

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08143

研究課題名(和文) 免疫不全ブタを用いたブタ自然リンパ球の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of porcine innate lymphoid cells using immuno-deficient pigs.

研究代表者

鈴木 俊一 (Suzuki, Shunichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：90391581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血球マーカー陽性/分化マーカー陰性(CD45+CD3-CD8-CD14-CD16-CD21-)かつ特異的転写因子(T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t)陽性の細胞として、ブタ自然リンパ球(ILC)1～3を検出する方法を確立した。野生型ブタにおいて、ILC1は末梢血、ILC2は肺で比較的多く存在し、ILC3は全ての組織で極めて少数であった。また、RAG2ノックアウトブタにおいては、末梢血を除く各組織でILC1と2の存在頻度が野生型より高かった。続いて、ILCを濃縮し、インターロイキン応答活性の解析を行い、ILC1におけるIFN $\gamma$ 誘導活性を確認することができたが、ILC2の活性は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスやヒトにおいて解析が進められている自然リンパ球が、これまで報告が皆無であったブタにおいても、同様に存在することを示唆するデータを得ることができた。十分な解析を達成するには至らず、濃縮方法や活性解析に関してさらなる検討が必要であるものの、本研究の成果は、実験動物としてのブタの汎用性拡大および産業動物としてのブタにおける抗病性向上に向けた研究の両面に資する可能性のあるものである。

研究成果の概要(英文)：We have enabled the identification of porcine ILC1-3 as specific transcription factor (T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t)-positive cells in hematopoietic marker-positive (CD45+) and lineage marker-negative (CD3-CD8-CD14-CD16-CD21-) cells. In wild type pigs, the frequency of ILC1 and ILC2 was relatively high in peripheral blood (PB) and lung, respectively. That of ILC3 was extremely low in all tissues examined. Meanwhile, RAG2 knockout pigs was showed the higher frequency of ILC1 and ILC2 than wild-type pigs in all tissues except PB. Besides, after the concentration of ILCs using MACS and FACS, we examined the response for interleukin stimuli. It was shown that the release of IFN $\gamma$  from ILC1 was induced by IL2, 12, 18 treatment, but any response of ILC2 could not be detected.

研究分野：実験動物学

キーワード：自然リンパ球 インターロイキン ブタ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球(Innate Lymphoid Cell; ILC)は、自然免疫に関わるリンパ球であり、T 細胞や B 細胞のような抗原特異的な反応を惹起せず、主としてサイトカイン産生細胞としての機能を持つ細胞群である。ILC は 1~3 に分類されており、各々がヘルパー T 細胞のサブセット(Th1、Th2、Th17) に類似したサイトカイン応答性を持つ。ILC1 は IL-12 や IL-18 に反応して IFN $\gamma$  を産生する細胞群で NK 細胞を包含するとされている。ILC2 は IL-25 や IL-33 に反応して、IL-5 や IL-13 を産生する細胞群で、寄生虫に対する感染防除やアレルギー反応に関わる。ILC3 は、IL-23 に反応して、IL-17A や IL-22 を産生する細胞群であり、細胞外の細菌に対する防除機能を持つとされている。これらの細胞集団は、マウス及びヒトでその存在が明らかとされており、アレルギー性疾患や炎症性腸疾患などの関連が示唆され、急速に研究が進展しているが、ブタをはじめとする他の実験動物・家畜における知見は(古典的な NK 細胞を除き、)ほぼ皆無である。重要な産業動物であるブタにおいて、自然リンパ球の存在や機能を明らかにすることは、獣医学産領域において、その機能制御による感染防除や疾病症状の緩和を目指した応用につながるものである。加えて、ブタの実験動物としての利用という観点からも、自然リンパ球が関わる疾患に関して、ヒトのモデル動物としてブタの利用可能性を明らかにするという点でも意義深いものである。

### 2. 研究の目的

産業動物かつ実験動物として重要なブタにおける、自然リンパ球の同定法を確立し、その存在様態を明らかにする。さらに、必要なブタインターロイキンの作製・精製し、それを用いた *in vitro* 刺激試験を行い、ブタ ILC のインターロイキン応答性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) ブタインターロイキンの作製：IL-12, 18, 23, 25 は CHO 培養細胞を用いて、IL-33 はブレビバチルス菌発現系を用いて作製し、タグ精製を行った。
- (2) FACS によるブタ ILC の同定：血球マーカー陽性/分化マーカー陰性(CD45+CD3-CD8-CD14-CD16-CD21-)かつ特異的転写因子(T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t)陽性の細胞として、ILC1~3 を FACS にて検出する方法を検討した。
- (3) ブタ ILC 存在様態の解析：(2)の手法を用いて、各種組織(末梢血、脾臓、腸間膜リンパ節、肺、回腸)における ILC1~3 の存在頻度を解析した。
- (4) 免疫不全ブタにおける ILC 存在様態の解析：一部組織について(3)と同様な解析を RAG2 ノックアウトブタと IL2RG ノックアウトブタにおいても行った。
- (5) ILC のインターロイキン応答性の解析：ILC を濃縮した後、(1)で作製したインターロイキンを添加し、分泌されるインターロイキンの培養上清中濃度を ELISA にて測定した。

### 4. 研究成果

- (1) ブタインターロイキン(IL)の作製：IL-12, 18, 23, 25 は CHO 培養細胞を用いて、IL-33 はブレビバチルス菌発現系を用いて作製し、アフィニティータグ(Strep, FLAG, His)により回収・精製することに成功した。IL-25 は一般にホモダイマーを形成することが知られているが、還元/非還元条件下での SDS-PAGE により、回収した IL-25 がホモダイマー化していることを確認した。(図 1)

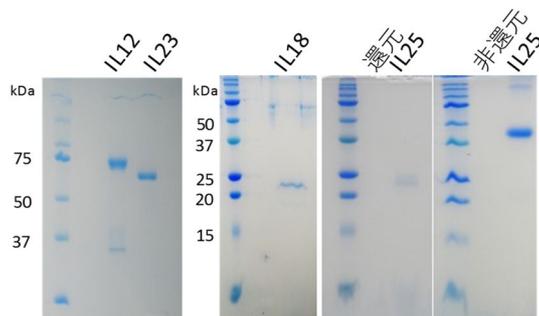


図1. インターロイキンの合成および精製 (CBB染色)

- (2) 作製した IL の生物活性の確認：既報を基に、各 IL の生物活性の検討を行った。IL-12 は IL-18 と共に添加することにより、ブタ末梢血有核細胞の IFN $\gamma$  mRNA 発現を誘導する活性を示した(図 2A)。IL-18 はヒト TNF $\alpha$  と共に添加することにより、KG1 細胞の IFN $\gamma$  mRNA 発現を誘導する活性を示した(図 2B)。IL-23 はマウス脾臓細胞に対し、IL-17A mRNA 発現を誘導する活性を示した(図 2C)。IL-25 は脾臓細胞に対し、IL-13 mRNA 発現を誘導する活性を示した(図 2D)。IL-33 の活性は、ブタ IL33 受容体を発現する 293 細胞に NF $\kappa$ B-GFP プラスミドを導入し、レポーターアッセイを行うことにより確認した(図 2E)。

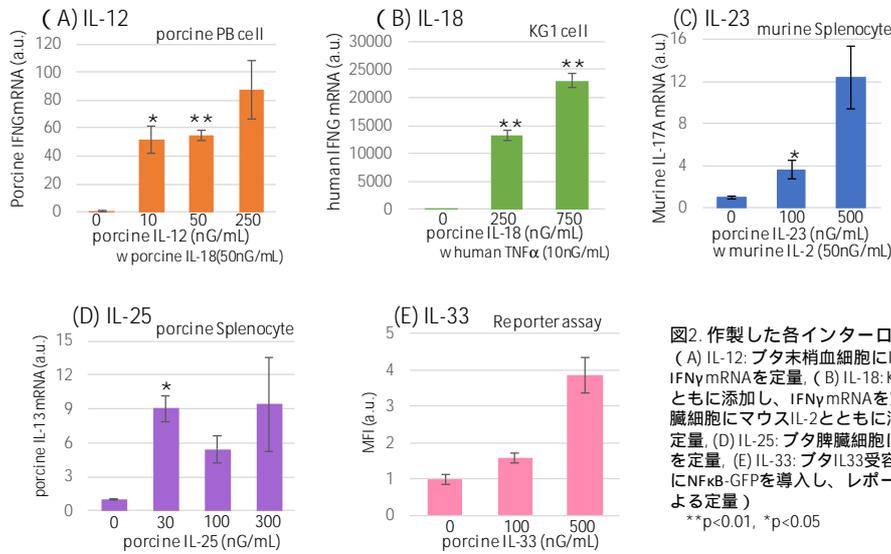


図2. 作製した各インターロイキンの活性測定  
 (A) IL-12: ブタ末梢血細胞にIL-18とともに添加し、IFN $\gamma$ mRNAを定量、(B) IL-18: KG1細胞にヒトTNF $\alpha$ とともに添加し、IFN $\gamma$ mRNAを定量、(C) IL-23: マウス脾臓細胞にマウスIL-2とともに添加し、IL-17AmRNAを定量、(D) IL-25: ブタ脾臓細胞に添加し、IL-13 mRNAを定量、(E) IL-33: ブタIL33受容体を発現する293細胞にNF $\kappa$ B-GFPを導入し、レポーターアッセイ (FACSによる定量)  
 \*\*p<0.01, \*p<0.05

(3) FACSによるブタ ILC の同定:  
 血球マーカー陽性/分化マーカー陰性 (CD45+CD3-CD8-CD14-CD16-CD21-) かつ特異的転写因子 (T-bet、GATA3、ROR t) 陽性の細胞として、ILC1~3をFACSにて検出・同定が可能であることを示した (図3)

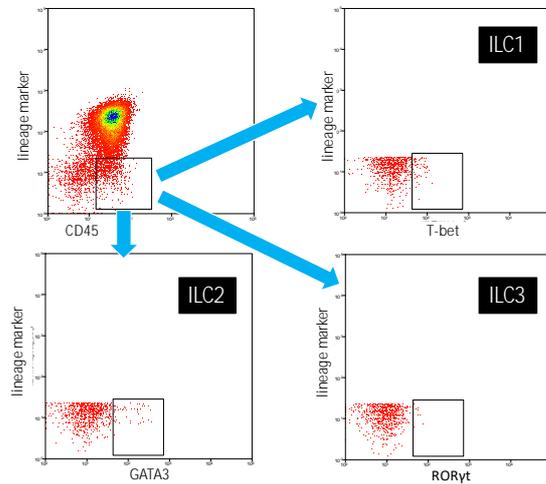


図3. FACSによるILCの同定  
 Lineage marker (CD3/CD8/CD14/CD16/CD21) 陰性かつCD45陽性細胞のうち、各々に特異的な核内転写因子を発現する細胞をILC1 (T-bet+)、ILC2 (GATA3+)、ILC3 (RORyt+) として同定した。

(4) 野生型および免疫不全ブタにおける ILC 存在様態の解析: (3)で確立した手法を用いて、野生型ブタにおける、全血球系細胞中に対する ILC の存在割合を各組織 [末梢血、脾臓、腸間膜リンパ節 (MLN)、肺、回腸] で比較検討した (図 4A~C)。ILC1 は末梢血 (1.4 ± 0.90%)、ILC2 は肺 (0.16 ± 0.030%) で比較的多く存在し、ILC3 はすべての組織で極めて低頻度 (0.03%以下) であった。続いて、T・B細胞は発生しないものの、NK細胞や ILC は正常に発生すると考えられる RAG2 ノックアウトブタで同様の解析を行った (図 4D~F)。ILC1 は野生型と異なり、末梢血 (0.21 ± 0.11%) より他の組織 (脾臓: 0.87 ± 0.089%、MLN: 0.50 ± 0.38%、肺: 0.72 ± 0.096%) で高頻度に存在していた。野生型との比較では、末梢血では低く、他の組織では高い傾向が見られた。ILC2 も同様な傾向を示した (末梢血: 0.030 ± 0.020%、脾臓: 0.29 ± 0.11%、MLN: 0.53 ± 0.41%、肺: 0.29 ± 0.027%)。ILC3については、すべての組織で野生型より低頻度 (0.007%以下) であった。一方、NK細胞や ILC も発生しないと考えられる IL2RG ノックアウトブタにおいては、末梢血・脾臓において IL1 と 3 はほぼ認められなかったが、ILC2 とみられる細胞がわずかに検出された。

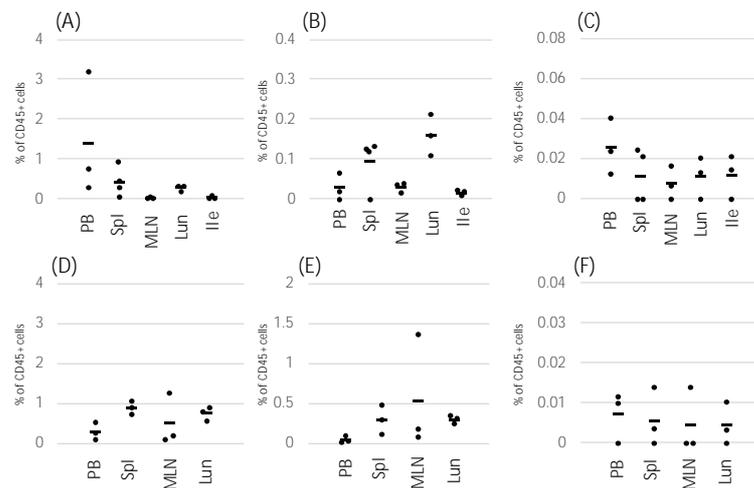


図4. 各組織におけるILC1~3の存在頻度  
 (A)~(C): 野生型ブタ、(D)~(F): RAG2ノックアウトブタ  
 (A), (D): ILC1、(B), (E): ILC2、(C), (F): ILC3  
 PB: 末梢血、Spl: 脾臓、MLN: 腸間膜リンパ節、Lun: 肺、Ile: 回腸

- (5) ILC のインターロイキン応答性の解析：分化マーカー陽性細胞 (CD3+/CD8+/CD14+/CD16+/CD21+) を除去し、残りの細胞から CD45+細胞を回収することで、ILC を濃縮し、in vitro におけるインターロイキン応答活性を解析した。ILC1 については、末梢血細胞を用いて、IL2・IL12・IL18 を添加して 72 時間培養後、IFN $\gamma$  の培地中濃度を ELISA により測定した結果、IFN $\gamma$  の誘導が確認された(図 5A)。ILC2 については、肺由来の細胞を用い、IL2・IL25・IL33 を添加して 72 時間培養後、IL5 および IL13 の培地中濃度を測定したが、変化は認められなかった(図 5B, C)。以上より、ブタにおいても他種と同様の活性を持つ ILC1 の存在は示唆されたが、ILC2 についてはインターロイキン応答活性が異なる可能性も含めてさらなる検討が必要である。

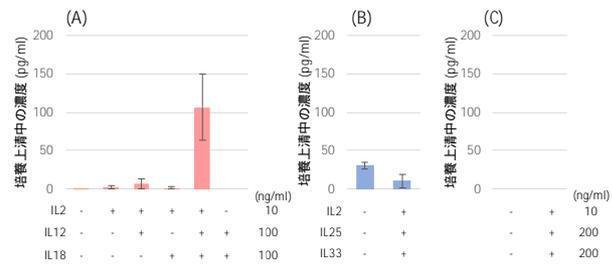


図5. ILC1、2のインターロイキン応答性解析  
 ILC1: IL2/IL12/IL18刺激のIFN $\gamma$ 濃度(A)  
 ILC2: IL2/IL25/IL33刺激後のIL5(B)、IL13(C)濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Shunichi、Fuchimoto Daiichiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Fetal and early postnatal development of the porcine tonsils of the soft palate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 233 ~ 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.18-0142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----