

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08529

研究課題名(和文) 非定型T細胞および自然リンパ球の分化と機能の転写因子による制御

研究課題名(英文) Regulation of development and function of unconventional T cells and innate lymphoid cells.

研究代表者

瀧 伸介 (Taki, Shinsuke)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：50262027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：消化管の恒常性維持に必須な働きを有し、その消化管関連疾患への関与が注目されているCD8⁺型上皮内リンパ球および自然リンパ球(ILC)の発生過程に重要な遺伝子発現制御機構を明らかにした。すなわち、転写因子インターフェロン制御因子2(IRF-2)が、胸腺内IEL前駆細胞が機能的に成熟するために必要であること、一方、ILC分化については、その骨髄内共通前駆細胞の分化に必須であることを明らかにした。IRF-2作用の解明をさらに進めることによって、粘膜免疫系の成立機構やその疾患への関わりについてより深い理解がえられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed gene regulatory mechanisms for the development of intestinal intraepithelial lymphocytes (IELs) expressing CD8alpha homodimers and newly discovered innate lymphoid cells (ILC), which play crucial roles in the homeostasis in the gut and are gathering much interests as to how they are involved in the pathogenesis of gastroenterological disorders. Thus, we showed that the transcription factor interferon regulatory factor 2 (IRF-2) was required for functional maturation of thymic precursors for IELs and for the generation of common progenitors in the bone marrow for ILC1, ILC2 and ILC3 but not lymphoid tissue inducer-like cells. To further clarify how IRF-2 functions in these processes will provide us with deeper understanding of the mechanisms underlying the establishment of mucosal immune system.

研究分野：免疫学

キーワード：粘膜免疫 リンパ球 遺伝子発現 自然免疫 造血

1. 研究開始当初の背景

本研究計画開始当初、体表面を取り巻く粘膜が、環境と免疫機構の相互作用点として免疫学的寛容および自己免疫・アレルギー疾患との関連において注目されていたが、その重要度は現時点において益々増加して来たと言える。粘膜免疫については、特に腸管において、腸内細菌叢と粘膜組織（消化管上皮および粘膜固有層）中の免疫細胞との間の相互の制御作用が、腸管における恒常性の維持、腸管組織の防御、さらには炎症性腸疾患に対する感受性の決定などに重要な役割を果たす因子として精力的に研究が進められてきた。腸管粘膜における免疫細胞群は、リンパ球系細胞に限っても他のリンパ組織とは大きく異なっており、conventionalなT細胞や制御性T (Treg) 細胞に加えて、腸管粘膜上皮内リンパ球 (intestinal intraepithelial lymphocytes; iIELs) として、 $\gamma\delta$ 型TCRを発現する $\gamma\delta$ T細胞、 $\alpha\beta$ 型TCRを発現するものの非古典的クラスI分子 (TL抗原) に依存性を示し、CD8 α ホモダイマーを発現するunconventional CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ +T細胞 (以下CD8 $\alpha\alpha$ T細胞と呼ぶ) の二つの非定型T細胞、粘膜固有層に見いだされる抗原受容体を発現しない、いわゆる自然リンパ球 (innate lymphoid cells; ILCs) が知られている。ILCsは、NK細胞やLymphoid tissue inducer (LTI)様細胞をも含むが、より最近になって発見されたILC1、2、3がメンバーに加わっている (Nat. Rev. Immunol. 13:145-149, 2013, Immunity 41:354-365, 2014)。これら細胞が腸管などにおける免疫学的恒常性維持および炎症反応制御に果たす役割の重要さが理解されてくるにつれて、その分化成熟のメカニズムが重要な研究課題として浮かび上がってきている。ごく最近の精力的な研究によって、いくつかの転写因子 (Tbet, NFIL3, Eomes, ROR γ t, TCF-1, GATA3, AhR など) およびサイトカイン類 (IL-7, IL-15 など) がこれら自然免疫系細胞の分化に関与している事が分かっている (上記総説を参照)。

研究代表者はこれまで、自然免疫系細胞であるCD11b+樹状細胞や好塩基球 (Ichikawa 他 PNAS, 2004, Hida 他 Blood, 2005) に加えて、NK細胞および (おそらく) 何らかの内因性リガンドによる刺激を介して生成されるNK受容体陽性CD8 α T細胞の分化、成熟における転写因子インターフェロン制御因子2 (IRF-2) の重要性を、すなわち、IRF-2は自然免疫系の成立に重要な転写因子である事を指摘し、さらにNK細胞分化過程におけるサイトカインIL-15の作用点の詳細な解析について報告を行ってきた (Taki 他 J.Immunol. 2005, Notake 他 J.Immunol. 2011, Yoshizawa 他 J.Immunol. 2012)。ここ数年のうちに、NK細胞の分化過程に関与する転写因子Tbet, GATA3, NFIL3, TCF-1などがILC分化にも重要であることが相次

いで明らかになってきた。研究代表者はこのようなNK細胞とその他の自然免疫細胞の転写制御に関わる因子の共通性に基づいて、NK細胞以外の自然免疫系リンパ球にもIRF-2が関与するのではないかと、この予想を立てた。

2. 研究の目的

研究代表者自身は、本計画の先行研究において、IRF-2を欠損するマウス *Irf2*^{-/-}マウス腸管における上皮内 $\gamma\delta$ T細胞、CD8 $\alpha\alpha$ T細胞、並びに粘膜固有層内NKp46+ILC3が著名に減少していることを見いだしていた。従って、本研究の目的は、この先行研究の予備的知見を確認するところから始め、その他の自然免疫系にまで検討対象を拡大し、IRF-2の腸管粘膜上皮内 $\gamma\delta$ T細胞、CD8 $\alpha\alpha$ T細胞および粘膜固有層ILCの分化過程における役割を検討し、その作用機序を、特に他の転写因子群やサイトカインの作用点、機能との関連において理解することとした。より具体的には、フローサイトメトリーによる詳細な表面マーカー解析を通じて、これら細胞および関連細胞の *Irf2*^{-/-}マウスと対照マウス間での比較を行うことによって、分化障害がどの細胞にまで及んでいるのかを確定する。さらに障害の見いだされた細胞については、その障害の程度を定量的に明らかにし、前駆細胞など分化のステップが知られている細胞についてはどのステップで分化障害が起きているのかを確定し、さらに骨髄移植や細胞移入を用いてIRF-2機能のprimaryな標的細胞群を決定することを本計画の視野に入れた。さらにサイトカイン応答性、生存能や他の転写因子、細胞表面マーカーの発現誘導、サイトカイン産生能などについても検討を加え、IRF-2の機能を絞り込み、これら情報に関して、他の転写因子およびサイトカイン欠損マウスにおける情報 (文献情報に加えて、必要な場合は自ら検討を加える) と比較することによって、転写因子・サイトカインのシグナル・カスケードの中でのIRF-2の相対的な位置を決定するところまで進む計画とした。

3. 研究の方法

以上の目的を達成するため以下の方法を用いて研究を進めた。

(1) *Irf2*^{-/-}マウスにおいてiIELやILCが欠損している事をさらに多くの個体で定量的に確認するとともに、様々な細胞表面マーカーや転写因子の発現をも検討した。ILCについては、腸管のみならず肝臓や肺における頻度を算定し、IRF-2欠損の効果を検討した。この目的のために野生型マウスおよび *Irf2*^{-/-}マウスについてそれぞれの細胞の頻度、臓器当たりの細胞数を算定し、統計的处理に十分なデータを蓄積した。ILCについては、予備的検討を行ったNKp46+ILC3以外の、NKR-ILC3やLTI, ILC1, ILC2についても、CD49a, CD127, CD4, DX5, KLRG1, NK1.1,

T1ST2 などに対する抗体を用いて分別して IRF-2 欠損の影響を調べた。特に ILC3 と LTi については、ROR γ t の発現がこれら細胞の系列マーカーであることから ROR γ t をコードする *Rorc* 遺伝子座に *gfp* cDNA をノックインした *Rorc^{gfp/+}* マウス (慶応大学・吉村教授経由で導入した) と *Irf2^{-/-}* マウスを交配して、より正確に ILC3 および LTi を同定した。ILCs の同定には *Rag1^{-/-}* 背景の *Irf2^{-/-}* マウスをも用いた。

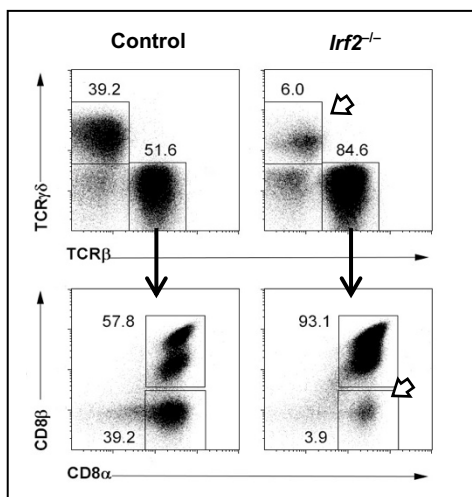
(2) IRF-2 欠損による分化停止段階の予想、障害の分子メカニズムの予測を行う為に以下の検討を行った。ヒト *bcl-2* トランスジーンを *Irf2^{-/-}* マウスに導入し、アポトーシスの関与を検討した。また、骨髄キメラや胸腺内前駆細胞の移植、前駆細胞の *in vitro* における培養などによって、IRF-2 が機能している細胞種を検索した。さらに、iIEL の胸腺内前駆細胞に関して double negative (DN) TCR β +胸腺細胞の表面マーカーについて、そして ILC 前駆細胞に関しては、骨髄内のさまざまな分化段階にある前駆細胞の表面マーカー等を *Irf2^{-/-}* マウスと対照マウスで比較検討した。また、iIEL および ILC 系統の細胞亜集団をソーティングして、mRNA を回収、RT-PCR によって様々な分子の遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) iIEL の分化における IRF-2 の機能について。

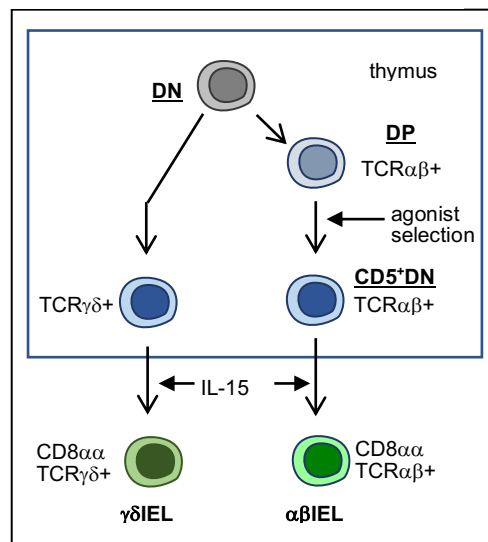
Irf2^{-/-} マウスでは小腸 IELs (CD8 α +TCR α β + および γ δ +) が激減しており (図 1)、この異常は *Irf2^{-/-}* マウス由来骨髄細胞を用いたキメラマウスにおいても再現されたため、造血細胞の異常によるものであることが明らかとなった。また、胸腺細胞を RAG-1 欠損マウスに移入して iIEL の分化を見る実験システムを開発し、野生型マウス由来の胸腺細胞に比べ、IRF-2 を欠損する胸腺細胞からは極めてわずかな IEL 細胞集団のみが再構築されるに過ぎないこと、すなわち、IRF-2 欠損マウスは胸腺内 IEL 前駆細胞を欠いているこ

図 1. *Irf2^{-/-}* マウス小腸上皮では γ δ T 細胞と CD8 α IEL が減少している



とを明らかとした。ところが、胸腺細胞のフローサイトメトリーによる検討の結果、CD8 α +TCR α β + IEL の前駆細胞 (IELp) を含むことが知られている CD4-CD8-TCR α β + 胸腺細胞分画の頻度については、野生型マウスと IRF-2 欠損マウスの間で差が見られなかった。従って、IRF-2 は胸腺内 IELp が機能的に成熟するために必要であると考えられる (得丸ほか、日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月、投稿準備中)。さらに、CD8 α +TCR α β + IELp を含むと考えられる TCR α β +NK1.1-DN 胸腺細胞をソートし、IL-15 存在中で *in vitro* 培養すると野生型マウス由来細胞では CD8 α +細胞が得られるが、*Irf2^{-/-}* マウス由来細胞ではその効率が低下している (得丸ほか同上)。胸腺内で産生された IELp は、粘膜組織に移動し、そこに存在するマクロファージなどによって IL-15 の供給を受け、最終的に IELs に分化することが明らかになっている (図 2)。*Irf2^{-/-}* マウスでは、フローサイトメトリーで検討した限りでは IELp 数自体は変化しておらず、従って、IL15 に応答できる機能的 IELp の分化の効率が低下しているものと考えられる。IRF-2 欠損 TCR α β +NK1.1-DN 胸腺細胞では IL-2R β 陽性細胞の比率が低下している (51.3+/-7.1% vs. 30.5+/-12.2%) が、野生型細胞と同レベルに発現している細胞も十分に存在しており、IL-15 受容体 (IL-2R β および γ c) 発現の低下のみでこの現象が説明できるとは考えにくい。従って、おそらく IL-15 刺激によって誘導される遺伝子の発現に IRF-2 が関わっており、IRF-2 欠損下では CD8 α +細胞の分化に必要な遺伝子が誘導されない可能性がある。実際、IRF-2 欠損マウスにわずかに残存する小腸 CD8 α +TCR α β +IEL において、すでにこれらの細胞の分化に必須であることが明らかになっている転写因子 T-bet の発現が、mRNA の発現レベル、細胞内フローサイトメトリーによって検討したタンパク量の双方で CD8 α +TCR α β +IEL 特異的に低下して

図 2. マウス γ δ T 細胞と CD8 α IEL の分化経路



いることを見出し、IRF-2がCD8 α ⁺TCR α β ⁺IEL分化を制御する転写因子ネットワークにおいてT-betやIL-15シグナルの関係する経路で機能している可能性が示唆された。残念ながら、IRF-2の働きがT-betの発現を誘導してiIELsの分化をサポートする、という仮説を実証すべく作成したT-betをヒトCD2プロモーターの下流に配置してT系列の細胞で強制発現するようにしたマウス(筑波大学。高橋智教授によって提供された)では、IRF-2欠損の有無にかかわらずT細胞分化がより未熟なdouble negative→double positiveのステップで強く阻害されてしまい、IEL分化に対するT-bet強制発現の影響を見ることはできなかった(Saitoほか、第46回日本免疫学会学術集会、2017)。一方、ヒト**bcl2**トランスジーンをH-2Kプロモーターの制御下に発現させたトランスジーンを発現する*Irf2*^{-/-}マウスではCD8 α ⁺TCR α β ⁺IEL細胞数がある程度回復しており、IRF-2の果たす役割には細胞の生存に関わる機能が含まれていることが示唆される。一方、残存 γ IELに関しては、残存CD8 α ⁺TCR α β ⁺IELで見られたT-betの低下が見られず、また**bcl2**強制発現によってもまったくその数が回復しなかった。従って、ともにIRF-2を必要とするものの、 γ IELの分化においてはCD8 α ⁺TCR α β ⁺IELの分化とは異なる機能を果たしているのではないかと考えられる。

(2) ILCsの分化におけるIRF-2の機能について。

Irf2^{-/-}マウス小腸粘膜固有層では、conventional NK (cNK) 細胞だけではなく、LTi様 ILC3を除く ILC1、ILC2、ILC3がいずれも減少していることを見いだした。図3はROR γ tをコードする遺伝子座にGFP遺伝子を挿入したRAG1背景の*Irf2*^{-/-}マウスを用いてNK⁺ILC3の欠損を示した例である(大久保ほか、日本免疫学会学術集会2016沖縄、その他のILCについては省略)。ILC3はさらにその表現型によって3つに分類されることが知られているが、*Irf2*^{-/-}マウス小腸で現象が見られたのは、その内NKp46⁺ILC3とNKp46-CD4-ILC3であって、NKp46-CD4⁺ILC3(いわゆるlymphoid tissue inducer様細胞、LTi様細胞)については減少が見られなかった。加えて、肝臓におけるILC1、肺

図3. *Irf2*^{-/-}マウス小腸粘膜固有層ではILCが減少している(NKp46⁺ILC3の例)

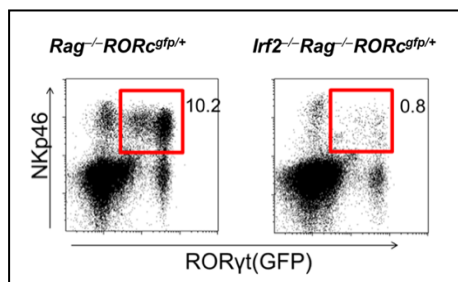
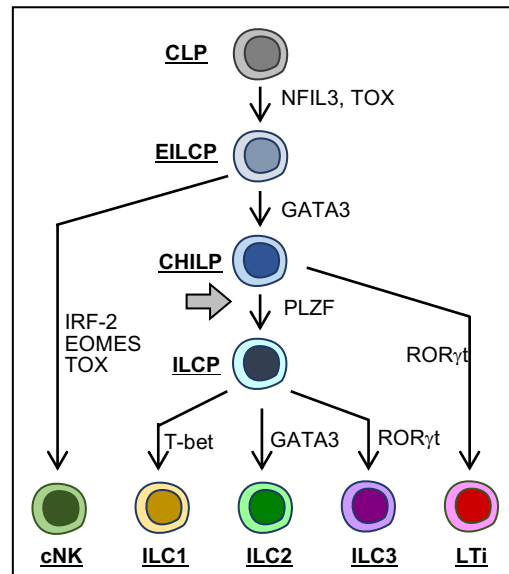
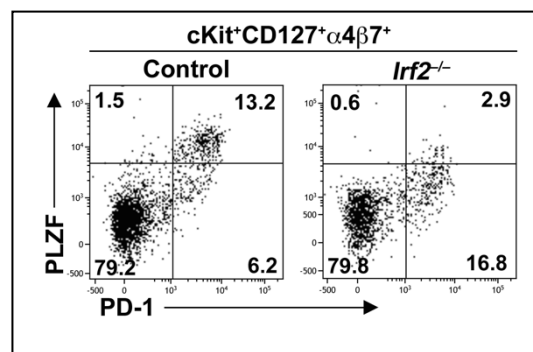


図4. ILC分化経路、前駆細胞、各ステージで機能する転写因子と予想されるIRF-2の作用点



におけるILC2のいずれもがやはり減少していた。従って、IRF-2欠損によるILCの減少は、小腸でのみ見られるものではなく、全身性の現象であることが示された。また、上で述べたヒト**bcl-2**トランスジーンを発現する*Irf2*^{-/-}マウスでは、小腸粘膜固有層内のcNK細胞数のみが有為に回復していたが、ILC1、ILC2、ILC3についてはまったく回復の傾向が見られなかった。従って、*Irf2*^{-/-}マウスにおける分化障害の機構は、cNKとILCでは異なっていることが予想された。実際、すでに我々自身が示したように(Taki他、J.Immunol. 2005)、cNK分化の障害は、骨髄におけるNK細胞の成熟段階で起こっている。さらに、骨髄キメラを用いた検討によって、骨髄の造血細胞内のIRF-2の欠損がこの表現型を原因したことが明らかになった。ILCの分化経路については、ここ2~3年で様々な分化ステージと各ステージで必要とされる転写因子が次々と明らかになってきている(図4、Current Op. Immunol. 44:61, 2017ほか)。すなわちcNKを除くすべてのILCはCHILP (common helper innate lymphocyte progenitors) と呼ばれる共通前駆細胞から分化することが知られている。

図5. *Irf2*^{-/-}マウスのPD-1^{hi}CHILPはPLZF^{hi}亜集団を欠く



IRF-2 欠損マウスが、ILC のサブセットのうち LT_i 以外の ILC3 および ILC1、ILC2 に分化障害を示すことから、IRF-2 の作用点は CHILP 以降の分化ステップであろうと予想された。最近、CHILP のうち細胞表面に PD-1 分子を、そして転写因子 PLZF を細胞内に発現する細胞が、LT_i への分化能を失った ILC 前駆細胞 (ILCP) であるとの報告がなされている (Constantinides ほか、Nature 508: 397-401, 2014; Yu ほか、Nature 539: 102-106, 2016、図 4 参照)。そこで、*Irf2*^{-/-} マウス骨髄内の CHILP を詳細に検討してみたところ、図 5 に示すように IRF-2 欠損 PD-1^{hi}CHILP では PLZF の発現が著しく低下しており、ILCP と同定される PLZF^{hi} 亜集団が見られなかった。従って、IRF-2 の作用点は、CHILP→ILCP のステップ (図 4 網掛け矢印) である可能性を強く示唆している。しかし、ILCP (PD-1^{hi}CHILP) の細胞数には大きな変化はないので、IRF-2 は ILCP の生成よりもむしろ質的な成熟に関与していると考えられた。

以上のように、本研究では、粘膜免疫、特に消化管におけるバリア機能に重要な自然免疫系細胞である iIEL および ILC の分化に関して、IRF-2 が重要な役割を担っていることを見だし、さらにその作用点がこれまでに知られていなかったユニークなものであることを明らかにできた。引き続き、両細胞種における IRF-2 の機能を明らかにすることによって、粘膜免疫系の成立の原理に迫るとともに、生体防御におけるこれらユニークな細胞の機能の理解につなげたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Sanjo H., Tokumaru S, Akira S, Taki S. Conditional deletion of TAK1 in T cells reveals a pivotal role of TCR $\alpha\beta$ ⁺ intraepithelial lymphocytes in preventing lymphopenia-associated colitis. Plos One 10(7): e0128761、2015、査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0128761

[学会発表] (計 4 件)

①Saito, H., Okubo, Y., Takahashi, S., Sanjo, H., Taki, S. Forced over-expression of T-bet transcription factor in thymocytes inhibits DN to DP transition. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017.

②Okubo, Y., Tokumaru, S., Shin, T., Sanjo, H., Taki, S. IFN regulatory factor 2 controls ILC development by promoting PLZF⁺ ILC progenitor generation. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016.

③Tokumaru, S., Okubo, Y., Shin, T., Sanjo, H., Taki, S. The transcription factor IRF-2

controls CR8 $\alpha\alpha$ ⁺ intraepithelial lymphocyte development at the level of thymic precursor. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015.

④Okubo, Y., Tokumaru, S., Shin, T., Sanjo, H., Taki, S. Interferon regulatory factor 2 is differentiation factor of type 3 NKp46⁺ and NKp46⁻CD4⁻ innate lymphoid cell. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧 伸介 (TAKI, Shinsuke)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：50262027

(3) 連携研究者

山条 秀樹 (SANJO, Hideki)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：50391967