

学位論文

過剰な IL-1 シグナルによる Th17 細胞分化機構の解析

(The mechanism of Th17 cell development induced
by excess IL-1 signaling)

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

池田 聡史

要旨

IL-1 レセプターアンタゴニスト欠損 (*Il1rn*^{-/-})マウスは関節炎を自然発症し、その関節炎の発症には IL-17 が重要な働きをしている。Th17 細胞分化は TGF- β と IL-6 に依存する事が多くの報告から示されているが、本研究では *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎は IL-6 欠損によって全く影響を受けない事を発見した。また、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスでは Th17 細胞が通常通り分化していた。IL-6 非依存的 Th17 細胞分化機構を明らかとする為に、naïve CD4⁺T 細胞を *Il6*^{-/-}マウスから精製し TCR 刺激、TGF- β 、IL-1 \pm IL-21 で刺激した。その結果、naïve T 細胞は TGF- β +IL-1+IL-21 で培養した方が TGF+IL-21 で培養した時よりも効率的に Th17 細胞に分化した。しかし、TGF- β と IL-1 では Th17 細胞は分化しなかった。さらに一度 Th17 細胞分化誘導した細胞に対して、IL-1 は TGF- β とともに Th17 細胞を維持した。興味深い事に IL-1 は、TGF- β によって誘導される Foxp3 の発現を抑制して Th17 細胞分化を亢進させていた。そして、これは増殖や IL-6 や IL-21 非依存的であった。さらに、IL-1 は *Nfkbiz* や *Batf* といった Th17 細胞転写因子の発現を増強した。これらの結果は IL-1 が IL-6 非依存的 Th17 細胞分化に重要な役割を果たしている事を示している。

Abstract

IL-1 receptor antagonist-deficient (*Il1rn^{-/-}*) mice spontaneously develop autoimmune arthritis and that IL-17 is crucial for the onset of the disease. Although many studies have shown that the Th17 cell differentiation is dependent on TGF- β and IL-6, we found that IL-6 deficiency does not affect the development of arthritis in *Il1rn^{-/-}* mice at all. *In vivo*, Th17 cells developed normally in *Il1rn^{-/-}Il6^{-/-}* mice. To elucidate the mechanisms of IL-6 independent Th17 cell differentiation, we purified naïve CD4⁺ T cells from *Il6^{-/-}* mice and cultured with TCR stimulation, TGF- β , IL-1 and/or IL-21. We found that naïve CD4⁺ cells efficiently differentiated into Th17 cells when cultured with TGF- β , IL-21 and IL-1 than the combination of TGF- β and IL-21, however, these cells did not differentiate with TGF- β and IL-1. In addition, IL-1 maintained Th17 lineage synergistically with TGF- β . Interestingly, we found that IL-1 inhibited TGF- β -induced Foxp3 expression to promote Th17 cell differentiation in a proliferation, IL-6 and IL-21 independent manner. Furthermore, IL-1 augments Th17 transcription factors expression such as *Nfkbiz* and *Batf*. These results indicate that IL-1 plays an important role in the Th17 cell differentiation in an IL-6 independent manner.

目次

1-1	要旨	2-3
1-2	背景と目的	5-8
1-3	材料と方法	9-17
1-4	結果	18-27
1-5	考察	28-37
1-6	結論	38
	略語	39-41
	参考文献	42-51
1-7	図	52-76
	謝辞	

【背景と目的】

関節リウマチは自己免疫疾患の一つで全身性慢性炎症性疾患であり、関節の腫れを主徴とする難病である。遺伝的要因、環境要因、感染などが発症の原因と考えられている(McInnes and Schett, 2007)。しかし、発症機構は完全には明らかとなっていない。多くの炎症性サイトカイン、ケモカイン、成長因子が発症した関節局所で発現しており、複雑なサイトカインネットワークを形成している。その為、サイトカインネットワークの崩壊が関節リウマチの発症に影響を与えると広く考えられている(McInnes and Schett, 2007)。IL-6 は関節リウマチ発症に重要な炎症性サイトカインの一つだと考えられており、IL-6 欠損マウスはコラーゲン誘導関節炎 (CIA)、HTLV-1 transgenic (Tg) マウス関節炎、SKG マウス関節炎など多くの関節炎に耐性となる(Figure 0-1a)(Ishihara et al., 2004; Iwakura et al., 2008)。実際、IL-6R に対する抗体は関節リウマチの臨床薬として利用されている(Figure 0-1b) (Jones et al., 2010; Nishimoto et al., 2009)。

IL-1 の関節リウマチ発症における重要性も同様にマウスモデルで示されており：IL-1 レセプターアンタゴニスト欠損マウス(*Il1rn*^{-/-} mouse)は IL-1 の内在性阻害因子 IL-1Ra の欠損マウスで、関節炎を自然発症する(Horai et al., 2000)(Figure 0-2a b)。また、IL-1 の欠損は CIA、HTLV-1 Tg マウス、SKG マウス、K/BxN マウスの関節炎を抑制する (Figure 0-1a) (Iwakura et al., 2008)。実際ヒトでも、IL-1 のシグナルを抑制する IL-1Ra は関節炎に対する臨床薬として利用されている(Cohen et al., 2002; Furst, 2004)。しかし、IL-1 や IL-6 の関節炎発症における役割は完全には明らかにされていない。

Th17 細胞は IL-17 を産生する新しい CD4⁺ヘルパーT細胞サブセットである(Korn et al., 2009)(Figure 0-3)。Th17 細胞は CIA や EAE (experimental autoimmune

encephalomyelitis)といったマウス自己免疫疾患モデルで重要な役割をしており、ヒトの関節リウマチや多発性硬化症でも同様に重要な役割を果たすと考えられる(Iwakura et al., 2011)。現在 IL-17 に対する抗体が臨床試験中であり、関節炎治療効果があると報告されている(Genovese et al., 2010; Hueber et al., 2010)。Th17 細胞は naïve T 細胞から TGF- β 、IL-6 または IL-21 で誘導される(Figure 0-3)(Zhou et al., 2007)。TGF- β は Foxp3 と Th17 細胞分化のマスターレギュレーターである retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)- γ t を誘導し(Ichihama et al., 2008; Zhou et al., 2008)、IL-6・IL-21・IL-23 は STAT3 を活性化する(Figure 0-4)。STAT3 は IL-17 プロモーターに ROR γ t と共に結合して直接 IL-17 の発現を活性化し、さらに ROR γ t の発現や IRF-4 の発現も活性化して間接的に IL-17 発現を促進する(Hirahara et al., 2010)。STAT3 は *Nfkbiz*、*Hif1a*、*Ahr* といった Th17 細胞特異的転写因子の発現を上昇させる(Figure 0-4) (Dang et al., 2011; Kimura et al., 2008; Okamoto et al., 2010)。STAT3 欠損 CD4⁺T 細胞は、IL-21 や IL-23R の発現が殆どなく Th17 細胞分化が起こらないことから STAT3 は Th17 細胞分化に必須であると考えられている(Durant et al., 2010; Zhou and Littman, 2009)。また、IL-23 は Th17 細胞の成長・生存・エフェクター機能の獲得に必要であり、IL-17A、IL-17F、IL-22 の発現を亢進させる。

IL-1 β は IL-17 産生細胞の分化、生存、増殖を促す。IL-1 は下流で PI3K、NF- κ B、PKC θ といったシグナル伝達因子を介して T 細胞からの IL-17 産生を促進し(Korn et al., 2009; Sutton et al., 2006; Yang et al., 2008a)、IL-6 と協調的に IRF-4 発現を亢進させる(Chung et al., 2009)。また、IL-1 は IL-2 による Th17 細胞分化抑制を解除する(Kryczek et al., 2007)。IL-6 は IL-1R1 を誘導し、SIGIRR は IL-1R のネガティブレギュレーターとして mTOR リン酸化抑制を介して Th17 細胞増殖を抑制する

(Gulen et al., 2010)。しかし、IL-1 による Th17 細胞分化の詳細については明らかになっていない。

Foxp3 は制御性 T(Treg)細胞分化のマスターレギュレーターであり、IRF-4 や Blimp-1 などの転写因子を介して IL-10、CTLA-4、ICOS、GITR といった Treg 特異的遺伝子の発現を制御している(Cretney et al., 2011; de Lafaille and Lafaille, 2009)。誘導性制御性 Foxp3⁺T (Induced Foxp3⁺ Treg:iTreg) 細胞は、慢性的な炎症状態で受ける抗原提示や腸管で受ける刺激により分化する(de Lafaille and Lafaille, 2009)。TCR シグナル、IL-2、TGF-βなどが Foxp3 の発現と Treg 分化を正に制御している。Th17 細胞分化条件下で、TGF-βは Foxp3 と RORγt を誘導するが、TGF-βにより誘導された Foxp3 は RORγt に結合して RORγt の機能を抑制して Th17 細胞分化を抑制する。IL-6、IL-21、IL-23 はこの Foxp3 による RORγt の抑制を解除して Th17 細胞分化を促進すると考えられている(Ahern et al., 2010; Ichiyama et al., 2008; Zhou et al., 2008)(Figure 0-5)。そのため、炎症性の Th17 細胞分化と抑制的な Treg 細胞分化は相互排他的であると考えられている(Bettelli et al., 2006)(Figure 0-2 and Figure 0-3)。このコンセプトに沿うと、Foxp3 の発現低下が RORγt の発現を促進し IL-17 産生を亢進させると考えられる。

本研究では *Il1rn*^{-/-} マウスの関節炎における IL-6 の役割を明らかとする為に、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-} マウスを作成した。興味深い事に、IL-6 の欠損は関節炎の発症に殆ど影響を与えなかった。そして、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-} マウスでも *Il1rn*^{-/-} マウスと同様に Th17 細胞が分化していた。そこで、IL-1 の過剰シグナルが IL-6 非依存的に Th17 細胞を分化/増殖させると仮説を立て、IL-1 による IL-6 非依存的 Th17 細胞分化機構の解明を行った。その結果、IL-1 は IL-6 非依存的に Th17 細胞を増殖させる事が明らかとなった。続く解析から過剰な IL-1 シグナルが TGF-βによって誘導される Foxp3 の発現

を抑制し、Th17 細胞分化における IL-6 欠損を代償する事が示唆された。これらの発見から Th17 細胞分化における IL-1 の新たな機能が明らかとなった。

【材料と方法】

●マウス

Il1rn^{-/-} (*Il1rn*^{tm1Yiw})、*Il1ab*^{-/-} (*Il1a*^{tm1Yiw}/*Il1b*^{tm1Yiw}) マウスは当研究室で樹立された(Horai et al., 1998; Horai et al., 2000)。*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-} マウスは *Il1rn*^{-/-} マウスと *Il6*^{-/-} (*Il6*^{tm1Kopf}: M. Kopf 博士より分与された)(Kopf et al., 1994)マウスを交配させる事により樹立した。*Il1r1*^{-/-}は Immunex Corporation より入手した(Glaccum et al., 1997)。*Rag2*^{-/-}マウスは坂口志文博士より分与して頂いた(Shinkai et al., 1992)。これらのマウスは 8 世代以上 BALB/cA (日本クレア株式会社、東京)マウスに戻し交配を行った。*Il1rn*^{-/-}マウスと *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-} マウスの関節炎発症率や重症度の観察はリッターメイトを用いた。*MyD88*^{-/-} (*MyD88*^{tm1Aki})マウスは審良静男博士より分与して頂き、8 世代以上 C57BL/6J マウスに戻し交配した(Adachi et al., 1998)。週齢、雌雄、遺伝的背景が適合したマウスを実験に使用し、野生型 C57BL/6J (Nihon SLC; Shizuoka, Japan) または BALB/cA (CLEA Japan, Inc.)をコントロールとして用いた。全ての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の SPF (specific pathogen-free conditions)環境下で飼育し、すべての実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従って行い、遺伝子欠損マウスの使用に関しては遺伝子組換え生物等の第二種拡散防止措置に従って使用した。

●試薬と培地

10% FBS RPMI1640:

50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin、50 mM 2-mercaptoethanol (GIBCO; invitrogen 社)、10% FBS (w/v)を含む RPMI1640 (nakarai tesque; Kyoto, Japan)

を 10% FBS RPMI1640 として使用した。FBS は T 細胞増殖と Th17 細胞分化誘導能を指標にロットチェックを行い、適したロットを使用した。

Hemolysis Buffer: 1.4 M NH_4Cl を 0.45 μm フィルターに通して滅菌。170 mM Tris-HCl (pH7.2) をオートクレーブで滅菌。終濃度 17mM Tris-HCl (pH7.2) ・ 140 mM NH_4Cl になる様に無菌的に混合し、Hemolysis Buffer とした。

MACS Buffer:アイソフロー(ベックマン・コールター株式会社) 1 L に対して、5 g の牛血清アルブミン (インビトロジェン社) を溶かしてから 0.45 μm フィルターを通して滅菌した物を MACS Buffer として使用した。

FACS Buffer: HBSS (Hanks' Balanced Salt Solutions) (Nissui, Tokyo)に 2% FBS、0.1% NaN_3 (Nakarai tesque, Tokyo)を加えたものを FACS Buffer として使用した。

● anti-CD3 のプレートへの固相化

anti-CD3(clone 145-2C11; 抗体精製は研究室で行った)の固相化は、PBS で希釈した抗体を 48 well/ Flat Bottom (Asahi glass)に加え、37°C、4 時間の条件で行った。細胞播種前に、PBS で 2 回洗浄した。

● anti-IL-4、anti-IFN- γ 抗体の調整

anti-IL-4抗体産生ハイブリドーマ(clone 11B11)と anti-IFN- γ 産生ハイブリドーマ(clone R4-6A2)は、当研究室に保管されていたものを使用した。11B11はCeLLLine フラスコシステム (BD Biosciences) を用いて増殖させ、モノクローナル抗体を回収した。

1 ~ 2 週間前に Freund's Incomplete Adjuvant (PIERCE Biotechnology 社) を 0.5 ml 腹腔内に投与しておいた BALB/cA-*nu/nu* マウスに、R4-6A2 を 1×10^6 cells/

mouse ずつ移植し、1~2 週間後に腹水を回収した。回収した腹水は、1 時間 37°C で暖めた後に、4 °C で一晚静置して赤血球を凝固させた。翌日、2000rpm で遠心し、上清を回収した。次に、Cleanascite (BIOTECH SUPPORT GROUP 社) を用いて脂質を除去し、0.45 µm フィルターを通して滅菌した。

11B11、R4-6A2 とともに、HiTrap Protein G カラム (GE Healthcare) を用いて精製し、Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO Dialysis Cassette (PIERCE; Thermo Fisher Scientific 社) を用いて PBS と置換した物を BCA Protein Assay Reagent (PIERCE; Thermo Fisher Scientific 社) を用いてタンパク質の定量を行ってから使用した。

●CD4⁺細胞の分離方法

野生型または *Il6*^{-/-}マウスのリンパ節を摘出し 10% FBS RPMI1640 を入れた φ 3.5 cm イージーグリップ細胞培養ディッシュ (FALCON; BECTON DICKINSON) に置いた (on ice)。その後、シリンジのプランジャーを用いてリンパ節を潰し、細胞懸濁液を 108 µm メッシュに通した。細胞を 1300 rpm で遠心後に上清を捨て、MACS Buffer を加えてから遠心する事により細胞を洗浄した。細胞を MACS Buffer に懸濁し、Micro beads 標識抗マウス CD4 抗体 (Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch, German) を加えて 15 分 氷上静置してビーズを細胞に結合させた。その後、取扱説明書に従い Auto MACS possel program (Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch, German) により CD4⁺細胞を精製した。精製した CD4⁺細胞は 5×10^5 cells、500 µl/48well の濃度で 4 µg/ml anti-CD3 抗体 (clone 145-2C11) を固相化した 48well/ Flat Bottom (ASAHI GLASS; Tokyo, Japan) に播種し、anti-CD28 抗体 (1 µg/ml) (clone 37.51; Biolegend; San Jose, CA, USA) 、10 µg/ml anti-IFN-γ (clone R4-6A2)、10 µg/ml anti-IL-4 (clone 11B11) を加えた X-VIVOTM 20 (Lonza; Basel, Switzerland) を用いて 37°C/5% CO₂ 雰囲気下で 5 日間培養した。さらに、必要に応じて 10 ng/ml rmIL-1α (PeproTech; Rocky Hill, NJ, USA)、10 ng/ml rmIL-1β (PeproTech) を使用した。

●naïve T 細胞の分離とヘルパーT 細胞分化誘導方法

Naive CD4⁺ T 細胞は、セルソーターを用いて精製した。野生型 BALB/cA、BALB/cA 背景の *Il1rn*^{-/-}、*Il6*^{-/-}、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}、*Il1ab*^{-/-}、C57BL/6J 背景の *MyD88*^{+/-}、*MyD88*^{-/-} マウスからリンパ節/脾臓細胞懸濁液を回収した。1300 rpm で遠心して上清を除去した後に、赤血球を含む細胞懸濁液は Hemolysis Buffer (1~2 ml)を加えて懸濁し室温 5 分間することで溶血処理を施した。溶血処理後、10% FBS RPMI1640 で細胞を洗浄し、さらに MACS Buffer で細胞を洗浄した。ビオチン標識した anti-mouse B220、anti-mouse CD8α、anti-mouse CD11b、anti-mouse DX5、anti-mouse Ter119 抗体(BD Biosciences; San Jose, CA, USA)、PE-Cy7 標識 anti-mouse CD4 (Biolegend)、Pacific BlueTM-標識 anti-mouse CD62L (Biolegend)、PE 標識 anti-mouse CD25 抗体(eBioscience, San Diego, CA, USA)を加えて 4°C 20 分間静置して標識した。細胞を MACS Buffer で洗浄後、Micro beads 標識 anti-Biotin 抗体で 4°C 15 分間静置して標識した。細胞を洗浄し、AutoMACS (Miltenyi Biotec GmbH)の deplete program により negative selection した。回収したネガティブフラクションから FACS Aria(BD bioscience)により CD4⁺CD62L⁺CD25⁻分画をソートし、これを naïve T 細胞とした。FACS Aria によるソーティング は、東京大学医科学研究所 FACS コアラボラトリーで行った。

精製した naïve T 細胞は X-VIVOTM 20 (Lonza)で培養した。naïve CD4⁺ T 細胞は 4 μg/ml anti-CD3 (clone 145-2C11)、1 μg/ml anti-CD28 (clone 37.51; Biolegend) を固相化した 96 well Flat Bottom(FALCON; BECTON DICKINSON 社)を用いて 2x10⁵ cells、250 μl/well で培養した。さらに 10 μg/ml anti-IFN-γ (clone R4-6A2)、10 μg/ml anti-IL-4 (clone 11B11)、必要に応じて 3 ng/ml CHO cell derived rhTGF-β1 (PeproTech), 40 ng/ml rmIL-6 (PeproTech)、10 ng/ml rmIL-1α (PeproTech)、10 ng/ml rmIL-1β (PeproTech)、100 ng/ml

rmIL-21 (PeproTech)、10 ng/ml rmIL-23(R&D systems)、50 ng/ml Rapamycin (LC Laboratories 社)を加えて培養した。リコンビナント IL-21R Subunit/Fc Chimera は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)より購入した。再刺激培養の際は、5日置きに生細胞を回収し、新たな培地、サイトカイン、抗体で刺激した。

●CFSE ラベルによる細胞分裂回数の追跡

細胞分裂を測定する為に、T細胞 (1×10^6 to 1×10^7 cells/ml) を 5 μ M CFSE (5- and 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; invitrogen; Carlsbad , CA, USA) / PBS を加えて6分間37度でラベルした。等量の血清を加えて洗浄した後、さらに培地で洗浄した。洗浄後 8×10^5 細胞/ml の濃度に調整し、必要な刺激をした。細胞増殖は FACS CantoII™ (BD Biosciences) を用いて測定し、データは FlowJo software (TreeStar; Ashland, OR, USA)を用いて解析した。

●フローサイトメトリー解析

細胞内サイトカインを調べる為に回収した細胞は、50 ng/ml PMA (Sigma)、500 ng/ml ionomycin (Sigma)、2 μ M monensin (Sigma)、37度 5% CO₂ 存在下で5時間培養した。細胞を回収後、anti-Fc γ RII/III receptor mAb (2.4G2) を適量加えて4℃、10分間静置する事で抗体の非特異的結合を阻害した。次に、細胞表面分子に対する抗体を用いて細胞を染色した。また同時に、死細胞を除去する為に 2 μ g/ml 7AAD (Sigma) で死細胞を染色した。FACS Buffer で洗浄後、4% paraformaldehyde 200 μ l を用いて20分間室温で細胞を固定し、固定後に permeabilization buffer (0.1% saponin containing FACS solution)で2度洗浄した。洗浄後、抗サイトカイン抗体を用いて40分間/4℃で染色した。2回 FACS Buffer で洗浄後に、70 μ m メッシュを通してから FACSCalibur™又は

FACSCantII を用いて解析した。細胞表面は以下の抗体を用いて染色した；APC-標識 anti-CD4 (BD Bioscience)、PE-Cy7-標識 anti-CD4 (Biolegend)、FITC-標識 anti-CD8a (eBioscience)、APC-Cy7-標識 anti-B220 (Biolegend)、FITC-標識 anti-TCR β (Biolegend)、PE-標識 anti-IL-1R1 (Biolegend)。細胞内染色に以下の抗体を用いた：FITC or PE or Pacific Blue-標識 anti-IFN- γ (Biolegend)、FITC or APC or Pacific Blue-標識 anti-IL-17 (Biolegend)、APC or PE-標識 anti-Foxp3 (BD Biosciences)、APC-標識 ROR γ (t) (eBioscience)。Foxp3 発現解析には、Foxp3 staining Kit (eBioscience)を取り扱い説明書に従い使用した。リン酸化 STAT3 の解析には BD phosflow Technology を取扱説明書に従い使用し、Pacific Blue-標識 STAT3 (pY705) 抗体 (BD bioscience 社)を用いた。

●粘膜固有層細胞の精製

マウスから小腸または大腸を回収し、シリンジなどを用いて PBS で腸内容物を押し出して洗浄した。その後、脂肪組織やパイエル盤をハサミで取り除いた。腸管を縦にハサミで割き、1.5 cm 程度の長さに分割し軽く PBS で洗浄した。次に 5 mM EDTA/10% FCS RPMI 20 ml の入った 50 ml チューブに組織を入れ、スターラーを用いて 20 分間 37°C (インキュベーター内で)攪拌した。攪拌子は 1~2 cm 程度の物を用いた。一度上澄みを捨て、再度 5 mM EDTA/10% FCS RPMI 20 ml を加えて攪拌して上皮細胞を除去した。次に茶こしに通して粘膜固有層だけを回収した。そして EDTA を除去する為に、大量の PBS で洗浄した。回収した粘膜固有層をハサミでみじん切りにし、新しい 50 ml チューブに移し、10% FCS/2 mg/ml Collagenase/ 5 ml RPMI を加えて 20 分間、37°C、スターラーで攪拌した。1 分程度静置して上澄みを回収し、残りをさらに Collagenase 処理した。Collagenase 処理した組織の上澄みを 200 μ m メッシュに通して 15 ml チューブに回収し、通過した細胞懸濁液を 1300 rpm、5 分間遠

心し上精を除去した。そこに 45%パーコール (GE healthcare 社) (1:9 で 10xPBS とパーコールを混ぜ、さらに等量の 10% FBS RPMI1640 を加えたもの) を加えて、2200 rpm、20 分、rt で遠心した。沈殿した細胞を 10% FBS RPMI1640 で 2 回洗浄し、赤血球が混入していた場合は溶血処理を行った。回収した細胞を小腸粘膜固有層リンパ球 (小腸 lamina proprial lymphocytes; LPL) とし、細胞内サイトカイン染色をする為に PMA/ionomycin で刺激した。

● CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻細胞移植誘導大腸炎

野生型 BALB/c マウス又は BALB/c 背景の *Il1r1*^{-/-}マウス、*Il17a*^{-/-}マウスのリンパ節と脾臓を摘出し、前述の naïve T 細胞を精製する要領で CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻細胞を FACS Aria によりソートした。ソートした細胞を遠心し 2 度 PBS で洗浄した後に、 2×10^6 cells/ml PBS の濃度に調整した。この細胞を 200 μ l ずつ (4×10^5 cells/mouse) *Rag2*^{-/-} (BALB/c 背景) に腹腔内投与により移植した。移植当日から一週間おきにマウスの体重を計測した。

● マクロファージコンディショニングメディウム (MCM) の作成

4% (w/v) で調整したチオグリコレート (Nissui; Tokyo, Japan) をオートクレーブで滅菌し、冷暗所で保管した。マウスに 2 ml の 4% チオグリコレートを腹腔内投与し、三日後に 0.5 % EDTA 含有 PBS で腹腔内を洗浄しながら腹腔内細胞を回収した。腹腔内細胞を 10 % FBS RPMI1640 で洗浄し、none treated 10 ϕ プレート (Asahi glass, Tokyo, Japana) に 5×10^6 cells/ml の濃度で播種し、37°C、5% CO₂ 雰囲気下で 4 時間培養した。培養後、浮遊細胞を捨て、さらに 3 回 PBS で洗浄した後にセルスクレーパー (Asahi glass) で接着細胞を剥がしとった。この接着細胞をチオグリコレート誘導マクロファ

ージとして使用した。続いて 5×10^5 cells/ml の濃度で 10% FBS RPMI1640 に懸濁し、24 well-plate (Asahi glass) に 1 ml ずつ播種した。同時に、LPS 5 μ g/ml、Zymosan 50 μ g/ml で刺激し 2 日間培養した。2 日後に培養上清を回収し、これを MCM として T 細胞分化誘導実験に使用した。LPS (*Escherichia coli* O55:B5) と Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) は SIGMA (St Louis, MO, USA) から購入した。

●Real-Time RT-PCR

全量 RNA は、GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) を取扱説明書に従い用いて回収した。RNA は the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Inc.; CA, USA) を用いて逆転写した。定量的 real-time RT PCRs は SYBER® Premix Ex Taq™ (TaKaRa; Shiga, Japan)、iCycler™ System (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) と以下の配列特異的なプライマーを用いて行った。プロトコルは、

50°C 3:00 → 95°C 2:00 → (95°C 0:15 → 60°C 1:00) × 44 → 70°C から 89.2°C まで 0.5°C ごとに吸光度を測った。

プライマーのシークエンスは:

Gapdh 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

Foxp3 5'-AGAAGCTGGGAGCTATGCAG-3' 5'-TACTGGTGGCTACGATGCAG-3';

Il17a 5'-CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC-3' 5'-GGGTCTTCATTGCGGTGG-3'

Rorc 5'-AGCAGTGTAATGTGGCCTAC-3' 5'-GCACTTCTGCATGTAGACTG-3'

Il1r1 5'-ACCTTCCCACAGCGGCTCCACATT-3'

5'-TTGTCAAGAAGCAGAGGTTTACAG-3'

Gata3 5'-CTTATCAAGCCCAAGCGAAG-3' 5'-CATTAGCGTTCCTCCTCCAG-3'

Tbx21 5'-GGTGTCTGGGAAGCTGAGAG-3' 5'-CCACATCCACAAACATCCTG-3'

Ii21 5'-GCCAGATCGCCTCCTGATTA-3' 5'-CATGCTCACAGTGCCCCTTT-3'

Ii22 5'-TGACGACCAGAACATCCAGA-3' 5'-AGCTTCTTCTCGCTCAGACG-3'

Batf 5'-CCAGAAGAGCCGACAGAGAC-3' 5'-GAGCTGCGTTCTGTTTCTCC-3'

Nfkbiz 5'-CCTCCGATTTCTCCTCCACT-3' 5'-GTTCTTCACGCGAACACCTT-3'

●関節炎発症の観察と統計処理

関節炎の発症率は1週間毎に観察し、関節炎を発症しているものの割合を示した。有意差検定は、 χ^2 二乗検定法を用いて行った。

関節炎発症マウスの関節炎は四肢毎に4段階の基準で目視的に評価した。評価の基準は以下の通りである。

0;正常、1;軽い関節の腫れ・甲の発赤、2;明らかな関節の腫脹、3;激しい腫脹・関節の硬化

有意差検定は、t-検定法を用いて行った。 $P < 0.05$

【結果】

● IL-6 の欠損は *Il1rn*^{-/-}マウスにおける関節炎の発症と Th17 細胞分化に影響を与えなかった。

私たちの研究室では、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症が IL-17 に依存する事や、関節局所で IL-1 β 、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの発現が亢進している事を報告してきた(Horai et al., 2004; Nakae et al., 2003)。そこで *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症における IL-6 の役割を明らかとする為に、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスを作成した。その結果、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスは *Il1rn*^{-/-}マウスと同様に関節炎を発症した(Figure 1a)。この結果は、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症に IL-6 は必要ない事を示している。

末梢リンパ節のリンパ球数、B220⁺細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞は *Il1rn*^{-/-}マウスと *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスで野生型に比べて増加していた(Figure 2)。*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスにおける Th17 細胞分化を検討する為に、これらのマウスの所属リンパ節における CD4⁺細胞からのサイトカイン産生を解析した。その結果、Th17 細胞数は *Il1rn*^{-/-}マウスと *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスで大きな差は見られなかった(Figure 1b、3)。これらの結果は、*Il1rn*^{-/-}マウスにおける Th17 細胞分化に対して IL-6 は重要でない事を示している。

● 過剰な IL-1 シグナルは IL-6 非依存的な Th17 細胞分化を誘導する。

Il1rn^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスで Th17 細胞の数が増加していた事から、過剰な IL-1 シグナルが IL-6 非依存的な Th17 細胞分化を亢進させているという仮説を考えた。この仮説を検証する為に、野生型マウスと *Il6*^{-/-}マウスのリンパ節から CD4⁺細胞を精製して *in vitro* で Th17 細胞分化に対する IL-1 の効果を調べた。その結果 *Il6*^{-/-}マウス由来の CD4⁺細胞も、野生型と同様に IL-1 刺激により IL-6 非依存的に CD4⁺IL-17⁺細胞を増加した(Figure 4) (Kryczek et al., 2007)。

IL-6 の機能の代わりに、IL-21 と TGF- β で Th17 細胞分化を誘導出来る事が報告されていた。そこで、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスの IL-6 非依存的 Th17 細胞分化に IL-21 が関係しているか検証した。野生型、*Il1rn*^{-/-}、*Il6*^{-/-}、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスの脾臓とリンパ節における IL-21 mRNA の発現をリアルタイム PCR により比較した。その結果、*Il1rn*^{-/-}マウスや *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスの脾臓及びリンパ節細胞では、野生型や *Il6*^{-/-}マウスに比べて *Il21* の発現が亢進している事が明らかとなった (Figure 5)。これらの結果は、過剰な IL-1 シグナルが IL-21 の発現を誘導している事を示している。

IL-1 と IL-21 の Th17 細胞分化における役割を明らかにする為に、メモリーやエフェクター T 細胞を含まない naïve CD4⁺ T 細胞(CD4⁺CD62L^{hi}CD25⁻細胞)をセルソーターで精製し *in vitro* で Th17 細胞分化誘導を行った。興味深い事に CD4⁺細胞と異なり、naïve T 細胞からは IL-1 単独/TGF- β 単独/IL-1+TGF- β で Th17 細胞を誘導する事は出来なかった。一方、TGF- β +IL-6 または TGF- β +IL-21 は Th17 細胞を誘導し、IL-1 はそれらの Th17 細胞分化を亢進させた (Figure 6a、c、Figure 7)。また IL-1 は IL-17 の発現を強く誘導するだけでなく、Th17 細胞から産生される IL-22 の発現も誘導したが、IL-21 の発現には殆ど影響を与えなかった (Figure 6c)。

IL-1 は naïve CD4⁺ T 細胞から Th17 細胞を分化誘導出来ない事から、次に naïve CD4⁺ T 細胞を各種サイトカインで刺激した後の IL-1R1 の発現をリアルタイム PCR と FACS により調べた。その結果 naïve T 細胞には IL-1R1 は発現しておらず、IL-1R1 は IL-6 や IL-21 によって発現してくる事が明らかとなった (Figure 6b、c、Figure 8)。意外な事に、Th17 細胞分化条件下で IL-1 を作用させても IL-1R1 の発現は亢進しなかった。これらの結果は、IL-6 や IL-21 が naïve T 細胞に IL-1R の発現を誘導し、IL-1 は Th17 細胞に分化しつつある細胞に作用して Th17 細胞分化を亢進させる事を示唆している。

この数年、Th17 細胞は可塑性を持ち *in vitro* で培養したり他の個体に移植したりすると細胞特性が変化する事が示されてきた。ある一定の条件では、Th17 細胞は IFN- γ のような Th1 サイトカインを産生するようになる。そして TGF- β が IL-17A や IL-17F の発現維持に必要な事が報告されている(Lee et al., 2009)。IL-1 が Th17 細胞分化誘導時に IL-17 の発現を誘導するのに重要な事が示唆されているが、Th17 細胞の維持における役割については良く明らかにされていない(Chung et al., 2009)。そこで、次に Th17 細胞の維持について IL-1 の効果を検討した。naïve T 細胞を Th17 細胞分化条件下 (TGF- β +IL-21) で 5 日間培養し、細胞をさらに各種サイトカイン条件下で 5 日 (2nd round) または 10 日 (3rd round) 培養した。報告通り(Lee et al., 2009)、TGF- β は Th17 細胞の維持に必要で、TGF- β なしで IL-1 だけだと細胞からの IL-17 産生を維持する事が出来なかった (Figure 9)。しかし、IL-1 は TGF- β と協調的に Th17 細胞を維持し明らかに IL-17 産生を長持ちさせた。これらの IL-17 発現の亢進や Th17 細胞の生存は exogenous な IL-21 非依存的であった。これらの結果は、IL-1 が IL-17 の発現を活性化する事と TGF- β と協調的に Th17 細胞の生存維持をする事を示唆している。

● IL-1 は Th17 細胞特異的遺伝子の発現を促進させる。

次に、IL-1 が Th17 細胞分化を促進するメカニズムを解析する為に、TGF- β +IL-21 で naïve T 細胞から分化誘導させた Th17 細胞に対して IL-1 で刺激し、サイトカインと転写因子の発現変動を調べた。naïve T 細胞には IL-1 は作用しないため、一度 Th17 細胞分化条件下で刺激した後に IL-1 で再刺激した。また、IL-6 非依存的 Th17 細胞分化を解析する事と内因性の IL-6 の影響を避けるため、IL-6 欠損マウス由来 T 細胞を用いた。その結果、IL-1 は IL-17A と IL-22 の mRNA の発現を誘導した(Figure 10a)。

しかし、IL-1 は IL-21 の発現を亢進させる事は無かった。また、IL-1 は *Nfkbiz* や *Batf* とった Th17 細胞特異的な転写因子の発現を促進させたが、*Rorc* や *Foxp3* の発現は促進しなかった。むしろ、IL-1 は *Foxp3* の発現を抑制した(Figure 10b)。

●IL-1 は *Foxp3* の発現を抑制する。

IL-1 が *Foxp3* の発現を抑制した事から、次に Th17 細胞分化条件下での各 Th サブセット特異的転写因子発現に対する IL-1 の影響を調べることにした。T 細胞サブセット分化は、特定の転写因子が担っている。そこで *Tbx21*、*Gata3*、*Rorc*、*Foxp3* といった Th1、Th2、Th17、Treg 細胞の機能を司る転写因子の mRNA を 2nd round の 2 日目に解析した。Figure 9 と一致して、*Il17a* の発現は TGF- β と IL-1 で維持された。*Tbx21*、*Gata3*、*Rorc* の発現は IL-1 によって影響を受けなかった。興味深い事に、IL-1 によって *Foxp3* の発現が強く抑制された(Figure 10c)。この IL-1 による *Foxp3* の発現抑制は、FACS 解析でも同様の結果が得られた事からタンパク質レベルでも *Foxp3* が減少している事が確認された(Figure 10d)。

この *Foxp3* の発現抑制が IL-1 によるものであることを確認する為に、次に IL-1 シグナル伝達因子 MyD88 の関与を検討した。FACS により精製した *MyD88*^{+/+}と *MyD88*^{-/-}マウス由来 naïve T 細胞を Th17 細胞分化誘導条件下(TGF- β +IL-21)で 4 日間培養し、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、TGF- β ±IL-1 で 2 日間再刺激して FACS で *Foxp3* の発現を解析した。その結果、*MyD88* 欠損マウス由来 T 細胞では IL-1 による *Foxp3* の発現抑制が見られなかった(Figure 10e)。これは、IL-1 が *MyD88* を介して *Foxp3* を抑制している事を示している。また予想通り Th17 細胞分化誘導条件下では、IL-1R1 は IL-17⁺細胞だけでなく *Foxp3*⁺細胞にも発現していた(Figure 11)。これらの結果は、IL-1 が *Foxp3* の発現を抑制する事により Th17 細胞分化を亢進させる事を示唆している。

IL-1 は T 細胞増殖を亢進させる事から(Sims and Smith, 2010)、IL-1 は Foxp3⁺細胞増殖を促進させ、その結果 Foxp3⁺細胞の割合を減少させている可能性がある。そこで、Foxp3 発現抑制の細胞増殖依存性を解析した。naïve T 細胞を CFSE で標識し、iTreg 細胞分化条件または Th17 細胞分化条件下で 96 時間培養し、各細胞分裂回数での Foxp3 の発現を解析した。その結果、IL-1 により Foxp3 の発現が抑制され、PE-標識 Foxp3 抗体の平均蛍光強度 (MFI) は明らかに TGF-β/IL-1/IL-21 の方が TGF-β/IL-21 で刺激された T 細胞よりも低かった (Figure 12a, b)。さらに、Foxp3⁺細胞の割合は TGF-βで培養したものより TGF-β+IL-21、TGF-β+IL-1+IL-21、TGF-β+IL-6 で培養した物の方が明らかに少なかった。特筆すべき事に、IL-1 で刺激した細胞は細胞分裂回数 0 回でも未刺激の物に比べて Foxp3⁺細胞の割合が減少していた(Figure 12c)。この事は IL-1 が細胞増殖非依存的に Foxp3 の発現を抑制している事を示唆している。よって IL-1 による Foxp3 の抑制作用は細胞分裂非依存的であり、IL-1 が選択的に Foxp3⁻細胞を増殖させている可能性を排除された。

●IL-1 による Foxp3 発現抑制は IL-6、IL-21 非依存的である。

IL-6 や IL-21 は STAT3 を活性化し、Foxp3 の発現を抑制する(Huehn et al., 2009; Wei et al., 2007)。そこで、IL-1 による Foxp3 の発現抑制が IL-6 や IL-21 の誘導を介した間接的な影響であるかを検証した。IL-6 の影響を排除する為に、IL-6 欠損マウス由来の naïve T 細胞を用いて Th17 細胞分化誘導実験を行ったところ、IL-1 により IL-17 発現が亢進して Foxp3 の発現が抑制された(Figure 13a)。この結果は、IL-1 の作用が IL-6 を介していない事を示している。さらに TGF-β+IL-21 で培養した *Il6*^{-/-} naïve T 細胞に対して、二次刺激時に IL-21R-Fc を用いて T 細胞が産生する IL-21 を中和した。その結果、IL-1 による Foxp3 発現抑制は IL-21 の中和では完全には阻害する事が出来な

った(Figure 13b)。一方、IL-21 の中和により IL-1 非依存的に Foxp3 の発現が回復した事から、autocrine 的に IL-21 が Foxp3 を抑制する作用は見られた。これと対応して IL-1 は高濃度の IL-21R-Fc (20 $\mu\text{g/ml}$)存在下でも Foxp3 の発現を濃度依存的に抑制した(Figure 13c)。また、IL-21R-Fc で IL-21 を中和した際の STAT3(pY705)のリン酸化をフローサイトメトリーで調べた。その結果、二次培養を培地のみや IL-1 を加えた条件では STAT3 のリン酸化が見られた。しかし、IL-21R-Fc で IL-21 を中和するとほぼ完全に STAT3 のリン酸化を抑制された。IL-21R-Fc で IL-21 を中和した条件でも IL-1 は Foxp3 の発現を抑制する事から、IL-1 は STAT3 非依存的経路により Foxp3 を抑制している事が示唆された(Figure 13d)。これらの結果は、IL-1 が Foxp3 の発現を IL-6 や IL-21 非依存的に抑制する事を示している。

● 自己分泌 IL-1 ファミリーによる Foxp3 発現抑制への影響の検討

T 細胞は IL-6、IL-1Ra、IL-1 を産生するという報告があった為、T 細胞自身が産生する IL-6 や IL-1 が Foxp3 を抑制するのか検討した(Horai et al., 2004; Li and He, 2006; Van Kooten et al., 1991)。*Il6*^{-/-}マウス、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウス、*Il1ab*^{-/-}マウス由来の naïve CD4⁺T 細胞を Th17 細胞分化条件下(TGF- β +IL-21)で 4 日間培養し、anti-CD3/anti-CD28/IL-1 で 2 日間再刺激してからフローサイトメトリーによって Foxp3 の発現を解析した。Foxp3 の発現レベルは、*Il6*^{-/-}、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}、*Il1ab*^{-/-}細胞で変わらず、TGF- β により Foxp3 は誘導され IL-1 により TGF- β の発現が抑制された。IL-1 による Foxp3 の抑制も差が無かった (Figure 13e)。さらに、これまで知られている IL-6 や IL-21 が Foxp3 を抑制する現象は、内在性の IL-1 の発現誘導を介しているかどうか検討した。野生型と *Il1ab*^{-/-}マウス由来 naïve T 細胞を Th17 細胞分化条件下で培養し、その時の IL-17 産生細胞と Foxp3⁺細胞の分化を FACS により解析した。その結果、

Il1ab^{-/-}マウス由来 naïve T 細胞も野生型の T 細胞と同様に IL-6 や IL-21 によって Foxp3 の発現が抑制された (Figure 14)。これらの結果は、T 細胞から産生される IL-6、IL-1、IL-1Ra は Th17 細胞分化条件下での IL-1 による Foxp3 発現抑制に殆ど影響しない事を示している。

●IL-1 により誘導される Th17 転写因子と自己分泌 IL-21 の関係性

IL-1 は IL-6・IL-21 非依存的に Foxp3 の発現を抑制する事が明らかとなったが、IL-1 によって誘導される他の転写因子やサイトカインの発現が自己分泌 IL-21 の発現を介しているか不明であった。そこで、IL-1 によって誘導されるサイトカイン/転写因子と IL-21 の関係性を明らかにする為に、IL-21 を阻害した条件で IL-1 の作用を解析した。*Il6*^{-/-} naïve T 細胞を TCR 刺激と TGF- β /IL-21 で刺激し、さらに 2nd round で IL-1 や IL-21R-Fc を加えて 24 時間培養した。2nd round 後に細胞を回収し、Real time PCR で各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。その結果、*Rorc* や *Il21* といった IL-1 によって殆ど発現の変動が無かった遺伝子は、IL-21 を中和すると発現が減少した (Figure 15)。この事は、これらの遺伝子が自己分泌 IL-21 でその発現が保たれている事を示唆している。また、*Foxp3*、*Batf*、*Il17*、*Il22* といった IL-1 によって発現量が変動する遺伝子も IL-21 の中和で *Foxp3* は発現が増加し、他の遺伝子は発現が減少した。これらの遺伝子は、IL-1 と IL-21 の両方で発現が制御されていると考えられる。また *Nfkbiz* は殆ど IL-21 の中和の影響は受けずに、IL-1 に依存して発現量が増加した。この事は、*Nfkbiz* の発現は主に IL-1 によって制御されている事を示唆する。また、IL-21 を中和した条件でも IL-1R1 の発現はあまり変動が無い事から、IL-21 を中和した時でも IL-1 のシグナルは入力されていると考えられる。これは IL-21 のシグナルは Th17 細胞分化初期には IL-1R1 の発現誘導に重要だが、一度分化した細胞の IL-1R1 発現維持には

必要がない事を示唆している。以上の結果から、IL-1 と IL-21 は下流で一部異なる遺伝子の発現を制御する事で独自の機能を発現する事が示唆された。

●腸管における IL-1Ra と Th17 細胞分化

腸管には多くの共生細菌が存在し Th17 細胞が恒常的に誘導されている。Th17 細胞は IL-6 欠損マウスの小腸粘膜固有層では殆ど見られないことから、IL-6 は Th17 細胞分化に必須のサイトカインであると考えられてきた(Ivanov et al., 2006)。また、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症には共生細菌が必須である事が報告されていた(Abdollahi-Roodsaz et al., 2008)。その為、*Il1rn*^{-/-}マウス、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスの小腸粘膜固有層では野生型と比べて Th17 細胞分化が亢進している事が考えられた。野生型、*Il1rn*^{-/-}マウス、*Il6*^{-/-}マウス、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスの粘膜固有層リンパ球を回収し、Treg、Th1、Th17 細胞の割合を解析した。その結果、野生型に比べて *Il6*^{-/-}マウスでは Th17 細胞の割合が減少している事が確認された(Figure 16)。しかしこれまでの報告とは異なり、Th17 細胞の割合は野生型と比較して半分程度の減少であった。また *Il1rn*^{-/-}欠損による Th17 細胞の割合には変化が見られなかったが、Treg 細胞が *Il1rn*^{-/-}マウスでは Treg 細胞が増加している傾向が見られた。これらの結果は、IL-6 は腸管での Th17 細胞分化に重要な役割をしている事、IL-1Ra は腸管での Th17 細胞分化には殆ど影響を与えない事を示唆している。

●*in vivo* における IL-1 シグナルと Th17 細胞と iTreg 分化

In vivo で IL-1 の Th17 細胞分化と iTreg 細胞分化への役割を明らかにする為に、*Il1r1*^{-/-} CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻細胞を *Rag2*^{-/-}マウスに移植する実験を行った。

CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻細胞は naïve T 細胞であり、*Rag2*^{-/-}マウスに移植する事により分

化してきた Foxp3⁺細胞は iTreg 細胞であると考えられる(Ahern et al., 2010)。実験の結果、野生型に比べコントロールの *Il17a*^{-/-}マウス由来 CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻細胞と *Il1r1*^{-/-} CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻細胞を移植したマウスは、有意に体重減少が抑制された(Figure 17a)。また *Il1r1*^{-/-}マウスは有意に大腸の長さが長かった(Figure 17b)。さらに、腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph nodes) や大腸粘膜固有層において Th1、Th17、Treg の割合を解析したところ、Th1 や Treg に有意な差は見られなかった。しかし、Th17 細胞の割合は有意に減少していた (Figure 17c)。この事は、IL-17 依存的大腸炎の発症と Th17 細胞分化に於いて、T 細胞に対する IL-1 シグナルが重要な役割を果たしている事を示唆している。

● 過剰な IL-1 シグナルのマクロファージへの影響と、その下流の IL-6 非依存的 Th17 細胞増殖への影響を調べる事にした。チオグリコレート誘導マクロファージを LPS と zymosan で刺激した培養上清をマクロファージコンディションドメディウム (MCM)とし、*Il6*^{-/-}MCM が CD4⁺細胞を Th17 細胞に分化させる事が出来るか検討した。LPS (TLR4 リガンド) は *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症率を上げる事が報告されており (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008)、zymosan も Th17 細胞を誘導する分子として報告があった(LeibundGut-Landmann et al., 2007; Veldhoen et al., 2006)。*Il6*^{-/-}マウス由来 CD4⁺細胞を抗 CD3、CD28、IL-4、IFN- γ 抗体、MCM 存在下で培養し、Th17 細胞への分化を FACS により解析した。その結果、*Il6*^{-/-}マウス由来 MCM も LPL 刺激や zymosan 刺激すれば Th17 細胞を増やす事が出来る事が明らかとなった。さらに、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウス由来 MCM の方が *Il6*^{-/-}マウス由来 MCM より効果的に Th17 細胞を誘導する事が出来た(Figure 18a)。この結果は、過剰な IL-1 シグナルが入る条件では IL-6 非依存的 Th17 細胞分化が亢進する事を示唆している。さらに、naïve T 細胞を TGF- β と *Il6*^{-/-}マウス

由来 MCM で培養する事で、naïve T 細胞からの Th17 細胞分化誘導を試みた。その結果、野生型と比べて効率は落ちる物の、*Il6*^{-/-}マウス由来 MCM でも Th17 細胞が分化した(Figure 18b)。また、Th17 細胞が分化と同時に Foxp3⁺細胞の分化が抑制されていた。これらのデータは、マクロファージから産生される未知の液性因子が Th17 細胞を増殖させるだけでなく、Th17 細胞を IL-6 非依存的に分化させる能力を有する事を示唆している。

【考察】

HTLV-1 Tg マウスや SKG マウス、CIA モデルといった関節リウマチモデルの関節炎発症は IL-6 依存的である。一方、human TNF- α Tg マウスやコラーゲン抗体誘導関節炎(CAIA)といった T 細胞非依存的関節リウマチモデルの関節炎は IL-6 非依存的である(Iwakura et al., 2008)。IL-6 依存的関節リウマチモデルは IL-17 にも依存して関節炎を発症することから、IL-6 は *in vivo* でも *in vitro* でも Th17 細胞の分化に必要であると考えられた。*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症は IL-17 と T 細胞に依存しているにも関わらず、興味深い事に *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスは *Il1rn*^{-/-}マウスと同様の発症率と重症度の関節炎を発症した (Horai et al., 2004; Nakajima et al., 2010)。そこで、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスにおける Th17 細胞分化を解析した。その結果、IL-6 非存在下でも *Il1rn*^{-/-}マウスでは Th17 細胞が分化する事を明らかとした。これは、過剰な IL-1 シグナルが Th17 細胞分化条件下で Foxp3 を抑制する事によって TGF- β と協調して Th17 細胞分化を誘導することによる。さらに、IL-1 は Th17 細胞特異的な転写因子を誘導し Th17 細胞の生存を TGF- β と協調的に助けている。これらの結果は、過剰な IL-1 シグナルは Th17 細胞分化時の IL-6 欠損を代償する事が出来る事を示している。

1; IL-1R の発現と IL-21

重要な事に、IL-1R1 が naïve T 細胞上には発現していない為に IL-1 は naïve T 細胞の Foxp3 を抑制する事が出来ない。本研究では、TGF- β +IL-21 または IL-6 が IL-1R1 の発現を naïve T 細胞上に誘導する事が出来る事を示した。さらに、IL-21 の発現は *Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ球で増大していた。その上、*Il1rn*^{-/-}マウスでは IL-1Ra 欠損による過剰な IL-1 シグナルは IL-21 を産生するように T 細胞を活性化し、IL-21 が IL-1R1 を naïve T 細胞に発現させる。IL-6 が STAT3 の活性化を介して IL-1R1 の発現を誘導

する事は報告されている(Chung et al., 2009)。IL-21 による IL-1R1 の発現誘導メカニズムは報告されていないものの、IL-21 は TGF- β と協調する事により STAT3 活性化を介して IL-1R1 を誘導すると推察される。リンパ節における IL-21 産生細胞は、IL-21 の mRNA の解析から CD4⁺細胞が中心である事は明らかとした(data not shown)。しかし、FACS による IL-21 産生細胞の染色が出来なかった為に、具体的に CD4⁺細胞のサブセット、CD4⁺細胞以外の産生細胞の有無などは同定する事は出来なかった。現在、IL-21 は主に NKT 細胞や CD4⁺Tfh 細胞、CD4⁺Th17 細胞などから産生される事が知られている(Monteleone et al., 2008)。これまで CD4⁺細胞からの IL-21 産生は IL-6 の下流で IL-21 産生細胞が誘導される事が報告されていたが、最近 IL-12 によっても IL-21 産生細胞が誘導される事が報告された(Nakayamada et al., 2011; Schmitt et al., 2009)。さらに、自然免疫細胞である好中球も IL-21 を産生する事も明らかとなってきた(Puga et al., 2012)。また IL-21 は自己免疫疾患の発症に重要な役割を担っている(Bubier et al., 2009; Spolski and Leonard, 2010)。IL-1 の過剰シグナルと IL-21 産生量の増加の因果関係を明らかとする事は今後の課題である。

また、Th17 細胞分化に相関して IL-1R1 の発現が上昇するにも関わらず(Figure 6)、Th17 細胞分化条件下で IL-1 刺激をすると IL-17 の発現はあがっても IL-1R1 の発現の上昇は見られなかった。先述の様に、STAT3 依存的に IL-1R1 が誘導される事が報告されている。このため、IL-1R1 の発現は単純に Th17 細胞と相関していないと考えられる。つまり IL-1 の下流で発現誘導される *Nfkbiz* や *Batf* といった転写因子は IL-1R1 の発現には影響を与えないと考えられる。IL-1R1 の発現制御メカニズムは、他の細胞でも殆ど明らかになっていないので今後の課題である。

2; Foxp3 の抑制と Th17 細胞分化

IL-6は下流でSTAT3活性化を誘導し、TGF- β と協調してTh17細胞分化を誘導する。STAT3はIL-17などTh17細胞特異的な遺伝子を活性化し、ROR γ tやROR α の機能を阻害する事によりTh17細胞分化を抑制するFoxp3の発現を弱める(Yang et al., 2008b)。IL-21もIL-6の代わりにTGF- β と協調的にTh17細胞分化を誘導する事が出来る(Korn et al., 2007)。本研究では、IL-1もTh17細胞分化を誘導する事を示した。しかし、IL-1の機能はIL-6やIL-21とは異なる。IL-1はSTAT3をリン酸化しなかったが、効果的にFoxp3の発現を抑制した。IL-1はIL-21やIL-6と協調的にFoxp3を抑制したが、IL-6欠損マウスのT細胞やIL-21R-Fcを用いた実験でもこの抑制が見られた事から、このFoxp3抑制はIL-6やIL-21非依存的であった。ただIL-1の作用がIL-21非依存的であるという事を証明するには、IL-21R-FcがIL-21特異的に中和しているのかどうかの検討が必要であった。その為には、同様の実験をIL-21欠損マウスで行ってもIL-1の作用が見られる事、さらにその時にIL-21R-Fcの影響が見られない事がIL-21R-Fcの特異性を証明するのに必要であると考えている。また、Fcタンパク質をコントロールとして用いる事が実験を組み立てる上で重要であった。

IL-6やIL-21によるFoxp3の抑制はIL-1 α/β 欠損マウスでも起こることから、IL-6やIL-21とIL-1によるFoxp3の抑制は別のメカニズムによる事が示唆された。さらに、このFoxp3の抑制はFoxp3⁺細胞の増殖による結果でない事も示した。これらの所見はIL-1がFoxp3の抑制活性を持っている事を示唆している。さらにIL-1が直接Foxp3⁺細胞のFoxp3を抑制する事を示すには、Foxp3-EGFPレポーターマウスを用いてFoxp3⁺細胞だけを精製し、IL-1がFoxp3を抑制する事を明らかにすれば、モデルがより強固になると考えられる。

これに対し、IL-2 の Th17 細胞分化抑制能を IL-1 は阻害する事が出来るという報告が有る(Huehn et al., 2009)。IL-2 は Th17 細胞の分化を抑制するだけでなく、STAT5 の活性化を介して Foxp3 の発現を誘導することが知られている(Huehn et al., 2009)。これらを総合すると、IL-1 が IL-2 のシグナルを抑制する事によって Foxp3 の発現を抑制する可能性が考えられる。また、IL-1 は Akt-mTOR 経路 (mTOR 経路は Foxp3 の発現を抑制する) を活性化する(Delgoffe et al., 2011)。さらに、IL-1 は TGF- β 2 の発現や Smad2 リン酸化を抑制したり Smad7 の発現を誘導する事により TGF- β シグナルを抑制したりする事も報告が有る(Bauge et al., 2007; Ishida et al., 2006)。これらのシグナル経路、または転写因子レベルで IL-1 の下流シグナルが Foxp3 の発現を抑制していると考えられる。実際 Rapamycin によって mTOR を阻害すると、Foxp3 の MFI が IL-1 により減少がしなくなった (Figure 19)。しかし、Foxp3⁺細胞の割合は IL-1 によって有為に減少する事から IL-1 の下流の mTOR 経路の Foxp3 発現における役割は部分的なものであると考えられる。さらに IL-1 のシグナルが Foxp3 の発現を抑制するメカニズムとして、Foxp3 発現制御領域のヒストンメチル化などにも影響を与えている事が予想される(Huehn et al., 2009)。IL-1 の下流シグナルがどのように Foxp3 の発現を抑制しているのかは今後の課題である。

本研究では IL-1 が *Nfkbiz* や *Batf* といった Th17 特異的転写因子を活性化し、*Il17a* や *Il22* の発現を亢進させる事も示した。これらの発現誘導は、IL-6 や IL-21 を介していなかった。最近の報告で、IL-1 が Th17 細胞分化に重要な役割を果たしている事が報告されている(Chung et al., 2009; Guo et al., 2009)。本研究では、IL-1 が TGF- β と協調的に Th17 細胞の維持する事が出来る事も示した。TGF- β は Th17 細胞の維持に重要である事が報告されていたが(Lee et al., 2009)、IL-1 によりより多くの Th17 細胞を維持する事が出来た。本研究と一致して、Striteski *et al.*は IL-1 が IL-23 と共に Th17 細胞

の維持に働くと報告している(Stritesky et al., 2008)。これらの結果は、IL-1 が Foxp3 を抑制するだけでなく、Th17 細胞特異的な転写因子の発現や Th17 細胞の生存を維持する事を示している。実際、IL-1R1 欠損 naïve T 細胞を *Rag2*^{-/-}マウスに移植したところ、末梢で誘導される Th17 細胞の割合が野生型に比べて有為に減少した(Figure 17)。この事は、*in vivo* でも IL-1 シグナルが Th17 細胞分化に重要な役割を果たしている事を示している。同時に、Foxp3⁺細胞の割合を解析したが有為な差は得られなかった。しかし、リンパ節などでは殆ど iTreg が誘導されていないが、粘膜固有層では Foxp3⁺細胞が分化し *Il1r1*^{-/-}マウス由来 T 細胞では Foxp3⁺細胞の割合が増えている傾向にあった。この事からも、IL-1 シグナルが Foxp3 の発現を抑制して Th17 細胞と Foxp3⁺細胞の分化バランスを制御していると考えている。

IL-6 や IL-21 が nTreg を IL-17 産生細胞に転換し、IL-1 が Foxp3 の発現に影響を与える事無くその IL-17 産生を増やす事が報告されている(Chung et al., 2009; Yang et al., 2008b)。これらの実験では、IL-1 が Foxp3 発現に与える影響は弱い。本研究との Foxp3 発現制御における IL-1 の作用の違いは、上記の報告では nTreg を用いて本研究では naïve T 細胞を用いている事によると考えられる。本研究では、IL-1 が Th17 細胞分化条件下で Foxp3 の発現を抑制して Foxp3⁺細胞の割合を減少させることを示した。そして、この抑制は IL-6 や IL-21 非依存的であった。さらに、この Th17 細胞分化条件下で誘導される Foxp3⁺細胞は IL-1R1 を発現している事を明らかにした。この結果は、IL-1R1 が Foxp3⁺細胞の形質に重要な役割を果たしている事を示唆している。nTreg と iTreg には Foxp3 発現制御などの違いが報告されており、これらの違いが結果に影響していると考えられる(de Lafaille and Lafaille, 2009)。Foxp3 の発現制御について、分子メカニズムのさらなる解析が求められる。加えて、IL-1 シグナルが Foxp3 を抑制

する事が、先の報告にある自己応答性のエフェクターT細胞の原因になるかは明らかになっていない(Zhou et al., 2009)。

3; *Il1rn*^{-/-}マウスの IL-6 非依存的関節炎とヒトの関節炎

サイトカインはマウスの関節炎だけでなく、ヒトの関節炎でも重要な役割を果たしている。実際にサイトカインを標的にした薬剤も臨床応用されており、TNF- α アンタゴニスト(Tak and Kalden, 2011)、IL-6R アンタゴニスト(Jones et al., 2010; Nishimoto et al., 2009)、IL-1 アンタゴニスト(Cohen et al., 2002; Furst, 2004)、IL-17 アンタゴニスト(Genovese et al., 2010; Hueber et al., 2010)などが治療や臨床試験に利用されている。

anti-IL-6R 抗体で関節炎が抑制される人がいる一方、anti-IL-6R 抗体に不応答な患者も30%ほどいる(Jones et al., 2010)。本研究から *Il1rn*^{-/-}マウスは IL-6 非依存的に関節炎を発症する事が明らかとなった。また、先の研究から *Il1rn*^{-/-}マウスは IL-6 や IL-17 非依存的に乾癬様の皮膚炎を発症することが明らかとなっている(Nakajima et al., 2010)。

関節リウマチに似た症状を示す関節炎として、乾癬性関節炎 (psoriatic arthritis) がある(Ramonda et al., 2011)。乾癬性関節炎の患者はアテローム性動脈硬化症を発症する傾向にあり(Ramonda et al., 2011)、*Il1rn*^{-/-}マウスもアテローム性動脈硬化症に高感受性となることが報告されている(Alexander et al., 2012)。これらの事を総合すると *Il1rn*^{-/-}マウスは乾癬性関節炎の良いモデルとなり、IL-6 非依存的な関節炎発症には TNF- α 、IL-17や IL-1 が重要な役割を果たしている事が示唆される。

4; 今後の研究課題

4-1; *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症機構

今後の *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎に残された課題として、*Il1rn*^{-/-}マウス関節炎における B 細胞の関与が明らかになっていない。本研究でもリンパ節において、*Il1rn*^{-/-}マウスのリンパ節では B 細胞が有意に増加している事を示した。さらに B 細胞活性化因子である IL-21 の発現も亢進していた。anti-CD20 抗体で B 細胞を除去するなどして B 細胞と関節炎の関係を明らかにする事が望まれる。また今回、IL-21 が *Il1rn*^{-/-}マウスの Th17 細胞分化に重要な役割を担っている事が示唆されたが、関節炎の発症における役割は未だ不明である。IL-21 と *Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎発症における役割も今後の課題として残っている。

また、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎が抗原特異的な関節炎であるかどうかは、検討する必要がある。なぜならば、抗原特異性と臓器特異性を明らかにする事は、自己免疫疾患の発症機構を明らかにする上で重要な課題だからである。Autoimmune disease と異なる Auto inflammatory disease という概念が有り(Dinarello, 2009)、Human では IL-1Ra の欠損が Auto inflammatory disease を引き起こす原因の一つであると考えられている(Aksentijevich et al., 2009; Reddy et al., 2009)。Auto inflammatory disease の患者では、皮膚、関節、骨、目、神経系で慢性的な炎症が見られる。そこで TCR 特異性の関節炎発症における役割を明らかとする為に、*Il1rn*^{-/-}と DO11.10 (OVA 特異的 TCR-Tg マウス)/*Rag2*^{-/-}マウスを掛け合わせて作成した *Il1rn*^{-/-}*Rag2*^{-/-}DO11.10 Tg が関節炎を発症するかを解析する。近年、IL-6 の過剰シグナルにより関節炎を発症する F759 マウスは、MHC ClassII 依存的・TCR 非依存的に関節炎を発症する事が報告された(Murakami et al., 2011)。また、当研究室の秋津らの解析から、抗原特異性を持たないと考えられている IL-17 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞が *Il1rn*^{-/-}マウスで増加しており、関節炎発症を促進してい

る可能性が示唆されている(unpublished observation)。今後の *Il1rn*^{-/-}マウスの解析から、臓器特異的な疾患における T 細胞の役割が明らかとなる事が期待される。

4-2; IL-1 と Th17 細胞分化機構

先に述べた通り、IL-1R1 の発現誘導機構は完全には明らかになっていない。同様に IL-23R が Th17 細胞分化・維持に重要である事は報告されているが、IL-23R の発現誘導機構の詳細は明らかとなっていない(McGeachy et al., 2009)。また、IL-23 の下流で誘導される IL-7R の発現誘導メカニズムも詳細には明らかとなっていない(Liu et al., 2010)。これら Th17 細胞の維持や機能の亢進に重要なサイトカイン受容体発現機構を明らかにする事は、通常の免疫応答は変えずに過剰な免疫応答のみを抑制する新規治療法の開発に役立つと考えられる。また、 $\gamma\delta$ ⁺T 細胞の IL-1R1 発現には IL-23 が必要な役割を果たしているが(秋津ら、unpublished observation)、CD4⁺細胞では IL-23R が naïve T 細胞に発現していない為に IL-23 は IL-1R の発現にあまり重要でない。この様に、細胞種によって IL-1R1 の発現誘導メカニズムは異なる事が予想される。これは、細胞種によって IL-1 シグナルを受け取る場所や、条件の違いを反映していると考えられる。包括的な IL-1R1 発現機構の解明が、IL-1 依存的な疾患発症メカニズムの理解には必要であろう。

また、IL-1 の下流で Th17 細胞分化を促進する分子レベルでの理解も完全ではない。IL-1 の下流で、Akt-mTOR 経路や MAPK 経路、NF- κ B 経路が IL-17 細胞分化に重要な事はあきらかとなりつつある。しかし、その具体的な機能や、それらシグナル伝達因子と IL-17 産生の間にはまだ乖離が有る。最近、NF- κ B 経路の c-Rel が直接 IL-17 プロモーターに結合して発現を制御している事が報告された(Ruan et al., 2011)。この論文では c-Rel と Rel-A が IL-17 産生に重要だと報告しているが、Rel-A に関しては

$\alpha\beta^+$ T 細胞からの IL-17 産生には関係が無いという報告も同時期に出ておりはっきりしていない(Powolny-Budnicka et al., 2011)。IL-1 下流シグナルが、Th17 細胞特異的遺伝子の発現を制御する分子メカニズムの解明は今後の課題である。

4-3; IL-6 非依存的 Th17 細胞分化機構

最近、IL-6 非依存的な Th17 細胞分化には IL-1 が重要だと言う論文が出てきた(Hu et al., 2011)。本研究でも、IL-6 非依存的な Th17 細胞分化に IL-1 が重要な事を示してきた。また、IL-1 や IL-21 以外の IL-6 非依存的な Th17 細胞分化誘導因子の存在も否定出来ない(Figure 18b)。今後のさらなる解析から、IL-6 非依存的な Th17 細胞分化機構の解明と、その因子の生理的な意味が明らかとなる事が期待される。特に、ヒトでは IL-6 は Th17 細胞分化にあまり重要でないと考えられている(Manel et al., 2008)。また、ヒトの Th17 細胞分化にも IL-23 は重要であると考えられており、*Il1rn*^{-/-}マウスでも IL-23 の発現が亢進している(Cho et al., 2006)。IL-6 非依存的な Th17 細胞分化に IL-23 がどれほど影響を与えるかは今後の課題である。ヒトとマウスの Th17 細胞分化誘導因子の不一致を解消する事は、よりよいヒト疾患モデルマウスの作成とその病態正確な病態解析、最終的には有益な臨床薬の開発に寄与すると考えられる。

4-4; STAT3 を活性化するサイトカインの機能の違い

これまでの報告から STAT3 は Th17 細胞分化に必須のシグナル伝達因子であると考えられ、IL-6/IL-21/IL-23 など STAT3 を活性化するサイトカインは Th17 細胞分化を促進する。STAT3 を活性化するサイトカインでも Th17 細胞分化能に差がある。本研究でも、IL-21 は IL-6 より Th17 細胞分化誘導能が弱かった(figure 6)。これらサイトカインの Th17 細胞誘導能の違いは、下流で活性化される STAT の指向性の違いだと

考えられる。IL-21 は STAT3 以外にも STAT1・5 を活性化するが(Leonard and Spolski, 2005)、STAT5 は STAT3 の転写領域と競合的に結合して STAT3 転写活性を阻害する(Yang et al., 2011)。L-6 に比べて IL-21 の Th17 細胞分化誘導能が低いメカニズムは報告されてなく、今後の課題である。一方、Th17 細胞分化を抑制する IL-27 や LIF(Leukemia inhibitory factor)も IL-6 と同じく gp130 を介して STAT3 を活性化することが知られている(Batten et al., 2006; Cao et al., 2011; Stumhofer et al., 2006)。しかし、LIF の STAT3 活性化は長続きせずに、ERK の下流で誘導される SOCS3 が STAT3 リン酸化を抑制してしまう。また IL-27 は STAT1 依存的・SOCS3 非依存的に Th17 細胞の分化を抑制する。IL-27 の下流の STAT1 がどのようにして STAT3 の機能を阻害するかは今後の課題である。

本研究では、IL-1 の Th17 細胞分化と関節炎への重要な役割を明らかとした。過剰な IL-1 シグナルは IL-6 欠損を乗り越えて関節炎を発症させる。また本研究で IL-1 シグナルと Foxp3 発現の関係性を明らかにした。IL-1 は Th17 細胞分化に重要な遺伝子の発現を誘導するだけでなく、その維持にも寄与している(Figure 20)。

【結論】

本研究では、関節炎を自然発症する IL-1 レセプターアンタゴニスト欠損 (*Il1rn*^{-/-}) マウスを用いて、IL-1 過剰シグナルと Th17 細胞分化機構の解明を行った。

Il1rn^{-/-}の関節炎発症と炎症性サイトカイン IL-6 の関係性を明らかにする為に *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスを作成した。その結果、*Il1rn*^{-/-}マウスの関節炎は IL-6 欠損によって全く影響を受けない事を発見した。また、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスでは Th17 細胞が通常通り分化していた。この事から、IL-1 のシグナルが IL-6 非依存的な Th17 細胞分化に重要な役割を果たしているかと仮定した。IL-6 非依存的 Th17 細胞分化機構を明らかとする為に、naïve CD4⁺T 細胞を *Il6*^{-/-}マウスから精製し TCR 刺激、TGF-β、IL-1±IL-21 で刺激した。その結果、naïve T 細胞は TGF-β+IL-1+IL-21 で培養した方が TGF+IL-21 で培養した時よりも効率的に Th17 細胞が分化した。しかし、TGF-βと IL-1 では Th17 細胞は分化しなかった。さらに、IL-1 は TGF-βとともに Th17 細胞を維持した。興味深い事に、IL-1 は TGF-βによって誘導される Foxp3 発現を抑制して Th17 細胞分化を亢進させており、これは細胞増殖や IL-6 や IL-21 非依存的であった。さらに、IL-1 は *Nfkbiz* や *Batf* といった Th17 細胞転写因子の発現を増強した。さらに、naïve T 細胞を *Rag2*^{-/-}マウスに移植して大腸炎を誘導する実験系から、IL-1R1 欠損 naïve T 細胞は大腸炎を誘導する力が弱く、Th17 細胞に分化しにくかった。よりこれらの結果は、IL-1 が Th17 細胞分化に重要な役割を果たしている事を示している。

ヒトでも IL-1 は Th17 細胞分化に重要なサイトカインである事が報告されている。本研究が、新たな炎症疾患治療法の開発につながる事が期待される。

【略語】 (Abbreviations)

7AAD; 7-Amino-ActinomycinD

APC; Allophycocyanin

Ahr; Aryl Hydrocarbon Receptor

Batf; Basic leucine zipper transcription factor

Blimp-1; B lymphocyte induced maturation protein 1

CFSE; Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CIA; collagen-induced arthritis

CTLA-4; Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

FACS; Fluorescence-activated cell sorting

FBS; Fetal Bovine Serum

FITC; fluorescein isothiocyanate

Foxp3; the forkhead box P3

GATA3; GATA-binding protein 3

GITR; Glucocorticoid-induced TNF-receptor

HTLV; Human T-lymphotropic Virus

Hif1 α ; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit

ICOS; inducible T-cell co-stimulator

IL-1RI; type I IL-1R

IL-1Ra; IL-1 receptor antagonist

IL; Interleukin

IRF4; Interferon regulatory factor 4

LIF; Leukemia inhibitory factor

LPL; lamina propria lymphocytes

LPS; Lipopolysaccharide

MAPK; mitogen-activated protein kinase

MCM; Macrophage conditioned media

MFI; Mean Fluorescent Intensity

MHC; major histocompatibility complex

Myd88; myeloid differentiation factor 88

NF- κ B; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Nfkbiz; NF-kappa-B inhibitor zeta

OVA; ovalbumin

PBS; Phosphate buffered saline

PE; Phycoerythrin

PI3K; Phosphoinositide 3-kinase

PKC θ ; Protein kinase C θ

PMA; Phorbol 12-Myristate 13-acetate

R; receptor

RA; rheumatoid arthritis

ROR- γ t; retinoic acid receptor-related orphan receptor

Rag2; recombination activating gene 2

Rorc; RORgamma

SIGIRR; Single Ig IL-1-related receptor

SPF; specific pathogen-free conditions

STAT; Signal Transduction and Activator of Transcription

T-bet; T box expressed in T cells

TCR; T cell receptor

TGF; transforming growth factor

Tg; transgenic

iTreg; induced regulatory T cell

mTOR; mammalian target of Rapamycin

rpm; rotation per minute

【引用文献】

- Abdollahi-Roodsaz, S., L.A.B. Joosten, M.I. Koenders, I. Devesa, M.F. Roelofs, T. Radstake, M. Heuvelmans-Jacobs, S. Akira, M.J.H. Nicklin, F. Ribeiro-Dias, and W.B. Van den Berg. 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 118:205-216.
- Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 β and IL-18-mediated function. *Immunity* 9:143-150.
- Ahern, P.P., C. Schiering, S. Buonocore, M.J. McGeachy, D.J. Cua, K.J. Maloy, and F. Powrie. 2010. Interleukin-23 Drives Intestinal Inflammation through Direct Activity on T Cells. *Immunity* 33:279-288.
- Aksentijevich, I., S.L. Masters, P.J. Ferguson, P. Dancy, J. Frenkel, A. van Royen-Kerkhoff, R. Laxer, U. Tedgard, E.W. Cowen, T.-H. Pham, M. Booty, J.D. Estes, N.G. Sandler, N. Plass, D.L. Stone, M.L. Turner, S. Hill, J.A. Butman, R. Schneider, P. Babyn, H.I. El-Shanti, E. Pope, K. Barron, X. Bing, A. Laurence, C.-C.R. Lee, D. Chapelle, G.I. Clarke, K. Ohson, M. Nicholson, M. Gadina, B. Yang, B.D. Korman, P.K. Gregersen, P.M. van Hagen, A.E. Hak, M. Huizing, P. Rahman, D.C. Douek, E.F. Remmers, D.L. Kastner, and R. Goldbach-Mansky. 2009. An Autoinflammatory Disease with Deficiency of the Interleukin-1-Receptor Antagonist. *New England Journal of Medicine* 360:2426-2437.
- Alexander, M.R., C.W. Moehle, J.L. Johnson, Z. Yang, J.K. Lee, C.L. Jackson, and G.K. Owens. 2012. Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 122:70-79.
- Batten, M., J. Li, S. Yi, N.M. Kljavin, D.M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F.J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunology* 7:929-936.
- Bauge, C., F. Legendre, S. Leclercq, J.M. Efissalde, J.P. Pujol, P. Galera, and K. Boumediene. 2007. Interleukin-1 beta impairment of transforming growth factor beta 1 signaling by down-regulation of transforming growth factor

- beta receptor type II and up-regulation of smad7 in human articular Chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism* 56:3020-3032.
- Bettelli, E., Y.J. Carrier, W.D. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H)17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
- Bubier, J.A., T.J. Sproule, O. Foreman, R. Spolski, D.J. Shaffer, H.C. Morse, III, W.J. Leonard, and D.C. Roopenian. 2009. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:1518-1523.
- Cao, W., Y. Yang, Z. Wang, A. Liu, L. Fang, F. Wu, J. Hong, Y. Shi, S. Leung, C. Dong, and J.Z. Zhang. 2011. Leukemia Inhibitory Factor Inhibits T Helper 17 Cell Differentiation and Confers Treatment Effects of Neural Progenitor Cell Therapy in Autoimmune Disease. *Immunity* 35:273-284.
- Cho, M.L., J.W. Kang, Y.M. Moon, H.J. Nam, J.Y. Jhun, S.B. Heo, H.T. Jin, S.Y. Min, J.H. Ju, K.S. Park, Y.G. Cho, C.H. Yoon, S.H. Park, Y.C. Sung, and H.Y. Kim. 2006. STAT3 and NF-kappa B signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Immunology* 176:5652-5661.
- Chung, Y., S.H. Chang, G.J. Martinez, X.O. Yang, R. Nurieva, H.S. Kang, L. Ma, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* 30:576-587.
- Cohen, S., E. Hurd, J. Cush, M. Schiff, M.E. Weinblatt, L.W. Moreland, J. Kremer, M.B. Bear, W.J. Rich, and D. McCabe. 2002. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate - Results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and Rheumatism* 46:614-624.
- Cretney, E., A. Xin, W. Shi, M. Minnich, F. Masson, M. Miasari, G.T. Belz, G.K. Smyth, M. Busslinger, S.L. Nutt, and A. Kallies. 2011. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nature Immunology* 12:304-U353.

- Dang, E.V., J. Barbi, H.-Y. Yang, D. Jinasena, H. Yu, Y. Zheng, Z. Bordman, J. Fu, Y. Kim, H.-R. Yen, W. Luo, K. Zeller, L. Shimoda, S.L. Topalian, G.L. Semenza, C.V. Dang, D.M. Pardoll, and F. Pan. 2011. Control of T(H)17/T(reg) Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* 146:772-784.
- de Lafaille, M.A.C., and J.J. Lafaille. 2009. Natural and Adaptive Foxp3(+) Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 30:626-635.
- Delgoffe, G.M., K.N. Pollizzi, A.T. Waickman, E. Heikamp, D.J. Meyers, M.R. Horton, B. Xiao, P.F. Worley, and J.D. Powell. 2011. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nature Immunology* 12:295-U117.
- Dinarello, C.A. 2009. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology* 27:519-550.
- Durant, L., W.T. Watford, H.L. Ramos, A. Laurence, G. Vahedi, L. Wei, H. Takahashi, H.W. Sun, Y. Kanno, F. Powrie, and J.J. O'Shea. 2010. Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. *Immunity* 32:605-615.
- Furst, D.E. 2004. Anakinra: Review of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical Therapeutics* 26:1960-1975.
- Genovese, M.C., F. Van den Bosch, S.A. Roberson, S. Bojin, I.M. Biagini, P. Ryan, and J. Sloan-Lancaster. 2010. LY2439821, a Humanized Anti-Interleukin-17 Monoclonal Antibody, in the Treatment of Patients With Rheumatoid Arthritis A Phase I Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Proof-of-Concept Study. *Arthritis and Rheumatism* 62:929-939.
- Glaccum, M.B., K.L. Stocking, K. Charrier, J.L. Smith, C.R. Willis, C. Maliszewski, D.J. Livingston, J.J. Peschon, and P.J. Morrissey. 1997. Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1. *Journal of Immunology* 159:3364-3371.
- Gulen, M.F., Z.Z. Kang, K. Bulek, W. Youzhong, T.W. Kim, Y. Chen, C.Z. Altuntas, K.S. Bak-Jensen, M.J. McGeachy, J.S. Do, H. Xiao, G.M. Delgoffe, B.K. Min, J.D. Powell, V.K. Tuohy, D.J. Cua, and X.X. Li. 2010. The Receptor SIGIRR Suppresses Th17 Cell Proliferation via Inhibition of the

- Interleukin-1 Receptor Pathway and mTOR Kinase Activation. *Immunity* 32:54-66.
- Guo, L.Y., G. Wei, J.F. Zhu, W. Liao, W.J. Leonard, K.J. Zhao, and W. Paul. 2009. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:13463-13468.
- Hirahara, K., K. Ghoreschi, A. Laurence, X.-P. Yang, Y. Kanno, and J.J. O'Shea. 2010. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21:425-434.
- Horai, R., M. Asano, K. Sudo, H. Kanuka, M. Suzuki, M. Nishihara, M. Takahashi, and Y. Iwakura. 1998. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta, IL-1 alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *Journal of Experimental Medicine* 187:1463-1475.
- Horai, R., A. Nakajima, K. Habiro, M. Kotani, S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, S. Saijo, H. Kotaki, K. Sudo, A. Okahara, H. Tanioka, T. Ikuse, N. Ishii, P.L. Schwartzberg, R. Abe, and Y. Iwakura. 2004. TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 114:1603-1611.
- Horai, R., S. Saijo, M. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, and Y. Iwakura. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 191:313-320.
- Hu, W., T.D. Troutman, R. Edukulla, and C. Pasare. 2011. Priming Microenvironments Dictate Cytokine Requirements for T Helper 17 Cell Lineage Commitment. *Immunity* 35:1010-1022.
- Hueber, W., D.D. Patel, T. Dryja, A.M. Wright, I. Koroleva, G. Bruin, C. Antoni, Z. Draelos, M.H. Gold, P. Durez, P.P. Tak, J.J. Gomez-Reino, C.S. Foster, R.Y. Kim, C.M. Samson, N.S. Falk, D.S. Chu, D. Callanan, N. Quan Dong, K. Rose, A. Haider, F. Di Padova, G. Psoriasis Study, G. Rheumatoid Arthritis Study, and G. Uveitis Study. 2010. Effects of AIN457, a Fully Human Antibody to Interleukin-17A, on Psoriasis, Rheumatoid Arthritis, and Uveitis. *Science Translational Medicine* 2:
- Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann. 2009. Epigenetic control of FOXP3

- expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature Reviews Immunology* 9:83-89.
- Ichiyama, K., H. Yoshida, Y. Wakabayashi, T. Chinen, K. Saeki, M. Nakaya, G. Takaesu, S. Hori, A. Yoshimura, and T. Kobayashi. 2008. Foxp3 inhibits ROR gamma t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR gamma t. *Journal of Biological Chemistry* 283:17003-17008.
- Ishida, Y., T. Kondo, A. Kimura, K. Matsushima, and N. Mukaida. 2006. Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kappa B activation and a reciprocal suppression of TGF-beta signal pathway. *Journal of Immunology* 176:5598-5606.
- Ishihara, K., S. Sawa, H. Ikushima, S. Hirota, T. Atsumi, D. Kamimura, S.J. Park, M. Murakami, Y. Kitamura, Y. Iwakura, and T. Hirano. 2004. The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-1 pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis. *International Immunology* 16:455-465.
- Ivanov, I.I., B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17(+) T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
- Iwakura, Y., H. Ishigame, S. Saijo, and S. Nakae. 2011. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity* 34:149-162.
- Iwakura, Y., S. Nakae, S. Saijo, and H. Ishigame. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Reviews* 226:57-79.
- Jones, G., A. Sebba, J. Gu, M.B. Lowenstein, A. Calvo, J.J. Gomez-Reino, D.A. Siri, M. Tomsic, E. Alecock, T. Woodworth, and M.C. Genovese. 2010. Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69:88-96.
- Kimura, A., T. Naka, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama, and T. Kishimoto. 2008. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:9721-9726.
- Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R.

- Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Kohler. 1994. IMPAIRED IMMUNE AND ACUTE-PHASE RESPONSES IN INTERLEUKIN-6-DEFICIENT MICE. *Nature* 368:339-342.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-U489.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* 27:485-517.
- Kryczek, I., S. Wei, L.H. Vatan, J. Escara-Wilke, W. Szeliga, E.T. Keller, and W. Zou. 2007. Cutting edge: Opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17(+) T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *Journal of Immunology* 179:1423-1426.
- Lee, Y.K., H. Turner, C.L. Maynard, J.R. Oliver, D.Q. Chen, C.O. Elson, and C.T. Weaver. 2009. Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. *Immunity* 30:92-107.
- LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M.J. Robinson, F. Osorio, E.C. Slack, S.V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G.D. Brown, J. Ruland, and C.R.E. Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature Immunology* 8:630-638.
- Leonard, W.J., and R. Spolski. 2005. Interleukin-21: A modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature Reviews Immunology* 5:688-698.
- Li, T., and S.H. He. 2006. Induction of IL-6 release from human T cells by PAR-1 and PAR-2 agonists. *Immunology and Cell Biology* 84:461-466.
- Liu, X.B., S. Leung, C.X. Wang, Z. Tan, J. Wang, T.B. Guo, L. Fang, Y.G. Zhao, B. Wan, X. Qin, L.M. Lu, R.S. Li, H. Pan, M.J. Song, A.L. Liu, J. Hong, H.T. Lu, and J.Z. Zhang. 2010. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nature Medicine* 16:191-U197.
- Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman. 2008. The differentiation of human T-H-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR gamma t. *Nature Immunology* 9:641-649.
- McGeachy, M.J., Y. Chen, C.M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W.M. Blumenschein, T.K. McClanahan, J.J. O'Shea, and D.J. Cua. 2009. The

- interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology* 10:314-324.
- McInnes, I.B., and G. Schett. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology* 7:429-442.
- Monteleone, G., F. Pallone, and T.T. MacDonald. 2008. Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends in Immunology* 29:290-294.
- Murakami, M., Y. Okuyama, H. Ogura, S. Asano, Y. Arima, M. Tsuruoka, M. Harada, M. Kanamoto, Y. Sawa, Y. Iwakura, K. Takatsu, D. Kamimura, and T. Hirano. 2011. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *Journal of Experimental Medicine* 208:103-114.
- Nakae, S., S. Saijo, R. Horai, K. Sudo, S. Mori, and Y. Iwakura. 2003. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5986-5990.
- Nakajima, A., T. Matsuki, M. Komine, A. Asahina, R. Horai, S. Nakae, H. Ishigame, S. Kakuta, S. Saijo, and Y. Iwakura. 2010. TNF, but Not IL-6 and IL-17, Is Crucial for the Development of T Cell-Independent Psoriasis-Like Dermatitis in Il1rn(-/-) Mice. *Journal of Immunology* 185:1887-1893.
- Nakayamada, S., Y. Kanno, H. Takahashi, D. Jankovic, K.T. Lu, T.A. Johnson, H.-w. Sun, G. Vahedi, O. Hakim, R. Handon, P.L. Schwartzberg, G.L. Hager, and J.J. O'Shea. 2011. Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity* 35:919-931.
- Nishimoto, N., N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, and J. Azuma. 2009. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68:1580-1584.
- Okamoto, K., Y. Iwai, M. Oh-hora, M. Yamamoto, T. Morio, K. Aoki, K. Ohya, A.M. Jetten, S. Akira, T. Muta, and H. Takayanagi. 2010. I kappa B zeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors.

Nature 464:1381-U1313.

- Powolny-Budnicka, I., M. Riemann, S. Taenzer, R.M. Schmid, T. Hehlgans, and F. Weih. 2011. RelA and RelB Transcription Factors in Distinct Thymocyte Populations Control Lymphotoxin-Dependent Interleukin-17 Production in gamma delta T Cells. *Immunity* 34:364-374.
- Puga, I., M. Cols, C.M. Barra, B. He, L. Cassis, M. Gentile, L. Comerma, A. Chorny, M. Shan, W. Xu, G. Magri, D.M. Knowles, W. Tam, A. Chiu, J.B. Bussel, S. Serrano, J. Antonio Lorente, B. Bellosillo, J. Lloreta, N. Juanpere, F. Alameda, T. Baro, R. Diaz de Heredia, N. Toran, A. Catala, M. Torreadell, C. Fortuny, V. Cusi, C. Carreras, G.A. Diaz, J.M. Blander, C.-M. Farber, G. Silvestri, C. Cunningham-Rundles, M. Calvillo, C. Dufour, L.D. Notarangelo, V. Lougaris, A. Plebani, J.-L. Casanova, S.C. Ganal, A. Diefenbach, J. Ignacio Arostegui, M. Juan, J. Yaguee, N. Mahlaoui, J. Donadieu, K. Chen, and A. Cerutti. 2012. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology* 13:170-180.
- Ramonda, R., A. Lo Nigro, V. Modesti, L. Nalotto, E. Musacchio, L. Iaccarino, L. Punzi, and A. Doria. 2011. Atherosclerosis in psoriatic arthritis. *Autoimmunity Reviews* 10:773-778.
- Reddy, S., S. Jia, R. Geoffrey, R. Lorier, M. Suchi, U. Broeckel, M.J. Hessner, and J. Verbsky. 2009. BRIEF REPORT An Autoinflammatory Disease Due to Homozygous Deletion of the IL1RN Locus. *New England Journal of Medicine* 360:2438-2444.
- Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Zhang, S. Zheng, J. Sun, J. Wang, J. DeVigiliis, H.-C. Liou, A.A. Beg, and Y.H. Chen. 2011. The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR gamma-ROR gamma T transcriptional axis. *Journal of Experimental Medicine* 208:2321-2333.
- Schmitt, N., R. Morita, L. Bourdery, S.E. Bentebibel, S.M. Zurawski, J. Banchereau, and H. Ueno. 2009. Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* 31:158-169.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K.P. Lam, E.M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A.M. Stall, and F.W. Alt. 1992. RAG-2-DEFICIENT MICE LACK MATURE LYMPHOCYTES OWING TO INABILITY TO INITIATE V(D)J REARRANGEMENT. *Cell* 68:855-867.

- Sims, J.E., and D.E. Smith. 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology* 10:89-102.
- Spolski, R., and W.J. Leonard. 2010. IL-21 and T follicular helper cells. *International Immunology* 22:7-12.
- Stritesky, G.L., N. Yeh, and M.H. Kaplan. 2008. IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *Journal of Immunology* 181:5948-5955.
- Stumhofer, J.S., A. Laurence, E.H. Wilson, E. Huang, C.M. Tato, L.M. Johnson, A.V. Villarino, Q.L. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C.J.M. Saris, J.J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst, and C.A. Hunter. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature Immunology* 7:937-945.
- Sutton, C., C. Brereton, B. Keogh, K.H.G. Mills, and E.C. Lavelle. 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* 203:1685-1691.
- Tak, P.P., and J.R. Kalden. 2011. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Research & Therapy* 13:
- Van Kooten, C., I. Rensink, D. Pascual-Salcedo, R. Van Oers, and L. Aarden. 1991. MONOKINE PRODUCTION BY HUMAN T CELLS IL-1-ALPHA PRODUCTION RESTRICTED TO MEMORY T CELLS. *Journal of Immunology* 146:2654-2658.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, R.A. Flavell, and B. Stockinger. 2006. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nature Immunology* 7:1151-1156.
- Wei, L., A. Laurence, K.M. Elias, and J.J. O'Shea. 2007. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 282:34605-34610.
- Yang, X.-P., K. Ghoreschi, S.M. Steward-Tharp, J. Rodriguez-Canales, J. Zhu, J.R. Grainger, K. Hirahara, H.-W. Sun, L. Wei, G. Vahedi, Y. Kanno, J.J. O'Shea, and A. Laurence. 2011. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature Immunology* 12:247-U284.

- Yang, X.O., R. Nurieva, G.J. Martinez, H.S. Kang, Y. Chung, B.P. Pappu, B. Shah, S.H. Chang, K.S. Schluns, S.S. Watowich, X.-H. Feng, A.M. Jetten, and C. Dong. 2008a. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29:44-56.
- Yang, X.O., R. Nurieva, G.J. Martinez, H.S. Kang, Y. Chung, B.P. Pappu, B. Shah, S.H. Chang, K.S. Schluns, S.S. Watowich, X.H. Feng, A.M. Jetten, and C. Dong. 2008b. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29:44-56.
- Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, and D.R. Littman. 2007. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting the sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. In 176.
- Zhou, L., and D.R. Littman. 2009. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Current Opinion in Immunology* 21:146-152.
- Zhou, L., J.E. Lopes, M.M.W. Chong, Ivanov, II, R. Min, G.D. Victora, Y.L. Shen, J.G. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, and D.R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR gamma t function. *Nature* 453:236-U214.
- Zhou, X.Y., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology* 10:1000-U1104.

a

Cytokine dependency of RA models

	IL-6	IL-17A	IL-1	TNF
HTLV-I Tg	↓*	↓*	↓ (163)	→ *
<i>Il1m</i> ^{-/-}	?	↓↓ (172)	ND	↓↓ (170)
SKG	↓↓ (178)	↓↓ (176, 177)	↓ (178)	↓ (178)
CIA	↓ (187)	↓ (188)	↓↓ (163)	↓ (189, 190)
CAIA	→ (193)	→ †	↓ (193)	↓↓ (193)
hTNF Tg	→ (187)	ND	↓↓ (198)	↓↓ (197)
K/BxN	→ (204)	ND	↓↓ (202)	↓ (204)

Il1m, IL-1R antagonist.

*As shown in Fig. 5A.

†Unpublished observation.

→, independent; ↓, involved; ↓↓, dependent; ND, not determined.

2008. *Immunological reviews*. Iwakura et al.

b

抗IL-6R抗体



Human IL-1Ra



抗TNF-α抗体

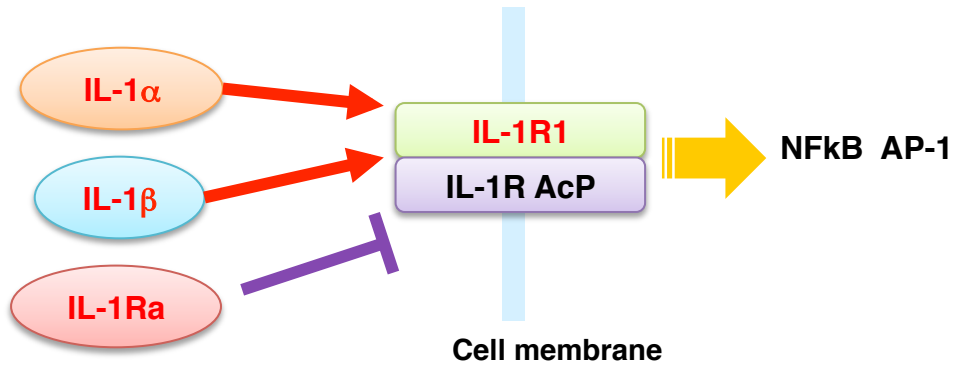


Figure 0-1 炎症性サイトカインと関節炎の関係性

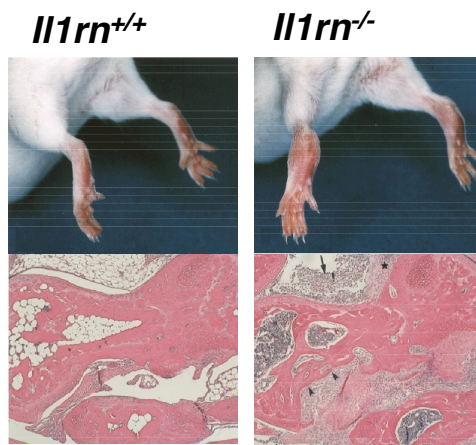
a, 多くの関節炎モデルマウスと炎症性サイトカインの関係性が調べられている。一番左が関節炎モデルマウス、IL-6-TNFが炎症性サイトカイン。各サイトカイン欠損マウスまたは阻害実験で関節炎発症への影響をまとめた。

b, IL-6、IL-1、TNFなどを阻害する薬剤が臨床応用されている。左から抗IL-6R抗体(トシリズマブ)、Human IL-1Ra(アナキンラ)、抗TNF抗体(インフリキシマブ)。

a

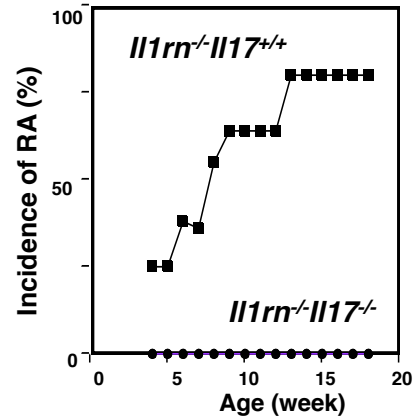


b



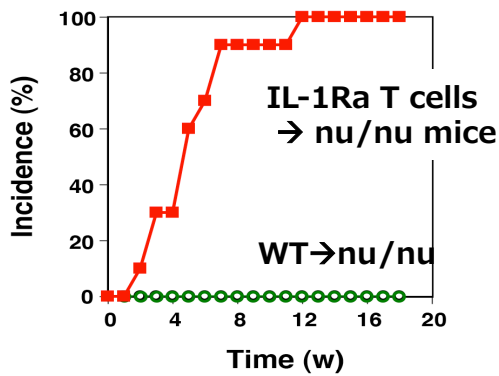
Horai et al., *J. Exp. Med.*, 2000

c



Nakae et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. 2003

d



Horai et al., *J. Clin. Invest.* 2004

Figure 0-2 IL-1Ra 欠損マウスはIL-17、T細胞依存的に関節炎を発症する。

a, IL-1Raは炎症性サイトカインであるIL-1の内在性阻害因子である。

b, IL-1Ra欠損マウスは関節炎を自然発症する。

c, この関節炎の発症にはIL-17が重要である。

d, IL-1Ra 欠損マウスのT細胞をnude マウスに移植すると関節炎を発症する。

CD4⁺ ヘルパーT細胞サブセット

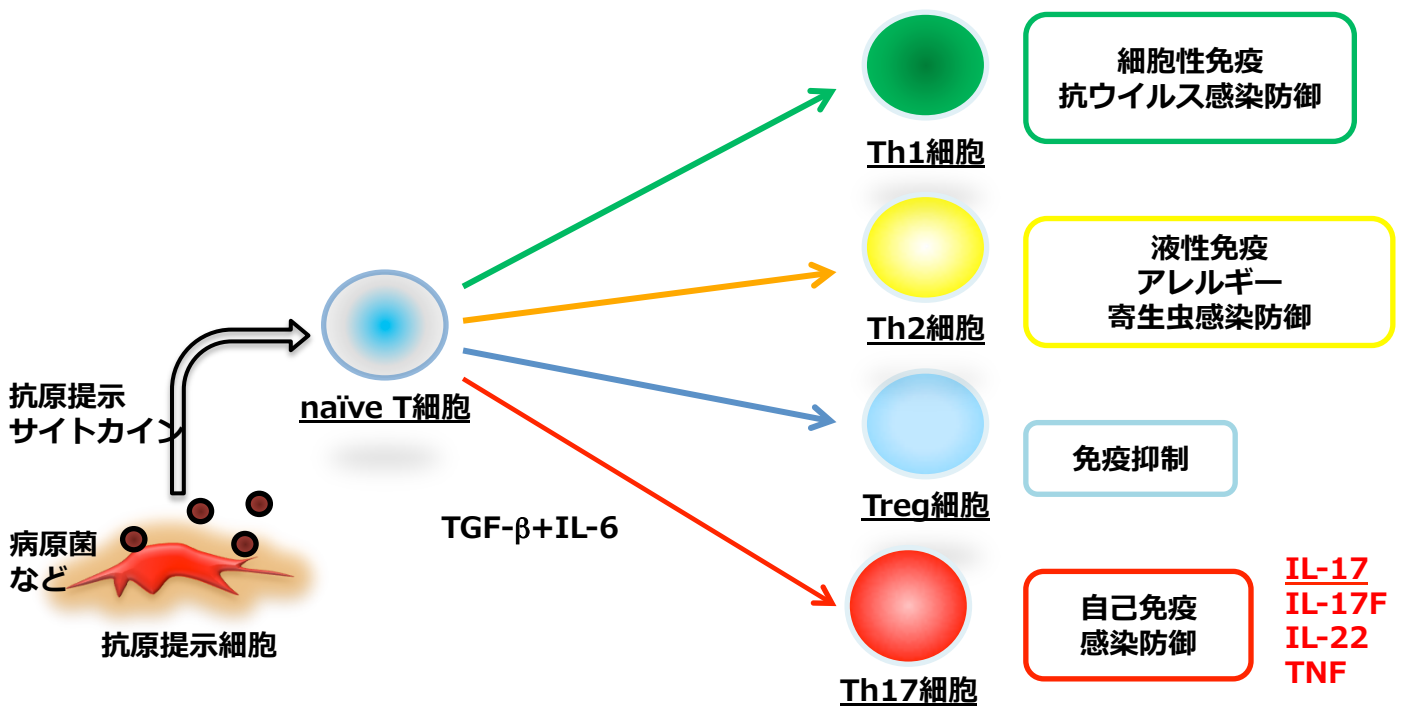


Figure 0-3 Th17細胞はIL-17を産生する新しいCD4⁺ヘルパーT細胞サブセットである。ヘルパーT細胞は免疫反応の方向性を決定する重要な細胞であり、その機能によりいくつかのサブセットに分けられる事が知られている。炎症性サイトカインIL-17を産生するTh17細胞は、自己免疫疾患や真菌感染防御に働く比較的新しいCD4⁺ヘルパーT細胞サブセットである。これらヘルパーT細胞の分化は末梢で抗原提示細胞からのサイトカインで制御されている。Th17細胞の分化にはTGF- β とIL-6が重要な働きをする事が知られていた。

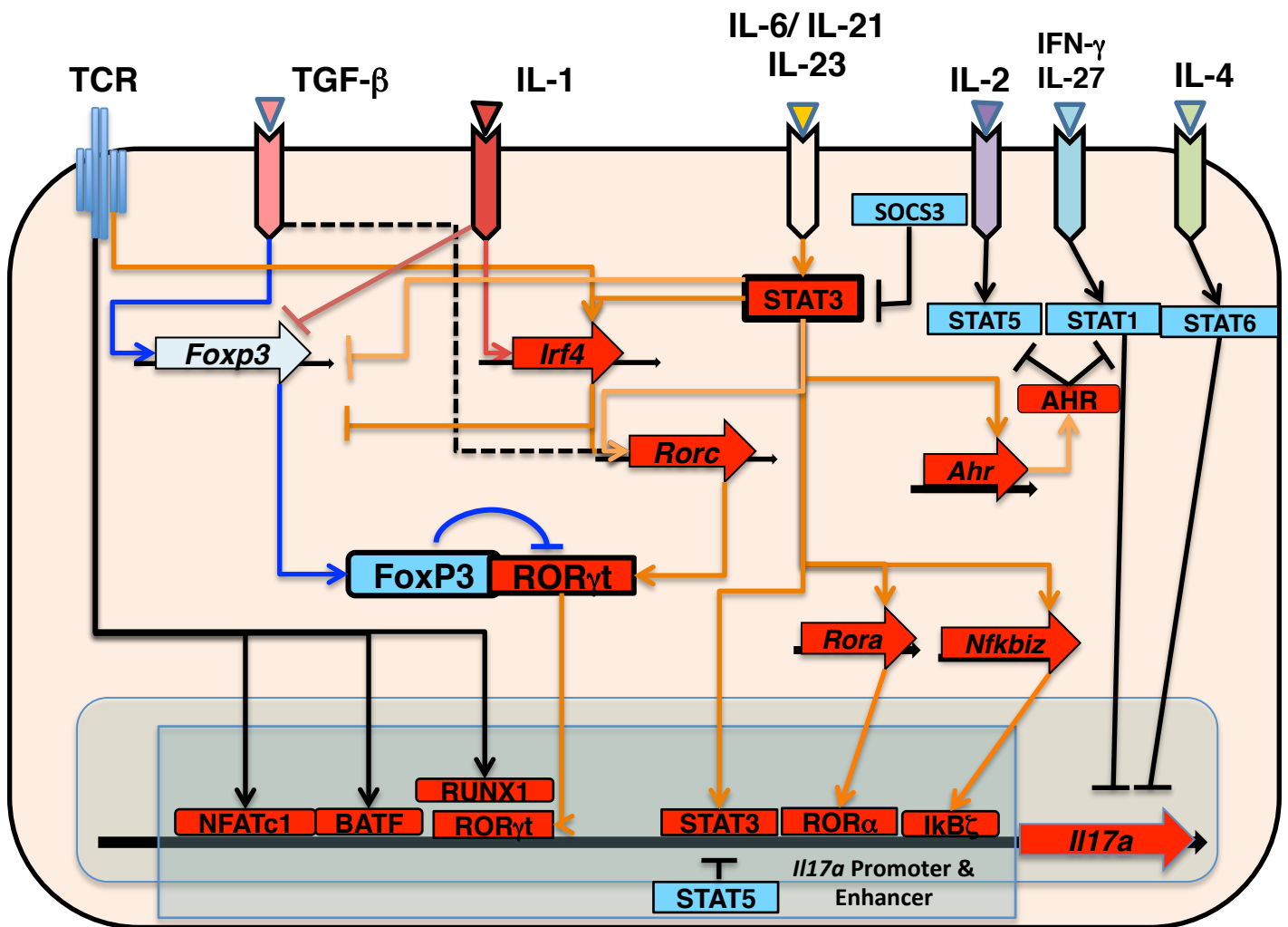


Figure 0-4 Th17細胞分化に関わる転写因子

サイトカインがどのようなシグナル・転写因子を介してIL-17の発現を誘導するのかをまとめた。

赤: Th17細胞分化に促進的に働く因子

青: Th17細胞分化を抑制する因子

RORγtはTh17細胞分化のマスターレギュレーターと考えられておられる。また、RORγt以外にもTh17細胞分化を正に制御する転写因子が多く報告されている。STAT3もTh17細胞分化に必須の転写因子だと考えられている。

Th17細胞とTreg細胞の相互排他的な分化

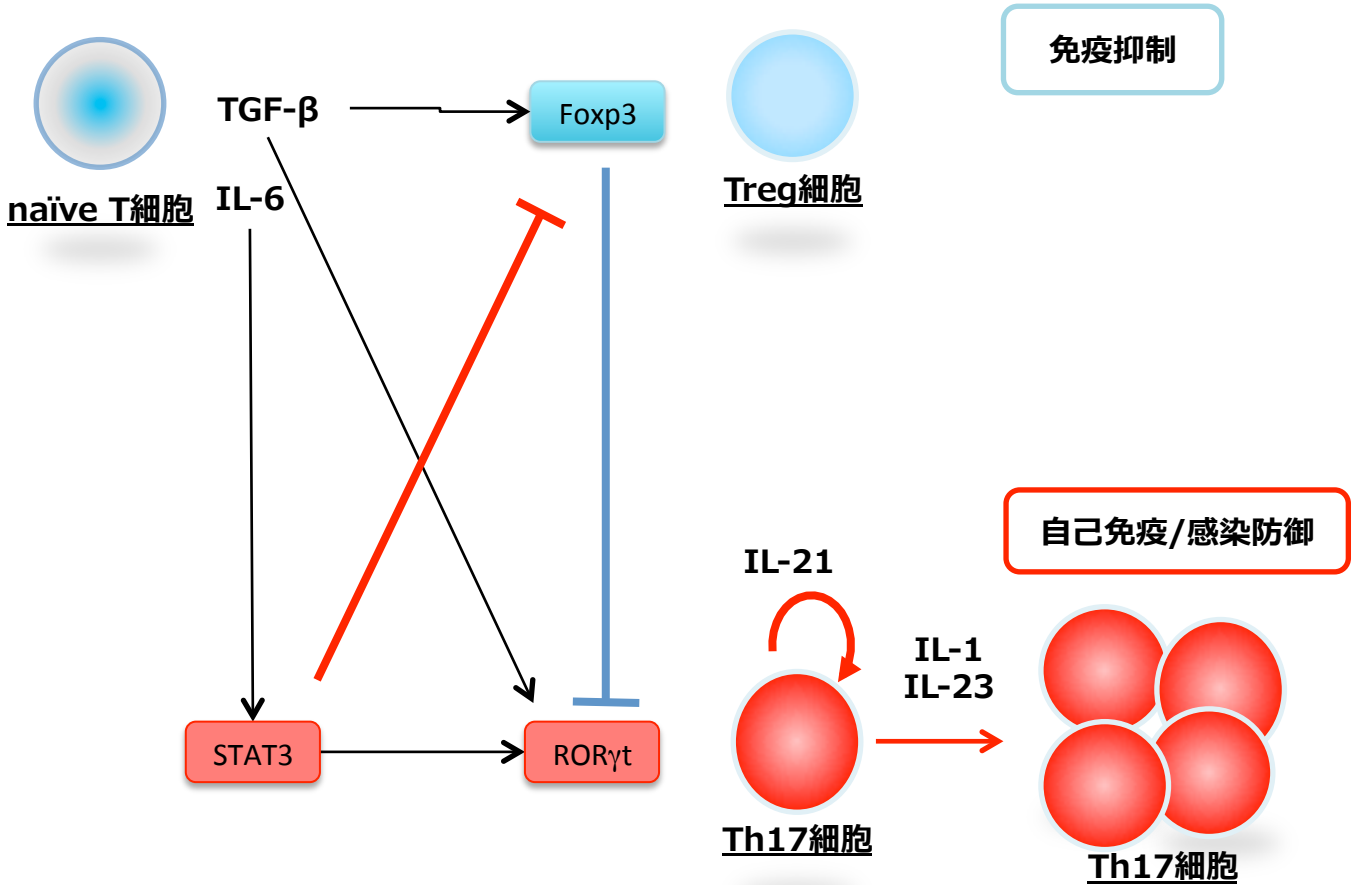


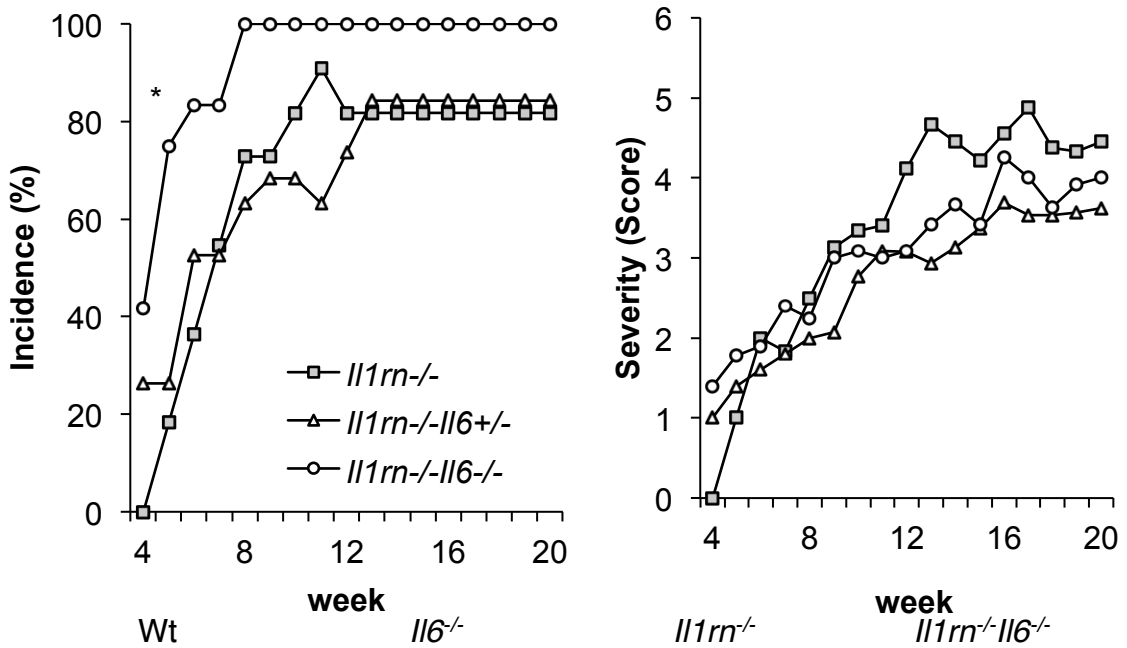
Figure 0-5 Th17細胞とTreg細胞の相互排他的な分化

赤: Th17細胞分化に促進的に働く因子

青: Th17細胞分化を抑制する因子

TGF- β はFoxp3とROR γ を誘導するが、Foxp3はROR γ を抑制する為にTGF- β 単独だとFoxp3⁺細胞が分化する。そこにIL-6が存在するとSTAT3依存的にFoxp3を抑制してROR γ 優位となってTh17細胞が分化すると考えられている。

a



b

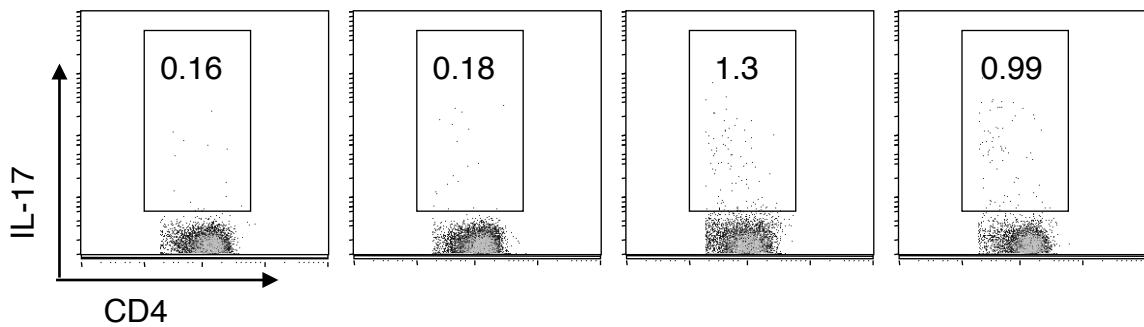


Figure 1. *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{+/-}マウスは、*Il1rn*^{-/-}マウスと同様に関節炎を発症しTh17細胞が分化していた。

(a) 左:関節炎発症率 右:関節炎重症度 n=15-22/群 *, $P < 0.05$: *Il1rn*^{-/-} 対 *Il6*^{-/-}*Il1rn*^{-/-} マウスの発症率の有意差検定は χ^2 検定により行った。2回の観察のうち代表例を示している。
 (b) WT, *Il6*^{-/-}, 関節炎発症 *Il1rn*^{-/-}, 関節炎発症 *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-} マウスのリンパ節におけるIL-17産生は、*in vitro* でのPMA/ionomycin刺激後にフローサイトメーターで解析した。数字は各エリアの細胞存在比(%)である。図は、CD4⁺細胞にゲートをかけてある。2回の実験のうち代表例を示している。

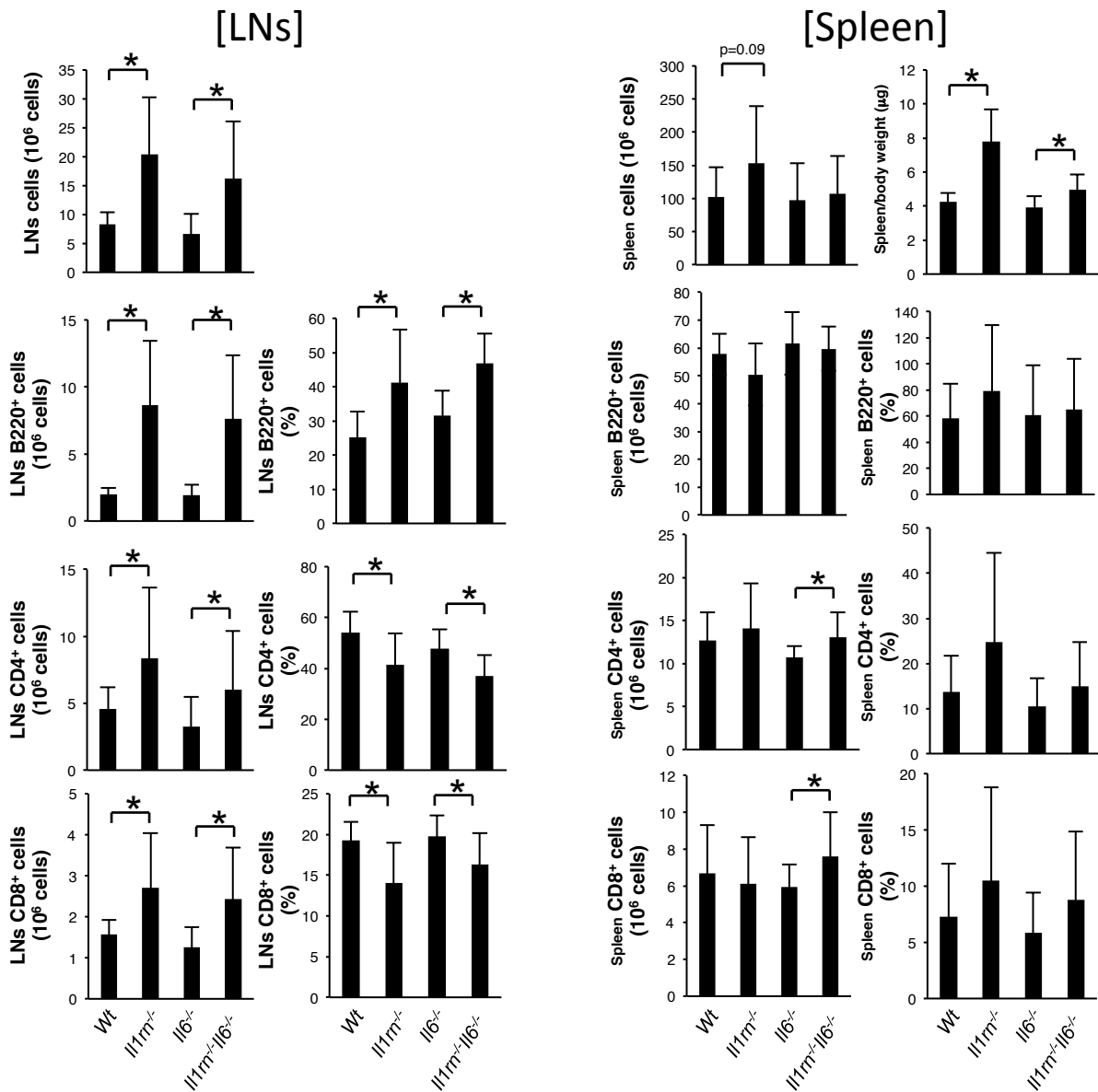


Figure 2. 各遺伝子欠損マウスのリンパ節細胞と脾臓細胞

野生型、*Il1rn*^{-/-}、*Il6*^{-/-}、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-} マウスの脾臓、リンパ節から細胞を回収し、各表面マーカーを抗体で染色し、フローサイトメーターにより解析した。左から脾臓の細胞比と細胞数、リンパ節の細胞比と細胞数。データは3-4匹の±SD **P* < 0.05. 2回の実験のうち代表例を示している

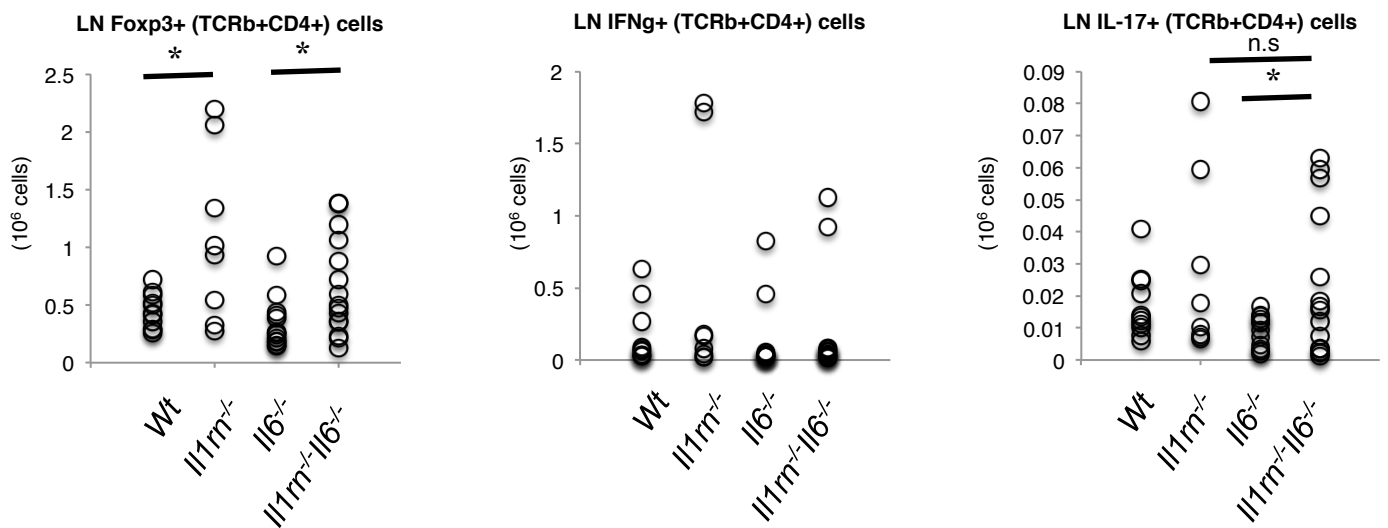


Figure 3. 各遺伝子欠損マウスのThサブセット

リンパ節のCD4⁺ T細胞細胞数。WT, *Il6*^{-/-}, arthritic *Il1rn*^{+/-}, *Il6*^{-/-}, arthritic *Il1rn*^{+/-}*Il6*^{-/-}マウスのリンパ節細胞をPMA/ionomycinで刺激した後、フローサイトメトリーでIFN- γ , IL-17A, Foxp3の発現を解析した。データは3-4匹の \pm SD。2回の実験のうち代表例を示している。

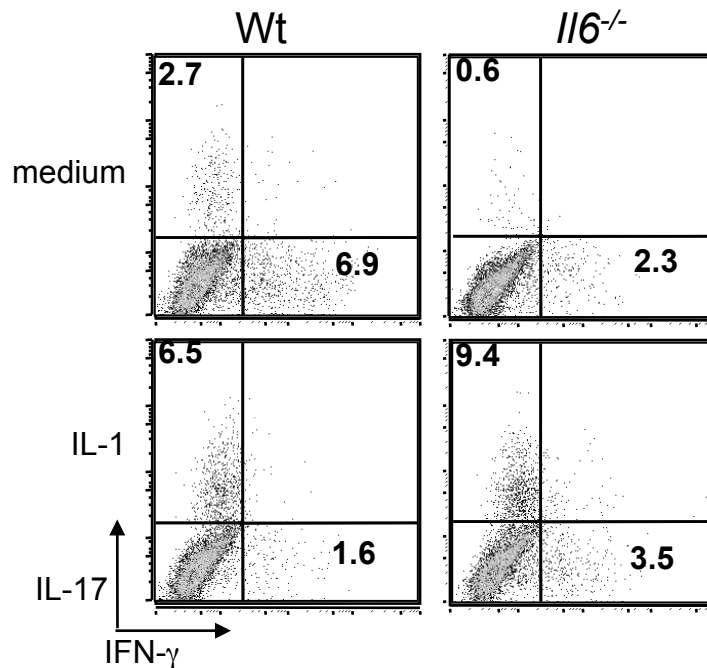


Figure 4. IL-1はIL-6非依存的にCD4⁺細胞からTh17細胞分化を誘導する。

WT または *Il6*^{-/-} マウスのリンパ節からCD4⁺細胞を精製し、IL-1有り無し・anti-CD3 (4 μ g/ml), anti-CD28 (1 μ g/ml), anti-IL-4 (10 μ g/ml), anti-IFN- γ (10 μ g/ml) 存在下で48well Flat Bottom plateを用いて5日間培養した。5日後に細胞を回収し、PMA/ionomycineで5時間刺激した後に細胞内サイトカイン染色を行い、FACSによりCD4⁺細胞からのサイトカイン産生を解析した。数字は各エリアの細胞存在比(%)である。2回の実験のうち代表例を示している。

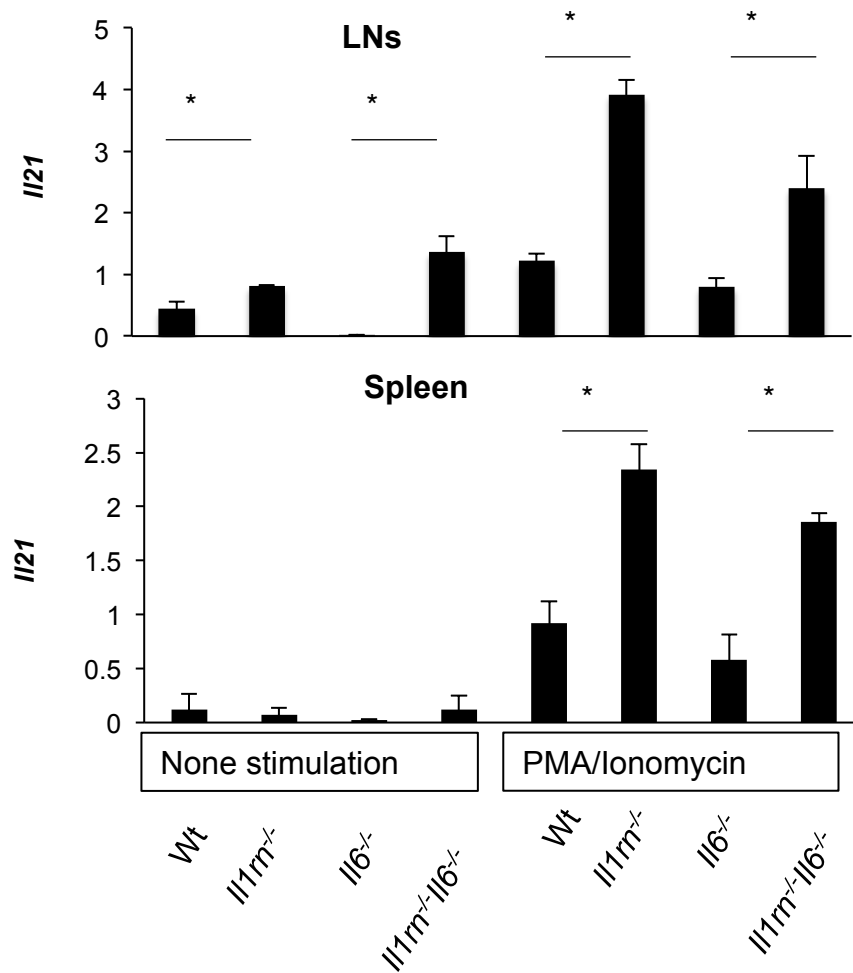


Figure 5. WT, *Il1rn*^{-/-}, *Il6*^{-/-}, *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスの脾臓とリンパ節における*Il21* mRNA発現。
 mRNAは脾臓から精製し、real-time RT-PCRによりIL-21遺伝子の発現を解析した。左の4サンプルは未刺激時、右の4サンプルはPMA/ionomycin刺激を5時間施したもの。全てのデータはGAPDH mRNAにより補正した。n=3。2回の実験のうち代表例を示している

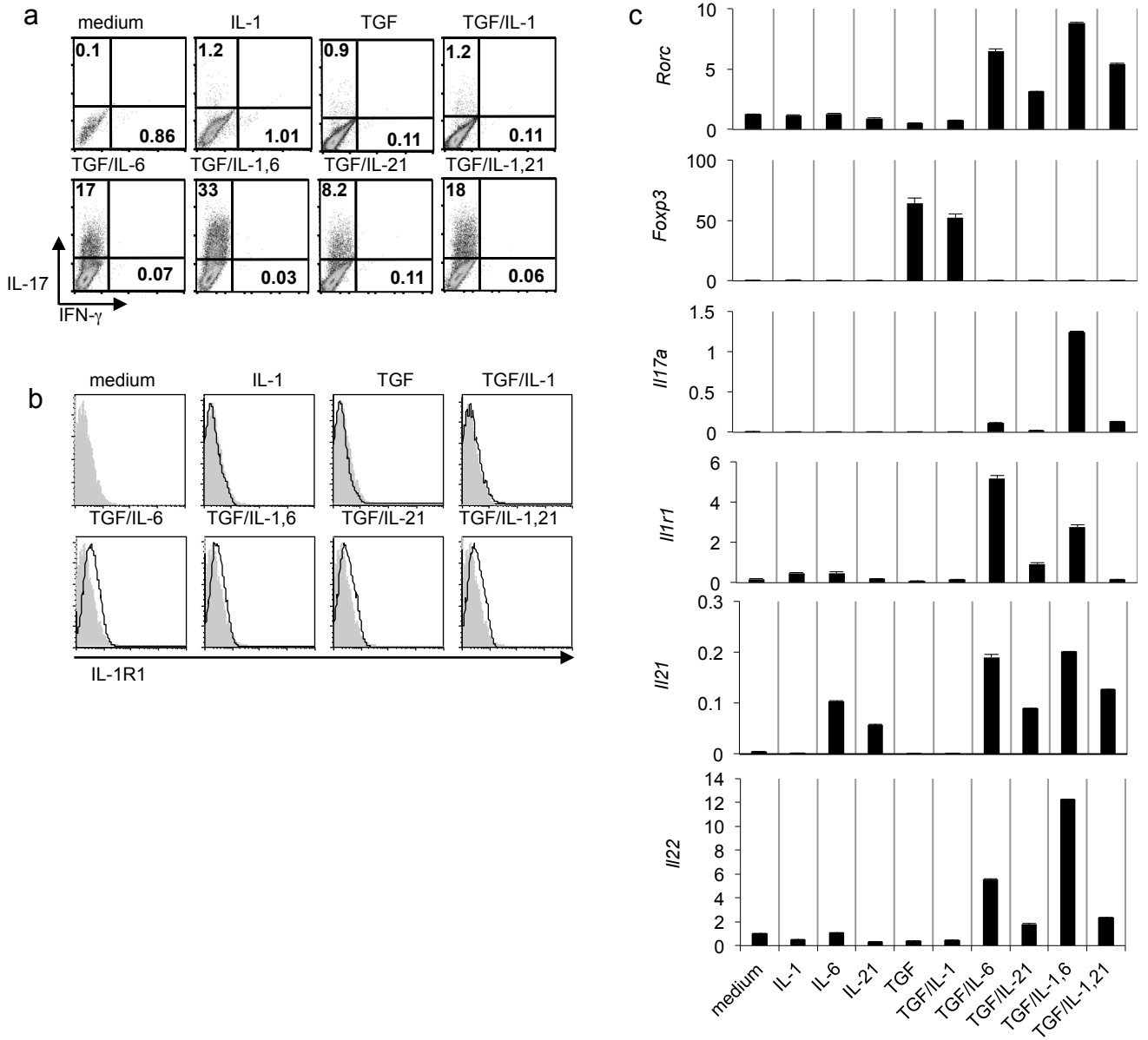


Figure 6. IL-1はIL-6非依存的にTh17細胞分化を誘導する。

(a-b) *In vitro* Th17細胞分化誘導試験。野生型BALB/cAマウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、anti-CD3 (4 μ g/ml)、anti-CD28 (1 μ g/ml)、10 ng/ml; anti-IFN- γ , 10 μ g/ml; anti-IL-4, 10 μ g/ml と図中に示したサイトカイン(TGF- β , 3 ng/ml; IL-6, 40 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml; IL-1, 10 ng/ml)を加えて5日間培養した。細胞内のIL-17A、FN- γ 、細胞表面のIL-1R1はPMA-ionomycin刺激後に染色しFACSにより解析した。数字は各エリアの細胞存在比(%)である。2回の実験のうち代表例を示している。

(b) IL-1Rの発現は (a) に示した細胞培養条件で検討した。Anti-IL-1R1: 黒線、対照群 (培地だけで培養した細胞): 破線。2回の実験のうち代表例を示している。

(c) 野生型BALB/cAマウスからFACSにより精製したnaïve CD4⁺T細胞は、anti-CD3 (4 μ g/ml)、anti-CD28 (1 μ g/ml)、10 ng/ml; anti-IFN- γ , 10 μ g/ml; anti-IL-4, 10 μ g/ml と図中に示したサイトカインを加えて5日間培養した。5日後にmRNAを回収し、各遺伝子のmRNA発現はリアルタイムPCRによって解析した。全てのデータはGAPDH RNAにより補正した。2回の実験のうち代表例を示している。

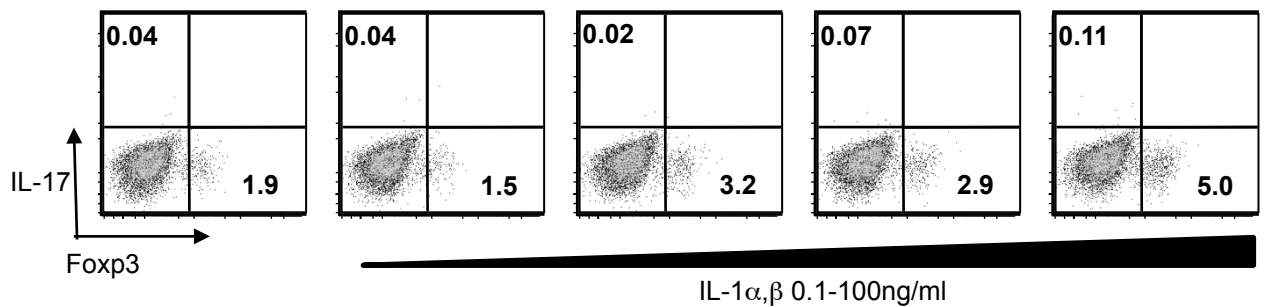


Figure 7 naïve T 細胞はIL-1刺激に反応しない。

FACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、anti-CD3 (4 µg/ml)、anti-CD28 (1 µg/ml)、anti-IFN-γ, 10 µg/ml; anti-IL-4, 10 µg/ml; IL-1(0.1-100 ng/ml)で4日間培養した。4日後、細胞をPMA/ionomycinで再刺激し、抗Fopx3抗体と抗IL-17抗体で染色した後にフローサイトメトリーにより解析した。2回の実験のうち代表例を示している。

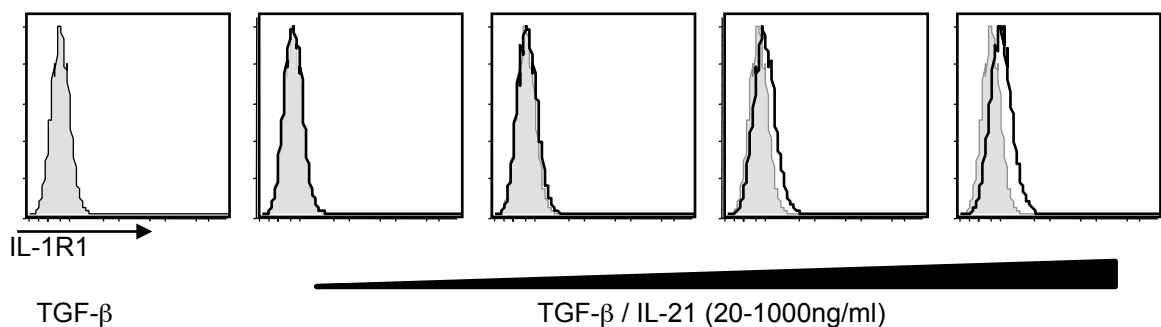


Figure 8 IL-21によるIL-1R1の誘導。

FACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、anti-CD3 (4 µg/ml)、anti-CD28 (1 µg/ml)、anti-IFN-γ, 10 µg/ml; anti-IL-4, 10 µg/ml; TGF-β (3 ng/ml); IL-21 (20, 100, 400, 1000 ng/ml)で4日間培養した。四日後、PMA/ionomycin刺激後に細胞表面のIL-1R1の発現をフローサイトメトリーにより解析した。実線：TGF-βのみで培養した細胞。影線：各サイトカイン条件下で培養した細胞。2回の実験のうち代表例を示している。

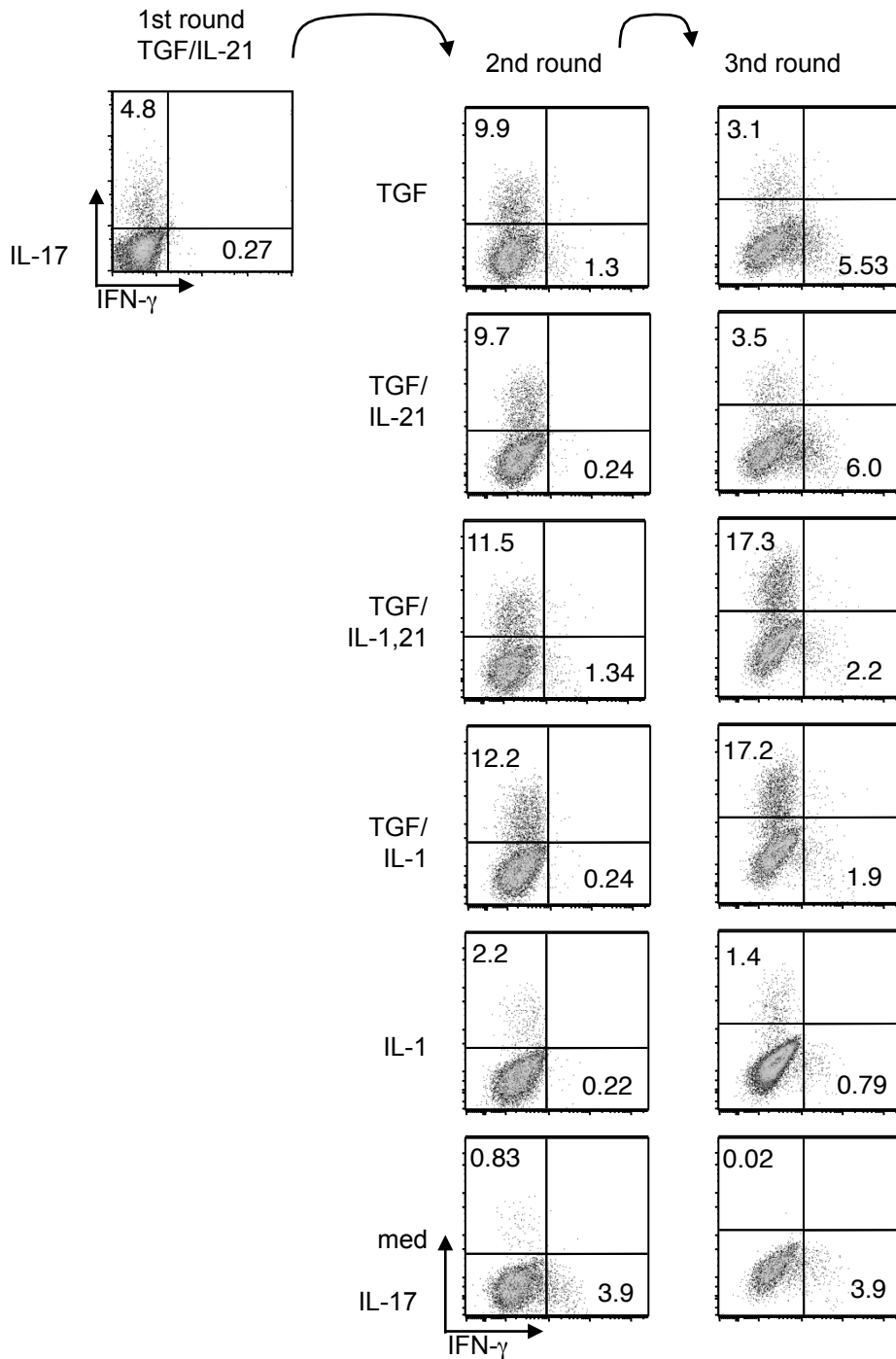


Figure 9 IL-1はTGF- β と協調的にIL-17産生を維持した。

FACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μ g/ml) 、 anti-CD28 (1 μ g/ml) 、 10 ng/ml; anti-IFN- γ , 10 μ g/ml; anti-IL-4, 10 μ g/ml; TGF- β , 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で5日間培養した(1st round culture)。細胞を回収し、サイトカインとanti-IFN- γ , anti-IL-4存在下でanti-CD3、anti-CD28により再刺激をした (各5日)。PMA/ionomycin後、抗IL-17A と抗IFN- γ 抗体で染色してFACSにより解析した。3回の実験のうち代表例を示している。

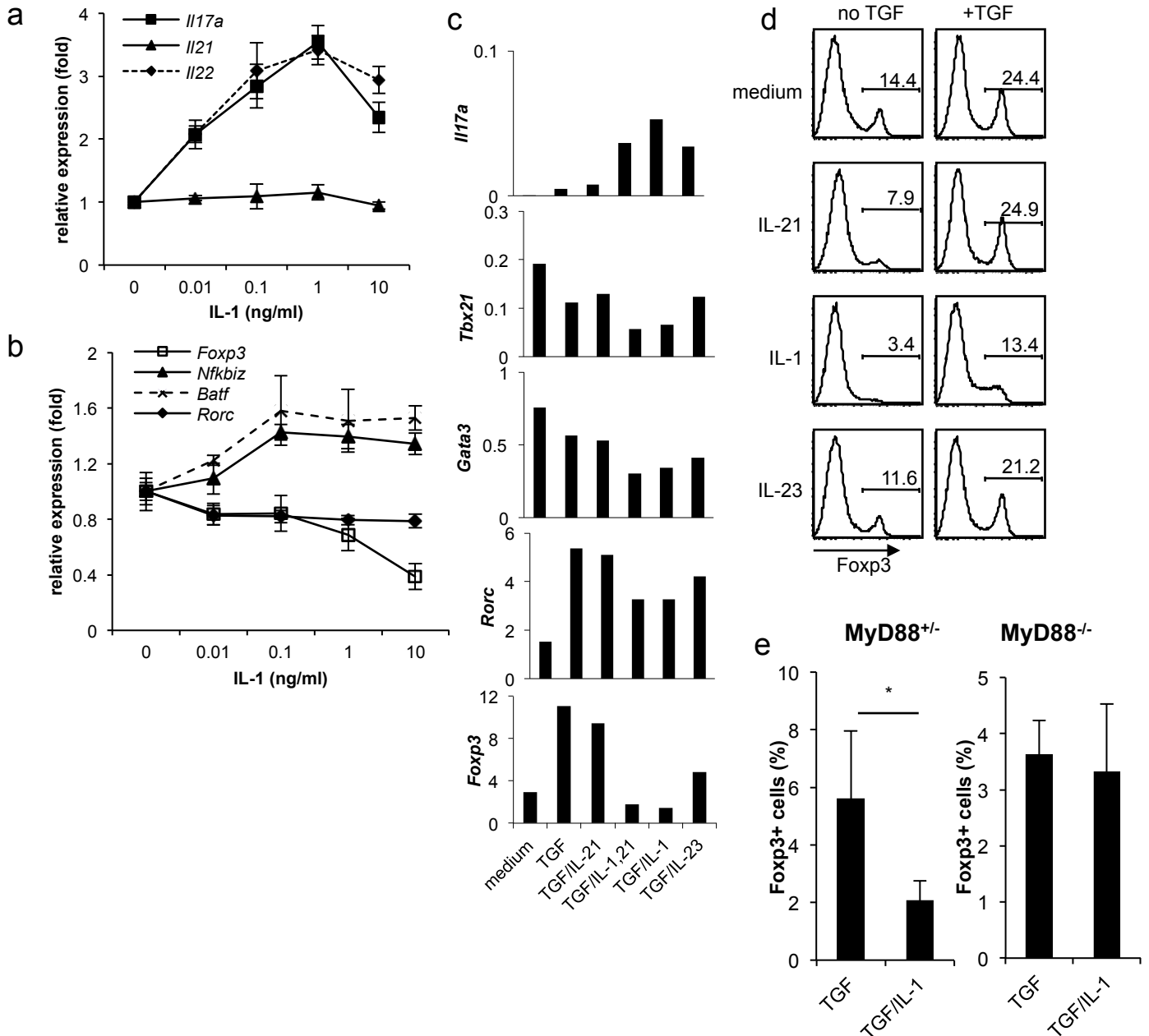


Figure 10. IL-1はin vitroでFoxp3の発現を抑制する。 (a), IL-1はTh17細胞特異的サイトカインと転写因子を誘導する。*Il6*^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で4日間培養した。細胞はIL-1 (0-10 ng/ml)存在下でanti-CD3, anti-CD28で24時間再刺激し、mRNAを精製してReal time PCRによりmRNA発現量を比較した。(a) IL-17AとIL-22発現は亢進していたが、IL-21はIL-1により影響を受けなかった。(b) *Nfkbiz*と*Batf*の発現は増加したが、*Rorc*は増加せず、*Foxp3*は抑制された。全てのデータはGAPDH RNAにより補正した。2回の実験のうち代表例を示している。(c-d), 野生型マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で5日間培養した。細胞は図表中のサイトカイン存在下でanti-CD3, anti-CD28で48時間再刺激し、(c)*Il17a*、*Tbx21*、*Gata3*、*Rorc*、*Foxp3*のmRNA発現量を解析した。全てのデータはGAPDH RNAにより補正した。(d), PMA/ionomycin刺激後にFoxp3を染色してFACSにより解析した。左図: 再刺激時TGF-β非添加 右図: 再刺激時TGF-β添加。数字は各エリアの細胞存在比(%)である。(e) *MyD88*^{+/+}、*MyD88*^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で4日間培養した。細胞は図表中のサイトカイン存在下でanti-CD3, anti-CD28で48時間再刺激し、PMA/ionomycin刺激後にFoxp3を染色しFACSにより発現量を解析した。2回の実験のうち代表例を示している。**P* < 0.05 (student t-test)

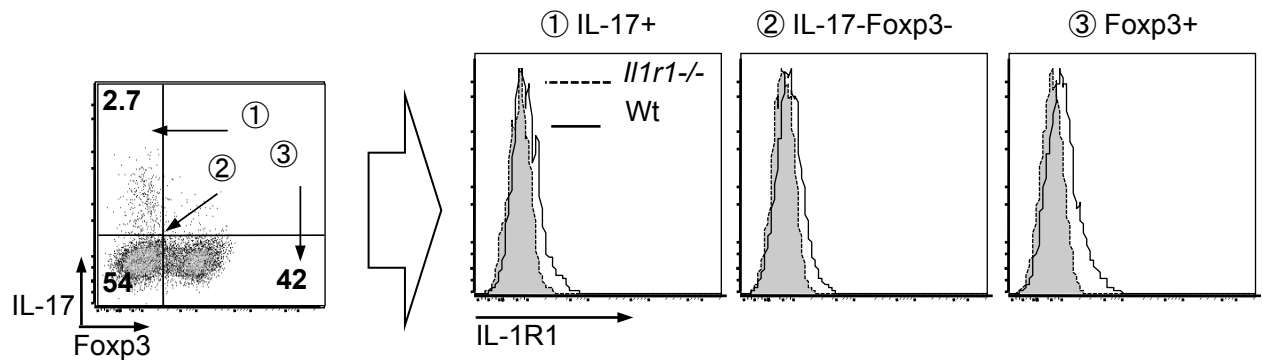


Figure 11. IL-1RはTh17細胞分化誘導条件下で培養するとIL-17⁺細胞とFopx3⁺細胞両方で発現している。

FACSによりソートした野生型または*Il1r1*^{-/-} naïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 µg/ml)、anti-CD28 (1 µg/ml)、anti-IFN-γ, 10 µg/ml; anti-IL-4, 10 µg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で4日間培養した(1st round culture)。4日後、PMA/ionomycin刺激で再刺激した後にIL-1R1、Fopx3、IL-17Aの発現をフローサイトメトリーにより解析した。WT T細胞のIL-1R1の発現は実線で、*Il1r1*^{-/-} T細胞は破線で示した (ネガティブコントロール)。2回の実験のうち代表例を示している。

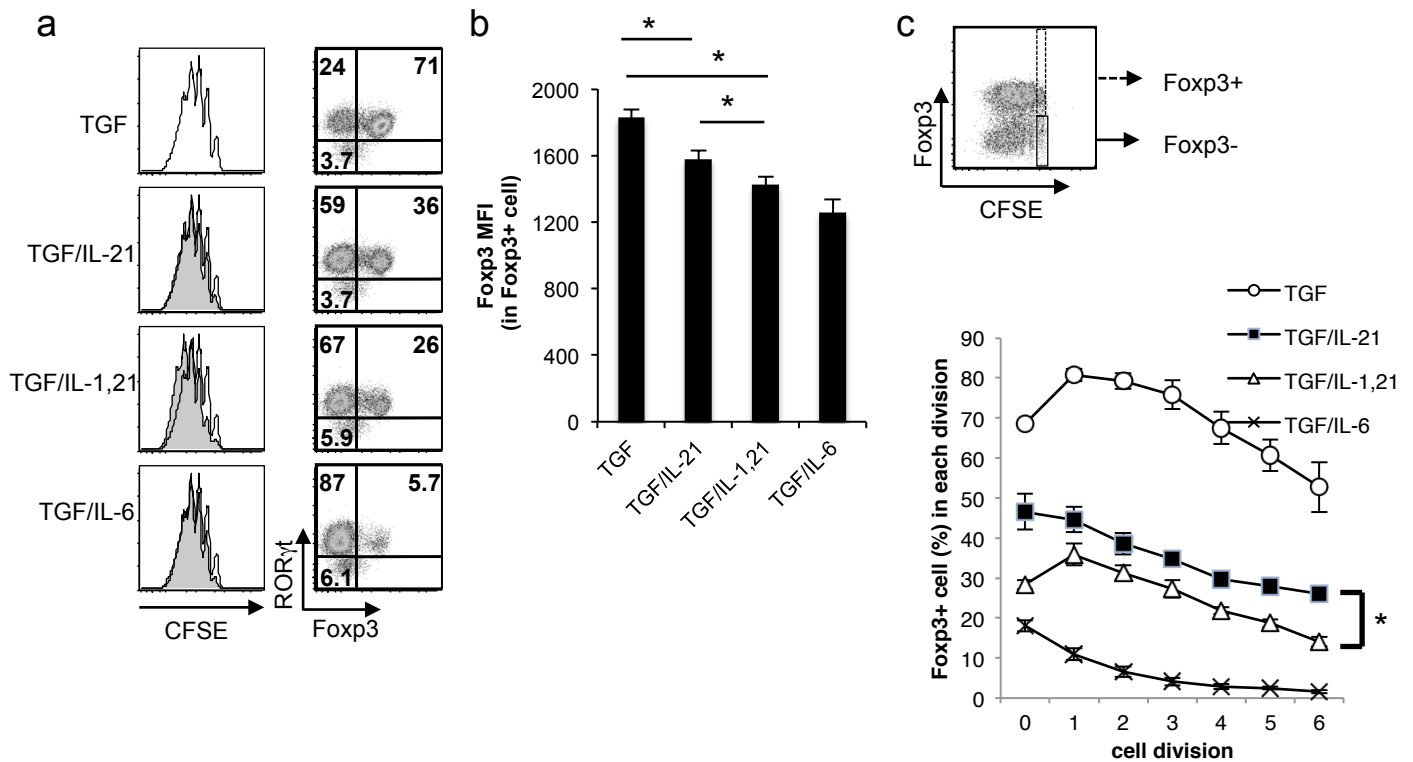


Figure 12. IL-1によるFoxp3下方制御は細胞増殖非依存的だった。

(a) *Il6*^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞をCFSEで標識し、anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ 10 μg/ml、anti-IL-4 10 μg/ml、図表中のサイトカインで刺激して4日間培養した。その後、RORγtとFoxp3の発現を細胞内染色により測定した。数字は各エリアの細胞存在比(%)である。(b) Foxp3の平均蛍光強度(Mean fluorescence intensity; MFI)は(a)の細胞から求めた。(c) 細胞分裂回数ごとのFoxp3⁺細胞の存在比は、CFSEを指標にフローサイトメトリーにより決定した。**P* < 0.05 (student t-test)。3回の実験のうち代表例を示している。

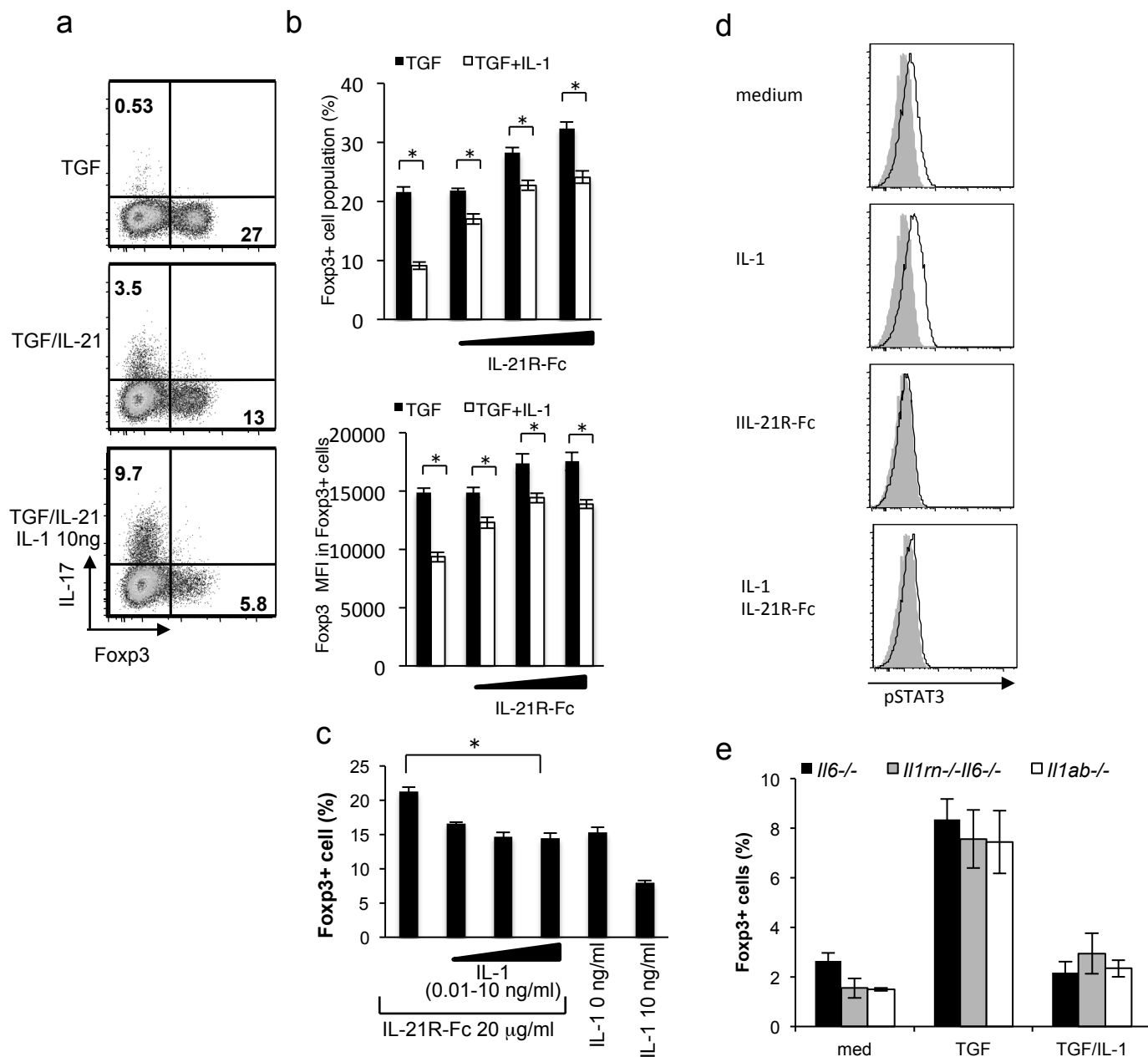


Figure 13. IL-1によるFoxp3下方制御はIL-6やIL-21を介していない。 (a) *Il6*^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; 図中に示したサイトカインで4日間培養した。PMA/ionomycinで再刺激後、Foxp3とIL-17の発現はフローサイトメトリーで解析した。数字は各エリアの細胞存在比(%)である。2回の実験のうち代表例を示している。(b-c) *Il6*^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で4日間培養した。細胞はサイトカインとIL-21R-Fc (1-15 μg/ml) 存在下でanti-CD3、anti-CD28により2日間再刺激した。Foxp3の発現は、FACSで解析した。上図: Foxp3⁺細胞の割合(%)、下図: Foxp3 MFI。(c-d) Th17細胞分化条件下で培養した細胞をIL-1 (10 ng/ml)とIL-21R-Fc (20 μg/ml)存在下でanti-CD3、anti-CD28によって2日間再刺激した後にFoxp3とpSTAT3を染色した。**P*<0.05 (student t-test)(e) IL-1によるFoxp3の下方制御はIL-6、IL-1α/IL-1β、IL-1Raの欠損に影響されない。*Il6*^{-/-}、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}、*Il1ab*^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、10 ng/ml; anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で4日間培養した。細胞はanti-CD3、anti-CD28、サイトカイン存在下で2日間再刺激してFoxp3を染色した。2回の実験のうち代表例を示している。

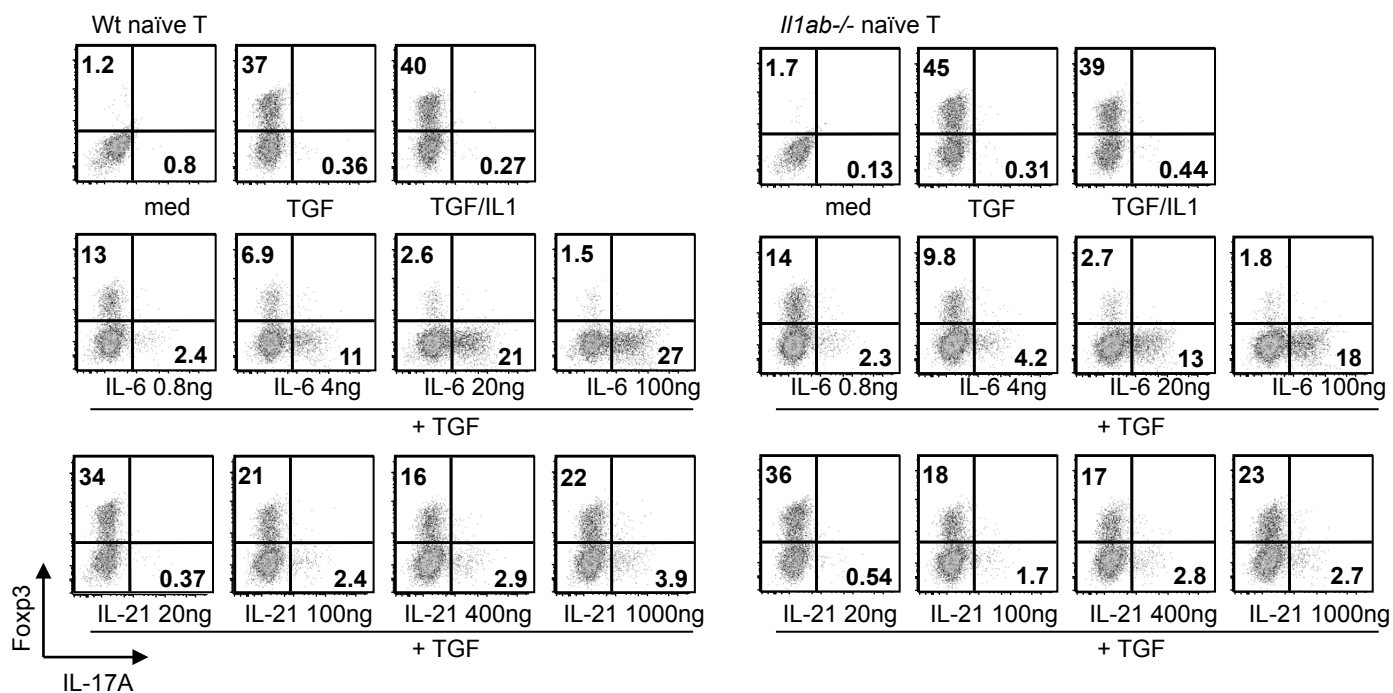


Figure 14. IL-6やIL-21によるFoxp3発現抑制やIL-17発現亢進はIL-1非依存的であった。

FACSによりソートした野生型または*Il1ab*^{-/-} naïve CD4⁺T細胞を、TGF-β: 3 ng/ml, IL-6: 40 ng/ml or IL-21: 100 ng/ml, anti-IFN-γ: 10 μg/ml, anti-IL-4: 10 μg/ml; anti-CD3 (4 μg/ml); anti-CD28 (1 μg/ml) で4日間培養した。細胞はPMA/ionomycin再刺激後にIL-17A, Foxp3の発現をフローサイトメトリーにより解析した。数字は各エリアの細胞存在比(%)である。2回の実験のうち代表例を示している。

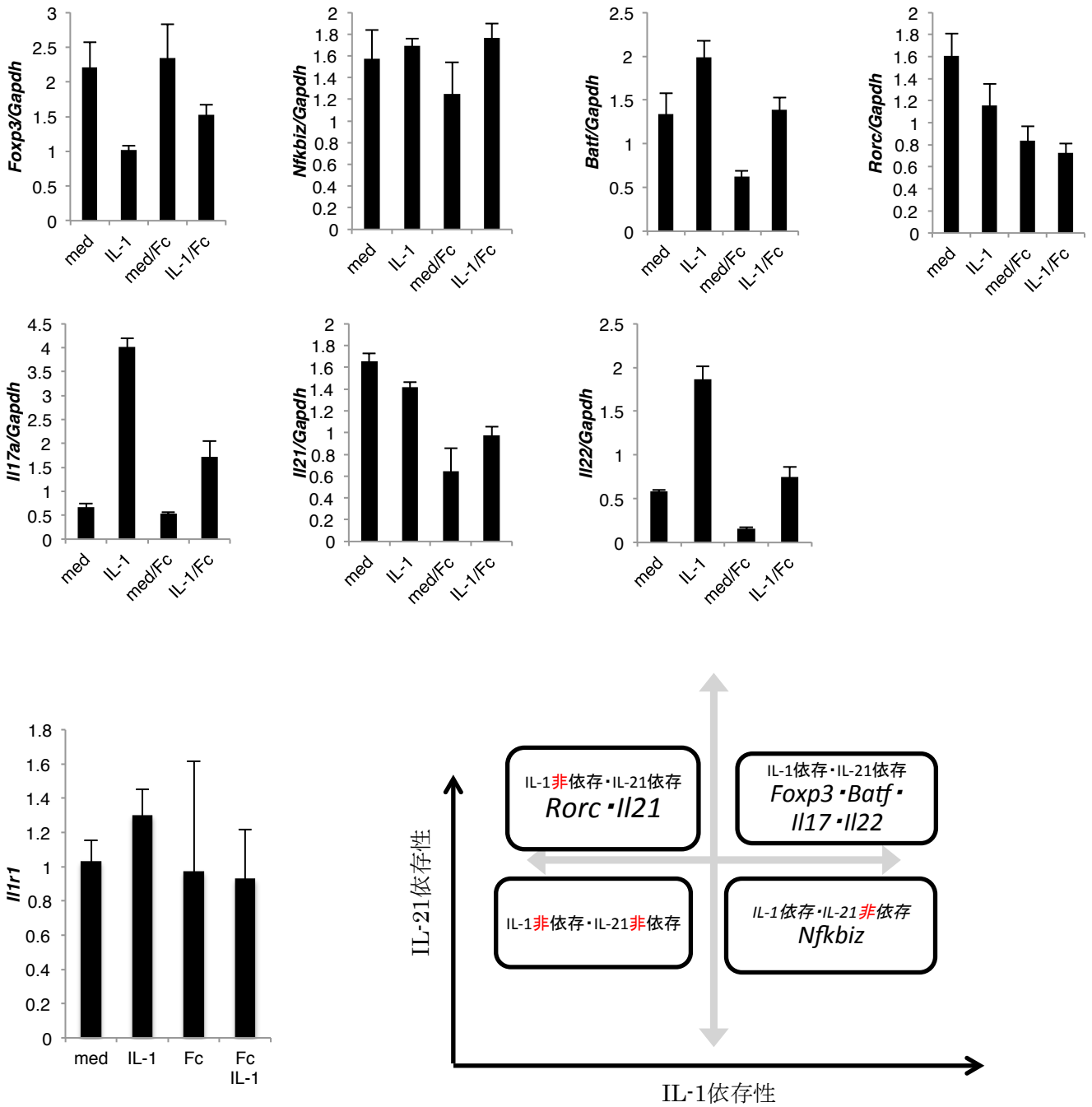
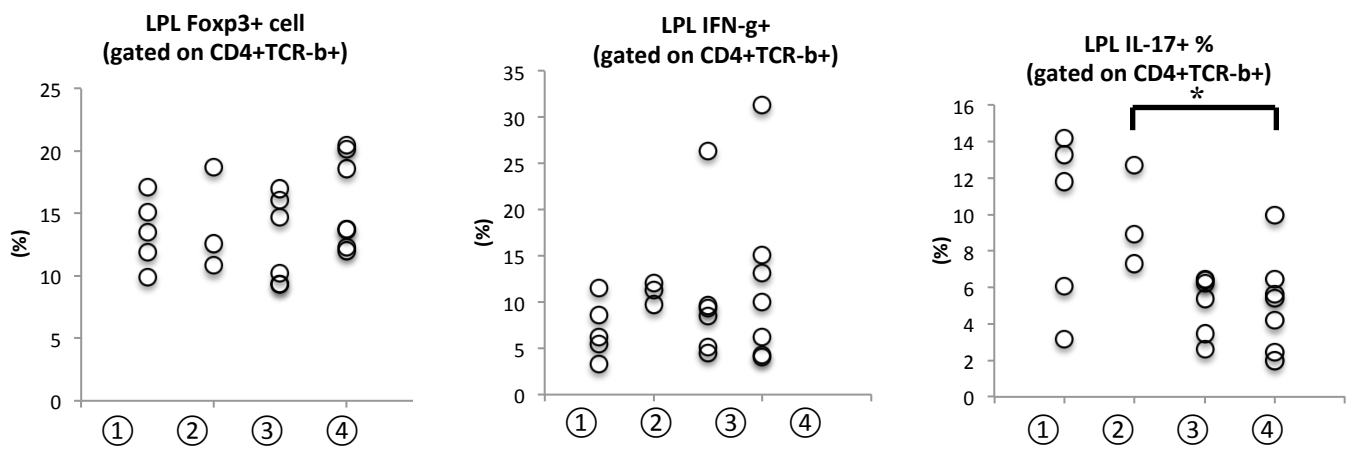


Figure 15. IL-1とIL-21は異なる遺伝子の発現を制御する

Il6^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で4日間培養した。細胞はIL-1 (10 ng/ml)、IL-21R-Fc (20 μg/ml)存在下でanti-CD3, anti-CD28で24時間再刺激し、mRNAを精製してReal time PCRによりmRNA発現量を比較した。2回の実験の代表例を示している。

小腸LPL



- ① Wild type
- ② *Il1rn*^{-/-}
- ③ *Il6*^{-/-}
- ④ *Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}

Figure 16. IL-1とIL-21は異なる遺伝子の発現を制御する

野生型、*Il1rn*^{-/-}、*Il6*^{-/-}、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスの小腸（パイエル盤を除く）から上皮細胞を除去し、コラゲナーゼ処理により小腸粘膜固有層リンパ球（小腸LPL）を回収した。回収したLPLをPMA/ionomycinで5時間刺激した後、細胞内染色をしてFoxp3、IFN- γ 、IL-17の発現をFACSにより解析した。

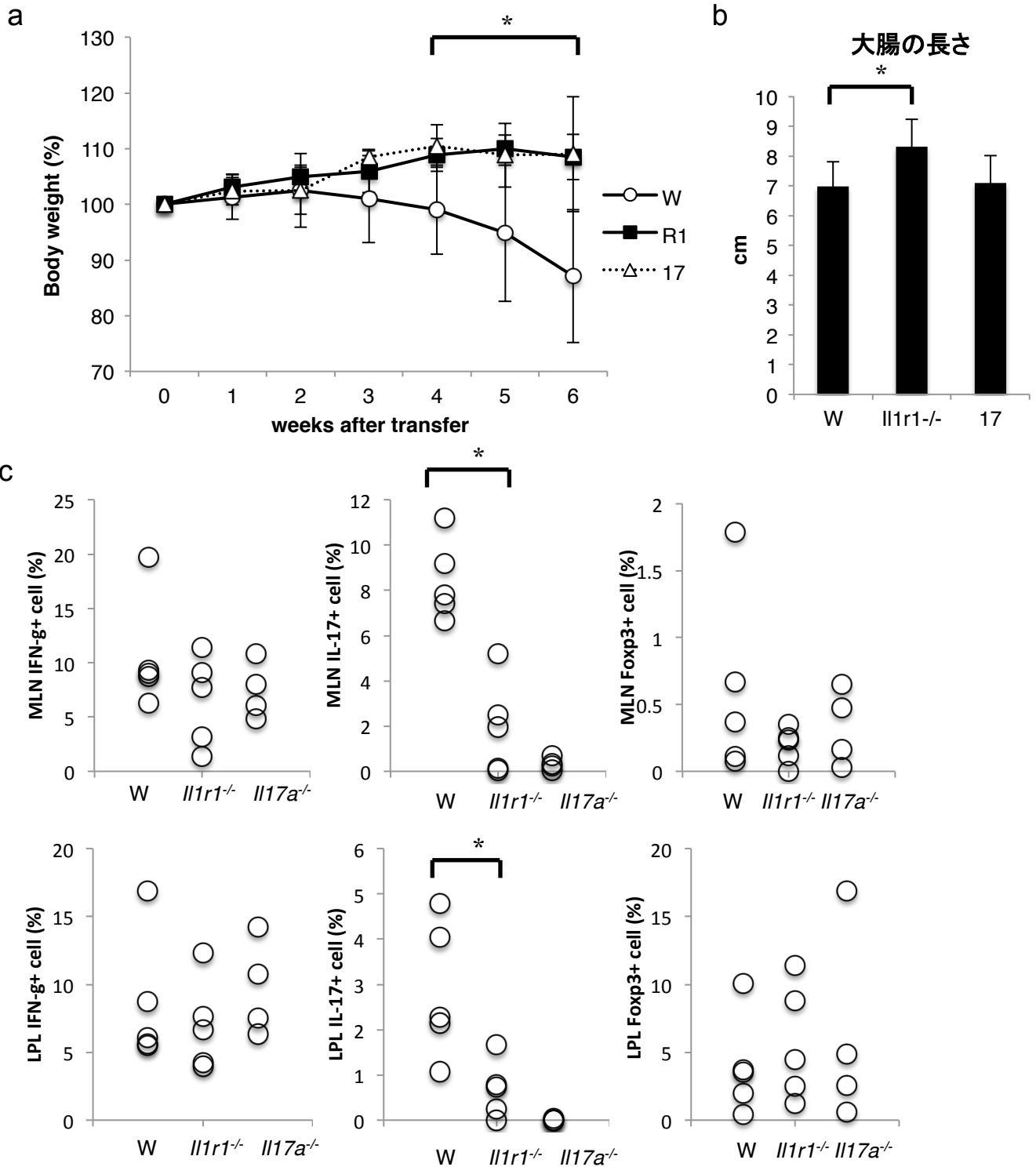


Figure 17. IL-1はin vivoでもTh17細胞分化に重要で、IL-17依存的大腸炎を悪化させる、
 野生型、*Il17a*^{-/-}、*Il1r1*^{-/-}マウスのCD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁺細胞を*Rag2*^{-/-}マウスに移植して大腸炎を誘導した。
 (a) 移植後の体重変動。移植当日から1週間おきに体重を測定した。野生型:*Il1r1*^{-/-}移植マウス p<0.05 (student t-test)
 (b) 移植6週間後の大腸の長さ。野生型:*Il1r1*^{-/-}移植マウス p<0.05 (student t-test)
 (c) 移植6週間後にMLNを回収。また小腸 (パイエル盤を除く)から上皮細胞を除去し、コラゲナーゼ処理により小腸粘膜固有層リンパ球 (小腸LPL)を回収した。回収したリンパ球をPMA/ionomycinで5時間刺激した後に、細胞内染色をしてFoxp3、IFN-γ、IL-17の発現をFACSにより解析した。野生型:*Il1r1*^{-/-}移植マウス p<0.05 (student t-test)

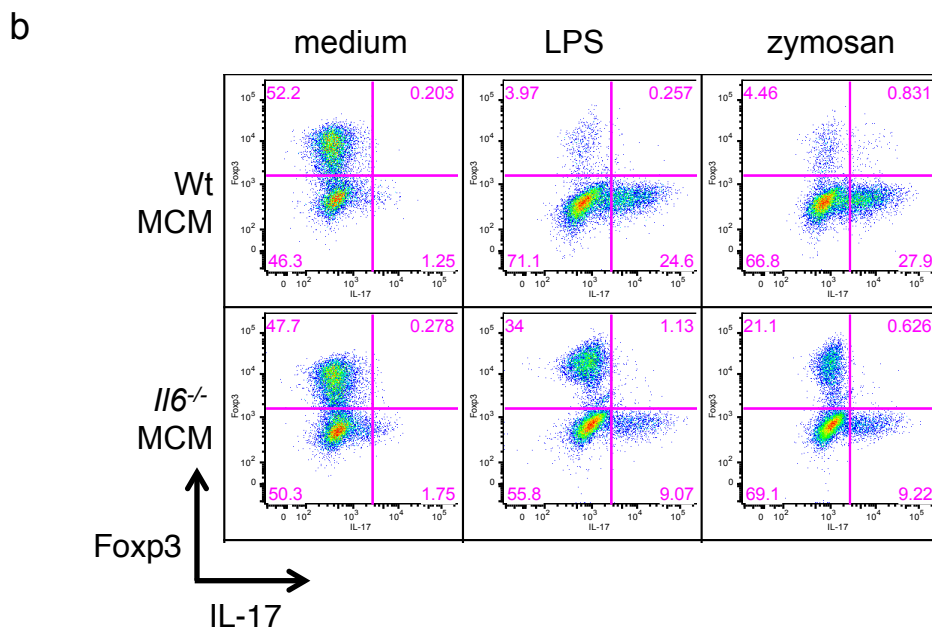
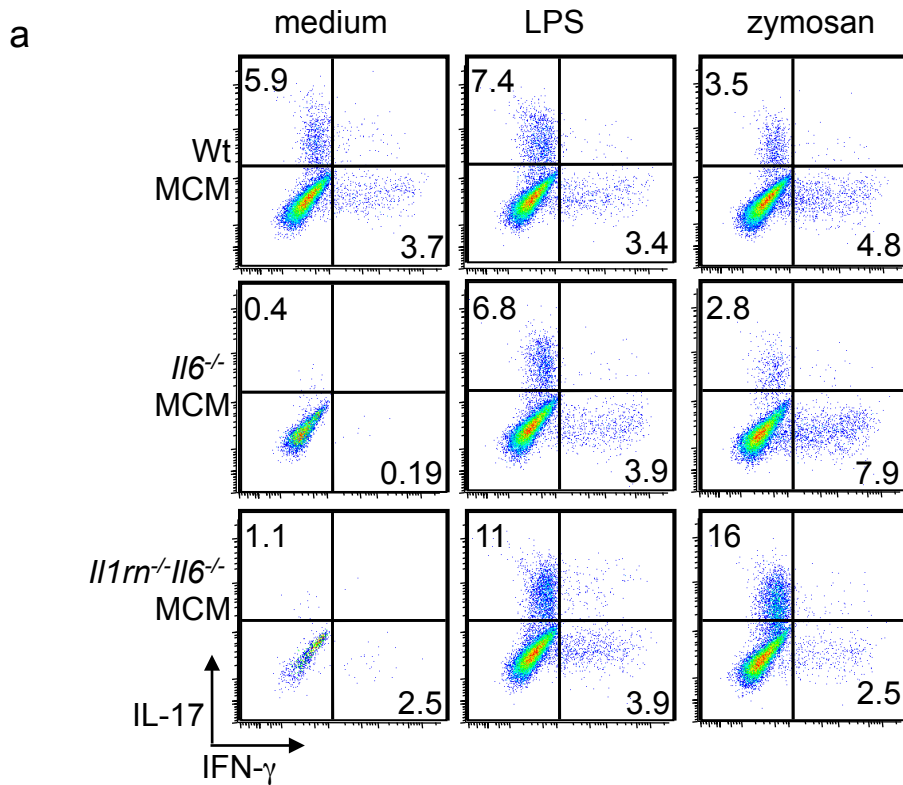


Figure 18. *Il1rn*^{-/-}マクロファージ培養上精はIL-6非依存的にTh17細胞を増加させる。

(a) 野生型、*Il6*^{-/-}、*Il1rn*^{-/-}*Il6*^{-/-}マウスのTGC誘導マクロファージを二日間LPSとzymosanで刺激した培養上精(MCM)を用いて、*Il6*^{-/-}CD4⁺細胞をanti-CD3、anti-CD28、anti-IFN-γ、atni-IL-4存在下で5日間培養した。5日後に、PMA/ionomycinで再刺激し、細胞内サイトカイン染色をしてFACSにより解析した。2回実験したうちの代表例を示している。

(b) naïve T細胞を、anti-CD3、anti-CD28、anti-IFN-γ、atni-IL-4、TGF-β (3 ng/ml)、CM存在下で5日間培養した。5日後に、PMA/ionomycinで再刺激し、細胞内サイトカイン染色をしてFACSにより解析した。

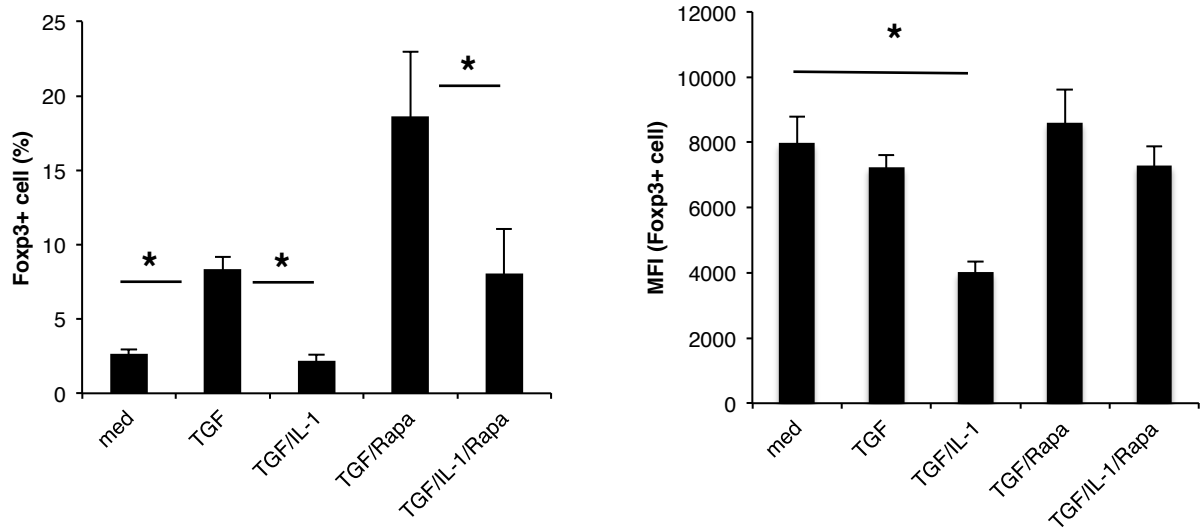


Figure 19. IL-1はmTORを介してFoxp3の発現を抑制している。

Il6^{-/-}マウスからFACSによりソートしたnaïve CD4⁺T細胞を、Th17細胞分化条件下 (anti-CD3 (4 μg/ml)、anti-CD28 (1 μg/ml)、anti-IFN-γ, 10 μg/ml; anti-IL-4, 10 μg/ml; TGF-β, 3 ng/ml; IL-21, 100 ng/ml) で4日間培養した。細胞はサイトカインとRapamycin 50 ng/ml存在下でanti-CD3、anti-CD28により2日間再刺激した。Foxp3の発現は、FACSで解析した。左図: Foxp3⁺細胞の割合 (%) ,右図: Foxp3 MFI。**P*<0.05 (student t-test)

IL-1によるTh17細胞分化制御モデル

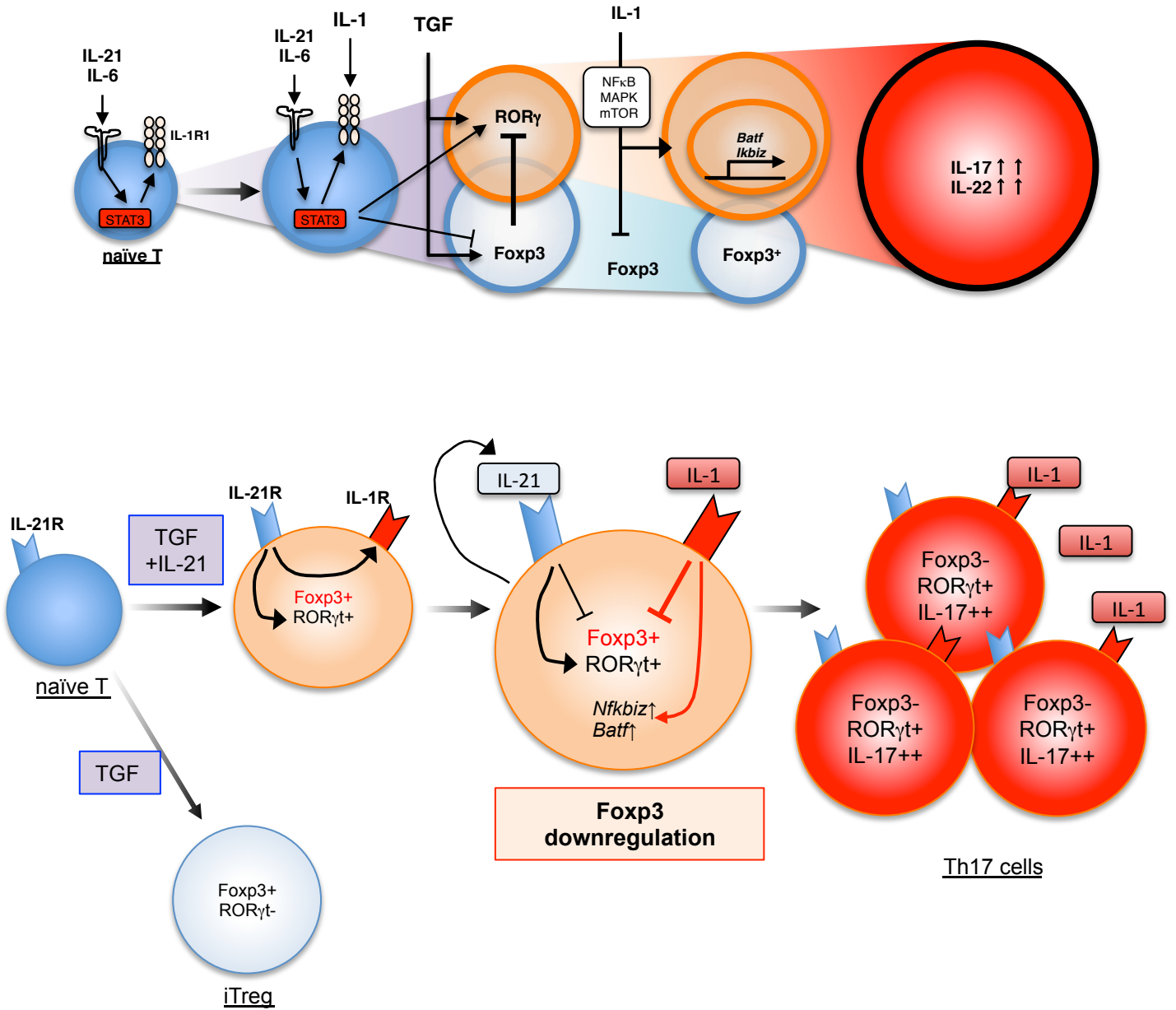


Figure 20 本研究のモデル

Th17分化に対するIL-1の役割。IL-21はIL-1R1の発現をnaive T細胞上に誘導し、TGF- β がFop3とROR γ 両方を誘導する。IL-1,IL-6,IL-21がFop3を抑制し、Th17細胞が分化する。

謝辞：

本研究の機会を与えて頂き、温かい御指導を頂い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 岩倉洋一郎教授に厚く御礼申し上げます。

直接の実験指導及び研究の方向性を議論して下さいました西城忍博士に心から感謝申し上げます。

長きにわたり有意義な議論と提言をして頂くとともに叱咤激励して下さいました、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助教の角田茂博士、西城忍博士に心より感謝いたします。

毎日の研究生活において様々な御助力、御助言を頂きました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心から感謝いたします。実験の為に犠牲になったマウスに感謝いたします。

最後に、学費などを援助して研究生活を支えてくれた両親に感謝いたします。