

IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞を制御するブチロフィリン蛋白の同定と免疫疾患治療基盤構築

須藤 明

千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫

【研究の背景】

近年の研究により Btl1 分子は $\gamma\delta$ T 細胞の TCR $\gamma\delta$ 鎖の第2相補性決定領域と結合することにより、 $\gamma\delta$ T 細胞分画の分化・増殖に関わることが明らかとなりつつある¹⁾。しかしながら自己免疫疾患の増悪に関わる IL-17 産生 $\gamma\delta$ T ($\gamma\delta$ T17) 細胞の分化や成熟における Btl1 分子は未だ不明である。

これまでに $\gamma\delta$ T17 細胞は胎生期胸腺で発生し、末梢に移動して自己増殖し維持され、成体胸腺からは成熟した $\gamma\delta$ T17 細胞が分化しないことが明らかとなっている²⁾。本研究者は胎生期と成体での $\gamma\delta$ T17 細胞の分化誘導のパターンを考察し、リンパ節で発現しているが、成体胸腺には発現しない Btl1 分子が $\gamma\delta$ T17 細胞の成熟や増殖に関わっているという仮説を立てた。

【目 的】

本研究者は $\gamma\delta$ T17 細胞の増殖に関与が予想される Btl1 分子を同定し、遺伝子欠損マウスを樹立した。本研究はこのマウスの解析を通じて、 $\gamma\delta$ T17 分化・増殖における機能を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

研究計画1. $\gamma\delta$ T17 の末梢での成熟と増殖に関与する Btl1 ファミリー分子の同定

公共データベースに登録された RNA シーケンスデータを再解析し、前述の条件に合致する Btl1/B7 ファミリー分子のスクリーニングをおこなった。その結果、成体胸腺上皮細胞での発現が最も低く、リンパ節内皮細胞での発現が高い BtlX(仮称)に注目した。

研究計画2. BtlX の $\gamma\delta$ T 細胞分化における役割の解明

1) BtlX 欠損マウスの作成

CRISPR/Cas9 システムにより BtlX 欠損マウスを作成した。

2) BtlX 欠損マウスの $\gamma\delta$ T 細胞分化・増殖の解析

非感作の BtlX 欠損の $\gamma\delta$ T17 分画の解析や T 細胞分化の解析をおこなった。さらに BtlX 欠損マウスと BtlX ヘテロ欠損マウスにイミキモド誘発性乾癬モデルを惹起し、疾患スコアや $\gamma\delta$ T17 細胞の分化・活性化を検討した。

【結 果】

結果1. BtlX は成体胸腺髄質上皮細胞に発現せず、リンパ管内皮細胞と血管内皮細胞に発現する

公共データベースに登録された単細胞 RNA シーケンスデータを再解析し、BtlX はリンパ節のリンパ管内皮細胞分画の天井リンパ管内皮細胞と血管内皮細胞の毛細血管内皮細胞に発現していることを見出した。さらにフローサイトメトリ解析で BtlX 蛋白が天井リンパ管内皮細胞と毛細血管内皮細胞分画の細胞集団で発現していることを見出した。

結果2. BtnX は V γ 4 陽性 $\gamma\delta$ T17 細胞の増殖を誘導する

1) BtnX 欠損マウスの作成

CRISPR/Cas9 により BtnX 欠損マウスを作成した。次にウサギ抗 BtnX 抗体を作成し、BtnX 欠損マウス、BtnX ヘテロ欠損マウス、BtnX 野生型マウスのリンパ節内皮細胞の BtnX の発現をフローサイトメトリーで検討し、BtnX 欠損マウスでの BtnX 蛋白の発現の欠損を確認した。BtnX 欠損マウスは正常に出生、発育した。

2) 定常状態の BtnX 欠損マウスの解析

定常状態の BtnX 欠損マウスの胎生期胸腺の $\gamma\delta$ T 細胞分化、成体胸腺の $\alpha\beta$ T 細胞分化は正常であった。一方、定常状態の成体マウスのリンパ節や皮膚では V γ 4 陽性 V δ 4 陰性 $\gamma\delta$ T17 細胞が有意に減少していることを見出した。

3) イミキモド誘発乾癬モデルの解析

BtnX 欠損マウスおよび BtnX ヘテロ欠損マウスの背部皮膚にイミキモドを連日5日間塗布し皮膚スコアと、表皮の厚さを病理所見で検討を行った。その結果 BtnX 欠損マウスでは皮膚スコアが有意に軽快し、表皮も BtnX ヘテロ欠損マウスと比較して厚くなりにくいことを見出した。さらに BtnX 欠損マウスの所属リンパ節では増殖期にある V γ 4 陽性 V δ 4 陰性 $\gamma\delta$ T17 細胞が有意に減少していることを見出した。

【考 察】

BtnX はマウス V γ 4 陽性 V δ 4 陰性 $\gamma\delta$ T17 細胞の末梢での維持・増殖に関わることが明らかとなった。V γ 4 陽性 V δ 4 陰性 $\gamma\delta$ T17 細胞の大部分は V δ 5 陽性だとされている^{3,4)}。BtnX がどのように V γ 4 陽性 V δ 5 陽性 $\gamma\delta$ T17 細胞の増殖に関わるのか、今後の解析が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

BtnX はヒトの単細胞 RNA シーケンスの解析でも内皮細胞に発現しており、ヒトにおいても同様に末梢での IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞分画の維持に働いている可能性がある。今後ヒトでの解析を進めることにより、BtnX の種を超えた働きが明らかになることが期待される。

【参考・引用文献】

1. Hayday, A.C., and Vantourout, P. (2020). The Innate Biologies of Adaptive Antigen Receptors. *Annu Rev Immunol* 38, 487-510. 10.1146/annurev-immunol-102819-023144.
2. Haas, J.D., Ravens, S., Duber, S., Sandrock, I., Oberdorfer, L., Kashani, E., Chennupati, V., Fohse, L., Naumann, R., Weiss, S., et al. (2012). Development of interleukin-17-producing gammadelta T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity* 37, 48-59. 10.1016/j.immuni.2012.06.003.
3. Chen, H.C., Eling, N., Martinez-Jimenez, C.P., O'Brien, L.M., Carbonaro, V., Marioni, J.C., Odom, D.T., and de la Roche, M. (2019). IL-7-dependent compositional changes within the gammadelta T cell pool in lymph nodes during ageing lead to an unbalanced anti-tumour response. *EMBO Rep* 20, e47379. 10.15252/embr.201847379.
4. Kashani, E., Fohse, L., Raha, S., Sandrock, I., Oberdorfer, L., Koenecke, C., Suerbaum, S., Weiss, S., and Prinz, I. (2015). A clonotypic V γ 4J γ 1/V δ 5D δ 2J δ 1 innate gammadelta T-cell population restricted to the CCR6(+)/CD27(-) subset. *Nat Commun* 6, 6477. 10.1038/ncomms7477.