

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390086

研究課題名(和文) 新たなヒト・リンパ球ナチュラル・ヘルパー細胞の同定と疾患への関与

研究課題名(英文) Human natural helper cells and its involvement in diseases

研究代表者

山田 健人 (YAMADA, TAKETO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：60230463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脂肪内リンパ組織FALCと自然免疫を担当するナチュラル・ヘルパー(NH)細胞の機能解析を行った。全身脂肪組織のFALCを検索し腸間膜が最も明瞭でNH細胞も多いことが判明した。剖検症例の腸間膜NH細胞を単離し、サイトカイン刺激後の遺伝子発現変化や転写因子発現を解析したところ、ヒトNH細胞もマウス同様の遺伝子発現やサイトカン産生能を示した。NH細胞を標識して免疫不全マウス腹腔内へ移植したところ、マウス脂肪組織への定着とヒトIL-5、IL-13産生が確認された。糖尿病、メタボリック症候群の剖検症例腸間膜では対照群と比較してFALC組織の面積の減少傾向およびNH細胞数の有意な低下が認められた。

研究成果の概要(英文)：Pathophysiological examinations of human innate immunology-related natural helper (NH) cells in fat-associated lymphoid cluster (LALC) were done using autopsy cases. FALCs in adipose tissues of total body were analyzed anatomically and histologically, consequently FALC was dominantly located in mesentery and NH cells were most frequent in mesentery as compared to omentum, fat capsule of kidney, genitalia, and retroperitoneum. Human NH cells prepared from human mesentery had the same patterns of gene expressions and similar kinds of cytokine production to murine NH cells. Human NH cells labeled with CFSE were transplanted in NOG mice. As a result human NH cells lodged in murine adipose tissues and produced human IL-5 and IL-13 constitutively. The area of FALC and NH cell number was decreased in mesentery of cases with diabetes mellitus and metabolic syndrome as compared to control cases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学 免疫学 メタボリック症候群 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、生まれながらに備わっている免疫応答で、最初の感染防御機構である。腸管は、広大な腸管腔に存在する常在細菌叢と共生する一方で、侵入した病原体を認識し、自然免疫応答を誘導することができる。腸間膜は、この腸管を栄養する血管系と多量の脂肪組織およびリンパ組織からなる臓器である。研究代表者らは、最近、マウス腸間膜において、これまで知られていなかったリンパ組織 (fat-associated lymphoid cluster (以下 FALC)) を見出した (Nature 463, 540, 2010)。FALC は、リンパ節とは異なり被膜組織を有さず、またミルキースポットとは異なり、T 細胞や B 細胞領域を持たない独自の形態を示した。この FALC の構成細胞を検討した結果、lineage マーカー陰性、c-kit 陽性、Sca-1 陽性のナチュラル・ヘルパー (NH) 細胞が 30% を占めていることが明らかとなった。この NH 細胞は、CD45, IL-2 受容体, IL-7 受容体, IL-25 受容体, IL-33 受容体や Thy-1, CD27 を発現しており、IL-2 存在下で増殖するとともに、IL-7 存在下で生存し続けた。NH 細胞は、T 細胞と B 細胞を欠損する Rag-2 欠損マウスや T 細胞を欠損するヌードマウスでも存在したが、サイトカイン共通受容体 γ_c 鎖欠損マウスでは認められなかった。また γ_c 鎖欠損マウスへの骨髓移植実験から、NH 細胞は造血幹細胞由来であることが判明した。NH 細胞は、恒常的に IL-5, IL-6, IL-13 などの Th2 サイトカインを産生しており、PMA とイオノマイシンの共刺激により、極めて大量の IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 などを産生した。マウスを用いた NH 細胞の機能解析からは、NH 細胞が、IgA 産生誘導能を有すること、腹腔内 B1 細胞の自己複製能を維持すること、を見出した。さらに寄生虫感染症において、感染後に放出あるいは産生される IL-33 や IL-25 に反応して、NH 細胞が、IL-13 の産生を通じて、腸管粘膜の杯細胞過形成を惹起することで、寄生虫を排除することを明らかにした。このように NH 細胞は、T 細胞や B 細胞のような抗原受容体を持たない一方、サイトカイン受容体 (IL-25 受容体, IL-33 受容体など) を発現することで、肺や腸管などの免疫の最前線を担う細胞が傷害を受けたときに異物や病原体の排除を積極的に誘導する、新たな自然免疫担当細胞と考えられる。また IL-25, IL-33 により誘導される Th2 サイトカインは、寄生虫感染以外にアレルギー性喘息や動脈硬化症、さらに脂肪組織における炎症反応であるメタボリック症候群における重要性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトにおける NH 細胞の同定、詳細な機能解析を行い、さらに脂肪組織での炎症を伴うメタボリック症候群における、本細胞の機能を病理学および免疫学的に解析するものであり、以下の課題を遂行するものである。

(1) ヒト全身脂肪組織における FALC を同定し、構成細胞 (NH 細胞を含む) を明らかにする。各種脂肪組織を剖検症例 (胎児から高齢者まで) より採取し、組織学およびフローサイトメーターにより FALC の局在を明らかにする。組織での NH 細胞の観察は、c-kit/IL-7 受容体および IL-33 受容体/CD3 の重染色にて行う。フローサイトメーターにより各種血球系統マーカーと c-kit, IL-7 受容体, IL-33 受容体を検討することで、FALC 内の NH 細胞と他の血球を同定する。

(2) FALC にある NH 細胞を単離し、自然免疫担当細胞としての機能を解析する。剖検症例の脂肪組織およびインフォームドコンセントの得られた外科摘出腸間膜から NH 細胞をソーティングし、形態観察を行い、各種サイトカン産生能、転写因子群発現を明らかにする。また試験管内において、IL-2, IL-7, IL-25, IL-33 や PMA とイオノマイシンなどの刺激後の各種サイトカン産生能を観察する。単離したヒト NH 細胞をマウス NH 細胞のない免疫不全マウスへ移植し、その生存、局在、機能を明らかにする。

(3) メタボリック症候群および糖尿病症例における FALC の病理学的解析を行い、NH 細胞の動態、機能を明らかにする。メタボリック症候群、糖尿病および対照群 (剖検例および外科摘出例) の脂肪組織における FALC の形態学的変化 (大きさ、NH 細胞数) と単離 NH 細胞の試験管内でのサイトカイン産生能を解析する。

3. 研究の方法

(1) ヒト全身脂肪組織における FALC を同定し、構成細胞 (NH 細胞を含む) を明らかにする。各種脂肪組織 (腸間膜、大網、腎脂肪被膜、生殖器周囲、後腹膜、縦隔、皮下、眼窩) を成人剖検症例より採取し、組織学およびフローサイトメーターにより FALC の局在を明らかにする。組織での NH 細胞の観察は、c-kit/IL-7 受容体および IL-33 受容体/CD3 の重染色にて行い、c-kit, IL-7 受容体, IL-33 受容体陽性かつ CD3 陰性細胞を NH 細胞とする。フローサイトメーターでは、血球系統マーカー (CD3, CD4, CD8, CD10, CD11, CD16, CD19, CD25, CD27, CD38, CD44, CD45RB, CD56, CD69 等) と c-kit, IL-7 受容体, IL-33 受容体を検討することで、FALC 内の NH 細胞と他系

統の血球を同定・定量する。また各種脂肪組織での FALC 構成細胞の比較を行う。

(2) FALC にある NH 細胞を単離し、自然免疫担当細胞としての機能を解析する。剖検症例の各種脂肪組織から、lineage 陰性分画内の c-kit, IL-7 受容体, IL-33 受容体陽性細胞を NH 細胞としてソーティングする。単離された細胞については、光学および電子顕微鏡により形態観察を行う。また単離された細胞を培養し、各種サイトカン(IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, M-CSF, GM-CSF, TNFa, TGFb, SCF, Flt3 ligand 等) 産生能、転写因子群(RORc, Id2, Lta, Ltb, Ltbr, Tbx21, Stat4, Maf, GATA3, JunB, Stat6 等)発現を明らかにする。また試験管内において、IL-2, IL-4, IL-7, IL-25, IL-33 や PMA とイオノマイシンなどにより刺激した後の各種サイトカン産生能を測定する。また生体内でのヒト NH 細胞の機能を解析するために、単離したヒト NH 細胞を CFSE 蛍光染色してから、NH 細胞のない免疫不全マウス (NOG) 腹腔内へ移植し、その生存と期間および増殖能を観察し、さらに一定期間後にマウスを解剖し、全身の脂肪組織やリンパ節、脾臓などを組織学的に検討することで、局在を明らかにする。

(3) メタボリック症候群症例での FALC の病理学的解析を行い、NH 細胞の動態、機能を明らかにする。内科学会の診断基準によりメタボリック症候群、糖尿病と診断された症例および非メタボリック症候群である対照群症例(悪性腫瘍および自己免疫性疾患を除く)について、剖検例および外科摘出例からの脂肪組織における FALC の形態学的変化(大きさ、NH 細胞数)を解析する。解析は、1 同様の染色標本について、画像解析ソフト ImageProPlus を用いて定量的に行う。これらの脂肪組織から単離した NH 細胞については、2 同様に試験管内でのサイトカイン産生能あるいは各種の刺激後のサイトカイン産生能を解析し、メタボリック症候群、糖尿病における NH 細胞の変化の有無を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 各種脂肪組織(腸間膜、大網、腎脂肪被膜、生殖器周囲、後腹膜、縦隔、皮下、眼窩)を成人剖検症例より採取し、組織学的およびフローサイトメーターにより FALC の局在を解析した。組織での NH 細胞の観察は、c-kit/IL-7 受容体および IL-33 受容体/CD3 の重染色にて行い、c-kit, IL-7 受容体, IL-33

受容体陽性かつ CD3 陰性細胞を NH 細胞とし ImageProPlus を用いて計測した(図 1)。



図1 ヒトFALCにおけるNH細胞の同定
c-kit(青)およびIL-7受容体(IL-7R、茶)の重染色された細胞をNH細胞として測定した

その結果、腸間膜がもっとも FALC が明瞭であり、FALC 中の NH 細胞が多いことが明らかとなった。腸間膜以外では、大網、腎脂肪被膜、生殖器周囲、後腹膜に一定数存在すること、縦隔、皮下、眼窩の脂肪組織にはほとんど認められないことを見出した。また各種脂肪組織における単核細胞分画について、フローサイトメーターにより各種血球系マーカーと c-kit, IL-7 受容体, IL-33 受容体発現を検討したところ、組織学的検討と同様に腸間膜で最も NH 細胞数および率が高かった。

(2) 剖検症例の脂肪組織から NH 細胞をソーティングし、形態観察を行い、各種サイトカン産生能、転写因子群発現を検討した。その結果、ヒト NH 細胞は N/C 比の高い単核細胞であり、細胞内小器官の発達は乏しくリソゾームは少数であった。また無刺激の状態においては、マウス同様の遺伝子発現(RORc, Id2, Lta, Ltb, Ltbr, Tbx21, Stat4, Maf, GATA3, JunB, Stat6) やサイトカン産生能(IL-5, IL-6, IL-13 等 Th2 サイトカイン)を有することが明らかとなった。この単離した細胞を IL-2, IL-7, IL-25, IL-33 や PMA とイオノマイシンで刺激したところ、細胞の大型化、N/C 比の低下とともに細胞質に小胞体やリソゾームなどの細胞内小器官の発達が観察され大量の IL-13 を産生した。次に生体内ヒト NH 細胞の機能を解析するために、ヒト NH 細胞を CFSE 蛍光染色して免疫不全マウス NOG 腹腔内へ移植し、その生存と期間および増殖能を観察し、さらに全身の脂肪組織やリンパ節、脾臓などを組織学的に検討したところ、移植 2 日後よりヒト NH 細胞のマウス脂肪組織への定着と血清中でのヒト IL-5 や IL-13 産生が確認された。またこのマウスにヒト IL-33 を投与すると血清中ヒト IL-5, IL-6, IL-13 値が上昇した(図 2)。

(3) 剖検症例において、糖尿病、メタボリック症候群症例および対照症例の腸間膜における FALC の病理学的解析を行い、NH 細胞の定量解析を行った。その結果、糖尿病およびメタボリック症候群におい FALC 組織の面積の減少傾向を見出した。さらに FALC 中の NH

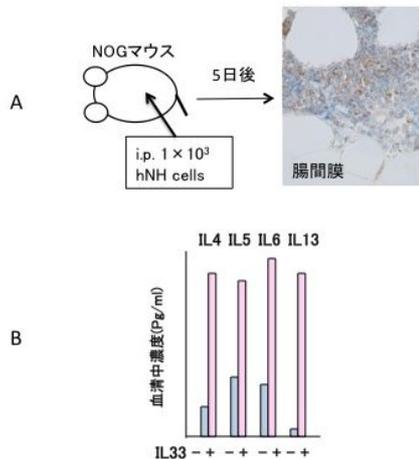


図2 ヒトNH細胞の免疫不全マウス体内での生着とIL-33によるサイトカイン産生亢進
 A ヒトNH細胞を免疫不全マウス(NOG)腹腔へ移植後、マウス腸間膜への定着を示す(青:c-kit 茶:IL-7R)
 B ヒトNH細胞移植マウスへヒトIL-33投与後、24時間後の血清中の各種サイトカイン濃度の上昇が見られる

細胞について ImageProPlus を用いて定量的に解析したところ、FALC 構成細胞中の NH 細胞の割合は、メタボリック症候群において有意に低下が認められた(図 3A)。一方、腸間膜単位面積あたりの NH 細胞数は、糖尿病およびメタボリック症候群において有意に減少していた(図 3B)。また 70 歳以上の高齢者では NH 細胞の比率および面積あたりの総数の減少傾向を認めた。

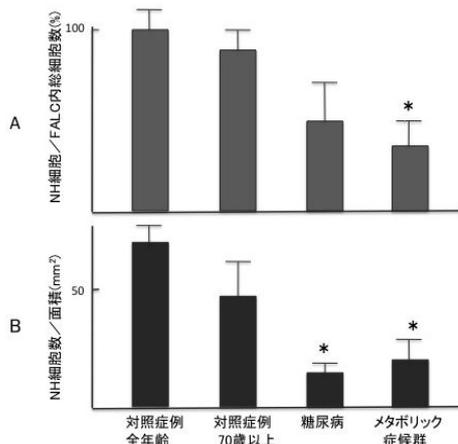


図3 腸間膜NH細胞の糖尿病、メタボリック症候群における減少
 A FALC内におけるNH細胞の割合はメタボリック症候群において減少している(* p>0.01)
 B 腸間膜におけるNH細胞の割合は糖尿病、メタボリック症候群において減少している(* p>0.01)

本研究は、脂肪組織内リンパ組織とその組織を構成する自然免疫担当 NH 細胞がヒトにおいても存在することを示した。ヒトではマウスと異なり NH 細胞マーカー Sca-1 がいないことなど、NH 細胞の存在を証明するには、組織学的な検討や NH 細胞の単離とその機能解析、さらに免疫不全マウスへの移植による自然

免疫担当細胞としての機能の解析などの検討が重要と考えられる。NH 細胞は、通常では微細な FALC 内に存在しており、その数は比較的少数に見える。しかし、腸間膜自体は生体内でも最大の脂肪組織であり、NH 細胞総数はある程度のものとなることが予想される。また、NH 細胞は、IL-2 や IL-7 刺激に反応して増殖しうることから、自然免疫担当細胞として生体防御の際に機能する時には、その局在・量の変化を伴う可能性がある。

近年、メタボリック症候群の本質として、脂肪組織での炎症が考えられているが、この炎症を抑制する非活性型マクロファージ(M2)は、正常の脂肪組織に存在し、IL-4, IL-13 といった NH 細胞が大量に産生するサイトカインによって誘導されることが知られている (Lumeng et al., J Clin. Invest. 117:175, 2007)。これらの知見から、メタボリック症候群において、FALC が、どのような病理学的変化を示すか、さらに NH 細胞がどのような局在変化を示し、その量的・質的变化を伴うか、を明らかにすることは、本疾患の病態解明や治療の開発に有用と推測される。今後、本研究の材料を用いて、マクロファージの定量解析を進めて、NH 細胞動態との関連を解析して行くことが重要と考える。

現在のところ、ヒト NH 細胞と FALC に関する研究は、国内外において報告はほとんどない。マウスでは、NH 細胞と類似した性格と機能を有する細胞が報告されている。Neill らは、小腸、リンパ節、脾臓に、NH 細胞同様の表面マーカーを有する細胞 Nuocyte が存在することを報告している (Nature 464:1367, 2010)。ただし、Nuocyte は細胞表面に MHC class II を発現している点と c-kit 発現において、NH 細胞と相違がある。一方、Saenz らは、NH 細胞と類似した表面マーカーを有する細胞 MPPtype2 を報告しているが、MPPtype2 は、IL-25 刺激により肥満細胞、好塩基球、マクロファージへと分化誘導する点が NH 細胞とは異なる。これらの細胞の異同については、さらに詳細な検討を要するが、いずれの報告においても、脂肪組織での局在や FALC の記載はなく、その生理的な局在と機能はいまだ不明である。またこれらの細胞のヒトでのカウンターパートとなる細胞の同定や解析が期待される。

本研究は、研究代表者らがマウスで発見した新たなリンパ球 NH 細胞と脂肪組織に随伴するリンパ組織 FALC について、詳細な組織解剖学的あるいは免疫学的研究を通じて、これらの細胞・組織の形態や機能をヒトにおいて明らかにするとともに、NH 細胞が関連する可能性がある疾患について、病理学的に解析したものであり、これらの知見は、ヒト自然

免疫系の新たな存在やその機能を明らかにし、代謝性疾患における動態や役割に迫ることで、予防や治療への応用も可能となることが期待されるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

①Hatano R, Yamada T, Matsuoka S, Iwata S, Yamazaki H, Komiya E, Okamoto T, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C Establishment of monoclonal anti-human CD26 antibodies suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue. Diagnostic Pathology 査読有 (in press) 2014 9:30. doi: 10.1186/1746-1596-9-30.

②Kou K, Saisho Y, Satoh S, Yamada T, Itoh H Islet number rather than islet size is a major determinant of beta and alpha cell mass in humans. J Clin Endocrinol Metab. 査読有 2014 99:1733-1740. doi: 10.1210/jc.2013-3731.

③Kou K, Saisho Y, Satoh S, Yamada T, Itoh H. Change in beta cell mass in Japanese nondiabetic obese individuals. J Clin Endocrinol Metab 査読有 2013 98:3724-3730, doi: 10.1210/jc.2013-1373.

④Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in matted mice. J Allergy Clin Immunol 査読有 2013 132:1111-1120. doi:10.1016/j.jaci.2013.08.027.

⑤Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. Br J Haematol. 査読有 2013 162:263-77. doi: 10.1111/bjh.12378.

[学会発表](計3件)

①Nagai S, Yoshizawa A, Baba Y, Yamada T, Nishimura T, Koyasu S The Pathogenesis of pulmonary alveolar proteinosis in PI3K deficient mice. 日本免疫学会総会 2013年12月11-13日 千葉・幕張

②侯金成 税所芳史 佐藤誠治 山田健人、伊藤裕 ヒトにおいて 細胞量は膵島サイズではなく膵島数と相関する 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 2013年5月16-18日 熊本

③ Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawakami H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiyama T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M A homozygous nonsense mutation of gene for *Matrin*, a component of lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in mice. International Investigative Dermatology, May 8-11, 2013, Edinburgh, Scotland

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.keio-pathology.net/Yamada_gr.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 健人(YAMADA Taketo)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 60230463

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

林 睦(HAYASHI Mutsumi)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 60327575

西田 浩子(NISHIDA Hiroko)

慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 80317130