

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：83206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05466

研究課題名（和文）IL-5産生細胞を中心とした腸内細菌の恒常性維持機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of homeostatic mechanisms of intestinal bacteria with a focus on IL-5-producing cells

研究代表者

柳橋 努 (Tsutomu, Yanagibashi)

富山県薬事総合研究開発センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：60710887

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）：ILC2は大腸で恒常的にIL-5を産生し、腸内細菌の構成バランスの適正化に寄与する。しかし、定常状態におけるILC2のIL-5産生調節機構は未解明な点が多い。本研究では、IL-33欠損マウスを用いて、IL-33がILC2のIL-5産生維持に必須であることを明らかにした。また、抗生物質処置による腸内細菌叢の変化に伴い、ILC2のIL-5産生も変化することから、腸内細菌がILC2のIL-5産生を調節することが示唆された。さらに、抗生物質処置ではIL-33産生が変化しなかったため、IL-33と腸内細菌が独立した経路でILC2のIL-5産生に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、定常状態における大腸ILC2のIL-5産生調節機構の解明に取り組み、大腸IL-33と腸内細菌がそれぞれ独立した経路でILC2のIL-5産生に寄与することを明らかにした。研究代表者らは、大腸ILC2がIL-5依存的に腸内細菌の構成バランスを適正化し、腸内細菌の恒常性維持において重要な役割を果たすと考えている。一方で、ILC2はIL-5過剰産生によってアレルギー反応や肺動脈高血圧症の発症にも寄与することから、その制御が健康維持に重要であると考えられる。本研究で得られた知見は、ILC2のIL-5産生を調節する薬剤や食品の開発に資するものであり、社会実装への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：ILC2 produces IL-5 at steady state in the colon and contributes to the proper compositional balance of the intestinal microbiota. However, the regulatory mechanism of IL-5 production by ILC2 at steady state remains elusive. In this study, using IL-33-deficient mice, we demonstrated that IL-33 is essential for the maintenance of IL-5 production by ILC2. Furthermore, IL-5 production by ILC2 was altered in response to changes in the gut microbiota caused by antibiotic treatment, suggesting that gut bacteria regulate IL-5 production by ILC2. Notably, IL-33 production was not altered by antibiotic treatment. These findings suggest that IL-33 and gut bacteria independently contribute to IL-5 production by ILC2 through distinct pathways.

研究分野：食品科学

キーワード：IL-5 腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管には、免疫系による高度な制御の下、1000 種に及ぶ腸内細菌が構成バランスを一定に保ち、腸内細菌叢を形成している。近年、腸内細菌の異常増殖や、構成菌の多様性の喪失が、炎症性腸疾患、代謝疾患、神経疾患等の病態形成の原因となることが明らかにされつつある (Klose CS and Artis D, *Nat. Rev. Immunol.* 17, 2016)。従って、これら疾病の予防や治療には、腸内細菌の数や多様性を適正な状態に維持することが極めて重要となる。

微生物に対する免疫応答の一つである免疫グロブリン A (IgA) 産生は、病原菌に対する感染防御のみならず、腸内細菌の構成菌バランスの制御にも関連する (Macpherson AJ, et al., *Science* 288, 2000)。申請者は、2 型サイトカインであるインターロイキン (IL)-5 を欠損するマウスにおいて、定常状態の腸管 IgA 産生量が減少し、腸内細菌叢の多様性が失われていることを見出している。また、IL-5 産生細胞を可視化できる IL-5 レポーターマウスを作出し、定常状態の大腸に存在する 2 型自然リンパ球 (ILC2) が恒常的に IL-5 を産生していることを報告している (Ikutani M, et al., *J. Immunol.* 188, 2012)。これらの結果は、大腸に存在する IL-5 産生 ILC2 が IgA 産生を介し、腸内細菌構成バランスの維持に関連していることを示唆している。

アレルゲンの暴露や、寄生虫感染時に腸管や気道の上皮細胞から産生される IL-25、IL-33、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は、ILC2 の IL-4、IL-5、IL-13 産生量の増加を誘導し、炎症反応を増悪へと導く。従って、IL-5 産生 ILC2 は定常状態では善玉として作用し、IgA 産生を介した腸内細菌叢の恒常性維持に寄与する一方、炎症状態では悪玉として作用し、炎症反応の増悪に関連する。従って、腸管 ILC2 の細胞数やサイトカイン産生のバランスを適正な状態に保つことは、腸内細菌構成バランスの維持において極めて重要であると推察される。

申請者は本研究の申請段階で、①定常状態の大腸には、ILC2 活性化因子である IL-33 産生細胞が存在していること、②腸内細菌の全く存在しない無菌マウスでは、通常マウスに比べ大腸の IL-5 mRNA 発現が著しく低下していることを見出しており、IL-33 と腸内細菌に着目した ILC2 の IL-5 産生調節機構の解明を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、IL-33 および腸内細菌による大腸 ILC2 の IL-5 産生調節メカニズムの解明を目的とした。申請者がこれまでに実施した定常状態の大腸 IL-5 産生 ILC2 の機能に関する研究に加え、本研究の実施により、IL-5 産生 ILC2 を中心とした大腸の恒常性維持機構の全体像が明らかになると考えた。

## 3. 研究の方法

本研究では、IL-33 および腸内細菌による大腸 ILC2 の IL-5 産生調節メカニズムを解明するため、以下の方法で課題に取り組んだ。

### (1) 大腸 ILC2 の IL-5 産生調節における IL-33 産生細胞の機能解析

- ① 定常状態の大腸 ILC2 の IL-5 産生が IL-33 に依存するの否かを解析するため、野生型マウスと IL-33 欠損マウスの大腸 ILC2 の IL-5 産生をフローサイトメトリー法で比較した。
- ② 大腸 IL-33 産生細胞が ILC2 の IL-5 産生に関連するかどうかを明らかにするため、ナイー

ブマウスの大腸から、IL-33 産生細胞を含む細胞画分と ILC2 を分取し、抗 IL-33 受容体抗体の存在下または非存在下で培養し、培養上清中の IL-5 を ELISA 法で測定した。

#### (2) 腸内細菌による大腸 ILC2 の IL-5 産生調節機構の解析

- ① 腸内細菌叢の変化が ILC2 の IL-5 産生に影響するのかどうかを明らかにするため、抗菌スペクトルの異なる 5 種類の抗生物質を単剤でマウスに処置して腸内細菌叢を様々な状態に変化させ、ILC2 の IL-5 産生量の変化をフローサイトメトリー法および定量 PCR 法により解析した。
- ② 抗生物質を処置したマウスの糞便から調製した 16S rRNA を用い、アンプリコンシーケンスにより腸内細菌叢を解析し、ILC2 の IL-5 産生が増加、または減少した抗生物質処置で共通して発現量に変化する腸内細菌を探索した。
- ③ 大腸 IL-33 産生が腸内細菌により調節されているのか否かを解析するため、IL-33 レポーターマウスに、ILC2 の IL-5 産生を減少させた抗生物質を処置し、IL-33 産生に影響するのかどうかをフローサイトメトリー法で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸 ILC2 の IL-5 産生調節における IL-33 産生細胞の機能解析

- ① IL-33 欠損マウスを用いた ILC2 の IL-5 産生における IL-33 の機能解析  
IL-33 欠損マウスの大腸 ILC2 の割合や細胞数は野生型マウスと変化しないが、ILC2 中の IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合が有意に減少していた。この結果から、定常状態の大腸 ILC2 の IL-5 産生を IL-33 が促進している可能性が示された。
- ② IL-33 産生細胞と ILC2 の共培養による IL-5 産生誘導の検証  
IL-33 産生細胞と ILC2 を共培養すると、ILC2 の単独培養に比べ IL-5 産生が亢進した。さらに IL-33 受容体に対する抗体を添加したところ、IL-5 産生が約半分に減少した。この結果から、定常状態の大腸において、IL-33 は ILC2 の IL-5 産生に寄与するが、IL-33 以外の因子も関与していることが示唆された。

#### (2) 腸内細菌による大腸 ILC2 の IL-5 産生調節機構の解析

- ① 抗生物質処置による ILC2 の IL-5 産生変化の解析  
抗菌スペクトルの異なる 5 種類の抗生物質のうち、3 種類の抗生物質 A、B、C において IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合、並びに IL-5 mRNA 発現の減少が認められた。また、抗生物質 D では、IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合、並びに IL-5 mRNA 発現の増加が認められた。抗生物質 E では IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合に変化は認められなかった。この結果から、ILC2 の IL-5 産生が腸内細菌叢の変化により調節される可能性が示唆された。
- ② 抗生物質処置マウスの腸内細菌叢の解析  
次世代シーケンサーを用いて抗生物質処置マウスの腸内細菌叢を網羅的に解析した結果、腸内細菌で多様性の指標である  $\alpha$  多様性が、全ての抗生物質処置マウスでコントロールマウスよりも減少していた。また、IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合が減少した抗生物質 A、B、C の  $\alpha$  多様性は、IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合が増加した抗生物質 D や IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合が変化しなかった抗生物質 E よりも低かった。また、腸内細菌構成の違いの指標となる  $\beta$  多様性解析

と群間比較解析 LEfSe を用いて各抗生物質処置マウスの腸内細菌の構成を比較したところ、IL-5<sup>+</sup> ILC2 の割合が減少した抗生物質 A、B、C とコントロールマウスでは、腸内細菌の構成が異なる可能性が示唆された。さらに、コントロールマウスの腸内細菌のうち存在割合が1%以上の菌を対象として各種抗生物質処置マウス中の発現割合を解析したところ、コントロールマウス並びに IL-5<sup>+</sup> ILC2 が増加した抗生物質 D、変化しなかった抗生物質 E で共通して発現し、IL-5<sup>+</sup> ILC2 が減少した抗生物質 A、B、C では発現を認めない腸内細菌として唯一 *Muribaculaceae* が同定された。本菌は、既に胃の ILC2 の IL-5 産生を増加させる菌として報告されていることから、大腸においても ILC2 の IL-5 産生の増加に関連する可能性が高い(Satoh-Takayama *et al.*, *Immunity* 52, 2022)。また、IL-5<sup>+</sup> ILC2 が減少した抗生物質 A、B、C でのみ発現し、コントロールマウス並びに IL-5<sup>+</sup> ILC2 が増加した抗生物質 D、変化しなかった抗生物質 E では発現が認めない腸内細菌も 1 菌種同定され、本菌が ILC2 の IL-5 産生を抑制に関連している可能性が示唆された。

- ③ IL-33 レポーターマウスに ILC2 の IL-5 産生が減少した抗生物質 A を処置したが、大腸間質細胞の IL-33 産生はコントロールマウスを変化しなかった。従って、抗生物質 A による ILC2 の IL-5 産生抑制は、IL-33 産生の減少に起因するものではないことが推察された。

本研究では、定常状態の大腸 ILC2 の産生調節機構の解明に取り組み、大腸 IL-33 産生および一部の腸内細菌がそれぞれ独立した経路により、ILC2 の IL-5 産生に寄与していることが明らかとなった。今後は *in silico* 解析で同定された腸内細菌が、ILC2 の IL-5 産生を抑制するのかわいかマウス実験モデルで検証を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kasai Kaichi, Igarashi Naoya, Tada Yuki, Kani Koudai, Takano Shun, Yanagibashi Tsutomu, Usui-Kawanishi Fumitake, Fujisaka Shiho, Watanabe Shiro, Ichimura-Shimizu Mayuko, Takatsu Kiyoshi, Tobe Kazuyuki, Tsuneyama Koichi, Furusawa Yukihiro, Nagai Yoshinori	4. 巻 24
2. 論文標題 Impact of Vancomycin Treatment and Gut Microbiota on Bile Acid Metabolism and the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4050 ~ 4050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24044050	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 Tada Yuki, Kasai Kaichi, Makiuchi Nana, Igarashi Naoya, Kani Koudai, Takano Shun, Honda Hiroe, Yanagibashi Tsutomu, Watanabe Yasuharu, Usui-Kawanishi Fumitake, Furusawa Yukihiro, Ichimura-Shimizu Mayuko, Tabuchi Yoshiaki, Takatsu Kiyoshi, Tsuneyama Koichi, Nagai Yoshinori	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles of Macrophages in Advanced Liver Fibrosis, Identified Using a Newly Established Mouse Model of Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13251 ~ 13251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232113251	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 Ogasawara Masaru, Yamasaki-Yashiki Shino, Hamada Masahiro, Yamaguchi-Miyamoto Tomomi, Kawasuji Toru, Honda Hiroe, Yanagibashi Tsutomu, Ikutani Masashi, Watanabe Yasuharu, Fujimoto Ryota, Matsunaga Takayuki, Nakajima Noriyuki, Nagai Yoshinori, Takatsu Kiyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Betulin Attenuates TGF- 1- and PGE<sub>2</sub>-Mediated Inhibition of NK Cell Activity to Suppress Tumor Progression and Metastasis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 339 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00921	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山県薬事総合研究開発センター  
<https://www.pref.toyama.jp/1285/kurashi/kenkou/iryuu/1285/index.html>

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	山崎 輝美 (長井輝美)  (Yamazaki Terumi)  (20558134)	金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教    (13301)	

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