-22 without TCR stimulation, whereas IL-1 $\beta$  induced IL-22 production in the presence of IL-2 or IL-23. In contrast to Th17 cells, stimulation with TLR2 ligand plus IL-2 robustly induced IL-22 production from Th1 cells. We also found that stimulation with TLR2 ligand plus IL-12 induced IFN- $\gamma$  production was impaired in memory phenotype T cells due to down-regulation of TLR2 expression. These findings reveal the cell-type specific differential role of TLR2 in the direct regulation of T cell response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：TLR、TCR、共刺激、Th1、Th17、メモリーT細胞

1. 研究開始当初の背景

Toll様受容体 (TLR) は病原体に保存された分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識し、迅速な自然免疫応答を誘導することにより、その後の獲得免疫応答を誘導することが知られているが、獲得免疫を担うT細胞も病原体の構成成分により直接活性化が制御されることが最近報告されている。これまでT細胞に発現するTLRの機能として、マウスではTLR2、TLR3、TLR9のリガンドがTCR刺激の共刺激分子としてT細胞の活性化を直接増強したり、制御性T細胞 (Treg) の活性化を直接制御することが報告されている。しかしながら、我々が調べた限りTLR3とTLR9リガンドによるT細胞の活性化の増強は、TLR非依存的であった (未発表データ)。一方で我々はTh1とTh2細胞に発現するTLRの機能解析を行い、TLR2刺激のみがTh1細胞を直接活性化 (IFN- $\gamma$ 産生、細胞増殖、生存延長の誘導) できるが、Th2細胞は活性化されないことを報告した。(J Immunol 178: 6715-6719, 2007)。

最近、新たなヘルパーT細胞のサブセットとしてIL-17を産生するTh17細胞が同定され、ある種の細胞外寄生性細菌の排除や自己免疫性疾患の発症に重要であることが示され、注目を集めている。TLRリガンドが自然免疫細胞からのIL-1やIL-23の産生を介して、Th17細胞への分化を誘導することはよく知られているが、TLRリガンドがTh17細胞への分化誘導に直接及ぼす影響に関しては明

らかにされていなかった。TLR2は病原体以外にも内因性のリガンドを認識することが知られており、TLR2欠損マウスは自己免疫性糖尿病に対して抵抗性を示す報告もあることから、生体内においてTLR2がTh17細胞の機能を直接制御している可能性が考えられた。我々はIL-6+TGF- $\beta$ で誘導されるTh17細胞への分化がTLR2リガンド存在下で、増強されることを見出したが、その分子機構の詳細は明らかになっていない。また、我々はTh1細胞上のTLR2が単独あるいはIL-2やIL-12と協調して、Th1細胞を直接活性化することを示してきたが、Th17細胞上のTLR2も同様に直接活性化される可能性が考えられる。

メモリーT細胞もTLRリガンド存在下でTCR刺激を行うとサイトカインの産生と増殖が促進されることが報告されているが、IL-18と同様に、TLR2が単独あるいはIL-12と協調して直接メモリーT細胞の活性化を誘導できるかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々はIL-6+TGF- $\beta$ で誘導されるTh17細胞への分化がTLR2刺激により増強されることを示してきたが、その分子機構と分化誘導後のTh17細胞におけるTLR2の役割に関しては不明な点が多い。そこで本研究ではTLR2刺激がTh17細胞への分化を促進する分子機構と分化誘導後のTh17細胞に発現するTLR2の機能を明らかにする。

T細胞上のTLR2はTCRと共刺激することに

より、T細胞の活性化を増強したり、分化誘導したエフェクターTh1細胞やエフェクターCD8+T細胞ではTLR2刺激単独で活性化を直接誘導することを明らかにしてきたが、メモリーT細胞におけるTLR2シグナルの直接的な役割に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、メモリーT細胞上のTLR2の機能的役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Th17細胞への分化誘導・活性化におけるTLR2の役割の解明

##### ①TLR2刺激によるTh17細胞への分化誘導促進の分子機構の解明

TLR2リガンド存在下で分化誘導したTh17細胞のmRNAを単離し、Th17細胞の分化に必須の転写因子ROR $\gamma$ tの発現量を定量的PCR法により明らかにする。

TLR2は共刺激を誘導することから、共刺激を介してTh17細胞の分化が増強される可能性が考えられる。そこでTLR2刺激で活性化が増強するTCR下流のシグナル伝達分子を同定する。

##### ②分化誘導後のTh17細胞におけるTLR2の役割の解明

Th17細胞もTh1細胞同様にTLR2リガンド単独で活性化される可能性が考えられるので、TLR2リガンドで刺激した時のサイトカインの産生(IL-17、IL-22)や活性化マーカー(CD69、CD70)、増殖、生存延長の誘導を調べる。IL-2やIL-23とTLR2が協調的に働く可能性も考えられるので、IL-2とIL-23存在下でも同様に調べる。TLR2刺激がTCR刺激によるIL-17の産生と増殖の誘導を増強するかも検討する。

#### (2)メモリーT細胞活性化におけるTLR2の役割の解明

##### ①メモリーT細胞におけるTLR2の役割の解明

メモリー表現型のT細胞をマウスから単離し、TLR2単独刺激あるいはIL-12存在下で刺激した時のサイトカイン産生を調べる。

### 4. 研究成果

#### (1) Th17細胞への分化誘導・活性化におけるTLR2の役割の解明

##### ①TLR2刺激によるTh17細胞への分化誘導促進

#### の分子機構の解明

ROR $\gamma$ tはTh17細胞のマスター遺伝子であることが広く知られているが、TLR2リガンド存在下でIL-6+TGF- $\beta$ でTh17細胞を分化誘導するとROR $\gamma$ tのmRNAの発現量が著明に増加することが明らかになった。また、ROR $\gamma$ tによって発現誘導されることが知られているIL-23受容体の発現もTLR2リガンド存在下で増加することが分かった。

TLR2の共刺激によってTCR下流のシグナル分子の活性化が増強するか検討したところ、ZAP-70やPLC- $\gamma$ などのTCR近傍のシグナル分子やERK、p38、JNKの活性化にはほとんど影響は見られなかったが、NF- $\kappa$ BとNFATの活性化がTLR2刺激により増強することを明らかにした。

##### ②分化誘導後のTh17細胞におけるTLR2の役割の解明

分化誘導したTh17細胞におけるTLR2の役割を検討したところ、TLR2リガンド単独ではIL-17やIL-22の産生、活性化マーカー、増殖、生存延長の誘導はほとんど認められなかったが、TCRと同時にTLR2刺激を行うとIL-17の産生や増殖、生存延長の亢進が認められた。また、IL-1 $\beta$ がIL-2あるいはIL-23存在下でTh17細胞からのIL-22の産生を誘導するのに対して、TLR2刺激ではIL-17やIL-22の産生、増殖の亢進はほとんど認められなかった。一方、Th1細胞ではIL-2とTLR2刺激によるIL-22の産生誘導が著明に認められた。

以上のことからTLR2はTh17細胞への分化誘導を直接亢進するとともに、分化後のTh17細胞においては共刺激シグナルを誘導し、Th17細胞の活性化を増強することが示唆された。

#### (2)メモリーT細胞活性化におけるTLR2の役割の解明

##### ①メモリーT細胞におけるTLR2の役割の解明

メモリー表現型のT細胞をマウスから単離し、TLR2リガンド単独あるいはIL-12存在下で刺激したところ、IL-18+IL-12刺激では著明なIFN- $\gamma$ の産生誘導が認められるのに対して、TLR2+IL-12刺激ではほとんど誘導が認められなかった。また、メモリー表現型のT細胞をTLR2とTCRで共刺激した場合でも、IL-2の産生増強はナイーブT細胞と比較して微弱

であった。そこでメモリー表現型 T 細胞の TLR2 の発現を FACS で解析したところ、メモリー表現型 T 細胞の TLR2 の発現レベルはナイーブ T 細胞や Th1 細胞と比較して低いことが明らかになった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

今西 貴之 (IMANISI TAKAYUKI)

独立行政法人理化学研究所・免疫シグナル研究グループ・研究員

研究者番号：10513442