

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09036

研究課題名(和文) 組織常在性自然IL-5産生細胞の活性化機構と炎症及び線維化制御

研究課題名(英文) Activation machinery of tissue-resident innate IL-5-producing cells and their roles in inflammatory diseases and fibrosis

研究代表者

井関 将典 (Iseki, Masanori)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30532353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アレルギーなどに重要なTh2サイトカインを産生する細胞として2型自然リンパ球(ILC2)が発見され、様々な炎症疾患に重要であることが分かってきている。我々はILC2のIL-5産生に着目し肝臓での炎症、繊維化におけるILC2の役割を調べた。その結果ILC2のIL-5産生および好酸球の活性化は肝臓の炎症に必須ではないことが分かった。また油脂成分の腹腔内投与によりマクロファージ、サイトカインIL-33、TSLPを介した肝臓ILC2の活性化が誘導できることも新たに分かった。

研究成果の概要(英文)：Recently, novel Th2 cytokine-producing cells, type 2 innate lymphoid cells (ILC2s) were identified and analyzed as an important cells for various inflammatory diseases. In this study, we examined a role of ILC2s in liver inflammation and fibrosis with IL-5 reporter mice that we newly generated. We found that IL-5 production from ILC2s and eosinophil activation are not necessary for the development of liver inflammation and the following fibrosis. We also found that ILC2s were activated by intraperitoneal administration of oil (e.g. mineral oil and olive oil), and this activation was mediated by peritoneal cells, especially macrophages and cytokine IL-33 and/or TSLP.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 ILC2 好酸球 炎症 IL-5

1. 研究開始当初の背景

腸や肺などの免疫組織以外の組織で Th2 型サイトカインである IL-5、IL-13 を大量に産生する 2 型自然リンパ球 (ILC2) が発見され、組織炎症に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている。我々は IL-5 遺伝子座に蛍光タンパク質遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (IL-5 レポーターマウス) を新たに開発し、T 細胞やマスト細胞、好酸球、好塩基球等の既知の IL-5 産生細胞以外に恒常的に IL-5 を産生する細胞 (自然免疫系 IL-5 産生細胞) が肺及び気道に常在すること、がん細胞の肺転移抑制に機能していることを明らかにしてきた。更なる解析を進め、我々は外来抗原への暴露は少ないと考えられる腎臓や肝臓、筋組織さらに皮下脂肪組織にも自然免疫系 IL-5 産生細胞が定常状態より存在することを見いだした。腎臓におけるこれらの機能については現在のところ全く不明である。肝臓では IL-33 により活性化される ILC2 由来の IL-13 によって肝硬変 (繊維化) が進行すること、脂肪組織では ILC2 と好酸球の存在が脂肪の慢性炎症を抑制し耐糖能の維持に寄与していることが報告されているが、組織に常在する意義ならびに各組織内での活性化機構についてまだ十分に明らかになっていない。

2. 研究の目的

我々が独自に新しく開発した IL-5 レポーターマウスの解析より、肝臓、腎臓など外界と直接接触することのない非リンパ系組織内にも常在することが明らかになった自然免疫系 IL-5 産生細胞、それに依存して増減する組織内の好酸球に注目し、組織障害や各種ストレス負荷下における活性化機構や制御分子を解明し、非リンパ系組織に常在する意義と細胞機能を明らかにすることを目的とする。更に障害で誘導される炎症や組織修復、組織の線維化でのそれらの細胞群の役割を明らかにする。また、我々が見出した自然リンパ球における新しい IL-5 産生誘導法についても詳細な分子機構を解明し、新規の組織障害軽減または制御法に繋がる知見収集を行う。

3. 研究の方法

(1) 肝臓の慢性炎症から誘導される線維化に ILC2、IL-5、好酸球はどのように関与しているか?

IL-5 遺伝子欠損マウス (IL-5 レポーターマウスのホモ接合体) を用いて肝臓の慢性炎症から線維化を誘導するモデル実験を行い、炎症や線維化の誘導に IL-5 が重要かどうかを明らかにする。また IL-5 レポーターマウス (ヘテロ接合体) を用いて肝臓に炎症を誘導し、炎症誘導初期に IL-5 を産生する細胞

を同定する。また IL-5 の標的である好酸球の数や活性化状態についても検討を行い IL-5 と好酸球活性化が肝臓の線維化に与える影響を解明した。

(2) ILC2 からの新しい IL-5 産生誘導機構の解明

予備実験の際に、ミネラルオイル等の油性溶媒の腹腔内投与によって肝臓の ILC2 から IL-5 産生が誘導されることを新たに見出した。油性溶媒の成分が直接 ILC2 に作用するのか等、分子機構の詳細を解析し、全く新しい ILC2 の IL-5 産生誘導機構を明らかにする。また、肝臓のみならず、腎臓や皮膚、腸管に存在する ILC2 から同様に IL-5 産生が誘導されるかどうかを調べる。これらの結果を元に、ILC2 からの IL-5 産生の阻害によって様々な組織の炎症性疾患を抑えられる可能性についても検討した。

4. 研究成果

(1) 肝臓の慢性炎症から誘導される線維化に ILC2、IL-5、好酸球はどのように関与しているか?

予備実験として炎症誘導後の早期の反応を見るため、四塩化炭素 (CCl₄) の腹腔内投与 1 日後や 2 日後の肝臓をコラゲナーゼ処理し、密度勾配遠心法によって免疫細胞を採取し、フローサイトメトリーを用いて解析した。投与 1 日後で肝臓内の IL-5 陽性 ILC2 の増加と好酸球数の増加が観察され、2 日後ではそれらが更に増加したが、IL-5 欠損マウスでは好酸球数の増加は観察されなかった (図 1)。炎症早期の好酸球浸潤には IL-5 が必須であることが明らかになっていた。

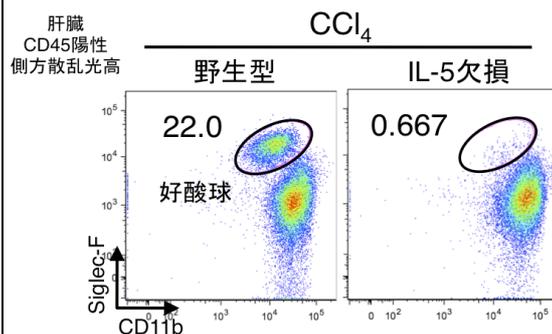


図 1. 野生型、IL-5 欠損マウスに CCl₄ を投与し 1 日後の肝臓細胞の解析。数字は好酸球の % を示す。

ILC2 から産生される IL-5 が肝臓の慢性炎症によって引き起こされる線維化に重要であるかどうかを調べるために IL-5 欠損マウスに CCl₄ を繰り返し腹腔内投与し肝線維症誘導実験を行った。CCl₄ を週二回、4 週間投与後に肝臓組織の切片を作成し、シリウスレッド染色を行って組織内のコラーゲンを染色、染色された部分の面積を測定し線維化の

程度を判定した。その結果、IL-5 欠損マウスと野生型マウスの間に肝線維化の程度に差はなく、慢性炎症によって誘導される肝臓の線維化には ILC2 からの IL-5 は必須ではないことが明らかとなった (図 2)。

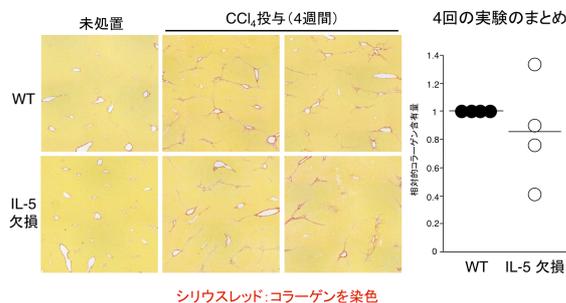


図 2. 野生型、IL-5 欠損マウスに CCl4 を 4 週間投与し線維化を誘導した肝臓の解析。右グラフは相対的なコラーゲンの割合をまとめたものを示す。

この結果は予想に反するものであった。しかし IL-5 によって活性化される好酸球は組織修復に必要なとの報告もあることから、我々は別の炎症モデル実験としてコンカナバリン A (ConA) による肝臓炎症モデルを用いて肝臓における ILC2、好酸球の活性化について検討した。ConA 投与後、T 細胞の活性化は観察できたが ILC2 からの IL-5 産生は検出されなかった。また肝臓内の好酸球は増加していたことから、ConA 肝炎モデルでの好酸球増加は ILC2 を介していないことが分かった。

当初の予想に反して肝臓の炎症モデルでは ILC2 が産生する IL-5 の関与が観察できなかったため、最終年度には肺組織の炎症についても解析を行った。その結果、免疫抑制剤シクロスポリン A (CsA) がパピイン投与後の肺組織中の ILC2 の数と活性化 (IL-5 の発現) を間接的に抑制することを明らかにした。今後はこの結果が肝臓など他の組織でも同様かどうかを解析していく必要がある。

(2) ILC2 からの新しい IL-5 産生誘導機構の解明

予備実験の際に、マウスに油脂溶媒 (ミネラルオイル) のみを腹腔内投与することで肝臓内 ILC2 に IL-5 産生を誘導できることを我々は新たに発見した (図 3)。その機構を明らかにするため、オリーブオイル、不完全フロイントアジュバント等の様々な溶媒を腹腔内投与したところ、いずれの場合も IL-5 産生が誘導された。更に別のマウスから採取した皮下脂肪、内臓脂肪を腹腔内投与しても IL-5 産生が誘導された。またオリーブオイルの経口投与では肝臓 ILC2 の IL-5 産生は誘導されなかった。これらの実験の際に脂肪の ILC2 についても解析したところ、脂肪 ILC2 は肝臓のものよりも活性化していること、更に油脂溶媒によってより強く IL-5 産生が誘

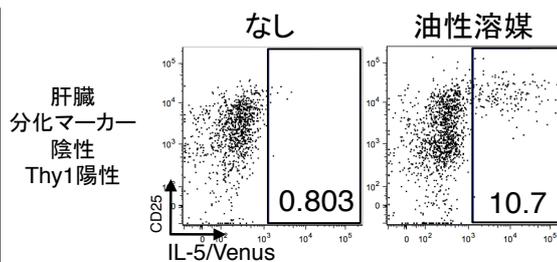


図 3. IL-5 レポーターマウスに油性溶媒 (ミネラルオイル) を投与し 2 日後の肝臓細胞の解析。横軸は IL-5 の産生を示している。

導されることを明らかにすることができた。これらの現象は腹腔内細胞の除去によって観察できなくなることから他の細胞を介した活性化の可能性が示唆される。最終年度にはマクロファージを特異的に除去するクロドロネートリポソームの投与により腹腔内マクロファージが重要であることを明らかにした。これまでに知られていない ILC2 の新規活性化機構の解明が期待できる。

油脂溶媒の腹腔内投与による ILC2 活性化にどのようなサイトカインが関与しているかを明らかにする目的で、これまで ILC2 を活性化することが知られているサイトカイン IL-33、TSLP の受容体遺伝子欠損マウスと IL-5 レポーターマウスの二重、三重変異マウスを作製し、これら既知のサイトカインシグナルの必要性を調べた。IL-33 受容体、TSLP 受容体それぞれの単独欠損では ILC2 の IL-5 産生に影響はなかったが、両方を欠損させると IL-5 陽性細胞の数、IL-5 の発現レベル共に低下した。IL-33、TSLP のいずれかが油脂溶媒による ILC2 の活性化に必要であることが示唆された (図 4)。

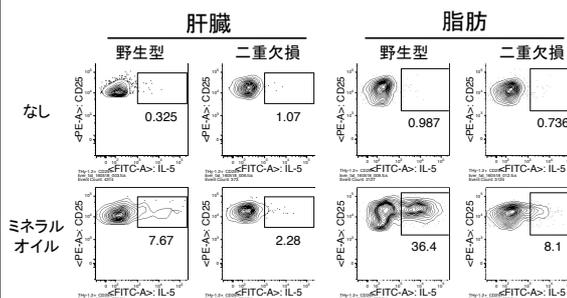


図 4. 野生型および IL-33 受容体 TSLP 受容体二重欠損マウス背景の IL-5 レポーターマウスに油性溶媒 (ミネラルオイル) を投与し 2 日後の肝臓、脂肪組織の分化マーカー陰性 Thy1 陽性 CD25 陽性細胞 (ILC2) の解析。横軸は IL-5 の産生を示している。

以上の実験結果より、CCl4 投与で誘導される肝臓への初期の好酸球浸潤には IL-5 が重要な役割をしていることが明らかになった。しかしながら IL-5 はその後引き起こされる肝臓の線維化には必須でないことが分かった。以前の報告では ILC2 由来の IL-13 が肝

臓の繊維化に重要であると報告されており、ILC2が大量に産生するTh2サイトカインの間でも炎症性疾患における役割に大きな違いがあることが示唆された。今後は肝臓以外の他の組織（腎臓や脂肪など）における ILC2 活性化と炎症性疾患の役割についても解析を進めていきたい。

また油脂溶媒を腹腔内投与した際に肝臓や脂肪組織内の ILC2 が活性化を起こすことを新たに見出し、その現象は腹腔内マクロファージとサイトカイン IL-33 または TSLP を介していることを明らかにした。どちらのサイトカインも ILC2 を活性化することは過去に報告されているが、サイトカインの産生細胞およびマクロファージがどのように関与しているかを明らかにしていく必要がある。予備的な結果では油脂溶媒を腹腔内に連続投与することで一時的な IL-5 依存性の体重減少が観察されている。組織炎症のみならず生体内全体への影響も示唆され、今後注目して解析を進めていきたいと考えている。

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)

1. Kudo F, Ikutani M, Iseki M, Takaki S, Cyclosporin A indirectly attenuates activation of group 2 innate lymphoid cells in papain-induced lung inflammation, *Cellular Immunology*, 査読有, Vol. 323, 2018, pp. 33-40, DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.10.010, Epub 2017 Oct 27.
 2. Ikutani M, Tsuneyama K, Kawaguchi M, Fukuoka J, Kudo F, Nakae S, Arita M, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K, Prolonged activation of IL-5-producing ILC2 causes pulmonary arterial hypertrophy, *JCI Insight*, 査読有, Vol. 2, 2017, e90721, DOI: 10.1172/jci.insight.90721.
 3. Suzuki-Yamazaki N, Yanobu-Takanashi R, Okamura T, Takaki S, IL-10 production in murine IgM(+) CD138(hi) cells is driven by Blimp-1 and downregulated in class-switched cells, *European Journal of Immunology*, 査読有, 2017, Vol. 47, pp. 493-503, DOI: 10.1002/eji.201646549, Epub 2017 Jan 10.
 4. Lee JH, Ji ST, Kim J, Takaki S, Asahara T, Hong YJ, Kwon SM, Specific disruption of Lnk in murine endothelial progenitor cells promotes dermal wound healing via enhanced vasculogenesis, activation of myofibroblasts, and suppression of inflammatory cell recruitment, *Stem Cell Research & Therapy*, 査読有, Vol. 7, 2016, pp. 158, DOI: 10.1186/s13287-016-0403-3.
5. Kudo F, Ikutani M, Seki Y, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Oshima K, Hattori M, Nakae S, Takatsu K, Takaki S, Interferon- γ constrains cytokine production of group 2 innate lymphoid cells, *Immunology*, 査読有, Vol. 147, 2016, pp. 21-29, DOI: 10.1111/imm.12537, Epub 2015 Oct 25.
- [学会発表] (計 17 件、一部略)
1. Mori T, Yamazaki N, Takaki S, Lnk/Sh2b3 regulates adipose inflammation and glucose tolerance through group1-ILCs, The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017年12月14日、仙台国際センター(宮城)
 2. Tenno M, Takaki S, Disruption of Lnk increases severity of dextran sulfate sodium-induced acute colonic inflammation, The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017年12月13日、仙台国際センター(宮城)
 3. Iseki M, Yahagi A, Ishihara K, BST-1/CD157 on B cells negatively regulates Toll-like receptor signaling, The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017年12月12日、仙台国際センター(宮城)
 4. Saito Y, Mori T, Kawamura YI, Dohi T, Takaki S, Activation of NK/group1-innate lymphoid cells in adipose tissues depends on the composition of fatty acids in high fat diet, The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017年12月12日、仙台国際センター(宮城)
 5. Ikutani M, Tsuneyama K, Nakae S, Takatsu K, Takaki S, Chronic IL-33-induced inflammation results in pulmonary arterial hypertrophy, The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017年12月12日、仙台国際センター(宮城)
 6. Yamazaki N, Takaki S, IL-10 derived from IgM+CD138hi cells support the antigen-specific antibody production, The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016年12月6日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)
 7. Mori T, Yamazaki N, Takaki S, Lnk/Sh2b3, an autoimmune disease-associated gene, prevents adipose tissue inflammation by controlling IL-15-dependent cell functions, The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016年12月6日、沖縄コンベンション

センター（沖縄）

8. Ikutani M, Tsuneyama K, Kudo F, Takatsu K, Takaki S, Chronic IL-33 treatment results in pulmonary arterial hypertrophy mediated by ILC2 and eosinophils, The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016年12月6日、沖縄コンベンションセンター（沖縄）
9. Ishihara K, Yahagi A, Nishimoto T, Iseki M, Lack of microbiota revealed the role for BST-1/CD157 to maintain the homeostasis at mucosa-MLN interface, The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016年12月5日、沖縄コンベンションセンター（沖縄）
10. Iseki M, Kudo F, Takaki S, Germinal center B cell survival and optimal IgE production are controlled by Lnk/Sh2b family adaptor protein Aps/Sh2b2, The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2015年11月20日、札幌コンベンションセンター（北海道）
11. Mori T, Yamazaki N, Takaki S, An autoimmune disease-associated gene, Lnk/Sh2b3 controls inflammation in adipose tissue and reduces the risk for onset of diabetes, The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2015年11月19日、札幌コンベンションセンター（北海道）
12. Kudo F, Takaki S, Inhibitory effects of interferon- γ on cytokine production in group 2 innate lymphoid cells, The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2015年11月18日、札幌コンベンションセンター（北海道）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井関 将典 (ISEKI MASANORI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：30532353

(2) 研究分担者

高木 智 (TAKAKI SATOSHI)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所・免疫学研究部・部長
研究者番号：10242116
(平成28年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし