

令和 6 年 10 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：20KK0360

研究課題名（和文）自然リンパ球を制御する細菌叢と活性化・抑制をコントロールするPD-1の役割解明

研究課題名（英文）Study of PD-1 in controlling the bacteria that regulate innate lymphoid cells and their activation and suppression

研究代表者

佐藤 尚子（高山尚子）（SatoH-Takayama, Naoko）

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・専任研究員

研究者番号：90732446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間：0.5ヶ月

研究成果の概要（和文）：腹膜炎は主に敗血症の引き金となることが知られている。脂肪組織が免疫臓器の一部として重要であるが、腹膜炎の制御における脂肪組織自然リンパ球（ILC）の関与はまだ十分に理解されていない。我々は、腸間膜脂肪組織（MAT）におけるILC1の免疫学的機能を明らかにした。急性腹膜炎の間、低レベルのIFN-g産生を示すMAT-ILC1において、IL-7Raとしても知られるCD127のアップレギュレーションを観察した。さらにMAT-CD127+ ILC1がPD-1/PD-L1経路を介してIL-17産生gdT細胞を直接制御すること、それにより盲腸結紮穿孔（CLP）誘発炎症を効果的に制御することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜炎は腸管穿孔による腹腔内への腸内細菌の漏出が一因となり、急性で全身性の強い炎症が惹起される病態である。腹膜炎は敗血症へ病態移行し最終的には多臓器機能不全により死亡する。よって腹膜炎から敗血症への移行を妨げるためには新たな視点から腹膜炎発症時の炎症動態を解明することが必要である。脂肪組織には多数の免疫細胞が存在し、免疫器官としても機能することが近年明らかとなってきた。これは腸管穿孔時には脂肪組織が免疫器官としても機能し腹膜炎の炎症制御に関与しているが、腹膜炎発症時における脂肪組織の免疫学的な役割は不明である。そこで本研究は腹膜炎発症時における脂肪組織の免疫細胞の動態について研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Peritonitis is an inflammation of the peritoneum mainly caused by gut perforation-associated bacterial leaking known to be a sepsis trigger. Although the importance of adipose tissue has been well recognized as a part of immune organs, the involvement of adipose tissue innate lymphoid cells (ILCs) in regulating peritonitis remains poorly understood. Here, we show the immunological function of group 1 ILCs (ILC1) in the mesenteric adipose tissue (MAT) that potentially affects the early phase of peritonitis. We observed an upregulation of CD127, also known as IL-7Ra on MAT-ILC1s which exhibited a low level of IFN-g production during acute peritonitis. We further demonstrated that MAT-CD127+ ILC1 directly regulates IL-17-producing gdT cells through the PD-1/PD-L1 pathway, thereby effectively controlling cecal ligation and puncture (CLP)-induced inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：敗血症 腹膜炎 PD-1 自然リンパ球

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球 (Innate lymphoid cells: ILCs) は、細胞の分化と機能により 1～3 型の大きく 3 つに分類され (NK 細胞などを加えた場合は 5 つ)、抗原受容体を発現していないことから自然免疫に分類される免疫細胞である。2008 年に初めて核内転写因子 ROR γ t により制御される ILC (現在は 3 型自然リンパ球: ILC3 と命名) が同定されたが、この 3 つの ILCs は全て疾患誘導や制御に関与するユニークな機能を持ち、また ILCs が神経受容体や代謝物受容体など、多くの受容体を発現することから、今後の免疫応答を理解する上で鍵となる免疫細胞であると言える。その為、発見今なお世界的に競争が熾烈であるが、日本が ILCs 研究で世界を牽引しているとは言い難い。そこで当初の本研究開発では、多くの遺伝子改変マウスを所持しているフランス・パスツール研究所の Dr. James Di Santo との共同研究を実施することで遺伝子改変マウス作製にかかる時間を短縮し、ILCs の疾患誘導に関わる機能の解析について研究の促進を図ることを目的とした。最終的にはインパクトのある研究に繋げて、日本発の ILC を牽引する研究報告を短い期間で報告することを目指していた。しかしながら、本研究開発が採択された 2020 年初頭からの世界的な COVID19 のパンデミックにより、申請者が所属する研究機関においても海外渡航禁止令が発令され、国外での研究活動が実質不可能になった。そこで、渡航が可能になるまで共同研究先のパスツール研究所では解析が必要になる遺伝子変異マウスのコロニー拡大と必要な遺伝子欠損されたマウスを得るための掛け合わせを依頼し、渡航が可能になった 2022 年の夏以降にフランス・パスツール研究所にてマウスの解析を実施した。

2. 研究の目的

腹膜炎は腸管穿孔による腹腔内への腸内細菌の漏出が一因となり、急性で全身性の強い炎症が惹起される病態である (Ross et al., 2018)。腹膜炎は敗血症へ病態移行し、最終的には多臓器機能不全により死亡することがあるにも関わらず治療は未だ対症療法に限られており、実際に現在でも敗血症患者の死亡率は 19.7% と高いままである (Rudd et al., 2020)。したがって、腹膜炎から敗血症への移行を妨げるためには新たな視点から腹膜炎発症時の炎症動態を解明することが必要である。エネルギー貯蔵器官として知られてきた脂肪組織には多数の免疫細胞が存在し、免疫器官としても機能することが近年明らかとなってきた。このことは、腸管穿孔時には脂肪組織が免疫器官としても機能し腹膜炎の炎症制御に関与している可能性が考えられるが、腹膜炎発症時における脂肪組織の免疫学的な役割は不明である。そこで本研究は、腹膜炎を発症した患者の早期治療に繋げるための基礎研究として、腹膜炎発症時における脂肪組織の免疫細胞の動態について研究を行った。

自然リンパ球 (Innate lymphoid cells; ILCs) は 2008 年に発見された自然免疫系で働くリンパ球であり (Satoh-Takayama N., 2008)、脂肪組織にも存在することが知られている (O'Sullivan et al., 2016)。ILCs は ILC1～ILC3 の 3 つのサブセットで構成され、それぞれ異なる核内転写因子による分化制御を受け特異的なサイトカインを産生する。その中でも ILC1 は T-bet 依存的に分化し、細胞内感染に対し Interferon-gamma (IFN-g) を産生することで免疫応答に関与するが、NK 細胞とは異なり核内転写因子である EOMES の影響を受けない。また ILCs は多岐にわたる機能を有しており、様々な疾患への関与も明らかになってきた。しかし、ILCs が腹膜炎発症時の免疫応答に関与するかは未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、腹膜炎モデルマウス (Cecal ligation and puncture: CLP) を用い、腸管穿孔時における脂肪組織の免疫学的役割について解析を行った。

3. 研究の方法

C57BL/6N 系統の野生型マウスは日本クレア社より購入し、ILC1 特異的 KO マウスは Dr. James Di Santo の協力を得て $NCR1^{Cre/GFP}$ マウスと $Tbx21^{fllox}$ マウスを交配することで作製した。また、腹膜炎は、マウス盲腸を結紮し注射針で穿孔することにより作製し (CLP)、開腹のみ行ったマウスをコントロールとして使用した (Sham)。イソフルラン吸引下で図 1A~D の通りに CLP 処置を施した。コントロール群として、開腹手術のみを行ったマウス (Sham) を作成した。

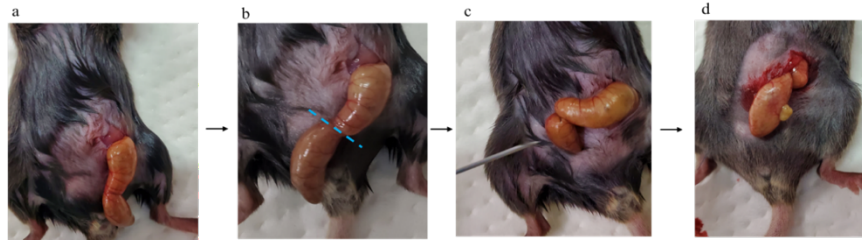


図 1. CLP 処置の図説。(A)腹部左側を解剖バサミで開腹し、盲腸を露出させた。(B)盲腸を 3 等分したときの盲腸先端側 (青色波線部)を滅菌済ナイロン縫合糸(5号、夏目製作所)で結紮した。(C)結紮した箇所の盲腸先端部を 21G 注射針で一か所穿孔した。(D)ピンセットで貫通させた箇所の周囲を圧迫し内容物を漏出させた。

4. 研究成果

CLP マウスの病態を調べるため、CLP 6 または 24 時間経過時点における直腸温を測定したところ、6 時間後に低下したが処置後 24 時間には Sham に近い値まで回復した (図 2: A, B)。またこの時、血中および脂肪組織において炎症性サイトカインである IL-6 が CLP 6 時間後に増加したが、24 時間後には低下していた (図 2C)。以上の結果から、この CLP マウスは処置後 6 時間までに急性腹膜炎を呈し、24 時間までに回復することが明らかになった。次に、CLP 6 時間後と 24 時間後の腸間膜脂肪組織から細胞を回収しフローサイトメトリーにより ILCs の解析を行った。その結果、ILC1 は CLP 6 時間後に増加していた一方 (図 2D)、NK 細胞、ILC2 および ILC3 は 6 時間後に差は見られなかった。この結果により、初期の炎症時に脂肪組織の ILC1 が関与している可能性が示唆された。一般的に、全ての ILCs は IL-7 受容体である CD127 を発現することが知られているが、脂肪組織の ILC1 は CD127 を発現しないことが近年報告されている (O'Sullivan et al., 2016)。しかしながら、CLP 6 時間後に増加する ILC1 は CD127 を高発現していることが明らかとなった (図 2: D, E)。この結果は、脂肪組織で増加した ILC1 がこれまでの報告とは異なる特徴を有することを示唆していた。

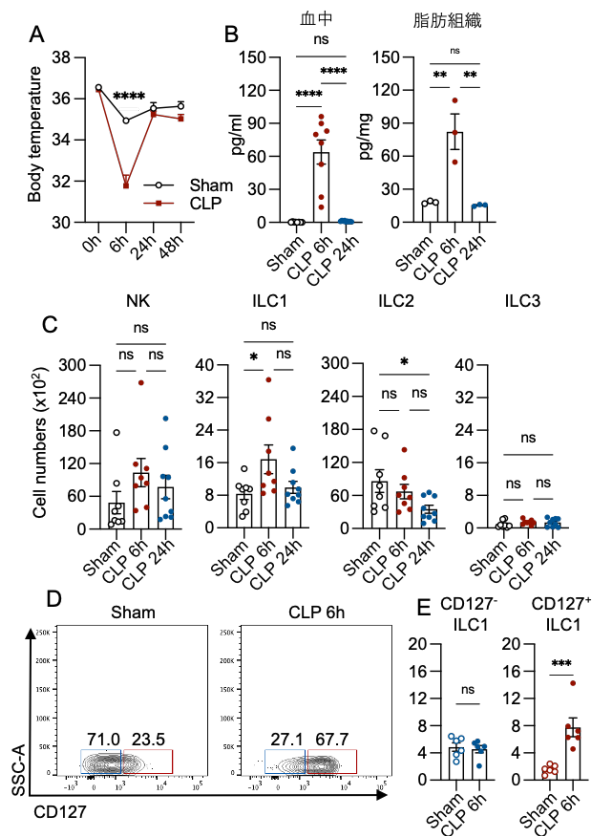


図 2. 脂肪組織の炎症は CLP 6 時間後に増加し 24 時間後に収束する。(A) Sham および CLP マウスにおける直腸温の経時変化。(B) Sham、CLP 6h および CLP 24h 後における血中および脂肪組織の IL-6 産生量の比較 (C)、および脂肪組織における ILC サブセットの細胞数変化 (D)。(D) および (E) Sham および CLP 6 時間後における CD127⁺ILC1 および CD127⁻ILC1 の FACS プロット (D) および細胞数の変化

次に、脂肪組織内 CD127⁺ ILC1 の腹膜炎発症時における役割を明らかにするため、コントロールおよび CLP マウスの脂肪組織を単一細胞化し Single cell RNA-sequencing (scRNAseq) 解析を実施した。CD127⁺ ILC1 クラスターに特徴的な遺伝子発現を調べたところ、PD-L1 として知られる *Cd274* が高発現していた (図 3A)。実際にフローサイトメトリーにて確認したところ、CLP 6 時間後の脂肪組織で PD-L1 を発現する CD127⁺ ILC1 の細胞数が増加していた (図 3B)。PD-L1 は T 細胞に発現している PD-1 のリガンドとして機能し T 細胞の活性を抑制することが知られている。そこで、scRNAseq データから T 細胞および ILC1 クラスターを抽出し、それぞれのクラスター間の相互作用を検出する CellPhoneDB 解析を試みた。その結果、ILC1 は *Rorc* (ROR γ t をコードする遺伝子) を発現している T 細胞と PD-1/PD-L1 を介して強く相互作用する可能性が示唆された (図 3C)。脂肪組織において ROR γ t⁺ T 細胞は Th17 と γ δ T 細胞が知られているため、CLP 6 時間後のこれら細胞における PD-1 発現を調べたところ、実際に γ δ T 細胞が PD-1 を高発現していることが確認できた (図 3D、E)。次に、PD-1/PD-L1 を介した ILC1 と γ δ T 細胞の相互作用を *In vivo* で検証するため、ILCs を欠損する PLZF KO マウスに ILC1s を移入して CLP 6 時間後における脂肪組織の γ δ T 細胞および炎症動態を比較検証することにした。核内転写因子である PLZF は全ての ILCs の分化に必須であり、PLZF KO マウスでは全ての ILCs サブセットが著しく減少するが骨形成や神経細胞の分化も阻害されるため、まず PLZF KO マウスの骨髄を放射線照射したマウスに移植する PLZF BM キメラマウスを作製した。その結果、ILC1 を移入した CLP 6 時間後の脂肪組織で γ δ T 細胞が減少し (図 3F)、さらに γ δ T 細胞の PD-1 発現が増加していた (図 3G、H)。次に脂肪組織の遺伝子発現を解析したところ、免疫細胞の遊走を促進し炎症を活性化することで知られるケモカイン CCL2 の遺伝子発現が ILC1 移入マウスで低下していることが明らかとなった (図 3I)。

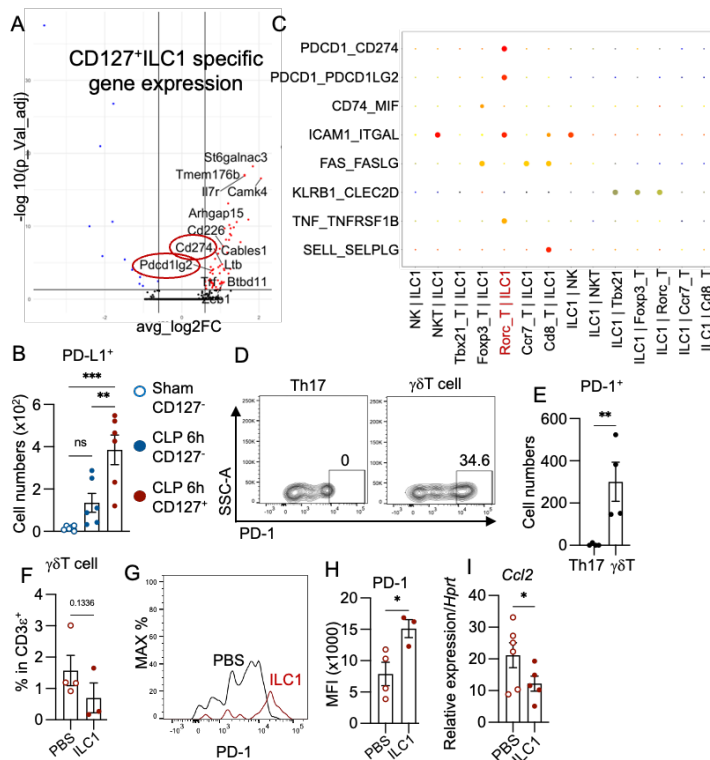


図 3. 脂肪組織内 CD127⁺ ILC1 は PD-L1 を介し γ δ T 細胞の活性を抑制する。 (A) CD127⁺ ILC1 に特徴的な遺伝子発現を比較したプロット。 (B) CellPhoneDB によるクラスター間相互作用の解析結果。 X 軸はクラスターのペア、 Y 軸は受容体-レセプターのペアを表す。 (C) Sham および CLP 6 時間後の脂肪組織における PD-L1 を発現する CD127⁺ ILC1 の細胞数。 (D) および (E) Th17 および γ δ T 細胞における PD-1 発現細胞の FACS プロット (D) および細胞数 (E)。 (F) PBS もしくは ILC1 を移入した PLZF BM キメラマウスの CLP6 時間後における脂肪組織内 γ δ T 細胞の CD3⁺ 細胞内の割合。 (G) および (H) PBS もしくは ILC1 を移入した PLZF BM キメラマウスの CLP6 時間後における脂肪組織内 γ δ T 細胞の PD1 発現。 (I) PBS もしくは ILC1 を移入した PLZF BM キメラマウスの CLP6 時間後の脂肪組織における *Ccl2* 発現。

この様に、急性腹膜炎発症時には CD127⁺ ILC1 へ変化し、PD-1 の発現上昇を伴って γ δ T 細胞を制御していることが示された。しかしながら、増加した ILC1 が実際に急性腹膜炎の病態に直接関与するのかわ不明である。そこで、ILC1 特異的欠損マウスに CLP 処置を実施し解析を行

った。ILC1 特異的マウスの脂肪組織において ILC1 欠損を確認後 (図 4A)、 $\gamma\delta$ T 細胞上の PD-1 発現を確認した。その結果、ILC1KO マウスでは $\gamma\delta$ T 細胞の PD-1 発現が低下しており (図 4B)、ILC1 との直接的な相互作用が示唆された。また、マウス脂肪組織において $\gamma\delta$ T 細胞からの TNF α 産生が向上しており、ILC1 が急性腹膜炎の炎症を制御していることが明らかとなった (図 4C)。

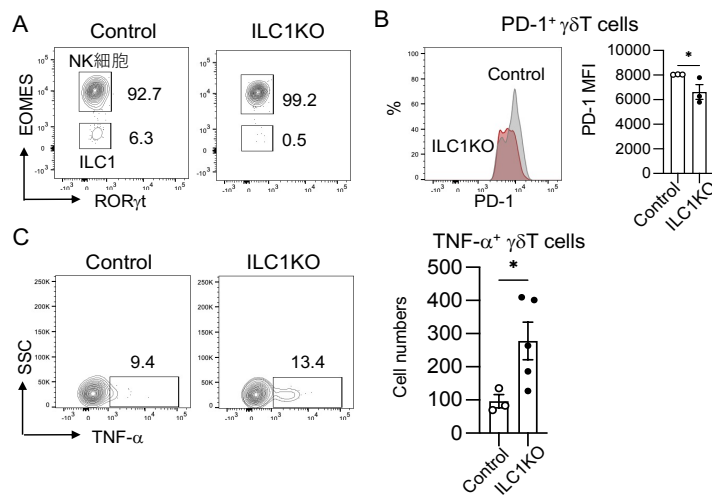


図 4. 脂肪組織内 ILC1 が $\gamma\delta$ T 細胞を介して炎症を制御する。(A) ILC1KO マウス脂肪組織における ILC1 の確認。コントロールとして Ncr1^{Cre/+} Tbx21^{+/+} マウスを使用。(B) CLP 6 時間後の脂肪組織における $\gamma\delta$ T 細胞上 PD-1 発現のフローサイトメトリー解析。(C) CLP 6 時間後の脂肪組織における TNF α 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数。

<考察>

本研究で使用したマウスは強い炎症の後に回復傾向を示したことから、ILC1 と $\gamma\delta$ T 細胞を介して腹膜炎発症時の過剰な炎症を抑制し、敗血症への移行を防いでいる可能性が考えられた。一般的に、ILC1 は IFN- γ を産生し感染時には炎症促進に関与することが知られている。しかしながら本研究では、腹膜炎による過剰な炎症誘導時には ILC1 が IFN- γ を産生せず、CD127⁺ILC1 が PD-L1 を発現することで $\gamma\delta$ T 細胞を制御することが明らかとなった。これまで ILC1 が PD-L1 を発現することは報告されておらず、全く新しいメカニズムにより ILC1 が過剰炎症を制御することが示された。PD-1/PD-L1 シグナル経路の阻害は近年注目されている敗血症の治療ターゲットの一つであるが、敗血症に病態移行する急性炎症時における PD-1/PD-L1 経路の役割は未だ知見に乏しかった。したがって、本研究による脂肪組織内 ILC1 による PD-1/PD-L1 を介した $\gamma\delta$ T 細胞制御機構の解明は、腹膜炎/敗血症の新たな治療戦略確立のための基盤的な知見となり得ると考えられる。

これまで、一般的に ILCs は組織常在性だと考えられていたが、近年は炎症に伴い組織間を循環する ILCs の存在が明らかとなりつつある。しかし、その遊走メカニズムは未だ不明な点が多く、本研究により明らかとなった脾臓からの脂肪組織への ILC1 遊走は、腹膜炎/敗血症研究のみならず ILCs 研究においても重要な報告になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsugawa Hiroshi, Ishihara Tomoaki, Ogasa Kota, Iwanami Seigo, Hori Aya, Takahashi Mikiko, Yamada Yutaka, Satoh-Takayama Naoko, Ohno Hiroshi, Minoda Aki, Arita Makoto	4. 巻 -
2. 論文標題 A lipidome landscape of aging in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Aging	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） 10.1038/s43587-024-00610-6	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 Matsumoto Kazuaki, Okuyama Kazuki, Sidwell Tom, Yamashita Motoi, Endo Takaho, Satoh-Takayama Naoko, Ohno Hiroshi, Morio Tomohiro, Rothenberg Ellen V., Taniuchi Ichiro	4. 巻 15
2. 論文標題 A Bcl11bN797K variant isolated from an immunodeficient patient inhibits early thymocyte development in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in 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） 10.3389/fimmu.2024.1363704	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 Mori Ayana, Ohno Hiroshi, Satoh-Takayama Naoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Disease pathogenesis and barrier functions regulated by group 3 innate lymphoid cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Seminars in Immunopathology	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） 10.1007/s00281-024-01000-1	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 Zhengzhen Shi, Tadashi Takeuchi, Yumiko Nakanishi, Tamotsu Kato, Katharina Beck, Ritsu Nagata, Tomoko Kageyama, Ayumi Ito, Hiroshi Ohno and Naoko Satoh-Takayama	4. 巻 in press
2. 論文標題 A Japanese herbal formula, Daikenchuto, alleviates experimental colitis by reshaping microbial profiles and enhancing group 3 innate lymphoid cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ritsu Nagata, Naoko Satoh-Takayama, Tommy Terooatea, Yuichi Akama, Akiko Minoda, Motomu Shimaoka and Hiroshi Ohno
2. 発表標題 Analysis for induction mechanisms of peritonitis regulated by adipose tissue
3. 学会等名 4th International Conference on innate lymphoid cell (ILC4) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Satoh-Takayama, Yuko Shigeno, Ritsu Nagata, Tomoko Kageyama, Naoko Tachibana, Yoshimi Benno and Hiroshi Ohno
2. 発表標題 The protective role of stomach ILC2 induced by the colonization of a strain S24-7
3. 学会等名 4th International Conference on innate lymphoid cell (ILC4) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Satoh-Takayama, Zhengzheng Shi, Tadashi Takeuchi, Ritsu Nagata and Hiroshi Ohno
2. 発表標題 A Japanese traditional medicine, Daikenchuto, alleviates colitis by reshaping microbial profiles and enhancing group 3 innate lymphoid cells.
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Satoh-Takayama
2. 発表標題 The stomach immune responses regulated by microbiota - Protective function of ILC2s from infection -
3. 学会等名 A potential interdisciplinary project between mathematics and immunology at University of Strasbourg (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Satoh-Takayama
2. 発表標題 細菌叢によって制御される胃の免疫応答 - ILC2を介した感染防御-
3. 学会等名 日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Satoh-Takayama1, Yuko Shigeno, Tomoko Kageyama, Tamotsu Kato, Yoshimi benno and Hiroshi Ohno
2. 発表標題 Bacterial isolation of family S24-7 and functional analysis.
3. 学会等名 International human microbiome consortium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Satoh-Takayama
2. 発表標題 Interaction of innate lymphoid cells and bacteria - important mediator for the host defense -
3. 学会等名 日本免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 森彩奈、大野博司、佐藤尚子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社 (臨床免疫・アレルギー科)	5. 総ページ数 88
3. 書名 疾患制御と恒常性維持に関与する3型自然リンパ球の役割	

1. 著者名 佐藤 尚子	4. 発行年 2024年
2. 出版社 先端医学社（炎症と免疫）	5. 総ページ数 276
3. 書名 ILC2により誘導される胃の粘膜バリア機構	

1. 著者名 佐藤 尚子	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社（医学のあゆみ）	5. 総ページ数 100
3. 書名 細菌叢と相互作用する自然リンパ球	

1. 著者名 佐藤 尚子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社（実験医学）	5. 総ページ数 1514
3. 書名 細菌叢と相互作用し免疫臓器として働く胃の役割	

1. 著者名 長田律、石箏箏、大野博司、佐藤尚子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 臨床免疫・アレルギー科（科学評論社）	5. 総ページ数 90
3. 書名 漢方薬・大建中湯による腸内細菌の恒常性維持と3型自然リンパ球の誘導	

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ディサント ジェームス (Di Santo James)	パスツール研究所・Department of Immunology・Professor	

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			
フランス	Institut Pasteur			
フランス	University of Strasbourg			