

自己免疫病の有効な治療法開発に繋がる。現在までに見出されたV $\alpha$ 19 NKT細胞を活性化する $\alpha$ -マンノシル化糖脂質の性質を詳細に検討しこれをもとに今後、実効性のある化合物を検索することが求められる。

### 文 献

- 1) Tilloy F, Treiner E, Park SH, et al. An invariant T cell receptor  $\alpha$  chain define a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted  $\alpha/\beta$  T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 1999 ; 189 : 1967.
- 2) Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, et al. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup>  $\alpha/\beta$  T cells demonstrates preferential use of several V $\beta$  genes and an invariant TCR  $\alpha$  chain. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 1.
- 3) Shimamura M, Huang YY. Presence of a novel subset of NKT cells bearing an invariant V $\alpha$ 19.1-J $\alpha$ 26 TCR  $\alpha$  chain. *FEBS Lett* 2002 ; 516 : 97.
- 4) Treiner E, Duban L, Bahram S, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003 ; 422 : 164.
- 5) Shimamura M, Huang YY, Okamoto N, et al. Characterization of a novel NKT cell repertoire expressing an invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 26 TCR  $\alpha$  chain using the TCR transgenic mice [abstract]. The 2<sup>nd</sup> International Workshop on CD1 antigen presentation and NKT cells, 2002 ; Woods Hole. Abstract No. 4.
- 6) Okamoto N, Kanie O, Huang YY, et al. Synthetic  $\alpha$ -mannosyl ceramide as a potent stimulant for an NKT cell repertoire bearing the invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 26 TCR  $\alpha$  chain. *Chem Biol* 2005 ; 12 : 677.
- 7) Kawachi I, Maldonado J, Strader C, et al. MR1-restricted V $\alpha$ 19<sup>i</sup> mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol* 2006 ; 176 : 1618.
- 8) Shimamura M, Huang YY, Okamoto N, et al. Modulation of V $\alpha$ 19 NKT cell immune responses by  $\alpha$ -mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosine. *Eur J Immunol* 2007 ; 37 : 1836.
- 9) Shimamura M, Huang YY, Okamoto N, et al. Glycolipids with non-reducing end  $\alpha$ -mannosyl residues that have potentials to activate invariant V $\alpha$ 19 NKT cells. *FEBS J* 2007 ; 274 : 2921.
- 10) Illés Z, Shimamura M, Newcombe J, et al. Accumulation of V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions. *Int Immunol* 2003 ; 16 : 223.
- 11) Croxford JL, Miyake S, Huang YY, et al. Invariant V $\alpha$ 19<sup>i</sup> T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 2006 ; 7 : 987.
- 12) Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-regulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 10913.
- 13) Sutton C, Brereton C, Keogh B, et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 1685.
- 14) Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006 ; 177 : 566.
- 15) Sakuishi K, Oki S, Araki M, et al. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J Immunol* 2007 ; 179 : 3452.
- 16) Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1372.
- 17) Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1380.
- 18) McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, et al. TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T<sub>H</sub>-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1390.



## 話題

# ヒトTh17細胞における ケモカインレセプターの発現\*

佐藤和貴郎\*\* 荒浪利昌\*\* 山村 隆\*\*

Key Words : Th17 cells, human T cells, chemokine receptors, CCR2

### はじめに

CD4<sup>+</sup>ヘルパー T細胞は適応免疫や種々の自己免疫疾患において鍵となる細胞である。従来提唱されてきたモデルは、Th1細胞とTh2細胞の2つのサブセットがあり、Th1細胞はIFN- $\gamma$ を産生し細胞性免疫に、Th2細胞はIL-4, -5, -13の産生を介してB細胞を活性化し、液性免疫に重要といわれてきた。両者はお互いがお互いを抑制する関係にあり、疾患との関連では、多発性硬化症などの臓器特異的自己免疫疾患は「Th1優位」な状況で生じ、一方アレルギー疾患は「Th2優位」な場合に起こるとい説が一世を風靡していた。しかし、実際には同一個体で両者が合併する例も少なくないし、近年日本をはじめとする先進国で両疾患とも増加している現状をうまく説明できなかつた。ところが、これまでTh1細胞が発症に重要といわれてきた自己免疫疾患の動物モデルの解析から、IL-17を産生するCD4<sup>+</sup>T細胞が真に発症に関与する細胞であることが示され<sup>1)~5)</sup>、また2006年にはTh1, Th2細胞とは異なる分化経路をたどる細胞であることがマウスで証明され、Th17細胞と名づけられた<sup>6)~10)</sup>。ヒトのTh17細胞は分化に必要なサイトカインの種類などマウスと異なる点がいくつか指摘されており、現在ホットに研究が展開されている<sup>11)~14)</sup>。一方、マウスではまだ解析が進んでいない領域として、Th17細胞のケモカイン受容体の研究がある。

ケモカインは特定の細胞(ケモカイン受容体発現細胞)を遊走・活性化させる作用をもち、免疫反応・炎症反応が「適材適所」で起こるために生体がもつメカニズムである。一般に、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞は末梢リンパ組織中を循環するためにケモカイン受容体としてCCR7を発現しているが、活性化とともにその発現を失い、エフェクター細胞に分化すると特有のケモカイン受容体を発現するようになる<sup>15)</sup>。これまでの報告ではTh1細胞に分化するとCCR5やCXCR3を、Th2細胞ならCCR4やCCR8, CRTh2を発現する傾向があり<sup>16)~20)</sup>、T細胞の分化とケモカイン受容体の発現は協調して制御されていると考えられる。Th17細胞が独立した分化経路をたどる細胞であるならば、Th1細胞やTh2細胞とは違った特有のケモカイン受容体を発現している可能性が考えられる。

われわれは、ヒトのTh17細胞が発現しているケモカイン受容体を明らかにしようと試み、Th17細胞がCCR2陽性であり、かつCCR5陰性であることによってTh1細胞と区別可能であることを見出した。CCR2は主として単球に発現しているが、T細胞においても弱いながら発現が認められ、また多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症にも重要であると報告されているケモカイン受容体である<sup>21)22)</sup>。しかし、現時点ではTh17細胞がCCR2を発現している生理的・病的意義については不明である。以下にわれわれの研究内容について紹介する<sup>23)</sup>。

\* Chemokine receptor expression on human Th17 cells.

\*\* Wakiro SATO, M.D., Toshimasa ARANAMI, M.D., Ph.D. & Takashi YAMAMURA, M.D., Ph.D.: 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部[〒187-8502 小平市小川東町4-1-1]; Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira 187-8502, JAPAN

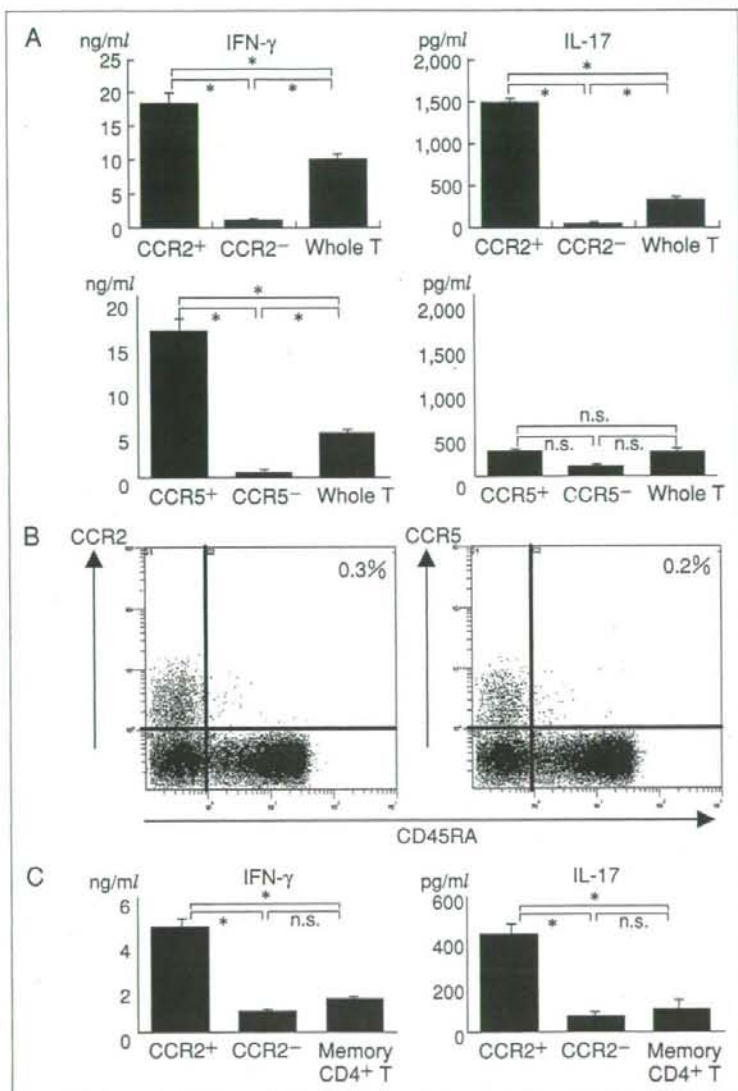


図1 Th17細胞はCCR2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の分画に含まれる

- A: 健常者の末梢単核球細胞から磁気ビーズを用いてT細胞を分離。このT細胞をさらにケモカイン受容体(CCR2およびCCR5)の有無で分画し、PMAとionomycinで24時間刺激後、その上清を回収、ELISAを用いてサイトカイン産生量を測定した。\* $P < 0.01$
- B: CCR2<sup>+</sup>細胞、CCR5<sup>+</sup>細胞ともにCD4<sup>+</sup>T細胞の中で、CD45RA陰性メモリーT細胞分画に属する。
- C: 磁気ビーズを用いてメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を分離し、このT細胞をさらにケモカイン受容体(CCR2およびCCR5)の有無で分画、刺激後の上清中サイトカイン量をELISAで測定した。\* $P < 0.01$

CCR2陽性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞は  
Th17細胞とTh1細胞の両者を含む

健常者の末梢血単核球細胞(PBMC)を磁気ビー

ズを用いてCD3陽性のT細胞に分離し、さらにケモカイン受容体CCR2の発現の有無により、CCR2陽性分画とCCR2陰性分画に分離、それぞれの細胞をPMAとionomycinで刺激したところ、



CCR2陽性分画の細胞は、CCR2陰性分画の細胞に比べ、IFN- $\gamma$ およびIL-17の産生が高かった。T細胞全体ではその中間の値を示した(図1A上)。同様にCCR5の有無でT細胞を分離した場合には、IFN- $\gamma$ の産生はCCR5陽性分画で高かったが、IL-17の産生に関しては有意な差は認められなかった(図1A下)。T細胞の中でIL-17の産生が報告されているT細胞として、CD4<sup>+</sup>T細胞のほかに、CD8<sup>+</sup>T細胞や $\gamma\delta$ T細胞がある。また、CD4<sup>+</sup>T細胞の中で、CCR2あるいはCCR5陽性の細胞はCD45RA陰性のメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞であるので(図1B)、今度はヒトPBMCから磁気ビーズを用いてメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を分離したのち、CCR2の発現の有無で細胞を分離し、それぞれの細胞を同様にPMAとionomycinで刺激した。図1Cに示すようにやはりCCR2陽性分画においてIFN- $\gamma$ およびIL-17の産生が高かった。さらに、産生量が高いだけでなく、産生細胞の頻度も高いかどうかをELISPOT法で調べたところ、予想どおりIFN- $\gamma$ 、IL-17ともに産生細胞の頻度は

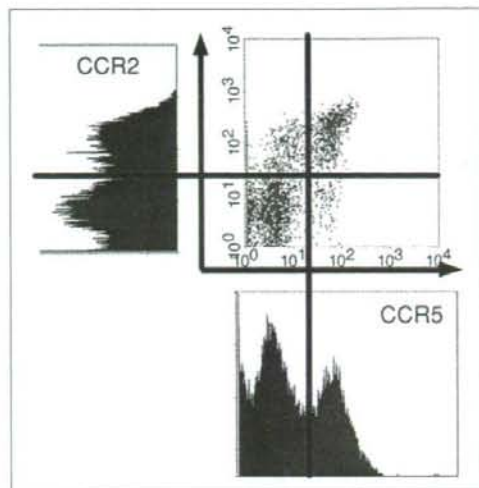


図2 CCR2<sup>+</sup>細胞はCCR5<sup>+</sup>細胞とCCR5<sup>-</sup>細胞の2つの分画からなるメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の中で、CCR2とCCR5の発現をFACSで調べた。

CCR2陽性細胞において高かった。このことから、CCR2陽性のメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞はTh1細胞と

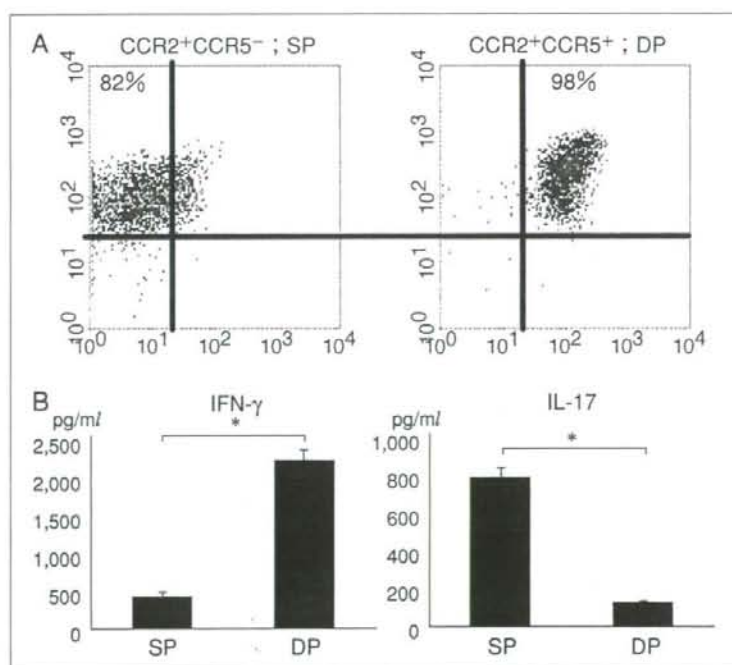


図3 CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>細胞は主としてIL-17を産生し、IFN- $\gamma$ は産生しない  
 A: FACSを用いてCCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>(single positive; SP)細胞とCCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>(double positive; DP)細胞を分離し、純度をFACSで解析した。  
 B: 分離したSP細胞とDP細胞をPMAとionomycinで24時間刺激し、上清中のサイトカイン産生量をELISAで測定した。\* $P < 0.01$

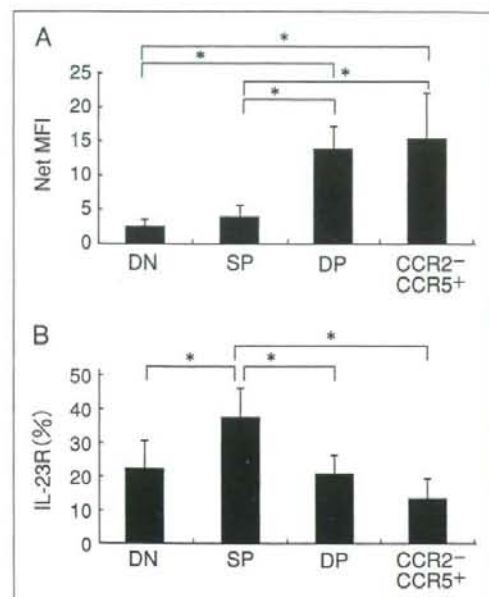


図4 SP細胞とDP細胞はT-betおよびIL-23R発現が異なる

A: T-betの発現レベルをアイソタイプコントロールと比較して示す。DN: double negative; CCR2<sup>-</sup>CCR5<sup>-</sup>細胞, MFI: mean fluorescent intensity, \**P*<0.01

B: IL-23受容体(IL-23R)陽性細胞の割合を示す。\**P*<0.01

Th17細胞の両者を多く含む分画であると考えられた。

### CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞は主としてIL-17を産生する

マウスではTh17細胞はTh1細胞とは別の経路で分化することが示されているので、このCCR2陽性CD4<sup>+</sup>T細胞はさらにケモカイン受容体の発現の違いによりTh17細胞とTh1細胞に区別できると考えた。メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞をCCR2とCCR5の両者の抗体で染色し、その発現を調べたところ、図2に示すように、CCR2<sup>+</sup>細胞は、CCR5の発現の有無により、CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>細胞(single positive; 以下、SP細胞と表記)とCCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>細胞(double positive; 以下、DP細胞と表記)からなっていた。そこで、実際にFACSを用いて、SP細胞とDP細胞の両者を分離し、それぞれの細胞をPMAとionomycinで刺激してサイトカイン産生能を比較した。図3Aは分離した各細胞の純度

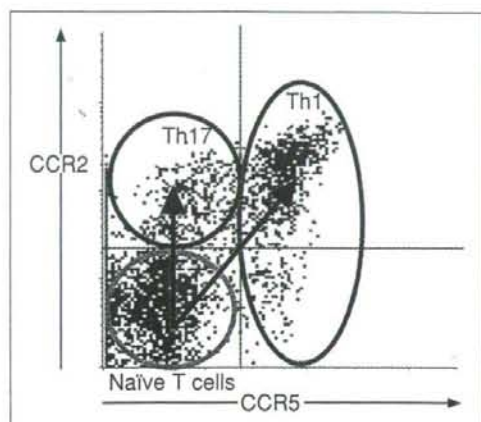


図5 ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞が活性化とともにケモカイン受容体を発現しつつ、Th1, Th17細胞に分化していくモデル

を示した代表例である。結果は図3Bに示すようにSP細胞はIFN- $\gamma$ 産生量は低くIL-17産生量が高かった。一方、DP細胞は対照的にIFN- $\gamma$ の産生量が高く、IL-17産生量は低かった。すなわち、Th17細胞とTh1細胞の両者を含むCCR2陽性細胞のうち、SP細胞は主としてTh17細胞を、DP細胞は主としてTh1細胞を含むと考えられた。

### T-betとIL-23受容体の発現

次に、Th1細胞の分化に必須の転写因子であるT-betの発現について調べた。T-betはTh1細胞においてとくに高く発現していると報告されている<sup>24)</sup>。メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞におけるT-betの発現を細胞内染色しFACSで解析した結果、図4Aに示すようにDP細胞とCCR2<sup>-</sup>CCR5<sup>+</sup>細胞においてとくに高く、SP細胞ではCCR2<sup>-</sup>CCR5<sup>-</sup>細胞と同様の低いレベルの発現しか認められなかった。また、IL-23はTh17細胞の増殖や生存に重要であると報告されているサイトカインであるが<sup>25)</sup>、その受容体(IL-23R)の発現はTh17細胞において高い可能性がある。実際、メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞におけるIL-23Rの発現をCCR2, CCR5の発現とともに解析してみたところ、SP細胞においても発現細胞の頻度が高かった(図4B)。

### まとめ

以上をまとめると、CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>細胞(SP細胞)はメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の中で、他の分画に比べ

て高いIL-17産生能をもち、もっとも高頻度にIL-23受容体陽性細胞を含み、そしてCCR5<sup>+</sup>細胞に比べT-betの発現が低いという特徴をもつ細胞である。CCR5の有無によってTh1細胞を含む分画と区別することができ、マウスと同様ヒトにおいてもTh1細胞とは異なる細胞であることが示唆された。ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞がTh1細胞やTh17細胞に分化するに従い、ケモカイン受容体の発現も変化するモデルが考えられる(図5)。われわれの報告とはほぼ同時期に、Acosta-RodriguezらはTh17細胞はCCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>であると報告している<sup>25)</sup>。われわれの報告との関係については現在解析中であるが、もしかすると両者が生体内において異なる部位で異なる役割を果たしているのかもしれない。Th1細胞とTh17細胞のケモカイン受容体の発現が異なることで、生体内においてそれぞれの細胞が異なる部位に遊走でき、それぞれの環境に応じた免疫反応や炎症反応に参加することが可能になると考えられる。ヒトのTh17細胞の解析をさらに進め、自己免疫疾患の病態の解明に一步でも近づけるよう今後も努力していきたい。

## 文 献

- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003 ; 421 : 744.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 1951.
- Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire : the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 2006 ; 18 : 349.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1310.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 1910.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 1123.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 1133.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006 ; 24 : 179.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 2006 ; 441 : 235.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage. *Nature* 2006 ; 441 : 231.
- Chen Z, Tato CM, Muul L, et al. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2007 ; 56 : 2936.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 950.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 942.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1849.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses : intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000 ; 290 : 92.
- Weber C, Weber KS, Klier C, et al. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and Th1-like/CD45RO<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2001 ; 97 : 1144.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells



- (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998 ; 187 : 129.
- 18) Campbell JD, HayGlass KT. T cell chemokine receptor expression in human Th1- and Th2-associated diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000 ; 48 : 451.
- 19) Nagata K, Tanaka K, Ogawa K, et al. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells *in vivo*. *J Immunol* 1999 ; 162 : 1278.
- 20) Qin S, Rottman JB, Myers P, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 746.
- 21) Izikson L, Klein RS, Charo IF, et al. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* 2000 ; 192 : 1075.
- 22) Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, et al. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000 ; 192 : 899.
- 23) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting Edge : Human Th17 cells are identified as bearing CCR2<sup>+</sup> CCR5<sup>-</sup> phenotype. *J Immunol* 2007 ; 178 : 7525.
- 24) Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000 ; 100 : 655.
- 25) Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 639.

\* \* \*