

Title	ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation
Author(s)	新, 幸二
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/49943">http://hdl.handle.net/11094/49943</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	新 幸 二
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 22800 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	ATP drives lamina propria T <sub>H</sub> 17 cell differentiation (ATP が腸管粘膜固有層の T <sub>H</sub> 17 細胞の分化を促進する)
論文審査委員	(主査) 教授 竹田 潔 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

【 目 的 】

腸管粘膜組織は外界と接している場であり、経口的に侵入する病原性微生物や食物抗原などにさらされている。また、腸管内腔には様々な細菌によって形成される腸内常在菌叢（腸内フローラ）が存在している。この常在菌や食物抗原には免疫寛容(tolerance)と呼ばれる免疫抑制機構が働いているが、病原性微生物が侵入してくると強い免疫反応が起こり、迅速に排除を行う。腸管にはこのようなユニークで複雑な免疫機構が形成されている。しかし、このバランスが崩れ常在菌や食物抗原に反応するようになると、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患や食物アレルギーを引き起こすと考えられている。近年、さまざまな自己免疫疾患の病態にTH17細胞が関与しているという報告が相次いで出された。同時に炎症性腸疾患のマウスモデルでもIL-17が病変形成に関与しているという報告がなされた。TH17細胞はヘルパーCD4 T細胞の一種として同定され、STAT3依存的に転写因子Ror $\gamma$ tが発現し、IL-17, IL-21, IL22などのサイトカインを分泌することが報告されている。TH17細胞の発生、分化機構の解析はin vitroにおいて盛んに研究されており、IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23の3種のサイトカイン刺激の重要性が明らかになっている。しかし、腸管に存在するTH17細胞の誘導がin vivoでどのようにして行われているのかの詳細なメカニズムは未解明であった。そこで今回、腸管でのTH17細胞の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

【 方法ならびに成績 】

1.腸管TH17細胞の腸内常在菌による誘導

TH17細胞の分布を解析すると、脾臓や腸間膜リンパ節、パイエル板などのリンパ節にはTH17細胞がほとんど存在していないにも関わらず、正常マウスにおいて腸管粘膜固有層に多数存在していた。このTH17細胞の誘導における腸内常在菌の関与について腸内常在菌が存在していないGerm-Freeマウスを用いて検討した。その結果、Germ-FreeマウスではTH17細胞が劇的に減少していた。しかし、Toll様受容体を介したシグナルの消失するMyD88/TRIF二重欠損マウスで腸管TH17細胞の数に変化がないことから、常在菌からの刺激がToll様受容体を經由していないことが考えられた。

2.ATPによるTH17細胞の誘導

アデノシン3リン酸(ATP)は免疫細胞に発現するATP受容体であるP2XやP2Y受容体を介して炎症を誘導することが知られている。また、SPFマウスの便中の細菌を培養すると、上清中のATP濃度が高い値を示したことや、Germ-Freeマウスにおいて便中ATP濃度が激減していたことから、TH17細胞誘導におけるATPの関与について解析した。TH17細胞がほとんど存在していないGerm-Freeマウスに加水分解されにくいATPホモログであるATP $\gamma$ Sを腹腔内や経肛門的に投与すると粘膜固有層のTH17細胞の数が増加した。一方、SPFマウスにATPの加水分解酵素であるapyraseを投与する

とTH17細胞が減少した。

3.樹状細胞の関与

TH17細胞が腸管粘膜固有層に多数存在していることから、粘膜固有層に存在する樹状細胞がTH17細胞を誘導していることが考えられた。実際、Germ-FreeマウスにATP $\gamma$ Sを投与すると粘膜固有層のCD11c陽性細胞で、TH17細胞の誘導に必要なサイトカインであるIL-6, IL-23p19, TGF- $\beta$ の活性化分子である $\alpha$ v $\beta$ 8インテグリンの発現上昇が見られた。また、脾臓または粘膜固有層のCD11c陽性細胞とナイーブT細胞を培養すると、粘膜固有層のCD11c陽性細胞で強くTH17細胞が誘導された。さらに、CD11c陽性細胞のどのサブセットが重要なのかを解析するために、脾臓や腸間膜リンパ節には存在せず粘膜固有層に特異的に存在するCD70を強発現する(CD70<sup>hi</sup>) 樹状細胞を特定した。この細胞とナイーブT細胞とを共培養すると腸管粘膜固有層CD70<sup>lo</sup> 樹状細胞や脾臓CD11c<sup>+</sup>細胞と比較して、極めて強くTH17細胞を誘導した。また、CD70<sup>hi</sup>樹状細胞をATPで刺激するとIL-6,  $\alpha$ v $\beta$ 8インテグリンやIL-23 p19の発現が上昇した。このことから、粘膜固有層に局在するCD70<sup>hi</sup>樹状細胞がTH17細胞の分化を誘導していることが明らかとなった。また、ナイーブT細胞との共培養中にATPを加えると、CD70<sup>hi</sup>樹状細胞によるTH17細胞の誘導能が亢進した。実際、CD70<sup>hi</sup>樹状細胞は粘膜固有層のCD70<sup>hi</sup>樹状細胞や脾臓の樹状細胞と比較してP2X1,2,4,7やP2Y1,2,6,12のmRNAの発現量が高かった。

4.ATP依存的なTH17細胞誘導と腸管炎症

Severe Combined Immunodeficiency(SCID)マウスにナイーブT細胞を移入すると腸炎を発症する。この系を用いてT細胞依存的腸炎とATPとの関わりを検証した。SCIDマウスにナイーブT細胞を移入した後、ATPを3日おきに1ヶ月間腹腔内投与した。その結果、ATPを投与していないマウスと比較してATPを投与したマウスでは体重減少や下痢がひどく、組織病理学的な解析においても大腸炎が有意に増悪していた。また、腸管粘膜固有層に存在しているTH17細胞の数を解析するとATPを投与したマウスにおいて有意に増加していた。このようにATPによるTH17細胞数の増加とT細胞依存性の大腸炎の重症度に相関性が認められた。

【 総 括 】

以上の結果から、腸管粘膜固有層に存在しているCD70<sup>hi</sup>樹状細胞が常在菌由来のATPの刺激を受けてIL-6, IL-23, TGF- $\beta$ などのTH17細胞誘導性サイトカインを産生する。その結果、粘膜固有層においてナイーブT細胞をTH17細胞へと誘導する。さらに誘導されたTH17細胞は定常状態では腸管免疫系のホメオスタシスの維持を担っているが、ある条件下では、腸管炎症を導きうることが示された。

論文審査の結果の要旨

最近、新たに同定されたインターロイキン(IL)-17産生ヘルパーT細胞(TH17細胞)が炎症性腸疾患に関与していることが報告された。TH17細胞の分化についてはin vitroにおいて多くの解析がなされているが、腸管での分化、誘導においては十分に解析がなされていない状況であった。

本研究では腸管でのTH17細胞の分化誘導メカニズムを解析し、腸内常在菌由来のATPが腸管粘膜固有層に存在しているユニークな樹状細胞を活性化し、TH17細胞の誘導因子であるIL-6, IL-23の産生やTGF- $\beta$ の活性化を引き起こし腸管でのTH17細胞を誘導していることを明らかにした。また、ATPによるTH17細胞の増加が大腸炎の悪性度と相関することも明らかにした。

本研究によりATPがTH17細胞の誘導を促し炎症性腸疾患を引き起こす機序の一つのメカニズムを明らかにしたと考えられ、非常に重要な研究成果である。よって、本研究は学位に値するものと認める。