

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：31302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11468

研究課題名(和文) 運動による自然リンパ球を介したアレルギー予防効果の検討

研究課題名(英文) Study of allergy prevention effect mediated by innate lymphoid cells using exercise

研究代表者

坂本 譲 (SAKAMOTO, Yuzuru)

東北学院大学・教養学部・教授

研究者番号：30316434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は運動によるアレルギー予防効果について検討するため、アレルギーや炎症応答に關与する自然リンパ球(innate lymphoid cells; ILC)に注目し、運動がILCに及ぼす影響と運動によるILCを介したアレルギーの制御について検討することを目的とした。その結果、長期自発運動により特定のILCサブセットに差異が生じること、およびアレルギーモデルマウスで運動量に差異が生じることが示された。よって、運動が免疫細胞や免疫制御受容体を介してアレルギー応答に關与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ILCは獲得免疫の司令塔として働くTh細胞の自然免疫における相同細胞と考えられ、皮膚や消化管での生体防御の役割だけでなく、代謝調節や組織修復、腸内細菌との相互作用など生体恒常性の維持にも關与する興味深い細胞である。運動とアレルギーの予防効果については、疫学的な見地から定期的な運動がアレルギーの発症を抑制することが示されているものの、運動がアレルギーに關与する免疫細胞やその制御に対して直接的な影響を及ぼした証拠はこれまでに得られていない。本研究成果は、運動によるILCの制御とアレルギー予防効果について新規の情報をもたらし、さらに進展することで運動による健康増進に寄与するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on innate lymphoid cells (ILC) involved in allergies and inflammatory responses to investigate the preventive effect of exercise on allergies. The purpose of this study was to investigate the effect of exercise on the functional regulation of ILC and the ILC-mediated control of allergies by exercise. As a result, it was shown that long-term spontaneous exercise causes a difference in a specific ILC subset, and that the amount of exercise differs in the allergy model mice. Therefore, it was suggested that exercise may be involved in the allergic response via immune cells and immunoregulatory receptors.

研究分野：スポーツ免疫学

キーワード：自発走運動 アレルギー 自然リンパ球 Th2免疫応答 免疫制御受容体

1. 研究開始当初の背景

運動が高齢者の健康増進や quality of life (QOL)の向上に寄与する一方で、QOL を著しく低下させる肺炎等の感染症やアレルギー、自己免疫などの慢性炎症性疾患は免疫機能の劣化や制御異常が一因である。高齢化社会を迎え、現在進められている第4次国民健康づくり対策「健康日本21(第2次)」において健康寿命の延伸を具体的目標の1つとするわが国では、これら疾病の予防や免疫劣化の予防手段に関する研究成果が期待されている。

運動による免疫機能の制御については、運動時に分泌されるサイトカインやマイオカイン、ホルモンや神経伝達物質などの生理活性因子群、さらにそれら液性因子により影響を受けた免疫担当細胞間の相互作用によって統合的に制御されていると考えられる。実際に、運動による液性因子の分泌や免疫細胞の分化増殖、細胞局在の変化について多くの知見が報告されている。しかしその分子機序について、特に個々の免疫細胞が運動による生体内の変化や液性因子の影響をどのように認識し、そして細胞機能をどのように変化させるのかについての情報は未だ乏しい。

アレルギー応答は、これまで獲得免疫のT細胞とそれに伴う炎症性細胞やサイトカインが重要な役割を果たすと考えられてきた。しかし近年、腸管や気道などの粘膜表面や皮膚など外界との境界面である生体バリアから侵入を試みる病原微生物や花粉など外因性抗原の一部(PAMP)や微生物の侵入や組織損傷を感知し上皮系細胞から分泌される内因性抗原(alarmin)が、生体のバリア機能を構成する上皮系細胞や自然免疫細胞に発現するToll様受容体(TLR)などのパターン認識受容体(PRR)を介して認識され、それぞれのPRRに特徴的なサイトカイン産生が起点となってアレルギー応答が発動するという自然免疫の関与する新たな制御機構への理解が進んでいる。また、最近になりこの上皮系組織のバリア機能において自然免疫の誘導に關与する新規リンパ系細胞である自然リンパ球(innate lymphoid cell; ILC)が発見され、精力的な解析が行われている。

このILCはリンパ球様の形態をとるがT細胞受容体のような抗原受容体を発現しないT細胞やB細胞とは異なる新しい細胞集団である。その機能は、感染や損傷組織からのシグナルに迅速に反応し、大量のサイトカイン産生を介して自然免疫応答を誘導し感染防御、炎症反応に重要な役割を担うだけでなく、代謝調節や組織修復、また神経系との関連や腸管では腸内細菌との相互作用など生体恒常性にも深く関与することが報告されている。またILCは、これまでに少なくとも3つのサブセットが見いだされており、Th1と同様に転写因子T-betを発現しIFN- γ を産生するグループ1 ILC(ILC1)、Th2と同様に転写因子GATA3を発現しIL-5やIL-13を産生するグループ2 ILC(ILC2)、Th17と同様に転写因子ROR γ tを発現しIL-17やIL-22を産生するグループ3 ILC(ILC3)に分類される。また、ILCは組織常在性も特徴の1つであり、その分布は上皮系組織など全身の生体バリア機能を担う末梢組織のみならず肝臓や脂肪組織、骨格筋など恒常的に炎症の起こりやすい組織にも常在している。

運動とアレルギーの予防効果については、疫学的な見地から定期的な運動がアレルギーの発症を抑制することが示されているものの、これまで運動がアレルギーに關与するエフェクター細胞やその制御に対して直接的な影響を及ぼした証拠は得られていない。そこでアレルギー応答への運動の影響についての予備実験を行い、運動によりalarmin分子の血中濃度変化、ILCの生存や分化に關与するサイトカインの血中濃度変化、Th2免疫応答に影響を及ぼす好塩基球の細胞数の変化が骨髄と脾臓では異なることが観察された。これらの結果は運動がILCに影響を及ぼす可能性を強く示唆するものであり、また細胞の局在部位における分化や細胞活性化の状態の差異により受ける影響が異なることを示している。

これら予備実験の結果から、運動がILCの機能に影響を及ぼすことが強く予想され、ILCのサブセットや局在部位の違いによってアレルギーの発症に対しても影響を及ぼす可能性が示唆される。さらに最近、ILC2はBsとIL-4の産生を介して協働し、アレルギーに關与するTh2免疫応答を制御することが報告された一方で、運動がILCやTh2免疫応答に対してどのような影響を及ぼすのかについてはこれまでのところ不明である。そこで本研究は運動によるアレルギーを予防について検討するため、運動によるILCを介した自然免疫の制御の観点から検討を進めた。

2. 研究の目的

本研究は運動によるアレルギー予防効果について検討するため、自然免疫に属しアレルギーや炎症応答に關与するILCに注目し、運動によるILCの分化や増殖、またサイトカイン産生などの機能制御とその分子基盤を明らかにすること、さらに運動によるILCを介したアレルギーの制御について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、運動によるアレルギー予防効果について運動による ILC の分化や機能の制御の検討するために、まず長期継続的な運動が ILCs (ILC1、ILC2、ILC3) に及ぼす影響の探索を行う計画を立てた。実験動物に長期継続的な運動を行わせるための運動負荷に関する予備検討として、対象動物である C57BL/6J 野生型 (B6.WT), Th2 免疫偏向モデルマウス (*Pirb*^{-/-}; PIR) および免疫不全モデルマウス (*Fcer1g*^{-/-}; FcRγ) に対してマウス用回転ケージ (LCW-M4、メルクエスト) を用いた自発走運動を実施し、その際の運動量と体重変化についての経時的観察を行い評価した。次に、8 週間の長期継続的な自発走運動を負荷後に血液ならびに脾臓、骨髄、腸管組織を採取し、また、それぞれの組織に局在する細胞を分離回収し、ILC 等の免疫細胞の細胞数や分化増殖、サイトカイン産生をフローサイトメトリー解析、ELISA 及び遺伝子発現解析を行い評価する計画とした。

4. 研究成果

(1) まず自発走運動に関する予備検討を元に自発走運動の実施期間を 8 週間と設定した。そして C57BL/6Njcl 野生型 (B6.WT) および Th2 免疫偏向モデルマウス (PIR), 免疫応答不全モデルマウス (FcRγ) に対し回転ケージ (メルクエスト) を用いた 8 週間の自発走運動を負荷し、実験動物への運動の影響を体重と運動量により検討した。

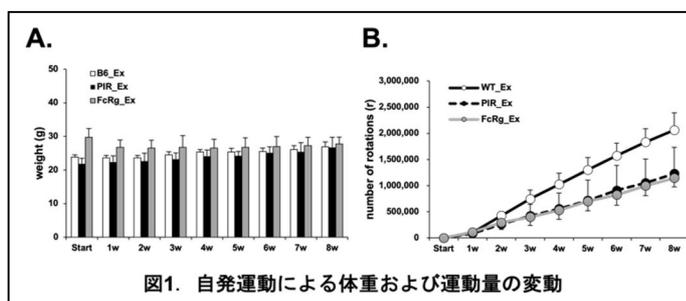


図1. 自発運動による体重および運動量の変動

その結果、運動開始時と比較して運動期間終了後に B6.WT, PIR, FcRγそれぞれ週齢に応じて体重は増加したものの、3 者間の体重に大きな変化はなかった (図 1A)。一方、期間中の自発運動量に関しては B6.WT と比較し PIR および FcRγで運動開始 2 週目以降に自発運動量の明らかな低下を確認した (図 1B)。

この原因の 1 つとして骨格筋などの運動器の異常が推測されるものの、これまでに骨格筋の損傷修復・再生機構について検討した我々の先行研究結果からは B6.WT と比較して FcRγでは損傷筋の再生に若干の遅延が観察されているものの、PIR での比較では顕著な差異は観察されなかった。よって、自発走運動により現在のところ原因は不明ではあるが、PIR および FcRγにおいて生体内で身体活動や運動に影響を及ぼす何らかの免疫機能変化が生じている可能性が示される。

(2) 次に運動が ILC サブセット (ILC1、ILC2、ILC3) に及ぼす影響の探索として、免疫細胞の変動に焦点を当てて検討するため、自発運動後の脾臓、骨髄、腸管組織中の免疫細胞について検討した。その結果、B6.WT と比較して PIR および FcRγの骨髄中 ILC サブセットに差異が観察され、特に ILC2 (CD45⁺ Lin⁻ NKp46⁻ CD127⁻ KLRG1⁺)、cNK (CD45⁺ Lin⁻ NKp46⁺ NK1.1⁺ CD127⁻)、NKp46⁺ ILC3 (CD45⁺ Lin⁻ NKp46⁺ NK1.1⁻ CD127⁺)、CD4⁺ IL3 (CD45⁺ Lin⁻ NKp46⁻ CD127⁺ KLRG1⁻ CD4⁺) で顕著な変化が認められた (図 2)。

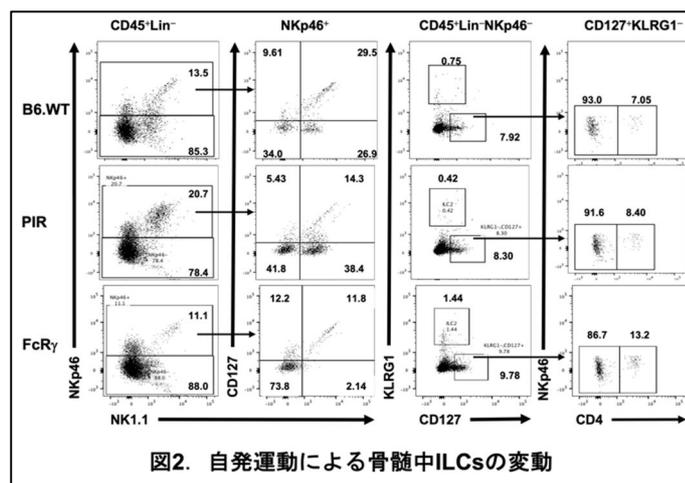


図2. 自発運動による骨髄中ILCsの変動

(3) さらに運動による影響を検討するため自発運動実施前後の ILC サブセットの変動について検討した。その結果、骨髄中の ILC1 ($CD45^+ Lin^- NKp46^+ NK1.1^- CD127^+$) では B6.WT および FcR γ で運動後の細胞割合が有意に低下したものの PIR では運動前後で変化がなかった。また ILC2 では、B6.WT、PIR、FcR γ いずれも運動による変化は観察されず、cNK では B6.WT、PIR、FcR γ いずれも運動後に有意な低下が観察された。ILC3 については NKp46 $^+$ ILC3 では B6.WT のみ運動後に有意な低下が観察されたが、一方で NKp46 $^-$ ILC3 では特に CD4 $^+$ IL3 で B6.WT では運動後の有意な減少を示したのに対し、PIR および FcR γ では運動後に有意な増加を示した。(図3)

これらの結果は運動が骨髄中のリンパ球の発生に影響を及ぼす他者の報告を支持するものであり、また我々の長期運動による骨髄好塩基球の割合の変化を示す結果とも関連性を示すものである。さらに運動による ILC への影響がアレルギー制御に關与する免疫制御受容体および活性化モチーフ ITAM や抑制性モチーフ ITIM を介した何らかの制御により行われていることを示唆するものである。現在、予定より進捗が遅れているものの 8 週間の自発走運動期間後に WT、PIR 及び FcR γ マウスより採取した種々のサンプル収集とそれらサンプルをもとにサイトカインやフローサイトメトリー解析を進めており、運動が ILC に及ぼす影響、他の免疫細胞との相互作用および運動によるアレルギー予防の可能性についての検討をさらに進める予定である。本研究が順調に進めば、運動による免疫制御に關して、外部刺激(運動)と内部環境(免疫機能)をリンクさせる接点としての ILC の役割や ILC を介した自然免疫制御の分子基盤が明らかになることが期待され、その延長線上に運動によるアレルギー予防効果や健康増進効果への寄与が期待される。

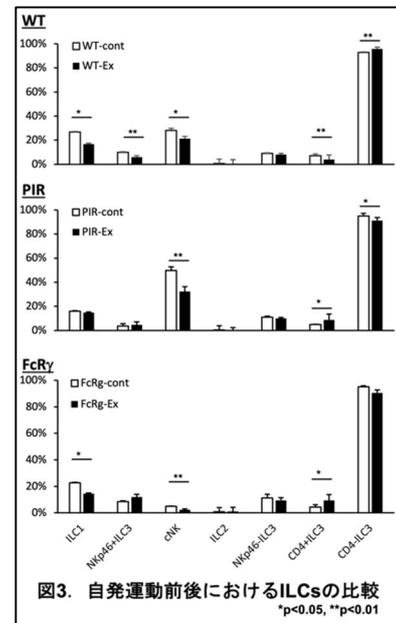


図3. 自発運動前後におけるILCsの比較
*p<0.05, **p<0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 So Itoi, Naoyuki Takahashi, Haruka Saito, Yusuke Miyata, Mei-Tzu Su, Dai Kezuka, Fumika Itagaki, Shota Endo, Hiroshi Fujii, Hideo Harigae, Yuzuru Sakamoto, Toshiyuki Takai.	4. 巻 -
2. 論文標題 Myeloid immune checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B can co-tether fibronectin with integrin on macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac023	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuzuru Sakamoto
2. 発表標題 Effect of long-term treadmill exercise on basophil mediated Th2 immunoregulation in mice.
3. 学会等名 25th European College of Sport Science Congress (Sevilla ESP (virtual congress)) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Itoi S, Endo S, Su MT, Sakamoto Y, Takai T.
2. 発表標題 Immune checkpoint gp49B tethers fibronectin with integrins on macrophage cell surface.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会（奈良）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Itoi S, Takahashi N, Saito H, Miyata Y, Su MT, Endo S, Fujii H, Harigae H, Sakamoto Y, Takai T.
2. 発表標題 Myeloid immune checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B tether fibronectin with integrin on macrophages.
3. 学会等名 第157回東北大学加齢医学研究所集談会（仙台）
4. 発表年 2022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
研究協力者	遠藤 章太 (ENDO Shota)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------