

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02707

研究課題名（和文）自然リンパ球特異的mRNA代謝による病態制御機構の解明

研究課題名（英文）mRNA metabolism specific to ILC subsets

研究代表者

海老原 敬（Ebihara, Takashi）

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20374407

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：自然リンパ球（ILC: Innate lymphoid cell）は初期の免疫応答を担う重要な細胞であり、T-bet依存性のグループ1（NK細胞、ILC1）、GATA3依存性のグループ2（ILC2）、ROR γ t依存性のグループ3（ILC3）に分類される。CNOT3はポリAデアニレーションで中心的役割を持つCCR4-NOT複合体のコアユニットであり、CNOT3の欠損をILCで誘導したところ、ILC2においてT-betとROR γ tの発現が上昇した。また、T-betやROR γ tのmRNAはCnot3依存的に分解された。CNOT3はILC2がILC2形質を維持するために重要な分子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然リンパ球は、抗原非特異的に免疫の方向性を決める免疫細胞であり、しばしば免疫体質を決定する細胞と呼ばれる。本研究は自然リンパ球の転写後調節に着目することにより、自然リンパ球の新しい分化・機能制御機構を発見するに至った。自然リンパ球を介した免疫体質のコントロールを目指す上で大事な知見であり、今後新しい治療戦略を生み出す可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Innate lymphoid cells (ILCs) are crucial for the early immune response and are classified into three groups: T-bet-dependent group 1 (NK cells, ILC1), GATA-3-dependent group 2 (ILC2), and ROR γ t-dependent group 3 (ILC3). CNOT3 is a core unit of the CCR4-NOT complex, playing a central role in poly(A) deadenylation. When CNOT3 deficiency was induced in ILCs, the expression of T-bet and ROR γ t increased in ILC2. Additionally, the mRNA of T-bet and ROR γ t was degraded in a CNOT3-dependent manner. Thus, CNOT3 is an important molecule for maintaining the ILC2 integrity.

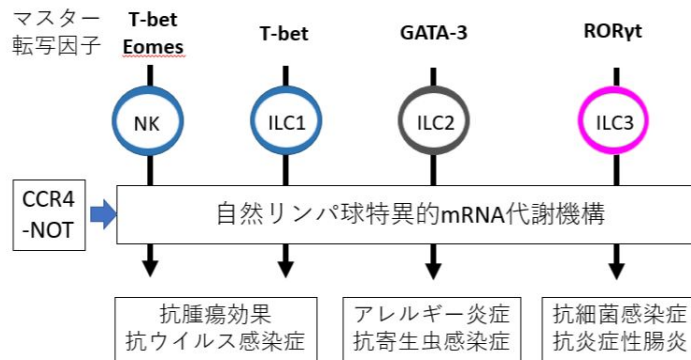
研究分野：Immunology

キーワード：自然リンパ球 転写後制御 NK細胞 ILC1 ILC2 ILC3

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球 (**ILC: Innate lymphoid cell**) は、初期の免疫応答を担う重要な細胞であり、ヘルパーサイトカイン産生を担うヘルパー自然リンパ球 (**ILC1、ILC2、ILC3**) と細胞障害活性をもつナチュラルキラー細胞 (**NK 細胞**) に分類される。**IFN-** を産生する **ILC1** や **NK 細胞** は抗腫瘍免疫や抗ウイルス免疫を、**IL-5** や **IL-13** を産生する **ILC2** はアレルギー炎症や抗寄生虫免疫を、**IL-17** や **IL-22** を産生する **ILC3** は病原性大腸菌等の細胞外病原体に対する免疫を、それぞれ誘導する (図1)。今まで、自然リンパ球の研究は、転写制御や液性因子と受容体による機能制御の研究が多く、転写後制御機構の報告はほとんどない状態であった。**RNA 結合タンパク質 Reganase-1** の **ILC2** における機能に関しては2報の報告があり、**Regnase-1** が **Il1r1、Il2ra、Gata3 mRNA** を代謝することが明らかになった (*Matsushita K, JCI Insight 2020; Nakatsuka Y, Euro Res J 2020*)。しかし、**ILC** サブセット特異的な **mRNA** 代謝機構の全貌は明らかになっていなかった。

図1：
自然リンパ球の **mRNA**
代謝と病態における機能



2. 研究の目的

哺乳類細胞の**mRNA** 転写後調節のなかで最終的なタンパク質発現に最も重要な機構はポリ A デアデニレーションによる **mRNA** 代謝経路と言われている。そして、哺乳類細胞におけるポリ A デアデニレーションで中心的役割を持つのが **CCR4-NOT** 複合体である。**CCR4-NOT** のコアユニットである **CNOT3** の欠損誘導を **ILC** サブセットで行うことにより、全ての **ILC** における **mRNA** 代謝機能の役割を、多角的な生理条件下で網羅的に検討し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

共同研究者の久場敬司先生により作成された **Cnot3^{fl}** マウスを様々な **Cre** マウス (**Il7r-Cre: ILC/T 細胞特異的 Cre, NCR1-Cre: グループ1 ILC 特異的 Cre, Id2-Cre-ERT2: 薬剤誘導性 ILC 特異的 Cre, Rorc-Cre: ILC3/Th17 特異的 Cre, CD4-Cre: CD4 T 細胞特異的 Cre, Rosa26-Cre-ERT2: 薬剤誘導性 Cre**) と掛け合わせて、細胞特異的な **Cnot3** 欠損を行い、それぞれの表現型を検討した。**ILC** における **CNOT3** の機能を検討するために、幾つかのマウスモデルを用いた。グループ1 **ILC** による I 型免疫炎症を誘導するために、**B16F10** メラノーマの肺転移モデルを使用した。グループ2 **ILC** による II 型免疫炎症を誘導するために、**N. brasiliensis** 感染モデルを、グループ3 **ILC** による III 型免疫炎症を誘導するために、**C. rodentium** 感染モデルを用いた。**Cnot3** 欠損

による ILC の機能を検討するために、**mRNA-sequencing, RIP-sequencing, mRNA stability assay** 等を行った。

4 . 研究成果

CCR4-NOT 複合体は、**CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT4, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8, CNOT9, CNOT10, CNOT11** の 11 分子からなる複合体で、**Cnot3** の欠損により mRNA 分解活性が失われることが分かっている。まず、NK 細胞、肝臓 **ILC1**、肺 **ILC2**、消化管 **ILC2**、消化管 **ILC3** における各 mRNA 発現を検討したところ、どの ILC サブセットでも **CCR4-NOT** 複合体は恒常的に発現していることが分かった (**Tatematsu M, Takasuga S, Kuba K, Ebihara T* et al., submitted**)。そこで、活性化により、どの ILC サブセットで **CCR4-NOT** 複合体の mRNA レベルが上昇するかどうか検討したところ、特に **IL2/IL7/IL25/IL-33** で活性化した消化管 **ILC2** において **CCR4-NOT** 複合体の mRNA 発現が上昇した。**CCR4-NOT** 複合体の mRNA の中でも特に **Cnot3** の mRNA 発現が上昇した。

Cnot3 の欠損を ILC で誘導し、その効果を調べるために、**Cnot3^{fl} Il7r-Cre** マウスの ILC サブセット (脾臓 NK 細胞、肝臓 **ILC1**、肺 **ILC2**、消化管 **ILC1/ILC2/ILC3**) を検討した。結果、どの細胞でも細胞数の減少を認めた。特に元から細胞数が少ない肝臓 **ILC1** と消化管 **ILC1** はほぼ欠損していた。脾臓 NK 細胞はさらに、成熟化障害を認めた。活性化型 **pan-caspases** を調べたところ、**CNOT3** 欠損 ILC サブセットで上昇しているため、ILC サブセットの減少は **Cnot3** の欠損によりアポトーシスが誘導されていることが示唆された。また、**Cnot3** 欠損の細胞内因性効果を調べるために、**CD45.2⁺ Cnot3^{fl} Il7r-Cre** マウスと **CD45.1** マウスの骨髓細胞を用いて競合的骨髓キメラを作製したところ、**Cnot3^{fl} Il7r-Cre** マウス由来の ILC サブセットは殆ど検出されず、NK 細胞の成熟化障害も認めた。よって、**Cnot3** 欠損 ILC のアポトーシスや NK 細胞の成熟化障害は細胞内因性効果であることが示唆された。

次に、**Cnot3** の欠損により ILC 分化異常が生じるかどうか検討するために、消化管 ILC サブセットにおいて各 ILC サブセット特異的転写因子 (**T-bet**: グループ 1, **GATA-3**: グループ 2, **RORgt**: グループ 3) の発現を調べた。結果、**GATA-3^{hi} KLRG1^{hi}** の **ILC2** と思われる細胞集団に高い **RORgt** の発現と **T-bet** の発現上昇を認めた。**ILC1** 特異的 Cre である **NCR1-Cre** や **ILC3** 特異的 Cre の **Rorc-Cre** により **Cnot3** の欠損を誘導しても、**GATA-3^{hi} RORgt^{hi} T-bet⁺** の **triple positive cell (TP cell)** は生じなかった。また、**Cnot3^{fl} Rosa26-Cre-ERT2** マウスの肺 **ILC2** を培養し、**Cnot3** の欠損をタモキシフェンで誘導したところ、**RORgt** と **T-bet** の発現上昇が誘導されたため、**ILC2** の **Cnot3** 欠損により **TP cell** が誘導されることが示唆された。

CD4T 細胞でも、ILC 分化と似たような状況が生じているかどうか検討するために、**Cnot3^{fl} CD4-Cre** マウスを作製し、**in vitro differentiation assay** を行ったところ、**Th1** と **Th17** への **skewing** が起きた。以上より、**CNOT3** は、いわゆる **I** 型免疫と **III** 型免疫誘導を抑制していることが分かった。

さらに、**Cnot3** 欠損による各 ILC サブセットによる転写の変化を検討するために、各 ILC サブセットによるトランスクリプトーム変化を解析した。結果、各 ILC サブセットにアポトーシスを誘導する遺伝子群の上昇を認め、**ILC2** における **Tbx21 (T-bet)** mRNA や **Rorc (RORgt)** mRNA の発現上昇を認めた。さらに、**Cnot3** 欠損によって mRNA レベルが上昇した遺伝子群のうち、どの mRNA が **CNOT3** を介して分解され

ているのか検討するために、**RIP-sequence**を行った。結果、**Cnot3**欠損で発現が上昇している mRNA のうち **10-20%**程度の遺伝子が **CNOT3**と直接結合していることが示唆された。特に、**ILC2**で **CNOT3**と共沈する mRNA として、**Rorc**や **Tbx21** mRNA が確認された。**Rorc**や **Tbx21** mRNA が **CNOT3**を介して分解されているかどうか検討するために、胸腺細胞を用いて **mRNA stability assay**を行った。結果、**Rorc**と **Tbx21** mRNA は、**CNOT3**依存的に代謝されていることが分かった。一方、**Gata3** mRNA は **CNOT3**非依存的に分解された。

最後に、**ILC**サブセットにおける **CNOT3**の機能を検討するために、マウス炎症モデルを用いた。**I**型炎症における **CNOT3**の機能を調べるために、グループ1 **ILC**特異的 **Cnot3**欠損マウス (**Cnot3^{fl/fl} NCR1-Cre**マウス)を作製し、**B16F10**メラノーマの肺転移モデルを行った。結果、**Cnot3^{fl/fl} NCR1-Cre**マウスにおいて、多くの肺転移を認めた。次に、消化管 **ILC2**における **CNOT3**の機能を検討するために、薬剤誘導性 **ILC**特異的 **Cnot3**欠損マウス (**Cnot3^{fl/fl} Id2-Cre-ERT2**マウス)を作製し、**N. brasiliensis**感染モデルを行った。この系では **ILC2**が生体防御に重要な機能を果たすことが知られている。結果、**Cnot3^{fl/fl} Id2-Cre-ERT2**マウスにおいて、消化管 **ILC2**の減少に伴う便虫卵数の上昇を認めた。**N. brasiliensis**感染モデルでは、**RORgt**陽性の **inflammatory ILC2**が肺に出現するが、**Cnot3**の欠損により **inflammatory ILC2**の数が上昇した。また、消化管3型炎症における **CNOT3**の機能を検討するために、**Cnot3^{fl/fl} Rorc-Cre**マウスを作製し、**C. rodentium**感染モデルを用いた。このマウスでは **ILC3**と **Th17**に強く **Cnot3**の欠損が誘導されるが、感染後 **ILC3**の細胞数のみ減少し、**Th17**に数的変化を認めなかった。そして、**Cnot3^{fl/fl} Rorc-Cre**マウスでは、**ILC3**の数的減少に伴い、優位な体重減少や重度の組織障害を認めた。以上より、各 **ILC**サブセットの **CNOT3**は、それぞれが誘導する炎症に重要な機能を果たしていることが示唆された。

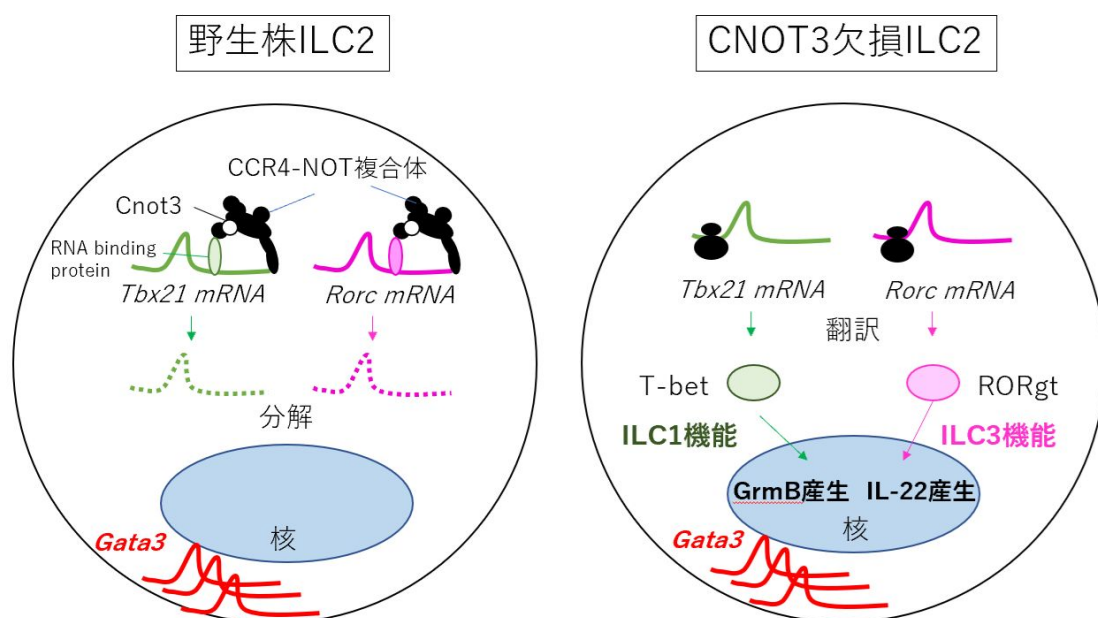


図 2 : **CNOT3**による **ILC2**の機能制御機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5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 Miyabe Yui, Tomizawa Hiroki, Saito Hidekazu, Yamada Toshiki, Shiina Kazuhiro, Koizumi Koh, Kawasaki Yohei, Suzuki Shinsuke, Fukuchi Mineyo, Ueki Shigeharu, Ebihara Takashi, Yamada Takechiyo	4. 巻 77
2. 論文標題 Quantification of Aspergillus fumigatus antigen Asp f 1 in airway tissue and allergic inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 3154 ~ 3156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15428	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 An Jianbo, Nagaki Yushi, Motoyama Satoru, Kuze Yuta, Hoshizaki Midori, Kemuriyama Kohei, Yamaguchi Tomokazu, Ebihara Takashi, Minamiya Yoshihiro, Suzuki Yutaka, Imai Yumiko, Kuba Keiji	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of Galectin-7 as a crucial metastatic enhancer of squamous cell carcinoma associated with immunosuppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5319 ~ 5330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02525-1	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 海老原敬	4. 巻 66
2. 論文標題 抗原受容体をもたないリンパ球 NK細胞	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床検査	6. 最初と最後の頁 582 ~ 587
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 無
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 海老原敬, 立松恵, 高須賀俊輔, 山田俊樹, 山田武千代	4. 巻 80
2. 論文標題 2型自然リンパ球の訓練免疫	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 【COPDと気管支喘息、その周辺疾患-病態・診断・治療の最新動向-】喘息病態up-to-date	6. 最初と最後の頁 586 ~ 590
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 無
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 Takashi Ebihara	4. 巻 70
2. 論文標題 Trained innate lymphoid cells in allergic diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 174-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.11.007	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 Toshiki Yamada, Megumi Tatematsu, Shunsuke Takasuga, Akane Fuchimukai, Kenki Yamagata, Shinsuke Seki, Keiji Kuba, Hideyuki Yoshida, Ichiro Taniuchi, Gunter Bernhardt, Kazuko Shibuya, Akira Shibuya, Takechiyo Yamada, Takashi Ebihara	4. 巻 220
2. 論文標題 TIGIT mediates activation-induced cell death of ILC2s during chronic airway allergy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20222005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20222005	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 Cui G, Shimba A, Jin J, Hojo N, Asahi T, Abe S, Ejima A, Okada S, Ohira K, Kato R, Tani-ichi S, Yamada R, Ebihara T, Shiroguchi K, and Ikuta K	4. 巻 120
2. 論文標題 CD45 alleviates airway inflammation and lung fibrosis by limiting expansion and activation of ILC2s.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	6. 最初と最後の頁 e2215941120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2215941120	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 海老原 敬*, 山田俊樹	4. 巻 288
2. 論文標題 ILC2と疲弊	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 43 - 47
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 無
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 海老原敬*, 立松恵, 高須賀俊輔	4. 巻 80
2. 論文標題 訓練免疫と自然リンパ球メモリー	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 22-28
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 無
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15件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toshiki Yamada, Megumi Tatematsu, Shunsuke Takasuga, Kenki Yamagata, Kazuko Shibuya, Akira Shibuya, Takechiyo Yamada, Takashi Ebihara.
2. 発表標題 Activation-induced cell death of ILC2 regulates chronic allergic inflammation
3. 学会等名 4TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON INNATE LYMPHOID CELLS (ILC4) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Megumi Tatematsu, Akane Fuchimukai, Tsukasa Nabekura, Akira Shibuya, and Takashi Ebihara.
2. 発表標題 Caloric restriction induces cellular quiescence in hepatic ILC1s
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiki Yamada, Akane Fuchimukai, Megumi Tatematsu, Shunsuke Takasuga, Hideyuki Yoshida, Kazuko Shibuya, Akira Shibuya, Takashi Ebihara.
2. 発表標題 TIGIT mediates activation-induced cell death of ILC2s
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原敬
2. 発表標題 自然リンパ球の多様性と運命決定機構
3. 学会等名 第74回 日本細菌学会東北支部会 学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立松恵、淵向茜、海老原敬
2. 発表標題 低栄養状態により誘導されるILC1 Quiescence
3. 学会等名 第74回 日本細菌学会東北支部会 学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原敬
2. 発表標題 2型自然リンパ球の多様性とアレルギー疾患
3. 学会等名 第3回秋田アレルギー疾患フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原敬
2. 発表標題 自然リンパ球の多様性と疾患
3. 学会等名 第86回秋田県医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原敬
2. 発表標題 自然リンパ球の多様性と小児疾患
3. 学会等名 第121回日本小児科学会秋田地方会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatematsu M, Sawa S, Ikuta K, Ebihara T.
2. 発表標題 The Ccr4-Not deadenylase complex controls antitumor NK cell activity.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamada T, Tatematsu M, Ebihara T.
2. 発表標題 Activation-induced cell death of ILC2s confers protection against chronic allergic inflammation.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高須賀俊輔、海老原敬、佐々木雄彦
2. 発表標題 肝特異的ホスファチジルグリセロールリン酸ホスファターゼ遺伝子欠損によるラロン型低身長症様疾患モデルマウス
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高須賀俊輔、佐々木雄彦、海老原敬
2. 発表標題 代償的なINPP4B過剰発現によるPTEN遺伝子欠損の機能代替の機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立松恵、高須賀俊輔、淵向茜、海老原敬
2. 発表標題 Ccr4-not複合体による自然リンパ球の制御
3. 学会等名 第75回日本細菌学会東北支部
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Ebihara
2. 発表標題 Exhaustion and Activation-Induced Cell Death of ILC2s in chronic allergy
3. 学会等名 The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Megumi Tatematsu, Akane Fuchimukai, Shunsuke Takasuga, Toshiki Yamada, Kenji Ishiwata, Ichiro Taniuchi, Shinichiro Sawa, Keiji Kuba, Takashi Ebihara
2. 発表標題 Cnot3 differentially regulates differentiation and function of innate lymphoid cells
3. 学会等名 The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 海老原敬	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 11
3. 書名 標準微生物学 第14版 第3版 第30章 ウイルスの病原性	

1. 著者名 海老原敬	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 11
3. 書名 標準微生物学 第15版 第3版 第30章 ウイルスの病原性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物学講座所属 山田 俊樹 医員が自然リンパ球の国際学会において、Travel Awardsを受賞
<https://www.med.akita-u.ac.jp/topics/20221220.php>

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 分担者	久場 敬司 (Kuba Keiji) (10451915)	秋田大学・医学系研究科・非常勤講師 (11401)	マウス作製、RNA関連実験、論文執筆

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	立松 恵 (Tatematsu Megumi) (70725605)	秋田大学・医学系研究科・助教 (11401)	動物実験、解析、論文執筆
研究分担者	高須賀 俊輔 (Takasuga Shunsuke) (90375262)	秋田大学・医学系研究科・助教 (11401)	動物実験、バイオインフォマティクス、論文執筆

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			
ドイツ	German Cancer Research Center	Hannover Medical School		
オーストリア	Veterinary University of Vienna			
米国	Cornell University	Washington University in St. Louis		
フランス	Institut Pasteur			
ドイツ	German Cancer Research Center			
オーストリア	Veterinary University of Vienna			