

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659200

研究課題名（和文） 細菌感染症におけるIL-17/IL-22産生制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the regulatory mechanism of IL-17/IL-22 production during bacterial infection

研究代表者

岡本 一男 (OKAMOTO KAZUO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00436643

研究成果の概要（和文）：本研究では細菌感染時におけるIL-17/IL-22産生制御機構を明らかにすべく、Th17細胞産生性サイトカインのレポーターマウスを用いて、細菌感染時におけるTh17細胞やIL-17/IL-22産生性自然免疫系リンパ球の時空間的挙動について解析した。またIL-17産生細胞およびIL-22産生細胞を用いたトランスクリプトーム解析を通じて遺伝子発現プロファイルを作成し、Th17細胞やIL-17/IL-22産生性自然細胞におけるIL-22遺伝子の発現制御に関わる因子の探索を試みた。

研究成果の概要（英文）：To clarify the regulatory mechanism of IL-17 and IL-22 production in response to bacterial infection, we analyzed the spatio-temporal behavior of Th17 cells and IL-17/IL-22-producing innate lymphoid cells during bacterial infection, using the reporter mice for visualization of Th17-related cytokine. Furthermore, we performed transcriptome analyses of IL-17-producing cells and IL-22-producing cells, and explored the factors which may regulate the expression of IL-22 in Th17 cells or IL-17/IL-22-producing innate lymphoid cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症・免疫学・サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

2000年代に入り、Interleukin (IL)-17産生性ヘルパーT細胞サブセット「Th17細胞」が同定され、関節リウマチ等の自己免疫疾患や病原菌感染に対する生体防御に重要であることが明らかとなり、これまでのTh1-Th2パラダイムが大きく塗り替えられた(Korn et al, *Annu. Rev. Immunol.*, 2009)。当初Th17細胞の最たる特徴であるIL-17産生に注目が集まり、IL-17による炎症応答惹起・抗菌タンパク質誘導こそがTh17細胞の主要な機能であると考えられた。しかしながら、

Th17細胞はIL-22も高く発現すること、IL-22欠損マウスの解析からIL-22はIL-17とは異なる生理活性を有していることが示された(Wolk et al, *Semin. Immunopathol.*, 2010)。IL-22は皮膚、腸管、呼吸器などの粘膜組織上皮細胞に作用し、炎症性サイトカインや抗菌タンパク質産生を誘導できる。さらに、腸内細菌 *Citrobacter rodentium* および肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* の排除にはIL-17ではなくむしろIL-22が重要であるという報告もなされている。

その治療標的としての有望性故に、

昨今 Th17 細胞に関わる研究は切磋琢磨しており、国際競争が非常に激しい。その恩恵により IL-17 産生制御に関しては大きく理解が進んだ。Th17 細胞分化のマスター転写因子である ROR γ t を始め、ROR α 、Signal transducer and activator of transcription (STAT3)、Interferon regulatory factor 4 (IRF4)、Aryl hydrocarbon receptor (Ahr)、Runt-related transcription factor 1 (Runx1) といった転写因子の重要性が次々と報告されている。申請者もこれまで、転写制御因子 Inhibitor of κ B (I κ B) ζ が ROR γ t による IL-17 産生に重要であるという、新規制御メカニズムを見出した (Okamoto et al, *Nature*, 2010)。その一方で、IL-22 産生制御についてはほとんど謎のまま残されている。

またここ数年、細菌感染防御に関わり IL-17 と IL-22 を産生する自然免疫系リンパ球 (γ δ T 細胞、NK 細胞の一部のサブセット、リンパ組織誘導様細胞、腸管自然免疫リンパ系細胞) が続々発見され、総説誌でも大きく取り上げられている (Cua, D.J., *Nature, Rev., Immunol*, 2010)。細菌感染の初期には、Th17 細胞といった分化に時間のかかる獲得免疫細胞ではなく、細菌に反応してすぐに IL-17 や IL-22 を産生できる自然免疫系細胞が菌体排除に関わるという、概念が支持されつつある。今後様々な感染炎症のケースで検証し、IL-17/IL-22 産生細胞の生理的意義を確かめ、これらのサイトカイン産生制御機構を解明することが、生体防御の理解を深めるためにも必要不可欠な課題である。しかしながら Th17 細胞や IL-17/IL-22 産生性自然リンパ球を生体内で追跡できる手法が確立できておらず、また特に IL-17/IL-22 自然リンパ球に関しては、系統特異的マーカーが未同定のため、生体レベルでの検証が困難であるのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、Th17 細胞産生性サイトカインが可視化できる遺伝子操作マウスを駆使し、細菌感染時における IL-17/IL-22 産生制御機構を解明することを目的とする。具体的には、(1) Th17 細胞産生性サイトカインが可視化できるモデルマウスを用いて、細菌感染によりどのような IL-17/IL-22 産生性自然免疫系細胞が、いかなるタイミングで(時間的制御)、いかなる経路を介して(空間的制御)、感染炎症局所に動員されるかを生体レベルで検証する、(2) Th17 細胞および IL-17/IL-22 産生性自然免疫系細胞において、*Il22* 遺伝子発現を制御する分子メカニズムを解明することを目指した。本成果を通じて、細菌感染症における免疫システムの統合的理解に繋がるだけでなく、Th17 細胞における更なる機能制御機構の解明にも結び付くことが期待される。

る。

3. 研究の方法

マウスの *Il17a* (IL-17 をコードする) 遺伝子座に緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescence Protein: GFP) 遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウス (*Il17a*-GFP KI マウス; 米国 BIOCYTOGEN 社) を用いることで、IL-17 産生を生体レベルで可視化することが可能となる。また、GFP を指標とすることで、IL-17 産生細胞を固定することなく単離することが可能となり、IL-17 産生細胞内の遺伝子発現動態を追跡することが可能となる。そこで細菌感染における IL-17/IL-22 産生細胞動態を生体レベルで検証すべく、当該レポーターマウスに黄色ブドウ球菌感染モデルを実施し、IL-17/IL-22 産生細胞の時間的・空間的挙動をフローサイトメーターおよび免疫組織染色法を通じて解析する。さらに、IL-17/IL-22 産生性の CD4 陽性 T 細胞や自然リンパ球を分離精製し、遺伝子発現解析をベースに、IL-17/IL-22 発現制御に関わる遺伝子プロファイルについて調べる。さらにマウス *Il22* 遺伝子プロモーターを用いたレポーターベクターを用いたレポーターアッセイ、および IL-22 産生 CD4 陽性 T 細胞や自然リンパ球を用いたトランスクリプトーム解析を通じて、*Il22* 遺伝子発現を制御する必須因子の同定を目指す。

4. 研究成果

(1) マウスの *Il17a* (IL-17 をコードする) 遺伝子座の下流に、internal ribosome entry site (IRES) 配列と緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescence Protein: GFP) 遺伝子が組み込まれた遺伝子改変マウス (*Il17a*-GFP KI マウス) を米国 BIOCYTOGEN 社より導入した。当該レポーターマウスを使用した研究例はまだ報告がなかったため、まず GFP 発現が IL-17 発現のパターンと正確に一致しているかどうかを、*in vitro* および *in vivo* レベルで検証することにした。

Il17a-GFP ヘテロKI (*Il17a*^{Gfp/+}) マウス、ホモKI (*Il17a*^{Gfp/Gfp}) マウス、および野生型コントロール (*Il17a*^{+/+}) マウスより脾臓を摘出し、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を MACS beads を用いて単離精製した。これらのナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、IL-6、TGF- β 、IL-23 存在下にて抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、*in vitro* で三日間培養して Th17 細胞へ分化誘導させた。固定後、抗 IL-17A 抗体 (phycoerythrin (PE) 標識) を用いて細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメーターにて GFP 発現と IL-17A 発現 (PE) を含めたマルチカラー解析を行った。*Il17a*^{Gfp/Gfp} マウス由来の T 細胞では、

IL-17Aを発現する細胞(PE陽性)のほぼ全てがGFP陽性であった。一方*Il17a^{Gfp/+}* マウス由来のT細胞では、IL-17A発現細胞(PE陽性)の内、約半数のみがGFP陽性として検出された。なおこれらのKIマウスでは両者共に、IL-17発現量自体は差が認められなかった。従って*Il17a*-GFPレポーターマウスでは、ホモKIマウスを用いる限り、IL-17産生細胞のほぼ全てがGFP陽性として検出可能であり、IRES-GFP遺伝子配列の挿入によるIL-17発現への影響もほぼ無視できると考えられた。

次に、*Il17a^{Gfp/Gfp}* マウスと野生型コントロールマウス (*Il17a^{+/+}*)を用いて、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)を実施した。ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質及び完全フロイントアジュバントを皮下に投与することで、自己免疫応答を惹起させ、3週後に脊髄を摘出した。さらに脊髄の凍結切片を作製し、免疫組織染色を行った。EAEを発症したマウスでは、脊髄内にCD4陽性T細胞をはじめとする炎症細胞の浸潤が認められるが、EAEを誘導させた*Il17a^{Gfp/Gfp}* マウスの脊髄ではGFP陽性のCD3陽性T細胞の浸潤が明確に検出できた。以上より、*Il17a*-GFPレポーターマウスでは、*in vivo*レベルでもIL-17産生を可視化できることが確かめられた。

(2) *Il17a*-GFPレポーターマウスを用いて黄色ブドウ球菌*S. aureus*感染モデルを行った。マウス表皮組織および粘膜組織中のIL-17産生細胞をGFP発現を指標として、フローサイトメーターおよび免疫組織学手法により検出を試みた。細菌感染に応じて発生するIL-17産生細胞の多くはCD4陽性T細胞もしくは $\gamma\delta$ T細胞であった。GFP陽性CD4 T細胞の遺伝子発現およびタンパク質発現解析より、IL-17F、CCR6、ROR γ tを高く発現する細胞集団であり、Th17細胞の性質と多に合致することが認められた。また、GFP陽性 $\gamma\delta$ T細胞のTCRレパトア解析をおこなったところ、V γ 4陽性もしくはV γ 6陽性 $\gamma\delta$ T細胞であることが認められた。また同様にCCR6陽性、ROR γ t陽性であることも判明した。

さらに*Il17a*-GFPレポーターマウスとRag1欠損マウスを交配させ、*Rag1^{-/-} Il17a*-GFPレポーターマウスも作製し、同様に感染実験を実施したところ、表皮組織中にGFP陽性細胞が検出された。この細胞集団はIL-17産生性自然リンパ球であることが考えられた。そこで、自動細胞分離装置(セルソーター)により各種IL-22産生細胞とIL-17産生細胞を分離精製し、RNAを抽出・精製を行った。それらの細胞のRNAを用いて遺

伝子発現解析を実施し、それぞれの遺伝子プロファイルの作製に取り組んだ。

(3) マウス*Il22*遺伝子プロモーターを用いたレポーターベクターを作製し、既知のTh17細胞特異的転写因子 (ROR γ t、ROR α 、STAT3、Runx、Ahr、I κ B ζ)が*Il22*遺伝子の転写活性を誘導できるかをレポーターアッセイにより検討した。しかしどれも単独発現では*Il22*遺伝子の転写活性を有意に増強することはできなかった。

IL-6/TGF β 刺激で分化誘導させたTh17細胞(IL-22^{Low})とIL-6/TGF β /IL-23刺激で分化誘導させたTh17細胞(IL-22^{High})からRNAを精製し、IL-23刺激依存的に発現誘導が認められる遺伝子の探索を行った。候補遺伝子をクローニングし、マウス*Il22*遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイにより、*Il22*遺伝子の転写に関わる遺伝子をスクリーニングした。その結果、Th17細胞においては機能が報告されていないある細胞膜たんぱく質が、IL-22^{High} Th17細胞で高く発現し、さらにマウス*Il22*遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイにおいても有意に転写活性を増強させることが見出された。今後ナイーブCD4陽性T細胞を用いた過剰発現やRNAi実験を重ね、IL-22遺伝子発現制御における機能を実証する必要がある。

(4) *Il17a*-GFPレポーターマウスを用いた黄色ブドウ球菌*S. aureus*感染実験により、生体内におけるIL-17産生細胞の挙動を理解することができた。さらにGFP発現を指標とすることで、IL-17産生細胞を単離精製することができ、遺伝子発現解析を通じて、黄色ブドウ球菌*S. aureus*に応じてIL-17産生が誘導される制御機構の解析にも応用することが可能となる。また、IL-22産生細胞の遺伝子発現解析との比較により、より正確にIL-17産生制御機構とIL-22産生制御機構を区別することができる。両者の遺伝子発現プロファイルの比較解析により、*Il22*遺伝子発現制御に関わる遺伝子の探索作業が期待できる。

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4件)

- ① Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Potential molecular targets for suppressing Th17 development *Inflammation and Regeneration*, 2011 31(4): 354-360 http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol31No4/pdf/05_M3_354.pdf 査読有り
- ② Erik Idrus, Tomoki Nakashima, Ling Wang,

Mikihito Hayashi, Kazuo Okamoto, Tatsuhiko Kodama, Nobuyuki Tanaka, Tadatsugu Taniguchi and Hiroshi Takayanagi The Role of the BH3-only Protein Noxa in Bone Homeostasis *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 410(3):620-5 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.040 査読有り

- ③ Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis *Arthritis Research & Therapy*, 2011, 13(3):219 DOI: 10.1186/ar3323 査読有り
- ④ Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Osteoclasts in arthritis and Th17 development *International Immunopharmacology*, 2011, 11: 543-548 DOI: 10.1016/j.intimp.2010.11.010 査読有り

[学会発表] (計9件)

- ① 岡本一男、小松紀子、高柳広 Study on the potential of IκBζ as a target for the treatment of inflammatory bone destruction 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月6日、神戸
- ② Matteo Maurizio Guerrini、岡本一男、中島友紀、高柳広 RANKL expressed by T lymphocytes is needed for development of experimental autoimmune encephalomyelitis 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5日、神戸
- ③ Jun-ichi Furusawa, Kazuyo Moro, Yasutaka Motomura, Masato Kubo, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi & Shigeo Koyasu Critical role of GATA3 in the differentiation and Th2 cytokine production of natural helper cell 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月7日、神戸
- ④ 岡本一男、高柳広 骨リモデリングの制御機構—骨免疫学の視点から 日本食品免疫学会 2012年度大会、2012年10月16日、東京
- ⑤ Matteo Maurizio Guerrini、岡本一男、Lynett Danks、寺島明日香、小松紀子、中島友紀、高柳広 RANKL expressed by T lymphocytes is required for full development of experimental autoimmune encephalomyelitis 4th International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 2012年7月21日、ギリシャ
- ⑥ 小野岳人、岡本一男、岩倉洋一郎、高柳広 マウス大腿骨骨損傷モデルにおける骨再生

に対する IL-17 の作用 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 07 月 06 日、福岡

- ⑦ 岡本一男、高柳広 転写制御因子 IκBζによる骨代謝と免疫システムの制御 平成 23 年度 東京大学医科学研究所共同研究拠点事業 共同研究成果報告会、2012年3月13日、東京
- ⑧ 岡本一男 関節炎における免疫システムと骨 第 10 回 Japan Conference on Bone & Joint Diseases (JCBJD)研究講演会、2012年2月18日、東京
- ⑨ 岡本一男、大洞将嗣、高柳広 An essential role of IκBζ in the transcriptional program in Th17 development Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo, The 8th GARN Meeting, 2011年11月15日、千葉

[図書] (計5件)

- ① 岡本一男、高柳広 南山堂 免疫学 update 一分子病態の解明と治療への展開—第 IV 部 学術的免疫研究の展開 26. 骨免疫学の新展開、2012年、p217-p224
- ② 岡本一男 医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ 骨免疫学-研究最前線 骨と免疫系のクロストーク 3.転写因子 NFATc1 と破骨細胞、2012年、242巻、p655-p659
- ③ 岡本一男、高柳広 医薬ジャーナル社 CLINICAL CALCIUM 骨免疫学 — オーバービュー、2012年、22巻、p1641-1649
- ④ 岡本一男、高柳広:転写制御因子 IκBζによる Th17 細胞分化制御 Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology, 2011年、5巻、p53-p57
- ⑤ Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi Osteoclasts and interleukin-17-producing helper T cells in rheumatoid arthritis *Arthritis: Pathophysiology, Prevention and Therapeutics*, 2011年、p75-p89

[その他]

ホームページ等

- ① 東京大学 大学院医学系研究科 免疫学 研究室ホームページ:
<http://www.immunol.m.u-tokyo.ac.jp/>
- ② ライフサイエンス領域融合レビュー 骨免疫学の歴史と新たな展開:
<http://leading.lifesciencedb.jp/1-e003/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者

岡本 一男 (KAZUO OKAMOTO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00436643

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし