

令和元年5月27日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15737

研究課題名(和文) IL-4によるNK細胞を介した自然アレルギー抑制機構の解明

研究課題名(英文) The investigation of regulatory mechanisms for innate allergy by IL4-induced NK cells

研究代表者

木庭 乾 (Kiniwa, Tsuyoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・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：90793795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アレルギー病態におけるIL-4誘導性NK細胞(IL4-NK)の生理的役割について、喘息モデルマウスを用いた解析を行った。特に、喘息の病態形成に重要な濾胞性T細胞TFHおよび2型自然リンパ球ILC2とIL4-NKの相互作用に着目した。喘息モデルマウスのNK細胞を除去したところ、TFHの産生するIL-4によって誘導される血中IgE量が減少したことから、喘息病態においてNK細胞がTFHを抑制している可能性が示唆された。また、IL4-NKとILC2の共培養によってILC2の増殖やサイトカイン産生が減弱したことから、IL4-NKがILC2に対し抑制作用を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、アレルギー病態における新たなNK細胞の制御機構およびその生理的役割として、IL-4を受け取ったNK細胞が活性化し、TFHやILC2と相互作用しそれらを抑制することでアレルギー性炎症の過剰な亢進を抑制する、ネガティブフィードバック機構に働く可能性があることが明らかになった。IL4-NKの誘導機序やTFHおよびILC2を抑制する機構の詳細は今の所不明であるが、今後その詳細が明らかとなれば、あらたなアレルギー性疾患の治療法開発の糸口となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the physiological roles of IL-4 induced NK cell (IL4-NK) in allergic diseases using mouse model of asthma. Especially, we focused on the interactions among T follicular helper (TFH), Group 2 innate lymphoid cells (ILC2), and IL4-NK. We found that serum IgE was reduced by injecting a depleting antibody against NK cells into asthmatic mice. Because IgE is induced by IL-4 from TFH, this result suggested that NK cell can suppress TFH during asthmatic diseases. Furthermore, we revealed that ILC2 co-cultured with IL4-NK showed lower proliferation and cytokine production compared to without IL4-NK, suggesting that IL4-NK can suppress ILC2 directly.

研究分野：免疫学

キーワード：NK cell ILC2 TFH IL-4 Allergy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2010年に新しいリンパ球として発見された (Group2 innate lymphoid cell : ILC2) は、肺や腸管などの末梢組織に多く存在し、アレルゲンや寄生虫の侵襲によって上皮から放出される IL-33 に応答し、IL-5 や IL-13 などの 2 型サイトカインを多量に産生する。ILC2 による 2 型免疫応答はアレルギーの病態に深く関わっており、Th2 細胞などの獲得免疫系を介した IgE 依存のアレルギーの機構とは区別され、自然アレルギーと呼ばれている。

Th2 細胞を活性化することで誘導される IgE 依存のアレルギーは、獲得免疫系を介する為惹起に時間を要するが、抗原特異性があることで速やかな抗原排除に働き、抗原の消失と共に鎮静化する。一方、自然アレルギーは組織破壊に伴う IL-33 産生を起点とする即時型の応答であり、IL-33 に暴露された ILC2 の迅速かつ多量の 2 型サイトカイン産生によって生じる。自然アレルギーは抗原特異的な応答ではなく抗原排除による鎮静化は起こらないことから、何らかの積極的な ILC2 抑制機構が存在すると考えられてきたが、当研究室では IFN- γ や IL-27 が活性化 ILC2 の機能を抑制することを報告した (Moro *et al*, Nature immunol, 2016)。これらのサイトカインは Th2 細胞よりも ILC2 に選択的な抑制効果を発揮することから、過剰な自然アレルギーを抑制し、抗原特異的な 2 型免疫応答への移行を促すと考えられる。しかし、抑制性サイトカインの産生細胞については十分な知見は得られておらず、ILC2 抑制機構においてどのような細胞がいつどこで ILC2 を抑制するのかについては解明されていない。

申請者は代表的な 2 型サイトカインである IL-4 の過剰発現が特徴的なマーカー発現および高い IFN- γ 産生能と細胞傷害活性を示す NK 細胞、IL-4 応答性 NK 細胞 (IL-4-induced NK cell : IL4-NK) を著明に増加させることを見出した (Kiniwa *et al*, PNAS, 2016)。1 型免疫応答で活性化する一般的な NK 細胞 (conventional NK cell : cNK) とは異なり、IL4-NK は 2 型免疫応答において IL-4 依存的に出現・活性化し、cNK に比べて多量の IFN- γ を産生することから、2 型免疫応答において出現する IL4-NK が IFN- γ 産生もしくは細胞傷害活性によって ILC2 を抑制し、自然免疫型の 2 型免疫応答を鎮静化させることを示唆している。

2. 研究の目的

当研究室では 2 型免疫応答を強力に惹起する ILC2 を発見し、その機能や役割を追求してきたが、その一環として 2016 年に IFN- γ や IL-27 が ILC2 の過剰な活性化を抑制することを報告した。一方、申請者は 2 型免疫応答時に著明に増加するユニークな NK 細胞、IL4-NK を発見し、IL4-NK が高い IFN- γ 産生能と細胞傷害活性を示し、寄生虫感染などの 2 型免疫応答を抑制することを報告した。本研究ではこの 2 つの新しい細胞の相互作用に着目し、IL-4 によって出現する NK 細胞が IFN- γ 、あるいはその細胞傷害活性によって ILC2 の過剰な活性化を抑制し 2 型免疫応答のネガティブフィードバック機構を形成する可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 気管支喘息モデルマウスにおける IL4-NK 誘導の確認

これまでの研究から、IL4-NK は強力な 2 型免疫応答を誘導する寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) を感染させたマウスの腸間膜リンパ節において誘導され、2 型免疫応答に抑制的に働くことが示唆されている。本研究ではアレルギー性炎症においても IL4-NK が同様の役割を持つのか明らかにするために、代表的なアレルギー性疾患である気管支喘息モデルマウスとしてパイン誘導性、およびアルテルナリア誘導性の気管支喘息モデルマウスを作製し、肺

胞洗浄液、肺実質組織、縦隔リンパ節における IL4-NK の出現の有無を確認した。

(2) IL4-NK 特異的マーカーの探索

IL4-NK は cNK に比べて B220^{high}/CD11b^{low}/IL-18R^{low}/IL-21R^{high} を示す特徴的な NK 細胞である。しかし、B220 や CD11b は様々な NK 細胞の活性化機構に反応して変動しやすく、また IL-18R や IL-21R はそもそもの発現量が大きくないため、より IL4-NK に特異的かつ変化を捉えやすいマーカーが求められている。そこで、IL-4 過剰発現マウスから単離した IL4-NK を用いて、ナイーブマウスに存在する cNK と種々の表面マーカーや転写因子の発現量を比較し、特異的マーカーを探索した。

(3) IL4-NK による ILC2 抑制作用の検討

IL4-NK は高い IFN- γ 産生能と細胞障害活性を持つことが明らかになっている。一方 ILC2 は IFN- γ による抑制を受けること、細胞障害活性のトリガーにもなる NK 活性化受容体のリガンドを IL-33 刺激に応じて高発現することが明らかになっている。そこで、ILC2 が IL4-NK の抑制標的となるのか、なる場合にどういった機序によるかを検討するため、共培養実験を行った。IL-4 過剰発現マウスから単離した IL4-NK を ILC2 と様々な条件下で共培養し、ILC2 の生存率をナイーブマウスから単離した cNK を用いた場合と比較した。

(4) IL4-NK の獲得免疫系における重要性の検討

IL4-NK はリンパ節でより強く誘導されることが明らかになっており、また IL4-NK の *in vitro* での誘導には高濃度の IL-4 が必要であることから、リンパ節に存在する強力な IL-4 産生細胞が IL4-NK の誘導や機能に関わっていることが示唆されている。そこで、2 型免疫応答時にリンパ節に形成される濾胞中心で誘導され、多量の IL-4 を産生することで B 細胞における IgE クラススイッチを誘導することで知られる濾胞型ヘルパー T 細胞 (T_{fh}) に着目した解析を行った。IL4-NK および T_{fh} が誘導される Nb 感染モデルマウスに NK 細胞を除去する抗アシアロ GM1 抗体 (GM1) を投与し、T_{fh} の数や活性の指標である血清中の IgE 量を測定した。

4. 研究成果

(1) 気管支喘息モデルマウスにおける IL4-NK 誘導の確認結果

パピン、アルテルナリア双方について、様々な投与量、投与回数、解析時期を検討した結果、縦隔リンパ節において B220^{high}/CD11b^{low}/IL-18R^{low} を示す IL4-NK 様の細胞が出現することが明らかになった。しかし、寄生虫感染時に腸間膜リンパ節で誘導される IL4-NK に比べてマーカー分子の変化、誘導される数は小さく、同じく 2 型免疫応答であっても、炎症の種類によってまたは組織によって IL4-NK の誘導性は異なることが明らかになった。

(2) IL4-NK 特異的マーカーの探索結果

(1)において、IL4-NK の検出が難航したため、これまでのマーカー以外で、より検出感度の高い分子の探索を行った結果、IL4-NK において NFIL3 と IRF4 が高発現することが明らかになった(図 1)。このうち、NFIL3 については *in vitro* で cNK を IL-4 刺激に供した場合にも発現上昇が見られた。NFIL3 は NK 細胞が

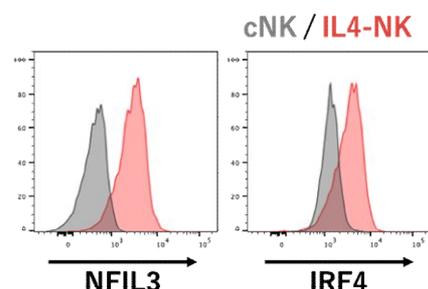


図1 IL4-NK特異的マーカーの探索

特徴的に高発現する転写因子であり、1型免疫応答においてはNK細胞の機能に影響しないことが報告されているが、2型免疫応答における機能はこれまで注目されておらず、IL4-NKの誘導や機能に重要な因子である可能性が考えられる。

(3) IL4-NKによるILC2抑制作用の検討結果

単離したcNKおよびIL4-NKをIL-12で短時間刺激し、その後ILC2と共培養した結果、IL4-NKがcNKよりも有意にILC2を抑制することが明らかになった(図2)。IL-12で刺激することなく単離後すぐに共培養に供した場合には、ILC2の抑制効果は低く、cNKとIL4-NKとで抑制効果に差は見られなかったことから、IL4-NKによるILC2の抑制にはIL-12などの活性化刺激が重要であると考えられた。

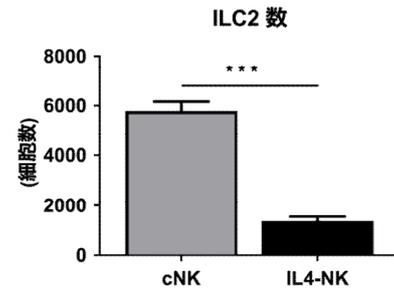


図2 IL4-NKとの共培養によるILC2の機能抑制

(4) IL4-NKの獲得免疫系における重要性の検討結果

Nb感染マウスにGM1を投与してNK細胞を除去したところ、血清中のIgE量が有意に増加することが明らかになった(図3)。縦隔リンパ節、腸間膜リンパ節のTfh数には有意な変化がなかったことから、NK細胞がTfhに対し、数的にはなく機能的に抑制している可能性が示唆された。本研究ではIL4-NKを特異的に欠損させる実験系を構築できなかったため、GM1の投与によるIgE量の増加がどの程度IL4-NKの誘導によるものかを評価することはできなかった。

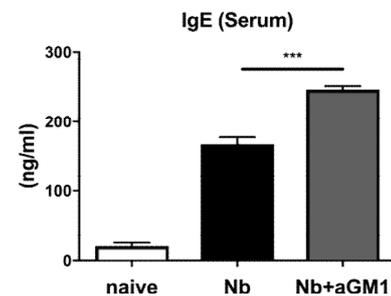


図3 NK細胞除去によるIgE量の増加

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

(1) Tsuyoshi Kaniwa, Kazuyo Moro

「Novel suppression mechanism of group 2 innate lymphoid cells.」

第47回日本免疫学会 / 2018年

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。