

令和元年6月11日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02631

研究課題名(和文) 自然リンパ球に注目した脂肪組織恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Role of innate lymphoid cells in adipose tissue homeostasis

研究代表者

小安 重夫 (Koyasu, Shigeo)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90153684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫系を欠くRag2^{-/-}マウスと、自然リンパ球を含む全てのリンパ球を欠損するc^{-/-}Rag2^{-/-}マウスを用い、高脂肪食負荷を与えた際の体重増加に、小腸粘膜固有層由来の2型自然リンパ球(SI-ILC2)と3型自然リンパ球(SI-ILC3)が関与し、これらのILCが産生するIL-2が必要である事を明らかにした。一方、脂肪組織由来のILC2(WAT-ILC2)はSI-ILC2と異なる性質を持ち、前脂肪細胞から脂肪細胞への分化を抑制する活性を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は様々な生活習慣病の背景となることから、社会的な問題となっている。我々の研究は過去10年の間にその存在が明らかにされた、抗原受容体を持たないリンパ球である自然リンパ球が肥満の誘導に関わることを明らかにした。さらに、寄生虫に対する感染防御やアレルギー性炎症に関係すると考えられてきた2型自然リンパ球(ILC2)が腸管と脂肪組織において異なる性質を持つこと、すなわち、腸管のILC2は肥満を誘導するのに対し、脂肪組織のILC2が脂肪細胞の分化を抑制する点は興味深い。今後これらの活性の分子機構の詳細を明らかにすることで肥満の予防や治療に繋がる新たな発見が期待される。

研究成果の概要(英文)： Using Rag2^{-/-} mice lacking adaptive immune cells and c^{-/-}Rag2^{-/-} mice lacking all lymphocytes, we have revealed that group 2 innate lymphoid cells (ILC2) and group 3 innate lymphoid cells (ILC3) from small intestine (SI-ILC2 and SI-ILC3, respectively) and IL-2 derived from those SI-ILCs are involved in the diet-induced obesity. Contrary to SI-ILC2, ILC2 derived from white adipose tissue (WAT-ILC2) suppressed adipocyte differentiation in an in vitro culture system, indicating that SI-ILC2 and WAT-ILC2 have different functions.

研究分野：免疫学

キーワード：肥満 自然リンパ球 脂肪組織炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は様々な生活習慣病の背景となることから、社会的な問題となっている。肥満が脂肪組織の炎症を通じてインスリン抵抗性を引き起こし、2型糖尿病の発症に繋がることも明らかにされている。組織炎症が関わることからこれらの過程に免疫系の関与が疑われ、脂肪組織内のマクロファージ (Mφ) や制御性T細胞の重要性などが論じられてきた。そのような中、過去10年の間に新しいリンパ球集団、すなわち抗原受容体を持たず、周りの細胞が産生するサイトカインに反応してヘルパーT細胞と同様のサイトカインを産生するリンパ球である自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cell (ILC)) : 産生するサイトカインの種類によってIFN γ を産生する1型 (ILC1)、IL-5やIL-13を産生する2型 (ILC2)、IL-17やIL-22を産生する3型 (ILC3) に分類され、胎児期にリンパ組織形成に関わるリンパ組織誘導細胞 (LTI: lymphoid tissue inducer) や細胞傷害性を持つNK細胞を含めて自然リンパ球と総称される) が徐々に発見されたことから、肥満の誘導における自然リンパ球の役割を考える必要性が生じた。

2. 研究の目的

研究代表者らは、脂肪組織から2型自然リンパ球 (当初はナチュラルヘルパー細胞と命名したが、現在ではILC2と呼ばれる) を発見した。ILC2は上皮細胞などが傷害された際に放出されるIL-33に反応してIL-5やIL-13をはじめとする2型サイトカインを大量に産生する。IL-5によって好酸球増多が誘導され、IL-13によって杯細胞の過形成とムチン産生などが誘導されることから、寄生虫感染防御やアレルギー性炎症の病態に関与することが我々を含む複数の研究室から報告されてきた。脂肪組織炎症では、炎症性の1型Mφと抗炎症性の2型Mφのバランスや、脂肪細胞が産生するアディポカインの関与が報告されている。ILC2が脂肪組織に大量に存在することや2型サイトカインが2型Mφの誘導に関わることから、ILC2が様々な細胞を通して脂肪組織の恒常性の制御や慢性炎症に重要な役割を果たすことが示唆された。そこで本研究では、高脂肪食負荷時の肥満や脂肪組織炎症におけるILC2の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

獲得免疫系を欠くRag2^{-/-}マウスと全てのリンパ球を欠損する γ_c ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスを用い、高脂肪食負荷を与えた際の体重増加を野生型と比較検討することで獲得免疫系のリンパ球や自然リンパ球の関与が検討できる。さらにその結果に基づいて、候補となるリンパ球がどのように肥満を誘導するかを *in vivo* や *in vitro* の系で検討した。

4. 研究成果

高脂肪食負荷を与えた際、獲得免疫系のリンパ球を欠損するRag2^{-/-}マウスは野生型マウスと同様に、顕著な体重増加と脂肪重量の増加を認めるが、全てのリンパ球を欠損する γ_c ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスでは体重増加も脂肪組織重量の増加も著しく抑制されていた。 γ_c ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスにおいては、脂肪肝も抑制され、インスリン抵抗性や空腹時血糖の上昇も抑制されていた。また、脂肪組織中のマクロファージの解析からもM1型Mφの増加が抑制されていた。これらの結果から自然リンパ球が肥満の誘導に関わることを示唆された。NK細胞を欠損するIL-15^{-/-}Rag2^{-/-}マウスでは高脂肪食負荷によって肥満が誘導された。一方、ILC2の分化や維持に必須のGata3を欠損(具体的にはCre-ERT2:Gata3^{flax/flax}マウスにタモキシフェンを投与した)させたマウスでは肥満の誘導が強く抑制されたことからILC2の関与が疑われた。ILC3を欠損するROR γ ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスも肥満に抵抗性を示したが、その程度はGata3欠損マウスと比較すると軽度であった。NK細胞とILC1におけるIFN γ 発現に重要なT-betを欠損するマウスでは肥満が誘導されることが他研究室から報告されており、ILC1の関与も低いと考えられた。これらのことからILC2とILC3が肥満の誘導に関わる可能性を考え、さらに研究を進めた。

ILC2の欠損が最も影響が大きかったことから肥満の誘導にはILC2の関与が重要と考え、ILC2を γ_c ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスに移植した後に高脂肪食を負荷したところ、興味深いことに、小腸管粘膜固有層由来のILC2 (SI-ILC2) を移植した際には高脂肪食負荷による体重増加が回復したが、脂肪組織である腸間膜由来のILC2 (WAT-ILC2) を移植した際には回復しなかった。SI-ILC2を移植した際には、体重増加のみならず、インスリン抵抗性、空腹時血糖値の上昇、脂肪組織内の1型Mφの増加などが観察された。SI-ILC2とWAT-ILC2の機能的差異を検討するために、それぞれの細胞を用いてRNASeq解析を行った。WAT-ILC2と比較してSI-ILC2においてIL-2の発現が10倍以上高かった。そこで、IL-2のシグナル伝達機能が欠損するIL-2R β ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスに高脂肪食負荷を与えたところ、肥満に抵抗性である事が分かった。さらに、細胞内サイトカイン染色によってSI-ILC2や腸管のILC3がIL-2を分泌することも明らかになった。ILC3を欠損するROR γ ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスも肥満に中程度の抵抗性を示すことから、ILC3もIL-2産生を介して肥満の誘導に関わる可能性が考えられた。RNASeq解析からは、IL-2以外にも、リポタンパク質の分解酵素を抑制するAngptl4やタイトジャンクションを構成するTjp1などが候補に挙がったが、決定的な証拠を得ることはできていない。

脂肪細胞分化におけるILC2の機能をさらに解析するために、トランスウエルを用いた培養系で前脂肪細胞から脂肪細胞への分化に与えるILC2の影響を精査したところ、ILC2が脂肪細胞の分化を抑制し、むしろ繊維化を誘導することが明らかになった。興味深いこ

とに抑制活性は脂肪細胞の分化途中に ILC2 を共存させた場合のみ観察され、分化前や分化後に共存させても影響は見られなかった。WAT-ILC2 の培養上清も前脂肪細胞から脂肪細胞への分化を抑制し、コラーゲン発現を上昇させるなど繊維化を誘導した。ILC2 の活性に与える脂肪細胞の影響も検討したところ、成熟脂肪細胞が ILC2 の活性化を抑制することが明らかになった。これらの結果は ILC2 と脂肪細胞が相互に抑制し合うことを示し、これが脂肪組織の恒常性の維持にも貢献していることが考えられた。これらの活性に關与する ILC2 由来の分子の同定を目指し、RNASeq 解析やプロテオミクス解析によって検討しているが活性分子の同定には至っていない。今後、ILC2 や脂肪細胞由来の因子を同定し、その活性の分子機構の詳細を明らかにすることで、肥満の予防や治療に繋がる新たな発見が期待される。

5 . 主な発表論文等 (実線のアンダーラインは代表者、破線のアンダーラインは分担者)

[雑誌論文] (計 17 件 : うち 14 件査読あり)

(原著論文)

(1) Sasaki, T., Moro, K., Kubota, T., Kubota, N., Kato, T., Ohno, H., Nakae, S., Saito, H. and Koyasu, S. (2019) Innate lymphoid cells in the induction of obesity. **Cell Rep.** in press. (査読あり)

(2) Koga, S., Hozumi, K., Hirano, K., Yazawa, M., Terooatea, T., Minoda, A., Nagasawa, T., Koyasu, S. and Moro, K. (2018) Peripheral PDGFR α ⁺gp38⁺ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. **J. Exp. Med.** 215: 1609-1626. (査読あり)

(3) Namkoong, H., Ishii, M., Fujii, H., Yagi, K., Asami, T., Asakura, T., Suzuki, S., Hegab, A. E., Kamata, H., Tasaka, S., Atarashi, K., Nakamoto, N., Honda, K., Kanai, T., Hasegawa, N., Koyasu, S. and Betsuyaku, T. (2018) Clarithromycin expands CD11b⁺Gr-1⁺ cells via the STAT3/Bv8 axis to ameliorate lethal endotoxin shock and post-influenza bacterial pneumonia. **PLoS Pathog.** 14: e1006955. (査読あり)

(4) Yamazumi, Y., Sasaki, O., Imamura, M., Oda, T., Ohno, Y., Shiozaki-Sato, Y., Nagai, S., Suyama, S., Kamoshita, Y., Funato, K., Yasui, T., Kikutani, H., Yamamoto, K., Dohi, M., Koyasu, S. and Akiyama, T. (2016) The RNA binding protein Mex-3B is required for IL-33 induction in the development of allergic airway inflammation. **Cell Rep.** 16: 2456-2471. (査読あり)

(総説)

(1) Bald, T., Wagner, M., Gao, Y., Koyasu, S. and Smyth, M. J. (2019) Hide and seek: Plasticity of innate lymphoid cells in cancer. **Semin. Immunol.** in press. (査読あり)

(2) Wagner, M. and Koyasu, S. (2019) Cancer immunoediting by innate lymphoid cells. **Trends Immunol.** 40: 415-430. (査読あり)

(3) Kabata, H., Moro, K. and Koyasu, S. (2018) The group 2 innate lymphoid cell (ILC2) regulatory network and its underlying mechanisms. **Immunol. Rev.** 286: 37-52. (査読あり)

(4) Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F. and Spits, H. (2018) Innate lymphoid cells: 10 years on. **Cell** 174: 1054-1066. (査読あり)

(5) Wagner, M., Moro, K. and Koyasu, S. (2017) Plastic heterogeneity of innate lymphoid cells in cancer. **Trends Cancer** 5: 326-335. (査読あり)

(6) Morita, H., Moro, K. and Koyasu, S. (2016) Innate lymphoid cells in allergic and non-allergic inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.** 138: 1253-1264. (査読あり)

[学会発表] (計 27 件)

(1) Shigeo Koyasu, Hiroki Kabata, Satoshi Koga, Kazuyo Moro. Regulatory mechanisms for ILC2 functions in allergic inflammation. 16th International Congress of Immunology (August 21-26, 2016), Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia. August 22 発表 (招待講演)

(2) Shigeo Koyasu. Regulatory mechanisms for ILC2 activation in allergic inflammation. 4th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (October 16-19, 2016). Hyatt Regency San Francisco, San Francisco, USA. October 19 発表 (招待講演)

(3) Shigeo Koyasu. Innate lymphoid cells in helminth infection. The 10th Federation of African Immunological Societies (FAIS) congress (December 3-7, 2017). Kalkscheune , Hammamet, Tunisia. December 4 発表 (招待講演)

(4) Shigeo Koyasu. Tolerance break by class switch recombination for auto-antibody production. The 7th FIMSA Congress (November 10-13, 2018). Mandarin Hotel Bangkok, Bangkok, Thailand. November 13 発表 (招待講演)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/ims/immun_cell_sys/

http://www.ims.riken.jp/labo/43/index_j.html

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：茂呂 和世

ローマ字氏名：Moro, Kazuyo

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命医科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号（8桁）：90468489

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐々木 崇晴：Ealey, Kafi N.

ローマ字氏名：Sasaki, Takaharu：Ealey, Kafi N.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。