

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07189

研究課題名(和文) PD-1またはPD-L1を介した胃 ILCsの制御・機能解析

研究課題名(英文) Study for the regulation of stomach ILCs through PD-1/PD-L1

研究代表者

佐藤 尚子(高山尚子)(Sato-Takayama, Naoko)

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・専任研究員

研究者番号：90732446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、主に腸管での免疫応答に関する研究が多く報告されてきたが、胃における免疫応答、特にILCsの役割については全く報告がない。申請者のこれまでの研究により、胃はILC2優位になっていることが明らかとなったが、胃に存在するILC2の役割については不明であった。そこで、胃のILC2の機能について解析したところ、胃ILC2は腸管のILC2と比較してIL-33Rを高発現し主にIL-5を産生していることが判明した。またこのILC2が産生するIL-5により、胃のB細胞分化が誘導されIgAの産生が増加する事で、ピロリ菌感染からの防御に寄与している事も明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで胃は食物を貯蔵・分解する機能のみを主体とする臓器であるという認識で、免疫学的な意義については低いと考えられてきた。しかしながら、本研究により胃の持つ防御的な役割に加え、胃に存在する細菌叢の重要性と免疫応答との関連性について明らかにすることができ、恒常性を維持する必要な要になりうる知見であると、一石を投じた。また本研究により、ピロリ菌感染後に生じるB細胞集積は、悪性リンパ腫の一種であるMALTとの関連性が示唆されており、この発生メカニズムを明らかにする事は、胃ガンの予防・治療に繋がる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The intestinal microbiota shapes and directs immune development locally and systemically, but little is known about whether commensal microbes in the stomach can impact their immunological microenvironment. Here, we report that ILC2s are the predominant ILC subset in the stomach and show that their homeostasis and effector functions are regulated by local commensal communities. Microbes can elicit IL-7 and IL-33 production in the stomach, which in turn trigger ILC2s. Stomach ILC2s are also rapidly induced following infection with *Helicobacter pylori*. ILC2-derived IL-5 results in the production of IgA, which coats stomach bacteria in both SPF and *H. pylori*-infected mice. Our study thus identifies a novel ILC2-dependent IgA response that is regulated by the commensal microbiota and is implicated in stomach barrier function.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：自然リンパ球

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究により、腸内細菌叢は局所的だけでなく全身的にも免疫形成に大きく関与しているが明らかになってきている¹。しかしながら、胃内の共生微生物が免疫応答に影響を与えるかはほとんど知られていない。これまで、胃は殺菌・分解・貯蔵を行う為だけの臓器として考えられ、免疫学的な役割についてはあまり着目されてこなかった。また、胃内は殺菌のために強酸性状態で維持されており、細菌培養法を基本とした解析を元に共生細菌は存在しないと考えられていた。胃でがん化と深く関わると知られているヘリコバクターピロリ菌に関して、その感染メカニズムや病原性については詳細な報告があるものの、詳細な免疫応答との関連性については明らかになっていなかった。

近年報告された自然リンパ球は、ヘルパーT細胞と似た機能を持つ細胞であり、サイトカイン産生および分化の違いにより1~3型の3つのグループに分類することが出来る。これら全ての自然リンパ球は様々な臓器に局在していることも近年明らかになり、疾患の発症・制御と深く関与していることが報告され、様々な分野で着目されている細胞群である²。一方、疾患発症・制御と関連するこの自然リンパ球の胃での免疫応答については、これまで報告は一切なかった。

2. 研究の目的

近年、菌が特異的に持つ16S rRNA配列をターゲットとした次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により網羅的に菌叢の分布と種類の把握を容易に行うことができるようになってきた。このシーケンス技術の向上は短時間で莫大な情報の取得を可能にし、サイエンスだけでなく様々な分野において飛躍的な発展に繋がっている。また、このメタゲノム解析の進歩により細菌叢と免疫との密接な関係性も明らかになり、疾患制御と関連して菌叢の重要性が注目されている。この細菌叢と免疫応答については、世界的にその必要性が注目され競争的に研究がおこなわれているものの、胃における細菌叢の重要性および免疫応答との関係性はこれまで不明であった。本研究では、この胃の菌叢解析とフローサイトメトリーを用いたマウス胃の免疫細胞の解析をあわせることで、胃に存在する免疫細胞、特に自然リンパ球の分布について明らかにする事を目的とし、その機能について明らかにする事とした。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーを用いた胃の免疫応答解析

胃からリンパ球を回収し、フローサイトメトリー解析を行う事でマウスの胃に存在している免疫細胞の分布について検討した。また無菌マウスと Specific pathogen free (SPF) マウスと胃について自然リンパ球およびT細胞、B細胞群の変化を解析した。

(2) 胃の細菌叢解析

SPFマウスの糞便・胃内要物・胃粘膜層に存在する菌叢を解析するため、細菌特異的配列である16s rRNAの中のV4領域をターゲットとした次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を行い、それぞれのサンプルについて菌叢を比較検討した。

(3) ヘリコバクターピロリ感染

ヘリコバクターピロリ菌の中でもCagAの発現が安定しているヒト由来株PMSS1を使用し、経口投与により感染させることで胃における免疫応答を解析した。

4. 研究成果

(1) 腸管のILCサブセットに関してはこれまでに多くの報告があり、ILCの分布に関してはすでによく研究されている一方、胃のILCについては未だ報告がない。そこで小腸と胃を比較することにより、胃のILCサブセットの分布について検討することにした。その結果、胃はILCサブセットの中でも特にILC2で占められているのに対して、ILC1とILC3はほとんど存在しなかった(図1A)。また、無菌(Germ free; GF)マウスと通常飼育(Specific pathogen free; SPF)マウスとの比較したところ胃のILC2数が減少し、共生細菌の影響を受けることが示された(図1B)。

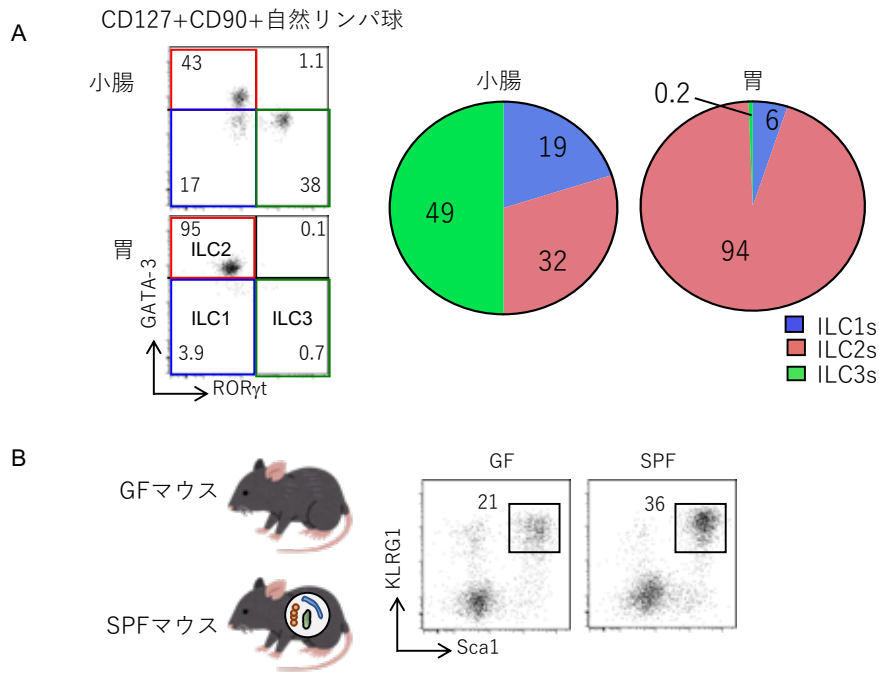


図1 胃はILC2優勢であり細菌叢の影響を受ける

A：小腸および胃の粘膜固有層に存在するILCサブセットを解析。小腸ではそれぞれのサブセットが確認できるが、胃では主にILC2でありILC3はほとんど確認存在しなかった。

B：無菌マウス（GF）と共生細菌が存在する通常飼育マウス（SPF）の比較。GFマウスではILC2数の減少が確認された。

(2) SPF マウスの糞便、胃内容物および胃の粘膜層の菌叢を 16s rRNA にて解析した結果、糞便とは異なる分布を示していた。また胃では、特に *Bacteroidetes* 門の S24-7 科が GF マウスへの SPF マウス胃内要物の移入で特異的に増加していた（図 2A-E）。

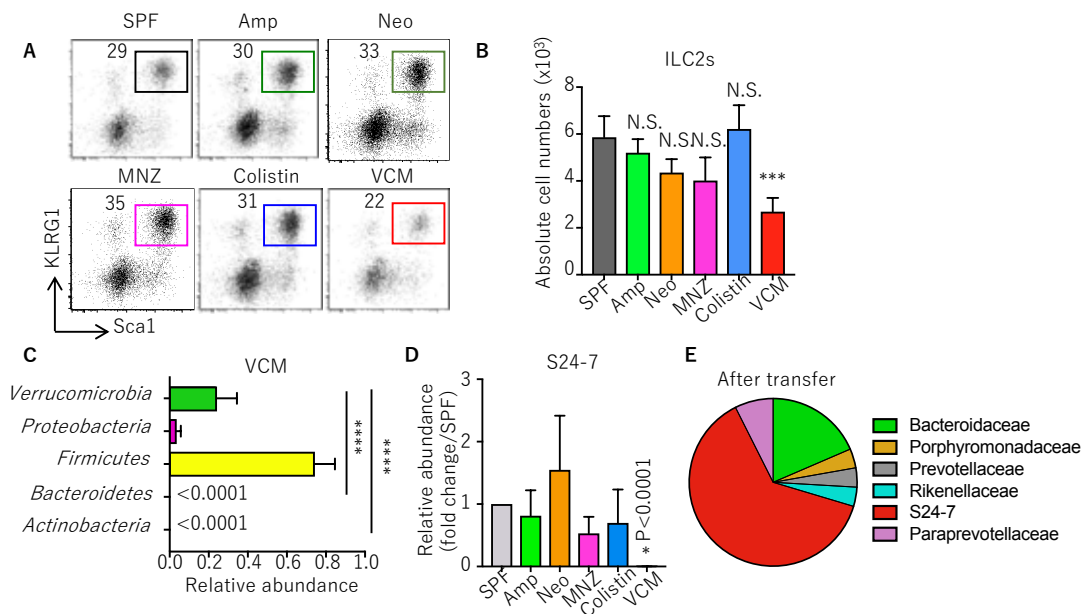


図2 胃に存在する細菌叢の内、S24-7がILC2の誘導に関与する。

A：SPFマウスにAmp(アンピシリン)、Neo(ネオマイシン)、MNZ(メトロニダゾール)、Colistin(コリスチン)またはVCM(バンコマイシン)を投与し、胃のILC2を解析した。

B：AのFACS plotより算出した胃のILC2数比較。

C：ILC2が一番減少したVCM投与による胃の細菌叢解析。

D：VCM投与によりS24-7科菌が減少

E：SPFマウスの胃から回収した細菌叢を無菌マウス（GF）に投与し4週間後に菌叢解析を行った結果。

S24-7科菌が増加していた。

(3) ヘリコバクターピロリを GF マウスに経口感染させると、感染後 2 週間で胃の ILC2 と共に B 細胞の増加が確認された。通常、ピロリ菌感染モデルにはスナネズミが用いられるが、SPF-C57BL/6 マウスではピロリ菌は定着せず最終的に排除され胃炎を呈することが知られている。GF マウスを用いた本研究でも感染 9 週間後では胃炎が誘導されていたが、その際には ILC2 数も低下していた (図 3A-G)。このピロリ菌の排除に關与する免疫応答は ILC2 特異的欠損マウスでは見られなかったことにより、ILC2 が胃においてピロリ菌感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

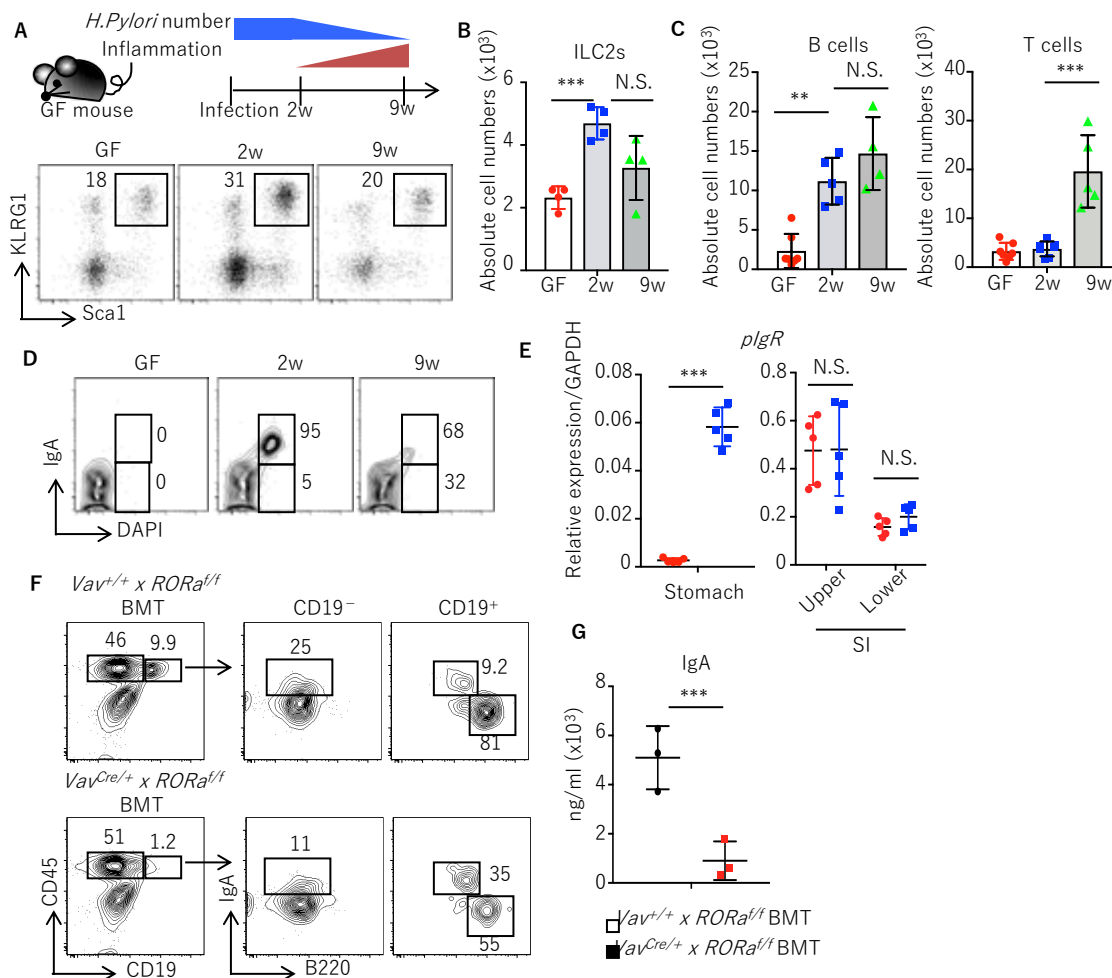


図3 ピロリ菌感染により胃にILC2が誘導されB細胞の増殖とIgA産生を介して防衛的に働く。
A: C57BL/6マウスにピロリ菌を感染しても2週間後から減少し最終的に排除される。一方、感染後期から胃炎が誘導される。ピロリ菌感染では2週間後にILC2が増加。B: AのFACS plotより算出した胃のILC2数比較。
C: 感染後のB細胞およびT細胞数。D: 胃内腔に産生されたIgAに結合した細菌の検出
E: 分泌型IgAに必要な分子*pIgR*の発現について胃と小腸の比較。
F: ILC2特異的ノックアウトマウスの胃の解析。 G: ILC2ノックアウトマウス中のIgA産生量比較。

【考察】

本研究では、胃内に存在する微生物叢によって胃上皮より IL-33 の産生が誘導され胃 ILC2 の活性化に關与していることを示した³。この IL-33 による ILC2 の活性化が IL-5 の産生をもたらし B 細胞からの IgA 産生を誘導するが、IL-33 自体は ILC2 の維持には必須ではない。代わりに、胃では IL-7 が ILC2 の維持に關与していることが明らかになった。これは、腸管とは異なるユニークな ILC の制御メカニズムが存在することを示唆しており、最初に食事や様々な細菌を含んだ大量の非自己抗原が貯留される胃において、第一線の防御として働く胃の重要性が注目される。微生物叢の曝露による B 細胞からの IgA 産生誘導は、T および B 細胞を欠損するマウスにおいても効率的に誘導されたことにより、自然免疫として ILC の重要性を改めて認識する結果である。興味深いのは、分泌型 IgA に必須である胃上皮の *pIgR* 発現が GF マウスでは極めて低い状態であったが、ピロリ菌感染時に強く上昇したことである。一方、腸管上における *pIgR* 発現は GF マウスおよびピロリ菌感染に関わらず恒常的に安定して発現していた。この結果は、胃上皮がその環境に合わせて柔軟に対応することで、貯蔵組織としてより効率に機能することを示唆していた。

<引用文献>

1. Seo, G.Y., Giles, D.A. & Kronenberg, M. The role of innate lymphoid cells in response to microbes at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol* **13**, 399-412 (2020).
2. Vivier, E. *et al.* Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* **174**, 1054-1066 (2018).
3. Satoh-Takayama, N. *et al.* Bacteria-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Stomach Provide Immune Protection through Induction of IgA. *Immunity* **52**, 635-649 e634 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤(高山) 尚子
2. 発表標題 2型リンパ球：新しい役割の発見と応用の可能性
3. 学会等名 第53回新潟血液同好会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤(高山) 尚子
2. 発表標題 Functional ILCs regulating mucosal homeostasis
3. 学会等名 The 4th RIKEN-Tsuingua Joint Symposium（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤(高山) 尚子
2. 発表標題 ILC2s regulate mucosal homeostasis in the stomach
3. 学会等名 第46回日本免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 佐藤(高山) 尚子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 239
3. 書名 自然免疫の最前線	

1. 著者名 玉浦 萌、佐藤(高山) 尚子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 49
3. 書名 臨床・アレルギー科	

1. 著者名 佐藤(高山) 尚子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 203
3. 書名 腸内細菌叢：健康と疾患を制御するエコシステム	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 理化学研究所	発明者 佐藤尚子、大野博司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、08816-JP	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------