

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390270  
 研究課題名（和文）：LFA-1 による自己反応性 Th17 細胞の分化・活性化・維持メカニズムの解析  
 研究課題名（英文）：A role of LFA-1 in the development of autoreactive Th17 cells

研究代表者 渋谷 和子 (SHIBUYA KAZUKO)  
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授  
 研究者番号：00302406

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、自己免疫疾患の一つである多発性硬化症のマウスモデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における LFA-1 の役割を、LFA-1 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、LFA-1 は、自己抗原特異的 T 細胞の所属リンパ節への流入と、Th17 細胞の増殖を促進することで、EAE の病態の増悪に関与していることが明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have evaluated a role of LFA-1 in the development of EAE using LFA-1-deficient mice. We demonstrate that LFA-1 plays an important role in both autoantigen-specific T cell immigration to the draining lymph nodes (dLN) and development of Th17 cells, leading to the development of EAE.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：免疫学、臨床免疫学、内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病アレルギー感染症内科学

キーワード：臨床免疫学，自己免疫疾患，Th17 細胞，LFA-1

## 1. 研究開始当初の背景

2003 年、IL-17 を産生する CD4<sup>+</sup> T 細胞が自己免疫性関節炎の病態増悪に関与していることが報告されて以来、この細胞は国内外の研究者により精力的に研究され、2005 年にはヘルパー T 細胞の中の独立したサブセット「Th17 細胞」として位置付けられる

にいたった。特に注目されるべきは、従来 Th1 細胞がその病態の主体だと考えられていた関節リウマチや多発性硬化症などの多くの自己免疫疾患において、実際には Th17 細胞こそが組織障害の誘導に重要な役割をはたしていることが明らかにされたことである。Th17 細胞が見いだされたことは、今

後の自己免疫疾患研究のブレイクスルーとなる大きな発見といえる。しかし、Th17細胞の分化と活性化の分子メカニズムの詳細は不明であり、自己免疫疾患において、生体内のTh17細胞を正もしくは負に制御する因子についても明らかではない。

## 2. 研究の目的

LFA-1は $\beta 2$ インテグリンファミリーに属する接着分子であり、ヘルパーT細胞をはじめとして多くの免疫細胞に発現している。T細胞上のLFA-1は接着機能のみならず、抗原受容体(TCR)シグナルを補助して細胞内へ活性化シグナルを伝達するcostimulatory機能を有している。

私達は、これまでに $CD4^+$ ナイーブT細胞上のLFA-1を介するシグナルが、サイトカイン非依存性にTh1細胞を分化誘導することを明らかにした。ヘルパーT細胞が抗原提示を受けて、分化、活性化する際、ヘルパーT細胞上のLFA-1と抗原提示細胞上のICAMが結合することから、LFA-1はTh1細胞のみならずTh17細胞など他のヘルパーT細胞サブセットの分化や活性化にも関与している可能性が推測される。

本研究では、LFA-1の自己免疫疾患への関与ならびにTh17細胞の分化、活性化におけるLFA-1の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 自己免疫疾患におけるLFA-1の役割の検討

LFA-1遺伝子欠損マウスと野生型マウスに、多発性硬化症の疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)や、関節リウマチの疾患モデルであるコラーゲン誘導関節炎(CIA)を誘導して、その発症率や臨床スコアを比較検討した。

### (2) 所属リンパ節の自己反応性Th17細胞の発生におけるLFA-1の役割の検討

LFA-1遺伝子欠損マウスと野生型マウスにEAEを誘導した後、4日目と7日目にそれぞれのマウスから所属リンパ節を採取し、所属リンパ節に存在する自己抗原(MOG)特異的Th17細胞の絶対数と $CD4^+$ T細胞におけるTh17細胞の比率を比較検討した。

### (3) Th17細胞の分化と活性化におけるLFA-1の役割の検討

#### ① Th17細胞分化；

野生型マウスから分離した $CD4^+$ ナイーブT細胞を抗CD3抗体単独または抗LFA-1抗体とともに刺激し、Th17分化を比較検討した。また、OVA特異的TCRトランスジェニックマウス(OT-II)とLFA-1遺伝子欠損マウスを掛け合わせたマウス由来の $CD4^+$ ナイーブT細胞を、OVAと抗原提示細胞( $CD11c^+$ 樹状細胞)で刺激し、Th17分

化を比較検討した。

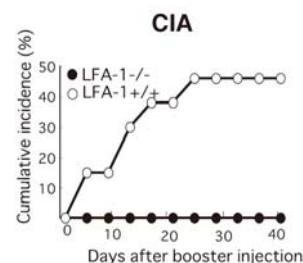
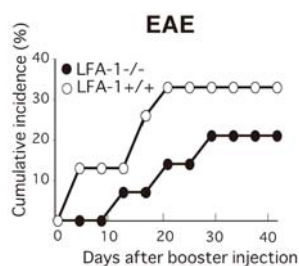
#### ② Th17細胞の活性化；

IL-6とTGF- $\beta$ にて分化誘導したTh17細胞を抗CD3抗体単独または抗LFA-1抗体とともに刺激し、Th17細胞の増殖とIL-17をはじめとするサイトカイン産生を比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 自己免疫疾患におけるLFA-1の役割の検討

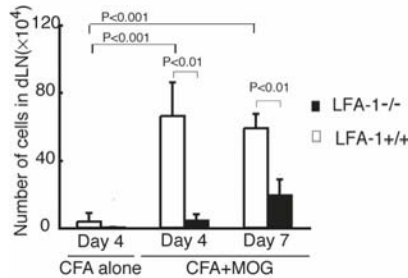
LFA-1遺伝子欠損マウスと野生型マウスにEAEを誘導した結果、LFA-1遺伝子欠損マウスではコントロールマウスに比較して、EAEの発症時期が遅く、最終的な発症率も低下していることが観察された。さらに驚くべくことに、CIA誘導実験では各群40匹のマウスを用いたが、LFA-1遺伝子欠損マウスでは1匹の発症も認められなかった。以上の結果より、LFA-1がEAEやCIAの発症に重要な役割を担っていることが明らかになった。



### (2) 所属リンパ節の自己反応性Th17細胞の発生におけるLFA-1の役割の検討

LFA-1遺伝子欠損マウスと野生型マウスにEAEを誘導後、4日目と7日目の所属リンパ節に存在するリンパ球の数を比較検討した。その結果、LFA-1遺伝子欠損マウスの所属リンパ節では、抗原特異性とは無関係にすべてのリンパ球の数が低下していた。このことは、LFA-1遺伝子欠損マウスでは、EAE誘導時の所属リンパ節へのT細胞の流入が著しく障害されていることを示している。また、LFA-1遺伝子欠損マウスの所属リンパ節においては、自己抗原特異的Th17細胞の数が有意に低下していた。さらに、 $CD4^+$ T細胞に対するTh17細胞の比率も著しく低下し

ていた。絶対数のみならず比率も低下している事実は、LFA-1 遺伝子欠損マウスにおける Th17 細胞の減少がリンパ節に流入してくる自己反応性ナイーブ T 細胞の数の減少だけでは説明がつかず、LFA-1 がリンパ節内で自己反応性 Th17 細胞の分化や活性化に関与している可能性が示唆された。



### (3) Th17 細胞の分化と活性化における LFA-1 の役割の検討

LFA-1 遺伝子欠損マウス由来の CD4<sup>+</sup>ナイーブ T 細胞を中立条件で刺激した結果、LFA-1 欠損 CD4<sup>+</sup>ナイーブ T 細胞から分化する Th17 細胞の数は、野生型マウス由来の CD4<sup>+</sup>ナイーブ T 細胞から分化する Th17 細胞と比較して著しく減少していた。このことから、LFA-1 が Th17 分化もしくは分化後 Th17 細胞の増殖に関与していることが示唆された。次に野生型マウスの CD4<sup>+</sup>ナイーブ T 細胞を抗 CD3 抗体単独または抗 LFA-1 抗体とともに刺激し比較検討したが、Th17 分化に差は認められなかった。一方、分化後の Th17 細胞を抗 CD3 抗体単独または抗 LFA-1 抗体とともに刺激すると、LFA-1 刺激により Th17 細胞の著しい増殖を認めた。これらの結果より、LFA-1 刺激が直接 Th17 分化の選択刺激とはならず、むしろ Th17 分化後の増殖や活性化に関与していることが示された。

以上より、LFA-1 は、自己抗原特異的 T 細胞のリンパ節への流入と、所属リンパ節における Th17 細胞の増殖を促進することで、EAE や CIA の病態の増悪に関与していることが明らかになった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Honda S, Kurita N, Miyamoto A, Cho Y, Usui K, Takeshita K, Takahashi S, Yasui T, Kikutani H, Kinoshita T, Fujita T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in Fc alpha/muR-deficient mice.

*Proc Natl Acad Sci USA*. 106:11230-11235. 2009 (査読有)

2. Lakshmikanth T., Burke S., Ali T.H., Kimpfler S., Ursini F., Ruggeri L., Capanni M., Umansky V., Paschen A., Sucker A., Pende D., Groh V., Biassoni R., Höglund P., Kato M., Shibuya K., Schadendorf D., Anichini A., Ferrone S., Velardi A., Kärre K., Shibuya A., Carbone E., Colucci F. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 119:1151-1163. 2009 (査読有)
3. Kurita N., Honda S., Usui K, Shimizu Y., Miyamoto A., Tahara-Hanaoka S., Shibuya K., Shibuya A. Identification of the Fca/mR Isoform Specifically Expressed in the Kidney. *Mol. Immunol.* 46:749-753. 2009 (査読有)
4. Iguchi-Manaka A., Kai H., Yamashita Y., Shibata K., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Yasui T., Kikutani H., Shibuya K.\*, Shibuya A. Accelerated Tumor Growth in Mice Deficient in DNAM-1 Receptor. *J. Exp. Med.* 205: 2959-2964. 2008 (\*coresponding author) (査読有)
5. Wang Y., Shibuya K.\*, Yamashita Y., Shirakawa J., Shibata K., Kai H., Yokosuka T., Saito T., Honda S., Tahara-Hanaoka S., Shibuya A. LFA-1 decreases the antigen dose for T cell activation *in vivo* *Int Immunol.* 20:1119-27. 2008 (\*coresponding author) (査読有)
6. Can I., Tahara-Hanaoka S., Hitomi K., Nakano T., Nakahashi-Oda C., Kurita N., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Caspase-Independent Cell Death by CD300LF (MAIR-V), an Inhibitory Immunoglobulin-Like Receptor on Myeloid Cells. *J.Immunol.* 180:207-213. 2008 (査読有)
7. Nakano T., Tahara-Hanaoka S., Nakahashi C., Totsuka N., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Activation of neutrophils by a novel triggering immunoglobulin-like receptor MAIR-IV *Mol. Immunol.* 45:289-294. 2008 (査読有)
8. Wang Y., Kai H., Chang F., Shibata K., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Shibuya A., Shibuya K. A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 353:857-862. 2007 (査読有)
9. Nakahashi C., Tahara-Hanaoka S., Totsuka N., Okoshi Y., Takai T., Ohkochi N., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Dual assemblies of an activating immune receptor, MAIR-II, with ITAM-bearing adapters DAP12 and Fcγ chain on peritoneal macrophages. *J. Immunol.*

- 178:765-770. 2007 (査読有)
10. Ishizaki K., Yamada A., Yoh K., Nakano T., Shimohata H., Maeda A., Fujioka Y., Morito N., Kawachi Y., Shibuya K., Otsuka F., Shibuya A., Takahashi S. Th1 and Type 1 Cytotoxic T Cells Dominate the Responses in Tbet Overexpression Transgenic Mice that Develop Contact Dermatitis. *J.Immunol.* 178:605-612. 2007 (査読有)

[学会発表] (計 35 件)

1. Shibuya K., Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor, Kyoto T cell Conference, 6/1/2009, Kyoto
2. 鍋倉幸, 抗 DNAM-1 モノクローナル抗体を用いた移植片対宿主病に対する新規予防および治療法の開発 第 71 回日本血液学会, 10/23/2009 京都
3. Nabekura T., Novel prophylactic and therapeutic approaches to GVHD with a monoclonal antibodies against DNAM-1, The 39<sup>th</sup> Japanese Society of Immunology, 12/3/2009, Osaka
4. Nabekura T., A critical role of DNAM-1 in the development of acute graft-versus-host disease, The Keystone Symposiam 2/27/2010, USA
5. Shibuya K., A critical role of DNAM-1 in tumor immunosurveillance, FESEB meeting, 6/11/2008, USA
6. 井口 研子, 腫瘍免疫監視機構における DNAM-1 の機能, KTCC 6/14/2008, 京都
7. 井口 研子, 腫瘍免疫監視機構における免疫受容体 DNAM-1 の機能, 第 67 回日本癌学会, 10/30/2008, 名古屋
8. Yoh K., Functional analysis of ROR $\gamma$ t-overexpressing transgenic mice, The 38<sup>th</sup> apanese Society of Immunology, 12/1/2008, Kyoto
9. Iguchi A., Accerelerated tumor groeth in mice deficient in DNAM-1 receptor, The 38<sup>th</sup> apanese Society of Immunology, 12/1/2008, Kyoto
10. Nabekura T., Involvement of DNAM-1 in development of graft-versus-host disease, The 38<sup>th</sup> apanese Society of Immunology, 12/1/2008, Kyoto
11. Yamashita Y., A novel role of CD155 as a costimulatory molecule on CD4 helper T cells in mice. The 38<sup>th</sup> apanese Society of Immunology, 12/1/2008, Kyoto
12. Shibata K., A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis, The 37<sup>th</sup> Japanese Society of Immunology, 11/20/2007, Tokyo
13. Kai H., Critical role of DNAM-1 in the

development of Th1 cells. The 38<sup>th</sup> apanese Society of Immunology, 12/1/2008, Kyoto

[図書] (計 2 件)

- 1, 渋谷和子, 「Th17 細胞とその機能」、生体の科学、現代医学・生物学の仮説・学説 2008、金原一郎記念医学医療振興財団、医学書院、2008 (総ページ数; 488)
- 2, 渋谷和子, 「新しいヘルパーT 細胞サブセット“Th17 細胞”」免疫応答と免疫病態の統合的分子理解に向けて、山本一彦ほか監修、南山堂、2007 (総ページ数; 269)

[その他]

報道関連情報

NHK ニュース (12/8/2008)

毎日新聞 (12/8/2008)

常陽新聞 (12/8/2008)

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/immunology/immunol.index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渋谷 和子 ( SHIBUYA KAZUKO )

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

准教授

研究者番号: 00302406