

平成 29 年 12 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06866

研究課題名（和文）胃における ILCs の局在とその役割解明に関する研究

研究課題名（英文）Protective function of stomach-ILC2s induction of IgA for bacteria elimination

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・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：90732446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：近年注目されている自然リンパ球（Innate Lymphoid Cells; ILCs）は、一般的な自然免疫細胞と獲得免疫細胞の中間的な役割を果たすことで様々な疾患や感染防御に重要であることが判明している。まず胃に存在する ILCs の解析を行ったところ、2型のサイトカインを産生する ILC（ILC2）がほとんどを占めていることが判明した。そして、無菌マウスでは胃の ILC2 が劇的に減少していることも判明し、胃に存在する細菌叢が ILC2 を誘導していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Intestinal tract is recently well studied to lead immune-responses induced by commensal bacteria stimulation, whereas stomach have been missed the immunological function on account of believing for only having sterilization of foods. Here, we report that stomach is also playing as “functional responder” following dominance of type 2 innate lymphoid cells (ILC2s). Further, stomach-ILC2s are exposed to commensal bacteria “Bacteroidales”, which is stationary forming population in mucin-layer of stomach. The clearance of pathogenic bacteria “Helicobacter pylori (H.pylori)” in stomach is also regulated by ILC2s-driven defense through IgA induction. Thus, ILC2s in stomach are key factor for regulating total microbiota symbiosis as first barrier.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：ILCs Microbiota

### 1. 研究開始当初の背景

胃は強酸性が維持されており、以前は臓器としての役割は食物の消化・殺菌を行うのみであると考えられてきた。*H.pylori* が胃に生着する報告を皮切りに、胃に存在する *H.pylori* との関連性に着目され始めたが、現在まで行われている研究は「組織としての胃」に関する研究がほとんどである。実際に、様々な科学系雑誌で報告されている胃と細菌に関する研究は、主に *H.pylori* 感染による胃ガン発症メカニズムや、または *H.pylori* 自体の構造からの感染機構解明などに関する研究である。免疫応答に制限すればT細胞応答とガンに関する研究を行っているグループは少数存在するが、胃に存在する共生細菌と免疫担当細胞との関連性については今のところ報告は全くなかった。

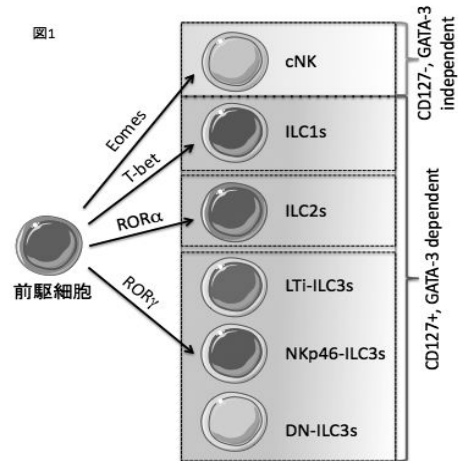
### 2. 研究の目的

近年、粘膜組織、特に腸管におけるユニークな免疫応答が注目され、疾患と腸内細菌叢との関連に対する研究が世界中で競争的に研究が進められている。今までの研究では、主に腸に注目し様々な報告がされてきたが、「胃と共生細菌」に関する報告は全くない。胃は摂取した食物を消化する為に強酸性に保たれており、胃への細菌叢による免疫学的な影響は低いという認識であった。

近年、**自然リンパ球【Innate Lymphoid cells: ILCs】**が体内の様々な組織で恒常性を維持する重要な役割を担っていることが判明した。この ILCs は細胞の性質や転写因子の発現の違いにより ILC1、ILC2、ILC3 の3つのサブセットとして分類されている(図1) [2,3,4,5,6]。これら ILCs の研究により、今まで獲得免疫だけでは説明できなかった疾患の発症メカニズムが初めて明らかになるなど、現在では世界中で注目されている細胞群である。[1]

しかしながら申請者の研究により、胃にも免疫学的に重要な役割が存在し[7]、そしてこの応答は主に細菌によって誘導される2型自然リンパ球によるものである事も明らかになってきた。胃は食物を分解・殺菌する為だけの臓器では無く、食事摂取と同時に上昇する感染のリスクを化学的および免疫学的に制御することで、腸管に到達する前に細菌叢の“選別”を行う重要な臓器であることが示唆された。よって本研究では、胃に存在する免疫担当細胞(本研究では特に2型自然リンパ球: ILC2s)の役割を新たに明らかにする事で、疾患を制御する因子を同定し解明することを目的とする。また、同時に ILCs へのさらなる理解を基本とし、胃に存在する細菌(共生細菌また

は病原性細菌)の影響と感染による発症機構を明らかにし、「胃」における ILCs の防衛的役割を解明する。実際に、胃に関しての免疫学的な報告は非常に少ないので、これらが明らかになることで粘膜組織の多臓器間ネットワークを介するサイトカイン産生制御法や発症メカニズムを利用した抗感染症医薬の開発に繋がることが期待できると考えている。



### 3. 研究の方法

胃に存在する ILC2 に着目し、その細胞の性質・役割を Flow cytometry や無菌マウスの解析により明らかにする。同時に、胃内に存在する共生細菌について次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により、どのような細菌が存在しているかを確認・同定する。また、単一の細菌が疾患と関連し、ILCs がその制御に関わっているかを明らかにするために、Mono-associate マウス(単一細菌のみが定着した特殊なマウス; 本実験の場合は *H.pylori*)を作成し、免疫応答と疾患との関連性を解析する。以上の研究により、胃に存在する ILCs と感染・疾患などの役割が明らかになることで、その制御機構を解明することが可能であると考えられる。

#### 【実験計画】

- ILCs サブセットの表現型・機能の同定  
C57BL/6 または *Rag<sup>-/-</sup>* マウスの胃から細胞を単離し、細胞内染色にて各種転写因子(Eomes, T-bet, GATA3, ROR $\alpha$  など: 図1 参照)発現と IFN- $\gamma$  を始めとした各種サイトカイン産生を比較し、DP-ILC 及びその他 ILCs と比較・検討した。

- 共生細菌を用いた感染実験  
当該研究(胃)では、まず ILCs の同定を念頭に実験計画を組み、その後、感染との関連性を精査する為に感染実験を行う。本研究では、胃に特異的に感染する *H.pylori* を

使用した。無菌マウスに経口で感染させることで、ILC2s に対する *H.pylori* 単独の影響を精査。

– 胃に存在する共生細菌と ILCs の関連性の確認

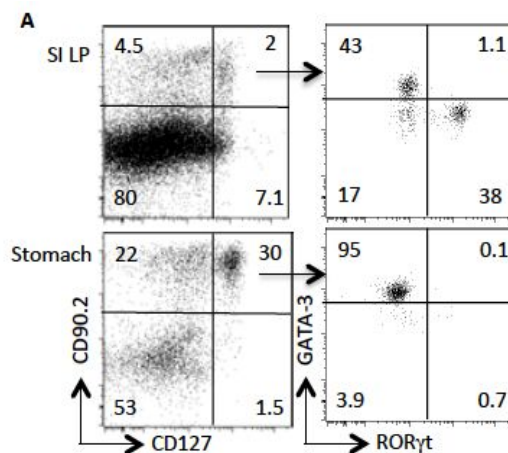
無菌マウスの解析により、無菌条件下において胃に存在する ILCs の影響・変化を細胞数及び機能（サイトカイン産生能）を含め比較/検討した。

– 次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析（メタゲノム解析）により胃に存在する共生細菌の同定

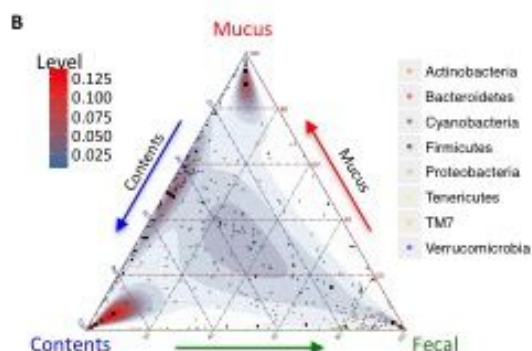
メタゲノム解析により胃組織に存在する共生細菌の組成並びにそれらが保有する遺伝子を同定し、共生細菌と ILC の関連性を検討した。

#### 4. 研究成果

胃に存在する ILCs の解析を行ったところ、2 型のサイトカインを産生する ILC (ILC2) がほとんどを占めていることが判明した (図 A)。

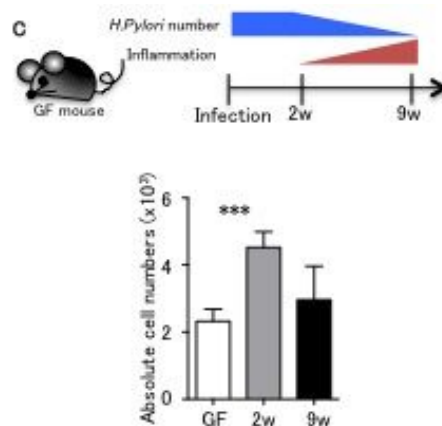


そして、無菌マウス(GF)では胃の ILC2 が劇的に減少していることも判明し、胃に存在する細菌叢が ILC2 を誘導していることが明らかになった。



また、胃内容物およびムチン層の菌叢解析を行ったところ、非常に多くの菌種・菌数が確認された(図 B)。この結果は非常に驚く物であり、胃に存在する菌が直接的に免疫応答に何らかの影響を与えている可能性を強めるものであった。

無菌マウスと比較して、SPF マウスでは ILC2s が誘導されている結果からも、胃に存在している菌と ILC2s との関連性を示していた。また、この ILC2s は特に IL-5 や IL-13 を産生し B 細胞を活性化して IgA の産生を誘導していることも明らかとなり、胃に存在する特定の共生細菌特異的排除に働いていた。また、病原性細菌として知られている *H.pylori* 感染時にも同様な排除機構が働いている事が判明し、胃に存在する ILC2s が細菌叢と相互作用を行い、体内の細菌叢コントロールを行っていることが示唆された。(Under review)



#### <引用文献>

- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N., Mebius, R. E., Powrie, F. and Vivier, E., Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol.* 13: 145-149. 2013
- Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C. A., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J. J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., Eberl, G. and Di Santo, J. P., Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity.* 29: 958-970. 2008
- Satoh-Takayama N, Serafini N, Thomas V, Rekiki A, Frankel G, Eberl G and Di Santo JP. CXCR6 controls functional topology of gut IL-22 producing innate lymphoid cells. *Immunity*, 41: 776-788, 2014
- Maloy, K. J. and Uhlig, H. H., ILC1 populations join the border patrol. *Immunity.* 38: 630-632. 2013
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H. and Koyasu, S., Innate production of T(H)2 cytokines by adipose

tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 463: 540-544. 2009

6. Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K., Bucks, C., Kane, C. M., Fallon, P. G., Pannell, R., Jolin, H. E. and McKenzie, A. N., Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 464: 1367-1370. 2010
7. Muhammad, J. S., Zaidi, S. F. and Sugiyama, T., Epidemiological ins and outs of helicobacter pylori: a review. *J Pak Med Assoc*. 62: 955-959. 2012

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：特になし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤(高山) 尚子 (SatoH-Takayama Naoko)  
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医  
科学研究センター・研究員  
研究者番号：90732446

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

三室 仁美 (Mimuro Hitomi)  
大阪大学微生物病研究所  
研究者番号： 80396887