

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19111

研究課題名(和文)短鎖脂肪酸によるIL-5産生グループ2自然リンパ球の制御機構の解明と治療応用

研究課題名(英文)The regulatory mechanism of IL-5-producing group 2 innate lymphoid cells by short-chain fatty acid

研究代表者

工藤 藤美(Kudo, Fujimi)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30726419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アレルギー性炎症の病態形成に重要な役割を担うグループ2自然リンパ球(ILC2)において、2型炎症を誘導するサイトカインIL-5の産生制御機構を解明し、ILC2を標的とした新たなアレルギー性疾患治療の基盤を確立することを目的とした。短鎖脂肪酸によるILC2の制御は認められなかったが、マウス喘息モデルにおいて、免疫抑制剤であるシクロスポリンによりILC2のIL-5産生が抑制されることを明らかにした。この抑制機構はT細胞を介しており、ILC2を標的とした新たな喘息治療への応用への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) and type 2 helper T (Th2) cells produce Th2 cytokines including IL-5 and play important roles in asthma pathogenesis. Cyclosporin A (CsA) is a well-known immunosuppressant that is used against steroid-resistant asthma. We studied the effects of CsA in allergen-induced lung inflammation in mice and found that CsA decreased the number of lung ILC2s and attenuated papain-induced activation of ILC2s accompanied with IL-5 expression. The ILC2 suppression mediated by CsA was not observed in culture or in lymphocyte-deficient Rag2^{-/-} mice. Thus, we propose a new suppressive effect of CsA, i.e., administration of CsA indirectly suppresses maintenance and activation of lung ILC2s in addition to direct suppression of T cell activation and cytokine production.

研究分野：免疫学

キーワード：ILC2 IL-5 喘息 炎症

1. 研究開始当初の背景

グループ2自然リンパ球 (Group 2 innate lymphoid cell ; ILC2) は、上皮細胞やマクロファージ、ナチュラルキラーT (NKT) 細胞から産生される IL-33 により多量の Th2 サイトカイン (IL-5 や IL-13) を産生する。IL-5 は主に ILC2 や 2 型ヘルパーT (Th2) 細胞から産生され、IgA 産生や B-1 細胞の維持、特に好酸球の分化、組織への集積に関わる。炎症時に多量の IL-5 を産生する ILC2 の活性化を抑制することは、好酸球によるアレルギー性炎症の増悪を阻止することに直結する。

我々のグループは、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を新たに開発し (IL-5/Venus マウス)、T 細胞等の既知の 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、肺組織の恒常性維持に關与することを報告した (Ikutani et al., J Immunol, 2012)。

申請者は上記の IL-5/Venus マウスを用いて、肺の ILC2 において SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法による遺伝子発現解析を行い、インターフェロン- γ (IFN- γ) 受容体が発現していることを見出し、NKT 細胞由来の IFN- γ が、IL-33 で誘導される ILC2 の Th2 サイトカイン (IL-5 及び IL-13) 産生を抑制することを明らかにした (Kudo et al., Immunology, 2015)。この結果は炎症やウイルス感染時に NKT 細胞や Th1 細胞等から産生される IFN- γ がアレルギーの重症化を制御し得ることを示している。

酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸等の短鎖脂肪酸は、大腸で腸内細菌による食物繊維の発酵によって産生され、宿主のエネルギー源として代謝利用される他に、好中球やマクロファージ等の免疫細胞に発現する短鎖脂肪酸受容体 (GPR41 及び GPR43) の活性化や、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害により免疫系を制御することが報告されている。

申請者らは ILC2 に短鎖脂肪酸受容体である GPR43 が発現していることを見出した。短鎖脂肪酸が ILC2 のサイトカイン産生を制御するかどうかについては不明であるが、短鎖脂肪酸による ILC2 の活性化制御が炎症や恒常性維持に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

また、ILC2 の活性化制御に関する検討において、免疫抑制剤のシクロスポリン (CsA) により喘息モデルマウスの肺由来 ILC2 の IL-5 産生が抑制されることを新たに見出した。CsA による IL-5 産生制御のメカニズムおよび分子機構を解析することで、ILC2 活性化制御を介した新たなアレルギー性疾患治療応用へ繋がることが期待される。

2. 研究の目的

申請者らは 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を新たに開発した (IL-5/Venus マウス)。本研究は、IL-5/Venus マウスを用いた解析を通して、アレルギー性炎症の病態形成に重要な役割を担うグループ2自然リンパ球 (ILC2) における 2 型炎症を誘導するサイトカイン (IL-5) の産生制御機構を解明し、ILC2 を標的とした新たなアレルギー性疾患治療の基盤を確立する。

3. 研究の方法

IL-5 産生細胞をフローサイトメトリーで追跡できる IL-5/Venus マウスを用いて、ILC2 による IL-5 産生を介した炎症病態形成と恒常性維持機構に、短鎖脂肪酸および CsA がどのように影響するかを解析する。以下2項目に焦点を当てて計画を実行し、ILC2 を標的とした新たなアレルギー性疾患治療とへの応用を目指す。

(1) 短鎖脂肪酸による肺由来 ILC2 の IL-5 産生抑制に関する検討

IL-5/Venus マウスの肺から ILC2 をソーティングし、IL-33 および各種短鎖脂肪酸を添加し培養後、フローサイトメトリーにて Venus (IL-5) 発現変化を解析する。さらに IL-5/Venus マウスに短鎖脂肪酸を投与または、高繊維食/低繊維食を与え短鎖脂肪酸が多量に生体内に存在する状況において、定常状態および IL-33 刺激後の肺および脂肪における ILC2 の IL-5 産生抑制効果を検討した。

(2) CsA による喘息誘導時の肺における ILC2 の IL-5 産生制御と ILC2 の維持に関する検討

IL-5/Venus マウスの皮下に CsA を 2 週間投与した後、システインプロテアーゼであるパピンの経鼻投与により喘息病態を誘導し、肺の ILC2 および好酸球の数や ILC2 の IL-5 産生能を解析した。また、CsA 投与による ILC2 の IL-5 産生制御が直接か、または他の細胞を介して間接的に誘導されているかを ILC2 の培養実験や T 細胞や B 細胞の存在しない Rag2 KO マウスを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 肺由来 ILC2 と各種短鎖脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸) との共培養において、プロピオン酸または酪酸添加により 20 時間後の ILC2 における Venus⁺ (IL-5⁺) 細胞の減少が見られた。次に、IL-5/Venus マウスにプロピオン酸または酪酸を腹腔内投与し、定常状態または IL-33 投与後の肺および脂肪の ILC2 の Venus⁺ (IL-5⁺) 細胞をフローサイトメトリーで解析を行ったが、顕著な IL-5 産生細胞の減少は認められなかった。高繊維食を与えたマウスの解析においても、ILC2 の IL-5 産生抑制は認められなかった。以上の結

果から、短鎖脂肪酸により ILC2 の IL-5 産生を制御する可能性は低いことが示唆された。

(2) CsA を 2 週間投与後、パパインで喘息を誘導し、肺における ILC2 の数と IL-5 産生をフローサイトメトリーで解析した結果、総 ILC2 数および Venus⁺(IL-5⁺) ILC2 数の減少、好酸球数の減少が認められた(図 1,2)。この時の肺組織において HE 染色を行ったところ、炎症に伴う細胞の浸潤が CsA 投与群において減少しており、肺の炎症が抑制されていた(図 3)。また、CsA のみを 2 週間投与したマウスの肺においても ILC2 数が減少することが明らかとなった。

次に、CsA による ILC2 数の減少および IL-5 産生能の低下が ILC2 に対し直接誘導されている現象を確認するため、肺の ILC2 をソーティングし、ILC2 を活性化させるサイトカイン(IL-33、IL-7)、さらに CsA を添加し、19 時間培養した後の Venus⁺(IL-5⁺) ILC2 細胞の割合と数を比較した。その結果、CsA 添加群と、CsA を添加しないコントロール群との間に差は認められなかった。また、T 細胞や B 細胞が存在しない Rag2 KO マウスにも同様の実験(CsA 投与後にパパインを経鼻投与し、肺の ILC2 を解析)を行ったところ、ILC2 数および Venus⁺(IL-5⁺) ILC2 数に差は認められなかったことから、T 細胞が肺の ILC2 制御に関与していることが示された。

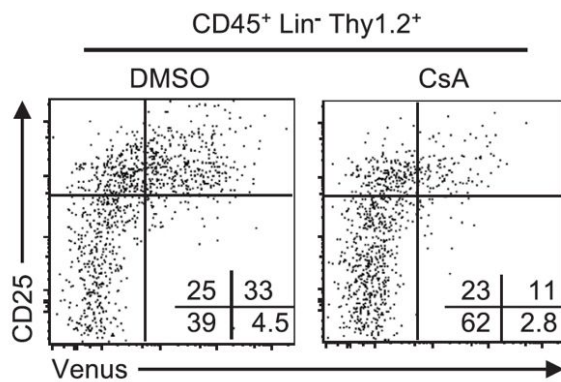


図 1. DMSO(対照群)とシクロスポリン(CsA)投与群の肺におけるパパイン刺激後の肺由来 ILC2 の Venus(IL-5)発現

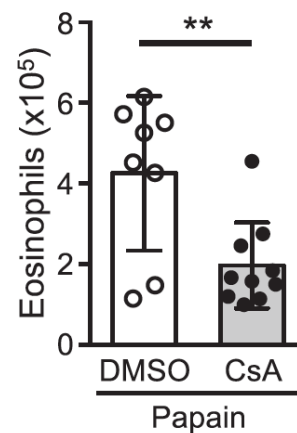
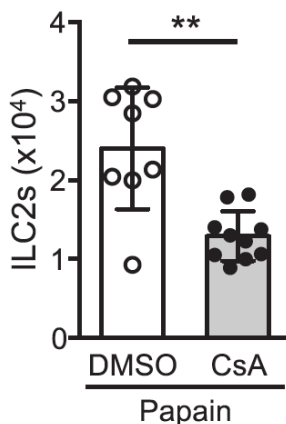


図 2. DMSO(対照群)とシクロスポリン(CsA)投与群の肺におけるパパイン刺激後の ILC2 と好酸球の絶対数

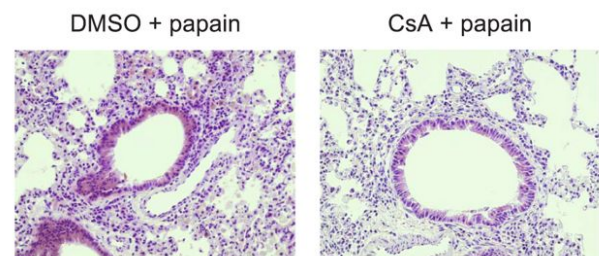


図 3. DMSO(対照群)とシクロスポリン(CsA)投与群のパパイン刺激後の肺組織 HE 染色像

以上の結果から、CsA はパパイン刺激後の肺の ILC2 数の減少と IL-5 産生抑制、および好酸球数の減少を誘導し、マウス喘息モデルにおける肺の炎症を抑制することが明らかとなった。さらに CsA は定常状態の肺における ILC2 の維持にも関わることを示唆された。また、喘息モデルにおける CsA の ILC2 抑制機構は、T 細胞を介して制御されていることが新たに分かった。本研究により、ILC2 の活性化抑制機構を介して肺の炎症が軽減される新たなメカニズムが解明され、ILC2 制御による喘息治療への応用の基盤となる結果を得ることができた。

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1件)
Kudo F, Ikutani M, Iseki M, Takaki S. Cyclosporin A indirectly attenuates activation of group 2 innate lymphoid cells in papain-induced lung inflammation. *Cell Immunol.* 査読有、2018 ; 323 : 33-40.

Published online 27-OCT-2017.
DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.10.010

6 . 研究組織

(1)研究代表者

工藤 藤美 (KUDO, Fujimi)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：3 0 7 2 6 4 1 9