

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21522

研究課題名（和文）BALB/cマウスにおけるTh2免疫応答の選択的誘導機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms in the strain specific Th2 response in BALB/c mice

研究代表者

渡会 浩志（Watarai, Hiroshi）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70415339

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近交系マウスの代表であるC57BL/6（B6）とBALB/cでは後者がTh2応答優位であることが知られているが、その理由の詳細は不明な点が多い。BALB/cではT細胞亜群であるiNKT細胞のうちiNKT2が顕著に多いことから、両背景のIL-17RB欠損マウスを樹立し、その分化発生様式の相違を解析した。末梢においてB6背景のIL-17RB欠損マウスでは末梢・胸腺においてiNKT2細胞が著しく減少するのに対して、BALB/c背景の末梢ではその数に大きな相違はなかった。BALB/c背景の胸腺ではIL-17RB欠損マウスで著しいRORγt陽性のiNKT細胞の増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BALB/cマウスにはB6マウスに存在しないiNKT2サブセットが存在し、iNKT2サブセットはIL-17RB非依存的に分化発生し得ることを明らかとした。iNKT2細胞は（特に小児期に）様々なアレルギー炎症に関与していることが知られるため、その機能や分化発生経路の一端を明らかにできたことは学術的に意義深い。また遺伝的背景の相違によって異なるiNKT2細胞が分化発生するという結果は、標的となる細胞に個人差があるという裏付けとなるため、様々なアレルギー治療やその制御戦略上重要であり、その社会的要請や意義も高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is well known that BALB/c mice have a dominant Th2 response compared to C57BL/6 mice, but the details of this phenomenon are largely unknown. Since iNKT2 subsets are significantly abundant in iNKT cells in BALB/c mice, we established IL-17RB-deficient mice from both backgrounds and analyzed the differences in their developmental pathways. IL-17RB-deficient mice with a B6 background showed a marked decrease in iNKT2 cells in both periphery and thymus, suggesting that IL-25/IL-17RB axis is essential for development and maintenance. Interestingly however there was no significant difference in the number of iNKT2 cells in the periphery of BALB/c background. In the thymus of BALB/c background, a significant increase of iNKT cells was observed in IL-17RB-deficient mice. The increased population was distinct from iNKT1/2/17 subsets and phenotypically ROR γ t+ PLZFint T-bet- CD24+ CD44int CD69-, a precursor iNKT2-like cells are appeared.

研究分野：免疫学

キーワード：iNKT細胞 Th2 アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいてアレルギー体質の有無は、遺伝的素因と環境因子による複数の要因によって決定されるとされる。遺伝的素因については例えばマウスの系統間の相違を明らかにする手法が取られてきており、ヒト GWAS 解析と併せて議論され明らかにされてきた。しかしながら代表的な近交系マウスである B6 と BALB/c の間でも、BALB/c で Th2 優位となる明確な説明は未だなされていない。

本研究においては、Th2 免疫応答の中心を司る細胞の一つ iNKT2 細胞に着目した。それは定常状態においても BALB/c マウスでは B6 マウスに比べ iNKT2 細胞が顕著に多いためである。BALB/c マウスにおける B6 とは異なる iNKT2 細胞の分化発生様式を明らかにすることができれば、社会的要請の高いアレルギー疾患制御にもつながり得ると考えられた。

2. 研究の目的

iNKT2 細胞は受容体 IL-17RB を発現し、IL-25 に応答して IL-4、IL-9、IL-13 などのサイトカインを産生し、Th2 免疫反応を惹起する中心的な T 細胞亜群である。しかしながら Th2 細胞やマスト細胞、好塩基球などと異なり、何故 BALB/c マウスに iNKT2 細胞が豊富に存在するのかは明らかではなかったため、これを明らかにすることを第一義の目的とした。これを出発点として遺伝的背景や分子多型による BALB/c の Th2 優位現象の一端を明らかにするアプローチを取る。

3. 研究の方法

iNKT2 細胞のマーカーである IL-17RB の欠損マウスを ES 細胞相同組み換え法により C57BL/6 背景のマウスを樹立し、バッククロスにより BALB/c 背景の欠損マウスも併せて樹立した。野生型マウスと併せた 4 系統のマウスを用いて、主に脾臓と胸腺の iNKT 細胞の表現型と機能解析を行った。iNKT 細胞 (γ -GalCer/CD1d dimer⁺ TCR⁺) はエフェクターメモリー様の細胞 (CD44⁺ CD62L⁻) として iNKT1/2/17 のサブセットが存在し、それぞれ転写因子や細胞表面抗原の発現の相違を指標に細胞の解析や機能解析を行った。

研究を進める過程で両系統の iNKT2 細胞の差異に起因するのは CD1d 分子の相違に起因する可能性が明らかとなったため、新しいツール (遺伝子改変マウス、モノクローナル抗体、組換え体など) の創出を手掛けた。

4. 研究成果

B6 背景においては、脾臓・胸腺ともに iNKT2 細胞 ($T\text{-bet}^{\text{hi}}$ PLZF^{int} ROR γ ^t CD24⁻ CD44^{int} CD69⁻ CD122⁻) は著しい減少を認めしたが、iNKT1 細胞 ($T\text{-bet}^{\text{hi}}$ PLZF^{int} ROR γ ^t CD24⁻ CD44^{hi} CD69⁺ CD122⁺) と iNKT17 細胞 ($T\text{-bet}^{\text{hi}}$ PLZF^{int} ROR γ ^t CD24⁻ CD44^{int} CD69⁻ CD122⁻) には数や表現型に変化は認められなかった。このことから C57BL/6 背景の iNKT2 細胞は IL-25 要求性で分化増殖や機能維持が行われているものと考えられた。

一方、BALB/c 背景においては、脾臓の iNKT1、iNKT17 細胞のみならず、iNKT2 細胞にも数や表現型には大きな相違は認められなかった。さらに胸腺においては、CD1d 拘束性の細胞が 5 倍程度に増えており、B6 とは明らかに異なるプロファイルを示した。IL-17RB 欠損マウスでは iNKT1/2/17 細胞の数と表現型は野生型 BALB/c マウスと比べて大きな差が認められなかったが、iNKT2 や iNKT17 とは異なる表現型の細胞 ($T\text{-bet}^{\text{hi}}$ PLZF^{int} ROR γ ^t CD24⁻ CD44^{int} CD69⁻ CD122⁻) の大量の出現を認めた。この結果は BALB/c マウスでは B6 マウスには存在しない IL-17RB 依存的な iNKT 細胞の分化発生経路があることを強く示唆するものである。

しかしながら胸腺の IL-25 や iNKT2 細胞の IL-17RB の発現レベルは両系統において大きな差異は存在しないため、別の因子の作用が推測された。最も可能性の高い内因性因子として両系統の CD1d の相違を予想した。iNKT 細胞の分化発生は CD1d による抗原提示が必須であることが知られるが、BALB/c には CD1d1 と CD1d2 の 2 つが存在するのに対して、B6 では CD1d1 のみ存在する (CD1d2 は one nucleotide delete pseudogene)。市販の抗 CD1d モノクローナル抗体 (1B1) について強制発現株による評価を行ったところ、これまでの報告とは異なり、CD1d1 に対する反応性はあるものの CD1d2 に対する反応性は有していないことが明らかとなった。また、胸腺 DP 細胞と脾臓樹状細胞における両系統の CD1d 分子の発現を qPCR 法と PCR-RFLP 法によって調べたところ、BALB/c においては B6 の約 1.6 倍の CD1d が発現し、BALB/c の CD1d1 と CD1d2 の存在比は胸腺 DP 細胞では 1:1、脾臓樹状細胞では 4:1 であった。また、既存の抗原提示分子 γ -GalCer C26:0 は CD1d1 に提示され iNKT 細胞のサイトカイン産生を促すことが知られるが、CD1d2 には提示されないことも明らかとなった。

現在、CD1d1 欠損 CD1d2 発現マウスの樹立を終え、抗 CD1d2 モノクローナル抗体の樹立、CD1d2 リガンドとテトラマーの創製に着手しており、CD1d 選択の相違による iNKT サブセットの分化

発生の相違の詳細を明らかにするための研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cui G, Shimba A, Jin J, Ogawa T, Muramoto Y, Miyachi H, Abe S, Asahi T, Tani-ichi S, Dijkstra JM., Iwamoto Y, Kryukov K, Zhu Y, Takami D, Hara T, Kitano S, Xu Y, Morita H, Zhang M, Zreka L, Miyata K, Kanaya T, Okumura S, Ito T, Hatano E, Takahashi Y, Watarai H, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 A circulating subset of iNKT cells mediates antitumor and antiviral immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eabj8760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.abj8760	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 Kasetthat Thitinan, Kamuthachad Ludthawun, Sermswan Rasana W., Watarai Hiroshi, Matangkasombut Ponpan, Wongratanacheewin Surasakdi	4. 巻 90
2. 論文標題 Early Activation of iNKT Cells Increased Survival Time of BALB/c Mice in a Murine Model of Melioidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e0026822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00268-22	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 Kashiwakura Jun-ichi, Saitoh Kodai, Ihara Takeru, Sasaki Yuto, Kagohashi Kota, Enohara Shiyo, Morioka Yuka, Watarai Hiroshi, Muromoto Ryuta, Kitai Yuichi, Iwabuchi Kazuya, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 16
2. 論文標題 Correction: Expression of signal-transducing adaptor protein-1 attenuates experimental autoimmune hepatitis via down-regulating activation and homeostasis of invariant natural killer T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0250536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0250536	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 Sugawara Kenji, Watarai Hiroshi, Ise Yuji, Yokose Hisayoshi, Morii Yasuhiro, Yamawaki Nobuhiro, Okada Shigeru, Matsunaga Shigeki	4. 巻 19
2. 論文標題 Structure Elucidation of Calyxoside B, a Bipolar Sphingolipid from a Marine Sponge Cladocroce sp. through the Use of Beckmann Rearrangement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 287 ~ 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md19060287	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 Kamuthachad L, Pisuttimarn P, Kasetthat T, Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Sermswan RW, Watarai H, Matangkasombut P, Wongratanacheewin S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Invariant Natural Killer T (iNKT) cells response in human melioidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12932/AP-290821-1217	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 Omori-Miyake Miyuki, Watarai Hiroshi, Sato Kayoko, Ziegler Steven F., Yagi Junji	4. 巻 353
2. 論文標題 An accumulation of two populations of dendritic cells in skin-draining lymph nodes in response to the expression of thymic stromal lymphopoietin in the skin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104116 ~ 104116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2020.104116	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 Isozaki A, Nakagawa Y, Loo MH, Shibata Y, Tanaka N, Setyaningrum DL, Park J-W, Shirasaki Y, Mikami H, Huang D, Tsoi H, Riche CT, Ota T, Miwa H, Kanda Y, Ito T, Yamada K, Iwata O, Suzuki K, Ohnuki S, Ohya Y, Kato Y, Hasunuma T, Matsusaka S, Yamagishi M, Yazawa M, Uemura S, Nagasawa K, Watarai H, Di Carlo D, Goda K	4. 巻 6
2. 論文標題 Sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput sorting of large-volume biological compartments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaba6712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba6712	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 Nitta N, et al	4. 巻 11
2. 論文標題 Raman image-activated cell sorting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17285-3	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 Kashiwakura Jun-ichi, Saitoh Kodai, Ihara Takeru, Sasaki Yuto, Kagohashi Kota, Enohara Shiyo, Morioka Yuka, Watarai Hiroshi, Muromoto Ryuta, Kitai Yuichi, Iwabuchi Kazuya, Oritani Kenji, Matsuda Tadashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression of signal-transducing adaptor protein-1 attenuates experimental autoimmune hepatitis via down-regulating activation and homeostasis of invariant natural killer T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0241440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241440	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 該当する

1. 著者名 Nishio Kumiko, Pasquet Lise, Camara Kaddy, DiSapio Julia, Hsu Kevin S., Kato Shingo, Bloom Anja, Richardson Stewart K., Welsh Joshua A., Jiang Tianbo, Jones Jennifer C., Cardelli Susanna, Watarai Hiroshi, Terabe Masaki, Oikhanud Purevdorj B., Howell Amy R., Berzofsky Jay A.	4. 巻 134
2. 論文標題 Lysosomal processing of sulfatide analogs alters target NKT cell specificity and immune responses in cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 34(4):e165281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI165281	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 該当する

1. 著者名 Kanamori Takashi, Nakabun Daisuke, Kojo Satoshi, Watarai Hiroshi, Yuasa Hideya	4. 巻 451
2. 論文標題 Photoswitching CD1d-restriction of TCR by -GalCer analogs with azobenzene in the middle of acyl chain	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 115501 ~ 115501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotochem.2024.115501	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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------