

博士論文

論文題目

関節炎モデルにおける

Peptidylarginine deiminase type 4 の機能解析

氏名 瀬理 祐

目次

要旨	1 ページ
序文	2 ページ
方法	9 ページ
結果	24 ページ
考察	33 ページ
謝辞	41 ページ
参考文献	42 ページ

要旨

Peptidylarginine deiminase type 4 (PADI4) は関節リウマチ(Rheumatoid arthritis ; RA) の疾患感受性遺伝子として報告され、主に骨髄球系細胞に発現する。PAD4 は蛋白シトルリン化による遺伝子発現調節等の機能を有する。今回、DBA/1J *Padi4* knockout (KO)マウスを用いた Recombinant human Glucose-6-phosphate isomerase (rhGPI) 誘導性関節炎モデルで *Padi4* の機能解析を行った。*Padi4* KO では関節炎の軽症化、病理所見の改善、血清抗 GPI 抗体低下、血清 IL-6 低下を認めた。また、免疫後リンパ節の T helper17 細胞の減少を認めた。更に、*Padi4* KO マウスでは脾臓の骨髄球系細胞減少と *in vitro* の *Padi4* 欠損好中球の寿命短縮を認めた。以上より、*Padi4* 遺伝子は免疫系において多彩な作用を持ち、関節炎の病態に関与していると考えられた。

序文

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis ; RA) は持続する破壊性の多関節炎を特徴とする疾患で、一部の症例では全身に臓器障害を合併しうる自己免疫疾患の一つであり、全世界での有病率は約 0.5~1%とされている[1]。RA の病因については複数の環境因子、遺伝因子の関与が示唆されているものの依然として完全には明らかでない[2]。近年、一塩基多型のゲノムワイド関連解析を用いて様々な疾患の遺伝因子の検索が行われており、RA においても同手法を用いた多くの大規模研究が施行され、HLA-DRB1 を始めとした様々な RA の疾患感受性遺伝子が報告されているが[3]、2003 年に non-MHC 遺伝子の RA の疾患感受性遺伝子ではペプチジルアルギニンデイミナーゼ タイプ 4 (*Peptidylarginine deiminase type 4 ; PADI4*) が初めて報告された[4]。その後もアジア人では同遺伝子の RA における関与が相次いで報告されたものの[5, 6]、欧米人では関連が確認されず[7, 8]、欧米人での RA と *PADI4* との関連には議論があった。しかし、現在は欧米人においてもサブグループではアジア人に比して弱いものの RA と関連があるとする見解で一致している[9]。さらに、現在までの他の自己免疫疾患における遺伝学的検討と比較したところ、non-MHC 遺伝子では *PADI4* と *CCL21* は RA でのみ関連が報告されて

おり、*PADI4*はRAの病態形成における重要な遺伝因子と考えられている [10]。

*PADI4*は蛋白質のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する翻訳後修飾能を有するPAD蛋白質をコードする*PADI*遺伝子の一つである。これらのPAD蛋白質に共通する酵素活性であるシトルリン化(脱イミノ化)によってCa²⁺存在下に基質蛋白質の陽電荷を有するアルギニン残基から中性のシトルリン残基に変換することで蛋白質の構造的、機能的な変化を惹起すると考えられている [11]。脊椎動物では*PADI1*~4, 6の5種類の*PADI*遺伝子が報告されており、ヒト*PADI*遺伝子は一番染色体、マウス*Padi*遺伝子は4番染色体に全てのサブセットがクラスターを形成して位置している [11]。PAD2蛋白質は全身の様々な細胞に恒常的に発現しているが、PAD1, 3蛋白質は皮膚等の比較的に限定した組織でのみ発現が確認されており、PADI6遺伝子は卵、胚細胞での発現が報告されている [11]。そして、PAD4蛋白質はPAD2と異なり炎症で誘導される蛋白質であると考えられており、主に骨髓球、顆粒球系といった血球系細胞や様々な悪性腫瘍での発現を認める [11, 12]。RA患者の炎症滑膜組織ではミエロイド系浸潤細胞に加えて血管内皮細胞、繊維芽細胞、滑膜表層細胞においてもPAD4蛋白質の発現亢進を認め、これらの細胞と一致した細胞外領域におけるシトルリン化蛋白質の沈着が報告されている [13, 14]。脊椎動物の免疫系細胞において特

に重要な *PADI* サブセットとしては、生体内で広範囲の細胞に発現する *PADI2* と主に血球系の細胞に限局して発現する *PADI4* であると考えられている。

PAD2 蛋白と *PAD4* 蛋白の酵素活性には機能や基質等の面で多くの違いが報告されている[15]。そして、*PADI4* のみは他の *PADI* サブセットと異なり核内移行シグナル (Nuclear Localization signals : NLS) を有しており[16]、ヒストンをシトルリン化することによるメチル化の競合阻害が遺伝子翻訳を抑制することが報告されている[17, 18]。また、*PAD4* が一部の転写因子をシトルリン化することによって間接的に遺伝子翻訳を惹起するといった報告もなされている[19]。また、*PAD4* によって直接的、間接的に p53 蛋白を制御することで細胞周期 G1 期の停止を解除したりアポトーシス誘導物質を抑制したりするとの報告がなされており[20-22]、*PAD4* が細胞増殖、アポトーシスに関与する可能性も示唆されている。最近、血球系細胞である骨髄多能性幹細胞の分化増殖にも *Padi4* が関与するとの報告がなされ、*Padi4* の欠損によって骨髄多能性幹細胞の増加を呈するとされている[23]。さらに、好中球の重要な抗細菌活性の一つである Neutrophil extracellular traps (NETs) の形成において、*PAD4* によるヒストンのシトルリン化に伴う核クロマチンの凝集の重要性が報告されている[24]。以上のように *PAD4* はシトルリン化活性によって遺伝子翻訳、細胞増殖、NETs 形成といった多彩な現象に関与すると考えられている。

RA 患者ではシトルリン化された α エノラーゼ, ビメンチン, フィブリノーゲンなどの自己抗原に対する自己抗体 (Anti citrullinated peptide antibody ; ACPA) の特異度が概ね 90%以上と非常に高いことが知られている [25-29]。そして、人工的な環状シトルリン化ペプチド抗原に反応性を有する血清抗 Cyclic-Citrullinated Peptide (CCP) 抗体の存在は RA の診断における特異度が 90-98%と非常に高いことから臨床において汎用されている [30-32]。さらに、抗 CCP 抗体陽性症例の約 40%では関節症状に約 5 年先行して抗体が出現していることが報告されており、同抗体が RA の発症過程に関与している可能性が考慮されている [33]。また、抗 CCP 抗体陽性は骨破壊の危険因子であることが報告されており [34, 35]、ACPA の一つである抗シトルリン化ビメンチン抗体によって破骨細胞の分化誘導, 活性化を介して骨吸収が亢進することが示されていることから [36]、RA において ACPA が何らかの機序で骨破壊に関与している可能性が考慮されている。従来、喫煙, 炎症等といった組織障害を惹起する原因によって局所における PAD を有する細胞の集積, アポトーシスに伴って PAD 蛋白の増加を来し、結果としてシトルリン化蛋白の産生亢進と ACPA の出現といった仮説が示唆されていた [37]。また、RA 感受性アレルでは *PADI4* の messenger RNA (mRNA) の安定性が増すことが示されており、結果として PAD4 蛋白の過剰な産生による様々な蛋白のシトルリン化の亢進が示唆されて

いる[4]。これらの知見を鑑みると、*PADI4*のRA感受性アレルを有する個人では、PAD4蛋白の増加によって様々な蛋白質が過剰なシトルリン化を受けて抗原性を有し、結果として抗シトルリン化蛋白抗体の出現やRA発症の可能性が高くなるといった仮説が考えられた。一方で、近年、抗CCP抗体陰性のRA患者においても*PADI4*遺伝子が骨破壊の独立したリスクであることが相次いで報告されており[38, 39]、関節リウマチの病態形成における*PADI4*の役割についても従来のシトルリン化蛋白の過剰産生に伴うACPAの出現といった仮説以外での役割が示唆されている。さらに、*PADI4*のRA感受性遺伝子の変異部分はPAD4蛋白の酵素活性を有するC末端領域ではなくNLSを有するN末端領域に位置しており[40]、分子学的にもシトルリン化活性以外の異常を呈している可能性が考慮された。

今回、我々はヒト*PADI4*のカウンターパートであるマウス*Padi4*のエクソン1欠損した*Padi4* knockout (KO) マウスを用いて、関節炎をモデルとした獲得免疫応答における*Padi4*の役割を検討した。現在、C57BL/6マウスの様々な免疫系細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した多施設共同のプロジェクトであるImmunological Genome Project (ImmGen project) によるデータベース作成が進行しており[41]、ヒトと同様にマウスにおいても*Padi4*は骨髄球系、顆粒球系の細胞で著明に発現しているが他の細胞群では概ね低発現であること

が同データベースで示されている。マウス関節炎モデルにおける *Padi4* KO マウスを用いた報告として、自己抗体依存型の関節炎モデルである K/BxN 血清移入関節炎でなされているが、この報告では *Padi4* KO マウスは関節炎の改善を認めなかったと報告されている[42]。また、PAD 阻害薬である N-a-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide (Cl-amidine) を Collagen induced arthritis (CIA) や Collagen antibody induced arthritis (CAIA) といった他の関節炎モデルに投与することによって PAD4 阻害の作用を検討した報告もなされているが、CIA では抗 II 型コラーゲン抗体の低下を伴って関節炎の改善を認めるものの、CAIA では改善を認めなかったと報告されている[43]。

以上のように、K/BxN 血清移入関節炎や CAIA といった抗体依存型の関節炎モデルにおいては PAD4 の欠損、阻害による関節炎の改善を認めないことから、関節炎期の免疫反応、特に組織障害には PAD4 は重要でない結論付けられている[42]。今回の我々の研究ではマウス自己免疫疾患モデルとして Recombinant human Glucose-6-phosphate isomerase (rhGPI) 誘導性関節炎モデルを用いた。Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) は K/BxN 関節炎モデルにおける関節炎誘発原性を有する自己抗体の抗原として同定された生体内に普遍的に存在する解糖系酵素の一つである[44-46]。そして、DBA/1J マウスへの rhGPI の免疫によって約 7 日後より発症して約 14 日後頃より自然軽快す

る関節破壊を伴う四肢関節炎を惹起できることが報告されている[47]。rhGPI誘導性関節炎は全経過において抗マウス CD4 抗体による CD4⁺ 細胞の除去や発症前、発症早期での抗マウス IL-17 抗体、抗マウス IL-6 受容体抗体による IL-17, IL-6 の阻害によって関節炎の著明な改善を認めることから、関節炎の発症と持続における CD4⁺ T 細胞, 特に T helper 17 (Th17) 細胞や IL-17, IL-6 の重要性が示唆されている関節炎モデルである[47, 48]。また、B 細胞は免疫早期において抗原提示細胞としても機能するが[48, 49]、抗 GPI 抗体価は関節炎の重症度と相関しないものの B 細胞欠損マウスや Fc γ 受容体欠損マウスでも関節炎の著明な改善を認めることから、B 細胞が rhGPI 誘導性関節炎の発症には重要であることが示唆されている[47, 50]。このように、rhGPI 誘導性関節炎は T 細胞, B 細胞といった獲得免疫系が発症に重要なモデルである。本研究では *Padi4* KO マウスにおける rhGPI 誘導性関節炎モデルを解析することにより、関節炎における *Padi4* の役割を解析するとともに、獲得免疫反応における *Padi4* の機能を検討した。

方法

マウス

DBA/1J Wild Type (WT) マウスは日本エスエルシー（静岡，日本）から購入した。*Padi4* KO マウスは理化学研究所にて C57BL/6 マウスの 4 番染色体上に位置する *Padi4* のエクソン 1 をネオマイシンカセットに置換する方法で作製されており、DBA/1J strain にバッククロスしたうえで、理化学研究所より同マウスの提供を受けた。実験で使用したマウスは当施設の specific pathogen free 環境で飼育した。動物実験の実施については当施設の動物実験委員会の認可を得た上で倫理規定に従って実施した。

Glutathione-S-transferase-tagged rhGPI (GST-rhGPI) 蛋白精製

筑波大学膠原病内科より rhGPI を pGEX4T-3 (GE healthcare ; Amersham, UK) に組み込んだベクターを BL-21 大腸菌株に導入したグリセロールストックの提供を受け、GST-rhGPI 蛋白を後述のとおり精製した。大腸菌を 100 μ g/ml アンピシリン (Meiji Seika ファルマ ; 東京, 日本) を添加したルリア基礎培地 (Invitrogen ; California, USA) で 37 $^{\circ}$ C 140rpm 12 時間の前培養を行った。本培養培地用量の 1% 量の前培養培地を添加して 37 $^{\circ}$ C 140rpm で本培養を開始し、OD600 0.6 となった時点でイソプロピル- β -チオガラクトピラノ

シド (Invitrogen) を最終濃度 0.1mM となるよう添加後に 30°C 140rpm 20 時間と温度変更して培養を継続した。培養終了後に遠心分離にて上清を廃棄し、菌体溶解液として 50mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 (ニッポンジーン, 東京, 日本), 400mM 塩化ナトリウム (和光純薬, 大阪, 日本), 5mM 塩化マグネシウム (和光純薬), 5% グリセロール(Sigma ; Missouri, USA), 0.5mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA : Thermo Scientific ; Massachusetts, USA), 1mM Protease inhibitor (Thermo Scientific), 0.1mM ジチオトレイトール (DTT : Thermo Scientific) となるように脱イオン水で調整し、菌体ペレットを本培養培地用量の 6%量の菌体溶解液で懸濁した。菌体懸濁液を-80°C 30 分間で凍結した後に 37°Cで融解し、リゾチーム (Thermo Scientific) を 20000 単位 / ml となるように添加して氷上 1 時間のインキュベーションを行い、-80°Cと 37°Cで同様の凍結融解を行った。凍結融解後、3.8% Surfact-Amps NP-40 (Thermo Scientific), 0.55mM EDTA (Thermo Scientific) となるように菌体溶解液に添加し、Bioruptor UCT-200 (東湘電気 ; 神奈川, 日本) を用いて冷水内で高出力, 30 秒間 破碎 / 30 秒間 休止, 4 サイクルで菌体の超音波破碎を行った。破碎後の菌体溶解液は 4°C 27700G 30 分間で遠心分離を行い、上清の菌体抽出液を Millex-GV 0.22µm PVDF filter unit (Millipore ; Massachusetts, USA) で濾過した。フィルター濾過後の菌体抽出液は Glutathione Sepharose 4B を充填

した GST-Gravi Trap (GE healthcare) を添付文書通りに使用し、還元型グルタチオン (和光純薬) を 50mM Tris-HCl pH 8.0 に 10mM となるように溶解した溶出バッファーで溶出, 精製した。精製した蛋白は Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific) で溶媒の Dulbecco's Phosphate buffer saline (D-PBS : Life Technologies ; California, USA) への透析置換と還元型グルタチオンの除去を行った。

rhGPI 誘導性関節炎の惹起と関節炎の評価

D-PBS に溶解した 4mg/ml GST-rhGPI と等量の Adjuvant complete freund (CFA : DIFCO LABORATORIES ; Detroit, USA) を金属コネクター (夏目製作所 ; 東京, 日本) を接続した 2 本のガラスシリンジ (TOP ; 東京, 日本) で混合してエマルジョンを作成した。オスの 8~12 週齢の DBA/1J マウスにガラスシリンジ (Hamilton ; Nevada, USA), 27 ゲージ針 (テルモ ; 東京, 日本) でエマルジョン を GST-rhGPI 300 μ g / 匹となるようにペントバルビタール麻酔下に尾部から臀部にかけて皮内注射した。免疫後は連日で関節炎の臨床重症度の評価を行い、この際の関節炎の臨床重症度は過去に報告されている後述の如く方法で行った[51, 52]。各肢において 0 点 ; 所見なし, 1 点 ; 極軽度の限局的な

腫脹, 2 点 ; 肢の背側か掌側にのみに限局する明らかな腫脹, 3 点 ; 肢全体の腫脹とし、1 匹あたり 0-12 点とした。

関節組織の病理標本の作成と組織学的な評価

免疫 14 日後に各々のマウスにおける平均的な臨床重症度を呈した上肢か下肢を手足関節近位部より切離し、4%パラホルムアルデヒド (和光純薬) で固定して標本作製までは 4°C で保存した。標本作製, Hematoxirin & Eosin (HE) 染色はバイオ病理研究所 (大分, 日本) にて行った。標本は OLYMPUS DP71 (オリンパス ; 新宿, 日本) で顕鏡し、画像取込, 処理ソフトウェアは DP Controller (オリンパス) を使用した。関節組織の組織学的評価は炎症細胞浸潤, 軟骨破壊, 骨びらんについて行い、各項目とも過去に報告されている方法で行った[53]。各標本において各項目 0-5 点とした。

脾細胞, 鼠径リンパ節細胞, 骨髄細胞, 血清の分離

D-PBS, RPMI 培地添加用の Fetal Calf Serum (FCS ; Thermo Scientific) は温浴槽で 55°C 30 分間の非動化を行ってから使用した。マウスは頸椎脱臼にて処理後に目的臓器を回収した。脾臓, 両側鼠径リンパ節は 0.1% *Clostridium*

histolyticum 由来コラゲナーゼ (Sigma), 10% FCS, 1% ストレプトマイシン・ペニシリン・グルタミン溶液 (invitrogen), 50 μ M メルカプトエタノール (Sigma) となるように調整したコラゲナーゼ処理用 RPMI1640 培地 (Life Technologies) 内で細断し、37°C, 5%CO₂ のインキュベーターで 20 分間のコラゲナーゼ処理を行った。脾臓, リンパ節はコラゲナーゼ処理終了後に 2%FCS, 0.2mM EDTA (Life Technologies) 入りの D-PBS (2% F-PBS) でコラゲナーゼ処理を終了し、セルストレーナー (BD falcon) とセルスクレーパー (岩城硝子株式会社 ; 静岡, 日本) でメッシュ濾過して細胞懸濁液とした。また、脾臓は遠心分離, 洗浄後に 150mM NH₄Cl (和光純薬), 10mM KHCO₃ (和光純薬), 0.1mM EDTA (ニッポンジーン) で調整した Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) で溶血処理を行った。骨髓細胞は両側大腿骨, 脛骨を回収し、両側骨端から約 1mm を切除した骨幹部の骨髓を D-PBS でフラッシュし、遠心分離, 上清廃棄後に ACK で溶血した。骨髓細胞の細胞数測定は右大腿骨で行った。血清は尾静脈からは直接 1.5ml チューブ (Eppendorf ; Hamburg, Germany) に回収するか頸椎脱臼直後に 1ml シリンジ (テルモ), 21 ゲージ針 (テルモ) で心臓から採血して 1.5ml チューブに回収, 遠心分離後に血清を回収し、使用時まで-30°Cで保存した。細胞数はビルケルチュルク計算盤 (エルマ ; 東京 日本) で測定した。

抗 GPI 抗体価測定

過去の文献を参考に Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) によって行った。Nunc maxisorp (BD falcon ; Neu Jursey, USA) に D-PBS で 5 μ g/ml とした GST-rhGPI を 4 $^{\circ}$ C 16 時間でコーティングした。コーティング終了後に GST-rhGPI 溶液を 0.05% Tween (和光純薬) 入りの D-PBS (Wash Buffer ; W/B) で洗浄し、Block Ace (雪印 ; 東京, 日本) の添付文書通りに作成した Block Ace 原液 を 4 倍希釈した Blocking solution を添加して 20 $^{\circ}$ C 2 時間のブロッキングを行った。以降は Block Ace 原液を 10 倍希釈したものを Dilution solution (D/B) として使用した。免疫 14 日後の WT マウス 4 匹の血清を等量混合したものを 1000 単位 (U) のスタンダードとして D/B で希釈系列を作成した。また、サンプル血清は D/B で希釈して測定用サンプルとした。ブロッキング終了後に W/B で洗浄し、スタンダード、サンプルをブロッキング後のプレートに添加して 20 $^{\circ}$ C 2 時間とした。サンプルのインキュベーション終了後に W/B で洗浄し、抗 GPI IgG 価測定では Alkaline Phosphatase-conjugated 抗マウス IgG (CHMICON international ; California, USA), 抗 GPI IgM 価測定では HRP-conjugated 抗マウス IgM (KPL ; Maryland, USA) を D/B で希釈して 2 次抗体溶液として添加後に遮光して 20 $^{\circ}$ C 30 分間とした。

2次抗体のインキュベーション終了後に W/B で洗浄し、発色は抗 GPI IgG 価測定では SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate Tablets (Sigma), 抗 GPI IgM 価測定では TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL) を添付文書通りに作成, 添加して 20°C とした。吸光度はスタンダードカーブが適度に発色した時点で BioRad Model 680 にて抗 GPI IgG 価は 405nm, 抗 GPI IgM 価は 450nm で測定した。スタンダードカーブは 5-パラメーターで X 軸 log, Y 軸 log として作成し、サンプル濃度の計算を行った。

鼠径リンパ節細胞の培養

鼠径リンパ節の培養では 10% FCS, 1% ストレプトマイシン - ペニシリン - グルタミン溶液 (invitrogen), 50μM メルカプトエタノール (Sigma) となるように調整した培養用 RPMI1640 (Life Technologies) 培地を使用した。免疫 7, 14 日後の鼠径リンパ節細胞を各々培養用 RPMI 培地にて 1×10^6 cell/ml とした細胞浮遊液を作成した。 *Ex vivo* での細胞増殖はリンパ節細胞をカルボキシフルオセイン二酢酸サクシミニジルエステル (CFSE : 同仁科学 ; 熊本, 日本) を 5%FCS, 0.5mM EDTA (Life Technologies) 入りの D-PBS で 1μM とした溶液で懸濁して遮光下に 20°C 3 分間の染色を行い、染色後は 2% F-PBS で洗浄し、培養用 RPMI1640 培地にて 1×10^6 cell/ml となるように調整した。細胞は

96 穴丸底培養皿 (BD falcon) で最終濃度 100 μ g/ml (免疫 7 日後), 5 μ g/ml (免疫 14 日後) の GST-rhGPI か等用量の D-PBS を添加して 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ のインキュベーターで 72 時間の培養を行った。細胞内サイトカイン測定では培養終了 3 時間前に Golgistop (BD pharmingen ; New Jersey, USA) を添付文書通りの濃度となるように添加した。

CD4⁺ T 細胞の T helper 1 (Th1) 細胞, Th17 細胞への分化誘導

Ex vivo での Th1 細胞, Th17 細胞の分化誘導実験は、脾臓の CD4⁺ T 細胞を mouse CD4⁺ T cell isolation kit II (Miltenyi biotec ; Bergisch Gladbach, Germany) で添付文書通りに分離, 培養した。96 穴平底培養皿 (CORNING ; New York, USA) を D-PBS で 2 μ g/ml とした抗マウス CD3 ϵ 抗体 (BD pharmingen) にて 4 $^{\circ}$ C 16 時間でコーティングした。プレートコーティング後は未接着の抗マウス CD3 ϵ 抗体を D-PBS で洗浄, 除去し、培養用 RPMI1640 培地で 1x10⁶cell/ml とした CD4⁺ T 細胞を最終濃度 5 μ g/ml の抗マウス CD28 抗体を添加して下記の如く分化条件で 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ のインキュベーター内で 96 時間の培養を行った。Th1 分化条件 ; 10 μ g/ml 抗マウス IL-4 抗体 (BD pharmingen), 20ng/ml リコンビナント マウス IL-12 (R&D system, ; Minneapolis, USA)、Th17 分化条件 ; 10 μ g/ml 抗マウス Interferon gamma

(IFN- γ) 抗体 (BD pharmingen), 10 μ g/ml 抗マウス IL-4 抗体, 50ng/ml リコンビナント マウス IL-6 (R&D system), 5ng/ml リコンビナント マウス IL-23 (R&D system), 1ng/ml リコンビナント ヒト Tumor growth factor - beta 1 (TGF- β 1 : R&D system) とした。培養終了 3 時間前に 0.5 μ g/ml イオノマイシン (Sigma), 10 μ M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA ; Sigma) と Golgistop を添付文書通りの濃度となるように添加した。

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

リンパ節細胞を Buffer RLT (QIAGEN ; Venlo, Netherlands) で回収し、Complementary DNA (cDNA) 合成時まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。DNase 処理, mRNA 抽出は RNeasy Micro kit (QIAGEN) の添付文書通りに行った。cDNA 合成は Random Primers (Invitrogen), dNTP mixture (タカラバイオ ; 大津, 日本) を添加して 65 $^{\circ}$ C 5 分間のインキュベーションを行い、Superscript III 逆転写酵素 (Invitrogen), RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega ; Massachusetts) を添付文書通りに添加して 50 $^{\circ}$ C 60 分間のインキュベーションを行った。cDNA 合成終了後は 70 $^{\circ}$ C 15 分間のインキュベーションにて酵素を失活し、使用時以外は-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

好中球, 骨髄球系細胞は TRizoll LS (Ambion ; Texas, USA) で回収, ピペッティングによる細胞破碎後に、cDNA 合成時まで-80°Cで保存した。TRizoll LS の添付文書通りに攪拌, クロロホルム添加, インキュベーション, 遠心分離を施行し、mRNA を含んだ水層を回収した。その後の DNase 処理, mRNA 抽出, cDNA 合成はリンパ節細胞と同様に行った。

PCR 時の Nuclease free water は Promega から購入し、SYBR green Mix は TUNDEBIRD (TOYOBO ; 大阪, 日本) を使用した。プライマーはオペロンバイオテクノロジー (東京, 日本) で下記配列にて作製, 使用した。

Gapdh Forward TTCACCACCATGGAGAAGGC, *Gapdh* Reverse GGCA
TGGACTGTGGTCATGA, *Il-1a* Forward TCGGGAGGAGACGACTCTAA, *I*
l-1a Reverse AGGTCGGTCTCACTACCTGTG, *Il-6* Forward GAGGATACC
ACTCCCAACAGACC, *Il-6* Reverse AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA, *I*
l-12p40 Forward GGAAGCACGGCAGCAGAATA, *Il-12p40* Reverse AACT
TGAGGGAGAAGTAGGAATGG, *Il-12p19* Forward TGCTGGATTGCAGAG
CAGTAA, *Il-12p19* Reverse GCATGCAGAGATTCCGAGAGA, *Tnfa* Forwa
rd CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA, *Tnfa* Reverse TGGGAGTAGAC
AAGGTACAACCC, *Tgfb* Forward TGACGTCACTGGAGTTGTACGG, *Tgfb*
Reverse GGTTTCATGTCATGGATGGTGC, *Ccl20* For-ward ATGGCCTGC

GGTGGCAAGCGTCTG, *Ccl20* Reverse TAGGCTGAGGAGGTTTCACAGCC
CT, *Padi4* Forward TGACCAATGGATGCAGGACG, *Padi4* Reverse CTCT
GTCCCTCGGGGAGTC。

PCR およびデータ解析は BioRad iCycler iQ (BioRad ; California, USA)
と Software Versoin 3.0 (SABioscience ; Meryland, USA) を使用した。

Fluorescence activated cell sorting (FACS)

下記に本実験で用いた Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin
(PE), Allophycocyanin (APC), APC and a cyanine dye (APC/Cy7), Biotin 標
識された抗体名および括弧内にクローンを示した。抗マウス CD3 抗体 (17A2),
抗マウス CD5 抗体 (53-7.3), 抗マウス CD8 抗体 (53-6.7), 抗マウス CD11b 抗
体 (M1/70), 抗マウス CD25 抗体 (PC61), 抗マウス CD69 抗体 (H1.2F3), 抗
マウス CD117 抗体 (2B8), 抗マウス B220 抗体 (RA3-6B2), 抗マウス NK1.1
抗体 (PK136), 抗マウス CD11c 抗体 (HL3), 抗マウス Ly-6G 抗体 (1A8), 抗
マウス Ly-6C 抗体 (AL-21), 抗マウス CXCR5 抗体 (2G8), 抗マウス PD-
1/CD279 抗体 (J43), 抗マウス CD95 抗体 (Jo2), 抗マウス GL7 抗体 (GL7),
抗マウス Il-17A 抗体 (TC11-18H10) は BD pharmingen より購入した。抗マ

ウス CD4 抗体 (RM4-5), 抗 CD62L 抗体 (MEL-14), 抗マウス CD44 抗体 (IM7), 抗マウス B220 抗体 (RA3-6B2), 抗マウス F4/80 抗体 (BM8) は Biologend (California, U.S.A) より購入した。抗マウス CD49b 抗体 (eBio, HMa2), 抗マウス Foxp3 抗体 (FJK-16s), 抗マウス Ter-119 抗体 (TER-119), 抗マウス IFN γ 抗体 (XMG1.2) は eBioscience (California, U.S.A) から購入した。Fc ブロックは抗マウス CD16/32 抗体 (2.4G2) を BD pharmingen から購入した。Stretavidin (SA) conjugated APC, SA conjugated APC/Cy7, 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) viability staining solution は Biologend から購入した。細胞表面抗原の染色過程は 2% F-PBS で細胞懸濁液として施行した。また、細胞内染色は BD cytofix/cytopermTM plus Fixation / Permeabilization Solution kit (BD pharmingen) と Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer set (eBioscience) を添付文書通りに使用した。アポトーシス / 死細胞染色は Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD pharmingen)を使用した。FACS での分析, ソーティングは FACS Vantage SE (Becton Dickinson ; New Jersey, USA) で行い、FACS データの解析ソフトは FlowJo (TreeStar.inc. ; Oregon, USA) を使用した。

血清 IL-6 濃度測定

血清 IL-6 濃度測定は Mouse IL-6 High Sensitivity ELISA (eBioscience) の添付文書通りに行った。吸光度は BioRad Model 680 にて 450nm で測定した。スタンダードカーブは 5-パラメーターで X 軸 log, Y 軸 log として作成し、サンプル濃度の計算を行った。

マウス骨髄好中球分離と May-Giemsa 染色

マウス骨髄好中球の分離は過去に報告されている比重遠心法を参考に行った [54]。骨髄好中球の分離中は 20°C で行い、試薬も全て 20°C としてから調整、使用した。マウスの両側大腿骨、両側脛骨を回収し、両側骨端を切除後に骨幹部を D-PBS でフラッシュした。骨髄細胞は遠心分離、洗浄後に ACK で溶血処理を行い、遠心分離後に D-PBS で骨髄細胞懸濁液とした。Percoll PLUS (GE healthcare) を 1/9 量の 10x D-PBS (Life Technologies) と混合して 100% Percoll を作製した。100% Percoll と D-PBS を混合して 75%, 65%, 55% Percoll を作成し、これら各濃度の Percoll と骨髄細胞懸濁液を重層した。遠心分離は 28°C 500G 30 分間にて施行し、75%と 65%の境界層の好中球分画を回収した。May-giemsa 染色は 1×10^5 cell を Cytospin III (Thermo Scientific) で 1200rpm 5 分間としてスライドガラス (松浪硝子工業 ; 大阪, 日本) に密着し、乾燥後に 99.9% エタノール (和光純薬) を滴下して 20°C 5 分間の固定を

行った。固定後に Gimesa 染色液（和光純薬）を 25 倍量の脱イオン水で希釈したものを滴下して遮光下で 20℃, 30 分間の染色を行った。染色終了後に脱イオン水で洗浄し、カバーガラス（松浪硝子工業）で覆った。標本は OLYMPUS DP71（オリンパス；新宿，日本）で顕鏡し、画像取込，処理ソフトウェアは DP Controller（オリンパス）を使用した。

好中球の培養

分離した好中球はフェノールレッドを含まない培養用 RPMI1640 培地（Life Technologies）で 1×10^6 cell/ml として細胞懸濁液とし、96 穴平底培養皿で無刺激か 100 μ g/ml Lipopolysaccharide (LPS : Invivogen ; California, USA) , 10 μ g/ml リコンビナントマウス Tumor necrosis factor alpha (TNF α : Miltenyi Biotec) , 10 μ g/ml マウス Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF : R&D), 10 μ g/ml Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF : Miltenyi Biotec) の何れかの存在下で 37℃ 5%CO₂ のインキュベーターで 48 時間の培養を行った。

統計解析

統計解析ソフトは SPSS (IBM) を用いて、各項目につき Mann-whitney U test にて検定を行った。P 値 < 0.05 を有意差ありとした。

結果

1. *Padi4* KO マウスにおける rhGPI 誘導性関節炎

免疫 8 日後頃より WT マウス, *Padi4* KO マウスとも関節炎の発症, 増悪を認め、免疫 14 日後には両群ともほぼ全ての個体で関節炎を呈したことから発症率は同等であったが (Fig. 1 A)、関節炎の重症度は *Padi4* KO マウスで有意に低下していた (Fig. 1 B)。また、免疫 14 日後の関節組織の HE 染色標本での組織学的検討では、*Padi4* KO マウスにおいて細胞浸潤, 軟骨破壊, 骨びらんスコアの有意な低下を認めた (Fig. 1 C, D)。以上より、WT マウスに比して *Padi4* KO マウスは rhGPI 誘導性関節炎の発症率は同等であるものの、関節炎の重症度と組織学的な関節破壊を含めた関節炎の有意な軽減を認めた。

2. *Padi4* KO - rhGPI 誘導性関節炎マウスにおける脾細胞数

rhGPI 誘導性関節炎の過程を関節炎発症直前の免疫 7 日後頃の前関節炎期と関節炎症状のピークである免疫 14 日後頃を関節炎極期として、WT マウス, *Padi4* KO マウスの様々な免疫細胞の動態を評価した。両系統とも免疫によって免疫 7 日後を最大として著明な脾臓, 鼠径リンパ節細胞の増加を認めた。しかし、*Padi4* KO マウスは WT マウスと比して免疫 7 日後の鼠径リンパ節の細

胞数は同等であるが脾臓の細胞数の増加が著明に抑制されており ($P < 0.001$)、免疫 14 日後では *Padi4* KO マウスは WT マウスに比して脾臓、鼠径リンパ節の細胞数の有意な減少 (脾臓 ; $P = 0.011$, 鼠径リンパ節 ; $P = 0.043$) を認めた (Fig. 1 E, F)。

3. *Padi4* KO - rhGPI 誘導性関節炎マウスにおける抗 rhGPI 抗体価

rhGPI 誘導性関節炎は B 細胞欠損マウス, $Fc\gamma$ 受容体欠損マウスで著明な関節炎の改善を認めることから、B 細胞および B 細胞による抗体産生の重要性が示唆されている [47, 50]。免疫 14 日後には WT マウス, *Padi4* KO マウスとも血清抗 GPI IgM 抗体の出現を認めるが、*Padi4* KO マウスは WT マウスに比して血清抗 GPI IgM 抗体価が有意差を持って低値 ($P = 0.015$) であった (Fig. 2 A)。さらに、血清抗 GPI IgG 抗体価も免疫後に著増を認めるものの、*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して抗体価は同様に有意差を持って低値 ($P = 0.002$) であった (Fig. 2 B)。また、B 細胞は抗体産生細胞としての機能のみならず抗原提示やサイトカイン産生などの役割を持つ細胞であり [48, 49]、免疫前後の脾臓 B 細胞数を WT マウス, KO マウスで比較したが、有意な差を認めなかった (Fig. 2 C)。そこで、抗原特異的な抗体産生能を獲得する過程において重要なサブセットである胚中心 (Germinal center) B 細胞 (GCB 細胞 ;

B220⁺ CD4⁻ CD95⁺ PD-L1⁺), Follicular helper T 細胞 (Tfh 細胞 ; CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁺) の検討を行った。 *Padi4* KO マウスでは免疫 14 日後における脾臓の GCB 細胞は WT マウスと同等であったが、鼠径リンパ節では GCB 細胞の有意な減少 ($P < 0.001$) を認めた (Fig. 2 D)。一方で、免疫 7 日後における Tfh 細胞は脾臓、鼠径リンパ節とも同等であった (Fig. 2 E)。

4. *Padi4* KO – rhGPI 誘導性関節炎マウスにおける T 細胞活性化

rhGPI 誘導性関節炎では抗マウス CD4 抗体による CD4⁺ T 細胞の除去によって関節炎の著しい改善を呈することが報告されており、この効果は発症前、後とも認めることから、関節炎の発症、持続において CD4⁺ T 細胞の重要性が示唆されている[47]。そこで、rhGPI 誘導性関節炎の経過における脾臓、鼠径リンパ節の T 細胞数、T 細胞フェノタイプの変化を観察した。免疫前、免疫 7、14 日後には *Padi4* KO マウスは WT マウスと脾臓の CD3⁺ T 細胞は同等であった (Fig. 3 A)。さらに、脾臓の CD62L⁻CD44⁺ memory CD4⁺ T 細胞、CD62L⁻CD69⁺ activated CD4⁺ T 細胞も WT マウスと *Padi4* KO マウスに有意差を認めなかった (Fig. 3 B, C)。鼠径リンパ節では免疫前、免疫 7、14 日後の何れにおいても WT マウスと *Padi4* KO マウスでこれらの細胞数に差を認めなかった。また、免疫 14 日後における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞にも有意差を認

めなかった (Fig. 3 D)。以上より *Padi4* KO マウスでは免疫後の T 細胞の活性化は正常に機能しており、また制御性 T 細胞の分化にも異常がないことが示された。

5. *Padi4* KO – rhGPI 誘導性関節炎マウスにおける Th17 細胞

rhGPI 誘導性関節炎での関節炎の発症、維持における Th17 細胞の重要性は IL-17, IL-6 の中和実験により証明されている[51]。そこで関節炎発症直前の Th17 細胞の分化を検討するため、rhGPI 免疫 7 日後の鼠径リンパ節細胞を rhGPI 100 μ g/ml の存在下で培養し、3 日後に FACS にて IL-17A 陽性 Th17 細胞, IFN γ 陽性 Th1 細胞を評価した。*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して Th17 細胞の割合の有意な減少($P=0.037$) を認めたが、Th1 細胞の割合は同等であった (Fig. 4 A)。また、CFSE^{lo} の増殖した CD4⁺ T 細胞の割合は同等であることから、抗原特異的な CD4⁺ T 細胞の増殖能の障害は示唆されなかった (Fig. 4 B)。また、Th17 細胞の所属リンパ節への遊走を評価するため、Th17 細胞で高発現であることが知られているケモカインレセプターである CCR6 の ligand の CCL20 の発現を免疫 7 日後の鼠径リンパ節において定量的 PCR で評価したところ[55]、*Padi4* KO マウスの鼠径リンパ節における *Ccl20* の発現はむしろ増加していた (Fig. 4 C)。以上より、関節炎発症直前の所属リンパ節

では Th17 細胞の減少を認めるものの、CD4⁺ T 細胞の抗原特異的な増殖や Th17 細胞の遊走を惹起するケモカイン産生の障害は示唆されず、何らかの原因による Th17 細胞への分化が障害されている可能性が考慮された。一方で、rhGPI 誘導性関節炎において関節炎極期においては IFN γ , IL-12 の中和により関節炎が増悪すること報告されており、関節炎極期における Th1 細胞は抗炎症的な役割を担うことが示唆されている[51, 52]。免疫 14 日後の鼠径リンパ節における Th1 細胞, Th17 細胞の分化の検討では、WT マウス, *Padi4* KO マウスでの Th1 細胞は同等であり、*Padi4* KO マウスでの Th17 細胞の減少は持続していた (Fig. 4 D)。

更に *Padi4* の欠損による CD4⁺ T 細胞自身の Th17 細胞への分化障害の可能性を検討するため、WT マウス, *Padi4* KO マウスの各々の脾臓から分離した CD4⁺ T 細胞を Th1 細胞, Th17 細胞の分化誘導条件下で培養し、96 時間後に Th1 細胞, Th17 細胞への分化を評価した。*Padi4* KO - CD4⁺ T 細胞は WT - CD4⁺ T 細胞と同程度に *in vitro* における Th1 細胞, Th17 細胞への分化を認め、*Padi4* - KO CD4⁺ T 細胞自身の Th17 細胞への分化障害は認めなかった (Fig. 5 A, B)。以上より、rhGPI 誘導性関節炎における *Padi4* KO マウスの Th17 細胞の減少は CD4⁺ T 細胞自身の分化障害ではなく、サイトカイン環境などの外的な要因による可能性が示唆された。

6. *Padi4* KO- rhGPI 誘導性関節炎マウスにおける血清 IL-6 濃度

rhGPI 誘導性関節炎においては免疫前後から関節炎極期にかけての IL-6 が関節炎の発症、維持に重要であり、免疫 14 日後にかけて血清 IL-6 濃度の著明な増加を呈することが報告されている[52]。WT における我々の検討では免疫 2 日後に血清 IL-6 濃度はピークとなり、免疫 7 日後にかけて緩徐に低下し、免疫 14 日後に再増加していた。しかし、*Padi4* KO マウスでは WT マウスに比して免疫 2 日後の血清 IL-6 濃度はむしろ増加していたが、免疫 7 日後の血清 IL-6 濃度は著明に低下しており (Fig. 6 A)、免疫 14 日後の血清 IL-6 濃度はさらに低下していた。一方、免疫後早期における所属リンパ節での炎症性サイトカインの発現を検討するため、尾部の所属リンパ節である腸骨リンパ節、傍大動脈リンパ節と両側鼠径リンパ節での Th17 細胞分化に関わる炎症性サイトカインの発現を定量的 PCR で測定した[56-60]。免疫 2 日後では、*Padi4* KO マウスでは WT マウスと比して *Il-12p40* 発現の低下を認めたものの、*Il-1a*, *Il-6*, *Tnfa* の発現はむしろ増加しており、*Tgfb*, *Il-12p19* の発現は同等であった (Fig. 6 A)。免疫 2 日後の鼠径リンパ節および免疫 7, 14 日後の鼠径リンパ節、脾臓、骨髄、肝臓、小腸、関節組織においても概ね同様の傾向を認め、*Padi4* KO マウスでは個々の細胞レベルでの IL-6 を始めとした炎症性サイトカインの

発現は障害されていない可能性が示唆された。以上より、*Padi4* KO マウスでは個々の細胞における *Il-6* 遺伝子発現は低下していないものの、経過に伴って総量としての IL-6 蛋白の減少を呈することが証明された。

7. *Padi4* KO – rhGPI 誘導性関節炎マウスにおける顆粒球系細胞, 単球系細胞

マウスにおいても *Padi4* を主に発現する細胞はヒトと同様に顆粒球系細胞, 単球系細胞であることが知られている[41]。 *Padi4* KO マウスでも免疫前後の脾臓における B 細胞, T 細胞といったリンパ球系細胞数は WT マウスと同等であり (Fig. 2C, 3A)、免疫後の *Padi4* KO マウスにおける脾細胞数の減少は顆粒球系, 単球系を始めとしたリンパ球系以外の細胞による可能性が示唆された。

そこで、CD11b⁺ 細胞の主なサブセットである好中球を始めとした顆粒球系細胞, 単球系細胞および CD11c⁺ 樹状細胞の検討を行った。FACS による末梢の顆粒球系細胞, 単球系細胞のゲーティング方法の報告を参考として[56]、末梢においては Peripheral-lineage (P-lineage : B220, NK1.1, CD11c)⁻ を用いてこれらの細胞の解析を試みた。rhGPI 誘導性関節炎の脾臓における顆粒球系細胞として FSC^{hi}SSC^{hi}CD11b⁺Ly-6G⁺Ly-6C^{int}P-lineage⁻ 細胞, 単球系細胞として FSC^{int}SSC^{int}CD11b⁺Ly-6G⁻Ly-6C^{hi}P-lineage⁻ 細胞および樹状細胞として FSC^{int}SSC^{int}CD11c^{hi}Ly-6G⁻B220⁻CD8⁻ 細胞の数を検討した。 *Padi4* KO マウ

スでは免疫後の脾臓における顆粒系細胞数, 単球系細胞数の著明な減少を認めた (Fig. 7 A, B)。一方で免疫後の脾臓における樹状細胞数は WT マウスと *Padi4* KO マウスで差を認めなかった (Fig. 7 C)。定量的 PCR による *Padi4* 発現の検討では、顆粒球系細胞, 単球系細胞においては著明な *Padi4* 遺伝子の発現が確認できたが、樹状細胞, リンパ球系細胞における *Padi4* 発現は極めて低値か検出できないレベルであった (Fig. 7 D, E)。次に、骨髄での顆粒球系細胞の分化, 増殖障害の有無を検討するため、骨髄における成熟好中球のネガティブソーティング (BM-lineage ; CD5, CD49b, CD117, Ter-119, F4/80, B220) の報告を参考として [57]、免疫前後における骨髄の CD11b^{hi}Ly-6G^{hi}BM-lineage⁻ 顆粒球系細胞の細胞数を検討したところ、免疫前後において WT マウスと *Padi4* KO マウスで骨髄におけるこれらの細胞の割合, 絶対数には差を認めなかった (Fig. 7 F)。

8. *Padi4* KO マウス骨髄球系細胞の細胞寿命

rhGPI 誘導性関節炎における免疫後の顆粒球系細胞, 単球系細胞の減少の原因として細胞の寿命の短縮が可能性の一つとして考慮されたため、免疫前の WT マウスと *Padi4* KO マウスの骨髄から分離した好中球の *in vitro* での培養後の細胞生存率を検討した。まず、比重遠心法で分離した細胞を May-Giemsa

染色で顕鏡したところ、WT マウス, *Padi4* KO マウスとも概ね 90%以上は環状核, 分葉核を有した骨髓好中球であり、これらの細胞形態には著明な違いを認めなかった (Fig. 8 A, B)。そして、培養直前における Ly-6G^{hi} 好中球の 99%以上は Propidium Iodide Annexin V とほぼ生細胞であった (Fig. 8 C)。そして、これらの分離細胞を無刺激, LPS, マウス TNF α , マウス GM-CSF, マウス G-CSF 存在下で 48 時間の培養を行い、Ly-6G^{hi} 好中球における Propidium Iodide Annexin V 生細胞の割合を生細胞率として検討したところ、いずれの条件の培養後でも *Padi4* KO マウス由来の骨髓好中球は WT マウス由来のものに比して生細胞率の低下を認めた (Fig. 8 C)。以上より、*Padi4* KO マウスにおける免疫後の骨髓球系細胞の減少の原因の一つとして、生存率の低下が考慮された。

考察

本研究では RA の疾患感受性遺伝子である *PADI4* の関節炎における機能解析を目的として、*Padi4* KO マウスを用いた rhGPI 誘導性関節炎モデルを解析した。*Padi4* KO マウスでは関節炎の臨床重症度、病理学的所見の著明な軽減を認めた。過去のマウス関節炎モデルにおける *Padi4* 遺伝子, PAD4 蛋白の機能解析の報告としては、PAD 阻害薬である Cl-amidine を用いたものと *Padi4* KO マウスを用いたものがある[42, 43]。DBA/1J マウスにおける CAIA では、Cl-amidine の投与によっても関節炎の重症度は同等であった[43]。さらに、C57BL/6 の *Padi4* KO マウスでも抗体依存型のマウス関節炎モデルである K/BxN 血清移入関節炎モデルにおいて関節炎の重症度に変化はなかったとの報告がなされている[42]。これらの抗体依存型の関節炎モデルでは、T, B 細胞反応を主とした獲得免疫は必要でなく、関節局所での抗 GPI 抗体の沈着と補体, Fc 受容体等からのシグナルを介した好中球により炎症および組織障害が惹起される。以上より、炎症関節局所での自己抗体の存在下で誘導される組織障害においては *Padi4* の有無は重要でない可能性が示唆されている。しかし、今回の GPI 誘導性関節炎モデルにおいては *Padi4* KO マウスで WT マウスに比して関節炎の発症率は同等であるものの重症度の軽減を認め、同関節炎モデルの増悪における *Padi4* の重要性が示唆された。そして、今回の我々の検討では Th17

細胞の減少, 血清 IL-6 濃度の低下や顆粒球系細胞, 単球系細胞の減少といった多彩な免疫反応の違いが観察されたことから、ヒト RA 病態においても重要とされている Th17 細胞, IL-6, 顆粒球系, 単球系細胞が *PADI4* によって直接的, 間接的に制御されている可能性が新たに示唆された。

rhGPI 誘導性関節炎では免疫後から関節炎発症直後での抗 IL-6 受容体抗体の投与による IL-6 シグナルの阻害によって関節炎の重症度が著しく改善することが報告されている [51]。さらに、免疫後から関節炎極期での抗 CD4 抗体による CD4⁺ T 細胞の除去および関節炎発症時での抗 IL-17 抗体による IL-17 の阻害によっても同様に著明な改善を認めるとされている [47, 51]。以上より、IL-6, Th17 細胞が rhGPI 誘導性関節炎の発症から維持, 増悪において非常に重要なサイトカインであることが示唆されている。今回の我々の検討においては、*Padi4* KO マウスは WT マウスに比して免疫直後の血清 IL-6 濃度は高値であるものの、関節炎発症直前, 関節炎極期である免疫 7, 14 日後における血清 IL-6 濃度の著明な低下と鼠径リンパ節の Th17 細胞の減少を認めた。一方で、免疫 2, 7, 14 日後のリンパ節, 脾臓を初めとした様々な臓器における *Il-6* 遺伝子の発現の著明な低下は認めなかった。以上より、*Padi4* の欠損によって所属リンパ節, 脾臓等の末梢免疫組織における個々の細胞レベルでは IL-6 発現の低

下を呈さないものの、経過に伴って総量としての IL-6 蛋白の減少を来している可能性が考慮された。さらに、免疫後の *Padi4* KO マウスでは rhGPI 誘導性関節炎における IL-6 の重要な産生源とされている脾臓の顆粒球系細胞、単球系細胞の著明な減少を認めた[50]。以上より、免疫後、特に関節炎発症直前から関節炎極期にかけての IL-6 産生細胞の減少に伴って総量としての IL-6 蛋白の低下を呈している可能性が考慮され、*Padi4* KO マウスにおいて関節炎が軽減した要因の一つと考えられた。*Padi4* KO マウス由来の好中球は WT マウス由来のものに比して *in vitro* での生存率は著明な低下を認めたが、過去の報告、我々の検討によると定常状態における骨髓、末梢血での成熟好中球の絶対数は WT マウスと *Padi4* KO マウスは同等であり[23, 24]、非炎症環境下ないしは骨髓では骨髓球系細胞の寿命の短縮を相対的な分化増殖の亢進等によって代償できている可能性も考慮された。しかし、免疫後の炎症環境下にある末梢組織においては、TNF α を始めとした骨髓球系細胞のアポトーシスを誘導する様々な物質に暴露することにより、末梢組織での骨髓球系細胞の生存率の低下を代償しきれずに絶対数が減少する可能性が考慮された。*Padi4* が細胞の分化、増殖、アポトーシスに関与するとの報告は悪性疾患分野を中心になされてきており、一例として PAD4 が腫瘍制御因子の一つである *OKL38* のプロモーター領域のシトルリン化によってアポトーシスを抑制しているといった報告がある[22]。

また、Th17 細胞は末梢における重要な GM-CSF の産生源であることも報告されており。*Padi4* KO マウスにおいても Th17 細胞の減少に伴って GM-CSF の低下を呈している可能性も考慮された[58, 59]。以上より、rhGPI 誘導性関節炎における *Padi4* 遺伝子の機能として、末梢組織における顆粒球系細胞、単球系細胞の生存や血清 IL-6, Th17 細胞分化などの多彩な免疫機構に影響し、結果として関節炎の重症化に密接に関与していることが判明した。RA においても IL-6 の病態における重要性は IL-6 中和抗体であるトシリズマブの臨床的有用性からも明らかであり[60]、Th17 細胞についても抗 IL-17A 抗体の RA への有効性は必ずしも高くないとの報告もあるが[61, 62]、病初期における重要性や GM-CSF 等の炎症性メディエーター分泌能の重要性等より Th17 細胞そのものの重要性は想定されている[63]。*PADI4* 遺伝子が RA 患者における IL-6, Th17 細胞分化へ関与している可能性がマウスの検討により推測されたが、ヒトにおけるゲノム多型と遺伝子発現の関連に関する解析の結果が待たれる。また、炎症環境下では末梢好中球が自然免疫のみならず獲得免疫の様々な動態にも影響を与えうることが知られている。一例として、好中球は炎症初期における可溶性 IL-6 受容体の産生源であることが報告されており[64]、T 細胞における IL-6 のトランスシグナルを惹起することによって Th17 細胞フェノタイプを維持する上で重要な要素と考えられる[65]。さらに、NETs が樹状細胞との共作用に

よって Th1, Th17 細胞の TCR 依存性の分化誘導, 活性化に重要であることが報告されている [66]。また、NETs はグラム陽性球菌, グラム陰性桿菌, 真菌の一部の細菌に対する感染防御において重要な免疫反応であり [67]、*Padi4* KO マウスでは NETs の産生障害によって *Group A Streptococcus pyogenes* の感染が重症化することが報告されている [24]。最近、腸内細菌が Th17 細胞, 制御性 T 細胞を含めた様々な免疫系に影響を与えることが注目されており [68, 69]、*Padi4* KO マウスにおいても腸管フローラの変化によって免疫応答への影響を呈している可能性も否定はできないと考えた。我々の preliminary な検討では WT と *Padi4* KO マウスの免疫前後の小腸における *Il-6* 遺伝子の発現に著明な低下を認めておらず、少なくとも腸管における Th17 細胞分化への圧力が *Padi4* KO マウスにおいて大きく変化している可能性は低いと考えている。

Padi4 KO - rhGPI 誘導性関節炎マウスでは血清抗 GPI 抗体価が低下していたが、rhGPI 誘導性関節炎においては抗 GPI IgG は発症には必要であるものの重症度には関連しないと報告されていることから [50]、本検討においても血清抗 GPI 抗体価の低下をもって関節炎の改善について説明できるとは言い難い。そして、免疫後にある程度の抗 GPI 抗体を有しているならば関節炎の発症には十分であるとも考えられ、この点に関しては *Padi4* KO マウスでも関節炎の発症

率が WT マウスと同等であったことから支持される。一方で、*Padi4* の欠損に伴ってリンパ節における GCB 細胞の減少を呈したことは興味深く、GPI に対する抗原特異的な抗体産生の低下への影響を説明するひとつの要因であると考えられた。Tfh 細胞の数には変化が見られていないが、IL-6 は B 細胞の分化、抗原特異的な抗体産生に関与することから[70]、*Padi4* 欠損に伴う IL-6 の低下による結果として GCB 細胞の分化抑制、抗 GPI IgG 抗体の産生低下を呈している可能性が考慮された。また、ImmGen project のデータベースによると骨髄成熟形質細胞にも *Padi4* が発現していることが示唆されており、*Padi4* の欠損によって同細胞を含めた他の B 細胞系の分化、増殖、生存にも直接影響を与えることで、抗 GPI IgG 抗体価が低下している可能性も考慮された。

なお、本検討では rhGPI 誘導性関節炎を含めたマウスモデルにおいてはシトルリン化蛋白, ACPA の意義が明らかでないことより、シトルリン化抗原, ACPA の検討は行っていないが、実際のヒト RA における *PADI4* 遺伝子の機能として重要である可能性はあり、今後の検討が必要と考えている。

最近、CIA マウスモデルの免疫後の脾臓において CD11b⁺Ly-6G⁺Ly-6C^{lo}B220⁻の未成熟な顆粒球様の形態の細胞群が増殖しており、これらは T 細

胞の増殖, 炎症性サイトカイン産生の抑制と抗炎症性サイトカイン産生を誘導することから、悪性疾患で見出された骨髄球系細胞の抑制性サブセットである Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) が自己免疫疾患モデルでも存在する可能性が示唆された[71]。GPI 誘導性関節炎においても免疫後の脾細胞で同様の環状核を有する $FSC^{hi}SSC^{hi}CD11b^{hi}Ly-6G^{hi}Ly-6C^{int}$ の細胞を認めたが、我々の preliminary な検討では *Padi4* KO マウスの免疫後の脾臓, 骨髄の顆粒球系細胞における MDSC で特徴的に発現するとされる NOS2 の発現は低下していたことから、*Padi4* KO マウスで MDSC が過剰に増加している可能性は低いと考えている。MDSC については今後の RA, 関節炎モデルマウスにおける更なる研究が必要と考えられる。

Padi4 KO マウスを用いた GPI 誘導性関節炎の解析により、*Padi4* 遺伝子は炎症状態における顆粒球系細胞, 単球系細胞の末梢での生存や血清 IL-6, Th17 細胞分化, 抗体産生といった多彩な免疫機構を制御していることが証明された。これらの新たな知見は、従来 RA における *PADI4* の役割として考えられてきたシトルリン化蛋白の産生以外にも、*PADI4* が様々な免疫系細胞の動態に影響を与えることによって関節炎の免疫応答における重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後の課題としては、PAD4 によるヒストン等の蛋白の

シトルリン化が細胞生存やサイトカイン産生に与える分子生物学的な機序の解明、RAにおける遺伝子多型と遺伝子発現の関連解析が必要であるが、PAD4はRAの治療標的として創薬につながる可能性が高い分子であると考えられ、更なる研究を行う予定である。

謝辞

DBA/1J *Padi4* KO マウスを快くご提供頂きました理化学研究所 自己免疫疾患研究チーム 鈴木亜香里先生、rhGPI 遺伝子導入大腸菌のグリセロールストックを快くご提供頂きました筑波大学膠原病内科 松本功先生、住田孝之先生、今回の研究全般においてお手伝い頂きました東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ内科 実験助手の坂下かな子さん、竹澤純さん、綿田草子さん、安樂正輝さん、井上和子さん、澁谷亜矢子さん、今回の研究全般において御指導頂きました東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ内科 庄田宏文先生、藤尾圭志先生、山本一彦先生に深謝申し上げます。

参考文献

- [1] D. L. Scott, *et al.*, "Rheumatoid arthritis," *Lancet*, vol. 376, pp. 1094-108, Sep 25 2010.
- [2] I. B. McInnes and G. Schett, "The pathogenesis of rheumatoid arthritis," *N Engl J Med*, vol. 365, pp. 2205-19, Dec 8 2011.
- [3] S. Viatte, *et al.*, "Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis," *Nat Rev Rheumatol*, vol. 9, pp. 141-53, Mar 2013.
- [4] A. Suzuki, *et al.*, "Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis," *Nat Genet*, vol. 34, pp. 395-402, Aug 2003.
- [5] K. Ikari, *et al.*, "Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study," *Arthritis Rheum*, vol. 52, pp. 3054-7, Oct 2005.
- [6] C. P. Kang, *et al.*, "A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans," *Arthritis Rheum*, vol. 54, pp. 90-6, Jan 2006.
- [7] M. L. Burr, *et al.*, "PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population," *Ann Rheum Dis*, vol. 69, pp. 666-70, Apr 2010.
- [8] A. Barton, *et al.*, "A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population," *Arthritis Rheum*, vol. 50, pp. 1117-21, Apr 2004.
- [9] Y. Kochi, *et al.*, "Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis," *Nat Rev Rheumatol*, vol. 6, pp. 290-5, May 2010.
- [10] S. Eyre, *et al.*, "High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis," *Nat Genet*, vol. 44, pp. 1336-40, Dec 2012.
- [11] E. R. Vossenaar, *et al.*, "PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease," *Bioessays*, vol. 25, pp. 1106-18, Nov 2003.
- [12] X. Chang and J. Han, "Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors," *Mol Carcinog*, vol. 45, pp. 183-96, Mar 2006.
- [13] C. Foulquier, *et al.*, "Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation," *Arthritis Rheum*, vol. 56, pp. 3541-53, Nov 2007.
- [14] X. Chang, *et al.*, "Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis," *Rheumatology (Oxford)*, vol. 44, pp. 40-50, Jan 2005.

- [15] M. Nakayama-Hamada, *et al.*, "Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 327, pp. 192-200, Feb 4 2005.
- [16] K. Nakashima, *et al.*, "Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes," *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 49562-8, Dec 20 2002.
- [17] G. L. Cuthbert, *et al.*, "Histone deimination antagonizes arginine methylation," *Cell*, vol. 118, pp. 545-53, Sep 3 2004.
- [18] Y. Wang, *et al.*, "Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination," *Science*, vol. 306, pp. 279-83, Oct 8 2004.
- [19] X. Zhang, *et al.*, "Genome-wide analysis reveals PADI4 cooperates with Elk-1 to activate c-Fos expression in breast cancer cells," *PLoS Genet*, vol. 7, p. e1002112, Jun 2011.
- [20] X. Cui, *et al.*, "The induction of microRNA-16 in colon cancer cells by protein arginine deiminase inhibition causes a p53-dependent cell cycle arrest," *PLoS One*, vol. 8, p. e53791, 2013.
- [21] Q. Guo and W. Fast, "Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53," *J Biol Chem*, vol. 286, pp. 17069-78, May 13 2011.
- [22] H. Yao, *et al.*, "Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis," *J Biol Chem*, vol. 283, pp. 20060-8, Jul 18 2008.
- [23] K. Nakashima, *et al.*, "PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression," *Nat Commun*, vol. 4, p. 1836, 2013.
- [24] P. Li, *et al.*, "PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps," *J Exp Med*, vol. 207, pp. 1853-62, Aug 30 2010.
- [25] V. Saulot, *et al.*, "Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum*, vol. 46, pp. 1196-201, May 2002.
- [26] S. Bas, *et al.*, "Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors," *Rheumatology (Oxford)*, vol. 41, pp. 809-14, Jul 2002.
- [27] R. Goldbach-Mansky, *et al.*, "Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset," *Arthritis Res*, vol. 2, pp. 236-43, 2000.
- [28] G. Hayem, *et al.*, "Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis," *Ann Rheum Dis*, vol. 58, pp. 291-6, May 1999.

- [29] W. Hueber, *et al.*, "Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis," *Rheumatology (Oxford)*, vol. 38, pp. 155-9, Feb 1999.
- [30] G. A. Schellekens, *et al.*, "Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies," *J Clin Invest*, vol. 101, pp. 273-81, Jan 1 1998.
- [31] G. A. Schellekens, *et al.*, "The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide," *Arthritis Rheum*, vol. 43, pp. 155-63, Jan 2000.
- [32] K. Nishimura, *et al.*, "Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis," *Ann Intern Med*, vol. 146, pp. 797-808, Jun 5 2007.
- [33] M. M. Nielen, *et al.*, "Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors," *Arthritis Rheum*, vol. 50, pp. 380-6, Feb 2004.
- [34] O. Meyer, *et al.*, "Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage," *Ann Rheum Dis*, vol. 62, pp. 120-6, Feb 2003.
- [35] E. J. Kroot, *et al.*, "The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum*, vol. 43, pp. 1831-5, Aug 2000.
- [36] U. Harre, *et al.*, "Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin," *J Clin Invest*, vol. 122, pp. 1791-802, May 1 2012.
- [37] L. Klareskog, *et al.*, "Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis," *Annu Rev Immunol*, vol. 26, pp. 651-75, 2008.
- [38] S. Y. Bang, *et al.*, "Peptidyl arginine deiminase type IV (PADI4) haplotypes interact with shared epitope regardless of anti-cyclic citrullinated peptide antibody or erosive joint status in rheumatoid arthritis: a case control study," *Arthritis Res Ther*, vol. 12, p. R115, 2010.
- [39] T. Suzuki, *et al.*, "PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study," *PLoS One*, vol. 8, p. e61045, 2013.
- [40] K. Arita, *et al.*, "Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, pp. 5291-6, Apr 4 2006.
- [41] T. Shay and J. Kang, "Immunological Genome Project and systems immunology," *Trends Immunol*, Apr 27 2013.

- [42] A. S. Rohrbach, *et al.*, "PAD4 is not essential for disease in the K/BxN murine autoantibody-mediated model of arthritis," *Arthritis Res Ther*, vol. 14, p. R104, 2012.
- [43] V. C. Willis, *et al.*, "N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis," *J Immunol*, vol. 186, pp. 4396-404, Apr 1 2011.
- [44] A. S. Korganow, *et al.*, "From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins," *Immunity*, vol. 10, pp. 451-61, Apr 1999.
- [45] I. Matsumoto, *et al.*, "How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease," *Nat Immunol*, vol. 3, pp. 360-5, Apr 2002.
- [46] I. Matsumoto, *et al.*, "Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme," *Science*, vol. 286, pp. 1732-5, Nov 26 1999.
- [47] D. Schubert, *et al.*, "Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice," *J Immunol*, vol. 172, pp. 4503-9, Apr 1 2004.
- [48] O. Frey, *et al.*, "B cell depletion reduces the number of autoreactive T helper cells and prevents glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis," *PLoS One*, vol. 6, p. e24718, 2011.
- [49] Y. Tanaka-Watanabe, *et al.*, "B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis," *Clin Exp Immunol*, vol. 155, pp. 285-94, Feb 2009.
- [50] R. Bockermann, *et al.*, "Induction of a B-cell-dependent chronic arthritis with glucose-6-phosphate isomerase," *Arthritis Res Ther*, vol. 7, pp. R1316-24, 2005.
- [51] K. Iwanami, *et al.*, "Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase," *Arthritis Rheum*, vol. 58, pp. 754-63, Mar 2008.
- [52] I. Matsumoto, *et al.*, "Therapeutic effects of antibodies to tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in mice with glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis," *Arthritis Res Ther*, vol. 10, p. R66, 2008.
- [53] A. R. Pettit, *et al.*, "TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis," *Am J Pathol*, vol. 159, pp. 1689-99, Nov 2001.

- [54] N. D. Kim, *et al.*, "A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis," *J Exp Med*, vol. 203, pp. 829-35, Apr 17 2006.
- [55] K. Hirota, *et al.*, "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model," *J Exp Med*, vol. 204, pp. 2803-12, Nov 26 2007.
- [56] S. Rose, *et al.*, "A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment," *Cytometry A*, vol. 81, pp. 343-50, Apr 2012.
- [57] M. Hasenberg, *et al.*, "Rapid immunomagnetic negative enrichment of neutrophil granulocytes from murine bone marrow for functional studies in vitro and in vivo," *PLoS One*, vol. 6, p. e17314, 2011.
- [58] M. El-Behi, *et al.*, "The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1 \cdot and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF," *Nat Immunol*, vol. 12, pp. 568-575, 2011.
- [59] L. Codarri, *et al.*, "ROR[gamma]t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation," *Nat Immunol*, vol. 12, pp. 560-567, 2011.
- [60] J. A. Singh, *et al.*, "Tocilizumab for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review," *J Rheumatol*, vol. 38, pp. 10-20, Jan 2011.
- [61] M. C. Genovese, *et al.*, "Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomised, placebo controlled study," *Ann Rheum Dis*, vol. 72, pp. 863-9, Jun 2013.
- [62] D. D. Patel, *et al.*, "Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases," *Ann Rheum Dis*, vol. 72 Suppl 2, pp. ii116-23, Apr 2013.
- [63] J. Leipe, *et al.*, "Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis," *Arthritis Rheum*, vol. 62, pp. 2876-85, Oct 2010.
- [64] S. M. Hurst, *et al.*, "Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation," *Immunity*, vol. 14, pp. 705-14, Jun 2001.
- [65] G. W. Jones, *et al.*, "Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells," *J Immunol*, vol. 184, pp. 2130-9, Feb 15 2010.
- [66] K. Tillack, *et al.*, "T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses," *J Immunol*, vol. 188, pp. 3150-9, Apr 1 2012.
- [67] V. Brinkmann and A. Zychlinsky, "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs," *Nat Rev Microbiol*, vol. 5, pp. 577-82, Aug 2007.

- [68] Ivanov, II, *et al.*, "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria," *Cell*, vol. 139, pp. 485-98, Oct 30 2009.
- [69] K. Atarashi, *et al.*, "Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota," *Nature*, vol. 500, pp. 232-6, Aug 8 2013.
- [70] O. Dienz, *et al.*, "The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells," *J Exp Med*, vol. 206, pp. 69-78, Jan 16 2009.
- [71] W. Fujii, *et al.*, "Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis," *J Immunol*, vol. 191, pp. 1073-81, Aug 1 2013.