

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20333

研究課題名(和文) アレルギー性結膜炎におけるILC2の役割

研究課題名(英文) The role of ILC2 in allergic conjunctivitis

研究代表者

浅田 洋輔 (ASADA, Yosuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70596626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では眼部における2型自然リンパ球 (Innate lymphoid cells, ILC2)を同定しその機能解析を目的に実験を行ってきた。自然免疫系アレルギー性結膜炎マウスモデルにおいてILC2が涙腺と結膜に存在し、かつ好酸球浸潤、炎症性サイトカインの惹起において重要な役割を果たしていることが判明した。またILC2を除去することで炎症が抑えられることが判明した。さらにアレルギー性結膜炎におけるヒト結膜組織においてもILC2が存在していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have performed experiments to identify type 2 Innate lymphoid cells (ILC2) in the eye and to analyze their functions. It was found that ILC2 is present in the lacrimal gland and conjunctiva in a mouse model of innate immune system allergic conjunctivitis and plays an important role in the induction of eosinophil infiltration and inflammatory cytokines. It was also found that inflammation can be suppressed by removing ILC2. Furthermore, ILC2 was also found in human conjunctival tissue in allergic conjunctivitis.

研究分野：アレルギー性結膜炎

キーワード：アレルギー性結膜炎 IL-33 ILC2 自然リンパ球 自然免疫 TSLP

## 1. 研究開始当初の背景

2010年 Moro らによって Natural helper 細胞として報告された ILC2 は既知の細胞系譜のマーカー陰性 (lineage 陰性) かつ IL-33 レセプターおよび CD25 抗原陽性の新しいリンパ球であり、IL-33 に反応し Th2 サイトカイン (IL-5, IL-13) を多量に放出する。IL-5 は肥満細胞に作用して好酸球を誘導し、IL-13 はムチンの産生を増加させ粘膜肥厚をもたらすため、ILC2 はアレルギー疾患において重要な役割を果たしていると考えられている。またマウス喘息モデルにおいて ILC2 は IL-33 および TSLP の刺激により、ステロイド抵抗性を示すことが報告されている。我々は慢性アレルギー性結膜炎疾患であるアトピー性角結膜炎 (AKC)/ 春季カタル (VKC) の病態に好酸球浸潤が関与し、IL-33 および TSLP が高発現していることを報告してきた。また臨床的にも、重症 AKC/VKC 患者の中にはステロイドや免疫抑制剤に抵抗性である症例が存在し、ILC2 がその病態に関連していることが予想される。申請者はタンパク分解酵素であるパピンを浸漬させたソフトコンタクトレンズを 4 日間マウス眼球に装着することで、自然免疫系結膜炎モデル (PSCL モデル) を樹立した。野生型マウスでは PSCL モデルにおいて結膜における好酸球浸潤や 2 型サイトカインである IL-4, IL-13, IL-33 の遺伝子発現上昇を認め、臨床的に結膜アレルギーに近い臨床像を得ている。また、獲得免疫系の細胞を欠く Rag2 KO でも野生型マウスと同程度の好酸球浸潤を認める事を確認している。ILC2 がアレルギー性炎症に果たす役割に関して、皮膚、肺、肝臓、等での報告なされているが、眼球およびその付属器についての報告はない。本研究によって ILC2 が、眼アレルギー性炎症の重症化に果たす役割を明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

アレルギー性結膜炎における ILC2 と IL-33、TSLP の役割を、自然免疫あるいは獲得免疫にそれぞれ依存する 2 種のアレルギー性結膜炎モデルを用いて明らかにする。

1. 抗マウス CD25 抗体投与によって ILC2 を除去した Rag2KO マウスを用いて自然免疫依存性パピン結膜炎モデルを作成し、好酸球浸潤ならびに 2 型サイトカイン発現を Rag2KO マウスと比較する事で、自然免疫に依存するアレルギー性結膜炎における ILC2 の役割を明らかにする。また逆に ILC2 を欠く Rag2/common gamma chain (c) KO マウスに涙腺由来の ILC2 を移入したマウスで同様の実験を試行し、ILC2 の役割を検証する。

2. IL-33KO および TSLP receptor (TSLPR) KO マウスを用い、パピン結膜炎モデルならびに獲得免疫に依存するマウスブタクサ花粉結膜炎モデルを作成し、それぞ

れのモデルにおける ILC2 の結膜内浸潤および活性化状態をフローサイトメトリー (FACS) により評価し、IL-33/TSLP が結膜炎発症時に ILC2 の結膜内での活性化に果たす役割を明らかにする。

3. TSLP シグナルにより、ステロイド依存性の ILC2 の細胞死が抑制されるとの既報が結膜炎モデルにおいても成立するのかを検証する。具体的には、野生型マウスならびに TSLPR-KO マウスを用いて、パピン結膜炎ならびにブタクサ結膜炎モデルの作成時にデキサメサゾン腹腔内に同時投与するモデルを作成する。評価は結膜内 ILC2 の浸潤数と活性化状態を FACS も用いて定量する。

4. ILC2 が IL-13 を強発現していることから、IL-13 レポーターマウスを用いて、結膜炎モデルにおける ILC2 の動態 (とくに涙腺から眼表面への遊走) を可視化するとともに、涙腺除去実験および各種のケモカイン阻害剤を用いた ILC2 の遊走抑制実験を施行する。

5. IL-33 中和抗体投与による ILC2 の活性化抑制を試み、ILC2 をターゲットにした新たなアレルギー性結膜炎の治療を目指した基礎的なデータを得る。

6. AKC/VKC 患者の結膜組織から ILC2 の FACS 解析を行い、ヒト結膜組織における ILC2 が存在を明らかにする。

T リンパ球をはじめとする獲得免疫を抑制するタクロリムス点眼の臨床応用によって、近年 VKC/AKC の治療成績は改善したが、依然として免疫抑制剤やステロイドの投与に抵抗する重症例が存在し、視機能に不可逆的な障害を残すことも多い。自然免疫系に依存するアレルギー反応における ILC2 や IL-33, TSLP の役割を獲得免疫に依存する反応と対比して、明らかにしてゆくことで、免疫抑制剤やステロイドに抵抗性を示すヒト慢性重症アレルギー性結膜炎症例における自然免疫依存性のアレルギー反応の役割を臨床的に探る手がかりを得る可能性が期待される。またひいては、現治療に抵抗する重症例に対する新たな治療法への展開も期待される。一方、これまでの予備実験から、マウスの涙腺に多量の ILC2 が存在することを確認しており、結膜炎発症時に涙腺から眼表面の ILC2 の遊走を証明することで、炎症に伴う ILC2 の移動を確認するはじめてのモデルケースとなり、各種の治療による ILC2 の遊走抑制を検証することが可能になる。さらに、ILC2 の活性化に関連する TSLP および IL-33 が、ヒトの AKC/VKC 患者の結膜組織に存在することを当研究室から報告しており、すでに保有している豊富な臨床サンプルを用いてヒト組織での ILC2 の役割の検証への展開も視野にいれて研究を進める。

### 3. 研究の方法

アレルギー性結膜炎における ILC2 の役割を解析し、遊走および活性化の制御を試みることで、近将来の臨床応用のための基礎的データを構築することを目標とする。ILC2 欠損マウスおよび ILC2 除去マウスを用いて、アレルギー性結膜炎の病態に ILC2 が果たす役割を明らかにする。IL-33, TSLP がアレルギー性結膜炎における ILC2 の活性化に果たす役割を、ノックアウトマウスを用いて精査する。ILC2 が強発現する IL-13 のレポーターマウスを用いて、ILC2 の移動を可視化する。ILC2 を活性化する IL-33 中和抗体の投与、また ILC2 の遊走に関連するケモカインの阻害剤を用いた ILC2 の抑制実験をアレルギー性結膜炎モデルで施行し、効果を評価する。ヒト結膜組織における ILC2 の同定を FACS 用いて検討する。

マウスにパピンを吸入させて作成する自然免疫依存性喘息モデルを参考に、我々は自然免疫依存結膜炎モデルとして、パピンを吸着させたソフトコンタクトレンズ (PSCL) をマウスに装着させることで自然免疫に依存する結膜炎 (パピン結膜炎モデル) を樹立した。パピン結膜炎モデルにおいて野生型マウスと Rag2KO マウスで結膜中に誘導される好酸球浸潤数に違いが無いことから、獲得免疫細胞を介さずに好酸球性炎症を引き起こすモデルであることを確認している。また、パピンは実際にヒトのコンタクトレンズ洗浄液の成分であり、アレルギー性結膜炎を引き起こすことが報告されており、実際の臨床病態に即したモデルである。獲得免疫系アレルギー性結膜炎モデルは、既に確立しているブタクサ花粉を用いた結膜炎モデルを使用する。

ILC2 除去マウスおよび ILC2 欠損マウスに ILC2 を移入する系を用いてパピン結膜炎モデルを作成し、ILC2 がパピン誘発結膜炎の病態に果たす役割を検証する：抗 CD25 抗体ならびにコントロール抗体を投与した Rag2KO マウスで、PSCL によるアレルギー性結膜炎を誘導する。好酸球浸潤数および炎症性サイトカインを定量することでアレルギー性炎症を評価し、ILC2 の役割を明らかにする。また、涙腺由来培養 ILC2 を ILC2 が存在しない Rag2/c KO マウスに細胞移入し、ILC2 の役割に関して裏付け実験を行う。

IL-33, TSLP がアレルギー性結膜炎における ILC2 の活性化に果たす役割を、ノックアウトマウスを用いて評価する：IL-33KO、TSLPRKO マウスならびに野生型マウスを用いて、パピンコンタクト結膜炎モデルとブタクサ花粉結膜炎モデルを作成し、自然免疫または獲得免疫が主導するアレルギー性結膜炎のモデルにおいて、ILC2 の活性化状態、好酸球の浸潤数、2 型サイトカインの発現を評価し、自然免疫系および獲得免疫系のアレルギー反応における ILC2 の働きと

IL-33/TSLP シグナルの役割を明らかにする。

マウスアレルギー性結膜炎モデルにおけるステロイドおよび免疫抑制剤投与と ILC2 の関係を明らかにする：自然免疫依存性のパピン結膜炎モデル、ならびに獲得免疫依存性のブタクサ結膜炎モデルを用い、デキサメサゾンおよびタクロリムスの腹腔内投与によるアレルギー性炎症の変化を好酸球浸潤並びにサイトカイン発現の定量で評価する。特にパピン結膜炎モデルでは、ステロイドならびにタクロリムスに対して治療抵抗性を示すことが予想される。予想どおりの結果が得られた場合、デキサメサゾン投与の有無で、ILC2 の結膜内への浸潤数ならびに活性化状態が変化するか FACS で評価するとともに、既報で ILC2 のステロイド抵抗性に関連するとされている TSLP の受容体欠損マウスを用いてデキサメサゾン投与の影響を評価する。

ILC2 が IL-13 を強発現していることから、IL-13 レポーターマウスを用いて ILC2 の可視化を行い、結膜炎モデルにおける ILC2 の動態 (涙腺から眼表面への遊走) を確認するとともに、涙腺除去実験および各種のケモカイン阻害剤を用いた ILC2 の遊走抑制実験を施行する：ILC2 は多量の IL-13 を産生することが報告されており、実際 ILC2 の結膜内浸潤を伴うパピン結膜炎モデルにおいても IL-13 発現上昇を確認している。我々が交配で樹立した Rag2KO-IL-13-YFP-Tg マウスはリンパ球を欠くため、YFP 陽性細胞の多くが ILC2 であり、ILC2 の *in vivo* 観察モデルとして有用である。このマウスを用いて結膜炎モデルを作成し、ILC2 の涙腺から眼表面への遊走をあらかじめ涙腺内に蛍光色素の DiI を投与する事で標識された ILC2 を同定する事で FACS ならびに *ex vivo* の免疫染色法で確認する。また、眼窩外涙腺を外科的に除去し、涙腺由来 ILC2 が結膜炎モデルにおいて果たす役割を検証する。ILC2 の遊走に関連しているとの報告があるケモカイン CCL4 の阻害剤を投与した際の結膜炎モデルにおける ILC2 の動態を評価する。

IL-33 中和抗体投与による ILC2 機能抑制実験：パピン結膜炎モデルにおいて、IL-33 の中和抗体の腹腔内および点眼投与実験を行う。好酸球の局所浸潤の抑制を指標にして、投与のタイミング、投与量、投与方法に関して検討する。

ヒト結膜組織における ILC2 の同定を FACS 用いて検討する：マウスでの成果を元にヒト AKC/VKC 患者由来の巨大乳頭組織での ILC2 を同定する。治療目的で切除した巨大乳頭組織をコラゲナーゼ処理し、細胞を単離、FACS でヒト ILC2 マーカーとされる Lineage-/CD161+/CRTH2+細胞分画を分取し、形態学的な解析と ST2L (IL-33R) 発現および IL-13 産生能の有無を検証する。

### 4. 研究成果

研究開始当初の背景では眼部に ILC2 がいる

ことが証明されていなかったがその後眼部に ILC2 がいることを報告することができた。また ILC2 が存在しない Rag2/c KO マウスでは自然免疫系アレルギー性結膜炎において炎症が軽くなり、また抗 CD25 抗体を用いた除去マウスモデルにおいても、炎症が軽くなることが判明した。獲得免疫性アレルギー性結膜炎においては IL-33 と TSLP が ILC2 と関与していることを想定し ILC2 が自然免疫系アレルギー性結膜炎において重要な役割を果たしていることが考えられたが、獲得免疫系結膜炎モデルにおいては ILC2 の有無で大きな変化は見られなかった。またヒト結膜組織における ILC2 の同定も行い FACS を用いてヒト結膜内における ILC2 の存在を同定した。以上のことは学会報告を行った。

#### 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 4 件)

Sugita J, Asada Y, Ishida W, Iwamoto S, Sudo K, Suto H, Matsunaga T, Fukuda K, Fukushima A, Yokoi N, Ohno T, Azuma M, Ebihara N, Saito H, Kubo M, Nakae S, and Matsuda A. Contributions of Interleukin-33 and TSLP in a papain-soaked contact lens-induced mouse conjunctival inflammation model. Immun Inflamm Dis. 2017 5(4):515-525. 査読有

浅田 洋輔、「花粉-食物アレルギー症候群の病態と治療」に寄せる アレルギー性結膜炎における自然免疫の役割。アレルギーの臨床(0285-6379)38 巻 3 号 Page268-271(2018.03)査読有

浅田 洋輔、「花粉や黄砂に対する洗眼と防御の役割」に寄せる アレルギー性結膜炎における ILC2 アレルギーの臨床(0285-6379)37 巻 6 号 Page574-578(2017.06)査読有

浅田 洋輔、海老原 伸行【眼アレルギーの最新診療】 春季カタルに対するタクロリムス点眼治療 アレルギーの臨床(0285-6379)36 巻 8 号 Page743-746(2016.08)査読有

#### [学会発表](計 5 件)

浅田 洋輔  
実験的アレルギー性結膜炎における上皮細胞由来 2 型サイトカインの役割  
第 120 回日本眼科学会総会  
2016 年 4 月 10 日  
仙台国際センター(宮城県)  
Yosuke asada  
The roles of IL-33 in ragweed-induced experimental allergic conjunctivitis with lacrimal gland excision  
ARVO annual meeting 2016

2016 年 5 月 3 日

Seattle, USA

浅田 洋輔

実験的アレルギー性結膜炎における涙腺由来の ILC2 ならびに IL-33 の役割

第 121 回日本眼科学会総会

2017 年 4 月 6 日

東京国際フォーラム(千代田区)

Yosuke Asada

Dual roles of IL-33 in ragweed-induced mouse conjunctivitis models under lacrimal gland excision

ARVO annual meeting 2017

2017 年 5 月 4 日

Baltimore, USA

浅田洋輔

実験的アレルギー性結膜炎における

上皮由来 2 型炎症起始サイトカインの役割

第 6 回日本眼科アレルギー講習会

2017 年 9 月 30 日

東京コンファレンスセンター・品川

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

浅田 洋輔 (Asada Yosuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 70596626

##### (4) 研究協力者

松田 彰 (Matsuda Akira)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 00312348

中江 進 (Nakae Susumu)

東京大学, 医科学研究所・准教授

研究者番号: 60450409