

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16167

研究課題名（和文）微生物叢の代謝産物による2型自然リンパ球活性制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of type 2 innate lymphoid cells by microbiota

研究代表者

森田 英明（Morita, Hideaki）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・室長

研究者番号：90365320

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）：気管支喘息を含むアレルギー疾患は、一旦発症すると完治させることが困難なため、発症を予防する方法の開発が求められている。近年、腸内細菌が様々な全身の炎症性疾患に影響を及ぼすことが報告されている。そこで本研究では、腸内細菌がアレルギー性の炎症誘導に深く関与する免疫細胞である2型自然リンパ球に与える影響を検討した。その結果、腸内細菌が産生する物質である短鎖脂肪酸の一部が、2型自然リンパ球の活性を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腸内細菌が産生する物質である短鎖脂肪酸の一部が、アレルギー性の炎症誘導に深く関与する免疫細胞の活性を抑制することが明らかとなった。これらの事実から、この短鎖脂肪酸自体、もしくはこれらを誘導する細菌に着目することで、気管支喘息を含むアレルギー疾患の発症予防法の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Allergic diseases, including asthma, are chronic inflammatory diseases that affect more than 200 million people all over the world. Therefore, it is critical to devise strategies for preventing allergic diseases. Recent findings suggest that gut microbiota and its metabolite affect systemic inflammatory diseases. In the present study, we attempt to clarify the roles of microbiota metabolite, especially short-chain fatty acid, in the regulation of group 2 innate lymphoid cells, one of the primary effector cells in allergic inflammation. As a result, we found that butyrate and propionate, but not acetate, suppress the activation of group 2 innate lymphoid cells. These findings may lead to the development of the strategy for the prevention of allergic diseases.

研究分野：免疫アレルギー

キーワード：微生物叢 アレルギー 自然リンパ球

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、日本を含む先進諸国において、気管支喘息を含むアレルギー疾患患者数が増加し、医療費増大の一因として大きな社会問題となっている。従来のステロイド剤や近年新たに開発された生物学的製剤は効果を示しながらも、継続的な投与を必要とすることから医療費の大幅な削減には繋がっていない。これらの事実は、一旦発症した気管支喘息を完治させることの困難さを示すと共に、より効果的な発症予防法の開発の重要性を示唆している。

これまで、気管支喘息の研究及び治療の標的は主に T 細胞や IgE 抗体等の獲得免疫が主体で、同分野に関して数多くの研究が行われてきた。しかし、近年の大規模ゲノム関連解析では、獲得免疫だけでなく、自然免疫系と関連が深い IL-33 とその受容体が気管支喘息の発症と最も強く相関していることが明らかとなったことから、IL-33 により活性化される自然免疫系と気管支喘息の発症との関連性に注目が集まっている。特に近年新たに発見された 2 型自然リンパ球 (Group 2 innate lymphoid cell: ILC2) は IL-33 により活性化されることで、大量のサイトカインを産生し、気管支喘息の発症及び炎症の慢性化にも関与している可能性が示唆されている。従って、ILC2 の活性、分化制御機構を解明することが気管支喘息の発症予防法の開発につながる可能性が高いが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。

腸内の細菌を含む微生物(微生物叢)が宿主の免疫細胞や組織構成細胞と相互作用することで、消化管を主病態とする疾患のみならず、自己免疫疾患、気管支喘息等のアレルギー疾患などの全身の疾患に影響を与えることが明らかとなり注目を集めている。この腸内の微生物叢と全身の恒常性維持を繋ぐ分子メカニズムの一つとして、微生物叢が産生する代謝産物の関与が示唆されている。事実、腸内の微生物叢により産生された代謝産物は体内に吸収され、循環血液中でも検出でき全身に分配されることが明らかとなっている。これらの事実は、微生物叢から産生される代謝産物が全身に影響力を持つ生理活性物質としても働き、アレルギー疾患や自己免疫疾患を抑制し全身の恒常性維持に貢献している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

微生物叢の代謝産物による ILC2 の機能制御機構を明らかにすることで、気管支喘息の新規発症予防法の基盤形成を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 短鎖脂肪酸による ILC2 活性制御機構

ヒト末梢血から単核球を分離し、MACS を使用して Lineage marker 陽性細胞を除去した後、Cell sorter を用いて ILC2 を分離した。分離したヒト ILC2 を IL-2 の存在下で 3-4 週間培養増殖させた後、実験に使用した。

ヒト ILC2 を IL-2 および IL-33 の存在下/非存在下で、異なる 3 種類の短鎖脂肪酸 (酪酸、プロピオン酸、酢酸) と共に培養し、培養上清中のサイトカイン、細胞数、表面分子の発現を評価した。培養上清中のサイトカインは ELISA 法で、表面分子の発現は Flow cytometer を用いて評価した。

(2) 短鎖脂肪酸による気管支喘息の発症予防効果の検討

妊娠期の母親マウスに、短鎖脂肪酸またはコントロール水を経口的に投与し、生まれて来た仔マウスに真菌抗原 (アルテルナリア) またはプロテアーゼ抗原 (パパイン) を吸入させ、アレルギー性気道炎症を誘導し、気道炎症の程度、ILC2 の活性を評価した。

気道炎症の評価には、下記の解析を用いた。

- 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数
- 肺の病理像解析
- 気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン測定
- 肺組織での遺伝子発現解析

4. 研究成果

(1) 短鎖脂肪酸による ILC2 活性制御機構

ヒト ILC2 を IL-2 および IL-33 の存在下で、異なる濃度の短鎖脂肪酸と共に培養し、培養後の細胞数を測定した。その結果、酪酸及びプロピオン酸の存在下で培養した際に、細胞数が有意に減少することが明らかとなった。一方で酢酸の存在下では、細胞数の減少は認めなかった。(図 1) これらの事実から、酪酸およびプロピオン酸がヒト ILC2 の増殖、生存を抑制する可能性が示唆された。

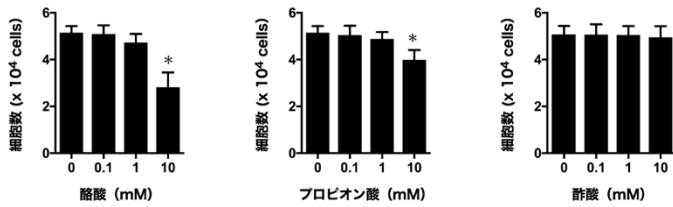


図 1：短鎖脂肪酸による ILC2 の細胞増殖への影響

また、同条件下での培養上清中の IL-13 を ELISA 法で測定した結果、酪酸及びプロピオン酸の存在下で培養した際に、IL-13 が有意に減少することが明らかとなった。一方で酢酸の存在下では、IL-13 の減少は認めなかった。(図 2) これらの事実から、酪酸およびプロピオン酸がヒト ILC2 の活性を抑制する可能性が示唆された。

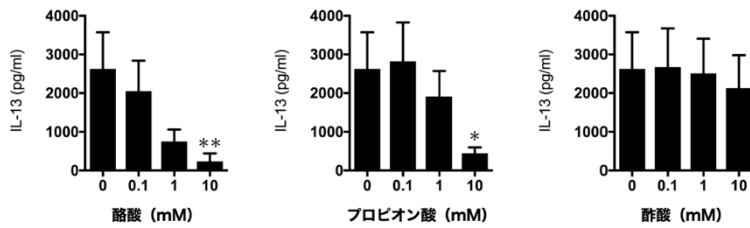


図 2：短鎖脂肪酸による ILC2 のサイトカイン産生への影響

更に、短鎖脂肪酸による ILC2 の表面分子の発現への影響を Flow cytometer を用いて検討した結果、酪酸及びプロピオン酸の存在下で培養した際に、ILC2 上の IL-2R α の発現が有意に減弱することが明らかとなった。一方で酢酸の存在下では、発現の減弱は認めなかった。(図 3) これらの事実から、酪酸およびプロピオン酸がヒト ILC2 の IL-2 R α の発現を減弱させることにより、増殖/生存の抑制に寄与している可能性が示唆された。

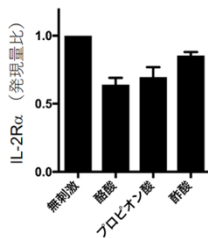


図 3：短鎖脂肪酸による ILC2 の表面分子の発現への影響

(2) 短鎖脂肪酸による気管支喘息の発症予防効果の検討

In vitro で短鎖脂肪酸が ILC2 の増殖/活性を抑制することが明らかになったため、In vivo での ILC2 の活性抑制効果及び気管支喘息発症予防効果の検討を行なった。抗原には、これまでの検討から ILC2 依存的に喘息様気道炎症を誘導するアルテルナリアを用いた。妊娠中の母親マウスに短鎖脂肪酸 (酪酸、プロピオン酸、酢酸) もしくはコントロール水を投与し、生まれてきた仔マウスに真菌 (アルテルナリア) を吸入し、喘息様気道炎症の程度を評価した。その結果、短鎖脂肪酸を投与した母親マウスから生まれた仔マウスと、コントロール水を投与した母親マウスから生まれた仔マウスでは、同程度の気道炎症が認められることが明らかとなった (図 4)。

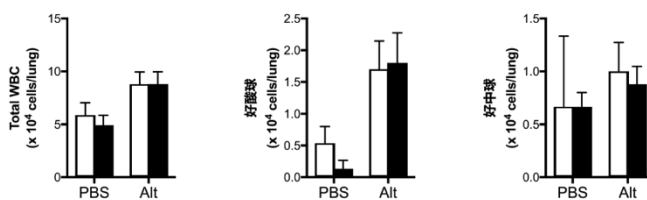


図 4：妊娠期の母親に対する短鎖脂肪酸の投与が、仔における喘息様気道症状に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugita K, Altunbulakli C, Morita H, Sugita A, Kubo T, Kimura R, Goto H, Yamamoto O, Ruckert B, Akdis M, Akdis CA.	4. 巻 74
2. 論文標題 Human type 2 innate lymphoid cells disrupt skin keratinocyte tight junction barrier by IL-13.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2534-2537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.13935.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Morita H, Kubo T, Ruckert B, Ravindran A, Soyka MB, Rinaldi AO, Sugita K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Motomura K, Tamari M, Orimo K, Okada N, Arae K, Saito K, Altunbulakli C, Castro-Giner F, Tan G, Neumann A, Sudo K, O'Mahony L, Honda K, Nakae S, Saito H, Mjosberg J, Nilsson G, Matsumoto K, Akdis M, Akdis CA.	4. 巻 143
2. 論文標題 Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 2190-2201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.12.1018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Li S, Morita H, Sokolowska M, Tan G, Boonpiyathad T, Opitz L, Orimo K, Archer SK, Jansen K, Tang MLK, Purcell D, Plebanski M, Akdis CA.	4. 巻 143
2. 論文標題 Gene expression signatures of circulating human type 1, 2 and 3 innate lymphoid cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 2321-2325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2019.01.047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Orimo K, Saito H, Matsumoto K, Morita H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Innate lymphoid cells in the airways: Their functions and regulators.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy Asthma Immunol Res.	6. 最初と最後の頁 381-398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4168/aair.2020.12.3.381.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 4)Hiraishi Y, Nambu A, Yamaguchi S, Shimura E, Takamori A, Narushima S, Nakanishi W, Asada Y, Yoshizaki T, Numata T, Suzukawa M, Yamauchi Y, Matsuda A, Arae K, Morita H, Hoshino T, Suto H, Okumura K, Matsumoto K, Saito H, Sudo K, Iikura M, Nagase T, Nakae S	4. 巻 8
2. 論文標題 IL-33, IL-25 and TSLP contribute to development of fungal-associated protease-induced innate-type airway inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30259-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 6)Arae K, Morita H, Unno H, Motomura K, Toyama S, Okada N, Ohno T, Tamari M, Orimo K, Mishima Y, Suto H, Okumura K, Sudo K, Miyazawa H, Taguchi H, Saito H, Matsumoto K, Nakae S	4. 巻 8
2. 論文標題 Chitin promotes antigen-specific Th2 cell-mediated murine asthma through induction of IL-33-mediated IL-1 production by DCs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30259-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Morita H, Matsumoto K
2. 発表標題 Role of innate immunity in the development of allergic diseases
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1)Morita H, Matsumoto K
2. 発表標題 Role of innate immunity in the development of allergic diseases
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morita H, Kubo T, Nakae S, Saito H, Matsumoto K, Akdis M, Akdis CA
2. 発表標題 Retinoic acid converts human group 2 innate lymphoid cells to a regulatory phenotype
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morita H
2. 発表標題 Innate immunity in allergic inflammation.
3. 学会等名 The 14th Research Symposium on Human Natural Defense System (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morita H
2. 発表標題 Retinoic acid controls lung homeostasis by converting group 2 innate lymphoid cells to a regulatory phenotype
3. 学会等名 32nd Symposium of the Collegium Internationale Allergologia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田英明
2. 発表標題 好酸球性気道炎症の病態形成におけるILC2の役割
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----