

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」  
平成 20年度採択研究代表者

平成 21 年度  
実績報告

岩倉 洋一郎

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 センター長・教授

## IL-17 ファミリー分子、C 型レクチンを標的とした自己免疫・ アレルギー疾患の発症機構の解明と治療薬の開発

### § 1. 研究実施の概要

本研究は、IL-17ファミリー分子、及びC型レクチンを標的とした自己免疫疾患・アレルギー疾患の発症機構を解明し、最終的に治療薬の開発に結びつけることを目的としている。これまでに、IL-17F ノックアウト(KO)マウスと IL-17A/F ダブル KO マウスを作製し、自己免疫疾患やアレルギー応答には主として IL-17A が関与しており、粘膜における細菌感染防御には IL-17F および IL-17A が共に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに C 型レクチンの一つである Dectin-2 が Th17 細胞の分化を誘導することで、真菌感染防御に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、別の C 型レクチンである Dcir の骨代謝に於ける役割を検討した。

### § 2. 研究実施体制

(1)「岩倉」グループ

① 研究分担グループ長:岩倉 洋一郎(東京大学医科学研究所、教授)

② 研究項目:

1. IL-17 ファミリー遺伝子の機能解析
2. C 型レクチンファミリー遺伝子の機能解析
3. 新規関節炎発症関連遺伝子の解析

### § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

IL-17AはTh17と呼ばれるT細胞サブセットから主に産生され、炎症性疾患の発症において重要な役割を果たしている (Iwakura, Y., et al., *Immunol. Rev.*, 226:57-79, 2008.)。Th17からはIL-17AのみではなくIL-17Fも産生されるが、これらの分子の役割分担は不明であった。そこで、我々はIL-17F ノックアウト(KO)マウスをとIL-17A/Fダブル KO マウスを作製し、以前に作製したIL-17A KO マウスと組み合わせ解析を行った(Ishigame, H., et al., *Immunity*, 30:108-119, 2009)。その結果、自己免疫疾患の発症にはIL-17Aが重要で、IL-17Fは部分的な役割を果たしているに過ぎないこと、しかし、腸管における *Cytrobacter rodentium* (*C. rodentium*)に対する感染防御には、IL-17A、IL-17F ともにβ-ディフェンシンの発現誘導を介して生体防御反応を担っていることを明らかにした。21年度はC型レクチンの一つであるDectin-2がTh17細胞の分化を誘導することにより真菌感染防御に重要な役割を果たしていることを明らかにした(38)。

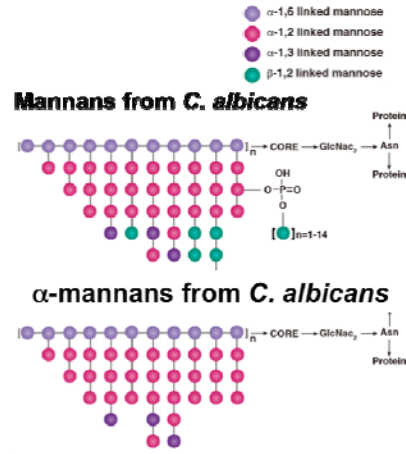


図1. *C. albicans* 細胞壁マンナン構造。培養温度や pH を制御することで、β-マンナンの付加を阻止することができる。

1. Dectin-2リガンドの同定  
糖鎖アレイによる解析の結果、Dectin-2が高マンノース構造と結合することが報告されていた。高マンノース構造は、真菌細胞壁の構成成分にも存在するが、*Candida albicans* (*C. albicans*) の細胞壁マンナンは、末端にβ-マンナンが付加されている。しかし、培養温度や pH を制御することでα-マンナンを露出させることが可能である(図1)。そこで、野生型マウスとDectin-2 KO マウス由来の樹状細胞(BMDC)を用い、*C. albicans* 細胞壁より抽出したマンナン、およびα-マンナンに対する反応性を比較した。その結果、野生型マウスのBMDCではマンナンおよびα-マンナンの刺激に反応し、種々のサイトカインを産生するが、Dectin-2 KO マウス由来BMDCではこれらのサイトカイン産生は全く見られなかった(図2)。これらの結果から、Dectin-2は真菌細胞壁のα-マンナンを認識し、サイトカインを産生することが示された。

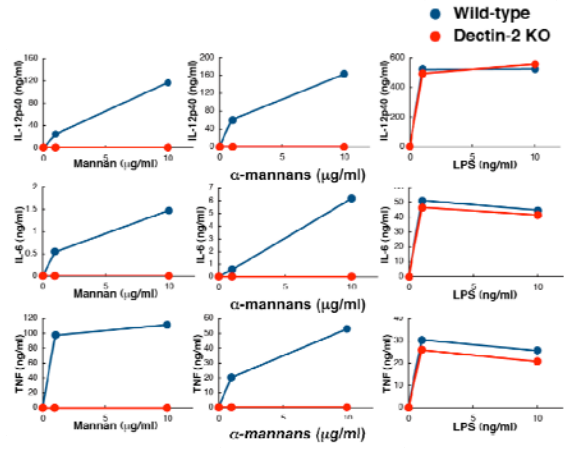


図2. *C. albicans* 細胞壁由来マンナン、α-マンナンによるサイトカイン産生。Dectin-2 KO マウス由来BMDCではサイトカイン産生が失われていた。

2. 真菌感染防御におけるDectin-2の役割  
Dectin-2が*C. albicans*細胞壁のα-マンナンを認識し、サイトカインを産生することが明らかとなったので、個体におけるDectin-2の役割を検討する目的で*C. albicans*の感染実験を行った。その結果、Dectin-2 KO マウスでは野生型マウスと比較し、生存率が有意に低下することが明らかとなった(図3)。一方 *in vitro* では、Dectin-2 KO マウス由来BMDCは酵母型*C. albicans*刺激によるサイトカイン産生がほぼ完全に失われ、菌糸型*C. albicans*刺激によるサイトカイン産生も部分的に抑制された。この時の培養上清を用い、naïve CD4<sup>+</sup>T細胞を抗CD3抗体存在化で培養したところ、酵母型*C. albicans*と培養を行った野生型マウス由来の培養上清は、CD4<sup>+</sup>T細胞をTh17細胞に効率よく分化させたが、Dectin-2 KO マウス由来の培養上清と培養した細胞はTh17細胞への分化が抑制されていた。菌糸型*C. albicans*

と培養を行った場合も同様の傾向が見られた(図4)。これらの結果から、Dectin-2は *C. albicans* を認識し、サイトカインを産生すること、この時のサイトカインは naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞を Th17 細胞に分化させる能力があることが示された。

3. 真菌感染防御における IL-17 ファミリー分子の役割  
Dectin-2 が *C. albicans* を認識し産生するサイトカインにより、naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞が Th17 細胞に分化することが明らかとなった。そこで、Th17 細胞が産生する IL-17A、IL-17F が実際に *C. albicans* の感染防御を担っているかどうかを明らかにする目的で、IL-17A、IL-17F、および IL-17A/F ダブル KO マウスを用いて感染実験を行った。その結果、野生型マウスと比較し、IL-17A および IL-17A/F KO マウスでは有意に生存率が低下した。

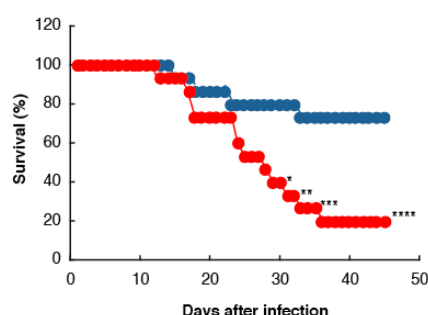


図 3. *C. albicans* 感染感受性の検討。Dectin-2 KO マウスでは野生型マウスと比較し、生存率が有意に低下した。

以上の結果から、1) Dectin-2 は *C. albicans* 細胞壁の  $\alpha$ -マンナンを認識し、サイトカインの産生を誘導すること、2) Dectin-2 は特に酵母型の *C. albicans* によるサイトカイン産生を担い、そのサイトカインは naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞を Th17 細胞に効率的に分化させること、3) Th17 細胞から分泌されるサイトカインのうち、IL-17A が全身性 *C. albicans* 感染防御に重要であること、の3点が明らかとなった。今後は肺等の粘膜感染やアレルギーにおける C 型レクチンや IL-17 の役割を明らかにしていく予定である。

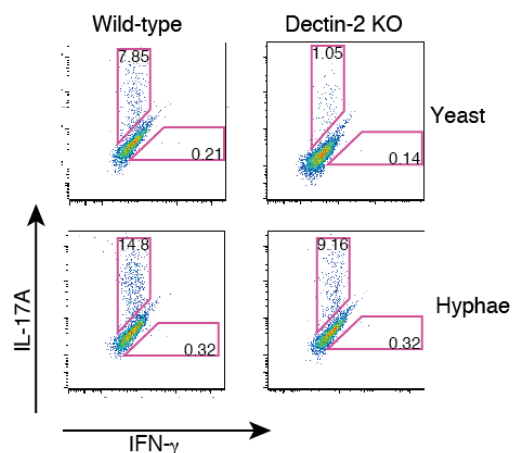


図 4. Th17 分化誘導能の検討。酵母型および菌糸型の *C. albicans* で BMDC を刺激し、培養上清を用い naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞の分化誘導を行ったところ、Dectin-2 KO マウス由来の培養上清は Th17 分化誘導能が顕著に低下していた。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. Yamada, J., Hamuro, J., Fukushima, A., Ohteki, T., Terai, K., Iwakura, Y., Yagita, H., and Kinoshita, S. MHC-matched corneal allograft rejection in an IFN- $\gamma$ /IL-17-independent manner in C57BL/6 mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50, 2139-2146 (2009). doi: 10.1167/iovs.08-2993
2. Elkabets, M., Krelin, Y., Dotan, S., Cerwenka, A., Porgador, A., Lichtenstein, R. G., White, M. R., Zoller, M., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., Voronov, E., and Apte, R. N. Host-derived Interleukin-1 $\alpha$  is important in determining the immunogenicity of 3-Methylcholantrene-tumor cells. *J. Immunol.*, 182, 4874-4881 (2009). doi:

- 10.4049/jimmunol.0803916
3. Irie, N., Takada, Y., Watanabe, Y., Matsuzaki, Y., Naruse, C., Asano, M., Iwakura, Y., Suda, T., and Matsuo, K. Bidirectional signaling through EphrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J. Biol. Chem.*, 284, 14637-14644 (2009). doi: 10.1074/jbc.M807598200
  4. Di Paolo, N. C., Miao, E. A., Iwakura, Y., Kaja, M-K., Aderem, A., Flavell, R. A., Papayannopoulou, T., and Shayakhmetov, D. M. Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 $\alpha$ -mediated proinflammatory macrophage response in vivo. *Immunity*, 31, 110-121 (2009). doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.015
  5. Miyazato A, Nakamura K, Yamamoto N, Mora-Montes HM, Tanaka M, Abe Y, Tanno D, Inden K, Gang X, Ishii K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Mitsutake K, Gow NA, Kaku M, Kawakami K. Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 77, 3056-3064 (2009). doi: 10.1128/IAI.00840-08
  6. Ohtaki Y, Yamaguchi K, Yu Z, Kumamoto H, Shimauchi H, Iwakura Y, Sugawara S, Endo Y. Hepatic platelet accumulation in Fas-mediated hepatitis in mice. *Int. Immunopharmacol.*, 9, 1071-1078 (2009). doi: 10.1016/j.intimp.2009.04.016
  7. O'Connor, W. Jr., Kamanaka, M., Booth, C. J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J. K., and Flavell, R. A. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat. Immunol.*, 10, 603-609 (2009). doi: 10.1038/ni.1736
  8. Oseko, F., Yamamoto, T., Akamatsu, Y., Kanamura, N., Iwakura, Y., Imanishi, J., Kita, M. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiol. Immunol.*, 53, 287-294 (2009). doi: 10.1111/j.1348-0421.2009.00123.x
  9. Yi, T., Chen, Y., Wang, L., Du, G., Huang, D., Zhao, D., Johnstone, H., Young, J., Todorov, I., Umetsu, D. T., Chen, L., Iwakura, Y., Kandeel, F., Forman, S., and Zeng, D. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft versus host disease. *Blood*, 114, 3101-3112 (2009). doi: 10.1182/blood-2009-05-219402
  10. Lindauer, M. L., Wong, J., Iwakura, Y., and Magun, B. E. Pulmonary inflammation triggered by Ricin toxin requires macrophages and IL-1 signaling. *J. Immunol.*, 183, 1419-1426 (2009). doi: 10.4049/jimmunol.0901119
  11. Shichita, T., Sugiyama, Y., Ooboshi, H., Sugimori, H., Nakagawa, R., Takada, I., Iwaki, T., Okada, Y., Iida, M., Cua, D. J., Iwakura, Y., and Yoshimura, A. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma \delta$  T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.*, 10, 603-609 (2009). doi: 10.1038/nm.1999
  12. Okiyama, N., Sugihara, T., Iwakura, Y., Yokozeki, H., Miyasaka, N., Kohsaka, H. Therapeutic effects of interleukin-6 blockade in a murine model of polymyositis that does not require interleukin-17A. *Arth. Rheum.*, 60, 2505-2512 (2009). doi: 10.1002/art.24689
  13. Horino, T., Matsumoto, T., Ishikawa, H., Kimura, S., Uramatsu, M., Tanabe, M., Tateda, K., Miyazaki, S., Aramaki, Y., Iwakura, Y., Yoshida, M., Onodera, S., Yamaguchi, K. Interleukin-1 deficiency in combination with macrophage depletion increases susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Microbiol. Immunol.*, 53, 502-511 (2009). doi: 10.1210/en.2009-0434
  14. Horie, I., Abiru, N., Nagayama, Y., Kuriya, G., Saitoh, O., Ichikawa, T., Iwakura, Y., and Eguchi, K. T helper type 17 immune response plays an indispensable role for development of iodine-induced autoimmune thyroiditis in nonobese

- diabetic-H2h4 mice. *Endocrinology*, 150, 5135-5142 (2009). doi: 10.1210/en.2009-0434
15. Lin, Y., Ritchea, S., Logar, A., Slight, S., Messmer, M., Rangel-Moreno, J., Guglani, L., Alcorn, J. F., Strawbridge, H., Park, S. M., Onishi, R., Nyugen, N., Walter, M. J., Pociask, D., Randall, T. D., Gaffen, S. L., Iwakura, Y., Kolls, J. K., and Khader, S. A. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity*, 31, 799-810 (2009). doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.025
  16. Tanaka, S., Yoshimoto, T., Naka, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Cua, D., and Kubo, M. Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses. *J. Immunol.*, 183, 7523-7530 (2009). doi: 10.4049/jimmunol.0803828
  17. Faust, S. M., Lu, G., Marini, B. L., Zou, W., Gordon, D., Iwakura, Y., Laouar, Y., and Bishop, D. K. Role of T cell TGF $\beta$  signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection. *J. Immunol.*, 183, 7297-7306 (2009).doi: 10.4049/jimmunol.0902446
  18. Shikama, Y., Kuroishi, T., Nagai, Y., Iwakura, Y., Shimauchi, H., Takada, H., Sugawara, S., and Endo, Y. Muramyl dipeptide augments the actions of lipopolysaccharide in mice by stimulating macrophages to produce pro-IL-1 $\beta$  and by down-regulation of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *Innate Immun.*, (2009). doi: 10.1177/1753425909347508
  19. Oyamada, A., Ikebema, H., Itsumi, M., Saiwai, H., Okada, S., Shimoda, K., Iwakura, Y., Nakayama, K. I., Iwamoto, Y., Yoshikai, Y., and Yamada, H. Tyrosine kinase 2 plays critical roles in the pathogenic CD4 T cell responses for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 183, 7539-7546 (2009). doi: 10.4049/jimmunol.0902740dec
  20. Muñoz, M., Heimesaat, M. M., Danker, K., Struck, D., Lohmann, U., Plickert, R., Bereswill, S., Fischer, A., Dunay, I. R., Wolk, K., Loddenkemper, C., Krell, H. -W., Libert, C., Lund, L. R., Frey, O., Holscher, C., Iwakura, Y., Ghilardi, N., Ouyang, W., Kamradt, T., Sabat, R., and Liesenfeld, O. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrix metalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J. Exp. Med.*, 206, 3047-3059 (2009). doi: 10.1084/jem.20090900
  21. Ohtaki, H., Yufu, S., Nakamachi, T., Satoh, K., Shimizu, A., Mori, H., Sato, A., Iwakura, Y., Matsunaga, M., and Shioda, S. Nucleoprotein diet ameliorates arthritis symptoms in mice transgenic for human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 46, 1-12 (2010). doi: 10.3164/jcbtn.09-61
  22. Gan, P. Y., Steinmetz, O. M., Tan, D. S., O'Sullivan, K. M., Ooi, J. D., Iwakura, Y., Kitching, A. R., and Holdsworth, S. R. Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, (2010) doi: 10.1681/ASN.2009070763
  23. Kono, H., Karmarkar, D., Iwakura, Y., and Rock, K. L. Identification of the cellular sensor that stimulates the inflammatory response to sterile cell death. *J. Immunol.*, (2010). doi: 10.4049/jimmunol.0902485
  24. Okamoto, Yoshida, Y., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R. L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol.*, (2010). doi: 10.4049/jimmunol.0903332
  25. Okae, H., and Iwakura, Y. Neural tube defects and impaired neural progenitor cell proliferation in Gbeta1-deficient mice. *Dev. Dyn.*, 239, 1089-1101 (2010). doi:

- 10.1002/dvdy.22256
26. Henry, T., Kirimanjeswara, G. S., Ruby, T., Jones, J. W., Peng, K., Perret, M., Ho, L., Sauer, J. D., Iwakura, Y., Metzger, D. W., and Monack, D. M. Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by gammadelta T cells during bacterial infections. *J. Immunol.*, 184, 3755-3767 (2010). doi: 10.4049/jimmunol.0902065
  27. Adamopoulos, I. E., Chao, C. C., Geissler, R., Laface, D., Blumenschein, W., Iwakura, Y., McClanahan, T., and Bowman, E. P. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res. Ther.*, 12, R29 (2010). doi: 10.1186/ar2936
  28. Itoh, S., Nakae, S., Axtell, R. C., Velotta, J. B., Kimura, N., Kajiwara, N., Iwakura, Y., Saito, H., Adachi, H., Steinman, L., Robbins, R. C., and Fischbein, M. P. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model. *J. Clin. Immunol.*, 30, 235-240 (2010). doi: 10.1007/s10875-009-9366-9
  29. Kawa, K., Tsutsui, H., Uchiyama, R., Kato, J., Matsui, K., Iwakura, Y., Matsumoto, T., and Nakanishi, K. IFN-gamma is a master regulator of endotoxin shock syndrome in mice primed with heat-killed *Propionibacterium acnes*. *Int. Immunol.*, 22, 157-166 (2010). doi: 10.1093/intimm/dxp122
  30. Isoda, K., Matsuki, T., Kondo, H., Iwakura, Y., and Ohsuzu, F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 30, 708-715 (2010). doi: 10.1161/ATVBAHA.109.201749
  31. Madhur, M. S., Lob, H. E., McCann, L. A., Iwakura, Y., Blinder, Y., Guzik, T. J., and Harrison, D. G. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*, 55, 500-507 (2010). doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094
  32. Doodes, P. D., Cao, Y., Hamel, K. M., Wang, Y., Rodeghero, R. L., Mikecz, K., Glant, T. T., Iwakura, Y., and Finnegan, A. IFN-gamma regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis. *J. Immunol.* 184, 1552-1559 (2010). doi: 10.4049/jimmunol.0902907
  33. Pierre, A. St. C., Chan, M., Iwakura, Y., Ayers, D. C., Kurt-Jones, E. A., and Finberg, R. W. Periprosthetic Osteolysis: Characterizing the innate immune response to titanium wear particles. *J. Orthopedic Res.*, in press.
  34. Kadoki, M., Choi, B. I., and Iwakura, Y. The mechanism of lipopolysaccharide-induced human immunodeficiency virus type I activation in transgenic mouse macrophages. *Int. Immunol.*, in press.
  35. Taguchi, F., Matsuyama, S., Iwakura, Y., Tagawa, Y., Saegusa, J., and Kyuwa, S. Characterization of a variant virus from ascites of subacute granulomatous serositis in interferon- $\gamma$ -deficient C57BL/6 mice persistently infected with murine coronavirus strain JHM. *Viral Immunol.*, in press.
  36. Teng, M. W. L., Andrews, D. M., McLaughlin, N., von Scheidt, B., Ngiow, S. F., Möller, A., Hill, G. R., Iwakura, Y., Oft, M., and Smyth, M. J. IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
  37. Baldeviano, G. C., Barin, J. G., Talor, M. V., Srinivasan, S., Bedja, D., Zheng, D., Gabrielson, K., Iwakura, Y., Rose, N. R., and Cihakova, D. IL-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circulation Res.*, in press.
  38. Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S., Komatsu, R., Miura, N., Adachi, Y., Ohno, N., Shibuya, K., Yamamoto, N., Kawakami, K., Yamasaki, S., Saito, T., Akira, S., and

- Iwakura, Y. Dectin-2 recognition of  $\alpha$ -mannans and induction of Th17 differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity*, in press.
39. Ishigame, H., Nakae, S., and Iwakura, Y. The roles of IL-17A and IL-17F in mucosal infection and allergy. In “*Th17 cells in health and disease*”, (ed. S. Jiang). Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY, in press.
40. Hill, G. R., Olver, S. D., Kuns, R. D., Varelias, A., Raffelt, N. C., Don, A. L. J., Markey, K. A., Wilson, Y. A., Smyth, M. J., Iwakura, Y., Tocker, J., Clouston, A., and MacDonald, K. P. A. Stem cell mobilization with G-CSF induces Type-17 differentiation and promotes scleroderma. *Blood*, in press.

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)