

平成30年 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15508

研究課題名(和文) 自然リンパ球の機能制御におけるTNF受容体型分子群の役割

研究課題名(英文) Roles for TNFR superfamily molecules in regulation of ILC function

研究代表者

石井 直人 (ISHII, Naoto)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60291267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：2型自然リンパ球(以下ILC2)は、呼吸器などの臓器特異的に局在し、呼吸器にアレルギーを惹起するトリガー細胞として注目されている。本研究では、ILC2に発現するGITRに焦点を当てて、ILC2の機能・活性化制御機構の解明を行った。GITR欠損マウスにおいて肺炎症が抑制されたほか、T細胞を欠損するGITR/RAG2二重欠損マウスにおいてもアレルギー性肺炎症が抑制された。したがって、ILC2に発現するGITRが直接的にILC2の活性化に関与することが示唆された。さらに、in vitro解析により、GITRシグナルによるILC2活性化の増強は、主にIL-9を介する機序であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Group 2 innate lymphoid cells (ILC2) in the lung are activated by inhaled allergens and epithelial cytokine interleukin 33 (IL-33). We found that IL-33 alone was not sufficient to induce optimal ILC2 activation and that additional signals from glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) were essential. *Gitr*^{-/-} mice displayed reduced numbers of ILC2 after administration of papain or IL-33, which resulted in impaired expression of IL-5 and IL-13 and diminished eosinophilia in the lung. Crosslinking of GITR with IL-33 synergistically activated NF- κ B, p38, and Erk to induce IL-9 production, and autocrine IL-9 promoted IL-5 and IL-13 via STAT5. Accordingly, STAT5 activators, IL-2 and IL-9, restored the defective responses of *Gitr*^{-/-} ILC2. Our results identify a previously unknown critical role for GITR co-signaling in initiating and promoting early ILC2 activation in the lung.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 サイトカイン 補助刺激シグナル

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球 (innate lymphoid cell, 以下 ILC) は、高いサイトカイン産生能を有するリンパ球系の細胞で、自然免疫系において機能する一群の細胞集団を指す。Th1 サイトカインを産生し細胞傷害活性をもつ 1 型 ILC、IL-5 などを産生し寄生虫感染防御やアレルギー疾患の病態形成に関連する 2 型 ILC (ILC2)、IL-17 を産生する 3 型 ILC (ILC3) の 3 種に分類され、それぞれが産生するサイトカインがヘルパー T 細胞の分化やマクロファージなどの自然免疫系細胞の機能を制御する。その中で、肺や脂肪組織に存在する ILC2 は、Th2 サイトカインの産生を介してアレルギー性呼吸器炎症の病態形成に関与する一方で、M2 マクロファージによる脂肪分解を制御することで肥満を抑制することが明らかにされ、注目されている。

本研究者は、以前より、TNF 受容体型の T 細胞共刺激分子 (OX40、GITR、CD27 など) の研究において、数多くの研究成果を挙げた。その研究過程で、ILC2 と ILC3 において、GITR の強い発現が見られることがわかった。また、ILC2 を刺激すると OX40 リガンドが高発現することも見いだした。すなわち、従来、T 細胞の機能分子として知られていた TNF 受容体型共刺激分子群が ILC においても何らかの機能を有すると考えられた。実際に、パピイン投与で惹起されるアレルギー性気道炎症が、GITR 欠損マウスで強く抑制されることを見いだした。実際に、肺 ILC2 には GITR が高発現しており、GITR からのシグナルが ILC2 の活性化に関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ILC における TNF 受容体型共刺激分子の役割を解明することを目的とする。既に、ILC2 依存性アレルギー性気道炎症モデルで、GITR 欠損マウスで炎症が抑制されることが分かっていることから、GITR 欠損マウスを使用し、特に、GITR シグナルによる ILC2 の機能制御機構を明らかにする。また、in vitro 実験によって、ILC2 活性化制御における GITR シグナル伝達系の関与メカニズムの解明を目指す。本研究が完遂されれば GITR とそのシグナル伝達分子を標的としたアレルギー性炎症の治療法開発に直結する知見が得られると同時に、その基盤技術が確立される。

3. 研究の方法

(1) 単離 ILC2 を GITR のアゴニストおよびアンタゴニストで in vitro 刺激し、その活性化制御における GITR シグナル伝達的作用機序を明らかにする。

(2) パピイン誘導および IL-33 誘導アレルギー性気道炎症に GITR 欠損マウスあるいは T 細胞欠損 GITR 欠損を用いて、ILC2 の発現

する GITR のアレルギー性炎症の病態形成における役割を明らかにし、GITR の治療標的としての可能性について検討する。

4. 研究成果

(1) 肺の ILC2 に GITR が高発現することをみいだした。同時に、GITR リガンド発現細胞の探索を行ったが、一部の樹状細胞にその発現が認められたものの、妥当な発現細胞を同定することはできなかった。

(2) GITR 欠損マウスの呼吸器にパピインあるいは IL-33 を投与しアレルギー性肺炎症を惹起したところ、野生型マウスに比し、炎症が有意に抑制された。具体的には、ILC2 と好酸球の細胞数が肺においても気管支洗浄液においても GITR 欠損マウスでは低下しており、さらに、同欠損マウスでは、気管支洗浄液中の IL-5 と IL-13 の濃度も減少していた。すなわち、GITR がアレルギー性肺炎症を正に制御することが明らかになった。

(3) GITR は T 細胞の活性化にも重要であることから、結果 2) は T 細胞の GITR 機能が反映された可能性も考えられた。そこで、T 細胞欠損 (RAG2 欠損) GITR 欠損マウスで同様の実験を行った。その結果、RAG2/GITR 二重欠損マウスにおいて、RAG2 欠損マウスに比し、肺炎症が強く抑制された。すなわち、ILC2 内因性 GITR がアレルギー性肺炎症の病態形成に関与することがわかった。また、T 細胞欠損マウスに IL-33 を気管内投与しアレルギー性肺炎症を惹起した際に、GITR とリガンドの結合を阻害する GITR-Fc タンパク質を投与したところ、肺炎症が抑制された。この結果から、T 細胞ではない細胞 (ILC2) の GITR が肺炎症に関与すること、GITR 阻害物質が、アレルギー性肺炎症の治療に有効であることが明らかになった。

(4) in vitro の実験において、ILC2 を IL-33 と共に GITR アゴニストで刺激すると、IL-33 単独刺激に比し、IL-5、IL-9、IL-13 の産生が強く増強された。その増強は、NF- κ B や STAT5 の阻害剤の投与で見られなくなることから GITR シグナルの直接的な作用である可能性が示唆された。さらに、IL-13 欠損マウス由来の ILC2 や、阻害性 IL-5 抗体、阻害性 IL-9 抗体を種々の組合せで使用することにより、GITR 刺激による ILC2 活性化の増強は IL-9 依存性であることが明らかになった。

以上の結果より、GITR が ILC2 の活性化に必須の分子であること、さらに、アレルギー性炎症の治療標的となりうるということが明らかになった。

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8件)

1. Kimura M, Nagashima H, Okuyama Y, Ishii N, and So T: TRAF2 and TRAF5 associated with the signal transducing receptor gp130 limit IL-6-driven transphosphorylation of JAK1 through the inhibition of proximal JAK-JAK interaction. *Int. Immunol.* 2018, in press, doi: 10.1093/intimm/dxy029
2. Machiyama T, So T, Okuyama Y, Kobayashi S, Phung HT, Asao A, Harigae H, and Ishii N: TNF receptor associated factor 5 controls oncostatin M-mediated lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018, in press, 10.1016/j.bbrc.2018.03.186
3. Nagashima H, Okuyama Y, Fujita T, Takeda T, Motomura Y, Moro K, Hidaka T, Omori K, Sakurai T, Machiyama T, Ndlovu LC, Riccardi C, So T, and Ishii N: GITR co-signal in ILC2 controls allergic lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2018, in press, doi: 10.1016/j.jaci.2018.01.028
4. Ebina-Shibuya R, Matsumoto M, Kuwahara M, Jang K-J, Sugai M, Ito Y, Funayama R, Nakayama K, Sato Y, Ishii N, Okamura Y, Kinoshita K, Kometani H, Kurosaki T, Muto A, Ichinose M, Yamashita M, and Igarashi K: Inflammatory responses induce an identity crisis of alveolar macrophages leading to pulmonary alveolar proteinosis. *J Biol Chem*, 292: 18098-18112, 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.808535
5. Lan P, Fan Y, Zhao Y, Lou X, Monsour HP, Zhang X, Choi Y, Dou Y, Ishii N, Ghobrial RM, Xiao X, Li XC.: TNF superfamily receptor OX40 triggers invariant NKT cell pyroptosis and liver injury. *J Clin Invest.* 127: 2222-34, 2017, doi: 10.1172/JCI91075
6. Suzuki T, Gao J, Ishigaki Y, Kondo K, Sawada S, Izumi T, Uno K, Kaneko K, Tsukita S, Takahashi K, Asao A, Ishii N, Imai J, Yamada T, Oyadomari S, and Katagiri H.: ER stress protein CHOP mediates insulin resistance by modulating adipose tissue macrophage polarity. *Cell Rep.* 18: 2045-2057, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.076
7. Lu L, Tanaka Y, Ishii N, Sasano T, and

Sugawara S.: CD103+ CD11b- salivary gland dendritic cells have antigen cross-presenting capacity. *Eur J Immunol.* 47: 305-313, 2017. doi: 10.1002/eji.201646631

8. Tanaka Y, Nagashima H, Bando K, Lu L, Ozaki A, Morita Y, Fukumoto S, Ishii N, Sugawara S: Oral CD103-CD11b+ classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3+ regulatory T cells in draining lymph nodes. *Mucosal Immunol.* 10: 79-90, 2017. doi: 10.1038/mi.2016.46

[学会発表](計11件)

1. Masanobu Kimura, Hiroyuki Nagashima, Naoto Ishii, Takanori So: TRAF2 and TRAF5 binding to the signal transducing receptor gp130 inhibit JAK1 activation in the IL-6-receptor signaling complex. 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2017)
2. Takanori So, Hiroyuki Nagashima, Yuko Okuyama, Yasutaka Motomura, Kazuyo Moro, Lishomwa C. Ndhlovu, Carlo Riccardi, Naoto Ishii: Early activation of group 2 innate lymphoid cells in the lung is critically controlled by the TNFR superfamily molecule GITR. 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2017)
3. Yuko Okuyama, Hiroyuki Nagashima, Masuko Ushio-Fukao, Michael Croft, Naoto Ishii, Takanori So: A new regulator of OX40 co-signaling controls autoimmune neuroinflammation mediated by CD4+ T cells. 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2017)
4. Hai T PHUNG, Hiroyuki Nagashima, Yuko Okuyama, Shuhei Kobayashi, Atsuko Asao, Naoto Ishii, Takanori So: TNF receptor-associated factors 5 expressed in non-hematopoietic cells augments acute colonic damage induced by dextran sulfate sodium. 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2017)
5. NAGASHIMA Hiroyuki, OKUYAMA Yuko, HAYASHI Takaya, ISHII Naoto, SO Takanori: A novel regulatory role for TRAF2 and TRAF5 in the IL-6-driven Th17 development. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium (2017)
6. Hiroyuki Nagashima, Takanori So, Naoto Ishii: 2型自然リンパ球の新たな制御機

構の解明、第 6 回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis (2017)

7. NAGASHIMA Hiroyuki, OKUYAMA Yuko, HAYASHI Takaya, ISHII Naoto, SO Takanori : TRAF2 and TRAF5 have redundant but unequal inhibitory roles in Th17 differentiation mediated by IL-6
45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (2016)
8. Hiroyuki Nagashima, Yuko Okuyama, Takaya Hayashi, Atsuko Asao, Takeshi Kawabe, Satoshi Yamaki, Hiroyasu Nakano, Michael Croft, Naoto Ishii, Takanori So : "CD4+ T cell-intrinsic TRAF5 negatively regulates Th17 cell-dependent experimental autoimmune encephalomyelitis.
International congress of immunology 2016 (2016)
9. OKUYAMA Yuko, ATSUMI Toru, JIANG Jing-Jing, NAKAMURA Akihiro, OGURA Hideki, MENG Jie, KAMIMURA Daisuke, ISHII Naoto, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki : A novel regulator of NFκB signaling enhances IκBα ubiquitination and promotes inflammatory disease development. International Congress of Immunology 2016 (2016)
10. So, T., H. Nagashima, Y. Okuyama, T. Hayashi, A. Asao, T. Kawabe, S. Yamaki, H. Nakano, M. Croft, N. Ishii. : TRAF adaptors limit IL-6 receptor signaling through an unexpected binding to the signaling transducer receptor gp130. International Congress of Immunology 2016 (2016)
11. OKUYAMA Yuko, NAGASHIMA Hiroyuki, MACHIYAMA Tomoaki, USHIO-FUKAI Masuko, CROFT Michael, ISHII Naoto, SO Takanori : OX40 binding and regulation of T cell activation by the scaffolding IQGAP1 protein. 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2016)

〔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

<http://www.immunol.med.tohoku.ac.jp//index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石井 直人 (ISHII NAOTO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 60291267

(2)研究分担者

宗 孝紀 (SO TAKANORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号 : 60294964