

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670237

研究課題名(和文)大腸ILC2細胞の機能的特徴の解明

研究課題名(英文)Analysis of group 2 innate lymphoid cells in colonic lamina propria

研究代表者

新 幸二(Atarashi, Koji)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：60546787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然リンパ球(ILC)は既存のリンパ球マーカーおよび特異的抗原受容体を発現していないリンパ球系の細胞群である。ILCの内Th2サイトカインを産生するILC2は肺やリンパ節に存在し、アレルギーや寄生虫の感染防御に関与していることが明らかになっている。しかし、大腸粘膜固有層に多く存在しているILC2の誘導機構や機能についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究ではまず、大腸ILC2と肺ILC2の性質の比較を行った。その結果、大腸ILC2ではIL-4、MHC II、ApoEなどの遺伝子が高発現していた。また、大腸ILC2のIL-4の発現には食餌中のビタミンB1が必要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Innate lymphoid cells (ILCs) are newly described immune lymphoid cells but do not express antigen-specific receptors. ILC type 2 (ILC2) cells have important functions in innate immune responses to helminth infection and in the regulation of allergic inflammation in the lung. ILC2 cells are abundant in colonic lamina propria, however, the regulatory mechanisms of the development and the role of ILC2 cells in the intestine are poorly understood. We identified that gut ILC2 expressed high level of IL4, H2-Ab1 (MHC class II) and ApoE compared with lung ILC2. We also discovered IL4 expression in gut ILC2 is dependent on dietary vitamin B1. These results indicate that gut ILC2 exhibit unique development programs and functions.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：自然リンパ球 IL-4 ビタミン

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球 (innate lymphoid cells, ILCs) はリンパ球様の形態を示す細胞であるが、既存のリンパ球マーカーおよび獲得免疫系細胞の特徴である遺伝子再構成に伴う特異的抗原受容体を発現していない細胞群である。以前から知られている Natural killer (NK) 細胞や Lymphoid tissue inducer (LTi) 細胞なども含まれるが、ここ数年の間に IL-17 や IL-22 を産生する group3 ILCs (ILC3)、また IL-5、IL-13 などの Type2 サイトカインを産生する group 2 ILCs (ILC2) などの新しいサブセットが発見され非常に注目されている。われわれは通常の SPF マウスの大腸粘膜固有層に IL-4、IL-5、IL-13 を高産生する ILC2 と予想される細胞群が非常に多く存在していることを突き止めている。これまでの研究において、ILC2 は肺やリンパ組織に少数のみ存在し、寄生虫感染時や IL-25、IL-33 などのサイトカイン刺激時において誘導・活性化されることが明らかになってきている。しかしながら、ILC2 が大腸粘膜固有層に常在していること、腸内細菌との関係についての報告はなされていなかった。また、ILC2 細胞にはまだ特異的なマーカーが同定されておらず、特徴・機能の解析は主に T 細胞と B 細胞がいない Rag 欠損マウスでの Thy1 抗体による ILC 細胞全体の depletion や T 細胞、B 細胞、NK 細胞、ILCs がいない Il2rgRag 二重欠損マウスに ILCs を入れ戻す方法により行われている。そのため、ILCs の詳細な性質・機能および獲得免疫系との関係についてはあまり解析が進んでいない。

2. 研究の目的

現在、ILC2 の特異的マーカーが同定されていないため、詳細な性質解析はあまり進んでいない。そこで、Th2 サイトカイン

群のレポーターマウスを用いて ILC2 細胞に特異的に発現している表面マーカーの探索・同定および機能の解析を行う。また、ILC2 が SPF マウスの大腸粘膜固有層に非常に多く存在していることから、ILC2 は腸内細菌や食餌成分の影響を受けていると考えられる。そこで、無菌マウスや成分調整した餌を用い、大腸 ILC2 がどのようなメカニズムで誘導・活性化されているかを解析する。ILC2 はアレルギーや喘息、アトピー性皮膚炎などの Th2 タイプの疾患との関わりが示唆されており、本研究により明らかになると予想される ILC2 の特徴・誘導メカニズムはこれら疾患の病因の解明、治療法への応用につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) ILC2 細胞の性質・特性の解析

これまで大腸粘膜固有層に存在する Thy1 陽性、CD3 陰性、CD127 (IL-7 受容体 α 鎖) 陽性、T1/ST2 (IL-33 受容体) 陽性の細胞群が IL-4、IL-5、IL-13 を大量に産生していることを同定している。この細胞はこれまでに報告された ILC2 と考えられるが、ILC2 に発現している Thy1、CD127、T1/ST2、c-kit などは他の造血系細胞にも発現していることが知られ、ILC2 細胞の特異的マーカーとしては用いることができない。そのため、IL-4、IL-5、IL-13 産生細胞を *in vivo* で検出するためレポーターマウスを作製する。IL-4、IL-5、IL-13 遺伝子を含む BAC の IL-4、IL-5、IL-13 遺伝子の ATG 直下にそれぞれ異なる蛍光タンパク質を挿入した BAC を作成し、トランスジェニックマウスを作製する。

蛍光タンパク質を発現する lineage 陰性の細胞をソーティングし、マイクロアレイや RNA-seq により ILC2 に特異的に発現している遺伝子を探索する。ILC2 特異的遺

伝子欠損マウスを作成し、ILC2 の分化や機能にどのような異常があるかを解析する。

(2) 大腸 ILC2 細胞の誘導メカニズムの解析

SPF マウスと無菌マウスの大腸粘膜固有層から細胞を単離し ILC2 の割合および Th2 サイトカイン産生を比較する。腸内細菌が ILC2 の誘導に関与している場合は、どのような細菌がその役割を担っているかについてノトバイオマウスを作製し解析を行う。同様に、細菌からのどのような刺激が ILC2 の誘導に必要であるか検討するため、細菌の構成成分を認識する受容体である Toll-like receptor (TLR) の必須アダプター分子である MyD88/Trif 二重欠損マウスや NOD1、2 の必須アダプター分子である Rip2 欠損マウスについても解析を行う。また、通常の餌から主要な構成成分を欠乏させた餌で飼育することにより、食餌成分による ILC2 の影響を解析する。

4 . 研究成果

(1) ILC2 細胞の性質・特性の解析

当初予定していた BAC を用いたレポーターマウスの作成はコンストラクトを 2 種類、それぞれ 2 回受精卵にインジェクションしたが、きちんと染色体に組み込まれた個体を得ることができなかった。そこで、アメリカ NIH の William E Paul 博士から IL-4 遺伝子座に AmCyan、IL-13 遺伝子座に DsRed が挿入された BAC-Tg レポーターマウス (4C13R マウス) を分与して頂いた。このマウスの大腸粘膜固有層から Thy1 陽性 CD3 陰性の ILC 分画での AmCyan 陽性細胞と DsRed 陽性細胞を単離し、遺伝子発現を解析した。大腸 T 細胞や肺 ILC2 と比較し、大腸 ILC2 に特徴的に発現している遺伝子として、IL-4、MHC classII (H2-Ab1)、ApoE などが見つかった。ILC3

でも MHC class II が発現し、免疫抑制に寄与していることが知られている。そこで、現在 ILC2 特異的 MHC class II 欠損マウスの作成を試みている。

(2) 大腸 ILC2 細胞の誘導メカニズムの解析

無菌マウスでは SPF マウスと比較して、ILC2 自体の細胞数や割合に違いはないが、ILC2 からの IL-4 産生が減少していることがわかった。このことから、大腸 ILC2 は程度は大きくないが腸内細菌の刺激を受け活性化していることが明らかになった。

一方で餌成分からビタミン B1 のみを欠乏させた餌で飼育したマウスでは大腸 ILC2 からの IL-4 産生が著明に減少していた。このことから大腸 ILC2 からの IL-4 産生は食餌中のビタミン B1 が必要であることがわかった。ビタミン B1 はピルビン酸からアセチル CoA への変換に補酵素として重要な働きをしていることが知られており、ビタミン B1 が欠乏すると TCA サイクルが回らなくなり、解糖系によって作られた乳酸がたまと予想された。そこで、乳酸が ILC2 からの IL-4 産生を負に制御しているかを検討した。その結果、*in vitro* において大腸 ILC2 を ionomycin で再刺激する際に、乳酸を添加すると、ILC2 からの IL-4 産生が強く抑制されることが明らかになった。このことから、ビタミン B1 欠乏による IL-4 産生の低下は、大腸 ILC2 で乳酸がたまることでカルシウム依存的な IL-4 産生が阻害されることにより引き起こされていると考えられた。今後、乳酸がどのようなメカニズムでカルシウムシグナルを抑制しているかを解析していきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

論文発表準備中

〔学会発表〕(計 3 件)

1. ATARASHI Koji, TANOUE Takeshi, NAGANO yuji, NARUSHIMA seiko, UMESAKI Yoshinori, HONDA kenya, Bacterial adhesion to epithelial cells is required for Th17 induction. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 12 日、京都
2. TANOUE Takeshi, ATRASHI Koji, NAGANO Yuji, NARUSHIMA Seiko, UMESAKI Yoshinori, HONDA Kenya, Microbiota-dependent induction of IL22-producing ILC3 in the gut. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 12 日、京都
3. NAGANO Yuji, ATARASHI Koji, TANOUE Takeshi, NARUSHIMA Seiko, HONDA Kenya, Intestinal Th17 response to pathogenic microorganisms. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 12 日、京都

〔図書〕(計 2 件)

1. 新 幸二、腸内細菌による腸管 T 細胞の誘導機構の解明、腸内細菌学雑誌 29 巻 1 号 p1-7 (2015)
2. 新幸二、腸内細菌による腸管制御性 T 細胞の誘導と炎症制御、別冊 Bio Clinica: 慢性炎症と疾患 2 巻 2 号 p122-127 (2013)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新 幸二 (KOJI ATARASHI)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学
学研究センター・客員研究員

研究者番号 : 60546787

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし