

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713019

研究課題名(和文) Th17細胞による粘膜免疫維持機構の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of mucosal immunity maintained by Th17 cells

研究代表者

廣田 圭司 (HIROTA, Keiji)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：90631250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン-17産生T細胞(以下Th17細胞と略)は粘膜組織中に常駐し、粘膜組織の恒常性維持と病原菌に対する粘膜感染防御に重要な細胞群である。本研究課題では、Th17細胞の可塑性を解析可能にするためのレポーターマウスを確立し、腸管粘膜組織においてTh17細胞の濾胞性Tヘルパー細胞方向への可塑性と抗原特異的IgA産生機構について明らかにした。さらに、Th17細胞の機能及びメモリーTh17細胞への分化についての解析を行い、関連する細胞表面マーカーの候補を得た。また、粘膜組織中インターロイキン-17の恒常的産生に關与する細菌叢をメタゲノム解析により同定した。

研究成果の概要(英文)：Interleukin (IL)-17-producing T helper (Th17) cells play an important role in the maintenance of mucosal immune homeostasis and the host defense against pathogens. In this study, we have established a reporter strain that visualizes IL-17-producing cells and is able to assess their fate. We have studied the regulation and function of Th17 cells and an interaction between Th17 cells and the microbiota in the gut, which controls the constitutive expression of IL-17 and drives production of anti-microbial peptides. We have demonstrated that Th17 cells show plasticity toward T follicular helper cells and help antigen-specific B cells to differentiate into IgA-secreting B cells in the small intestine. Taken together, Th17 cells regulate multiple layers for mucosal immune homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：IL-17 Th17 炎症性Tヘルパー細胞

1. 研究開始当初の背景

新規ヘルパーT細胞として同定されたインターロイキン-17(IL-17)産生Tヘルパー(Th17)細胞は、これまで考えられてきたIFN- γ 産生Th1細胞やIL-4産生Th2細胞とは異なった細胞群であり、細胞外細菌や真菌による粘膜感染症に対する生体防御に重要な役割をはたしている。一方、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患惹起および炎症の慢性化に關与することが示唆されている。

Th17細胞の制御機構については、これまでにNature・Science誌をはじめ活発な研究発表がなされており、免疫学・医学のホットピックとして世界的な研究競争が行われてきた結果、急速に進展してきた分野である。ナイーブCD4ヘルパーT細胞からTh17細胞分化に必須のサイトカイン、特徴的なエフェクターサイトカインであるIL-17を転写制御するマスター転写因子、Th17細胞の初期分化・機能を抑制する因子など、多方面からのアプローチによりTh17細胞の分子生物学的及び細胞生物学的特徴が急速に明らかになってきた。特に、多発性硬化症や関節リウマチなどの慢性自己免疫疾患の動物モデルにおいて、Th17細胞の発生分化及び機能を負に制御することによる慢性炎症反応の抑制はさまざまなノックアウトマウスを使った実験系で証明されており、さらにヒトTh17細胞の初期分化、機能、炎症局所への遊走などの新規制御法の開発は、Th17細胞が関わる感染免疫・腫瘍免疫の増強のみならず、これまで有効な治療法が確立していない各種膠原病や慢性炎症性疾患などの免疫難病に対する有効な治療手段になりうる可能性を示唆している。

我々の作製したIL-17-細胞系譜リポーターマウス(Hirota, et al., Nat Immunol 2011)を使った実験によって、非常に興味深い生物学的特長の一つであるTh17細胞の生体内での可塑性が明らかになった。Tヘルパー細胞の可塑性とその特異的な機能に関しては新規の重要なトピックであるが、細胞系譜リポーターマウスを使わなければ解析ができない点からも、これまでのところ十分な理解が得られていない。したがって、IL-17細胞系譜リポーターマウス、IL-17-eGFPマウスを駆使することにより、可塑性を示した細胞の機能およびその後の細胞運命について詳細な解析が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、新規に開発したIL-17細胞系譜リポーターマウスとIL-17-eGFPマウスを駆使することにより、IL-17産生T細胞の発生・分化・エフェクター機能、加えて可塑性誘導因子の分子基盤を明らかにし、将来的には、IL-17産生T細胞の機能操作による免疫制御法の確立を目指す。また、IL-17産生T細胞の分化や機能維持に重要な常在細菌叢

についてメタゲノム解析を進める。

3. 研究の方法

IL-17を一旦高発現したTh17細胞を永続的に追跡できるシステムとして、IL-17細胞系譜リポーター系統(IL17aCreR26ReYFP, IL17aCreR26RFP635)を作製した。このシステムによって、細胞固定後の細胞内サイトカイン染色に頼らずに、蛍光分子eYFP又はFP635陽性細胞としてTh17細胞を生きたまま追跡可能である。加えて、解析時にIL-17発現を停止した"ex-Th17"細胞も同定可能である。したがって、細胞系譜リポーターマウスはTh17細胞の潜在的な可塑性やエフェクター能を評価できる強力な研究ツールである。

IL-17-細胞系譜リポーターマウスのIL-17産生T細胞をリポーター遺伝子の発現と細胞表面マーカーに基づいてセルソーターを用いて分画し、機能・増殖能・生存能を細胞レベル、分子レベルで比較検討する。また、粘膜組織付着の常在細菌叢の構成を次世代シーケンサーを用いてメタゲノム解析を行い、IL-17産生T細胞、粘膜上皮細胞、常在細菌叢の相互作用と遺伝子発現維持機構についての解析を行った。

4. 研究成果

(1) 末梢リンパ組織Th17細胞の腸管親和性
末梢リンパ節や脾臓では、0.1%程度のCD4⁺Th細胞はリポーター-eYFP陽性Th17細胞であり、PMA/Ionomycin刺激後の細胞内染色によって大部分のeYFP陽性細胞はTh17細胞の特徴であるIL-17を産生し、マスター転写因子であるRoryt陽性である。表面抗原のフローサイトメトリ解析から、これらTh17細胞は腸管遊走性受容体であるCCR6やCD103を高発現し、これらの細胞をフローサイトメトリにより純化後にT細胞欠損マウスへ養子移入を行うと、腸管パイエル板及び粘膜固有層への遊走能が非常に高いことが分かった。加えて、生理的な条件下でのTh17細胞の分化は腸内細菌叢に依存していることと、腸管常在菌も存在しない無菌マウスでは末梢リンパ節にTh17細胞が見られないことからリンパ節や脾臓のTh17細胞は腸管由来の細胞群であることを示唆している。即ち、腸管フローラ特異的なTh17細胞は体内リンパ組織を循環しており、リンパ球欠損マウスに養子移入により活性化・増殖を行うことから機能的にはセントラルメモリー型細胞であることを見出した。

(2) Th17細胞の腸管パイエル板における可塑性

Th17細胞のパイエル板への集積は、胚中心B細胞と相互作用する可能性を示唆した。これまで、表面マーカーCXCR5, PD-1, ICOS, サイトカインIL-21, 転写因子Bcl6を高発現するTfh細胞は胚中心に位置するThサブセットであり、そこでのB細胞の活性化、分化に

重要な役割を担っていることが明らかにされている。パイエル板 Th17 細胞の表現系の解析から、15%以上の eYFP 陽性細胞は、CXCR5 及び PD-1 を高発現し、Tfh 表現系に可塑性を示していることが分かった。非常に興味深いことに、表面抗原のみならず IL-21 と Bcl6 の発現を上昇させた Tfh 細胞への可塑性は、リンパ節や粘膜固有層では観察されず、パイエル板環境下特異的に観察され、同時に Th17 細胞の特徴的な因子である IL-17 と転写因子 Ror γ t の発現は低下していた。即ち、最終分化した機能的な Th17 細胞は、未だ不明なパイエル板組織因子によって可塑性が誘導され、新たな機能を獲得したことが示唆された。

(3) Th17 細胞の可塑性に対するサイトカイン IL-23 の役割

これまで、自己免疫疾患モデルにおいて Th17 細胞のエフェクター機能及び可塑性は IL-23 に依存しており、IL-23 欠損マウスを使った実験から Th17 細胞の機能維持に必須のサイトカイン分子であることが知られている。そこで、Tfh 細胞への可塑性においても IL-23 が制御しているのかどうか調べるため、IL-23 欠損 IL-17 細胞系譜リポーターマウスを作製した。これまでの報告と一致して、腸管 Th17 細胞のエフェクターサイトカインの一つである IL-22 産生能は IL-23 に依存していた。逆に、IL-23 の自己免疫反応時における Th17 細胞機能維持や可塑性に対する役割とは対照的に、IL-23 は恒常的な腸管 Th17 細胞の生存維持に関与せず、Th17 細胞の Tfh 細胞への可塑性にも影響を与えなかった。これらの結果は、自己免疫惹起性 Th17 細胞と腸管 Th17 細胞の機能制御、生存維持、可塑性は独立した因子によって制御されていることを示唆している。

(4) パイエル板 “ex-Th17” 細胞は IgA 産生胚中心 B 細胞を誘導する

生理的な環境下における Tfh (“ex-Th17”) 細胞への可塑性が、パイエル板 B 細胞にどのような作用をするかどうか調べた。T 細胞欠損マウスは通常パイエル板の胚中心の形成は見られず、B 細胞 AID の発現は低い。そのマウスに eYFP 陽性 Th17 細胞を養子移入する実験系によって B 細胞に対する影響を調べると、移入した eYFP 陽性細胞が胚中心に位置し胚中心の形成促進が見られ、強い B 細胞 AID の上昇が観察された。さらに、その GL-7+CD95+胚中心 B 細胞は IgA 発現を上昇させ、血清中の免疫グロブリンアイソタイプの中で IgA のみ特異的に上昇させた。このことから、移入 Th17 細胞の認識する抗原が腸管パイエル板に存在し、抗原特異的な B 細胞の活性化と IgA 産生の促進に寄与することが示唆された。

(5) Th17 細胞は抗原特異的腸管 IgA 産生に必要なサブセットである

上記に解説した T 細胞欠損マウスに Th17 細胞を養子移入する非生理的な実験系だけでなく、通常マウスの T 細胞依存的 IgA 産生における Th17 細胞の役割を検証した。通常の IL-17 細胞系譜レポーターマウスに腸管細菌毒素であるコレラ毒素を経口免疫し、パイエル板での Th17 細胞の表現系を解析すると、Th 細胞の中での eYFP 陽性細胞の割合に変化は見られなかったが、毒素投与前後に eYFP 陽性 Th 細胞中の CXCR5 陽性 Tfh 細胞の頻度が 15%程度から 50%程度にまで著しく増加した。このことから、コレラ毒素の経口免疫により、Th17 細胞は積極的な Tfh 細胞への変移シグナルを受けていることが示唆される。この経口免疫後、コレラ毒素特異的な IgA 産生能の検証を行なったところ、毒素特異的な IgA が検出された。次に、これら抗原特異的な IgA 産生機構に Th17 細胞が直接関わっているかどうか調べるため、野生型骨髄細胞または Rorc 欠損骨髄細胞を T 細胞受容体 (TCR) 欠損マウスに再構築を行った。骨髄移植 3 ヶ月後のコントロール野生型骨髄キメラマウスと Th17 細胞欠損 (Rorc 欠損) 骨髄キメラマウスを用いて、コレラ毒素特異的な IgA 産生機構を検証した。経口免疫前に Th17 細胞欠損骨髄キメラマウスのパイエル板を解析すると、Th17 細胞以外の Th1, Th2, Foxp3+ 制御性 T 細胞は通常マウスと同様に再構築されていたが、期待した通りに Rorc は Th17 細胞のマスター転写因子であることから Th17 細胞への分化は阻害されていた。これら骨髄キメラマウスにコレラ毒素を経口免疫し、10 日後にコレラ毒素特異的 IgA を測定したところ、コントロール骨髄キメラマウスは通常マウスと同様にコレラ毒素特異的 IgA の産生を増加させたが、Th17 細胞欠損骨髄キメラマウスは特異的な IgA 産生上昇が見られなかった。これらの結果から、Th17 細胞はパイエル板における胚中心 B 細胞の腸管抗原特異的な IgA 産生機構に必要なサブセットであることが明らかとなった。

(6) エフェクター Th17 細胞と Th17 細胞由来 Tfh 細胞の遺伝子プロファイル

Th17 細胞の Tfh 細胞方向への可塑性を誘導する因子を検索するため、可塑性を示す前後の細胞群をフローサイトメトリを用いて純化し、マイクロアレイ解析によって遺伝子プロファイルの差異について検討を行った。予想されたエフェクター分子と特徴的な転写因子の他に、細胞内代謝に関わる分子の候補を得た。これら候補分子の Th17 細胞可塑性に関わる機能を検討するため、遺伝子改変マウスの作製を行い、現在解析を継続している。

(7) パイエル板 Th17 由来 Tfh 細胞は生存・増殖能を示さない

末梢リンパ組織に循環している腸管細菌特異的な Th17 細胞は機能的であり増殖能を示す。同様な実験システムを用いて、Th17 由

来の Tfh 細胞の細胞運命を調べた。IL-17 細胞系譜リポーターマウスの eYFP 陽性 CXCR5+PD-1+T 細胞を腸管パイエル板から純化し、リンパ球欠損マウスに養子移入したところ、パイエル板のエフェクター eYFP+Th17 細胞は強い増殖を示したのち再構築が見られた。しかしながら、eYFP+Tfh 細胞は末梢リンパ組織および腸管組織で検出できなかったことから、増殖せず細胞死したことが示唆された。従って、eYFP+Tfh 細胞は、細胞運命の一つの最終形態であり、B 細胞と相互作用した後には細胞死する運命にあることが示唆された。

(8) メモリー型 Th17 細胞とエフェクター型 Th17 細胞を分離する手法の開発

メモリー型 Th17 細胞の同定は、エフェクターサイトカインを産生しない性質のため非常に困難である。IL-17 細胞系譜レポーターマウスを用いることによって、最終分化したエフェクター Th17 細胞がサイトカインの産生を停止させた後もレポーター遺伝子を指標として追跡・解析可能になる。特に、2 次リンパ組織中のレポーター陽性細胞を細胞表面マーカーと IL-17 産生能を組み合わせることで評価を行った。従来からのメモリー型細胞が発現するマーカーと IL-17 産生能との間に相関は見られ、現在までにメモリー型 Th17 細胞の分離・解析法を確立した。今後、メモリー型 Th17 細胞に有意に発現の高い遺伝子を欠損させたマウスの作製を行っていき、機能的分子群の同定を展開する。

(9) 粘膜組織中の恒常的 IL-17 産生に関わる維持因子の同定

生殖粘膜組織に常在する IL-17 産生 T 細胞のサブセット解析と相互作用する相手側の粘膜上皮細胞から分泌される抗菌ペプチドについて解析を進めた。IL-17 細胞系譜リポーターマウスの解析から、IL-17 産生細胞の大部分は T 細胞であることを見出し、これらの IL-17 産生 T 細胞は Th17 細胞とは異なり可塑性は示さず、粘膜組織中の安定的な IL-17 供給源であることが示唆された。また、IL-17 欠損マウスの解析から、生殖粘膜中の IL-17 依存性の抗菌ペプチド群(Lcn2 など)を同定し、粘膜組織の恒常性維持に重要な役割を果たすことを示した。さらに、粘膜組織中の恒常的 IL-17 誘導にかかわる上流シグナルの解析を進める過程で、粘膜常在細菌叢の関与を示唆する結果を得た。そこで、常在細菌を完全に欠損する無菌マウスを用いて T 細胞の IL-17 産生能と抗菌ペプチド産生能を評価したところ、無菌条件において IL-17 産生と抗菌ペプチド産生の有意な低下を見出した。即ち、常在細菌叢が恒常的な IL-17 産生に関わる上流シグナルの一つであることを見出した。さらに、細菌叢分布について生殖粘膜組織のメタゲノム解析を行い生殖粘膜特異的な細菌種を同定した。現在、

これらの特定の細菌種によって T 細胞から恒常的な IL-17 産生が維持されるのかどうか検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Ito Y, Hashimoto M, Hirota K, Ohkura N, Morikawa H, Nishikawa H, Tanaka A, Furu M, Ito H, Fujii T, Nomura T, Yamazaki S, Morita A, Vignali D, Kappler J, Matsuda S, Mimori T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Detection of T-cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. *Science*. 346:363-8. (2014) doi: 10.1126/science.1259077. (査読有)
- 2) Di Meglio P, Duarte JH, Ahlfors H, Owens ND, Li Y, Villanova F, Tosi I, Hirota K, Nestle FO, Mrowietz U, Gilchrist MJ, Stockinger B. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Dampens the Severity of Inflammatory Skin Conditions. *Immunity*. 40:989-1001. (2014) doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.019. (査読有)
- 3) Duarte JH, Di Meglio P, Hirota K, Ahlfors H, Stockinger B. Differential Influences of the Aryl Hydrocarbon Receptor on Th17 Mediated Responses in vitro and in vivo. *PLoS One*. 8:e79819 (2013). Doi: 10.1371/journal.pone.0079819 (査読有)
- 4) Hirota K, Turner JE, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM, Stockinger B. Plasticity of TH17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nature Immunology* 4, 372-379. (2013).doi: 10.1038/ni.2552. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Keiji Hirota: Th17 cells orchestrate an inflammatory circuit in the development of autoimmune arthritis, World Immune Regulation Meeting X, 16 - 19 March 2016, Davos, Switzerland
- 2) Keiji Hirota: Generation of highly self-reactive T helper cells in SKG autoimmune arthritis, 第 10 回 研究所ネットワーク国際シンポジウム、2015 年 7 月 23 日 24 日、北海道

- 3) Keiji Hirota: T cell-dependent IgA responses by plastic Th17 cells, IMMUNOLOGY 2014, The American Association of Immunologists Annual Meeting. May2-6, 2014. Pittsburgh, Pennsylvania, USA.
- 4) Keiji Hirota: Function and regulation of autoimmune T helper cells, The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology. Dec.1-3, 2013. POSTECH, Pohang, Korea.
- 5) Keiji Hirota: Th17 plasticity in homeostasis and inflammation, Joint International Symposium: JSICR-MMCB May20-21, 2013. Tokyo, Japan

〔図書〕(計6件)

- 1) 廣田圭司、橋本求、坂口志文 「関節リウマチの病態形成に關与する T 細胞クローンの同定と新規自己抗原 RPL23A」: 感染・炎症・免疫、45巻 3号 67-70、Autumn 2015
- 2) 廣田圭司 「Th17 細胞の機能制御と自己免疫疾患」: 実験医学 増刊、羊土社、33巻 12号(増刊)1877-1881、2015年
- 3) 廣田圭司 「腸管パイエル板における IgA 産生に關与する T 細胞」: 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、61巻 6号 694-699、2014年
- 4) 廣田圭司 「Th17 細胞の Plasticity(可塑性)」: 炎症と免疫、先端医学社、21巻 2号 93-97、2013年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 圭司 (Keiji HIROTA)
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号: 90631250