

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06630

研究課題名(和文)2型自然リンパ球の新規制御法を通じたアレルギー疾患新規治療の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapy for allergic diseases through the modulation of type 2 innate lymphoid cells

研究代表者

石井 崇史 (Ishii, Takashi)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：30803118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：2型自然リンパ球(ILC2)はアレルギー疾患の病態に関わる事が示されている。ILC2の活性化の機序は近年研究されているがまだ不明な点も多く、本研究ではその機序の一端として自然免疫受容体であるTLR2に着眼した。TLR2刺激によりILC2がアレルギー疾患に関わる物質IL-5, IL-13を産生する事が判明し、更にアレルギー疾患と関わる深いダニの抽出物はその作用を増強する事が明らかになった。生体内での役割も検証し、気管支喘息の病態に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型自然リンパ球(ILC2)が自然免疫受容体のTLR2により直接的に活性化され、気管支喘息の病態、感染の後の喘息症状の悪化などに関わる可能性がある事を示した。感染時の防御反応としてTLR2を含めた自然免疫受容体の役割は重要であるが、その過剰な活性化を抑制する事で喘息症状の改善に関与できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Type 2 Innate lymphoid cells (ILC2s) are known to be involved in allergic diseases such as asthma. How ILC2s are activated has been studied recently, and we focused on whether innate immune receptor TLR2 could activate ILC2s.

Upon stimulation of lung ILC2s by TLR2 agonist, allergic mediators such as IL-5 and IL-13 could be produced. Furthermore, house dust mite extract, which often causes allergic diseases, could enhance these effects. Taken together with in vivo results, Activation of lung ILC2s by TLR2 may be involved in the pathogenesis of asthma,

研究分野：呼吸器・アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息 アレルギー 自然リンパ球

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

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 呼吸器は外界に晒された系であり、呼吸器疾患の病態形成の多くに自然免疫系が関与している。自然免疫受容体のうち toll-like receptor (TLR) は、病原体成分を認識後に自然免疫系を発動させる事で、生体防御に重要な役割を果たす。マウスでは 12 種類、ヒトでは 10 種類が同定されていて、種間で良く保存されており、その認識対象は受容体毎に異なる。一方、TLR は気管支喘息のようなアレルギー性疾患への関与も近年報告されてきた。

(2) 近年同定された細胞群である 2 型自然リンパ球 (ILC2) は、リンパ球に認められる特異的な抗原受容体を持たないが、IL-25、IL-33 等のメディエーターによる刺激を受けて IL-5、IL-13 等のサイトカインを分泌し寄生虫防御に貢献するが、その一方で気管支喘息等のアレルギー性疾患発症に関与することが分かってきた。ILC2 の活性化の誘因は様々であり、現状で未解明な部分も多数ある。

(3) ILC2 に於ける TLR の発現は同細胞のトランスクリプトーム解析や qPCR による発現解析でその存在は示唆されているが、詳細な機能に関しては不明である。TLR が気管支喘息病態に関与している事を踏まえると、ILC2 自体の TLR もその病態に関与し、TLR 制御を介した ILC2 による気管支喘息の病態形成の改善ができる可能性が考えられる。

#### 2. 研究の目的

(1) 申請者らの以前の研究で肺由来 ILC2 は IL-2 存在下で TLR2 agonist である Pam3CSK4 (PAM) を投与すると IL-13 を産生する事が *in vitro* で確認されている。これを元に TLR、特に TLR2 に主眼を置き、肺由来 ILC2 における発現を調べ、サイトカイン分泌能を含めた機能を評価する。また、TLR 刺激を受けた ILC2 が生体内で果たす役割を検討する。

(2) ILC2 の制御はアレルギー疾患の新規治療ターゲットとして重要であり、その活性化メカニズムや抑制経路の解明は重要な貢献をされると考えられるが、いずれも十分には解明されていない。本研究では上記を中心に、ILC2 の新規活性化メカニズムや抑制経路の同定を行い、アレルギー疾患新規治療法を探索する。

#### 3. 研究の方法

(1) 野生型/TLR2K0 雌マウスに IL-33 を点鼻投与して ILC2s を誘導した。ILC2 は特徴的な細胞面抗原マーカー (lineage- CD25+ CD125+ IL-33R+ Sca-1+) を持つので、IL-33 投与後に採取したマウス肺より単細胞懸濁液を得て、特異的蛍光抗体で処理後、セルソーターを用いて上記特徴を持った細胞をソーティングした。

分離した ILC2 を TLR2 および TLR4 を中心とした TLR の発現について、蛍光標識抗体を用いてスクリーニングした。検出にはフローサイトメトリーを用いた。TLR2 に関しては蛍光免疫染色でも確認した。

(2) 分離した ILC2 を IL-2 添加培地で培養し、細胞を刺激した。TLR 刺激物質候補として IL-33/ PAM/ LPS/ HDM/ PAM+LPS/ PAM+HDM を用いた。刺激後約 72h 後に上清と ILC2-RNA を回収した。また、上清の IL-13 濃度を ELISA 法にて測定した。回収した RNA より cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法にて IL-5、IL-13 の遺伝子発現を定量した。

IL-33 は positive control、PAM は TLR2 アゴニスト、LPS は TLR4 アゴニスト、HDM はダニ由来粗抽出液で自然免疫系活性化をもたらす、TLR2/TLR4 や dectin-1 の活性化が報告されている。

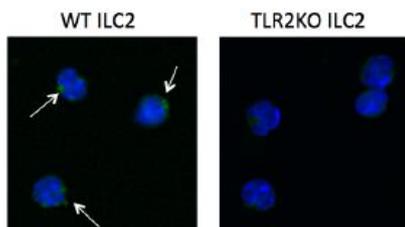
(3) TLR 刺激物質にて type 2 cytokine 産生を認めたものを対象に細胞内での産生経路を推定した。TLR2or4 シグナリング経路を考慮して NF- $\kappa$ B や AP-1 阻害薬を使用し、上記サイトカインの産生抑制が見られるかを評価した。HDM による PAM 刺激増強効果に関与する経路としては TLR4、dectin-1 を想定し、TLR4 に関しては TLR4K0 ILC2 を用いて検証し、dectin-1 はシグナリング経路に関わる Syk の阻害剤を用いた。

(4) *in vitro* で認められた作用が生体内においてどのような役割をもたらすかを検討するため、マウスモデルを作成した。IL-33 を点鼻投与したマウスを一定期間置き、誘導される好酸球が減少し、且つ ILC2 は残存した状態にした。このマウスに PAM や HDM、PAM+HDM の細胞刺激の時に用いた物質の組み合わせを用いて点鼻投与を 1 度行い、翌日以降に気管支肺胞洗浄液、肺を回収する。気管支肺胞洗浄液の総細胞数や細胞分画、IL-13 濃度、肺内 ILC2 数の測定、肺由来 RNA を用いた IL-13 等の遺伝子発現量の測定を行い、ILC2 の増加や IL-13 発現上昇が見られるか観察した。また、気管支喘息に特徴的なアセチルコリン誘発気道抵抗の上昇を認めるか、気道抵抗測定装置を用いて行った。肺組織の HE 染色等を用いた病理解析も行った。

#### 4. 研究成果

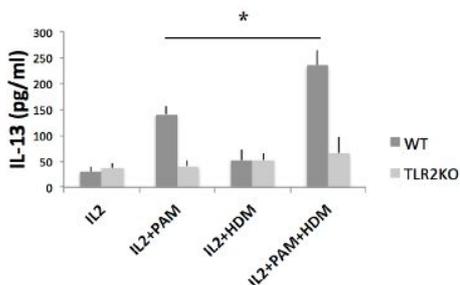
(1) 野生型、TLR2K0、TLR4K0 マウスいずれに於いても IL-33 投与により、BALF 中の好酸球数

増多と共に肺内 ILC2 の誘導を認めた。分離した総 ILC2 数は系統間で差は認めなかった。ILC2 を抗 TLR2, TLR4 蛍光標識抗体で標識しフローサイトメトリーで測定した所、両者の検出を認めた。TLR2 の蛍光免疫染色所見を下に示す。

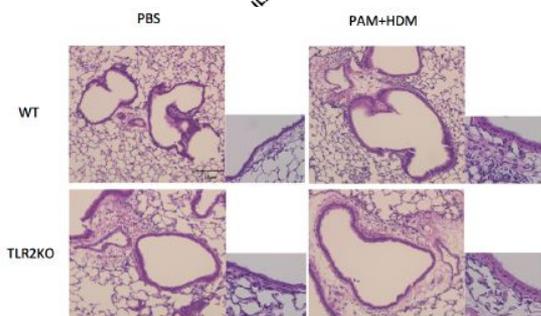


(2) ILC2 は IL-33 刺激での IL-13 多量産生を認めた一方、PAM による IL-13 産生と更に HDM 追加による IL-13 産生の相乗効果を認めた(ELISA の所見を下に示す)。LPS では同産生は認めなかった。TLR2KO ILC2 では PAM や PAM+HDM による IL-13 産生は誘導されなかった。リアルタイム PCR 法では、IL-5/IL-13 発現の増加を、PAM 刺激野生型 ILC2 で認めた。また、

PAM+HDM 刺激により、PAM 単独投与と比較して IL-5/IL-13 発現増強を認めた。



(3) NF- $\kappa$ B や AP-1 阻害薬投与により、野生型 ILC2 の PAM や PAM+HDM 刺激による IL-13 産生は抑制された。HDM による PAM 刺激増強効果に関しては、TLR4KO ILC2 においても、Syk の阻害剤に於いても抑制されなかった。TLR2 自体に依存している事が示唆された。



(4)新規に作成したモデルでは、IL-33 を点鼻投与後一定期間おいたマウスに PAM+HDM を単回投与した野生型マウスにおいて、PBS 投与(コントロール)群よりも BALF 中の好中球、好酸球の増多と肺 ILC2 数の増多や IL-13 発現が増強していた。また、PAM+HDM 群のみ、メサコリン誘発気道過敏性の上昇を認めた。肺組織 HE 染色においても炎症細胞の気道周囲や小血管周囲への浸潤が PAM+HDM 投与により認められた(左図)。

TLR2KO マウスでは BALF 中の好中球、好酸球の増多が野生型と比して抑制され、また肺 ILC2 数の増多や IL-13 発現は PAM+HDM 投与によっても誘発されなかった。

(5)以上より、IL-33 経鼻投与で誘発された ILC2 は TLR2、TLR4 を発現し、TLR2 のリガンドである PAM は TLR2 活性化により IL-5/IL-13 の type 2 cytokine を産生する事が明らかになった。この事象には TLR2 シグナリング経路の下流にある転写因子 NF- $\kappa$ B や AP-1 に依存していた。また、HDM は単独では ILC2 からの type 2 cytokine 産生を惹起させないが、PAM に HDM を追加することで type 2 cytokine 産生が増強し、TLR4 や dect in-1 に依存せず TLR2 自体に依存する可能性が示唆された。

この事象の生体内における影響を検証するモデルでは、IL-33 事前投与後に PAM+HDM を単回投与する事で ILC2 の増多、IL-13 産生増強に加えて、好中球/好酸球の気道炎症と気道過敏性上昇を認め、気管支喘息の特徴と類似した事象を惹き起こす事が出来た。これらの事象は TLR2 に依存している事が判明した。

ILC2 以外の他の細胞も関わっている事は否定できないが、少なくとも IL-33 投与無しの場合では PAM+HDM 投与のみで ILC2 増多や IL-13 発現の上昇、気道過敏性の上昇は認めなかったことから、ILC2 はこの事象に深く関わっている事が明らかになった。

(6)インフルエンザ感染後の患者/気管支喘息患者のような、気道上皮バリアの破綻かつ ILC2 が活性化している状況において、感染(マイコプラズマは TLR2 を活性化する)+ダニ成分吸入曝露が起こることで、本モデルのメカニズムが適応される可能性があり、気管支喘息の病態解明の一端を担うものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)現在投稿中

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 第 39 回日本炎症・再生医学会

自然免疫受容体 TLR2 を介する 2 型自然リンパ球の活性化と気管支喘息病態における役割

石井崇史<sup>1,2</sup> 新倉雄一<sup>1</sup> 村上祐輔<sup>1</sup> 長瀬隆英<sup>2</sup> 山下直美<sup>1</sup>

1. 武蔵野大学薬学部 薬物療法学 2. 東京大学医学部附属病院 呼吸器内科  
2018年7月11日(水) 京王プラザホテル P10-1

(2) 第67回日本アレルギー学会学術大会  
自然免疫受容体TLR2により直接活性化される2型自然リンパ球は気管支喘息様病態形成に  
関与する

石井崇史<sup>1,2</sup> 新倉雄一<sup>1</sup> 村上祐輔<sup>1</sup> 長瀬隆英<sup>2</sup> 山下直美<sup>1</sup>

1. 武蔵野大学薬学部 薬物療法学 2. 東京大学医学部附属病院 呼吸器内科  
2018年6月22日(金) 幕張メッセ MS05-2

(3) A1307 - Toll-Like Receptor 2 Directly Activates Pulmonary Type2 Innate Lymphoid  
Cells and Modify the Asthmatic Phenotype

Takashi Ishii<sup>1,2</sup> Yuichi Nikura<sup>1</sup> Yusuke Murakami<sup>1</sup> Takahide Nagase<sup>2</sup> Naomi Yamashita<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacotherapy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences,  
Musashino University 2. Department of Respiratory Medicine, Graduate School of  
Medicine, The University of Tokyo

Thematic Poster Session

ATS 2018 San Diego 2018年5月20日(日) San Diego convention center

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

(2) 研究協力者 該当なし

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。