

学位論文

自己免疫性関節炎モデルマウスにおける

IL-17産生性 $\gamma\delta$ T細胞の役割

The role of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells
in the development of a mouse rheumatoid arthritis model

平成23年12月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

秋津 葵

Abstract

インターロイキン-17 (IL-17) は広範囲にわたる細胞に作用して炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着分子などを誘導する炎症性サイトカインである。近年、IL-17 を産生するヘルパーCD4⁺T 細胞 (Th17 細胞) が、関節リウマチをはじめとする様々な自己免疫疾患・炎症性疾患に関与していることが明らかとなっており、世界的に大きな注目を集めている。一方、IL-17 は、Th17 細胞以外の T 細胞からも産生されることが知られているが、Th17 細胞以外から産生される IL-17 が自己免疫疾患にどのような役割を果たしているかはほとんど明らかとなっていない。よって、これら Th17 細胞以外の IL-17 産生細胞の病態形成における役割を解明し、Th17 細胞との分化機構や役割の相違を明らかにすることは、自己免疫疾患の発症機構を理解する上で非常に重要である。

本研究では、IL-17、および T 細胞依存的に自己免疫性関節炎を自然発症する IL-1 レセプターアンタゴニスト (Ra) 欠損 (KO) マウスを用い、IL-17 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞 ($\gamma\delta$ 17 細胞) が病態形成にどのように関与しているかに焦点をあて、関節炎発症のメカニズムを解明することを目的とした。

まず、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17 産生には IL-23 による IL-1R の発現誘導を介した IL-1 β シグナルが必須であることを明らかにした。次に、IL-1Ra KO マウスのリンパ節において $\gamma\delta$ 17 細胞と Th17 細胞の亢進を認めた。抗体によって $\gamma\delta$ T 細胞、または CD4⁺T 細胞を除去したところ、どちらの場合も発症が抑制されたことから、 $\gamma\delta$ T 細胞と CD4⁺T 細胞の両方が IL-1Ra KO マウスの関節炎発症において病原性を有していることが示された。また、IL-17 KO-IL-1Ra KO の T 細胞を *nu/nu* マウスに移植することによって、ドナー由来の IL-17 産生性 T 細胞は存在しないが、レシピエント由来

の胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が存在するようなマウスを作製し、関節炎を発症することを明らかにした。発症したマウスの IL-17 産生の全ては $\gamma\delta T$ 細胞が担っており、レシピエントの IL-17 を欠損させたところ発症率が低下したことから、胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞も発症に関与していることがわかった。さらに、 $CD4^+T$ 細胞、 $\gamma\delta T$ 細胞を *scid/scid* マウスへ移植したところ、それぞれ単独では関節炎を発症せず、両者の存在が必要であることを明らかにした。 $\gamma\delta T$ 細胞を単独で移植した際は、関節局所に IL-17 産生細胞は存在しなかったが、 $CD4^+T$ 細胞を同時に移植することにより $\gamma\delta 17$ 細胞の関節への集積が認められた。これらの結果は $CD4^+T$ 細胞が臓器特異性を決定し、 $\gamma\delta 17$ 細胞が炎症の増幅を行っているという新たな関節炎発症メカニズムを示している。その一方で、胸腺由来の T 細胞は存在しないが、胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が存在するヌードマウス背景の *Il1rn^{-/-}*マウスも関節炎を発症することから、関節で IL-1 の過剰発現があるときには $CD4^+T$ 細胞の関与なしに $\gamma\delta 17$ 細胞だけで関節炎を発症する事が示唆された。このことは、たとえ $CD4^+T$ 細胞が自己抗原を認識しなくても、感染や IL-1 関連遺伝子の変異等により IL-1 が異常に産生されただけで関節炎を発症しうる可能性を示している。

Abstract

Interleukin-17 (IL-17) is a proinflammatory cytokine that activates various cells to produce a variety of cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules. Recently, it was shown that IL-17-producing helper T subset (Th17) of CD4⁺ T cells are involved in the development of autoimmune and inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, therefore, it is attracting worldwide attention. Other cell types also produce IL-17, however, little is known about the pathogenic roles of these cells in the development of autoimmune diseases compared to Th17 cells. Therefore, it is important to elucidate the pathogenicity of other IL-17-producing cells and to clarify a difference from Th17 cells, when we understand the mechanism of the development of autoimmune diseases.

IL-1 receptor antagonist (Ra) knockout (KO) mice spontaneously develop arthritis in IL-17-and T cell- dependent manner. In this study, we focused on how IL-17-producing $\gamma\delta$ T ($\gamma\delta$ 17) cells are involved in the development of arthritis, and aimed to reveal the mechanism of the development of arthritis using IL-1 Ra KO mice.

Firstly, we showed that IL-1 β is crucial for IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells and IL-23 is required for the induction of IL-1R in $\gamma\delta$ T cells. $\gamma\delta$ 17 cells and Th17 cells were increased in lymph nodes of IL-1Ra KO mice, and the depletion of $\gamma\delta$ T cells or CD4⁺ T cells reduced the disease incidence in both cases, indicating involvement of $\gamma\delta$ T cells and CD4⁺ T cells in the pathogenesis of arthritis. Then, we generated mice with $\gamma\delta$ 17 cells from recipient, but without IL-17-producing cells from donor, by adoptively transferring IL-17 KO-IL-1Ra KO -T cells into *nu/nu* mice in which extrathymic $\gamma\delta$ 17 cells are present. We found that these

mice still developed arthritis and that only $\gamma\delta$ T cells produced IL-17. To corroborate that the development of arthritis in this transfer system is dependent on IL-17, we adoptively transferred IL-17 KO-IL-1Ra KO -T cells into IL-17 KO-*nu/nu* mice. The development of arthritis was significantly suppressed in IL-17 KO-IL-1Ra KO-T cell-transferred IL-17 KO-*nu/nu* mice compared with IL-17-present *nu/nu* mice transferred with IL-17 KO-IL-1Ra KO-T cells, suggesting that extrathymic $\gamma\delta$ 17 cells are also important for the development of arthritis. Moreover, we found that *scid/scid* mice transferred with the mixture of $\gamma\delta$ T cells and CD4⁺ T cells developed arthritis, but *scid/scid* mice transferred with $\gamma\delta$ T cells or CD4⁺ T cells alone failed to induce arthritis. $\gamma\delta$ 17 cells were found in the joint of *scid/scid* mice transferred with $\gamma\delta$ T cells plus CD4⁺ T cells but not with $\gamma\delta$ T cells only, indicating that CD4⁺ T cells are required for the $\gamma\delta$ 17 cell migration to the joint. These results suggest that $\gamma\delta$ 17 cells are required for the amplification of inflammation and CD4⁺ T cells direct the tissue specificity in normal mice. On the other hand, IL-1Ra KO mice on the nude mice background with $\gamma\delta$ 17 cells but without thymus-derived T cells also developed arthritis, suggesting that only $\gamma\delta$ 17 cells develop arthritis without CD4⁺ T cells when IL-1 β is abnormally produced in the joint. These results show a possibility that arthritis may be induced by excess IL-1 signaling by infections or the mutation of IL-1-related genes, even if CD4⁺ T cells do not recognize a self antigen.

目次

序論	8
図	12
材料と方法	16
結果	22
考察	35
図	45
表	70
参考文献	71
謝辞	78

略語

STAT3 . . . signal transducer and activator of transcription 3

ROR γ t . . . retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t; *Rorc*

ROR α . . . retinoic acid receptor-related orphan receptor- α ; *Rora*

BATF . . . basic leucine zipper transcription factor; *Batf*

I κ B ζ . . . nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor- ζ ;

Nfkbiz

AHR . . . aryl-hydrocarbon receptor

CCR6 . . . chemokine (C-C motif) receptor 6

Il1rn^{-/-}マウス . . . interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra)欠損マウス

*Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウス . . . interleukin 1- α / interleukin 1- β 二重欠損マウス

Il1r1^{-/-}マウス . . . interleukin 1 receptor type I欠損マウス

Cd4^{-/-}マウス . . . cluster of differentiation 4欠損マウス

Tcrd^{-/-}マウス . . . $\gamma\delta$ T cell receptor δ chain欠損マウス

Il17a^{-/-}マウス . . . interleukin 17 (IL-17A)欠損マウス

CIA . . . コラーゲン誘導関節炎

EAE . . . 実験的自己免疫性脳脊髄炎

斜体は遺伝子シンボルを示している。

序論

インターロイキン-17 (IL-17: IL-17Aとも呼ぶ) は、線維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど広範囲にわたる細胞に作用して、IL-6やTNF- α といった炎症性サイトカインやケモカインの誘導、好中球の遊走を強力に行うことによって炎症を誘導する炎症性サイトカインである¹。2005年、IL-17を産生するT細胞が、従来知られていたIFN- γ 産生性Th1細胞や、IL-4産生性Th2細胞とは異なる新たなヘルパーCD4⁺T細胞サブセット「Th17細胞」であることが報告された²。その後、Th17細胞が関節リウマチをはじめとする様々な自己免疫疾患、炎症性疾患やアレルギー反応、細菌感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、世界的に大きな注目を集めている (図1) ^{1,3}。Th17細胞は特徴的にIL-17、IL-17F、IL-21やIL-22を産生し、TGF- β とIL-6やIL-21によってナイーブCD4⁺T細胞から分化誘導され、IL-1 β やIL-23がその増殖や生存に重要な役割を果たしている。IL-6、IL-21やIL-23は転写因子STAT3のリン酸化を介してTh17細胞のマスターレギュレーターであるROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t) の発現を誘導する^{1,3,4}。ROR α やBATF、I κ B ζ といった転写因子もまた、ROR γ tと協調的に働くことによってTh17細胞分化を誘導する⁵⁻⁷。また、Th17細胞はCCL20をリガンドとするケモカインレセプターCCR6を特異的に発現している。一方、IL-17は、Th17細胞以外にも $\gamma\delta$ T細胞、CD8⁺T細胞、NKT細胞、NK細胞、好中球などからも産生されることが知られている⁸⁻¹³。しかし、これらTh17細胞以外から産生されるIL-17の生理学的、病理的意義や、IL-17産生の誘導機構など不明な点が多い。よって、これらTh17細胞以外のIL-17産生細胞の病態形成における役割を解明し、Th17細胞との分化誘導機構や役割の相違を理解することは、自己免疫疾患などの発症機構や種々の病原体に対す

る感染防御機構を理解する上で非常に重要である。

$\gamma\delta$ T細胞は γ 鎖と δ 鎖で構成される $\gamma\delta$ TCRを発現しているT細胞であり、皮膚や腸管上皮ではT細胞の約50%を占めるものの、リンパ組織では約1~5%しか存在しない細胞集団である¹⁴。末梢に存在する $\gamma\delta$ T細胞の多くは通常状態においても活性化しており、種々の刺激により急速にサイトカインを産生する。近年、IL-17産生性 $\gamma\delta$ T細胞（以下 $\gamma\delta$ 17細胞）とTh17細胞の相違が徐々に明らかとなってきた。Th17細胞と同様に、 $\gamma\delta$ 17細胞はTh17細胞分化に重要であるROR γ tやAHRといった転写因子や、Th17細胞特異的に発現しているケモカインレセプターCCR6を発現しており、また、エフェクター機能を発揮するためにIL-1 β やIL-23刺激を必要とする^{15, 16}。しかしながら、Th17細胞は末梢においてTCRシグナルと局所のサイトカイン環境依存的にナイーブT細胞から分化するのに対し^{1, 3}、 $\gamma\delta$ T細胞は胸腺ですでに $\gamma\delta$ 17細胞に分化しており^{17, 18}、分化に $\gamma\delta$ TCRは関与していない^{15, 19}。また、Th17細胞は一度分化した後でも、他のヘルパーT細胞サブセットへのコンバージョンが起こるが、 $\gamma\delta$ 17細胞ではそのような可塑性は見られない^{20, 21}。さらに、脾臓、またはリンパ節中の $\gamma\delta$ T細胞はTCR非依存的にIL-1 β とIL-23によって急速にIL-17を産生する^{13, 22}。実際、*Mycobacterium tuberculosis*や*Escherichia coli*感染時における主なIL-17産生細胞は $\gamma\delta$ T細胞であり、感染部位への好中球の遊走を促進させる^{23, 24}。また、 $\gamma\delta$ 17細胞はTLR1やTLR2、dectin-1といった自然免疫細胞に発現しているパターン認識受容体を発現しており、病原体の構成成分を認識することによりIL-17を産生することも報告されている¹⁶。したがって、細菌感染時において $\gamma\delta$ 17細胞は急速にIL-17を産生することによって、感染防御の最前線として働き、その後、抗原特異的なTh17細胞が分化し獲得免疫機構が働くと考えられている。

$\gamma\delta$ 17細胞はまた、自己免疫疾患の病態形成にも関与していることが明らかとなっ

てきている。コラーゲン誘導関節炎（CIA）時のリンパ節において、 $\gamma\delta$ T細胞のサブセットであるV γ 4/V δ 4⁺が増加しており、抗体投与によりV γ 4⁺サブセットを除去することにより関節炎の発症率、重症度が低下することや²⁵、コラーゲンで免疫したマウスにCCR6⁺ $\gamma\delta$ T細胞を移入すると関節炎が悪化することが報告されている¹⁹。さらに、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（EAE）や大腸炎モデルマウスにおいて、 $\gamma\delta$ 17細胞から産生されるIL-17がTh17細胞からのIL-17産生を増幅させることが報告されている^{15, 20}。しかしながら、精力的な研究が行われているにも関わらず、 $\gamma\delta$ TCRに認識される抗原はほとんど明らかとされていない。さらに、胸腺で抗原に出会っていない $\gamma\delta$ T細胞が優先的にIL-17を産生することや¹⁷、また、*in vitro*の解析において $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生にはTCR刺激が必要でないことが報告されている^{15, 19}。したがって、 $\gamma\delta$ 17細胞がどのように組織特異性を決定し炎症を誘導しているのかということや、Th17細胞が存在しなくても $\gamma\delta$ 17細胞が自己免疫疾患を引き起こすことができるのかという根本的な問いは未解決のままであった。

筆者の研究室では関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患の発症機序の解明や治療薬の開発を目的として、発生工学手法により疾患モデルマウスの作製を行ってきた。その結果、リウマチ様関節炎を自然発症するIL-1レセプターアンタゴニスト（Ra）欠損マウス（*Il1rn*^{-/-}マウス）を作ることに成功した（図2-A）²⁶。IL-1Raは、炎症性サイトカインであるIL-1の内在性抑制因子で、IL-1 α とIL-1 β と同じIL-1レセプター（IL-1R）（遺伝子シンボル：*Il1r1*）に結合するが、シグナルを伝えずIL-1シグナルを負に制御している（図2-B）^{27, 28}。*Il1rn*^{-/-}マウスでは、IL-1シグナルが過剰にされることにより、T細胞が異常活性化し自己免疫性の関節炎を発症するものと考えられている²⁹。これまでに、*Il1rn*^{-/-}マウスをT細胞、B細胞を欠損している*scid/scid*マウスとかけ合わせると関節炎が発症しなくなること（図3-A）、*Il1rn*^{-/-}

マウスの T 細胞をヌード (*nu/nu*) マウスに移入することにより関節炎を誘導できること (図 3-B) から、T 細胞がこのモデルにおける病態形成に重要であることが分かっている³⁰。さらに、*Il1rn*^{-/-}マウスの T 細胞からの IL-17 産生が亢進していること (図 4-A)、*Il17a*^{-/-}マウスは *Il1rn*^{-/-}マウスにおける関節炎をほぼ完全に抑制すること (図 4-B) から、IL-17 が IL-1 の下流に位置し、炎症性疾患の発症に根本的なところで関与していることが明らかとなっている (図 4-C)^{31, 32}。しかしながら、どの細胞から産生される IL-17 が関節炎の発症に重要な役割を果たしているのかということや関節炎発症の分子機構など不明な点は多く残されていた。

本研究では、*Il1rn*^{-/-}マウスを自己免疫性疾患モデルマウスとして用い、 $\gamma\delta 17$ 細胞が病態形成に関与しているかに焦点をあて、関節炎発症のメカニズムを解明することを目的とした。まず $\gamma\delta T$ 細胞による IL-17 産生メカニズムを検討した。その結果、IL-23 による IL-1R の発現誘導を介した IL-1 β シグナルが $\gamma\delta T$ 細胞による IL-17 産生に必須であることがわかった。また、*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節、および関節局所における $\gamma\delta 17$ 細胞の顕著な亢進を認めた。抗体投与により $\gamma\delta T$ 細胞を除去した際に、関節炎の発症が抑制されたことから、 $\gamma\delta T$ 細胞が *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症において病原性を有していることを明らかとした。さらに、CD4⁺T 細胞、 $\gamma\delta T$ 細胞を *scid/scid* マウスへ移植したところ、それぞれ単独では関節炎を発症せず、両者の存在が必要であることがわかった。これらの結果は CD4⁺T 細胞が臓器特異性を決定し、 $\gamma\delta 17$ 細胞が炎症の増幅を行っているという新たな関節炎発症メカニズムを示している。その一方で、関節で IL-1 の過剰発現があるときには CD4⁺T 細胞の関与なしに $\gamma\delta 17$ 細胞だけで関節炎を発症する事が示唆された。このことは、たとえ CD4⁺T 細胞が自己抗原を認識しなくても、感染や IL-1 関連遺伝子の変異等により IL-1 が異常に産生されただけで関節炎を発症しうる可能性を示している。

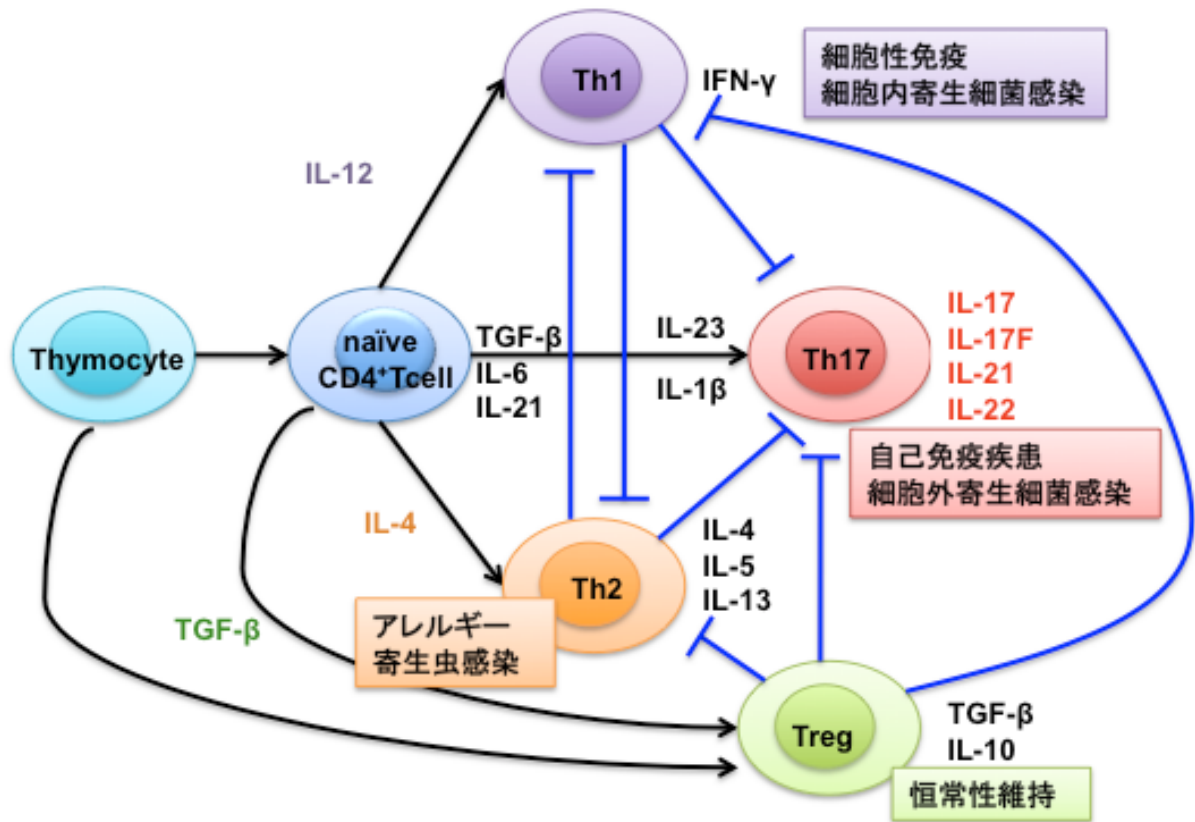


図1 Th サブセット

IL-17 を産生する T 細胞は、従来知られていた IFN- γ 産生性 Th1 細胞や、IL-4 産生性 Th2 細胞とは異なる新たな CD4⁺T 細胞サブセットである。Th17 細胞は特徴的に IL-17、IL-17F、IL-21 や IL-22 を産生し、TGF- β と IL-6 や IL-21 によってナイーブ CD4⁺T 細胞から分化誘導され、IL-1 β や IL-23 がその増殖や生存に重要な役割を果たしている。

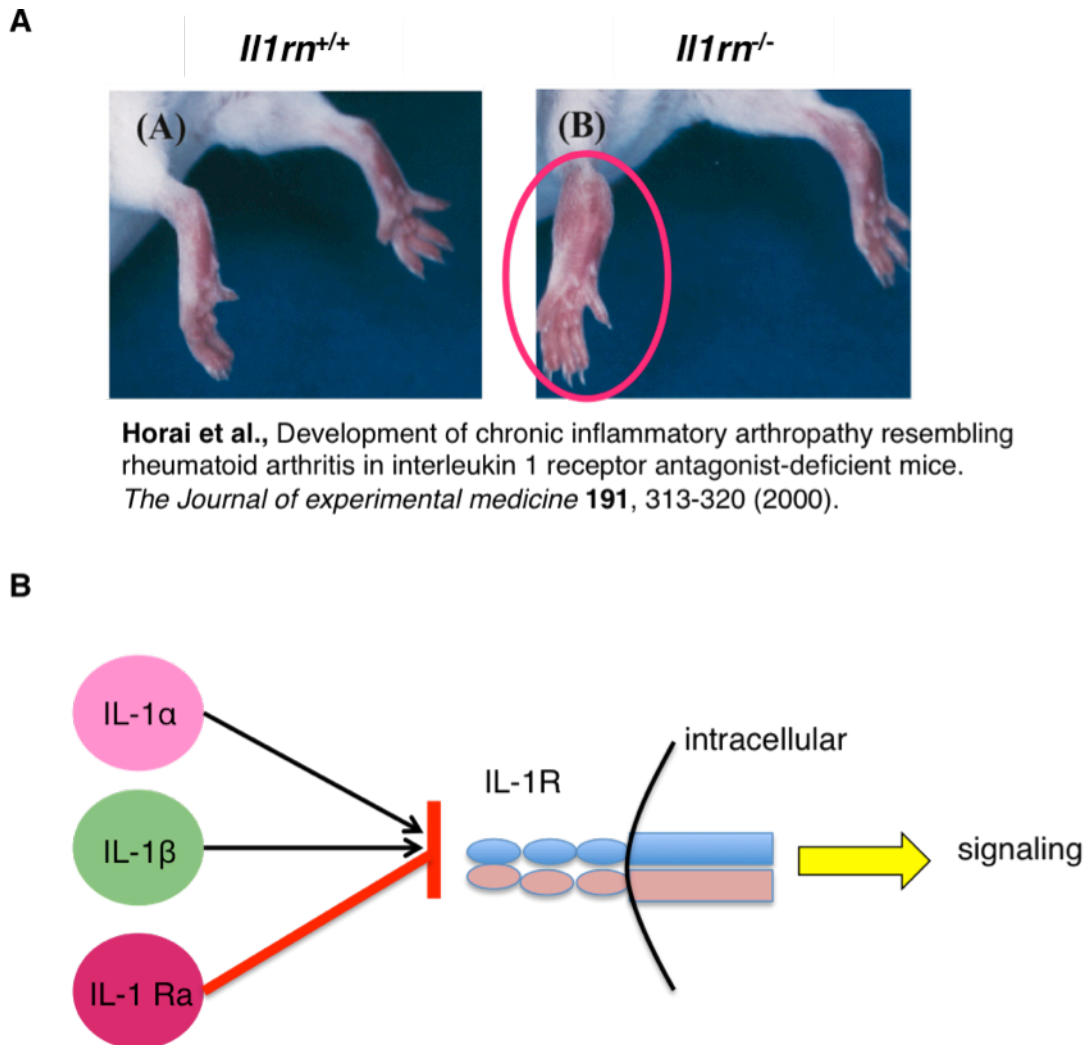


図2 *Il1rn^{-/-}*マウスはリウマチ様関節炎を自然発症する

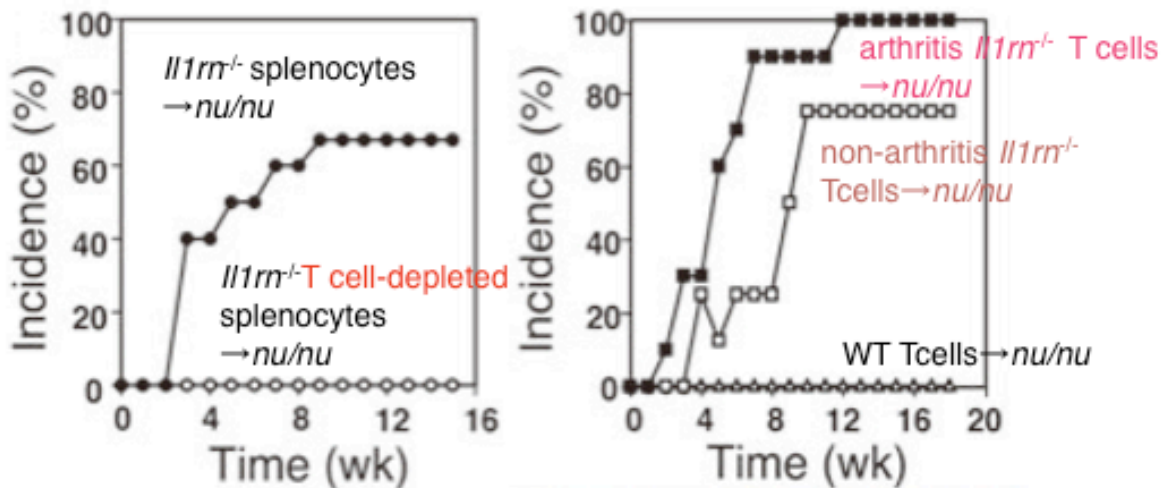
- A. 16週齢のBALB/cA 背景の*Il1rn^{+/+}*マウス（左）と*Il1rn^{-/-}*マウス（右）の足関節。
*Il1rn^{-/-}*マウスでは関節の腫れと発赤が観察される。
- B. IL-1Raは、炎症性サイトカインであるIL-1の内在性抑制因子で、IL-1 α やIL-1 β と競合的にIL-1Rと結合することでIL-1シグナルを負に制御している。

A

Incidence of arthritis in IL-1Ra^{-/-} *scid/scid* mice

Genotype of <i>scid</i> loci	Incidence (%)
<i>scid/scid</i>	0/6 (0%) ^A
<i>scid/+</i>	9/11 (82%)
<i>+/+</i>	7/8 (88%)

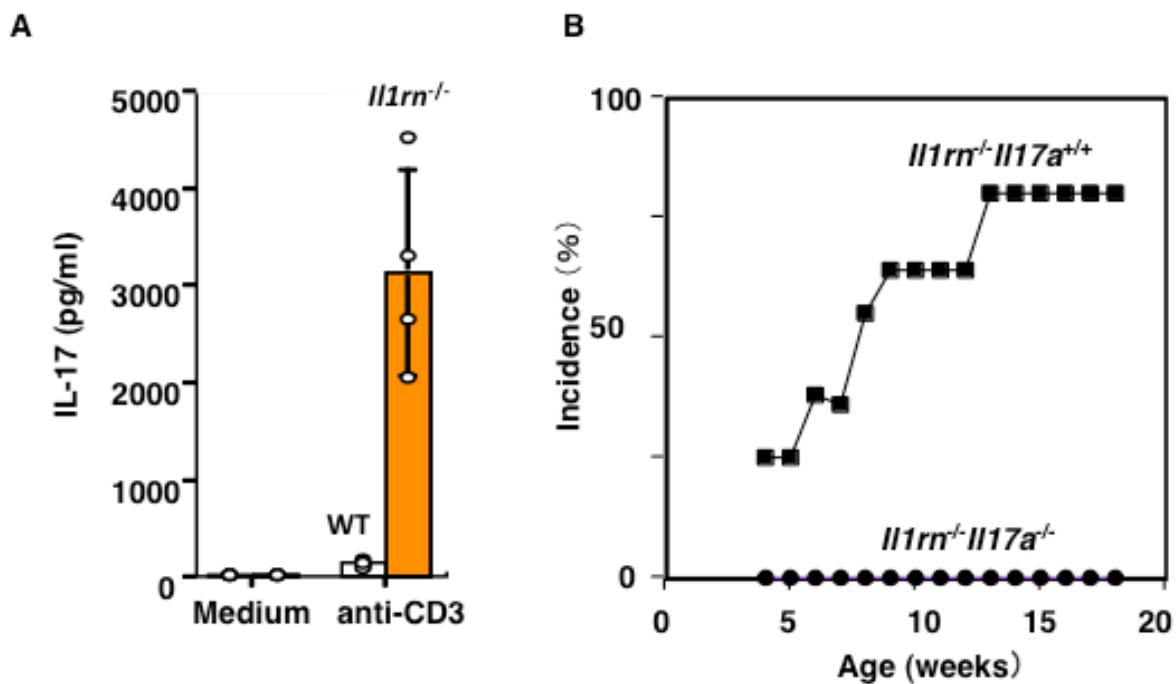
B



Horai et al., TNF-α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 114, 1603-1611 (2004)

図3. *Il1rn^{-/-}*マウスの関節炎発症にはT細胞が重要な役割を果たしている

- A. 20週齢での関節炎の発症率。T細胞欠損*Il1rn^{-/-}-scid/scid*マウスでは関節炎の発症が完全に抑制される。^AP<0.01 (カイ二乗テスト)。
- B. *Nu/nu*マウスへの脾臓細胞、およびT細胞の移植。*Il1rn^{-/-}*マウス由来脾臓細胞の*nu/nu*マウスへの移植は関節炎を誘導する。一方、T細胞を除去した脾臓細胞は関節炎を誘導しない(左)。関節炎発症、または未発症の*Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞の*nu/nu*マウスへの移植は関節炎を誘導する。一方、野生型マウス由来のT細胞は関節炎を誘導しない(右)。



Nakae et al., IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5986-5990 (2003).

図4 IL-17は*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症に重要である

- A. 野生型、または*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節を1 μg/mlの抗CD3抗体で刺激し、培養したときの上清中のIL-17産生。
- B. *Il1rn*^{-/-}マウスにおいてIL-17を欠損させた際の関節炎の発症率。*Il1rn*^{-/-}*Il17a*^{-/-}マウスでは関節炎の発症が抑制される。
- C. IL-17はIL-1の下流に位置し、IL-1RaはIL-1による過剰なIL-17産生を抑制している。

材料と方法

マウス

Il1rn^{-/-}マウス、*Il1α*^{-/-}*β*^{-/-}マウスは当研究室の宝来らによって作製された³³。*Il1r1*^{-/-}マウスはImmunex Corporationより入手した。*Tcrd*^{-/-}マウスは九州大学生体防御医学研究所 吉開博士から譲り受けた³⁴。*Cd4*^{-/-}マウスは理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 藤井博士から供与いただいた。これらのマウスは、BALB/cAマウスに8世代以上戻し交配し、実験に用いた。*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスと*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスは*Tcrd*^{-/-}マウス、または*Cd4*^{-/-}マウスと*Il1rn*^{-/-}マウスを掛けあわせることにより作製した。*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスは*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスと*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスを掛けあわせることにより作製した。*Il17a*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスは当研究室の中江らによって作製された³¹。*Il1rn*^{-/-}*nu/nu*マウス、*Il17a*^{-/-}*nu/nu*マウスは*Il1rn*^{-/-}マウス、または*Il17a*^{-/-}マウスとBALB/cA-*nu/nu*マウスを掛けあわせることにより作製した。BALB/cAマウス、BALB/cA-*nu/nu*マウス、C.B.-17 *scid/scid*マウスはCLEAより購入した。マウスは東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センターにおいて、SPF (specific pathogen free) 環境下で維持した。全ての実験は、医科学研究所動物実験実施マニュアルと遺伝子組み換え生物等の使用に関する法律に沿って行った。

抗γδTCR抗体、抗CD4抗体の調製

抗γδTCR抗体 (UC7-13D5) 産生ハイブリドーマは、九州大学生体防御医学研究所 吉開博士により譲り受けた。CeLLineプラスチックシステム (BD Biosciences) を用いてハイブリドーマを増殖させ、モノクローナル抗体を回収した。抗CD4抗体 (GK1.5) は、BALB/cA-*nu/nu*マウスにハイブリドーマを投与し、1~2週間後に腹水を採取する

ことによって回収した。抗 $\gamma\delta$ TCR抗体、抗CD4抗体ともに、HiTrap Protein Gカラム（GE Healthcare）を用いて精製し、透析後（PIERCE）、使用した。

抗体投与による $\gamma\delta$ T細胞およびCD4⁺T細胞除去

抗 $\gamma\delta$ TCR抗体（UC7-13D5）は4週齢の*Il1rn*^{-/-}マウスに週2回、400 μ gずつ腹腔内投与した。コントロールとしてArmenian Hamster IgG（innovate research）を同量・同期間投与した。抗CD4抗体（GK1.5）は4週齢の*Il1rn*^{-/-}マウスに週2回、250 μ gずつ腹腔内投与した。コントロールとしてRat IgG（Thermo）を同量・同期間投与した。

臨床的な関節炎の評価

関節炎は四肢毎に4段階の基準で巨視的に評価し（0；正常、1；軽い関節の腫れ・甲の発赤、2；明らかな関節の膨張、3；関節の硬化）、各マウスの最高点は12点とした。

フローサイトメトリー

細胞は、10% FCS（SIGMA）、50 U/ml ペニシリン（明治製菓）、50 μ g/ml ストレプトマイシン（明治製菓）、50 μ M 2-メルカプトエタノール（GIBCO）を添加したRPMI 1640（SIGMA）に懸濁し、50 ng/ml PMA（Sigma）、500 ng/ml イオノマイシン（Sigma）、2 μ M モネンシン（Sigma）で刺激して5時間培養した。細胞を96ウェル丸底プレート（IWAKI）に回収後、非特異的な抗体反応を防ぐためにFc blocker（CD16/CD32 モノクローナル抗体（2.4G2）/FACS溶液（2%FCS、0.1%アジ化ナトリウムを添加したHBSS溶液））を加えて4℃、15分反応させた。表面抗

原を抗体で30分染色した後、4%パラホルムアルデヒド/PBSを加え室温で20分反応させて細胞を固定し、0.1%サポニン (SIGMA) を含むFACS溶液中で、サイトカインに対する抗体と細胞を4℃、30分間反応させ、染色した。個々の抗体は以下の通りである。FITC融合抗マウス $\gamma\delta$ TCR抗体 (GL3; eBioscience)、FITC融合抗マウスTCR β 抗体 (H57-597; eBioscience)、PE融合抗マウスIL-1R抗体 (JAMA-147; BioLegend)、PE/Cy7融合抗マウスCD4抗体 (GK1.5; BioLegend)、Alexa Fluor 647融合抗マウス $\gamma\delta$ TCR抗体 (GL3; BioLegend)、APC融合抗マウスCD3 ϵ 抗体 (45-2C11; BioLegend)、APC融合抗マウス CD4抗体 (GK1.5; BioLegend)、APC融合抗マウスCD8抗体 (53-6.7; BioLegend)、APC融合抗マウス CD49b抗体 (DX5; BioLegend)、APC/Cy7融合抗マウス CD3 ϵ 抗体 (145-2C11; BioLegend)、Pacific Blue融合抗マウスIL-17A抗体 (TC11-18H10; BioLegend)。フローサイトメトリーはFACSCanto II (Becton Dickinson) を用いた。また死細胞を染色するのに7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (Sigma-Aldrich) を用いた。データはFlowJo software (Tree Star) を用いて解析した。

関節からの細胞の単離

マウスの両肢の皮膚を除去した後、関節部分を細かく切った。6ウェル平底アッセイプレート (IWAKI) に10%FCS (SIGMA)、50 U/ml ペニシリン (明治製菓)、50 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製菓)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (GIBCO) を添加したRPMI 1640 (SIGMA) 4mlを加え、細かい関節断片を入れた。1 mg/ml コラゲナーゼIV (Sigma)、1 mg/mlヒアルロニダーゼ (Sigma) を添加し、37℃、1時間、穏やかにしんとう培養した後、培養上清を回収した。

細胞の単離

$\gamma\delta$ T細胞を単離するために、目的マウスのリンパ節、または脾臓細胞をビオチン融合抗マウス $\gamma\delta$ TCR抗体 (UC7-13D5; eBioscience) と反応させた。洗浄後、MACSビーズ融合抗ビオチン抗体 (Miltenyi Biotec) で磁気標識し、autoMACS (Miltenyi Biotec) を用いて、ポジティブセレクションを2回行った。全T細胞、または $CD4^+$ T細胞は、目的マウスのリンパ節細胞懸濁液をMACSビーズ融合抗Thy1.2抗体 (Miltenyi Biotec)、またはMACSビーズ融合抗 $CD4$ 抗体 (Miltenyi Biotec) で標識し、autoMACSを用いてポジティブセレクションにより回収した。FACS精製 $\gamma\delta$ T細胞は $\gamma\delta$ TCR $^+$ CD3 ϵ^+ 細胞分画を、またTN-T細胞は $\gamma\delta$ TCR $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ DX5 $^-$ TCR β^+ 細胞分画をFACS Aria (Becton Dickinson) を用いてセルソーティングにより精製した。

細胞移植

Il1rn $^{-/-}$ マウス、*Il17a* $^{-/-}$ *Il1rn* $^{-/-}$ マウス、*Tcrd* $^{-/-}$ *Il1rn* $^{-/-}$ マウス、*Cd4* $^{-/-}$ *Il1rn* $^{-/-}$ マウスのリンパ節から単離した $\gamma\delta$ T細胞 (8×10^5 細胞)、 $CD4^+$ 細胞 (2×10^7 細胞)、Thy1.2 $^+$ 細胞 (2×10^7 細胞) を200 μ lのPBSに懸濁し、*nu/nu*マウス、*Il17a* $^{-/-}$ *nu/nu*マウス、*scid/scid*マウスに静脈注射した。

細胞培養

マウスの脾臓、またはリンパ節から単離した $\gamma\delta$ T細胞を10%FCS (SIGMA)、50 U/ml ペニシリン (明治製菓)、50 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製菓)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (GIBCO) を添加したRPMI 1640 (SIGMA) に懸濁した。96ウェル平底プレート (IWAKI) に、懸濁した細胞を $7 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ cell/wellとなるように播種し、10 ng/ml リコンビナントマウスIL-1 β (PEPROTECH)、10 ng/ml リ

コンビナントマウスIL-23 (R&D Systems) 、または200 ng/ml リコンビナントマウスIL-1Ra (R&D Systems) を添加し、培養した。

ELISA法によるサイトカインの測定

10 ng/ml リコンビナントマウスIL-1 β (PEPROTECH) 、10 ng/ml リコンビナントマウスIL-23 (R&D Systems) 、または200 ng/ml リコンビナントマウスIL-1Ra (R&D Systems) を添加し72時間培養した後、上清を採取した。IL-17産生量の測定はELISA kit (Ready-Set-Go; eBioscience) を用いた。プレートリーダー (CORONA) を用いて450nmで吸光度を測定した。

リアルタイムPCR

CD3 $^+$ $\gamma\delta^+$ T細胞、またはCD3 $^+$ $\gamma\delta^+$ T細胞を10 ng/ml リコンビナントマウスIL-1 β (PEPROTECH) 、10 ng/ml リコンビナントマウスIL-23 (R&D Systems) 、または200 ng/ml リコンビナントマウスIL-1Ra (R&D Systems) で48時間刺激し、細胞を回収した後、GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (SIGMA) を用いてRNAを抽出した。cDNAの合成にはHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いた。リアルタイムPCRにはSYBR Green qPCR kit (Invitrogen) 、iCycler System (Bio-Rad) を用いた。PCR反応に用いたプライマーは表1に示す。

統計学的解析

関節炎の発症率を統計学的に解析するのにカイ二乗検定、重症度を評価するのにMann Whitney testを用いた。その他の解析にはstudent's t検定により統計学的に評

価し、P値が0.05以下のものについて有意と判断した。

結果

1. $\gamma\delta$ T細胞によるIL-17産生メカニズム

1-1. $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生にはIL-1 β シグナルが必要である

これまで $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生には、 $\gamma\delta$ TCR刺激は必要ではなく、IL-1 β とIL-23の組み合わせが重要であることが知られていた^{15, 19, 35}。しかし、IL-1 β とIL-23のIL-17産生における役割の相違については明らかとされていなかった。 $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生メカニズムを明らかにするために、野生型マウスの脾臓細胞とリンパ節細胞のプールから自動磁気細胞分離装置(MACS)により $\gamma\delta$ T細胞を精製し(精製率80%)、IL-1 β やIL-23を添加して培養した際のIL-17産生を測定した。これまでの報告通り、抗CD3抗体刺激非存在下においても、IL-23単独、またはIL-1 β とIL-23刺激は $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生を誘導した(図5-A)。しかし、*Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウス(IL-1 α 、IL-1 β 二重欠損マウス)由来の $\gamma\delta$ T細胞を用いた場合、IL-23単独刺激ではIL-17産生を誘導することができなかった。一方、*Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウス由来の $\gamma\delta$ T細胞でもIL-1 β とIL-23刺激はIL-17を誘導した。この結果は、IL-1 β シグナルが $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生に必須であることを示している。IL-1 β とIL-23の濃度は、野生型マウスにそれぞれ10 ng/ml添加時にプラトーに達するため、この濃度を使用した(図5-B)。次に、IL-1 β が $\gamma\delta$ T細胞自身から産生されているかを調べるために、フローサイトメトリー(FACS)で精製した $\gamma\delta$ T細胞(精製率>99%)を用いて同様の実験を行った。FACSで高精製した $\gamma\delta$ T細胞を用いた場合、IL-1 β とIL-23刺激はIL-17を誘導することができるが、IL-23単独で刺激してもIL-17は誘導されなかった(図5-C)。この結果は、 $\gamma\delta$ T細胞自身ではなく、MACSで精製した際に微量にコンタミネーションした他の細胞から産生されるIL-1 β が $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生に重要であることを示している。

1-2. IL-23は $\gamma\delta$ T細胞のIL-1Rの発現を誘導する

IL-1 β とIL-23による $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生メカニズムをより詳細に明らかにするために、IL-1Rの発現をフローサイトメトリーにて測定した。以前の報告通り、野生型マウスの脾臓に存在する $\gamma\delta$ T細胞は定常状態ではほとんどIL-1Rを発現していなかった³⁵ (図6-A, B)。しかしながら、IL-23で刺激することにより $\gamma\delta$ T細胞上のIL-1Rは顕著に増加した。また、IL-23と同時にIL-1 β を加えることによって、IL-1Rの発現はさらに増強された。IL-1 β 単独刺激はIL-1Rの発現を誘導しないため、IL-1 β はIL-23と協調的に働くことによって $\gamma\delta$ T細胞のIL-1Rの発現を増加させることが示唆される。興味深いことに、IL-23によるIL-1Rの発現誘導は、IL-1Raを加えることによって強く抑制された。IL-1RaはIL-1と競合的にIL-1Rと結合することによってIL-1シグナルを負に制御することが知られている^{27, 28}。この実験ではFACSで高精製した $\gamma\delta$ T細胞を用いているが、IL-1 β はIL-23と協調的にIL-1Rの発現を増加させるため、少量のIL-1 β 産生細胞がコンタミネーションしていた場合、IL-1RaがIL-1 β と競合的にIL-1Rを奪うことによりIL-1 β が作用できず、IL-1Rの発現が抑制されているように見えている可能性がある。IL-1RaによるIL-1Rの発現抑制がIL-1 β に非依存的であるかを確かめるために、*Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウス由来の $\gamma\delta$ T細胞を用いて同様の実験を行った。*Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウスにおいても野生型マウスと同様にIL-23によりIL-1Rの発現が誘導され、IL-23と同時にIL-1Raを加えることによってIL-1Rの発現が抑制された (図6-A, B)。また、*Il1rn^{-/-}*マウスの $\gamma\delta$ T細胞は、未刺激時においても野生型に比べてIL-1Rを高発現していた。これらの結果から、IL-1RaはIL-1 β 非依存的に $\gamma\delta$ T細胞上のIL-1Rの発現を負に制御していることが明らかとなった。

次に、野生型、*Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウス、*Il1r1^{-/-}*マウス、*Il1rn^{-/-}*マウス由来の $\gamma\delta$ T細胞をIL-1 β やIL-23、IL-1Raで刺激したときの培養上清中のIL-17を測定した。野生型マウスと

同様に *Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウス、*Il1rn^{-/-}*マウスの $\gamma\delta$ T細胞は、IL-23単独刺激ではIL-17を誘導しなかったが、IL-1 β とIL-23で刺激するとIL-17を強く誘導した(図7-A)。一方、*Il1r1^{-/-}*マウスの $\gamma\delta$ T細胞はIL-1 β とIL-23で刺激してもIL-17を誘導することができなかった。これらの結果は、 $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生には、IL-1Rを介したIL-1 β シグナルが重要であることを示している。さらに、同様の結果をIL-17の細胞内染色によって確認した(図7-B)。興味深いことに、 $\gamma\delta$ 17細胞から産生されるIL-17の細胞内染色にはマイトジェン刺激を必要としなかった。これは、通常、Th17細胞が産生しているIL-17を細胞内染色する際にはPMA/ionomycinといったマイトジェン刺激を必要とするのと対照的である。

1-3. IL-1 β は*Rorc*、*Rora*、*Nfkbiz*、*Batf*の発現を増加させる

IL-1 β による $\gamma\delta$ T細胞のIL-17産生メカニズムをさらに詳細に明らかにするために、Th17細胞分化に重要であることが知られている転写因子の発現を調べた。野生型、または*Il1r1^{-/-}*マウスの脾臓細胞からCD3⁺ $\gamma\delta$ T細胞、またはCD3⁺ $\gamma\delta$ T細胞を精製し、IL-1 β やIL-23、IL-1Raで刺激したときのmRNAの発現をリアルタイムPCRにて測定した。まず、IL-1 β やIL-23による*Il17*と*Il1r1*のmRNAの発現が1-2で見られたタンパクの挙動と一致していることを確認した(図8-A, B, 6-A, B, 7-A)。ROR γ t (遺伝子シンボル; *Rorc*) はTh17細胞のマスターレギュレーターであり³⁶、 $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生にも重要であることが知られている³⁷。また、ROR γ tは末梢の $\gamma\delta$ 17細胞だけでなく、胸腺に存在する $\gamma\delta$ 17細胞にも恒常的に発現している^{15, 18, 37}。まず、これまでの報告と同様に、野生型マウスの $\gamma\delta$ T細胞において*Rorc*が恒常的に発現していること、またIL-23によってその発現が亢進することを確認した(図8-C)。IL-23とIL-1 β の組み合わせは $\gamma\delta$ T細胞の*Rorc*の発現を顕著に増加させたが、*Il1r1^{-/-}*マウスの $\gamma\delta$ T細胞を

IL-23とIL-1 β で刺激しても *Rorc*の発現亢進は見られなかった。これらの結果は、IL-1Rを介したIL-1 β シグナルが*Rorc*の発現に重要であることを示している。ROR α はROR γ tと協調してTh17細胞分化を誘導する転写因子として知られている⁵。*Rorc*と同様に、 $\gamma\delta$ T細胞の*Rora*の発現はIL-23によって亢進し、IL-23とIL-1 β 刺激によりその発現が強く増強された(図8-D)。また、IL-23とIL-1 β による*Rora*の発現亢進は*Il1r1*^{-/-}マウスの $\gamma\delta$ T細胞では観察されなかった。IkB ζ (遺伝子シンボル; *Nfkbiz*)と*Batf*もまたROR γ tと協調的にTh17細胞分化を促進する転写因子として知られている^{6, 7}。野生型マウスの $\gamma\delta$ T細胞では、IL-1 β に応答してこれらの転写因子の発現が亢進していた(図8-E, F)。またIL-23とIL-1 β 刺激によりその発現はより増加し、*Il1r1*^{-/-}マウスの $\gamma\delta$ T細胞では発現亢進は見られなかった。以上の結果は、IL-23によるIL-1Rの発現の誘導、またIL-1 β による*Rorc*、*Rora*、*Nfkbiz*、*Batf*といった転写因子の発現亢進が $\gamma\delta$ T細胞のIL-17産生に重要であることを示唆している。

2. *Il1rn*^{-/-}マウスでは $\gamma\delta$ 17細胞とTh17細胞が増加している

*in vitro*の解析により、 $\gamma\delta$ T細胞のIL-17産生にはIL-1 β シグナルが重要であること、またIL-23とIL-1RaがIL-1Rの発現を制御していることが明らかとなったので、次に*Il1rn*^{-/-}マウスにおいて $\gamma\delta$ 17細胞が増加しているかを調べた。*Il1rn*^{-/-}マウスはIL-1シグナルが過剰に輸入されており、IL-17とT細胞依存的に関節炎を自然発症するマウスである^{26, 30, 31}。*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節におけるIL-17産生細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ、野生型マウスと比較して $\gamma\delta$ 17細胞の割合が優位に増加していた(図9-A, B)。また、Th17細胞の割合も増加していた。一方、IL-17を産生するT細胞としてCD8⁺T細胞やNKT細胞も知られているが、IL-17産生性CD8⁺T細胞やIL-17産生性NKT細胞(DX5⁺T細胞)のポピュレーションの割合に変化はなかった

(図9-C, D)。野生型マウスに比べて*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節では、 $\gamma\delta$ 17細胞、およびTh17細胞の数も増加していた(図10)。興味深いことに、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所の浸潤細胞をフローサイトメトリーにより解析すると、IL-17産生細胞の多くは $\gamma\delta$ T細胞であり、Th17細胞はわずかにしか存在していなかった(図11)。これまで、IL-23とIL-1 β が*Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所で亢進していること、また*Il1rn*^{-/-}マウスの脾臓細胞をIL-1 β で刺激するとIL-23産生が増加することが報告されている⁸。そのため、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所における過剰なIL-1 β シグナルはIL-23の産生を亢進させ、その結果、 $\gamma\delta$ T細胞上のIL-1Rの発現を増加させているのではないかと考えた。予想通り、*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節、および関節局所でIL-1Rを発現している $\gamma\delta$ T細胞の割合が顕著に増加していた(図12-A, B)。一方、CD4⁺T細胞におけるIL-1Rの発現増加はリンパ節でのみ観察された。以上の結果は、*Il1rn*^{-/-}マウスにおいてIL-1 β の過剰シグナルにより亢進したIL-23が $\gamma\delta$ T細胞上のIL-1Rの発現を増加させ、その結果、 $\gamma\delta$ 17細胞が増加していることを示唆している。

3. CD4⁺T細胞と $\gamma\delta$ T細胞のどちらもが*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症に重要である

Il1rn^{-/-}マウスの関節炎発症に重要なIL-17産生細胞を同定するために、*Il1rn*^{-/-}マウスの主なIL-17産生細胞であるCD4⁺T細胞と $\gamma\delta$ T細胞を、それぞれ抗CD4抗体と抗 $\gamma\delta$ TCR抗体投与により除去した際の影響を検討した。まず、関節炎を発症していない4週齢の*Il1rn*^{-/-}マウスに抗CD4抗体を週2回ずつ投与した際の関節炎の発症率、および重症度を観察した。コントロールのラットIgGを投与した群に比べて、抗CD4抗体を投与した群は有意に関節炎の発症率が低下した(図13-A)。重症度には有意な差は認められなかった。はじめに抗体を投与してから11日目のリンパ節細胞をフロー

サイトメトリーにて解析すると、ラットIgGを投与した群に対し、抗CD4抗体を投与した群ではほとんどのCD4⁺T細胞が除去されており、除去率の平均は94.8%であった（図13-B, C）。一方、抗CD4抗体の投与は $\gamma\delta$ 17細胞の割合に影響を与えなかった（図13-B）。次に、4週齢の*Il1rn*^{-/-}マウスに抗 $\gamma\delta$ TCR抗体を週2回ずつ投与した際の関節炎の発症率、および重症度を観察した。コントロールのハムスターIgG投与群に比べて、抗 $\gamma\delta$ TCR抗体を投与した群は、関節炎の発症が有意に抑制された（図14-A）。重症度には変化はなかった。抗 $\gamma\delta$ TCR抗体投与後2日目のリンパ節では90%の $\gamma\delta$ T細胞が除去されていたが、抗体投与を繰り返すうちに $\gamma\delta$ T細胞が徐々に検出されはじめ、抗体投与後15日目では約半数の $\gamma\delta$ T細胞が回復していた（図14-B）。これは、抗 $\gamma\delta$ TCR抗体がハムスター由来であるため、抗体に対する抗体ができてしまったためだと考えられる。しかしながら、抗体投与後8日目では依然約70%の $\gamma\delta$ T細胞が除去されており、抗 $\gamma\delta$ TCR抗体投与は少なくとも部分的には*Il1rn*^{-/-}マウスにおける関節炎の発症を抑制しているといえる（図14-B, C）。また、抗 $\gamma\delta$ TCR抗体投与はTh17細胞の割合に影響を与えなかった（図14-C）。これらの結果から、CD4⁺T細胞と $\gamma\delta$ T細胞のどちらもが*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎の発症に重要であることが明らかとなった。

4. CD4またはTCR δ の遺伝的欠損は*Il1rn*^{-/-}マウスにおける関節炎の発症に影響を与えない

CD4⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞どちらもが*Il1rn*^{-/-}マウスにおける関節炎発症に重要であることが明らかとなったが、抗体投与では完全に細胞を除去することができないため、次に遺伝子欠損マウスを用いてCD4⁺T細胞と $\gamma\delta$ T細胞の関節炎発症における役割を検討した。*Cd4*^{-/-}マウス、または*Tcrd*^{-/-}マウス（ $\gamma\delta$ TCR δ 鎖欠損マウス）と*Il1rn*^{-/-}マウスをかけ合わせることにより*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス、または*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスを作製し、

関節炎の発症率、および重症度を観察した。予想に反して、*Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスも *Tcrd^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスも関節炎の発症を抑制しなかった (図15-A, B)。重症度にも変化はなかった。*Cd4*、*Tcrd*を遺伝的に欠損させると、*Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス、または *Tcrd^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスに存在する $\gamma\delta$ 17細胞、またはTh17細胞が互いの病原性を補完するため関節炎の発症が抑制されないのではないかと考え、次に *Tcrd^{-/-}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*三重遺伝子欠損マウスを作製し、関節炎の発症率、および重症度を観察した。驚くべきことに、*Tcrd^{-/-}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスも *Tcrd^{+/+}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスと比べて関節炎の発症率、重症度に影響を与えなかった (図15-C)。これら二重、三重欠損マウスのリンパ節におけるIL-17産生細胞を調べてみたところ、*Tcrd^{+/+}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスでは、*Tcrd^{+/+}Cd4^{+/+}Il1rn^{-/-}*マウスと同様に $\gamma\delta$ 17細胞が主なIL-17産生細胞であった (図16-A, 17-A, B)。一方、*Tcrd^{-/-}Cd4^{+/+}Il1rn^{-/-}*マウスではTh17細胞に加えて $\gamma\delta$ TCR⁺CD4⁺CD8⁻ (トリプルネガティブ ; triple negative; TN) ⁻T細胞からのIL-17産生が亢進していた (図16-A~C, 17-C)。また、IL-17産生性TN-T細胞は *Tcrd^{-/-}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスでも増加していた (図16-B, C)。*Tcrd^{-/-}Cd4^{+/+}Il1rn^{-/-}*マウスや *Tcrd^{-/-}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスにおけるIL-17産生性TN-T細胞の増加は、野生型マウスや *Il1rn^{-/-}*マウスでは観察されないため、*Tcrd*を遺伝的に欠損することで現れるTN-T細胞は、 $\gamma\delta$ T細胞の病原性を補完しているのではないかと考えた。

5. *Tcrd^{-/-}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスにおけるTN-T細胞は $\gamma\delta$ T細胞と同様の性質を有している

TN-T細胞が $\gamma\delta$ T細胞の病原性を補完している仮説を検証するために、*Tcrd^{-/-}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスのTN-T細胞について解析した。まず、*Tcrd^{-/-}Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスのリンパ節におけるIL-17産生性TN-T細胞の表面マーカーについて調べたと

ころ、大半の細胞がCD3⁺, TCRβ⁺であり、NKT細胞のマーカーであるDX5は発現していなかった (図18-A)。次に、TN-T細胞がγδT様細胞であるかを検討するために、γδT細胞に特異的に発現している遺伝子として知られている*Sox13*, *Scart2*のTN-T細胞における発現を調べた^{39, 40}。 *Tcrd*^{-/-} *Cd4*^{-/-} *Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節からTN-T細胞をTCRβ⁺, γδTCR⁻, CD4⁻, CD8⁻, DX5⁻を指標として精製し、これらの遺伝子の発現をRT-PCRにて調べたところ、ポジティブコントロールのγδT細胞と同様に*Sox13*と*Scart2*を発現していた (図18-B)。一方、ネガティブコントロールであるCD8⁺T細胞や非T細胞ではこれらの遺伝子の発現は見られなかった。この結果は、TN-T細胞はγδTCRを発現していないもののγδT細胞と同じような特徴を有していることを示唆している。TN-T細胞がγδT細胞と同様の性質を有していることをさらに確かめるために、 *Tcrd*^{-/-} *Cd4*^{-/-} *Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節から精製したTN-T細胞をIL-1β、IL-23、IL-1Raで刺激した際のIL-1Rの発現、およびIL-17産生を測定した。未刺激時、およびIL-1β単独刺激時ではIL-1Rの発現はほとんど検出されなかったが、IL-23刺激によりTN-T細胞上のIL-1Rの発現が顕著に増加した (図19-A)。また、IL-23によるIL-1Rの発現亢進は、同時にIL-1Raを加えることによって抑制された。さらに、サイトカイン刺激時のIL-17産生を細胞内染色により解析したところ、IL-1βとIL-23を加えたときに顕著に増加していることがわかった (図19-B)。IL-1βとIL-23によるTN-T細胞からのIL-17産生の亢進は培養上清中のIL-17を測定することによっても確認した (図19-C)。これらのサイトカイン刺激によるIL-1R、およびIL-17の制御はγδT細胞と同様であり (図6-A, B, 7-A)、TN-T細胞がγδT様細胞であることをより裏付けている。さらに、γδT細胞と同様に、TN-T細胞からのIL-17産生にはTCR刺激は必要ではなく、また、PMA/ionomycinのようなマイトジェン刺激がなくても細胞内染色にてIL-17を検出することができた (図19-B, 7-B)。最後に、*Tcrd*遺伝子欠損によって

現れたTN-T細胞が *Il1rn*^{-/-}マウス背景特異的な現象ではないことを証明するために、*Tcrd*^{-/-}マウスのリンパ節細胞をPMA/ionomycin未刺激、かつIL-1βとIL-23刺激条件下で培養し、細胞内染色によりIL-17産生を測定した。*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスと同様に *Tcrd*^{-/-}マウスのTN-T細胞はIL-1βとIL-23に反応してIL-17を産生し(図20-A)、また、この反応性は野生型マウス、*Il1rn*^{-/-}マウスのγδT細胞と同様であった(図20-B)ことから、TN-T細胞はIL-1Ra遺伝子の欠損によって現れたものではないことが明らかとなった。以上の結果から、TCRδの遺伝的欠損により現れたTN-T細胞はγδT細胞と同様の特徴を有していることが明らかとなり、特にTCR刺激非依存的/IL-1βとIL-23依存的にIL-17を産生することからも、TN-T細胞が *Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症における病原性を補完している可能性が示唆される。

6. *Il1rn*^{-/-}*nu/nu*マウスは関節炎を発症する

これまで *Il1rn*^{-/-}マウスと全てのT細胞が存在しない *scid/scid*マウスをかけあわせると関節炎の発症が完全に抑制されることから、T細胞が *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症に重要であることがわかってきた³⁰。しかし、T細胞には通常の胸腺で分化する細胞以外にも腸管や肝臓などに胸腺外分化するレパトアが存在する。実際、αβT細胞と同様に一部のγδT細胞は胸腺で分化するが、胸腺が存在しない *nu/nu*マウスでもγδT細胞が認められることから、胸腺外分化するγδT細胞が存在することが知られている⁴¹。γδ17細胞の関節炎発症における病原性の有無をさらに明らかにするために、*Il1rn*^{-/-}マウスと *nu/nu*マウスをかけ合わせ (*Il1rn*^{-/-}*nu/nu*マウス)、関節炎を発症しうるかを検討した。CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、および一部の胸腺由来のγδT細胞は存在しないが、胸腺外分化したγδT細胞が存在する *Il1rn*^{-/-}*nu/nu*マウス(図21-A)は、発症率は有意に低下するものの関節炎を発症した(図21-B, C)。関節炎を発症した *Il1rn*^{-/-}*nu/nu*

マウスのリンパ節をフローサイトメトリーにより解析したところ、 $\gamma\delta 17$ 細胞がコントロールの *nu/nu* マウスに比べて顕著に増加していた (図22)。このとき、2.4%の $CD4^+IL-17^+T$ 細胞が存在していたが、これらの多くは $\gamma\delta TCR^+$ であり、いわゆるTh17細胞とは異なる細胞集団であることがわかった。IL-17産生性 $\gamma\delta TCR^+CD4^+$ ダブルポジティブ細胞は *Il1rn^{-/-}*マウスにも存在しており (図22, 17-A)、IL-17産生性 $\gamma\delta TCR^+$ シングルポジティブ細胞とどのような機能の相違があるかは不明であるが、これらの結果は、胸腺由来T細胞非存在下においても胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が *Il1rn^{-/-}-nu/nu*マウスにおける関節炎の病態形成に関与していることを示唆している。

7. 胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞はTh17細胞非存在下においても関節炎発症における病態形成能を有している

胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が関節炎発症において病態形成能を有していることをさらに明確にするために、*Il1rn^{-/-}*マウス、または *Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来のT細胞を *scid/scid*マウス、または *nu/nu*マウスに移植した (図23-A)。*Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した *scid/scid*マウスは関節炎を発症したのに対して、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した *scid/scid*マウスは関節炎をほとんど発症しなかったことから、IL-17産生性T細胞が関節炎発症に重要であるということを確認した (図23-B)。これらのマウスのリンパ節細胞をフローサイトメトリーにて解析すると、*Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した *scid/scid*マウスは $\gamma\delta 17$ 細胞とTh17細胞の両方が存在するが、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した *scid/scid*マウスではIL-17産生細胞は存在しなかった (図24)。興味深いことに、レシピエントに *nu/nu*マウスを用いると、*Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞と同様に、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞も関節炎を誘導した (図23-B)。この結果は、*nu/nu*マウスがレシピエントである場合は、ドナー由来のIL-17

産生性T細胞は必要でないことを示唆している。*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した*nu/nu*マウスは胸腺由来IL-17産生性T細胞は存在しないが、レシピエント由来の胸腺外分化した $\gamma\delta$ 17細胞が存在するため(図23-C)、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した*nu/nu*マウスのリンパ節におけるIL-17産生細胞を解析すると、 $\gamma\delta$ 17細胞が増加しており、さらにIL-17産生の全てを $\gamma\delta$ T細胞が担っていた(図24、上段)。これらの結果は、レシピエントの*nu/nu*マウス由来の胸腺外分化 $\gamma\delta$ 17細胞が関節炎を発症させるのに十分であることを示唆している。1.5%のCD4⁺IL-17⁺T細胞が存在していたが(図24、中段)、これらの多くは $\gamma\delta$ TCR⁺であり(図24、下段)、*Il1rn^{-/-}-nu/nu*マウスで見られた細胞集団と同じく(図22)、 $\gamma\delta$ T細胞の亜集団であると考えられる。最後に、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した*nu/nu*マウスの関節炎発症が、レシピエント由来のIL-17に依存しているかどうかを確かめるために、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を*Il17a^{-/-}nu/nu*マウスに移植した。*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞を移植した*Il17a^{-/-}nu/nu*マウスは*Il17a^{+/+}nu/nu*マウスに比べて有意に関節炎の発症が抑制されたことから(図25)、レシピエントの*nu/nu*マウス由来のIL-17産生細胞が関節炎発症に重要な役割を果たしていることが示された。以上の結果は、胸腺外分化した $\gamma\delta$ 17細胞が関節炎発症における病態形成能を有しており、もしレシピエントマウスに胸腺外分化 $\gamma\delta$ 17細胞が存在していれば、*Il1rn^{-/-}*マウス由来のIL-17産生性T細胞は関節炎の発症に必ずしも必要ではないことを示している。

8. CD4⁺ T細胞と $\gamma\delta$ 17細胞の両方が関節炎の発症に必要である

Th17細胞が存在しなくても、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来T細胞とヌードマウス中の胸腺外分化 $\gamma\delta$ 17細胞によって関節炎を誘導できることが明らかとなったので、 $\gamma\delta$ T細胞、CD4⁺T細胞が直接病態を誘導しうるかを検討した。*Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来の $\gamma\delta$ T

細胞、または *Tcrd⁺ Il1rn^{-/-}* マウス由来の CD4⁺T細胞を *scid/scid* マウスに移植したところ、どちらのマウスもほとんど関節炎を誘導することができなかった (図26-A)。

一方、*Cd4⁺ Il1rn^{-/-}* マウス由来の $\gamma\delta$ T細胞と *Tcrd⁺ Il1rn^{-/-}* マウス由来の CD4⁺T細胞を同時に *scid/scid* マウスに移植したところ、コントロールである *Il1rn^{-/-}* マウス由来の全T細胞を移植した *scid/scid* マウスと同様に効率よく関節炎を発症した。さらに、これらのマウスの関節局所に浸潤している細胞をフローサイトメトリーにて解析したところ、 $\gamma\delta$ T細胞、または CD4⁺T細胞を単独で移植したマウスには IL-17 産生細胞が存在しなかったが、 $\gamma\delta$ T細胞と CD4⁺T細胞を同時に移植し、関節炎を発症したマウスでは $\gamma\delta$ 17細胞が浸潤していた (図26-B)。

一方、CD4⁺T細胞単独、または $\gamma\delta$ T細胞と CD4⁺T細胞を同時に移植したマウスでは Th17細胞は存在しないが、CD4⁺IL17⁺T細胞が浸潤していた。関節局所とは異なり、リンパ節では $\gamma\delta$ T細胞と CD4⁺T細胞を同時に移植したマウスや、関節炎を発症しない CD4⁺T細胞単独移植マウスでさえも Th17細胞が存在した (図27)。

これらの結果は、CD4⁺T細胞が $\gamma\delta$ 17細胞を関節局所に浸潤させるのに必要であり、また $\gamma\delta$ 17細胞が関節局所に集積することが関節炎発症に重要であることを示唆している。さらに、*Cd4⁺ Il1rn^{-/-}* マウス由来の $\gamma\delta$ T細胞を移植した *scid/scid* マウスは半数が脱肛を伴う大腸炎を発症し、8匹中1匹が皮膚炎を発症した (図28)。

大腸炎はコントロールの *Cd4⁺* マウス由来の $\gamma\delta$ T細胞を移植しても起こることから、IL-1Ra 遺伝子欠損によって活性化した $\gamma\delta$ 17細胞が全ての病態の原因であるとは言えないが、少なくとも $\gamma\delta$ T細胞単独では臓器特異性を決定できず、全身で炎症が起こってしまうことを示唆している。CD4⁺T細胞移植群では大腸炎や皮膚炎は観察されなかった。以上の結果は、CD4⁺T細胞が臓器特異性を決定し、 $\gamma\delta$ 17細胞が炎症の増幅を行うことによって関節炎が発症するという新たな病態形成メカニズムを示唆している (図29-A)。

一方、胸腺由来のT細胞は存在しないが、胸腺外分化した $\gamma\delta$ 17細胞

が存在する *Il1rn*^{-/-}*nu/nu* マウスも関節炎を発症することから (図21-B, C)、関節で IL-1 の過剰発現があるときには CD4⁺T 細胞の関与なしに $\gamma\delta$ 17 細胞だけで関節炎を発症する事が示唆される (図29-B)。

考察

γδT細胞によるIL-17産生メカニズム

これまで、γδT細胞からのIL-17産生にはTCRシグナルは必須ではなく、IL-1βとIL-23刺激が必要であることが知られていた^{15, 19, 35}。しかしながら、γδT細胞のIL-17産生におけるIL-1βとIL-23の役割の相違については不明のままであった。本研究では、IL-23がγδT細胞のIL-1Rの発現を誘導すること、つづくIL-1βシグナルがIL-17産生に重要であることを明らかとした。以前の報告と同様に、γδT細胞は恒常的にRORγt、IL-23Rを発現しているにもかかわらず、高精製したγδT細胞をIL-1β、またはIL-23単独で刺激してもIL-17は誘導されなかった^{15, 35}。最近、Duanらのグループは、腹腔や肺に存在するγδT細胞は脾臓のγδT細胞に比べて5~10倍のIL-1Rを発現していること、しかし、十分にIL-1Rを発現している腹腔や肺のγδT細胞においてもIL-1β単独刺激はIL-17を誘導することができず、IL-1βとIL-23の刺激によりIL-17産生が誘導されることを報告した³⁵。これは、IL-23は単にIL-1Rを誘導するだけではなく、他のTh17細胞分化関連転写因子の発現を増加させることによってIL-17産生を制御していることを示唆している。実際、本研究ではIL-1βが*Rorc*、*Rora*、*Nfkbiz*、*Batf*の発現を促進していることを見い出しており、γδT細胞からのIL-17産生にTh17細胞分化関連転写因子の発現が関与していることを示唆している。今後、γδT細胞によるIL-17産生メカニズムをより詳細に明らかにするために、IL-23でどんな転写因子が誘導され、*Rorc*、*Rora*、*Nfkbiz*、*Batf*と協調的にIL-17産生を亢進させるのかを、未刺激時、IL-23刺激時、IL-1βとIL-23刺激時にγδT細胞で誘導される遺伝子をマイクロアレイによって比較解析することによって明らかにする必要がある。これらの転写因子を誘導するためのIL-1βシグナルの下流は完全には明らかとされていないが、近年、p38、PKC、

PI3K、NF- κ Bシグナルが $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生に重要であることが報告された^{35, 37}。したがって、IL-1 β によって活性化されるこれらのシグナル伝達経路がTh17細胞分化関連転写因子の発現に重要である可能性が示唆される。

また、本研究ではIL-1Raが $\gamma\delta$ T細胞上のIL-1Rの発現を抑制することを明らかとした。IL-1RaによるIL-1Rの発現抑制は*Il1 α ^{-/-} β ^{-/-}*マウスにおいても観察されることから、IL-1RaはIL-1によるIL-1Rの発現増加を阻害することによってではなく、直接的にIL-1Rの発現を制御していると考えられる。IL-1RaがどのようにIL-1Rの発現を抑制しているのかは不明であるが、IL-1RaはIL-1Rと結合してもIL-1Rアクセサリプロテイン (IL-1RAcP) をリクルートすることができず、シグナルを伝えることができないことが知られている²⁸。そのため、IL-1Raは抑制性のシグナルを伝えるというよりはむしろ、エンドサイトーシス/リソソームのような機構を介して、IL-1Rを細胞表面から取り込ませ分解しているのだと予想される。この仮説は、 $\gamma\delta$ T細胞にIL-23とIL-1Raを添加し培養した際にエンドサイトーシス/リソソーム経路の阻害剤を加えたときのIL-1Rの発現を解析することによって証明できると思われる。また、同じIL-1Rに結合するにも関わらず、IL-1 β はなぜIL-1Rの発現を抑制しないのかという点についても解析が必要である。

Il1rn^{-/-}マウスの関節炎発症におけるCD4⁺T細胞と $\gamma\delta$ T細胞の病態形成能

これまで、*Il1rn^{-/-}*マウスはT細胞、およびIL-17依存的に関節炎を自然発症することが明らかとなっていたが、どのT細胞が産生するIL-17が病態形成に関与しているのかということや、関節炎発症における分子機構は不明のままであった。本研究では、*Il1rn^{-/-}*マウスのリンパ節、および関節局所で $\gamma\delta$ 17細胞の割合が顕著に増加していることを見出した。前述した*in vitro*の結果とIL-1 β がIL-23の発現を増加させるという

これまでの報告³⁸をふまえると、この $\gamma\delta 17$ 細胞の増加は、IL-1Raの欠損、およびIL-1の過剰シグナルによって炎症局所でIL-23が亢進するため、 $\gamma\delta T$ 細胞上のIL-1Rの発現が促進した結果だと考えられる。実際、リンパ節、および関節局所の $\gamma\delta T$ 細胞上のIL-1Rの発現は顕著に増加していた。また、リンパ節では $\gamma\delta 17$ 細胞以外にもTh17細胞の割合が増加していた。Th17細胞はCIAやSKGマウス、F759マウスといったT細胞依存的な関節炎モデルマウスにおける関節炎発症において重要であることが報告されており、関節リウマチの病態形成に関与していると考えられている。*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症において、Th17細胞と $\gamma\delta 17$ 細胞のどちらが病態形成能を有しているかを明らかにするために、抗体投与によってCD4⁺T細胞と $\gamma\delta T$ 細胞を除去した際の関節炎の発症率を観察した。抗CD4抗体、および抗 $\gamma\delta TCR$ 抗体、どちらを投与した際も関節炎の発症が抑制されたことから、CD4⁺T細胞と $\gamma\delta T$ 細胞の両方が関節炎発症に重要であることが明らかとなった。しかし、抗体を用いた細胞除去実験では完全に細胞を欠損させることができないため、次に遺伝子欠損マウスを用いてCD4⁺T細胞と $\gamma\delta T$ 細胞を欠損させた場合の関節炎の発症率を検討した。予想と異なり、*Cd4*^{-/-}マウスも*Tcrd*^{-/-}マウスも*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎の発症を抑制しなかった。それぞれのマウスのリンパ節におけるIL-17産生細胞を解析したところ、*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスでは $\gamma\delta 17$ 細胞が主なIL-17産生細胞であるのに対し、*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスではTh17細胞以外に機能未知な $\gamma\delta TCR$ ・CD4⁺・CD8⁺・(TN)-T細胞によるIL-17産生が増加していた。このことから、*Tcrd*遺伝子欠損マウスにおいてはIL-17産生性TN-T細胞が病原性を補完していることが考えられた。さらに、*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}三重遺伝子欠損マウスも関節炎を発症し、リンパ節においてIL-17産生性TN-T細胞が増加しているのを観察した。IL-17産生性TN-T細胞はTCR δ が遺伝的に欠損したときにのみ現れるため、TN-T細胞は $\gamma\delta TCR$ を有していないものの $\gamma\delta T$ 細胞様の性質を持っているのではないかと考えた。

興味深いことに、TN-T細胞と $\gamma\delta$ T細胞のIL-17産生メカニズムは非常によく似ていることがわかった。IL-23はTN-T細胞上のIL-1Rの発現を増加させ、IL-1 β とIL-23はTCR非依存的にTN-T細胞からのIL-17産生を誘導した。NKT細胞もまた、IL-1 β とIL-23によってIL-17産生を誘導することや、IL-23がNKT細胞上のIL-1Rを誘導することが報告されているが、IL-1 β とIL-23によって誘導されるNKT細胞からのIL-17産生にはCD1dを介したTCRシグナルが必須であるため⁴²、TN-T細胞はNKT細胞ではないと考えられる。実際、*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスから単離したTN-T細胞は*Sox13*や*Scart2*といった $\gamma\delta$ T細胞特異的遺伝子を発現していたため、TCR δ の遺伝的欠損によって現れたTN-T細胞は $\gamma\delta$ TCRを有していないものの $\gamma\delta$ T細胞様の細胞であり、 $\gamma\delta$ T細胞の関節炎発症における病原性を補完していることが示唆される。現在、この結論を補強するために *Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス由来のTN-T細胞とCD4⁺T細胞を *scid/scid*マウスに移植し（後述するように*scid/scid*マウスに関節炎を誘導するためには $\gamma\delta$ T細胞とCD4⁺T細胞を同時に移植することが必要）、関節炎の発症を観察中である。

胸腺外分化 $\gamma\delta$ 17細胞の関節炎発症における病態形成能

これまで、*Il1rn*^{-/-}マウスを*scid/scid*マウスとかけ合わせると関節炎の発症が完全に抑制されることがわかっていた³⁰。また、NODマウスの糖尿病や*Tgfb1*^{-/-}の全身性の炎症は*nu/nu*マウス背景にすることで抑制されることから、これまで自己免疫疾患の発症には胸腺由来のT細胞が重要であると考えられていた^{43, 44}。しかしながら、本研究では*Il1rn*^{-/-}マウスを*nu/nu*マウスとかけ合わせると関節炎を発症すること、また関節炎を発症した*Il1rn*^{-/-}*nu/nu*マウスのリンパ節で $\gamma\delta$ 17細胞の割合が顕著に増加していることを見出した。この結果は、自己免疫疾患の発症には胸腺由来のT細胞が重

要であるという従来の考え以外にも胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が病原性を有していることを示唆している。また、胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が関節炎の発症に重要であることを、移植実験によっても確認した。 $Il1rn^{-/-}$ マウスのT細胞を nu/nu マウスに移植すると関節炎を誘導できるが、レシピエントを $scid/scid$ マウスにすると発症が遅れた。さらに、ドナー細胞が $Il17a^{-/-} Il1rn^{-/-}$ マウス由来のT細胞である場合、 $scid/scid$ マウスではIL-17産生細胞は観察されず、関節炎をほとんど誘導できなかったが、 nu/nu マウスではドナー由来のIL-17欠損の影響を受けずに、関節炎を発症した。この結果はレシピエント由来の $\gamma\delta 17$ 細胞が関節炎の発症に関与していると考えられ、実際、 $Il17a^{-/-} Il1rn^{-/-}$ マウスのT細胞を移植した nu/nu マウスのリンパ節では $\gamma\delta 17$ 細胞が増加しており、IL-17産生のほぼ全てを $\gamma\delta T$ 細胞が担っていた。 Nu/nu マウスにはB細胞も存在しているので、B細胞の関与を完全に否定することはできないが、 $Il17a^{-/-} nu/nu$ マウスに $Il17a^{-/-} Il1rn^{-/-}$ マウスのT細胞を移植するとドナーが $Il17a^{+/+} nu/nu$ マウスであるときに比べて関節炎の発症が抑制されることから、レシピエントの nu/nu マウス由来の胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が関節炎発症に重要であり、また、もしレシピエントの $\gamma\delta T$ 細胞からIL-17が産生される場合は、ドナーの $Il1rn^{-/-}$ T細胞由来のIL-17は必要ではないことが明らかとなった。

CD4⁺T細胞非存在下における $\gamma\delta 17$ 細胞の関節炎発症における病態形成能

これまで、 $\gamma\delta 17$ 細胞は自己免疫疾患において炎症を増悪化すると考えられてきたが、自己免疫疾患の発症にどのように関与しているのか、そのメカニズムはほとんど明らかとされていなかった。ごく最近、 $\gamma\delta 17$ 細胞はTh17細胞からのIL-17産生を促進させることや^{15, 20}、抑制性T細胞（Treg）の機能を阻害することで⁴⁵間接的に自己免疫疾患を増悪化させることが報告された。しかしながら、本研究では、 $Il1rn^{-/-} nu/nu$ マウ

スのようにCD4⁺T細胞が存在しないマウスでも関節炎を発症し、 $\gamma\delta$ 17細胞が増加していることを明らかとした。これは、たとえCD4⁺T細胞が存在しなくても、*Il1rn*^{-/-}背景では関節局所でIL-1 β が過剰に産生されており²⁶、 $\gamma\delta$ 17細胞だけで炎症が起こるためだと考えられる。なぜ、*Il1rn*^{-/-}マウスにおいて関節特異的にIL-1が過剰に産生されるかは不明であるが、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所ではIL-1 β とIL-23の発現が亢進していることや、IL-1 β は*Il1rn*^{-/-}マウスの脾臓細胞からのIL-23産生を亢進させること³⁸、リウマチ患者の滑膜細胞からのIL-23産生を誘導することが報告されている⁴⁶。したがって、関節局所におけるIL-1 β の過剰産生はIL-23の発現を増加し、 $\gamma\delta$ T細胞のIL-1Rの発現とIL-17産生を亢進させ、関節炎を引き起こすと考えられる。 $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生にはTCR刺激は必要ではなく、IL-1 β シグナルが重要であることを合わせて考えると、これらの結果は、たとえCD4⁺T細胞が自己抗原を認識しなくても、感染やIL-1関連遺伝子の変異等によりIL-1 β が異常に産生されただけで、 $\gamma\delta$ 17細胞により関節炎を発症するという新たな関節炎発症のメカニズムを示唆している。

F759マウスは、IL-6レセプターと会合するgp130の759番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換したノックインマウスであり、IL-6とSTAT3が活性化することによって関節炎を自然発症する関節炎モデルマウスである⁴⁷。近年、Murakamiらは、針で関節を刺激することによって実験的に局所に微小炎症を起こさせるmicrobleedingの系を用いて、F759マウスの関節炎発症メカニズムを報告した⁴⁸。すなわち、microbleedingが関節局所のCCL20の発現を誘導し、臓器特異的であるが関節抗原非特異的なCD4⁺T細胞が集積し、その結果関節炎が発症することを明らかにした。本研究では、臓器特異性が決定されていれば（例えば*Il1rn*遺伝子欠損において関節局所でIL-1 β が過剰に産生されていれば）、 $\gamma\delta$ 17細胞のみで炎症応答が惹起され、関節炎を引き起こすことを提唱した。二つのモデルに共通する重要な点として、もし

局所で炎症が起これば、F759マウスも *Il1rn*^{-/-}マウスも関節炎の発症にCD4⁺T細胞による関節抗原の認識を必要としないことが挙げられる。しかしながら、F759マウスではサイトカインのソースとして関節局所にTh17細胞を含むCD4⁺T細胞が集積することが重要であるのに対して、*Il1rn*^{-/-}マウスは $\gamma\delta$ 17細胞が必要である。F759マウスでは、F759変異を有した線維芽細胞等のI型コラーゲン陽性細胞に過剰なIL-6-STAT3シグナルが入力されると、T細胞の生存に重要なIL-7の発現誘導を介してTh17細胞が増殖・活性化し、IL-17とIL-6がさらにI型コラーゲン陽性細胞からのIL-6などの炎症性サイトカインやケモカイン群を相乗的に発現増強し関節炎が発症すること、その関節炎の発症はIL-6やSTAT3を欠損させることで抑制されることがわかっている^{49, 50}。一方、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所ではIL-1 β が過剰に産生されており、その関節炎発症はIL-6に非依存的である（池田ら、未発表データ）。また、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所に集積している $\gamma\delta$ 17細胞の分化はIL-6とSTAT3非依存的であり^{51, 52}、IL-1 β に強く依存している。さらに、F759マウスの場合は、microbleedingによる関節でのCCL20の発現が、Th17細胞を含むCD4⁺T細胞の集積に重要である。一方、*Il1rn*^{-/-}マウスでは、リンパ節ではCCR6⁺Th17細胞、およびCCR6⁺ $\gamma\delta$ 17細胞のどちらも増加しているのに対し、関節局所ではIL-17産生細胞のほぼ全ては $\gamma\delta$ 17細胞であり、Th17細胞はほとんど検出されない。よって、*Il1rn*^{-/-}マウスでは、関節局所へのIL-17産生性の細胞浸潤にCCL20-CCR6軸は関与していないことが示唆される。それゆえ、二つの関節炎モデルマウスにおいて、局所の炎症反応の引き金の違いが異なるサイトカインやケモカインの発現パターンを引き起こし、その結果、異なるエフェクター細胞が関節に集積すると考えられる。*Il1rn*^{-/-}マウスにおいて $\gamma\delta$ 17細胞が関節局所に浸潤するために必要なケモカインレセプターは現時点では不明であるが、今後リンパ節に存在するTh17細胞と関節局所に存在する $\gamma\delta$ 17細胞のケモカインレセプターの

発現の違いをマイクロアレイによって比較解析することによって明らかとなるものと思われる。

関節炎発症における組織特異性

本研究では、関節炎発症における $\gamma\delta 17$ 細胞とTh17細胞の役割をさらに一般化するために、IL-1 β が過剰産生されていない*scid/scid*マウスに $\gamma\delta$ T細胞とCD4⁺T細胞を移植した。 $\gamma\delta$ T細胞とCD4⁺T細胞をそれぞれ単独に移植した*scid/scid*マウスは関節炎を発症しなかったが、 $\gamma\delta$ T細胞とCD4⁺T細胞を同時に移植すると効率よく関節炎を誘導した。さらに、 $\gamma\delta$ T細胞、またはCD4⁺T細胞を単独で移植した*scid/scid*マウスの関節局所にはIL-17産生細胞は存在しなかったが、 $\gamma\delta$ T細胞とCD4⁺T細胞を同時に移植し、関節炎を発症した*scid/scid*マウスの関節局所では $\gamma\delta 17$ 細胞の集積が観察された。一方、CD4⁺T細胞単独、または $\gamma\delta$ T細胞とCD4⁺T細胞を同時に移植したマウスではTh17細胞は存在しないが、CD4⁺IL17⁺T細胞が浸潤していた。関節局所とは異なり、リンパ節では $\gamma\delta$ T細胞とCD4⁺T細胞を同時に移植したマウスや、関節炎を発症しないCD4⁺T細胞単独移植マウスでさえもTh17細胞が存在した。これらの結果は、 $\gamma\delta 17$ 細胞が関節局所に浸潤するためにCD4⁺T細胞が必要であり、 $\gamma\delta 17$ 細胞が集積することによって関節炎が発症するという新たなメカニズムを示している。言い換えると、IL-1 β が過剰産生されていない通常のマウスでは、CD4⁺T細胞が組織特異性を決定し、 $\gamma\delta 17$ 細胞が炎症を増幅させることによって、関節炎が発症すると考えられる。上述したようにCD4⁺T細胞非存在下でもIL-1 β の過剰シグナルがある場合は、 $\gamma\delta 17$ 細胞だけで関節炎を引き起こすことが示唆されるため、このときのCD4⁺T細胞は関節局所にいる抗原提示細胞や滑膜細胞からIL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させることによって、関節局所に $\gamma\delta 17$ 細胞を集積させ、さらにIL-1/IL-23/IL-17の相乗効果によっ

て関節炎を誘導していると考えられる。本研究での知見と同様に、SuttonらはEAEの系において、*in vitro*でMOGとIL-1 β 、IL-23で刺激した $\gamma\delta$ T細胞単独を野生型マウスに移植した際も、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞を移植した際もEAEを発症しないが、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞、さらに $\gamma\delta$ T細胞を同時に移植すると発症することを報告している¹⁵。彼らは、 $\gamma\delta$ T細胞は、自己抗原特異的な $\alpha\beta$ T細胞と協調して炎症を誘導することによって自己免疫疾患の発症に関与していると結論づけており、EAEにおいてもCD4⁺T細胞が組織特異性を決定し、 $\gamma\delta$ 17細胞が炎症を増幅させるという本研究で提唱するメカニズムと同様の機構が働いている可能性がある。興味深いことに、本研究では*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*のT細胞を移植した*nu/nu*マウスも関節炎を発症することから、組織特異性を決定するCD4⁺T細胞は必ずしもTh17細胞である必要はないことがわかった。一方、Suttonらは $\gamma\delta$ T細胞から産生されるIL-17がTh17細胞からのIL-17産生を増幅し、**amplification loop**を形成することで病態形成を促進すると主張しているため、CD4⁺T細胞はどちらの系においても重要であるものの、Th17細胞の必要性については見解が異なる。EAEは、CCR6⁺Th17細胞が脈絡叢上皮で恒常的に発現しているCCL20と相互作用することによって中枢神経系に侵入し、炎症性サイトカインやケモカインを誘導することによって血液脳関門の透過性を変化させ、その結果、他のリンパ球が浸潤することによって起こると考えられている^{53, 54}。*Il1rn^{-/-}*マウスでは、関節局所へのIL-17産生性の細胞浸潤にCCL20-CCR6軸は関与していないことが示唆される。それゆえ、炎症局所に浸潤するためのケモカインレセプターの違いが炎症を誘起するのに必要なCD4⁺T細胞がTh17細胞であるかどうかの違いとなっている可能性がある。

結語

本研究では、IL-23によるIL-1Rの発現誘導を介したIL-1 β シグナルが $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生に重要であること、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症において $\gamma\delta$ 17細胞が病態形成能を有していることを明らかとした。また、CD4⁺T細胞が臓器特異性を決定し、 $\gamma\delta$ T細胞が関節局所に集積しIL-17を産生することによって関節炎が発症するという新たな関節炎発症メカニズムを示した。一方、IL-1 β が関節局所で過剰産生していれば、たとえCD4⁺T細胞が存在しなくても $\gamma\delta$ 17細胞だけで関節炎が発症するということも示唆された。IL-1 β が過剰に産生される要因としては、様々な微生物の感染や組織傷害による炎症反応、免疫応答、HTLV-I-TaxのようなIL-1 β を誘導する能力を持つ転写因子の侵入、あるいは遺伝的要因によるIL-1系の制御異常などが考えられる。近年、*Il1rn*遺伝子が欠失、または変異があるヒトでは、IL-1RaがmRNA、タンパクレベルで欠損しており、その結果、骨や皮膚の炎症を主徴とする自己炎症性疾患（autoinflammatory disease）を発症するということが報告されている^{55,56}。これらの患者では、単核球からのIL-1 β 産生が亢進していることや、炎症を起こした皮膚に顕著にIL-17産生細胞が浸潤していることが明らかとなっている。関節に炎症が起きている患者の炎症局所に浸潤している細胞については解析されていないが、本研究の結果をふまえると、 $\gamma\delta$ 17細胞が亢進していて病態形成に関与している可能性がある。

本研究では、新たな関節炎発症メカニズムを提唱することができ、病態形成の基本的理解、発症機序解明に新たな道を切り開くことができた。本研究の知見により、今後、自己免疫疾患、炎症性疾患に対する新たな治療法の確立につながることを期待される。

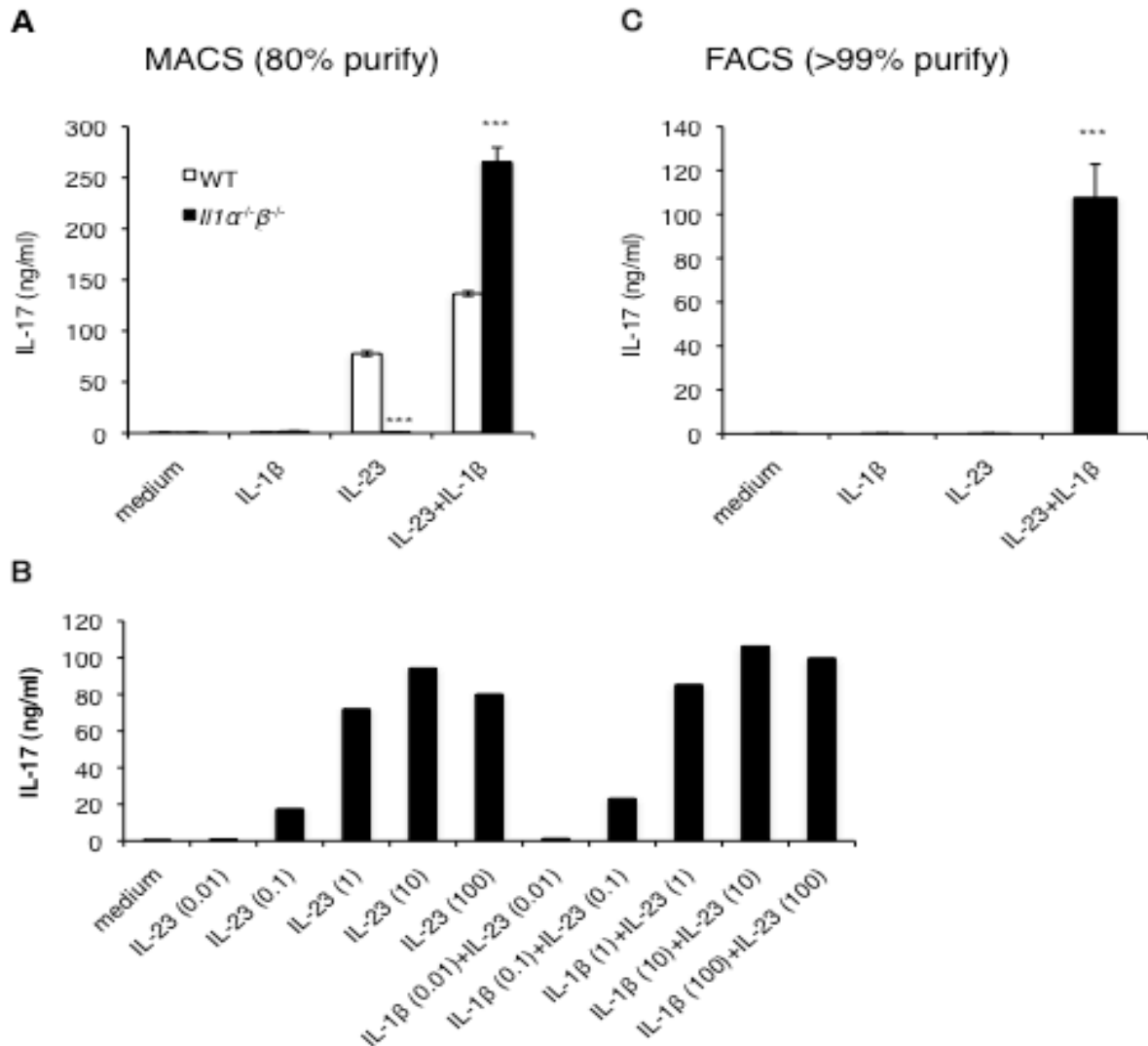


図5 $\gamma\delta$ T細胞からのIL-17産生にはIL-1 β シグナルが重要である

- A. 野生型、*Il1α⁺β^{-/-}*マウスのリンパ節および脾臓細胞のプールから $\gamma\delta$ T細胞をMACSで精製し（精製率80%）、mediumのみ、IL-1 β (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)+IL-23 (10 ng/ml)で72時間刺激した後の培養上清中のIL-17産生をELISA法によって測定した。各値は3ウェル間の平均±標準誤差で表示してある。***P>0.001, versus 野生型マウス。
- B. 野生型マウスのリンパ節および脾臓細胞のプールから $\gamma\delta$ T細胞をMACSで精製し、mediumのみ、IL-23 (0.01-10 ng/ml)、IL-1 β (0.01-100 ng/ml)+IL-23 (0.01-100 ng/ml)で72時間刺激した後の培養上清中のIL-17産生をELISA法によって測定した。括弧内は添加したサイトカインの濃度をng/mlで表している。
- C. 野生型マウスの脾臓細胞から $\gamma\delta$ T細胞をFACSで精製し（精製率>99%）、mediumのみ、IL-1 β (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)+IL-23 (10 ng/ml)で72時間刺激した後の培養上清中のIL-17産生をELISA法によって測定した。各値は3ウェル間の平均±標準誤差で表示してある。***P<0.001, versus medium。

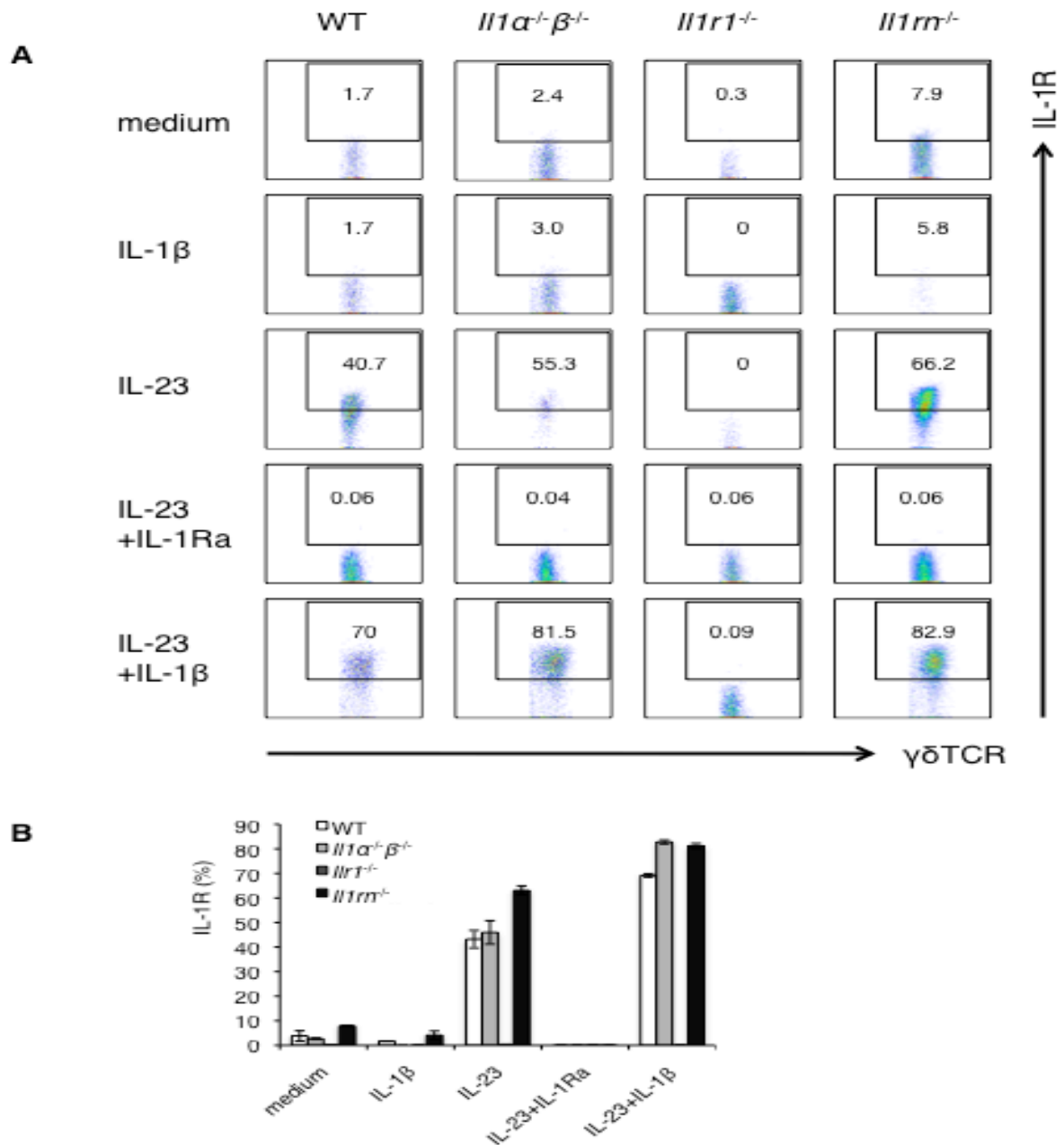


図6 IL-23はγδT細胞のIL-1Rの発現を誘導する

A. 野生型、*Il1α^{-/-}β^{-/-}*、*Il1r1^{-/-}*、*Il1rn^{-/-}*マウスの脾臓細胞からγδT細胞をFACSで精製し、mediumのみ、IL-1β (10ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)+IL-1Ra (200 ng/ml)、IL-1β (10 ng/ml)+IL-23 (10 ng/ml)で72時間培養した後のγδT細胞上のIL-1Rの発現の割合をフローサイトメトリーによって測定した。データはγδTCRでゲートをかけ、3ウェルの代表的なものを示している。

B. Aで測定したIL-1Rの発現の割合の平均をグラフ化したものを示す。それぞれの棒グラフは、3ウェル間の平均±標準誤差で表示してある。

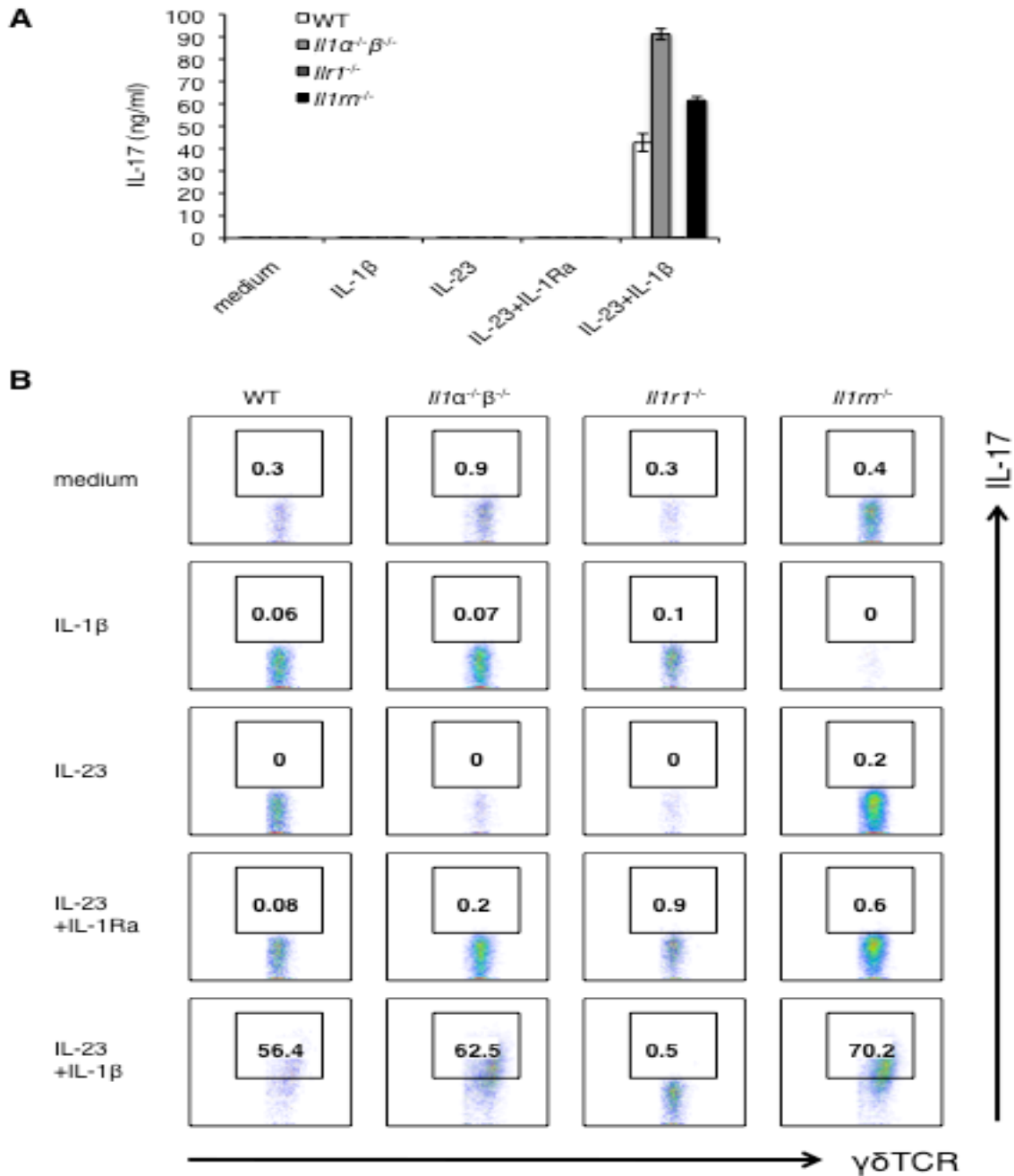


図 7 $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17 産生には、IL-1R の発現誘導を介した IL-1 β シグナルが重要である

- A. 野生型、*Il1 α ⁻ β ⁻*、*Il1r1⁻*、*Il1rn⁻* マウスの脾臓細胞から $\gamma\delta$ T 細胞を FACS で精製し、medium のみ、IL-1 β (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)+IL-1Ra (200 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)+IL-23 (10 ng/ml) で 72 時間培養した後の培養上清中の IL-17 産生を ELISA 法によって測定した。各値は、3 ウェル間の平均 \pm 標準誤差で表示してある。
- B. A で培養した細胞をさらにモノニンシンで 5 時間刺激した後、IL-17 を細胞内染色し、フローサイトメトリーによって測定した。データは $\gamma\delta$ TCR でゲートをかけ、3 ウェルの代表的なものを示している。

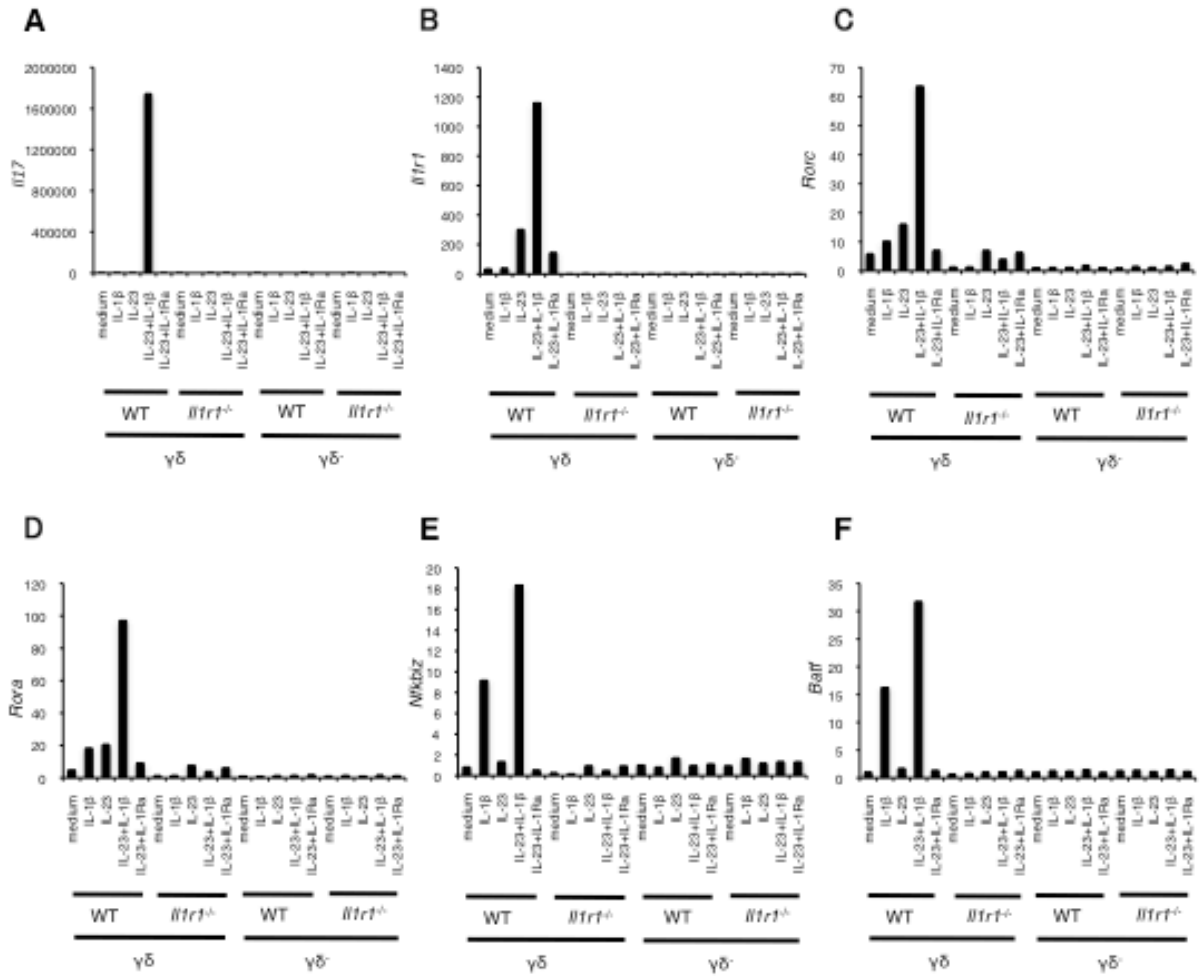


図 8 IL-1βは *Rorc*、*Rora*、*Nfkbiz*、*Batf* の発現を増加させる

野生型、*Il1r1*^{+/+}マウスの脾臓細胞からγδ⁺CD3⁺T細胞、γδ⁻CD3⁺T細胞をFACSで精製し、mediumのみ、IL-1β (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)、IL-1β (10 ng/ml)+IL-23 (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)+IL-1Ra (200 ng/ml)で48時間培養した後の *Il17a* (A)、*Il1r1* (B)、*Rorc* (C)、*Rora* (D)、*Nfkbiz* (E)、*Batf* (F) の mRNA 発現量をリアルタイム PCRにより定量した。縦軸の値は、γδ⁺CD3⁺T細胞をmediumのみで培養したときのそれぞれの mRNA の値を1とし、相対値で表している。

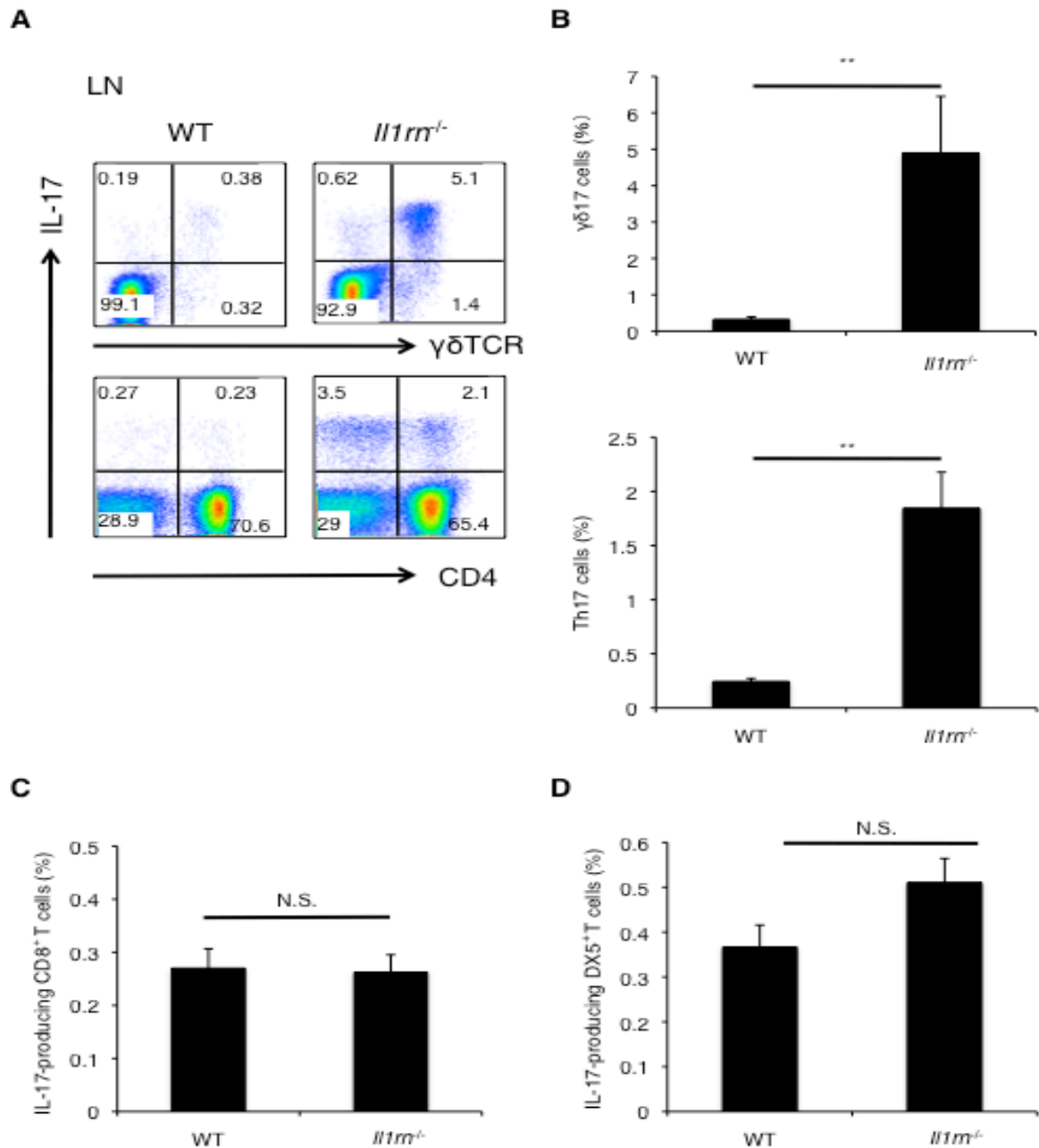


図9 *Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節では $\gamma\delta 17$ 細胞と Th17細胞が増加している

- A. 24週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節細胞をPMA/ionomycinで刺激し、 $\gamma\delta 17$ 細胞と Th17細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。データはCD3 ϵ ⁺でゲートをかけ、3~4匹の代表的なものを示している。
- B. Aで測定した $\gamma\delta 17$ 細胞と Th17細胞の割合の平均ををグラフ化したものを示す。それぞれの棒グラフは、3~4匹の平均±標準誤差で表示してある。
- C. Aと同様に測定したIL-17産生性CD8⁺T細胞の割合、および
- D. IL-17産生性NKT (DX5⁺T)細胞の割合の平均をグラフ化したものを示す。それぞれの棒グラフは、3~4匹の平均±標準誤差で表示してある。 **P<0.01、N.S.; N.S.; Not Significant.

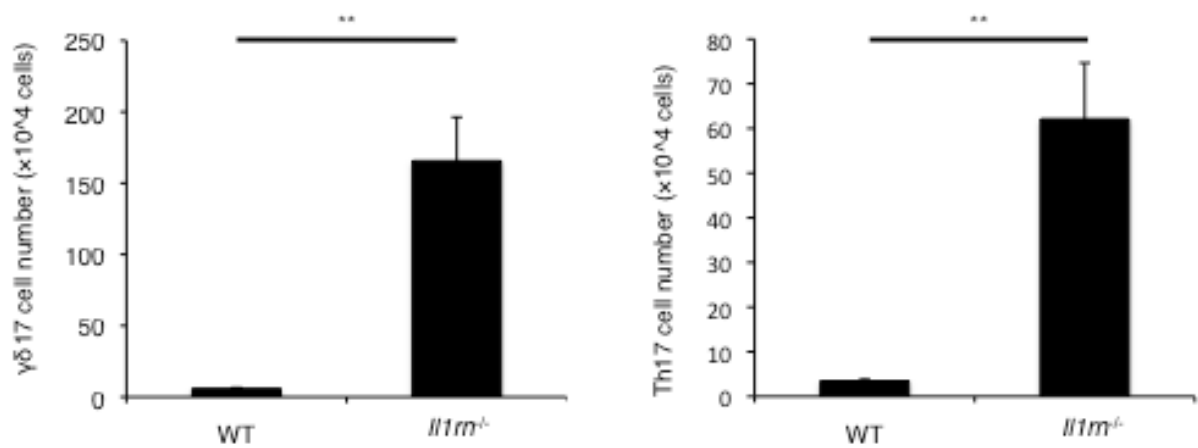


図 10 $Il1rn^{-/-}$ マウスのリンパ節では $\gamma\delta 17$ 細胞と Th17 細胞の数が増加している

24 週齢の野生型、 $Il1rn^{-/-}$ マウスの腋窩、上腕、鼠径、膝窩リンパ節細胞をプールし細胞数を計測し、図 9-A のように全体の細胞に対する $\gamma\delta 17$ 細胞と Th17 細胞の割合を調べ、 $\gamma\delta 17$ 細胞と Th17 細胞の数を算出した。それぞれの棒グラフは、3~4 匹の平均 \pm 標準誤差で表示してある。** $P < 0.01$

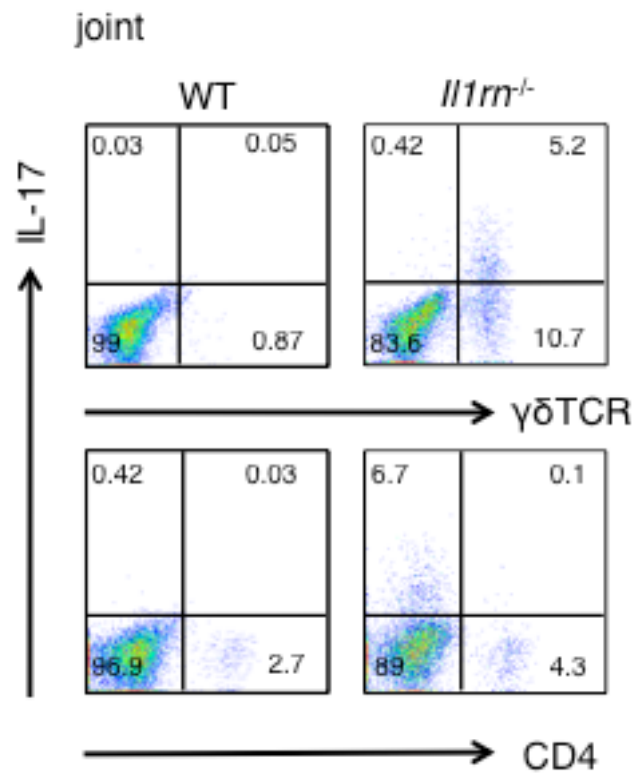


図 11 *Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所には多くのγδ17 細胞が浸潤している

20 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節局所に浸潤している細胞を PMA/ionomycin で刺激し、γδ17 細胞と Th17 細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。

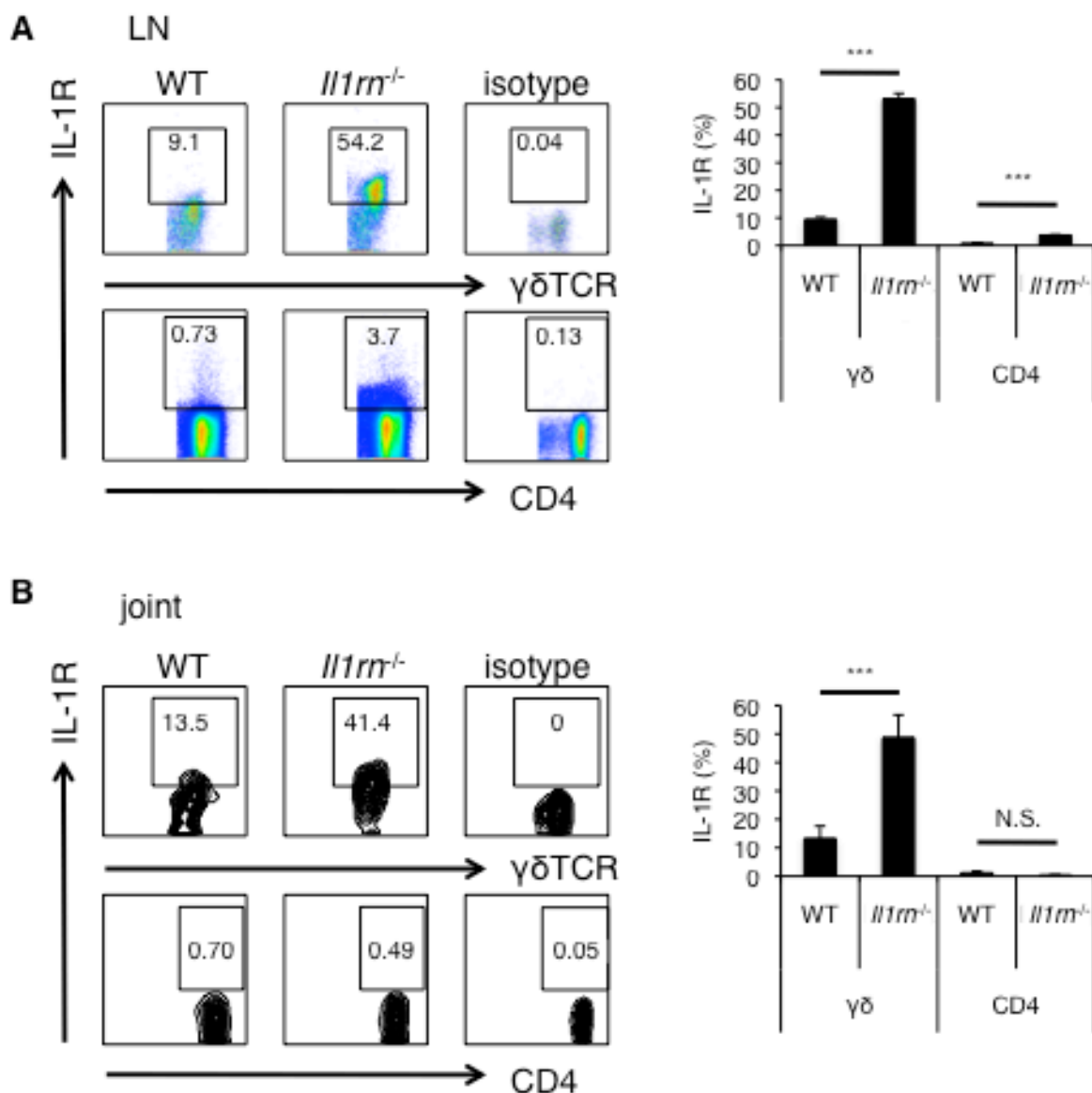


図 12 *Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節、関節局所では IL-1R を発現しているγδT 細胞が増加している

24 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節 (A)、および関節局所 (B) のγδT 細胞 (上段)、CD4⁺T 細胞 (下段) における IL-1R の発現の割合をフローサイトメトリーによって解析した。データは CD3ε⁺とγδTCR⁺ (上段)、または CD3ε⁺と CD4⁺ (下段) でゲートをかけ、3 匹の代表的なものを示している (左)。測定した IL-1R の発現の割合の平均ををグラフ化したものを示す (右)。それぞれの棒グラフは、3 匹の平均±標準誤差で表示してある。***P<0.001、N.S.; Not Significant.

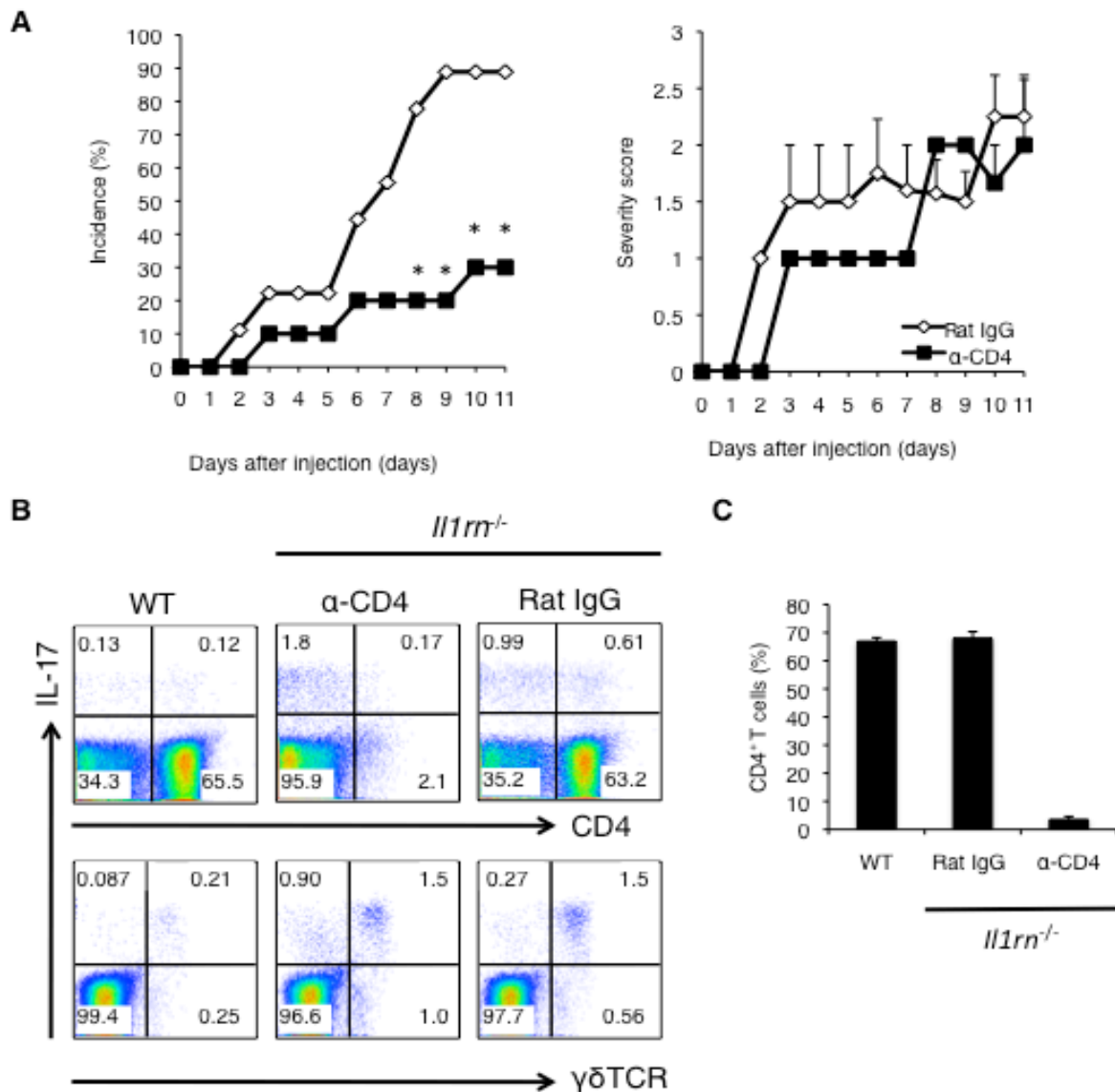


図 13 抗 CD4 抗体は *Il1rn*^{-/-} マウスの関節炎発症を抑制する

- A. 4 週齢の *Il1rn*^{-/-} マウスに抗 CD4 抗体 (n=10)、またはラット IgG (n=9) を週 2 回 (day 0, 3, 7, 10)、250μg ずつ腹腔内投与したときの関節炎の発症率 (左) と重症度 (右) を示す。*P<0.05。重症度は発症したマウスの平均±標準誤差で表示してある。
- B. 野生型マウス、および抗 CD4 抗体、またはラット IgG を投与した day11 における *Il1rn*^{-/-} マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、Th17 細胞とγδ17 細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。データは CD3ε⁺ でゲートをかけ、9~10 匹の代表的なものを示している。
- C. B で測定した CD3ε⁺T 細胞に対する CD4⁺T 細胞の割合の平均ををグラフ化したものを示す。それぞれの棒グラフは、9~10 匹の平均±標準誤差で表示してある。

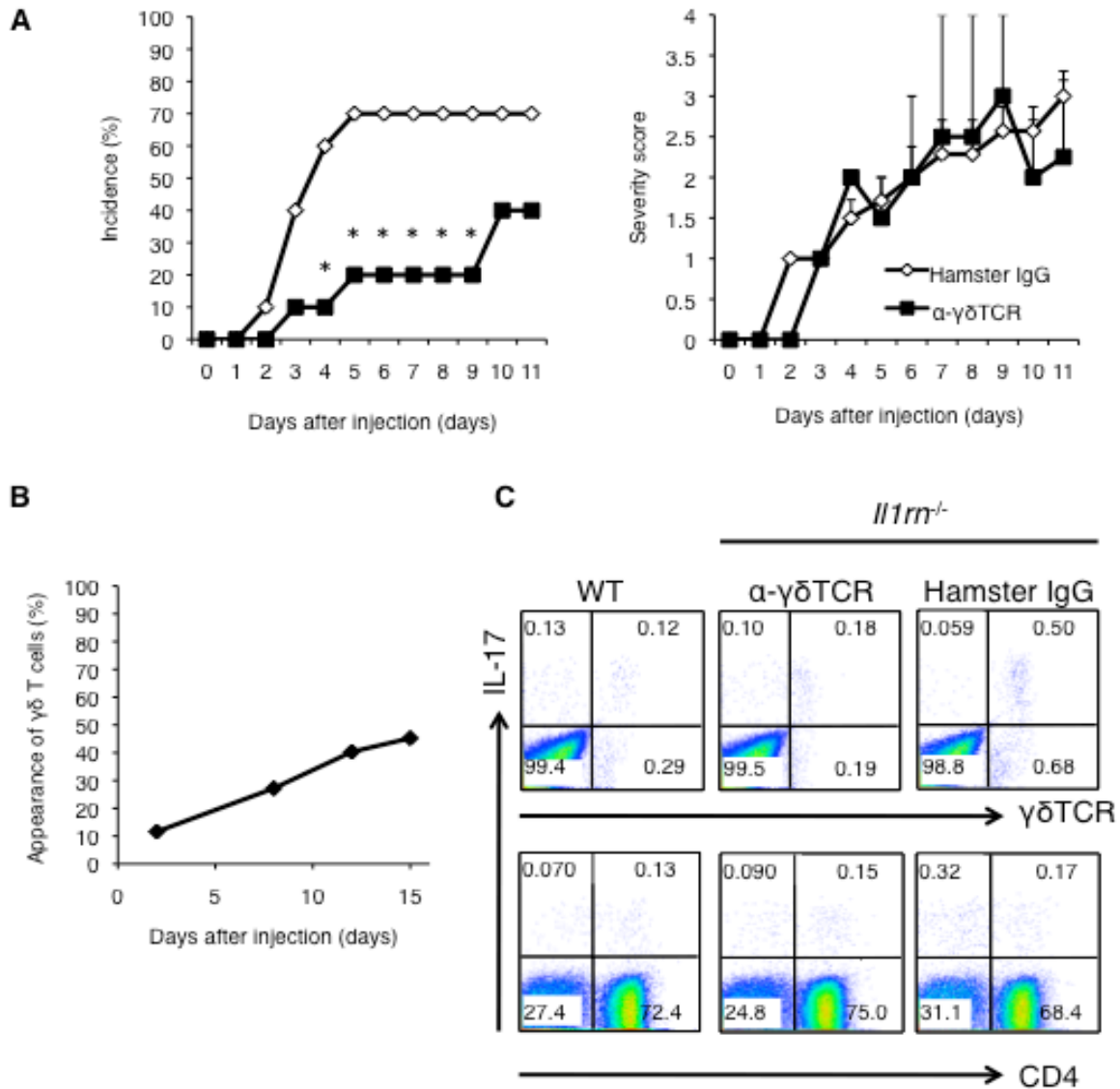


図 14 抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体は $Il1rn^{-/-}$ マウスの関節炎発症を抑制する

- A. 4 週齢の $Il1rn^{-/-}$ マウスに抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体 (n=10)、またはハムスターIgG (n=10) を週 2 回 (day 0, 3, 7, 10)、400 μ g ずつ腹腔内投与したときの関節炎の発症率 (左) と重症度 (右) を示す。
*P<0.05。重症度は発症したマウスの平均 \pm 標準誤差で表示してある。
- B. 週 2 回 (day 0, 3, 7, 10, 14)、抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体、またはハムスターIgG を投与した $Il1rn^{-/-}$ マウスのリンパ節における $\gamma\delta$ T 細胞の割合を day 2, 8, 12, 15 にフローサイトメトリーによって調べ、ハムスターIgG を投与した群に対する抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体投与群の $\gamma\delta$ T 細胞の割合として示した。
n=2~4。
- C. 野生型マウス、および抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体、ハムスターIgG を投与した day8 における $Il1rn^{-/-}$ マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、 $\gamma\delta$ 17 細胞と Th17 細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。データは CD3 ϵ ⁺ でゲートをかけ、10 匹の代表的なものを示している。

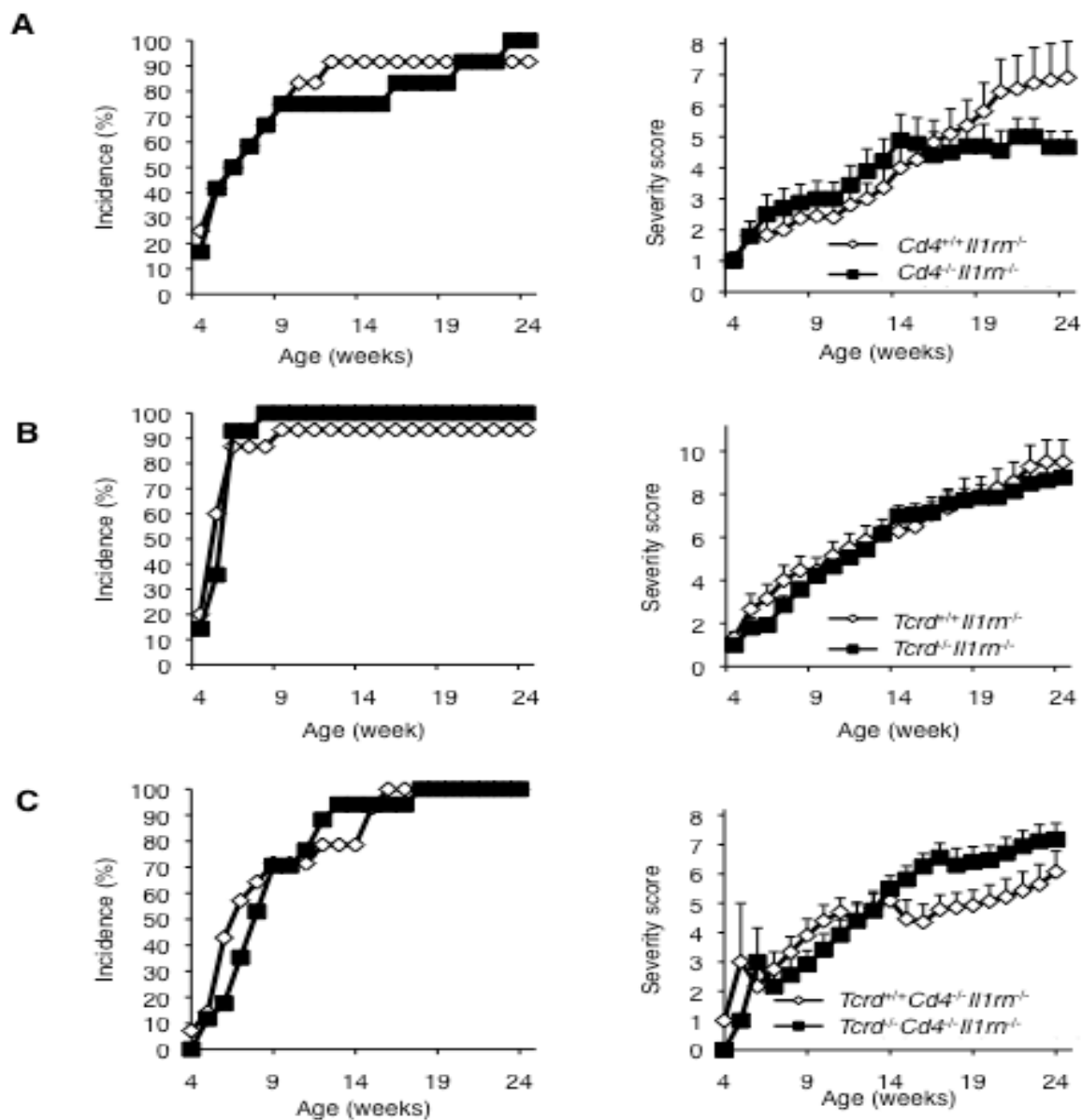


図 15 *Cd4*、および *Tcrd* の遺伝的欠損は *Il1rn*^{-/-}マウスにおける関節炎の発症に影響を与えない

- A. *Il1rn*^{-/-}マウスにおいて *Cd4* を欠損させた際の関節炎の発症率。(左)と重症度 (右) を示す。重症度は発症したマウスの平均±標準誤差で表示してある。*Cd4*^{+/+}*Il1rn*^{-/-} (n=12)、*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} (n=12) マウス。
- B. *Il1rn*^{-/-}マウスにおいて *Tcrd* を欠損させた際の関節炎の発症率。(左)と重症度 (右) を示す。重症度は発症したマウスの平均±標準誤差で表示してある。*Tcrd*^{+/+}*Il1rn*^{-/-} (n=15)、*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} (n=14) マウス。
- C. *Il1rn*^{-/-}マウスにおいて *Tcrd*、および *Cd4* を欠損させた際の関節炎の発症率。(左)と重症度 (右) を示す。重症度は発症したマウスの平均±標準誤差で表示してある。*Tcrd*^{+/+}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} (n=14)、*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} (n=17) マウス。

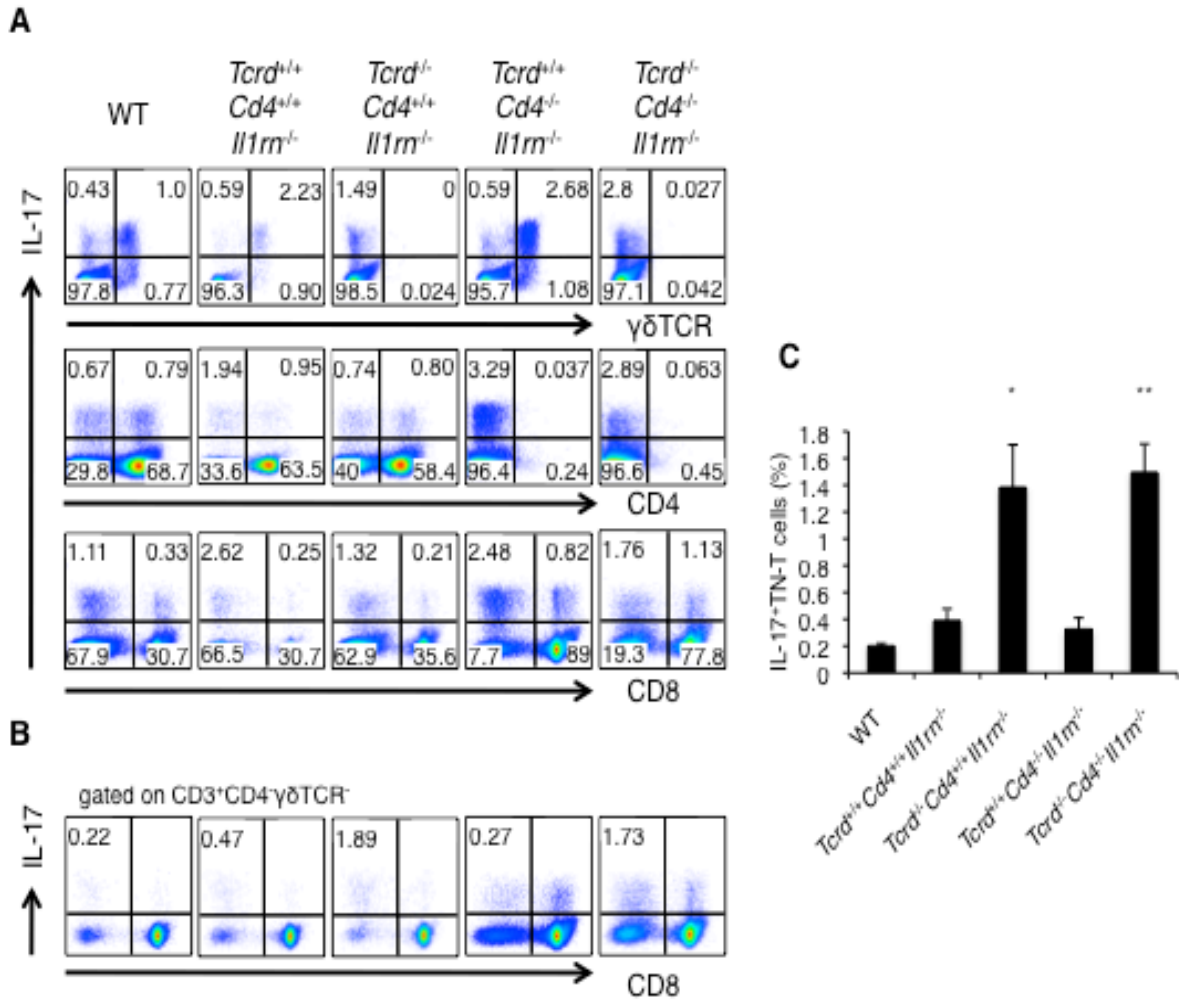


図 16 *Tcrd* を遺伝的に欠損しているマウスでは IL-17 産生性 TN-T 細胞が増加している

A. 24 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}、*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{+/+}*Il1rn*^{-/-}、*Tcrd*^{+/+}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}、*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、γδ17 細胞、Th17 細胞、IL-17 産生性 CD8⁺T 細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。データは CD3ε⁺でゲートをかけ、3~5 匹の代表的なものを示している。

B. 24 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}、*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{+/+}*Il1rn*^{-/-}、*Tcrd*^{+/+}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}、*Tcrd*^{-/-}*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、IL-17 産生性 TN-T 細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。データは CD3ε⁺、γδTCR⁺、CD4⁺でゲートをかけ、3~5 匹の代表的なものを示している。

C. B で測定した IL-17 産生性 TN-T 細胞の割合の平均をグラフ化したものを示す。それぞれの棒グラフは、3~5 匹の平均±標準誤差で表示してある。

*P<0.05、**P<0.01 versus 野生型マウス。

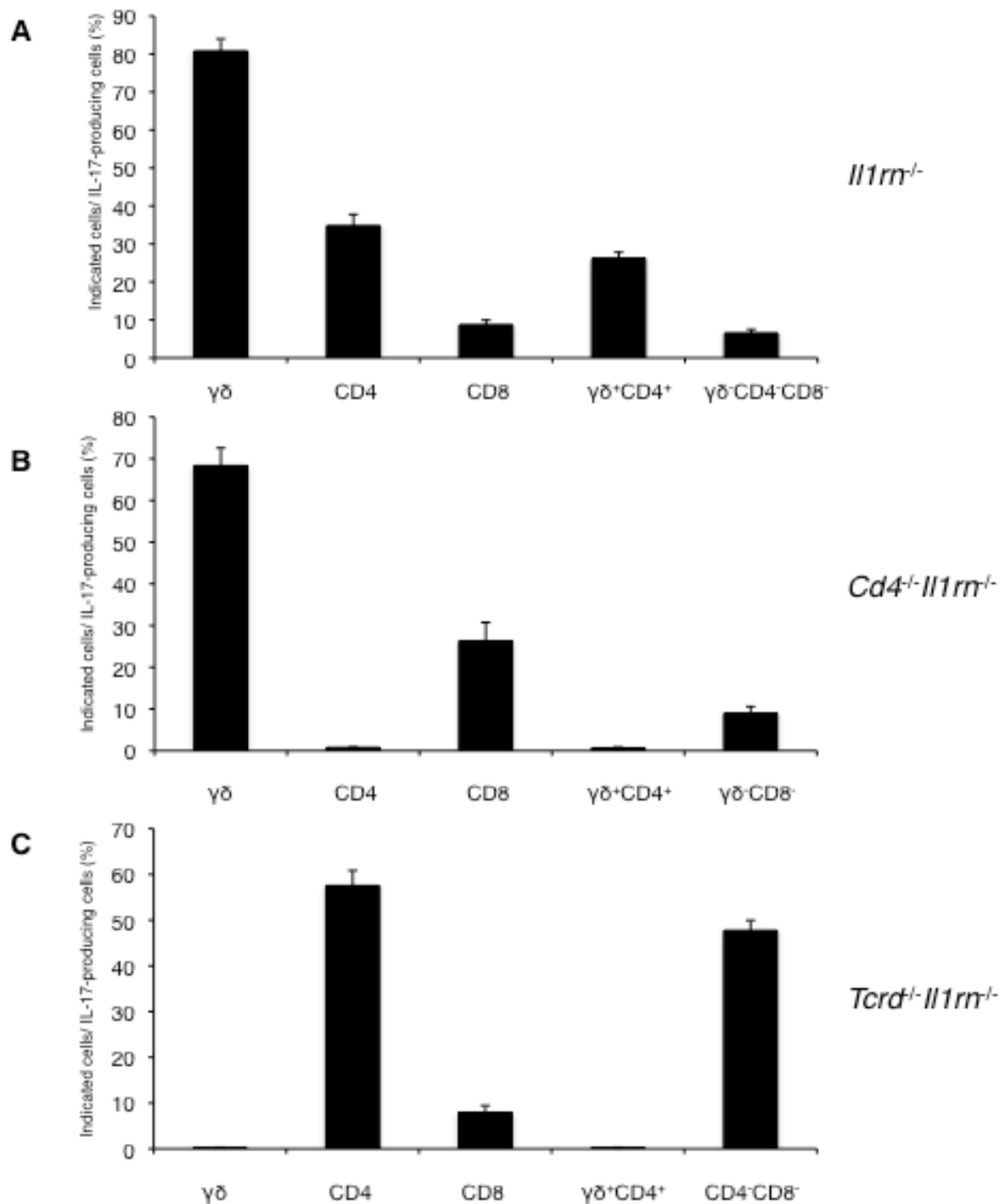


図 17 *Il1rn^{-/-}*、*Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}*、*Tcrd^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウスにおける IL-17 産生細胞の割合

24 週齢の野生型、*Il1rn^{-/-}* (A)、*Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}* (B)、*Tcrd^{-/-}Il1rn^{-/-}* (C) マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、IL-17 産生細胞の割合をフローサイトメトリーによって測定した。CD3 ϵ ⁺IL-17⁺細胞のうち、 $\gamma\delta$ TCR⁺、CD4⁺、CD8⁺、 $\gamma\delta$ TCR⁺CD4⁺、 $\gamma\delta$ TCR⁻CD4⁻CD8⁻細胞の割合をグラフ化した。それぞれの棒グラフは、3~7 匹の平均±標準誤差で表示してある。

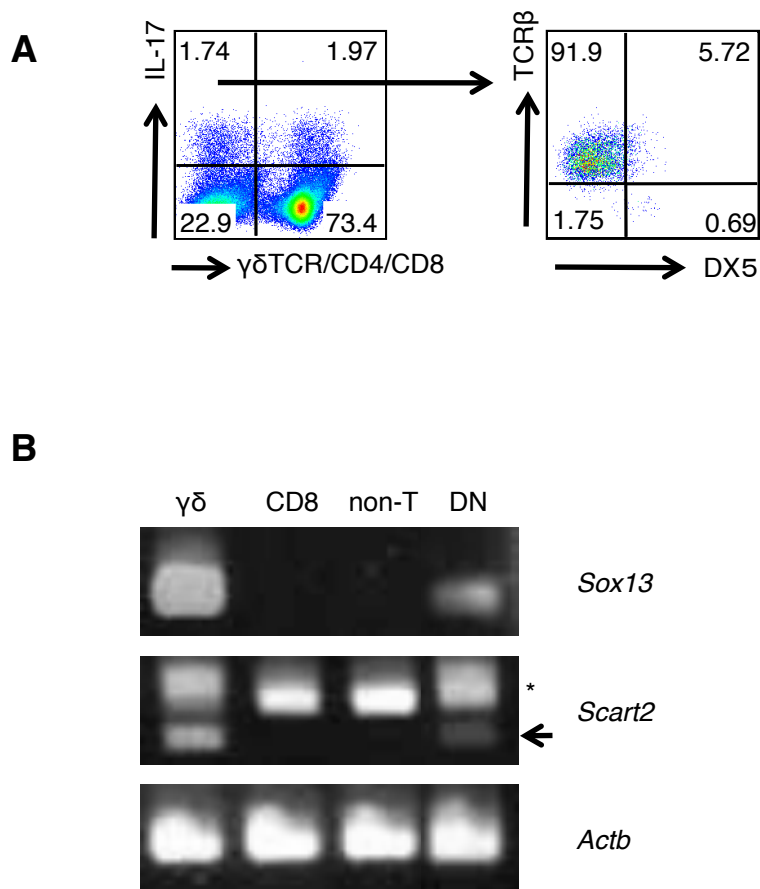


図 18 TN-T 細胞は $\gamma\delta$ T細胞特異的遺伝子を発現している

- A. *Tcrd*⁺*Cd4*⁺*Il1rn*⁺マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、 $CD3\epsilon^+\gamma\delta TCR\cdot CD4\cdot CD8\cdot IL-17^+$ T 細胞における TCR β と DX5 の発現をフローサイトメトリーによって測定した。
- B. *Il1rn*⁺マウスのリンパ節から $\gamma\delta$ T 細胞を、*Tcrd*⁺*Cd4*⁺*Il1rn*⁺マウスのリンパ節細胞から $CD8^+$ T 細胞、non-T ($B220^+CD11b^+$)、TN-T ($\gamma\delta TCR\cdot CD4\cdot CD8\cdot DX5\cdot TCR\beta^+$) を精製し、RT-PCR によって *Sox13* と *Scart2* の発現を測定した。矢印は *Scart2* の発現を、*は非特異的なバンドを示している。

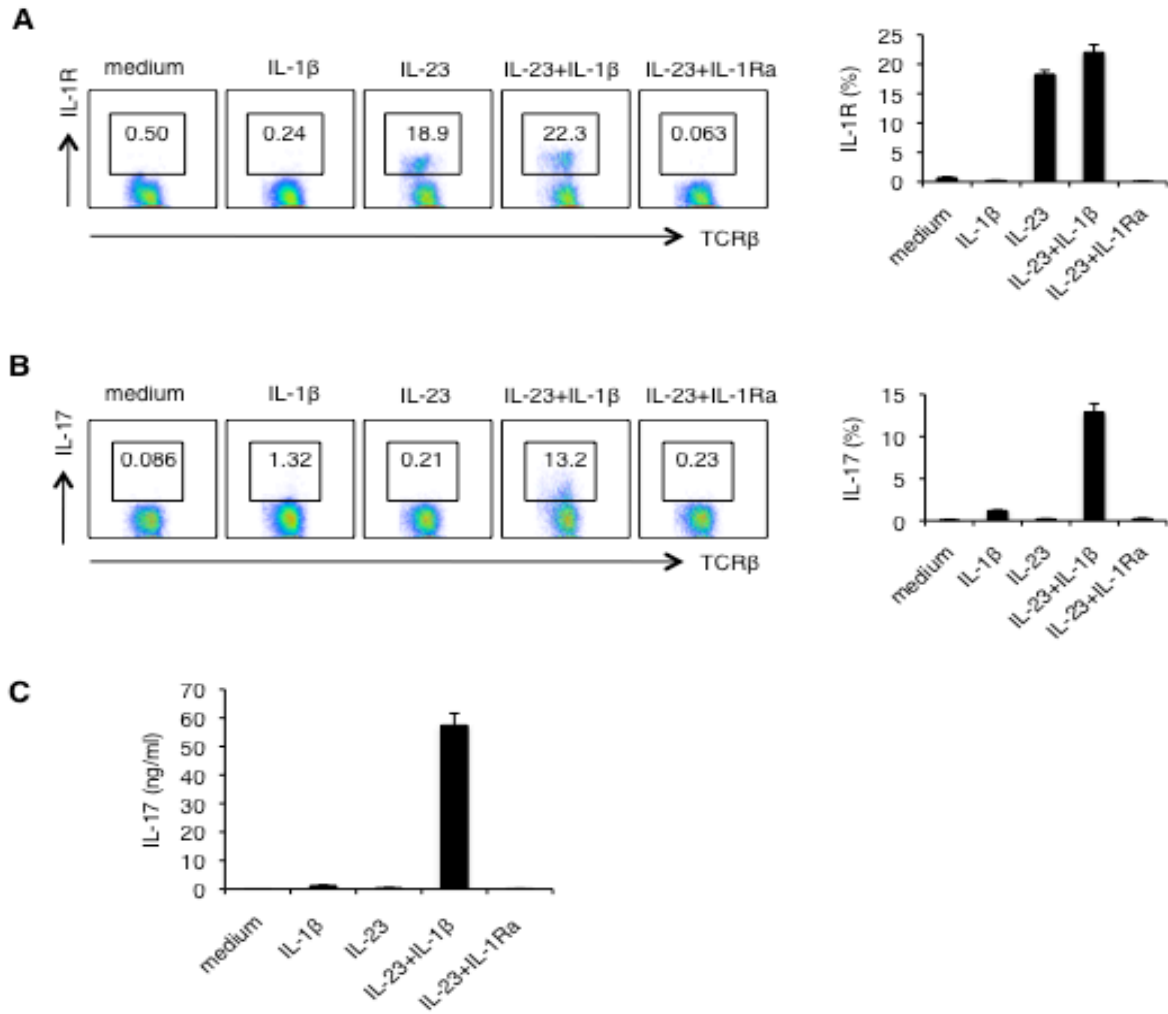


図 19 TN-T 細胞は $\gamma\delta$ 細胞様の細胞である

- A. *Tcrd*⁺*Cd4*⁺*Il1rn*⁺マウスのリンパ節細胞から TN-T 細胞を精製し、medium のみ、IL-1 β (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)+IL-23 (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)+IL-1Ra (200 ng/ml)で 72 時間培養した後の TN-T 細胞上の IL-1R の発現の割合をフローサイトメトリーによって測定した。データは TCR β ⁺でゲートをかけ、3 ウェルの代表的なもの (左)、IL-1R の発現の割合の平均をグラフ化したもの (右) を示している。それぞれの棒グラフは、3 ウェル間の平均 \pm 標準誤差で表示してある。
- B. A の刺激における TN-T 細胞の IL-17 産生の割合をフローサイトメトリーによって測定した。データは TCR β ⁺でゲートをかけ、3 ウェルの代表的なもの (左)、IL-17 の発現の割合の平均をグラフ化したもの (右) を示している。それぞれの棒グラフは、3 ウェル間の平均 \pm 標準誤差で表示してある。
- C. A で刺激した培養上清中の IL-17 産生量を ELISA 法によって測定した。それぞれの棒グラフは、3 ウェル間の平均 \pm 標準誤差で表示してある。

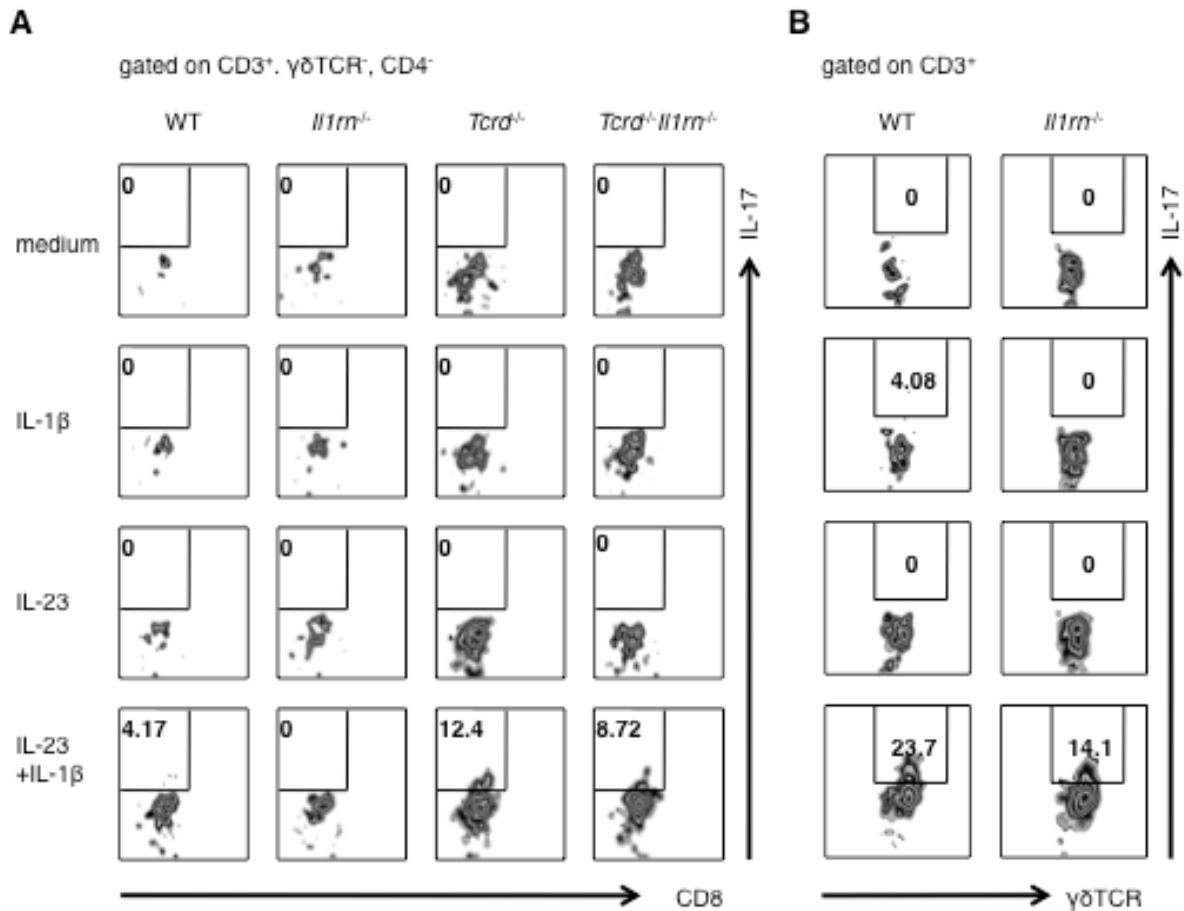


図 20 IL-1βと IL-23 による TN-T 細胞からの IL-17 産生は *Il1rn* 遺伝子欠損の影響によるものではない

A. 野生型、*Il1rn*^{-/-}、*Tcrd*^{-/-}、*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節細胞を medium のみ、IL-1β (10 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml)、IL-1β(10 ng/ml)+IL-23 (10 ng/ml)で 72 時間刺激し、その後モネンシンで 5 時間処理し、TN-T 細胞からの IL-17 産生をフローサイトメトリーによって測定した。データは CD3ε⁺,γδTCR⁻, CD4⁻, CD8⁺でゲートを取り、3 ウェルの代表的なものを示している。

B. A と同様に刺激した野生型、*Il1rn*^{-/-}マウスのγδT 細胞における IL-17 産生。データは CD3ε⁺,γδTCR⁺でゲートを取り、3 ウェルの代表的なものを示している。

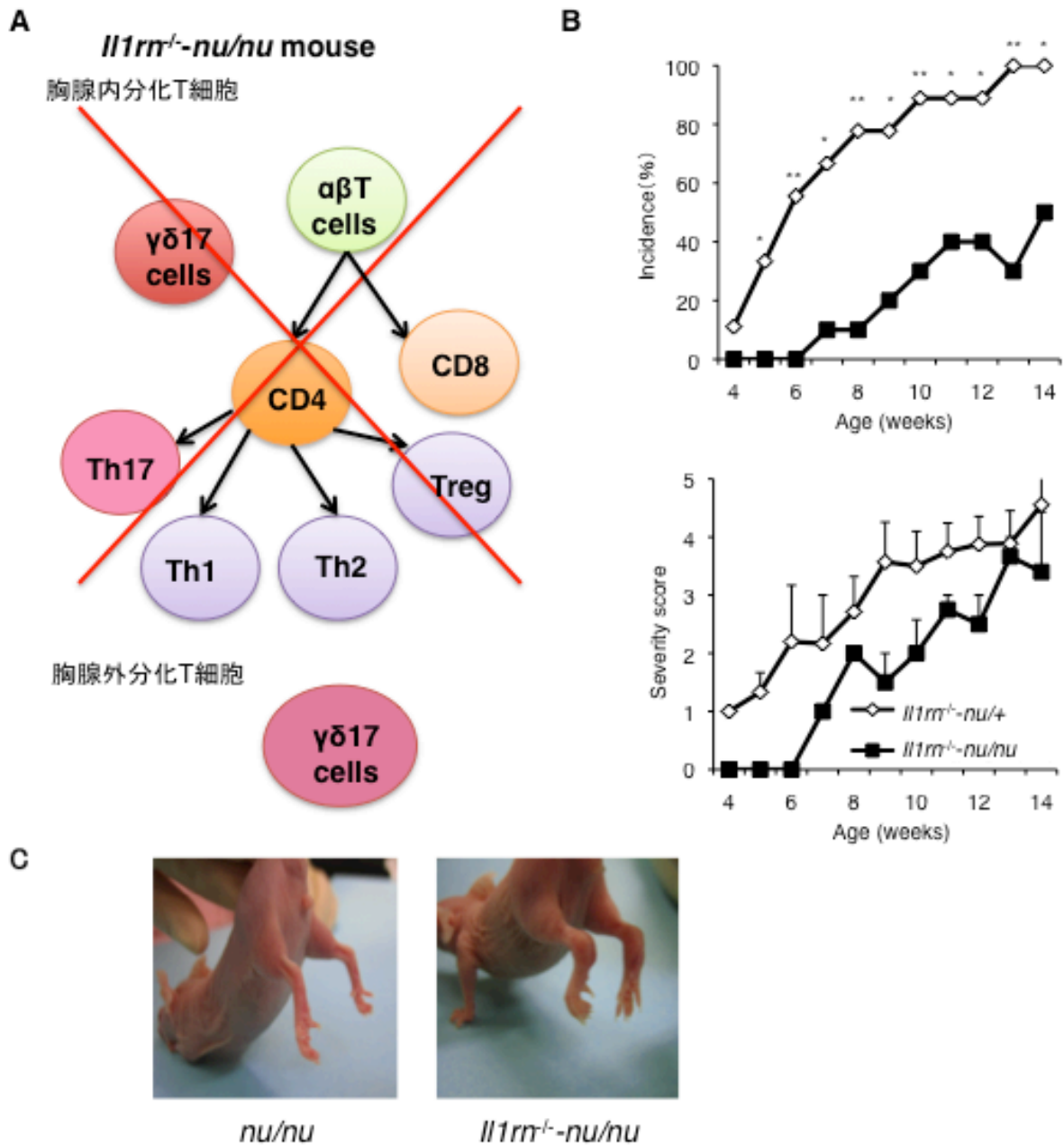


図 21 *Il1rn^{-/-}-nu/nu* マウスも関節炎を発症する

- A. *Il1rn^{-/-}-nu/nu* マウスには胸腺由来の T 細胞は存在しないが、胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が存在する。
- B. *Il1rn^{-/-}-nu/nu* マウスにおける関節炎の発症率（上）、および重症度（下）を示す。*Il1rn^{-/-}-nu/nu* (n=10)、*Il1rn^{-/-}-nu/+* (n=9) マウス。*P<0.05, **P<0.01。重症度は発症したマウスの平均±標準誤差で表示してある。
- C. 14 週齢の BALB/cA 背景の *nu/nu* マウス（左）と *Il1rn^{-/-}-nu/nu* マウス（右）の足関節。*Il1rn^{-/-}-nu/nu* マウスでは関節の腫れと発赤が観察される。

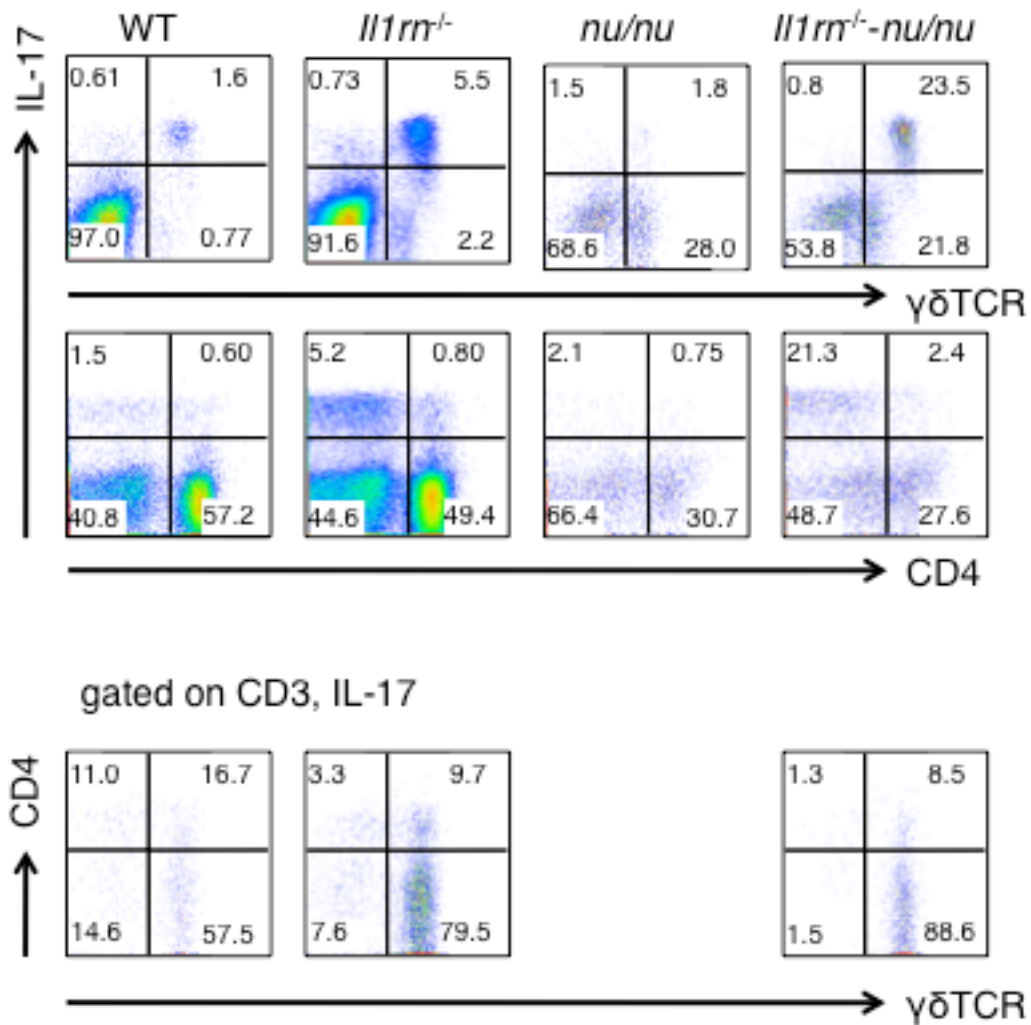


図 22 *Il1rn*^{-/-}*nu/nu* マウスでは $\gamma\delta$ 17 細胞が増加している

15~19 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}、*nu/nu*、*Il1rn*^{-/-}*nu/nu* マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーによって解析した。データは、CD3 ϵ ⁺でゲートをかかけた $\gamma\delta$ 17 細胞（上段）、CD4⁺IL-17⁺T 細胞（中段）の割合、または CD3 ϵ ⁺IL-17⁺でゲートをかかけた IL-17 産生細胞中の $\gamma\delta$ T 細胞と CD4⁺T 細胞の割合（下段）を示している。データは 3~4 匹の代表的なものを示している。

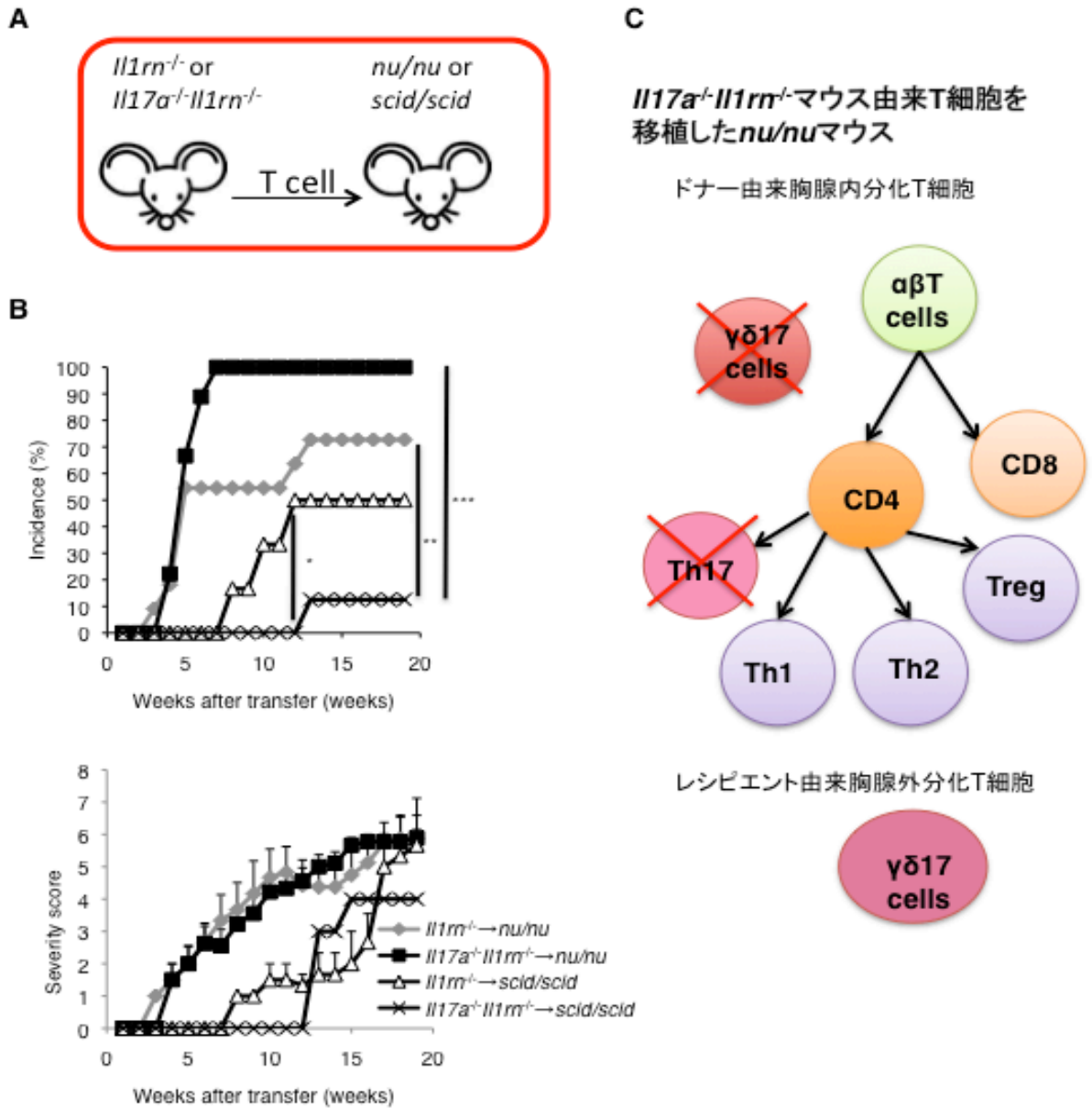


図 23 ドナー由来の IL-17 産生細胞がなくてもレシピエント由来の胸腺外分化 $\gamma\delta 17$ 細胞が存在すれば関節炎を発症する

A. *Il1rn^{-/-}*、または *Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来の T 細胞を *nu/nu*、または *scid/scid* マウスに移植した。

B. 移植後のマウスの関節炎の発症率（上）、および重症度（下）を示す。*Il1rn^{-/-}*-T 細胞移植 *nu/nu* (n=11)、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*-T 細胞移植 *nu/nu* (n=9)、*Il1rn^{-/-}*-T 細胞移植 *scid/scid* (n=6)、*Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*-T 細胞移植 *scid/scid* (n=8)。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。重症度は発症したマウスの平均±標準誤差で表示してある。

C. *Il17a^{-/-}Il1rn^{-/-}*マウス由来 T 細胞を移植した *nu/nu* マウスはドナー由来の IL-17 産生性 T 細胞は存在しないが、レシピエント由来の胸腺外分化した $\gamma\delta 17$ 細胞が存在する。

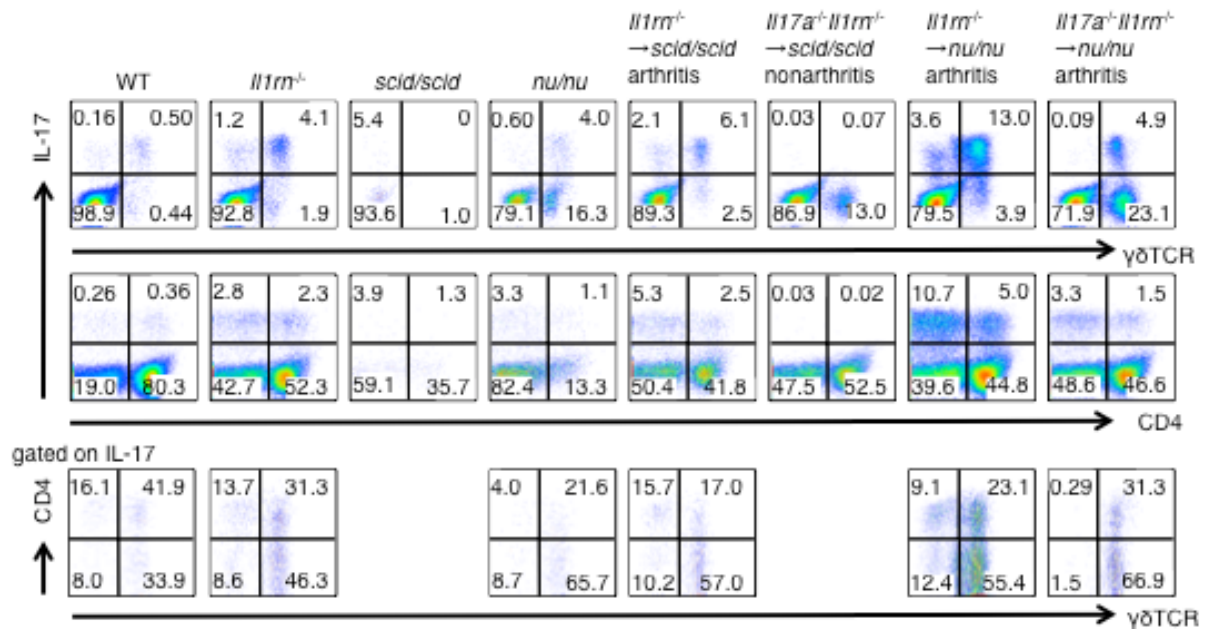


図 24 *Il17a*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}マウス由来 T 細胞を移植した *nu/nu* マウスではγδ17 細胞が増加している

23 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}、*scid/scid*、*nu/nu*、*Il1rn*^{-/-}-T 細胞移植 *scid/scid*、*Il17a*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}-T 細胞移植 *scid/scid*、*Il1rn*^{-/-}-T 細胞移植 *nu/nu*、*Il17a*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}-T 細胞移植 *nu/nu* マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーによって解析した。データは、CD3ε⁺でゲートをかけたγδ17 細胞（上段）、CD4⁺IL-17⁺T 細胞（中段）の割合、または CD3ε⁺IL-17⁺でゲートをかけた IL-17 産生細胞中のγδT 細胞と CD4⁺T 細胞の割合（下段）を示している。データは 3~4 匹の代表的なものを示している。

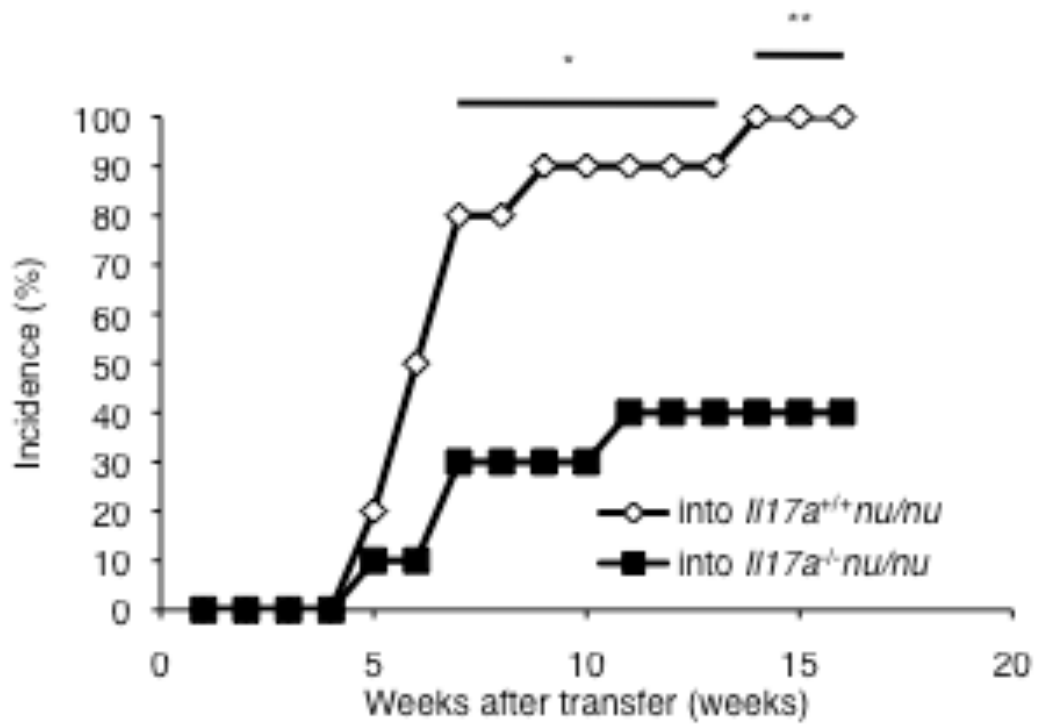


図 25 レシピエント由来の IL-17 産生細胞細胞が関節炎発症に重要である

移植後のマウスの関節炎の発症率を示す。*Il17a^{-/-} Il1rn^{-/-}*-T 細胞移植 *nu/nu* (n=10)、*Il17a^{-/-} Il1rn^{-/-}*-T 細胞移植 *Il17a^{-/-} nu/nu* (n=9) マウス。*P<0.05, **P<0.01。

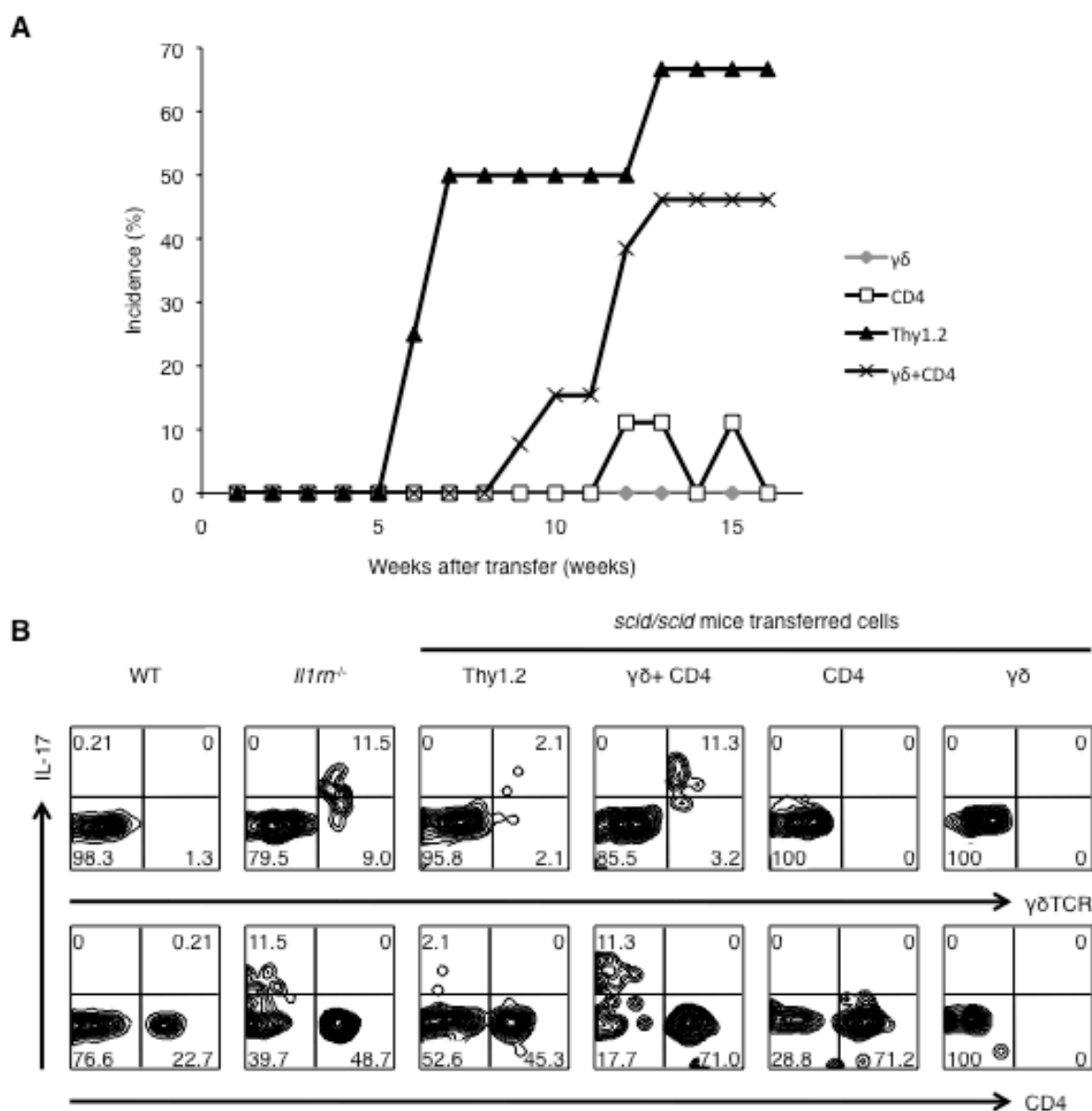


図 26 CD4⁺ T 細胞と $\gamma\delta$ 17 細胞の両方が関節炎の発症に必要である

- A. 移植後の *scid/scid* マウスの関節炎の発症率を示す。 *Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} $\gamma\delta$ T 細胞移植 (n=8)、 *Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}CD4⁺T 細胞移植 (n=9)、 *Il1rn*^{-/-}T 細胞移植 (n=8)、 *Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} $\gamma\delta$ T+*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}CD4⁺T 細胞移植 (n=13) *scid/scid* マウス。
- B. 24 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}マウス、または *Il1rn*^{-/-}T 細胞移植、*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} $\gamma\delta$ T+*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}CD4⁺T 細胞移植、*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}CD4⁺T 細胞移植、*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} $\gamma\delta$ T 細胞移植 *scid/scid* マウスの関節局所の浸潤細胞を PMA/ionomycin で刺激し、IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーによって解析した。データは、CD3 ϵ ⁺ でゲートをかけた $\gamma\delta$ 17 細胞 (上段)、Th17 細胞 (下段) の割合を示している。データは 3~4 匹の代表的なものを示している。

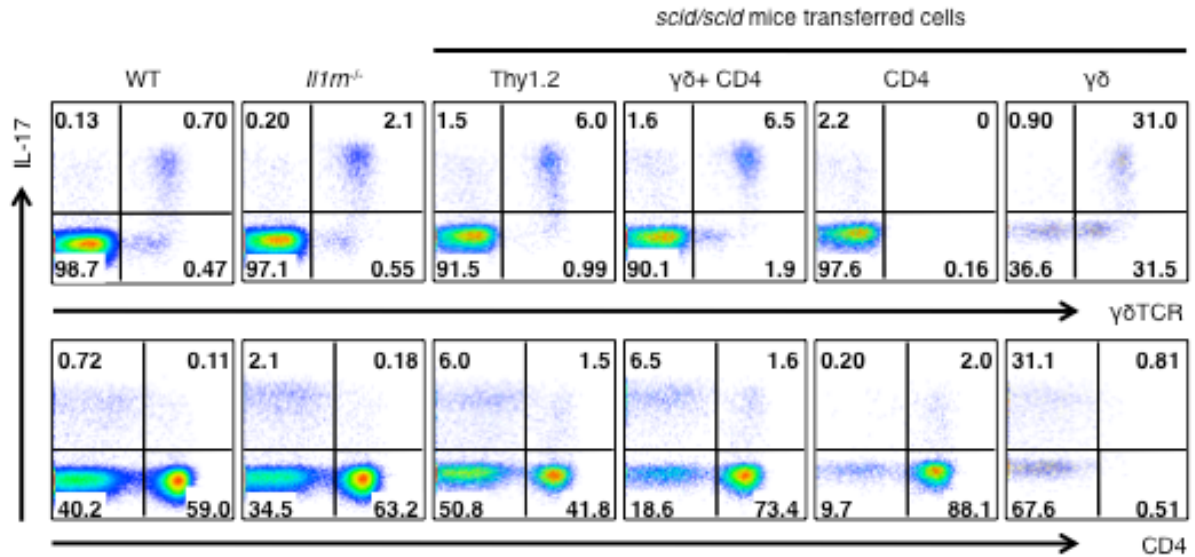


図 27 CD4⁺ T 細胞移植マウスのリンパ節では Th17 細胞が存在する

24 週齢の野生型、*Il1rn*^{-/-}マウス、または *Il1rn*^{-/-}-T 細胞移植、*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}- $\gamma\delta$ T+*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}-CD4⁺T 細胞移植、*Tcrd*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}-CD4⁺T 細胞移植、*Cd4*^{-/-}*Il1rn*^{-/-}- $\gamma\delta$ T 細胞移植 *scid/scid* マウスのリンパ節細胞を PMA/ionomycin で刺激し、IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーによって解析した。データは、CD3 ϵ ⁺でゲートをかいた $\gamma\delta$ 17 細胞（上段）、Th17 細胞（下段）の割合を示している。データは 3~4 匹の代表的なものを示している。

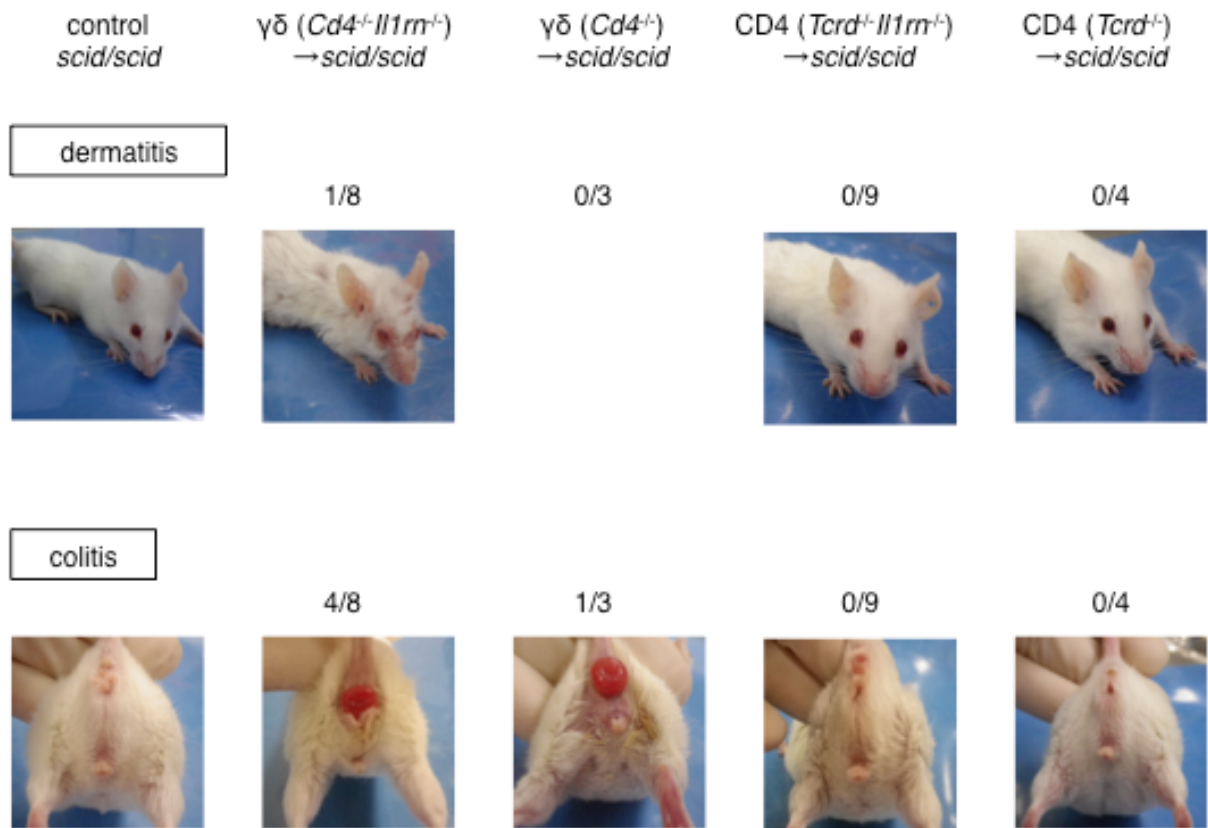


図 28 $\gamma\delta$ T 細胞の移植は全身性の炎症を引き起こす

細胞移植後の *scid/scid* マウスの皮膚炎（上段）、および大腸炎（下段）の発症率を示す。24 週齢で発症したマウスの数／移植したマウスの数を示している。

Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}、または *Cd4^{-/-}* マウス由来の $\gamma\delta$ T 細胞を移植した *scid/scid* マウスの約半数は大腸炎を発症し、*Cd4^{-/-}Il1rn^{-/-}* マウス由来の $\gamma\delta$ T 細胞を移植した *scid/scid* マウスのうち 8 匹中 1 匹は皮膚炎を発症した。

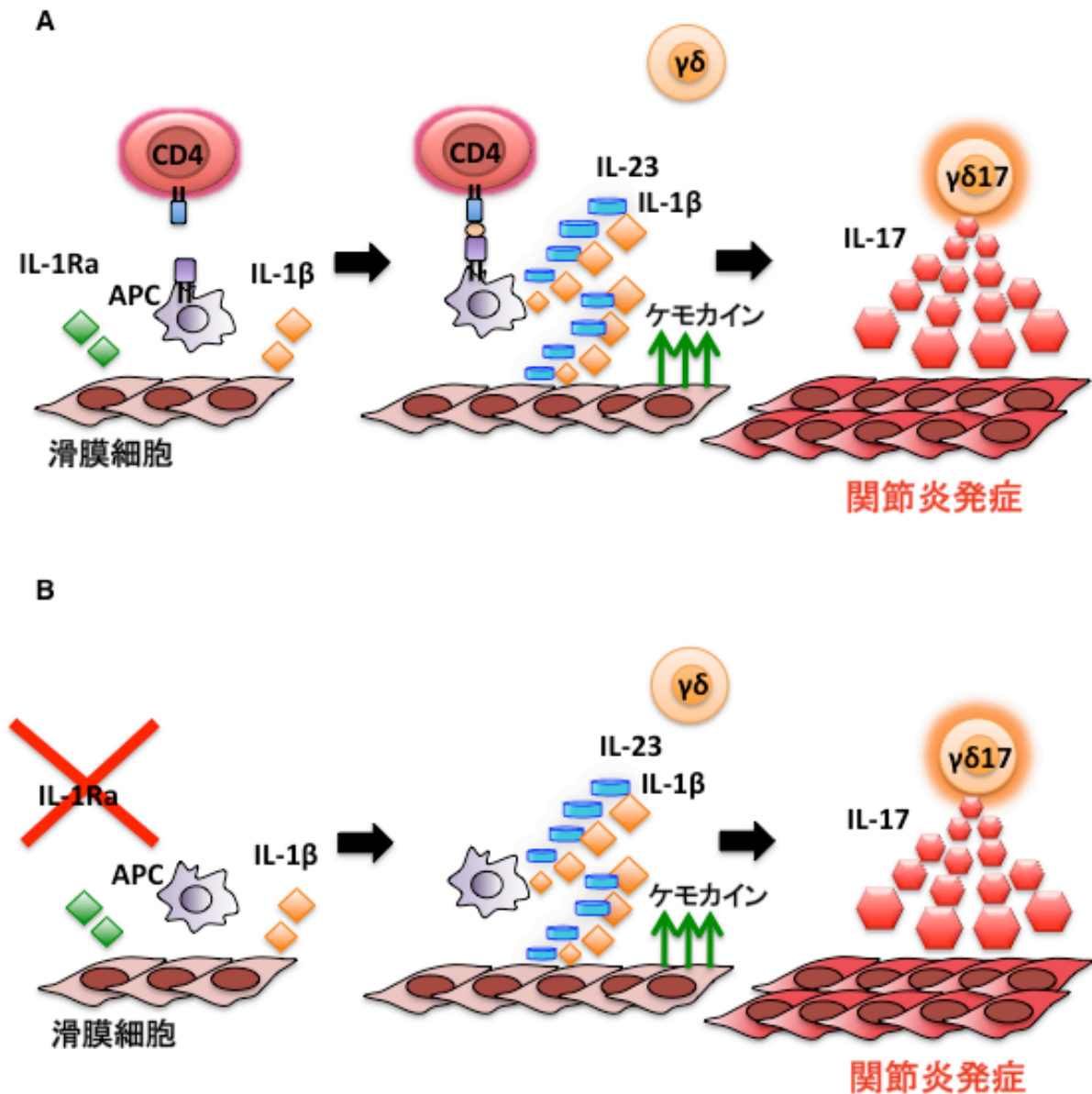


図 29 関節炎発症の新規提案モデル

- A. CD4⁺T 細胞が臓器特異性を決定し、関節局所に存在する細胞に IL1βや IL-23 といった炎症性サイトカインやケモカインを誘導し、γδ17 細胞が関節局所に浸潤することによって関節炎が発症する。
- B. 一方、IL-1Ra の欠損等により関節局所で IL-1 βが過剰に産生されていれば、CD4⁺T 細胞の関与なしにγδ17 細胞のみで関節炎を発症する可能性が示唆される。

表 1. RT-PCR Primers

Gene name	F	R
<i>Sox13</i>	CGGAACAGCAGCCACATCAAGAGA	ATGGTGTAGCTTTGGCGAGCAC
<i>Scart2</i>	GGTTGGCAGCGGGTAAGAAC	AATCGTAGACGAGCCCCTT
<i>Actb</i>	CTAGGCACCAGGGTGTGATGG	TCTCTTTGATGTCACGCACGA
<i>Gapdh</i>	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA
<i>Il17a</i>	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	GGGTCTTCATTGCCGGTGG
<i>Il1r1</i>	ACCTTCCCACAGCGGCTCCACATT	TTGTCAAGAAGCAGAGGTTTACAG
<i>Rorc</i>	AGCAGTGTAATGTGGCCTAC	GCACTTCTGCATGTAGACTG
<i>Nfkbiz</i>	CCTCCGATTTCTCCTCCACT	GTTCTTCACGCGAACACCTT
<i>Batf</i>	CCAGAAGAGCCGACAGAGAC	GAGCTGCGTTCTGTTTCTCC
<i>Rora</i>	CCCCTACTGTTTCCTTACCA	CCAGGTGGGATTTGGATATG

参考文献

1. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* **34**, 149-162 (2011).
2. Langrish, C.L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233-240 (2005).
3. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517 (2009).
4. Zhou, L. & Littman, D.R. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol* **21**, 146-152 (2009).
5. Yang, X.O. *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* **28**, 29-39 (2008).
6. Schraml, B.U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**, 405-409 (2009).
7. Okamoto, K. *et al.* IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* **464**, 1381-1385 (2010).
8. Stark, M.A. *et al.* Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**, 285-294 (2005).
9. Hamada, H. *et al.* Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* **182**, 3469-3481 (2009).
10. Michel, M.L. *et al.* Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* **204**, 995-1001 (2007).
11. Passos, S.T. *et al.* IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during

- toxoplasmosis. *J Immunol* **184**, 1776-1783 (2010).
12. Li, L. *et al.* IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* **120**, 331-342 (2010).
 13. Cua, D.J. & Tato, C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* **10**, 479-489 (2010).
 14. Carding, S.R. & Egan, P.J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **2**, 336-345 (2002).
 15. Sutton, C.E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* **31**, 331-341 (2009).
 16. Martin, B., Hirota, K., Cua, D.J., Stockinger, B. & Veldhoen, M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* **31**, 321-330 (2009).
 17. Jensen, K.D. *et al.* Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* **29**, 90-100 (2008).
 18. Ribot, J.C. *et al.* CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* **10**, 427-436 (2009).
 19. Ito, Y. *et al.* Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 2294-2303 (2009).
 20. Do, J.S., Visperas, A., Dong, C., Baldwin, W.M., 3rd & Min, B. Cutting edge: Generation of colitogenic Th17 CD4 T cells is enhanced by IL-17+

- gammadelta T cells. *J Immunol* **186**, 4546-4550 (2011).
21. Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* **12**, 255-263 (2011).
 22. Roark, C.L., Simonian, P.L., Fontenot, A.P., Born, W.K. & O'Brien, R.L. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* **20**, 353-357 (2008).
 23. Lockhart, E., Green, A.M. & Flynn, J.L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* **177**, 4662-4669 (2006).
 24. Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K. & Yoshikai, Y. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol* **178**, 4466-4472 (2007).
 25. Roark, C.L. *et al.* Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol* **179**, 5576-5583 (2007).
 26. Horai, R. *et al.* Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 313-320 (2000).
 27. Dinarello, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519-550 (2009).
 28. Kalliolias, G.D. & Liossis, S.N. The future of the IL-1 receptor antagonist anakinra: from rheumatoid arthritis to adult-onset Still's disease and systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Expert opinion on investigational drugs* **17**, 349-359 (2008).
 29. Iwakura, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**,

341-355 (2002).

30. Horai, R. *et al.* TNF- α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest* **114**, 1603-1611 (2004).
31. Nakae, S. *et al.* IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5986-5990 (2003).
32. Ishigame, H. *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucopithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* **30**, 108-119 (2009).
33. Horai, R. *et al.* Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 α/β , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 β is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* **187**, 1463-1475 (1998).
34. Itohara, S. *et al.* T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell* **72**, 337-348 (1993).
35. Duan, J., Chung, H., Troy, E. & Kasper, D.L. Microbial colonization drives expansion of IL-1 receptor 1-expressing and IL-17-producing gamma/delta T cells. *Cell Host Microbe* **7**, 140-150 (2010).
36. Ivanov, II *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133 (2006).
37. Powolny-Budnicka, I. *et al.* RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in gammadelta T cells. *Immunity* **34**, 364-374 (2011).

38. Cho, M.L. *et al.* STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* **176**, 5652-5661 (2006).
39. Melichar, H.J. *et al.* Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13. *Science* **315**, 230-233 (2007).
40. Kisielow, J., Kopf, M. & Karjalainen, K. SCART scavenger receptors identify a novel subset of adult gammadelta T cells. *J Immunol* **181**, 1710-1716 (2008).
41. Bandeira, A. *et al.* Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor gamma delta. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 43-47 (1991).
42. Doisne, J.M. *et al.* Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *J Immunol* **186**, 662-666 (2011).
43. Makino, S., Harada, M., Kishimoto, Y. & Hayashi, Y. Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background. *Jikken dobutsu* **35**, 495-498 (1986).
44. Bommireddy, R. *et al.* Elimination of both CD4+ and CD8+ T cells but not B cells eliminates inflammation and prolongs the survival of TGFbeta1-deficient mice. *Cellular immunology* **232**, 96-104 (2004).
45. Petermann, F. *et al.* gammadelta T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism. *Immunity* **33**, 351-363 (2010).
46. Liu, F.L. *et al.* Interleukin (IL)-23 p19 expression induced by IL-1beta in human fibroblast-like synoviocytes with rheumatoid arthritis via active nuclear factor-kappaB and AP-1 dependent pathway. *Rheumatology*

(Oxford, England) **46**, 1266-1273 (2007).

47. Atsumi, T. *et al.* A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med* **196**, 979-990 (2002).
48. Murakami, M. *et al.* Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J Exp Med* **208**, 103-114 (2011).
49. Ogura, H. *et al.* Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* **29**, 628-636 (2008).
50. Sawa, S. *et al.* Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *J Exp Med* **203**, 1459-1470 (2006).
51. Lochner, M. *et al.* In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med* **205**, 1381-1393 (2008).
52. Shibata, K. *et al.* Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing gammadelta T cells. *Blood* **118**, 586-593 (2011).
53. Reboldi, A. *et al.* C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* **10**, 514-523 (2009).
54. El-behi, M., Rostami, A. & Ciric, B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* **5**, 189-197 (2010).
55. Aksentijevich, I. *et al.* An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med* **360**, 2426-2437 (2009).

56. Reddy, S. *et al.* An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N Engl J Med* **360**, 2438-2444 (2009).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター分子病態研究分野 岩倉洋一郎博士に深く感謝申し上げます。

実験を行うにあたり、ご指導、ご助言を賜りました現・Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine の石亀晴道博士、現・千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分野の西城忍博士、現・信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験部門の角田茂博士に厚く御礼申し上げます。

Tcrd^{-/-}マウス、および抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体産生ハイブリドーマを提供して下さいました九州大学生体防御医学研究所附属感染防御研究センター感染制御学の吉開泰信博士、*Cd4*^{-/-}マウスを供与していただきました理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫細胞移植戦略研究ユニットの藤井眞一郎博士に感謝致します。

実験を行うにあたり、ご協力、ご助言を頂きました Chung Soohyon 博士、池田聡史氏、清水謙次氏に心から感謝致します。

有意義な議論、特に数多くのマウスの世話にご協力頂きましたチームメンバーの日下智聖博士、村山正承氏をはじめ、東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター分子病態研究分野の皆様にご感謝申し上げます。

実験動物施設の運用にご尽力頂いた方々に感謝致します。

本研究の過程で犠牲となった数多くのマウス達へ哀悼の意を捧げます。

精神的援助、経済的援助をしていただいた母に感謝致します。