



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウスCommunity-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus 肺炎モデルにおける Interleukin-17の役割
Author(s)	渋谷, 寧
Description	配架番号 : 2153
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11671号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11671
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75188
Type	doctoral thesis
File Information	Yasushi_Shibue.pdf



学 位 論 文

マウス Community-Associated Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus

肺炎モデルにおける Interleukin-17 の役割

(Role of Interleukin-17 in a Murine

Community-Associated Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus Pneumonia Model.)

2 0 1 5 年 3 月

北 海 道 大 学

浜 江 寧

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	4 頁
実験方法	5 頁
実験結果	10 頁
考察	20 頁
統括および結論	23 頁
謝辞	24 頁
引用文献	25 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中

• Infection and Immunity

Role of Interleukin-17 in a Murine Community-Associated Methicillin-Resistant
Staphylococcus aureus Pneumonia Model.

Yasushi Shibue, Soichiro Kimura, Chiaki Kajiware, Yoichiro Iwakura, Keizo
Yamaguchi, Kazuhiro Tateda

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 渋谷 寧、木村 聡一郎、嵯峨 知生、舘田 一博、西村 正治、山口 恵三

MRSA マウス肺炎モデルにおける IL-17 の関与

第 86 回日本感染症学会総会, 長崎, 2012 年 4 月

2. Yasushi Shibue, Soichiro Kimura, Chiaki Kajiware, Kazuhiro Tateda, Masaharu
Nishimura, Keizo Yamaguchi

Critical Roles of IL-17 in Lethality of Community-associated MRSA Pneumonia in
Mice.

52nd Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012, San
Francisco, USA, 2012 年 9 月

第1節 緒言

Th17 サイトカインの役割

近年 Th17 系のサイトカインが好中球を誘導し、膠原病、腫瘍、アレルギーなど様々な分野で病態に関与していると報告されている¹⁻⁵。感染症領域における Th17 系サイトカインの役割を示した報告もあり、その多くは Th17 サイトカインが欠損した状態では様々な病原体に対して易感染性を示すという結果が報告されている⁶⁻⁸。黄色ブドウ球菌への易感染性が主症状の一つとされる Hyper IgE 症候群は *STAT3* の変異による Interleukin(IL)-17 産生低下が病態に関連していることが報告され⁹、ヒト、マウスともに、IL-17 産生低下ではブドウ球菌に対して易感染性を示すという報告がある¹⁰⁻¹²。*Staphylococcus aureus* と IL-17 の関連を示したものでは、特にブドウ球菌による皮膚・軟部組織感染症が代表的であり、先に挙げた Hyper IgE 症候群以外にもアトピー性皮膚炎や HIV 感染症とも関連していると指摘され、IL-17 産生低下の影響があると示唆されている¹³。

Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* の存在

昨今の耐性菌の代表格である MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) は院内感染症の起炎菌と考えられていたが、近年 CA-MRSA (community-associated MRSA) が世界中で検出され^{14,15}、その感染により皮膚・軟部組織感染症、敗血症をきたしたとする報告が相次いでなされている¹⁶⁻¹⁹。CA-MRSA として、USA300、USA400 はその代表株であり、そのゲノム解析も行われている²⁰。CA-MRSA の病原性を説明するものとして PVL (Panton Valentine Leukocidin) の関与が以前から指摘されているが²¹⁻²³、それに対して否定的な報告^{24,25}や、その他の病原因子の影響として、 α -hemolysin、PSM (Phenol-soluble modulins) などの関与を指摘した報告もある²⁶⁻²⁹。また、皮膚・軟部組織感染に比べると頻度は低いながらも USA300 による壊死性肺炎の報告も散見されており³⁰、特に免疫不全宿主ではない市中発症の若年者が致死的な経過を辿ったとする報告がある^{31,32}。その病原因子に注目が集まっており、ラット CA-MRSA 肺炎モデルとして USA300 と USA400 の症状の差を確認した報告もあり、その病原因子の違いから USA300 は USA400 よりも重症化したと結論づけられている³³。しかし、これらの病原因子に焦点を当てた研究に比べ、宿主の免疫応答に焦点を当てたものは少なく、CA-MRSA による肺炎の病態は現時点では明らかではない。

Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* 感染症に対する Interleukin-17 の関わり

CA-MRSA に対する宿主免疫の役割はまだ明らかにされておらず、それは IL-17 に関しても例外ではない。

今回我々は、IL-17 サイトカインの中でも中心的な役割を担うとされ、細菌、ウイルス、真菌、寄生虫に対する宿主の免疫反応に重要とされる IL-17A に主眼を置き^{34, 35}、これらがマウス CA-MRSA 肺炎モデルに対してどのように関与するかを検討した。

まず、WT マウス、IL-17 ノックアウトマウス (*Il-17a*^{-/-}, *Il-17a*^{-/-} *Il-17f*^{-/-}) を用いて、CA-MRSA 肺炎モデルを作成し、各群の生存率を確認したところ、IL-17A ノックアウトマウスは WT マウス、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスと比べ、感染早期で有意に致死性であった (vs WT, $P < 0.01$; *Il-17a*^{-/-} *Il-17f*^{-/-}, $P < 0.05$)。しかし、各群の肺内菌数は特に有意差を認めなかった。また、IL-17A ノックアウトマウスではその他の群と比べて有意に IL-17F、G-CSF mRNA 発現量が高値であり、肺胞洗浄液中の好中球数が有意に高値であった。コラゲナーゼ処理後の WT マウス肺細胞に USA300 の死菌刺激をし、抗 IL-17A 抗体を加えた群は、コントロール群と比較して ELISA での G-CSF が高値となることが確認された。

これらの結果からマウス CA-MRSA 肺炎モデルにおいて、IL-17A が欠損した状況では G-CSF が有意に高値となり、肺胞洗浄液中の好中球数が有意に高値となることが確認された。この炎症が宿主にとって致死的な影響をもたらす可能性が示唆され、IL-17A と IL-17F との相互作用の関係性も示唆する結果が得られた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ATCC	American Type Culture Collection
IL-17	interleukin-17
IFN γ	interferon-gamma
CA-MRSA	community-associated methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFU	colony forming unit
ELISA	Enzyme Linked Immuno Solvent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
MOI	multiplicity of infection
PBS	phosphate buffered saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse Transcription Polymelase Chain Reaction
TNF α	Tumor necrosis factor-alpha
WT	wild type

第2節 実験方法

【動物】

WT マウスは6-10 週齢オスの BALB/c マウス(日本チャールズリバー)を受注してから1 週間隔離して使用した。IL-17A ノックアウトマウス(*Il-17a^{-/-}*)、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウス(*Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}*)は BALB/c を背景にもつ、東京大学医科学研究所で以前から使用が確立しているものであり^{36,37}、これらも6-10 週齢オスを使用した。全てのマウスは実験に使用するまで、特定の微生物や寄生虫が除去された環境下、東邦大学実験動物センターで飼育された。実験は東邦大学の動物実験の倫理規定と遺伝子操作実験の安全規定に則り、動物実験のプロトコールは東邦大学動物実験委員会の承認を経て施行された(承認番号 12-54-54)。

【微生物】

東邦大学で保存(-80 °C)している MRSA(USA300, ATCC BAA-1556)を使用した。冷凍保存株の USA300 をミューラーヒントン培地(Difco)に 5%ウマ脱繊維素血液を混ぜた血液寒天培地で 35 °C、24 時間培養し、コロニーの発育を確認した。

【感染方法】

上記で得られたコロニーを鉤菌し、それを tryptic soy broth で 35 °C、8 時間振盪培養(160 rpm)し、波長 600 nm で吸光度 1.7-1.8 を確認した。その後、菌液を 3000 rpm、15 min、4 °C で遠心して上清を除き、PBS で菌液を調整し、50 μ l/mouse とし、それぞれのマウスに経鼻投与を行った。投与前にマウスに接種した菌液は上記と同様の操作で培養し、その翌日に接種菌量を確認した。予備実験後は $2.0-4.0 \times 10^8$ CFU/mouse で実験を行った。経鼻投与に際してケタミン 60 mg/kg (第一三共)とキシラジン 10 mg/kg (バイエル薬品)を混合し、麻酔前投薬として筋注した。

【肺内菌数測定】

マウス感染後、CO₂ で安楽死させて開胸し、1 ml の生理食塩水を右心室に投与し、肺血管系を満たした。無菌環境下で肺を取り出し、マウス右肺を complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche)を溶かした 1 ml の生理食塩水中に収集した。採取した臓器はクリーンベンチでホモジナイザー (IKA ジャパン)を用いて処理し、得られた菌液(10 μ l)をウマ血清血液寒天培地に接種後、35 °C で 24 時間培養し、目視にてコロニーを観察し、菌数を測定した。

【Real time RT-PCR】

マウス肺内の IL-17A、IL-17F、CXCL1、CXCL2、IL-21、IL-22、IL-23 p19、IL-6、IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、G-CSF の mRNA を Real time PCR 法で以下のように検証した。

【肺内菌数測定】と同様の操作でマウスの開胸を行った後、マウス左肺を *RNAlater* Solution (Ambion) 1ml につけておき、4°C で 1 日保存した。その後 RiboPure kits (Ambion) を使用し、全 RNA 抽出、精製、TURBO DNA-free-kit (Ambion) を用いて DNase 処理、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystem) を用いて RNA から cDNA への逆転写を行い、Real time PCR で mRNA 発現量を評価した。プライマーは以下のものを使用した³⁸⁻⁴²。

(IL-17A)

Forward primer: 5' -TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA-3'

Reverse primer: 5' -CTTTCCTCCGCATTGACAC-3'

(IL-17F)

Forward primer: 5' -TGCTACTGTTGATGTTGGGAC-3'

Reverse primer: 5' -AATGCCCTGGTTTTGGTTGAA-3'

(CXCL1)

Forward primer: 5' -CGCTTCTCTGTGCAGCGCTGCT-3'

Reverse primer: 5' -CAAGCCTCGCGACCATTCTTGA-3'

(CXCL2)

Forward primer: 5' -TCCAGAGCTTGAGTGTGACG-3'

Reverse primer: 5' -TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC-3'

(IL-23 p19)

Forward primer: 5' -CCAGCAGCTCTCTCGGAATC-3'

Reverse primer: 5' -GATTCATATGTCCCGCTGGTG-3'

(IL-6)

Forward primer: 5' -ACACATGTTCTCTGGGAAATCGT-3'

Reverse primer: 5' -AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'

(IFN- γ)

Forward primer: 5' -GAACTGGCAAAAGGATGGTGA-3'

Reverse primer: 5' -TGTGGGTTGTTGACCTCAAAC-3'

(IL-4)

Forward primer: 5' -CTCATGGAGCTGCAGAGACTCTT-3'

Reverse primer: 5' -CATTTCATGGTGCAGCTTATCGA-3'

(TNF α)

Forward primer: 5' -GCCTCCCTCTCATCAGTTCT-3'

Reverse primer: 5' -CACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'

(IL-21)

Forward primer: 5' -GCCAGATCGCCTCCTGATTA-3'

Reverse primer: 5' -CATGCTCACAGTGCCCCTTT-3'

(IL-22)

Forward primer: 5' -CATGCAGGAGGTGGTACCTT -3'

Reverse primer: 5' -AGCTTCTTCTCGCTCAGACG-3'

(G-CSF)

Forward primer: 5' -CCTTCACTTCTGCCTTCCAG-3'

Reverse primer: 5' -TCAGGTCTAGGCCAAGTGGT-3'

(β -actin)

Forward primer: 5' -AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'

Reverse primer: 5' -CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'

RT-PCR に関しては、SYBR Green 法で ABI Prism 7000 sequence detector system (Life Technologies Corporation) を用いて、40 サイクル (95 °C 3 秒、60 °C 30 秒) 行った。mRNA 発現量についてはハウスキーピング遺伝子の発現量に対する各種サイトカイン、ケモカインの発現量の相対比で表記した。

【肺胞洗浄、肺胞洗浄液の処理】

感染 12 時間後にマウスを CO₂ で安楽死させた後に、気管を露出し、そこに外径 1.7 mm のポリエチレン製のカテーテルを留置した。肺胞洗浄には 3 ml の PBS を用い、それぞれのマウスから肺胞洗浄液を回収して、1500 rpm、4 °C、5 分間遠心した。上清を除いた後に、残ったペレットに Lysing Buffer (Becton Dixon) 2 ml を加えて、37 °C で 3 分間静置して溶血処理を行った。再度上清を除き、残ったペレットに PBS 400 ml と 10% ウシ血清アルブミンを混合して作成した FACS Buffer を 0.5 ml 加え、その懸濁液 10 μ l とトリパンブルー 10 μ l を混合し、位相差顕微鏡で細胞数を計測した。

【フローサイトメトリー】

溶血処理後に FACS Buffer を加えた BALF で得られた細胞数の結果から 3.0-4.0 $\times 10^5$ /ml となるようにそれぞれ必要な量を計算した。蛍光標識抗体として PerCP/Cy5.5-anti-mouse Ly-6G (BioLegend, clone: 1A8) 0.2 mg/ml と PE anti-mouse F4/80

(BioLegend, clone: BM8) 0.2 mg/ml を FACS Buffer を用いて、それぞれ 1:100、1:20 希釈として用意した。またコントロール抗体としては PerCP/Cy5.5 Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl (BioLegend, clone: RTK2758)、PE Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl (BioLegend, clone: RTK2758)を用い、Fc Block (BioLegend)を 1 μ g/100 μ l として用意した。肺胞洗浄液の検体を以下のプロトコール通りに処理し、FACSDiva™ (Becton Dixon)を用いて解析した。

(プロトコール)

- ①600 g、4 °Cで 5 分間遠心して上清を除き、各検体に Fc Block を 50 μ l ずつ入れ、4 °Cで 10 分間静置する
- ②600 g、4 °Cで 5 分間遠心して上清を除き、各検体に FACS Buffer 1 ml を加える
- ③600 g、4 °Cで 5 分間遠心して上清を除き、各検体に蛍光標識抗体 50 μ l、またはコントロール抗体 50 μ l を加えて、4 °Cで 30 分間静置する
- ④各検体に FACS Buffer 1 ml を加える
- ⑤600 g、4 °Cで 5 分間遠心して上清を除き、各検体に 4%パラホルムアルデヒド 100 μ l を加え、vortex で混和して 4 °Cで 20 分間静置する
- ⑥600 g、4 °Cで 5 分間遠心して上清を除き、FACS Buffer を 1 ml 加えて vortex で混和する
- ⑦600 g、4 °Cで 5 分間遠心して上清を除き、0.5 ml の FACS Buffer を加え、使用まで 4 °Cで保存する

【USA300 死菌処理】

【微生物】で作成した通りに菌を培養し、20 ml の菌液を遠心 (3000 rpm、15 min、4 °C)して、上清を除いた。PBS 10 ml を加えてペレットを懸濁し、2 倍に濃縮した。65 °Cのウォーターバスで 90 分間温めて、1 ml ずつ 1.5 ml チューブに分注し、使用まで-20 °Cで保存した。

【マウス肺のコラゲナーゼ溶液処理】

0.5 mg/ml コラゲナーゼ D (Roche)と 15 μ g/ml DNase I (Roche)を用いてコラゲナーゼ溶液を作成する。WT マウスから摘出した両肺を 10 ml コラゲナーゼ溶液の入ったディッシュに入れ、ハサミを用いて細断する。CO₂ インキュベーターに 37 °C、45 分間静置し、その後に組織片をすり潰す。70 μ m セルストレイナー (Becton Dickinson)で濾しながら細胞懸濁液を回収し、1500 rpm、4°C、5 分間遠心した後に上清を廃棄し、10 ml RPMI で細胞を洗浄する。再度上清を廃棄し、Pharm Lyse (Becton Dickinson)で溶血させ、10% FBS (GIBCO)-RPMI Medium 1640 (GIBCO) 10 ml を加えて

細胞を2回洗浄し、トリパンブルーと細胞懸濁液を1:1で混ぜて、細胞数を測定した。抗 IL-17A 抗体 (Monoclonal rat anti-IL-17A antibodies, eBioscience) とコントロール抗体 (Monoclonal rat anti-IgG2a antibodies, eBioscience) を使用するときにはチューブに 2×10^6 /ml の細胞に各抗体を $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で加え、20 分間、 37°C のインキュベーターで静置した。 2×10^5 /100 μl /well で 96 ウェルプレート (Becton Dickinson) に用意し、【USA300 死菌処理】で用意しておいた菌を解凍し、10% FBS+ RPMI で2倍の希釈系列をつくり、100 μl /well ずつ加え、 CO_2 インキュベーターで 37°C 、48 時間培養した。

【ELISA】

【マウス肺のコラゲナーゼ溶液処理】で用意しておいた培養上清を回収し、96 ウェルプレートに乾燥固定した。以下の行程には IL-17F, G-CSF mouse ELISA kits (R&D Systems) を用いた。各検体に 1% ウシ血清アルブミンでブロッキングを行い、1 次抗体としてそれぞれ IL-17F 抗体、G-CSF 抗体を使用し、2 次抗体として Streptavidin-HRP を使用し、吸光度 450 nm で測定した。

【統計学的解析】

データは平均±標準偏差で示した。2 群間の比較には t 検定を用い、群間比較には 1 元配置の分散分析 (ANOVA)、Tukey 法を用いた。生存曲線は Kaplan-meier 法を用いて、解析は log rank 検定で行った。 P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とみなした。

第3節 実験結果

【USA300 マウス肺炎モデルでの生存率】

USA300 によるマウス肺炎モデルを作成するにあたり、まずは実験に必要な投与菌量の確認をすべく、菌量を変えて投与したマウスの生存率を確認した。その結果を Figure 1 に示す。

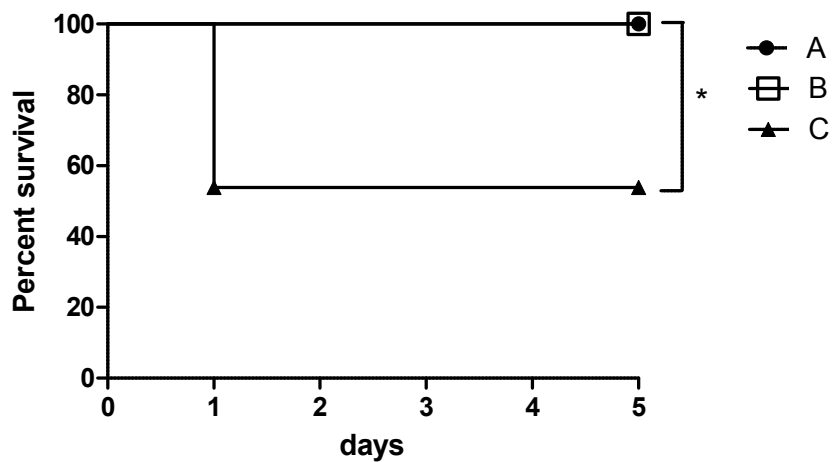


Figure 1. USA300 経鼻投与を行った WT マウス、A : 2.5×10^7 CFU/mouse (n=12)、B : 2.0×10^8 CFU/mouse (n=11)、C : 1.5×10^9 CFU/mouse (n=13) の生存率の差

* : $P < 0.01$

これらの結果から 1.5×10^9 CFU/mouse 投与群で約 50%程度死亡しており、他の群と比べて有意な差を認めた(vs A, B, $P < 0.01$)。

また、投与から死亡するまでの時期が 1 日以内とかなり早期に起こること、マウスの呼吸促迫や毛羽立ちの状況から、感染後 1 日以降は改善傾向を示すことも確認した。過去の報告から WT マウスよりノックアウトマウスの方が致死的となると予想し、 2.0×10^8 CFU/mouse から 2.5×10^9 CFU/mouse までの濃度に調整した菌量で投与することとした。

次に IL-17A ノックアウトマウス、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスに対して USA300 を経鼻投与したマウス肺炎モデルの生存率の差を Figure 2 に示す。

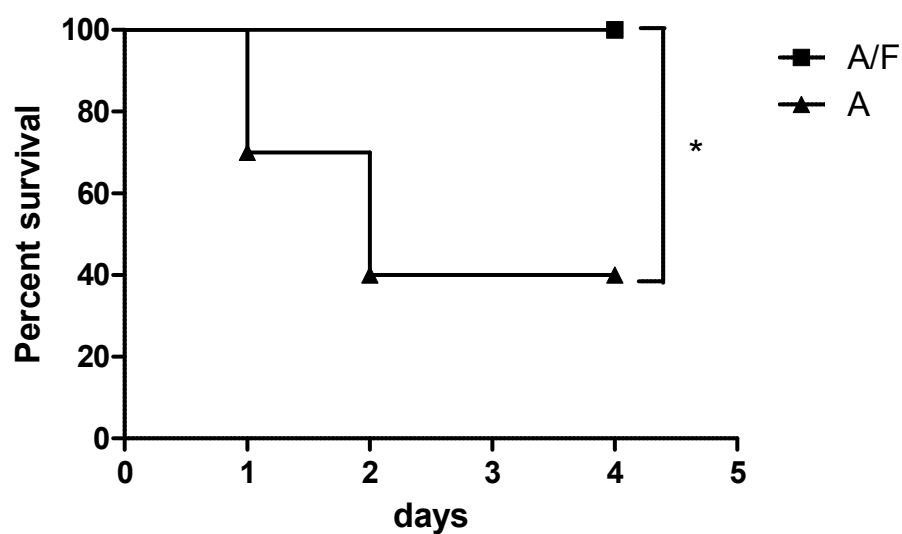


Figure 2. USA300 経鼻投与 (2.8×10^8 CFU/mouse)を行った IL-17A+IL-17F ノックアウトマウス (A/F; n=8)、 IL-17A ノックアウトマウス (A; n=10) の生存率
 * : $P < 0.01$

これらの結果から IL-17A ノックアウトマウスは IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスよりも致死的となることが確認され(vs $Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}$, $P < 0.01$)、その変化は WT マウス同様に感染後早期に起こることが観察された。

上記実験から、今回の実験に相当と考えられる菌量を $2.0-4.0 \times 10^8$ CFU/mouse 程度と考え、USA300 を経鼻投与した WT マウスと IL-17A ノックアウトマウス、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスの生存率の差を検証した。その結果を Figure 3 に示す。

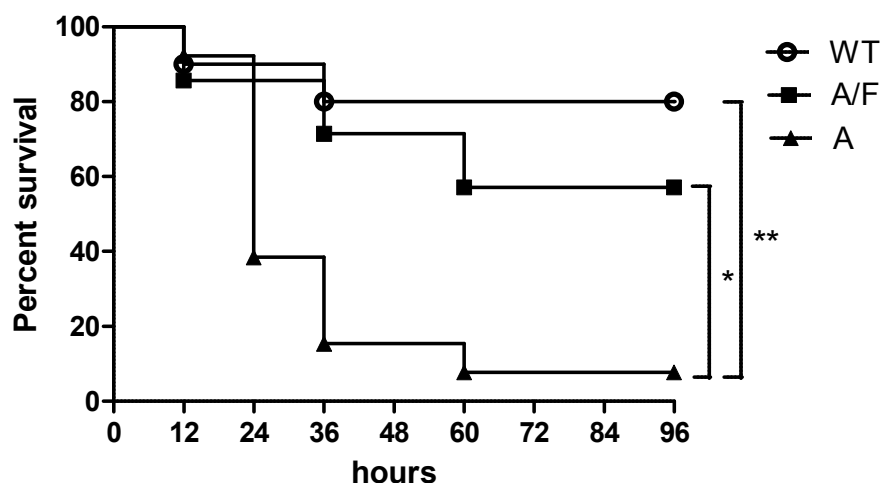


Figure 3. USA300 経鼻投与(10^8 CFU)を行った WT マウス (WT; $n=10$)、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウス (A/F; $n=7$)、IL-17A ノックアウトマウス (A; $n=13$) の生存率

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

各群のマウスは感染から 6-12 時間後に毛羽立ちがみられ、12-24 時間後には殆ど体動もなく、呼吸促迫がみられた。感染 12-24 時間後で最も致死性となったのは IL-17A ノックアウトマウスであり、この時間帯で 62% 死亡した。また、感染 60 時間以内には 92% が死亡し、他の群とは有意差をもって致死的な結果を示した (vs WT, $P < 0.01$; $Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}$, $P < 0.05$)。

IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスでは WT マウスと比べて致死性となる傾向が確認されたものの有意差は認めなかった。また、殆どのマウスは 24 時間を超えると毛羽立ちや呼吸促迫などは改善傾向を示し、どの群のマウスも感染 96 時間後を超えて死亡することはなかった。これらの結果から USA300 を経鼻投与した場合に感染後早期に致死的な経過を辿り、それは IL-17A ノックアウトマウスで有意であることが確認された。

その後のマウス感染実験はこの生存率の差を示した $2.0-4.0 \times 10^8$ CFU/mouse の菌量で経鼻投与で行っていくこととした。

【USA300 肺炎モデルでの肺内菌数】

生存率の結果から、感染 24 時間後には多くのマウスで呼吸促迫や毛羽立ちが改善傾向を示すことを観察していたため、致死的な原因が肺炎によって起こっているかどうかを確認する目的で、予備実験として感染後に最も致死的となると考えられた感染 12 時間後、24 時間後にそれぞれのマウスから右肺を取り出し、肺内菌数を測定した結果を Figure 4 に示す。

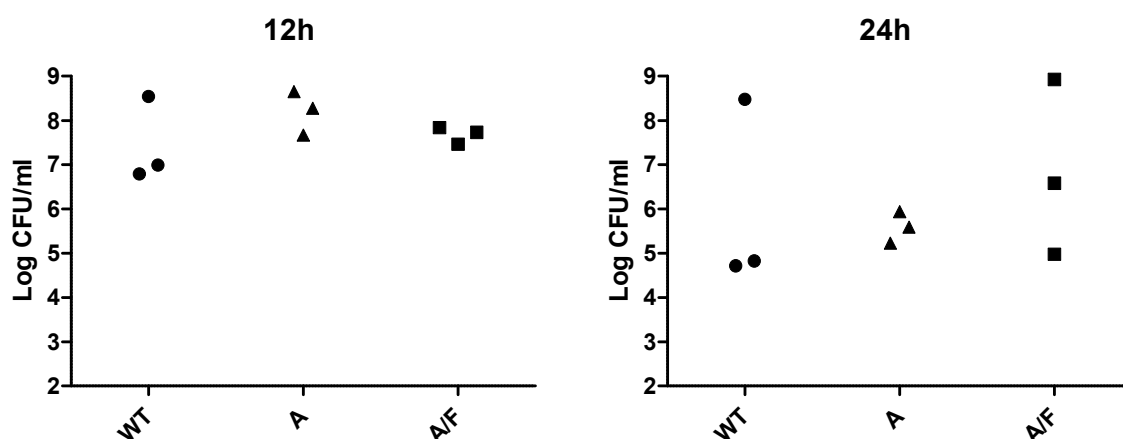


Figure 4. USA300(10^8 CFU)経鼻投与を行った WT マウス (WT)、IL-17A ノックアウトマウス(A)、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウス(A/F)の感染 12 時間後、24 時間後における各群の右肺内菌数 (各群 : n=3)

これらの結果から感染 12 時間後と比べ、24 時間後の肺内菌数はばらつきが大きいものの、各群の菌量は減少傾向を示すことが観察された。またどの群も経過中に有意な菌数差を認めなかった。

当初、過去の報告から、ノックアウトマウスが致死的となるのは易感染性となり、菌数が増加することによる肺炎の病態と考えていたために、肺内菌数に差を認めることを予想していたが、これらの結果からは致死的な変化が起こるこの時間帯に菌数の差がなく、菌数以外の要素が肺炎の病態に関与していると考えられた。

次に感染 12 時間後に各群のマウス匹数を増やし、再度肺内菌数の差を確認することとした。その結果を Figure 5 に示す。

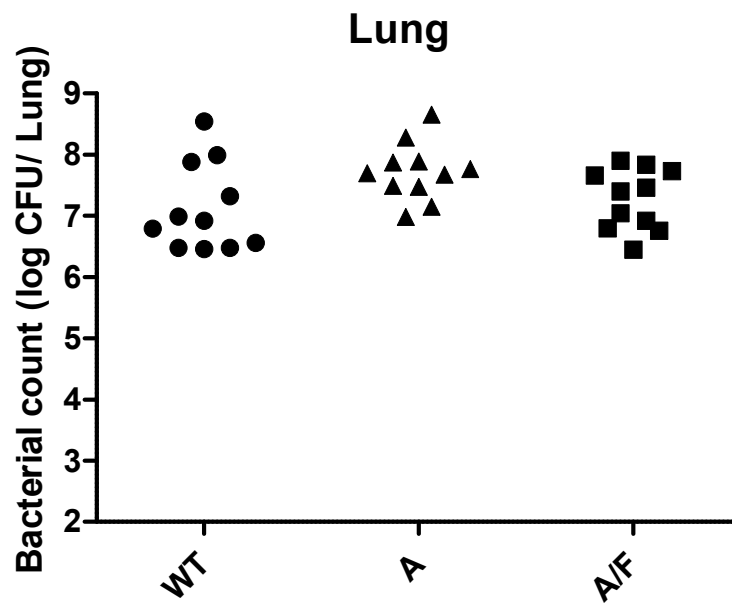


Figure 5. USA300 (10^8 CFU) 経鼻投与 12 時間後の WT マウス (WT)、IL-17A ノックアウトマウス (A)、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウス (A/F) における各群の右肺内菌数 (各群 : n=11)

予備実験同様、肺内菌数は 10^6 – 10^8 CFU とややばらつきはあるものの、各群の肺内菌数に有意差を認めなかった。

これらの結果から、各群のマウスが致死となる感染後早期に各群の肺内菌数の有意な差はみられず、肺炎の病態として肺内菌数の差は致死率の差と相関していないと考えられた。

【USA300 肺炎モデルでのサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量】

次に、各群の致死率の差は感染後の炎症性サイトカイン、ケモカインの影響による可能性を考え、感染 12 時間後に取り出した左肺をホモジナイズした後に Real time PCR を用いて各群のサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量を測定した結果を Figure 6 に示す。

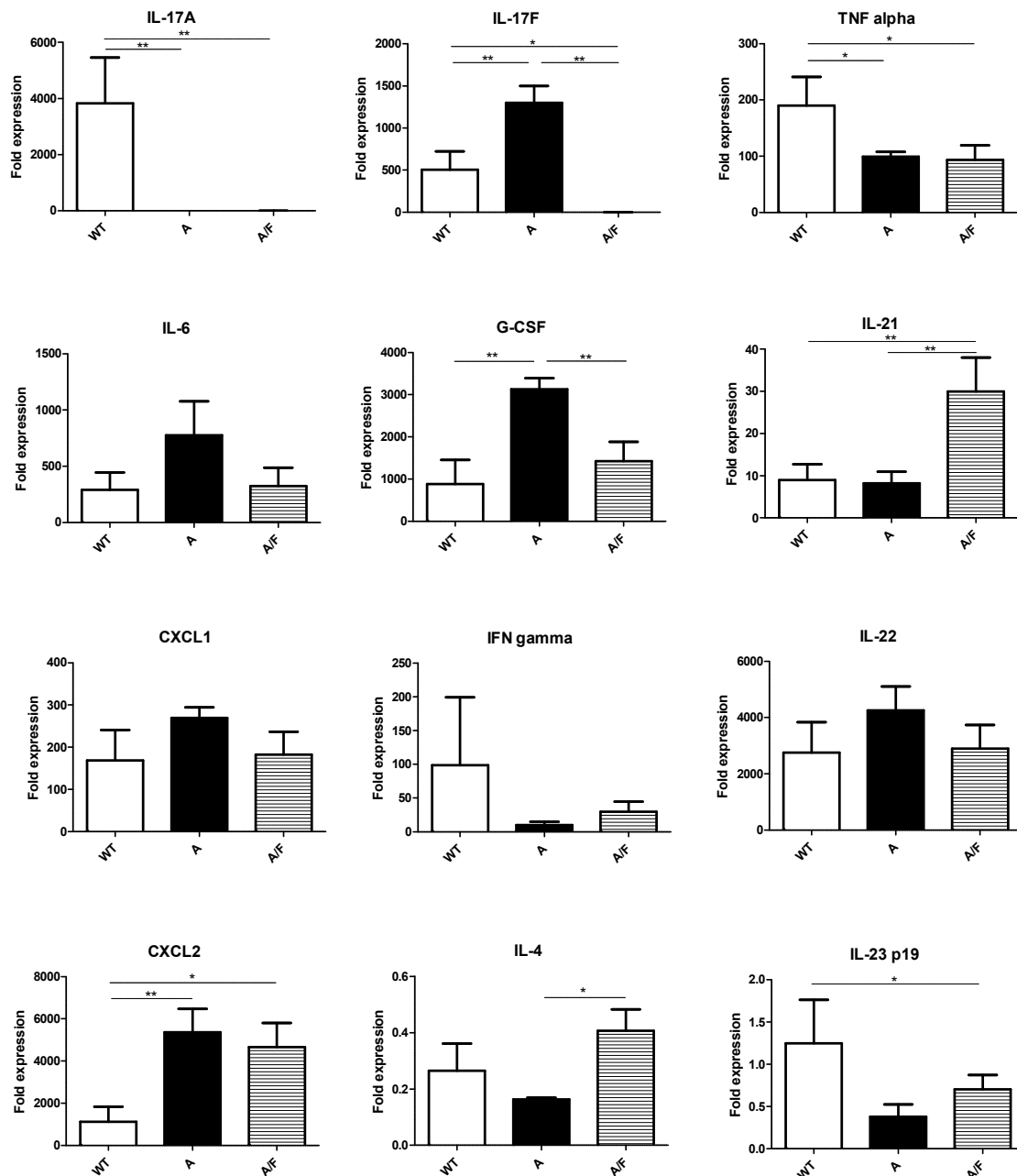


Figure 6. USA300(10^8 CFU)経鼻投与 12 時間後の WT マウス (WT)、IL-17A ノックアウトマウス(A)、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウス(A/F)における左肺の炎症性サイト

カイン、ケモカインの mRNA 発現量 (IL-17A、IL-17F、TNF- α 、IL-6、CXCL1、CXCL-2、G-CSF、IFN- γ 、IL-4、IL-21、IL-22、IL-23 p19)

(各群：n=3)

各データは、未感染マウスの β -actin mRNA 発現量を内部標準とした

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

最も致死性であった IL-17A ノックアウトマウスにおいて、感染 12 時間後で IL-17F mRNA 発現量は WT マウスよりも有意に高値を示した (vs WT, $Il-17a^{-/-}Il-17f^{-/-}$, $P < 0.01$)。また、IL-17A ノックアウトマウスで G-CSF mRNA 発現量も他の群に比べて、有意に高値を示した (vs WT, $Il-17a^{-/-}Il-17f^{-/-}$, $P < 0.01$)。その他に、IL-6、CXCL1、CXCL2、IL-22 も IL-17A ノックアウトマウスで高い傾向を示したが、これらは他の群と比べて有意差は認めなかった。

これらの結果から、感染後に最も致死性であった IL-17A ノックアウトマウスでは WT マウスや IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスと比べて、G-CSF mRNA 発現量の有意な増加が確認された。また、WT マウスと比べて IL-17A ノックアウトマウスでは IL-17F mRNA 発現量が有意に高値を示した。

【BALF での好中球数】

各群の菌数に差がないものの、最も致死性となった IL-17A ノックアウトマウスで IL-17F、G-CSF の mRNA 発現量が有意に増加していたため、各群のマウスに好中球産生の差があると考えた。各群の肺内の好中球数差を確認するため、感染 12 時間後に肺胞洗浄を行い、その回収液から細胞数を確認したのちにフローサトメトリーを行い、その割合から好中球数とマクロファージ数を算出した。その結果を Figure 7 に示す。

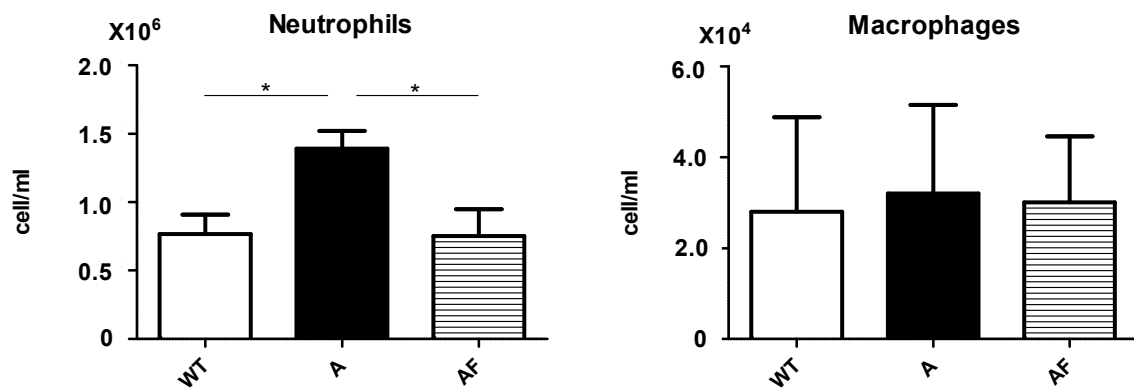


Figure 7. USA300 (10^8 CFU) 経鼻投与 12 時間後の WT マウス (WT)、IL-17A ノックアウトマウス (A)、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウス (A/F) における BALF の好中球数、マクロファージ数 (各群: $n=4$)

* $P < 0.01$.

各群の肺胞洗浄液から検出された細胞の殆どは好中球であった。IL-17A ノックアウトマウス群では他の群と比べ、肺胞洗浄液中の好中球数は有意に増加していた (vs WT, $Il-17a^{-/-} Il-17f^{-/-}$, $P < 0.01$) が、マクロファージ数は各群で特に有意差を認めなかった。

これらの結果から、IL-17A ノックアウトマウスの肺内好中球数は感染 12 時間後で有意に増加していることが示された。

【コラゲナーゼ処理した肺細胞に対する抗 IL-17A 抗体投与の影響】

in vivo で有意な上昇がみられた IL-17F と G-CSF の結果を *in vitro* で確認するため、コラゲナーゼ処理した WT マウス肺細胞に対して USA300 死菌刺激を行った。濃度設定のために MOI 100-3.125 の範囲で 2 倍希釈を行い、IL-17F と G-CSF の産生量を ELISA で測定した。その結果を Figure 8 に示す。

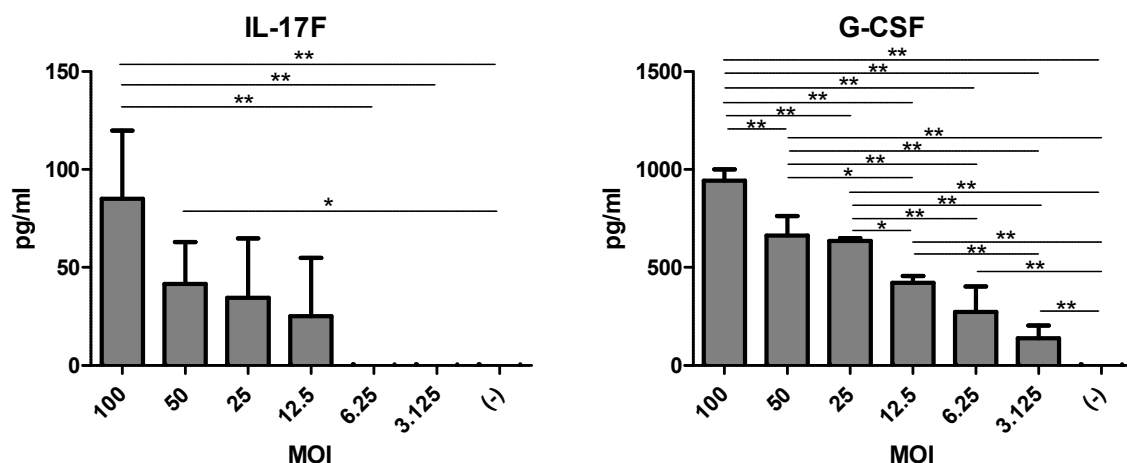


Figure 8. コラゲナーゼ処理後の WT マウス肺細胞に対する USA300 死菌刺激によるサイトレクション、ELISA での IL-17F と G-CSF 濃度 (各群 : n=3)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

MOI:50 の死菌刺激では、死菌刺激をしない群と比べて IL-17F (vs (-), $P < 0.05$)、G-CSF (vs (-), $P < 0.01$) と有意な差を認めており、この実験系では MOI:50 が適当と判断をした。

次に上記の死菌刺激を行った肺細胞に対して抗 IL-17A 抗体を投与し、コントロール群と比較した結果を Figure 9 に示す。

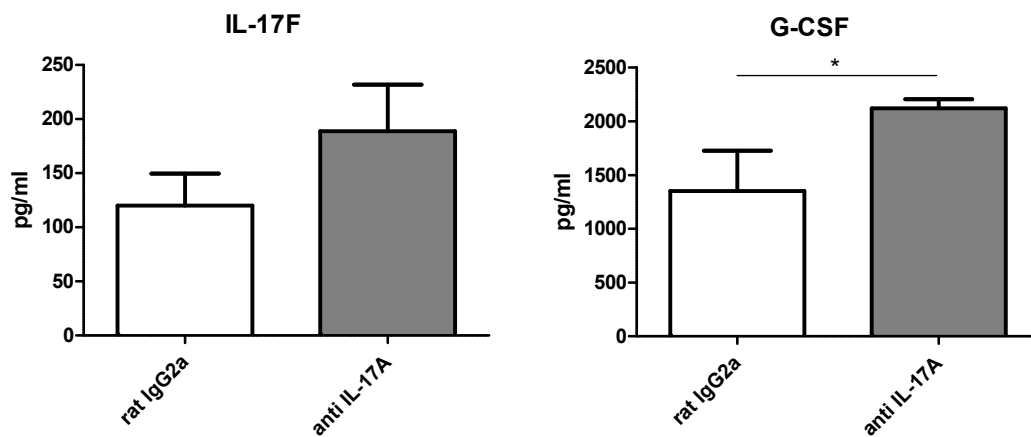


Figure 9. コラゲナーゼ処理後の WT マウス肺細胞に対する USA300 死菌 (MOI : 50) 刺激後の抗 IL-17A 抗体 (anti-IL-17A) 投与群とコントロール抗体 (rat IgG2a) 投与群での IL-17F と G-CSF 濃度 (各群 : n=3)

* $P < 0.05$.

抗 IL-17A 抗体を投与した群はコントロール群と比較して有意に G-CSF が高い結果が得られ (vs rat IgG2a, $P < 0.05$)、*in vitro* でも IL-17A を抑制した状態では G-CSF の産生が高まることが示唆された。IL-17F は両群で有意差は認めないものの、コントロール群と比較して高くなる傾向はあった。

第4節 考察

今回の我々の研究では、USA300 を経鼻投与すると WT マウス、IL-17A+IL-17F ノックアウトと比べ、IL-17A ノックアウトマウスの方が致死性であり、これらの変化は感染 12-24 時間という感染後早期で顕著であることが確認された。これらの群間で肺内菌数に有意差は認めないものの、最も致死性となった IL-17A ノックアウトマウス群で好中球増殖能に関わる G-CSF、BALF の好中球数は有意に高値であった。また、*in vitro* の実験として、コラゲナーゼ処理したマウス肺細胞に USA300 死菌刺激を行い、そこに抗 IL-17A 抗体投与を行ったところ *in vivo* のデータと同様に G-CSF が高値を示す結果が得られた。これらの結果は CA-MRSA マウス肺炎モデルの感染早期に IL-17A が好中球性炎症に関して重要な役割を担うことを示唆していると考えた。

Th17 サイトカイン、特に IL-17、CXCL2、G-CSFなどを介し、好中球の動員、増殖による好中球性炎症の発現、膿瘍形成など起こることが知られており^{43,44}、逆に IL-17 の産生が低下することで膿瘍形成が阻害されたという報告もある⁴⁵。これらの報告では病原体に対する IL-17 の働きは防御的であり、IL-17 の産生低下によって好中球遊走・増殖に関わるサイトカイン、ケモカインの産生低下が起こり、好中球遊走、増殖障害をきたすとされる。その好中球障害の結果、*Salmonella enteritidis*、*Candida albicans*、*Klebsiella pneumoniae*、*Bordetella pertussis* などの病原体増殖が起こり、致死性となるという報告がある⁴⁶⁻⁴⁹。

また、最近の研究では、IL-17 は Th17 細胞以外に $\gamma\delta$ T 細胞、Natural Killer T 細胞などから産生され、特に早期の自然免疫に重要という報告もある^{13,50,51}。 $\gamma\delta$ T 細胞を欠損させたマウス *S. aureus* 肺炎モデルでは、IL-17 産生低下が起こり、好中球が減少することで早期におこる炎症性変化が起こりづらくなるという報告もある⁵²。このように早期に反応する自然免疫由来の IL-17 の産生源が欠損することで炎症は起こりづらくなることが示された報告はあるが、我々の今回の結果では、IL-17A のみを阻害することで WT マウスに比べて肺胞洗浄液中の好中球数の有意な増加が観察された。これらの結果は感染症における IL-17 の役割は病原体の種類だけではなく、IL-17 が作用するタイミングによっても変わる可能性を示していると考ええる。

今回の我々の結果では、感染したマウスが最も致死性となった感染 12-24 時間後の各群の肺内菌数は有意差を認めなかったが、G-CSF mRNA 発現量は有意に高まり、BALF の好中球が増加したことから、この各群での致死率の差はマウス間での過剰な免疫反応の差である可能性を考えた。実際に、今回の実験で死亡したマウス肺の病理像では、著明な好中球浸潤に伴う微小膿瘍の形成とそれに伴う肺胞構造の破壊を認めた (data not shown)。

好中球は宿主防御の役割以外にも、急性肺障害との関与が示唆されており、肺胞の好中球集簇と低酸素血症や肺血管透過性の程度が相関し、好中球数の増加が予後不良因子と関連したとする報告はある⁵³。USA300 を気管内投与したラット肺炎モデルにおける報告では、感染後 12 時間以内の早期に気道、肺への好中球増加や血液凝固因子の集積が起こり、病理でも肺胞構造の破壊を認めており⁵⁴、今回の我々の報告と同様に USA300 感染による早期の肺炎発症を支持するものと考ええる。ただ、今回の研究では PVL や α -hemolysin、PSM などの病原性に関わる因子の検討はしていないため、これらの影響に関しては不明である。

IL-17A と IL-17F のレセプターは IL-17RA と IL-17RC とで共通しており^{55,56}、これらの作用は似ているとする報告はある³⁴。感染症領域においては、IL-17A の機能に関する報告に比べて IL-17F の機能に関する報告は少ないが、*Klebsiella pneumoniae* を感染させた肺炎モデルでは感染後 12 時間以内の早期に IL-17F が増加していることが確認されており⁵⁷、アデノウイルスを経鼻投与したマウスでは肺で IL-17F が高発現し、組織中に好中球の集簇を認めたとする報告⁵⁸ や、IL-17F が欠損したマウスに *Aspergillus spp.* を投与すると有意に肺への好中球集簇が減少したという報告はあり⁵⁹、IL-17F の肺における炎症への関与が示唆されている。

今回確認した以外にも好中球に関与したサイトカイン、ケモカインは存在するため、全てをこれだけで説明できるかは議論の余地があるものの、IL-17A の作用が減弱した状況でも好中球が増加した原因として、IL-17F の増加による G-CSF の増加が原因と解釈できる可能性はある。*in vitro* では IL-17F の産生増加は有意差を示さなかったために、これらの結果に IL-17F がどこまで関与しているのかははっきりしていないが、*in vivo* との違いとして、死菌処理で菌の病原因子を排除したことがこれらの結果に影響した可能性はある。

IL-17A と IL-17F は相同性が高く、ヘテロダイマーを形成しているといわれているが⁶⁰、それぞれの機能に関してはまだはっきりとしない点が多い。しかし、IL-17A ノックアウトマウスでは WT マウスと比べて血漿中の IL-17F、G-CSF の発現が有意に高まるという報告もあり⁶¹、これは我々の結果を支持するものと考ええる。また、ノックアウトマウスというモデル自体に相補的なサイトカインの働きがあった可能性を考慮し、*in vitro* で抗 IL-17A 抗体投与実験を行ったが、*in vivo* と同様に IL-17A の作用が減弱した状況で G-CSF の産生が高まることが確認された。今回の実験で IL-17A の作用が減弱したことによる G-CSF 増加の機序は完全に明らかとなっていないが、CA-MRSA マウス肺炎モデルにおいて、これらの事象を示した報告は我々の知りうる限りなく、IL-17A と IL-17F に関する知見として重要な結果と考える。

さらに、今回の結果では、IL-17A と IL-17F の両方をノックアウトしたマウスでは

IL-17A 単独のノックアウトマウスと比べ、肺に起こる好中球性の炎症の程度は軽度であった。IL-17F の存在だけが問題であれば、WT マウスでも炎症は同じ程度となると考えられるが、IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスのように IL-17A と IL-17F がともに欠損した状況では IL-17A ノックアウトマウスほど致命的とはならず、肺胞洗浄液中の好中球数も WT マウスと比べてとくに有意差を認めなかった。このことはUSA300 によるマウス肺炎モデルにおいて、IL-17F が存在し、なおかつ IL-17A が存在しない状況が肺障害の一因として重要である可能性を示しており、IL-17A と IL-17F の相互の影響を示唆する結果であると考ええる。

今回の研究は CA-MRSA によるマウス肺炎モデルにおいて、IL-17A 単独で欠損した状況下で、G-CSF が高値を示し、好中球性炎症の程度が増加することで過剰な炎症をきたし、結果的に宿主にとって肺炎の増悪因子としても働く可能性があることを示唆する初めての報告であり、また、IL-17A と IL-17F の相互作用の存在を示唆するものであると考える。

第5節 総括および結論

I 本研究から得られた新知見

- ・ CA-MRSA の代表株である USA300 のマウス肺炎モデルにおいて、WT マウスと IL-17A+IL-17F ノックアウトマウスに比べ、IL-17A ノックアウトマウスではより致死的となり、その変化は感染後早期である 12-24 時間で最も顕著であった。

その後は徐々に軽快傾向を示し、感染 96 時間後以降に死亡するマウスは観察されなかった。

- ・ 各群の肺内菌数は有意差を認めなかったが、最も致死的となった IL-17A ノックアウトマウスでの IL-17F、G-CSF の mRNA 発現量が他の群と比べて有意に高値を示し、BALF での好中球数も高値を示した。

- ・ コラゲナーゼ処理した WT マウス肺細胞を USA300 で死菌刺激し、抗 IL-17A 抗体投与群とコントロール抗体投与群で比較すると、ELISA での G-CSF 産生量は抗 IL-17A 抗体投与群で有意に高値を示した。

II 新知見の意義

USA300 は健常者に致死的な肺炎をきたしうる CA-MRSA の代表株であり、その肺炎発症のメカニズムはまだ完全に解明されていない。IL-17 が感染症に対して防御的に働き、この産生低下により易感染性になり、その結果として致死的となるという報告は多いが、今回の研究では、マウス USA300 肺炎モデルにおいて、IL-17A の作用が減弱し、IL-17F が存在している状況では、宿主の過剰な好中球性炎症が起こり、肺炎の増悪因子となりえると示唆した初めての報告であり、CA-MRSA の肺炎発症メカニズム、および IL-17A と IL-17F の相互作用に関する新たな知見と考える。

III 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

- ・ マウス USA300 肺炎モデルにおける、好中球増加に関わる因子に注目した検討や、USA300 の病原因子と IL-17 との関連性を検討する。

IV 今後の課題

IL-17A ノックアウトマウス群で G-CSF の増加、肺内好中球数の増加を認めたが、その機序に関しては十分に解明されていないため、さらなる検討が必要と考える。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究科内科学講座呼吸器内科学分野 西村正治教授に深謝致します。並びに、適切な助言と直接の御指導を賜りました東邦大学医学部微生物・感染症学講座 舘田一博教授、助教 木村聡一郎先生、助教 梶原千晶先生に感謝の意を表します。

引用文献

- 1 Fouser, L. A., Wright, J. F., Dunussi-Joannopoulos, K. & Collins, M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 226, 87-102 (2008).
- 2 Zhou, Y., Toh, M. L., Zrioual, S. & Miossec, P. IL-17A versus IL-17F induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Cytokine* 38, 157-164 (2007).
- 3 Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J. L. & Miossec, P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J. Immunol.* 161, 409-414 (1998).
- 4 Benchetrit, F. *et al.* Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99, 2114-2121 (2002).
- 5 Kudo, M. *et al.* IL-17A produced by alphabeta T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat. Med.* 18, 547-554 (2012).
- 6 Holland, S. M. *et al.* STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357, 1608-1619 (2007).
- 7 Peck, A. & Mellins, E. D. Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect. Immun.* 78, 32-38 (2010).
- 8 Conti, H. R. *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.* 206, 299-311 (2009).
- 9 Minegishi, Y. *et al.* Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.* 206, 1291-1301 (2009).
- 10 Milner, J. D. *et al.* Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 452, 773-776 (2008).
- 11 Ma, C. S. *et al.* Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J. Exp. Med.* 205, 1551-1557 (2008).
- 12 Cho, J. S. *et al.* IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1762-1773

- (2010).
- 13 Miller, L. S. & Cho, J. S. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 505–518 (2011).
 - 14 Otto, M. Community-associated MRSA: what makes them special? *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 324–330 (2013).
 - 15 DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N. & Chambers, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375, 1557–1568 (2010).
 - 16 Moellering, R. C., Jr., Abbott, G. F. & Ferraro, M. J. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 2–2011. A 30-year-old woman with shock after treatment of a furuncle. *N. Engl. J. Med.* 364, 266–275 (2011).
 - 17 Nakamura, I. *et al.* Clinical aspects of infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 strain, generally regarded as community-acquired, in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66, 416–420 (2013).
 - 18 Beilman, G. J. *et al.* Emerging infections with community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in outpatients at an Army Community Hospital. *Surg. Infect. (Larchmt)* 6, 87–92 (2005).
 - 19 Daum, R. S. Clinical practice. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 357, 380–390 (2007).
 - 20 Diep, B. A. *et al.* Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367, 731–739 (2006).
 - 21 Labandeira-Rey, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315, 1130–1133 (2007).
 - 22 Lina, G. *et al.* Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1128–1132 (1999).
 - 23 Gillet, Y. *et al.* Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359, 753–759 (2002).
 - 24 Bubeck Wardenburg, J. *et al.* Pantón-Valentine leukocidin is not a

- virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J. Infect. Dis.* 198, 1166–1170 (2008).
- 25 Voyich, J. M. *et al.* Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J. Infect. Dis.* 194, 1761–1770 (2006).
 - 26 Cremieux, A. C. *et al.* alpha-Hemolysin, not Pantone-Valentine leukocidin, impacts rabbit mortality from severe sepsis with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *J. Infect. Dis.* 209, 1773–1780 (2014).
 - 27 Wang, R. *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* 13, 1510–1514 (2007).
 - 28 Li, M. *et al.* Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5883–5888 (2009).
 - 29 Tkaczyk, C. *et al.* *Staphylococcus aureus* alpha toxin suppresses effective innate and adaptive immune responses in a murine dermonecrosis model. *PLoS One* 8, e75103 (2013).
 - 30 Klevens, R. M. *et al.* Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 298, 1763–1771 (2007).
 - 31 Hidron, A. I., Low, C. E., Honig, E. G. & Blumberg, H. M. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. *Lancet Infect. Dis.* 9, 384–392 (2009).
 - 32 Francis, J. S. *et al.* Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Pantone-Valentine leukocidin genes. *Clin. Infect. Dis.* 40, 100–107 (2005).
 - 33 Montgomery, C. P. *et al.* Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. *J. Infect. Dis.* 198, 561–570 (2008).
 - 34 Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S. & Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.* 226, 57–79 (2008).

- 35 Miyazaki, Y. *et al.* IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 185, 1150-1157 (2010).
- 36 Horai, R. *et al.* TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 114, 1603-1611 (2004).
- 37 Nakae, S. *et al.* Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375-387 (2002).
- 38 Ishigame, H. *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30, 108-119 (2009).
- 39 Rutitzky, L. I. *et al.* IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *J. Immunol.* 180, 2486-2495 (2008).
- 40 Ramesh, G. *et al.* Endotoxin and cisplatin synergistically induce renal dysfunction and cytokine production in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F325-332 (2007).
- 41 Alam, M. S. *et al.* Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4⁺ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5943-5948 (2010).
- 42 Pesce, J. *et al.* The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J. Clin. Invest.* 116, 2044-2055 (2006).
- 43 Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 479-489 (2010).
- 44 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485-517 (2009).
- 45 Chung, D. R. *et al.* CD4⁺ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* 170, 1958-1963 (2003).
- 46 Schulz, S. M. *et al.* IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4⁻ lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* and has a mild effect in bacterial clearance. *Int. Immunol.*

- 20, 1129–1138 (2008).
- 47 Huang, W., Na, L., Fidel, P. L. & Schwarzenberger, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* 190, 624–631 (2004).
 - 48 Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194, 519–527 (2001).
 - 49 Higgins, S. C., Jarnicki, A. G., Lavelle, E. C. & Mills, K. H. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J. Immunol.* 177, 7980–7989 (2006).
 - 50 Reynolds, J. M., Angkasekwinai, P. & Dong, C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 413–423 (2010).
 - 51 Roark, C. L. *et al.* gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 353–357 (2008).
 - 52 Cheng, P. *et al.* Role of gamma-delta T cells in host response against *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *BMC Immunol.* 13, 38 (2012).
 - 53 Miller, E. J. *et al.* Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 427–432 (1992).
 - 54 Montgomery, C. P. & Daum, R. S. Transcription of inflammatory genes in the lung after infection with community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a role for panton-valentine leukocidin? *Infect. Immun.* 77, 2159–2167 (2009).
 - 55 Toy, D. *et al.* Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J. Immunol.* 177, 36–39 (2006).
 - 56 Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 14, 282–289 (2008).
 - 57 Happel, K. I. *et al.* Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 202, 761–769 (2005).
 - 58 Hurst, S. D. *et al.* New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J. Immunol.*

- 169, 443–453 (2002).
- 59 Yang, X. O. *et al.* Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J. Exp. Med.* 205, 1063–1075 (2008).
- 60 Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34, 149–162 (2011).
- 61 von Vietinghoff, S. & Ley, K. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J. Immunol.* 183, 865–873 (2009).