

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19486

研究課題名(和文) 3型自然リンパ球を用いた粘膜バリア増強療法への挑戦

研究課題名(英文) Experimental trials to promote mucosal barrier via enhancing function of ILC3s

研究代表者

澤 新一郎 (Sawa, Shinichiro)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80611756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：3型自然リンパ球(ILC3)は腸管バリア機能の維持に極めて重要な役割を果たす。本研究ではILC3機能増強による粘膜バリア機能の向上を目的とした細胞治療法や薬剤開発への道を開拓するため、(i)ILC3の大量培養を目的としたin vitro培養系の樹立および(ii)細胞移入によるin vivo ILC3機能の検証を行った。ILC3の生存を増強させるため、恒常的活性型STAT5(STAT5CA)を発現するレトロウイルスベクター(pMXs-tdTomato-P2A-STAT5CA)の開発に着手し、ヒト細胞株であるJurkat細胞へのウイルスベクター発現系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ILC3は腸管バリア機能の維持に極めて重要な役割を果たすことから、「生体内におけるILC3数の増加や機能増強は細菌性腸炎、ウイルス性腸炎などの感染性腸炎からの生体防御や炎症性腸疾患やアレルギー、急性GVHDなどの免疫異常の予防につながる可能性が高い。しかし、これまでILC3の細胞株は存在せず、gain-of functionによる生体内ILC3機能評価を行うことは不可能であった。本研究ではリンパ球の生存を促進させる恒常的活性型STAT5(STAT5CA)をレトロウイルスによりILC3へと遺伝子導入させ、ILC3細胞株の樹立を実現させるために必要なレトロウイルスベクターの樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Group3 Innate Lymphoid Cell=ILC3 is a member of innate lymphoid cells which play critical roles on the maintenance of intestinal epithelial barrier. In this project, I planned to establish novel therapeutic strategy to promotes epithelial barrier by transferring ILC3s as well as by using small chemical compounds which enhance function of ILC3s. To achieve these aims, establishment of cell lines of ILC3 is the most challenging issue which should be overcome. In this project, I tried to establish retroviral vector-based gene delivery system into ILC3s. In the first step, I succeeded in generating pMXs-tdTomato-P2A-STAT5CA plasmid, which should prolong survival of viral infected lymphocytes. In the second step, I confirmed tdTomato-P2A-STAT5CA expression in viral particle packaging cells named Phoenix cells. However, due to technical issues, in vitro culture of ILC3s from adult mice have not been succeeded.

研究分野：免疫学

キーワード：ILC3 細胞株 STAT5 レトロウイルスベクター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管には生体の約 80%もの免疫細胞が存在し、病原性微生物の排除や上皮生存シグナルを介した腸管バリア機能の維持に貢献すると考えられている。3 型自然リンパ球(Group3 Innate Lymphoid Cell=ILC3)は腸管粘膜固有層のリンパ球の 10-15%を占める自然免疫系の細胞であり、炎症腸疾患や急性 GVHD などの腸管免疫異常への強い関与が報告されている。

腸管免疫における ILC3 の第一の役割は抗原を捕捉後、活性化した樹状細胞より分泌される IL-23 や IL-1 β に応答して IL-22 を産生し、上皮細胞の生存維持や抗菌ペプチド産生に寄与することである。急性 GVHD の予防に必要な腸幹細胞の生存・維持にも ILC3 由来 IL-22 が重要な役割を果たす。第二の役割は孤立リンパ濾胞(Isolated Lymphoid Follicle=ILF)と呼ばれるリンパ組織を形成し、T 細胞非依存的な抗体 IgA 産生を促進することである。ILC3 を欠損する ROR γ t 欠損マウスや IL-2R γ c 欠損マウスでは腸管上皮に障害を受けた後、上皮再生が遅延するため、炎症性腸疾患モデルである Dextran Sodium Sulfate (DSS)誘導性腸炎が激症化する。また、細菌特異的 IgA 産生や抗菌ペプチド産生の低下により、病原性細菌に対する抵抗性が著しく減弱する。

このように、ILC3 は腸管バリア機能の維持に極めて重要な役割を果たすことから、「生体内における ILC3 数の増加や機能増強は細菌性腸炎、ウイルス性腸炎などの感染性腸炎からの生体防御や炎症性腸疾患やアレルギー、急性 GVHD などの免疫異常の予防につながる」との着想に至った。しかし、従来の ILC3 研究は抗体除去(Hepworth, *Nature*, 2013)、遺伝子欠損による ILC3 の分化障害(Sawa, *Nat Immunol*, 2011)や機能障害(Withers, *Nat Med*, 2016) など、loss of function による検証が中心であり、ILC3 機能の増強が生体にどのような利点をもたらすか、全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ILC3 機能増強による粘膜バリア機能の向上を目的とした細胞治療法や薬剤開発への道を開拓するため、以下の 3 項目を研究目的とした。

- (i) ILC3 の大量培養を目的とした *in vitro* 培養系の樹立
- (ii) 細胞移入による *in vivo* ILC3 機能の検証
- (iii) *in vitro* 低分子化合物スクリーニング系の樹立

3. 研究の方法

(i) ILC3 大量培養系の樹立

ILC3 は表面抗原が Lineage(Lin)⁻, c-kit⁺IL7Ra⁺ のリンパ球であり、転写因子 ROR γ t 陽性細胞が EGFP で標識される ROR γ t-EGFP マウスを用いることで ROR γ t(EGFP)⁺CD3⁻細胞 として容易に識別できる。ILC3 は IL-7 受容体下流のシグナル伝達経路、IL-7R-JAK1/2- STAT5 依存的に分化増殖する。IL-7 シグナル

過剰が生体内の ILC3 数を増加 (Meier, *Immunity*, 2007)させることに注目し、北村俊雄博士 (東京大学名誉教授) が開発したレトロウイルスベクター pMXs を用いて ROR γ t-EGFP マウスより採取した ILC3 に活性型 STAT5a (STAT5a^{CA}) (Kitamura, *Exp. Hematology*, 2003)の遺伝子導入を試みる。

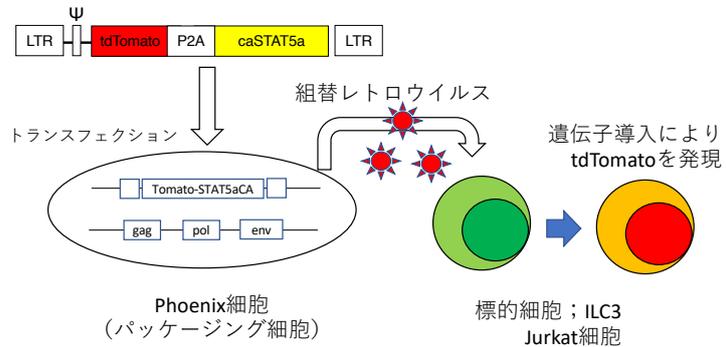


図1：実験概要
レトロウイルスベクターにより恒常的活性型STAT5a遺伝子を導入されたILC3がtdTomatoで標識される。

(ii) *in vivo* 細胞移入による ILC3 機能の検証

Ex vivo で STAT5^{CA} 導入後、増殖した ILC3 を野生型マウスに 1×10^6 個/匹以上静脈注射し、(a) 百日咳毒素に対する抗体産生能、(b) 病原性大腸菌モデルである *Citrobacter rodentium* 感染腸炎の重症度変化、(c) DSS 誘導性腸炎の重症度を指標として ILC3 機能を *in vivo* で評価する。成体野生型マウスへの経静脈的な ILC3 移入は肺静脈へのトラップや臓器微小環境(ニッチ)の問題で生着しない可能性がある。その場合、(a)新生仔肝臓や成体マウス骨髄への注射、(b)抗 CD90.2 抗体投与により ILC3 数を減少させたマウスへの CD90.1 アロマーカマーを持つ ILC3 の移入 (Hepworth, *Nature*, 2015), (c) 薬剤投与により ILC3 を選択的に減少させたマウスモデル(澤 特許出願済み)への ILC3 投与を追加検討する。

(iv) *in vitro* 化合物スクリーニング系の樹立

上記(i)で作成した ILC3 細胞株を用い、低分子化合物ライブラリーを用い、ILC3 機能調整因子の探索を行う。

4. 研究成果

(i) ILC3 大量培養系の樹立

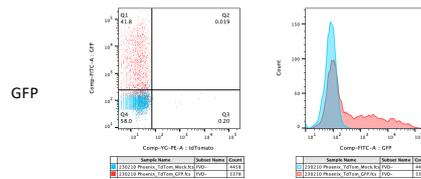
(1) tdTomato-P2A- STAT5a^{CA} プラスミドの作出

レトロウイルスベクター pMXs の導入効率を簡便にモニタリングするため、蛍光タンパク質である tdTomato を 2A ペプチド配列を介してタンデムに繋げた tdTomato-P2A- STAT5a^{CA} のインサートを有するプラスミドをクローニングし、pMXs ベクター内に挿入した (pMx-tdTomato-STAT5CA) (図1)。また、コントロールベクターとして EGFP のみを pMXs ベクター内に挿入した(pMx-IRES-EGFP)を作成した。

(2) Phoenix 細胞への遺伝子導入実験

レトロウイルス粒子を産生する Phoenix 細胞に pMx-IRES-EGFP を含む pMXs ベクターを Lipofectamin3000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。GFP 陽性率を指標とした場合、導入効率は 40% 程度であった (図 2 a)。続いて、Phoenix 細胞に tdTomato-P2A- STAT5a^{CA} プラスミドの導入を行った。tdTomato を指標とした場合、導入効率はコントロールベクター同様 40% 程度であった。

(a) Phoenix細胞へのコントロールベクターのTransfection



(b) Phoenix細胞への STAT5a^{CA}プラスミドのTransfection

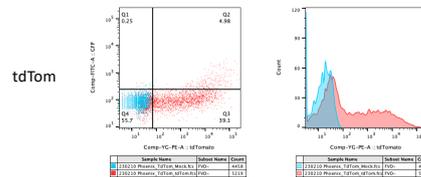


図 2 pMXs-IRES-EGFP プラスミド (a), tdTomato-P2A- STAT5a^{CA} プラスミド (b) のパッケージング Phoenix 細胞への遺伝子導入実験

(3) コントロールベクターの T 細胞株への感染実験

pMx-IRES-EGFP 遺伝子を導入した Phoenix 細胞培養の上清に含有されるウイルス粒子をヒト T 細胞株である Jurkat 細胞に感染させ、導入効率を検討した。導入効率は 75% 程度であった (図 3)。

Jurkat細胞へのコントロール組替レトロウイルスの感染実験

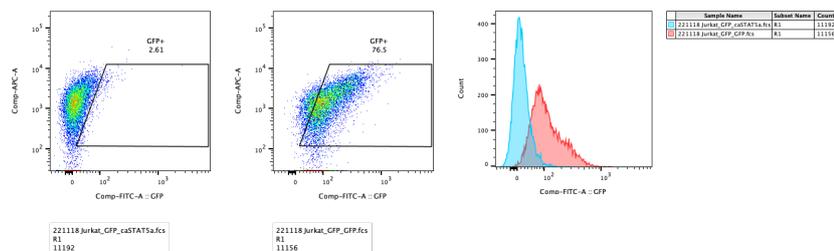


図 3 pMXs-IRES-EGFP レトロウイルスベクターの Jurkat 細胞株への遺伝子導入実験

1. ILC3 の細胞移入実験

移入した ILC3 が生体内に生着するか否かを検討するために、10 週齢の RORγt-EGFP マウス 10 匹のリンパ節および小腸粘膜固有層から ILC3 を採取し、C57BL/6J 野生型マウス 1 匹あたり 10x10⁵ 個の ILC3 を経静脈的に移入した。移入 1 週間後、腸管、リンパ節、脾臓に存在する EGFP 陽性 ILC3 のフローサイトメーターによる確認を試みたが、EGFP 陽性細胞は検出されなかった。

- 胎齢 14.5 日および 10 週齢の RORγt-EGFP マウスのリンパ節および小腸粘膜固有層から ILC3 を採取し、SCF および IL-7 の存在下で Tst4-DLL1 ストローマ細胞との共培養を 10 日間行った。胎仔由来の ILC3 は本培養条件下で生存していたが、10 週齢マウス由来の ILC3 はほぼ死滅していた。

【考察・今後の方針】

ILC3 への tdTomato-P2A- STAT5a^{CA} 遺伝子導入を成功させるには、(a) 導入細胞の生存率の向上、(b) ウイルス感染効率の向上がクリアすべき重要な問題と考える。

- (a) に関しては今後、増殖速度の速い胎仔 ILC3 またはその前駆細胞。テロメラーゼを欠損させ、不死化処理を行った ILC3 を遺伝子導入細胞として用いる。
- (b) に関しては、超遠心機を用いたウイルス粒子の濃縮および培養液の条件検討を考慮する。さらに、非分裂細胞への感染が可能なレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入も有効と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------