

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16882

研究課題名(和文) 網羅的解析による ILC2 活性化に伴う鼻粘膜炎症増悪因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors that exacerbate nasal mucosal inflammation associated with ILC2 activation by comprehensive analysis

研究代表者

森川 太洋 (Morikawa, Taiyo)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：70815985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウスモデルを用いて、2型自然リンパ球(ILC2s)が鼻粘膜炎症を増悪する因子を同定した。これらの因子は、ILC2が誘導されたマウス鼻粘膜で有意な上昇を認め、ILC2活性化に必要なとされるIL-33/ST2Rシグナル経路を阻害することで有意に抑制された。またこれらの因子は、鼻茸形成に関与すると報告されているM2マクロファージに関連する因子であった。本研究成果は、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸形成メカニズムの解明に重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、好酸球性副鼻腔炎における鼻茸形成、難治性を引き起こすメカニズムを解明することである。最近同定されたアレルギー炎症と関連する新しい細胞集団である2型自然リンパ球(ILC2s)に着目した。本研究では、ILC2による鼻粘膜炎症を関連する因子を同定した。これらの因子が好酸球性副鼻腔炎の病態形成にどのように関与するかを解明することで、指定難病疾患である好酸球性副鼻腔炎の新規治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a mouse model to identify factors that exacerbate nasal mucosal inflammation by group 2 innate lymphoid cells (ILC2s). These factors were significantly elevated in ILC2-induced nasal mucosa of mice, and were significantly suppressed by inhibiting the IL-33/ST2R signaling pathway required for ILC2 activation. These factors were related to M2 macrophages, which were reported to be involved in nasal polyps formation. The results of this study are important for elucidating the mechanism of nasal polyps formation in eosinophilic chronic rhinosinusitis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ILC2s 鼻粘膜肥厚 M2 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ILC2 は、獲得免疫である Th2 cell とは独立してアレルギー反応を起こす自然リンパ球として、2012 年に同定された新しい細胞である。ILC2 は、上皮細胞から放出された IL-25、IL-33、TSLP の刺激により多量の Th2 サイトカインを分泌することでアレルギー反応を呈することが知られており、アトピー性皮膚炎、気管支喘息においては重症例での ILC2 の存在が重要視されている。アレルギー性鼻炎においては、花粉症患者や猫アレルギー患者の末梢血で ILC2 の発現が確認され、好酸球性副鼻腔炎では、鼻茸に ILC2 の発現が認められ、鼻アレルギー疾患においても ILC2 が重要な役割を担っていると考えられる。

好酸球性副鼻腔炎は、鼻茸の多発性、再発性を特徴とする難治性疾患である。好酸球性副鼻腔炎は Th2 優位の疾患であり、Th2 サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 が鼻茸への好酸球浸潤や鼻茸形成に重要であると推測され、また鼻茸の ILC2 の局在および ILC2 から分泌される Th2 サイトカインが難治性、再発性を高めている可能性があり非常に興味深い。しかしアレルギー性鼻炎および好酸球性副鼻腔炎で ILC2 発現がみられることは報告されているが、ILC2 の役割、病態形成のメカニズムについて言及した研究は今まで報告されていない。

これまで申請者は、Th2 cell を誘導する抗原として ovalbumin(OVA)、ILC2 を誘導するシステムプロテアーゼである papain をマウスに点鼻することで、Th2 cell と ILC2 がそれぞれ独立して鼻に誘導されるモデルを確立し、鼻の切片を作成し、鼻粘膜肥厚および好酸球浸潤における ILC2 の役割について解析を行った(Morikawa et al : Int.Immunol, 2017)。鼻粘膜に Th2 cell と ILC2 を誘導し解析した研究は世界的にも報告はなく、新しい試みであった。結果以下のことが判明した。

(1) Th2 cell、ILC2 の鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤への影響

正常 Balb/c マウスを用いた OVA 点鼻群(Th2 cell 誘導)、および papain 点鼻群(ILC2 誘導)において、鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤が PBS 点鼻群(コントロール)より有意に増悪したことから、Th2 cell と ILC2 がどちらも単独で鼻粘膜炎症を引き起こすことを確認した。

(2) Rag2 KO マウス(T/B 細胞欠損マウス)、Rora BMT(bone marrow transplanted)マウス(ILC2 欠損マウス)、IL-33 KO マウスを用いた実験

papain 点鼻により鼻粘膜から放出された IL-33 が鼻粘膜の ILC2 を活性化させ、鼻粘膜肥厚および好酸球浸潤を増悪させることを確認した。

(3) ILC2 が分泌する Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)の鼻粘膜肥厚への影響

IL-5 欠損マウス(抗 IL-5 抗体 腹腔内投与)および IL-13 KO マウスを用いた実験では、ILC2 が分泌する IL-5 ではなく、IL-13 が鼻粘膜肥厚に重要であることを確認した。

(4) 鼻粘膜の ILC2 活性化によるステロイド抵抗性獲得

ステロイド治療を行ったマウス(デキサメサゾン腹腔内投与)での検討では、鼻粘膜の ILC2 が活性化することで、鼻粘膜肥厚がステロイド抵抗性を獲得することを確認した。

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究により、ILC2(特に ILC2 が分泌する IL-13)は鼻粘膜肥厚および好酸球浸潤、ステロイド抵抗性に重要な役割を持つことが証明された(Morikawa et al : Int.Immunol, 2017)。本研究では、Microarray にて、ILC2 が鼻粘膜肥厚を増悪させる因子 Xi を同定する。さらに、ILC2 が分泌する Th2 サイトカイン(特に IL-13)が、ターゲットと考えられる細胞(鼻粘膜上皮細胞、鼻線維芽細胞、マクロファージ)への影響を検討し、鼻粘膜肥厚増悪、ステロイド抵抗性を獲得させる因子 Xi の発現を検討する。これらの実験は好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸にも応用可能であり、本研究により、好酸球性副鼻腔炎における鼻粘膜肥厚、鼻茸形成、難治性を引

き起こすメカニズムを解明し、治療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 網羅的解析による ILC2 が鼻粘膜炎症を増強する因子 Xi の同定

これまで申請者は、PBS(コントロール)、OVA(Th2 cell 誘導)、papain(ILC2 誘導)、OVA+papain(Th2 cell+ILC2 誘導)を2週間(計6回)点鼻し、最終点鼻から24時間後にマウスの鼻を採取、ホルマリン固定、脱灰後、鼻の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色した後、顕微鏡で鼻粘膜肥厚の計測および好酸球数の測定にて解析を行ってきた。これまでの実験で ILC2 が鼻粘膜肥厚、好酸球浸潤を増悪させることを明らかにしている。本実験では、2週間点鼻モデルを用いて各群の鼻を Microarray にて網羅的に比較解析し、papain 点鼻群(ILC2 誘導)で有意に上昇する因子、即ち ILC2 が鼻粘膜炎症を増強させる因子 Xi の同定を行う。

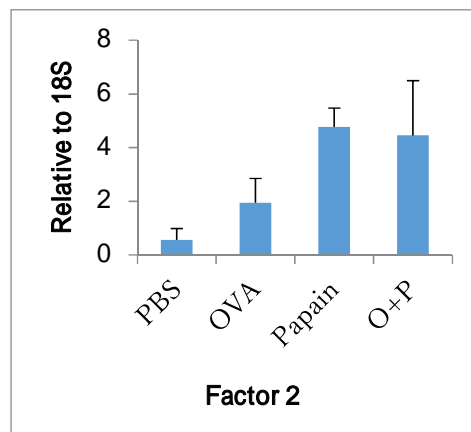
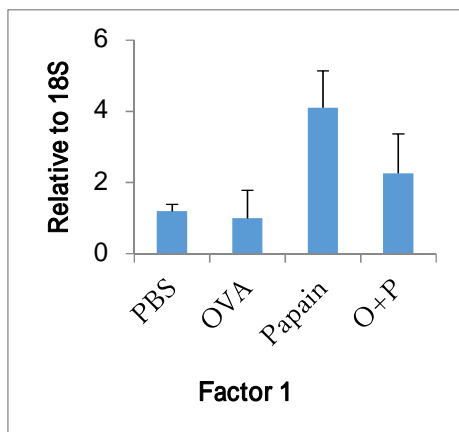
(2) ILC2 による鼻粘膜肥厚に alternative activated macrophage (M2 macrophage)が関与するか？

M2 macrophage を特徴づける Arginase(Arg)1、chitinase-like protein Ym1、RELM の mRNA 発現を Real-time PCR を用いて、比較検討する。papain 点鼻群で有意に上昇が見られれば、ILC2 の活性に伴い M2 macrophage が活性化していることが確認される。

4. 研究成果

(1) 網羅的解析による ILC2 が鼻粘膜炎症を増強する因子 Xi の同定

PBS(コントロール)、OVA(Th2 cell 誘導)、papain(ILC2 誘導)、OVA+papain(Th2 cell+ILC2 誘導)を2週間(計6回)点鼻し、最終点鼻から24時間後にマウスの鼻を採取した。採取した鼻から total RNA を抽出し、Microarray による網羅的解析を行った。その中で、ILC2 誘導により鼻粘膜で有意に上昇する因子をいくつか選別し、Real-time PCR を用いて mRNA 発現の測定を行った。そして mRNA 発現の測定を行った中で、papain(ILC2 誘導)で有意に発現が上昇している因子 (Factor 1, Factor 2) を同定した。

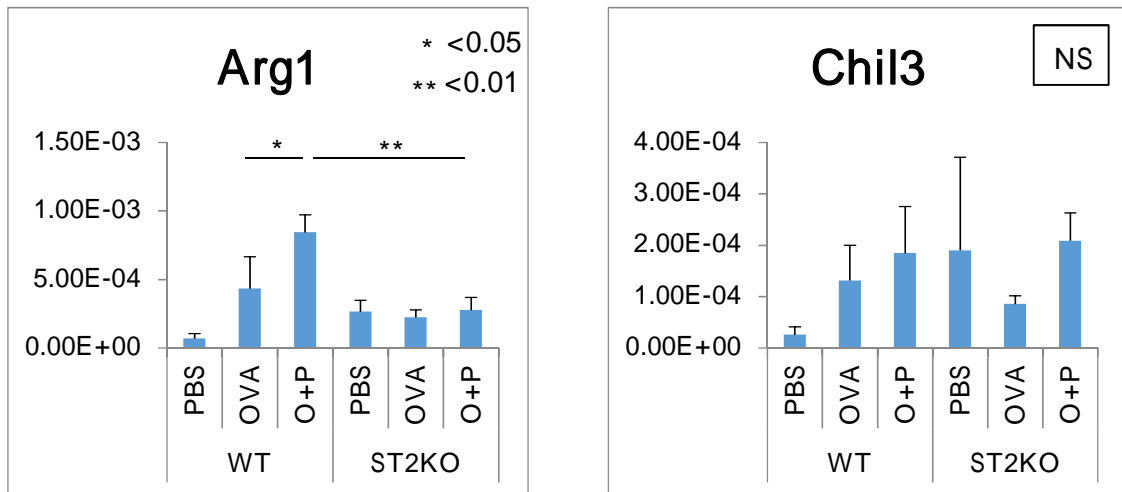


(2) ILC2 による鼻粘膜肥厚に M2 macrophage が関与するか？

M2 macrophage を特徴づける Arginase(Arg)1、chitinase-like 3(Chil3)の mRNA 発現を Real-time PCR を用いて、比較検討した。

その結果、Arginase(Arg)1 の mRNA 発現が、papain(ILC2 誘導)で有意に上昇していた。さらに ILC2 活性化に重要な IL-33 刺激の受容体である ST2 受容体を欠損させた ST2 KO マウスを用いて検討した。ST2 KO マウスでは、papain(ILC2 誘導)で上昇した Arginase(Arg)1 の mRNA 発現が有

意に抑制された。一方、chitinase-like 3(Chil3)の mRNA 発現は有意な差を認めなかった。



つまり、papain(ILC2 誘導)により、Arginase(Arg)1 が活性化されるが、chitinase-like 3(Chil3)の発現に変化はなく、この結果から M2 macrophage と ILC2 の関連を述べることは難しい。ILC2 活性化に Arginase(Arg)1 が関与している報告はいくつかある。鼻における Arginase(Arg)1 の役割を検討することは重要かもしれない。

また、papain(ILC2 誘導)による鼻粘膜炎症の増悪因子として同定した Factor 1, Factor 2 も M2 macrophage に関連する因子であり、Arginase(Arg)1 と合わせて、これらの因子が鼻粘膜炎症および好酸球性副鼻腔炎の鼻茸形成にどのように関与するかを解明することで、指定難病疾患である好酸球性副鼻腔炎の新規治療ターゲットとなる可能性があるかもしれない。

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
--	---------------------------	-----------------------	----