

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15158

研究課題名(和文) 自然リンパ球ナチュラルヘルパー細胞の微小環境ニッチの同定

研究課題名(英文) Identification of niches of natural helper cells in non-lymphoid tissues

研究代表者

本村 泰隆 (Motomura, Yasutaka)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：10587794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織リンパ集積(FALC)に存在する新規のリンパ球として見出されたナチュラルヘルパー(NH)細胞は、肺や腸管、皮膚などの非リンパ組織にも存在する。本研究では、非リンパ組においてFALCのようなNH細胞のニッチが存在するか解析を行った。マウスへのアレルギーの点鼻投与により、肺NH細胞が活性化し、肺への好酸球の集積を誘導する。好酸球欠損マウスでは、NH細胞の活性化が減弱することから、NH細胞が好酸球と直接相互作用していることが明らかとなった。好酸球の集積は肺に点在することから、この好酸球集積がアレルギー病態におけるNH細胞のニッチとして働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Natural Helper (NH) cells, originally found as a new type of lymphocyte in fat-associated lymphoid cluster (FALC), exist in non-lymphoid tissues such as lung, gut and skin. In this study, intranasal administration of allergen induces the activation of lung NH cells to the accumulation of eosinophils in the lung. Eosinophil-deficient mice show the impairment of NH cell activation after allergen treatment, suggesting that the direct interaction with eosinophils regulates the activation of NH cells. We also found the eosinophil accumulation exists in the lung interspersed. These results suggest that the interaction of NH cells with eosinophils forms the microenvironments 'niche' in the pathogenesis of allergic disorders.

研究分野：免疫

キーワード：NH細胞 ニッチ アレルギー

1. 研究開始当初の背景

2010年に、腸間膜脂肪組織にリンパ集積 Fat-associated lymphoid cluster; FALC)の存在が明らかとなり、そこに多く存在する新規のリンパ球としてナチュラルヘルパー(NH)細胞(現在は、グループ2自然リンパ球(ILC2)と称されているが、ここではNH細胞と呼ぶ)が見つかった。NH細胞は、既知の免疫細胞が発現する Lineage (Lin) マーカー陰性であり、c-Kit、Sca-1を発現する細胞である。T細胞やB細胞とは異なり、抗原認識受容体を持たず、IL-2、IL-7、IL-25、IL-33のサイトカイン受容体を発現し、これらのサイトカインによりNH細胞の機能が制御されている(引用文献1)。脂肪組織におけるNH細胞の発見後、肺、腸管、皮膚といった非リンパ組織においてもNH細胞が存在することが明らかとなってきた。NH細胞は、寄生虫感染やアレルゲンの侵入により損傷した上皮細胞から放出されるIL-33に反応し、2型サイトカインであるIL-5やIL-13を産生することで寄生虫感染防御やアレルギー病態に重要な役割を担う。NH細胞の特徴的な機能として組織常在性が挙げられる。T細胞のように、定常時にリンパ節に存在し、炎症時にリンパ節から炎症部位に遊走するのではなく、NH細胞は、定常時からすでに末梢組織に停滞し、その場所に侵入してきた寄生虫に対し免疫応答を誘導することが示され、他の組織へ遊走することはない(引用文献2)。このことは、NH細胞が末梢組織に停滞する組織常在性を規定するメカニズムが存在することを示唆していた。そこで、末梢組織におけるNH細胞の機能を制御する環境に注目した。

2. 研究の目的

NH細胞は、T細胞やB細胞とは異なり、組織常在性をもつリンパ球である。当初、NH細胞は脂肪組織に存在するリンパ集積 FALCに多く存在するリンパ球として見出された後、肺、腸管、皮膚といった非リンパ組織にも存在することが見出され、各組織において外界から侵入する病原微生物に備えていると考えられている。脂肪組織のFALCは、他のリンパ節とは異なり、リンパ節を欠失するROR γ t欠損マウスやaly/alyマウスにおいてもFALCが存在することが示されている。また、末梢のリンパ節にはNH細胞がほとんど存在しないことから、FALCはNH細胞の生存、維持の場として働くニッチであることが考えられた。また、肺や腸管においてもNH細胞が常在することが報告されてきたが、各組織におけるNH細胞を検出する際に、異なったマーカーが使われ、これらのNH細胞が同一の細胞群であるのかという議論がなされる程、各組織でのNH細胞のフェノタイプが異なることが示唆された。しかしながら、各末梢組織にNH細胞の機能を規定するニッチが存在すると仮定した時に、各組織のNH細胞の表現型が異なることが容易に説明でき

ることや、脂肪組織にFALCが見出されたことから、各組織にニッチが存在し、その場で組織に適したフェノタイプを決められている可能性が考えられた。そこで、本研究では、各組織(脂肪組織、肺、腸管)におけるNH細胞がどのような機能的な違いがあるかを明らかにするとともに、生体におけるNH細胞を追跡できるシステムを構築することにより、末梢組織においてNH細胞の機能を制御するニッチが存在するかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では各組織におけるニッチが存在し、それぞれのニッチが組織特異的な機能を規定している可能性を検証するため、各組織におけるNH細胞のフェノタイプの違いを明らかにするため、各組織(肺、脂肪組織、腸管)からNH細胞を単離し、遺伝子発現解析およびフローサイトメーターによるサイトカイン産生能を解析した。また、NH細胞は、特異的なマーカーが見つからないため、組織学的解析により細胞局在を解析することが困難である。そこで、NH細胞の発現する遺伝子を組み合わせることにより、GFPを発現するレポーターマウスの作製を試みた。また、コンジェニックマウスから単離したNH細胞を移入することにより、NH細胞の動態を追跡することで、末梢組織におけるニッチの存在を解析した。

4. 研究成果

(1) 各組織におけるNH細胞の表現型解析

マウスの肺、脂肪組織、腸管(小腸、大腸)からLin陰性Sca-1、KLRG1陽性細胞としてNH細胞を単離し、RNA抽出後、DNAライブラリーを作製し、RNAシーケンス解析を行い、それぞれのNH細胞の発現遺伝子を比較した。その結果、脂肪組織NH細胞においてIL-33受容体であるST2の発現が、肺と腸管NH細胞に比べ顕著に高かった。一方で、腸管NH細胞では、肺、脂肪組織NH細胞よりもIL-25受容体であるIL17Rbの発現が顕著に高いことがわかった。また、サイトカイン遺伝子に関しては、腸管NH細胞においてIL-4、IL-6、IL-13といった2型サイトカイン遺伝子の発現が他の組織のNH細胞よりも顕著に高かった。そこで、遺伝子発現解析をもとに、単離した各組織のNH細胞を用いて、ST2、IL17Rbに対する抗体を用いてタンパク質の発現を解析したところ、遺伝子発現解析の結果と一致し、脂肪組織NH細胞ではIL-17RbよりもST2の発現が高い一方で、腸管NH細胞ではST2よりもIL-17Rbを高発現していた。*in vitro*での各組織のNH細胞のIL-25、IL-33の応答性を調べたところ、それぞれの発現に相関し、脂肪組織NH細胞がIL-33への高い応答性を、また、腸管NH細胞がIL-25への高い応答性を示した。したがって、各組織においてサイトカインの応答性

が異なることが明らかとなった。次に、サイトカイン産生能を解析するため、各組織のNH細胞を単離し、*ex vivo*で人為的に活性化を誘導するPMAとイオノマイシン刺激に応じて産生されるサイトカインを解析したところ、腸管NH細胞におけるIL-4、IL-13の産生が他の組織のNH細胞よりも高いことが確認され、これは遺伝子発現解析の結果と一致していた。この結果から、各組織におけるNH細胞のサイトカイン産生能にも違いがあることが示され、存在する組織に応じて機能が異なっていることが明らかとなった。また、肺のNH細胞のマウスへの移入実験において、移入したNH細胞が肺では検出できたにも関わらず、腸管では検出できなかった。この結果は、存在する組織に応じてNH細胞の機能を規定するとともに、NH細胞の機能がその組織に適応しやすい機能へと変換されている可能性が示唆され、組織に応じたNH細胞の機能を規定するなんらかの環境が存在する可能性が示唆された。

(2)末梢組織におけるNH細胞ニッチの探索

当初計画していたレポーターマウスの作製は、コンストラクションの構築において目的の遺伝子を組み込むのに時間を要してしまい、作製に至らなかった。そこで、移入実験によりNH細胞の末梢組織での動態解析を行った。非リンパ組織として肺に着目し、移入した細胞とレシピエントの細胞を分けるために、コンジェニックマウスであるS_JLとB6の交配したマウス(S_JLxB6 F1)の肺からNH細胞を単離し、NH細胞を含むリンパ球が存在しないIL-7受容体欠損マウス(B6バックグラウンド)に移入し、各組織における移入したNH細胞の存在をフローサイトメーターにより解析した。定常時では、移入したNH細胞が肺のみに検出され、他の組織では検出できなかった。一方で、移入した細胞が機能を持つかを検証するために、NH細胞がアレルギーに反応し、IL-5、IL-13産生を介して喘息様の症状を誘導するという知見をもとに、NH細胞を移入したマウスにアレルギーであるパピンの点鼻投与を行った。その結果、定常状態では気道と縦隔リンパ節ではNH細胞の存在が認められなかったにも関わらず、パピンを投与したマウスにおいて気道と縦隔リンパ節にNH細胞の集積が認められ、肺や肺胞洗浄液中における好酸球浸潤が顕著に誘導された。したがって、パピン投与により、気道と縦隔リンパ節へのNH細胞の集積が誘導され、喘息様の症状を呈したことから、移入したNH細胞は機能的であり、また肺へ移行した後、活性化することで気道と縦隔リンパ節に移動したことが示された。パピンにより活性化したNH細胞はIL-5産生を介して肺への好酸球の浸潤を誘導する。しかしながら、好酸球欠損マウスでは、NH細胞自体の活性化が減弱していることを見出した。この結果は、好酸球とNH細胞が直接

相互作用することで、NH細胞が活性化していることを示唆しており、NH細胞と好酸球が共局在することが考えられた。パピン投与したマウスの肺をHE染色したところ、好酸球の集積が肺に点在して認められることがわかった。この結果から、パピン投与による好酸球の集積の場がNH細胞の活性化する場である可能性が考えられ、NH細胞の機能を制御するニッチとして働いていることが示唆された。今後は、好酸球の集積場に含まれる細胞群を同定することで、どのような細胞がNH細胞の機能を制御するニッチの形成に寄与するかを解析して行くとともに、腸管においても、肺でみられた好酸球の集積が認められるかを解析することで、腸管におけるNH細胞のニッチとなる場が存在するかを解析していく予定である。

<引用文献>

1. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463(7280):540-4, 2010

2. Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T, Koyasu S. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nature Immunology*, 17(1):76-86, 2016

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 0件)

[学会発表](計 5件)

1. Regulation of IL-4 production in Group2 innate lymphoid cells, Yasutaka Motomura, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, 2017年3月16日、京都

2. Regulation of IL-4 production in Group2 innate lymphoid cells, Yasutaka Motomura, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, 15th Cytokines & Inflammation Conference, 2017年2月6日、San Diego, USA

3. Regulation of IL-4 production in Group2 innate lymphoid cells, Yasutaka Motomura, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, 第45回日本免疫学会学術集会, 2016年12月6日、沖縄

4. ILC2におけるIL-4産生機序の解明、本村泰隆、小安重夫、茂呂和世、免疫四次元空

間ダイナミクス 第5回班会議・第8回総
括班会議・第4回サマースクール、2016年
7月7日 淡路島

5. ILC2 におけるサイトカイン遺伝子の発現
制御、気管支喘息における ILC2 のサイト
カイン産生機構について、本村泰隆、小
安重夫、茂呂和世、第26回 Kyoto T Cell
Conference、2016年5月21日、京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

本村 泰隆 (MOTOMURA YASUTAKA)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号：10587794

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし