

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16702

研究課題名（和文）セロトニンによる新たなアレルギー抑制機構の解明

研究課題名（英文）The elucidation of novel mechanisms for regulation of allergic inflammation by serotonin

研究代表者

木庭 乾（Kiniwa, Tsuyoshi）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90793795

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）：2型自然リンパ球（ILC2）は2型ヘルパーT細胞（Th2細胞）とともにアレルギーの発症に重要なリンパ球である。本研究ではセロトニンによるILC2抑制機構について、気管支喘息モデルマウスを用いて解析を行った。セロトニンを投与した気管支喘息モデルマウスではILC2の機能が抑制され、アレルギー性炎症が顕著に抑制された。RNAseq解析の結果、セロトニンによる抑制は活性化ILC2に選択的であり、ナイーブILC2やTh2細胞は抑制しないことが明らかとなった。さらに、喘息肺セロトニン産生源は気管支上皮層のマスト細胞であり、ILC2の過剰な活性化を防ぐ役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、非常に多機能な生理活性モノアミンであるセロトニンが、アレルギー性疾患の新たな治療標的として注目を集めているILC2に対して選択的な抑制作用を持つことが明らかとなった。セロトニン拮抗薬はうつ病、偏頭痛など様々な疾患を対象に薬として使われており、本研究の成果をもとに、今後アレルギー治療に応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Group 2 innate lymphoid cells (ILC2) are important lymphocytes in the pathogenesis of allergy same as type 2 helper T cells (Th2 cells). In this study, we analyzed the mechanism of serotonin-induced suppression of ILC2 using a mouse model of bronchial asthma. Serotonin treatment suppressed ILC2 function in the asthmatic lungs and markedly reduced allergic inflammation. RNAseq analysis revealed that serotonin selectively suppressed activated ILC2, but not naive ILC2 or Th2 cells. Furthermore, we demonstrated that the serotonin source of asthmatic lungs was mast cells in the bronchial epithelial layer, suggesting that they play a role in preventing excessive activation of ILC2.

研究分野：自然免疫学

キーワード：アレルギー 気管支喘息 ILC2 セロトニン マスト細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

2型サイトカインの過剰産生に起因するアレルギー疾患は、日本人の2分の1が発症する国民病として深刻な社会問題となっている。当研究室で発見された2型自然リンパ球(ILC2)は、抗原受容体を持たない新規のリンパ球であり、アレルゲンによる組織損傷に伴い産生されるIL-25やIL-33に反応し、迅速かつ多量に2型サイトカインを産生することでアレルギー性炎症を誘導する。これまでアレルギーの原因細胞と考えられてきた2型ヘルパーT細胞(Th2細胞)と異なり抗原非特異的にアレルギー性炎症を誘導するILC2は、喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなど多様なアレルギーにおける重要性が明らかとなっており、新規治療標的として注目を集めている。

ILC2の制御機構の解明が急がれる中、我々は20種類以上の多様な免疫細胞を比較したRNAseqデータを解析し、ILC2が神経伝達物質であるセロトニンの受容体Htr1Bを特徴的に高発現することを見出した。セロトニンはトリプトファンから代謝されるモノアミンであり、神経伝達物質やホルモンとして働く多機能生理活性物質である。代表的なアレルギー性疾患である喘息患者では、重症化に伴い血中セロトニン濃度が上昇することが知られているが、セロトニンは気管支収縮を促す一方で抗炎症作用があるPGE2の産生を誘導するなど、喘息の増悪/改善両方向の生理作用が報告されており、その作用は標的細胞や産生されるタイミングによって多岐にわたると考えられている。セロトニン受容体には15種類ものサブセットが存在するが、RNAseq結果からILC2はHtr1bとHtr2aを選択的に発現することが明らかになった。特にHtr1bの遺伝子発現はILC2とTh2細胞の分化に必須なGATA3の制御下にあることが報告されており、我々のRNAseq結果からも免疫細胞の中でILC2とTh2細胞に特徴的な高発現が認められたが、セロトニンによるILC2やTh2細胞の制御機構はこれまでに報告がなく未解明である。

2. 研究の目的

予備的解析から、我々はin vivo およびin vitroのセロトニン刺激がILC2の増殖やサイトカイン産生を抑制することを見出した。近年、ILC2がCGRPやNMUなど特定の神経伝達物質受容体を高発現することが報告されているが、そのほとんどが活性化シグナルを伝える受容体であり、 β_2 アドレナリン受容体を介した刺激を除き抑制シグナルを伝える受容体の報告は少ない。抗原の排除とともに自然に沈静化するTh2細胞とは異なり、抗原非依存的に活性化するILC2の制御において積極的に抑制する機構の解明は重要な課題である。本研究では、アレルギー性炎症におけるセロトニンの新たな生理的役割をILC2の抑制という観点から明らかにし、その抑制機構の破綻とアレルギー疾患の因果関係を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 喘息肺で産生されるセロトニンの定量と生理的意義の解析

重症喘息患者ではセロトニン産生が亢進することが知られている。そこで、真菌性喘息モデルであるアルテルナリア投与モデルを用いた経時的な解析により、肺胞洗浄液と血漿中のセロトニン量を定量し、喘息病態との関連性を解析した。また、セロトニンが肺局所で産生される可能性を確認するために、肺におけるセロトニン合成酵素Tph1の遺伝子発現変動をqPCRで確認した。さらに、セロトニン産生が喘息病態に与える影響を確認するために、Tph1阻害剤を気管内投与し、炎症状態を解析した。

(2) ILC2、Th2細胞に対するセロトニンの作用メカニズムの解析

喘息モデルマウスへのセロトニン投与がILC2の活性化やアレルギー性炎症を抑制することが明らかになっている。セロトニンの作用機序やILC2に対する特異性を明らかにするため、アルテルナリアとともにセロトニンを投与し、細胞内染色によってILC2とTh2細胞のサイトカイン産生や増殖活性を比較した。また、ナイーブ群とセロトニン単独投与群からILC2とCD4T細胞を、アルテルナリア単独投与群とアルテルナリアとセロトニンの同時投与群からILC2とTh2細胞を単離してRNAseq解析を行い、各細胞に対するセロトニンの作用を精査した。

(3) 喘息肺におけるセロトニン産生細胞の同定

喘息肺におけるセロトニンの産生細胞を明らかにするため、免疫組織染色によってセロトニンを染色し、アルテルナリアの投与によって誘導される肺のセロトニン陽性細胞の局在を確認した。セロトニン陽性細胞の細胞種を特定するために、肺構成細胞のうちセロトニン産生能が報告されているILC2、マスト細胞、肺神経内分泌細胞、神経について、連続切片を用いた代表的なマーカー因子の免疫組織染色を行うとともに、アルテルナリア投与肺から各細胞を単離し、in vitroでセロトニン産生能を比較した。さらに、有力な候補細胞と考えられたマスト細胞については、マスト細胞欠損マウス(Kit^{W/W^v}マウス)にアルテルナリアを投与し、セロトニン陽性細胞の誘導、BALF中のセロトニン量、ILC2の活性化および炎症状態の変化を検証した。最後に、セロトニン陽性細胞の誘導条件を明らかにするために、各種KOマウスを用いたアルテルナリア投与モデル、アルテルナリア投与モデルとは別の真菌性喘息モデルであるアスペルギルス投与モデル、ダニ誘導性喘息モデルであるパパイン投与モデル、ILC2を直接活性化させるIL-25およびIL-33投与モデル、Th2細胞を強力に活性化するOVA投与モデルについて、セロトニン陽性細胞の誘導の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 喘息肺ではセロトニン産生が亢進され、過剰な炎症の抑制に寄与する

アルテルナリア投与後のマウスでは、経時的に BALF 中のセロトニン濃度が増加し、炎症が収束しても高いレベルのまま維持されることが明らかになった。この時、血漿中のセロトニン量は増加しておらず、さらにアルテルナリアの投与によって肺の Tph1 発現が亢進していたことから、肺で局所的なセロトニン産生が生じていることが示唆された。そこで、Tph1 阻害剤を気管内投与したところ、ILC2 の活性化マーカーの発現上昇、好酸球浸潤や M2 マクロファージの増加といった炎症状態の増悪が確認された(図 1)。比較として Tph1 阻害剤を経口投与し、体内のセロトニンの 90% を供給すると言われていた腸管エンテロクロマフィン細胞のセロトニン産生を阻害しても炎症状態に変化は生じなかったことから、肺局所でのセロトニン産生が ILC2 の過剰な活性化を抑制し、不適切な炎症を防ぐ役割を担うことが明らかとなった。

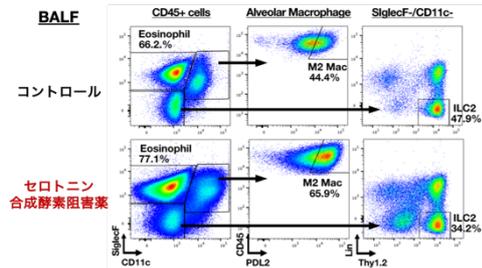


図1. セロトニン合成酵素阻害薬の気管内投与

(2) セロトニンは活性化 ILC2 を選択的に抑制する

細胞内染色の結果から、アルテルナリアにセロトニンを同時投与することで、アルテルナリア単独投与群に比べて IL-13 陽性および増殖マーカーである Ki67 陽性の ILC2 の割合が有意に減少した一方で、Th2 細胞にはこうした変化が起こらないことが明らかとなった。RNAseq 解析においても、セロトニンの同時投与によって、ILC2 では IL-13、Ki67 に加えて IL-4, 6, 9 などのアレルギー関連サイトカインの発現も顕著に減少したが、Th2 細胞ではほとんど抑制されていなかった(図 2)。また、ナイーブ群とセロトニン単独投与群の比較においては、ILC2 と CD4T 細胞のどちらも大きな変化が見られなかった。以上の結果から、セロトニンは活性化された ILC2 に選択的に作用し、その機能を抑制することが明らかになった。

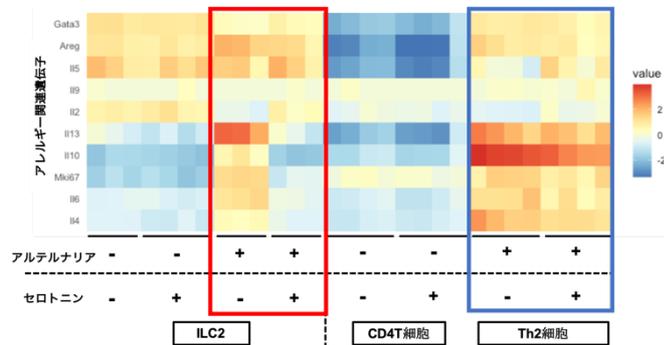


図2. ILC2、CD4T細胞、Th2細胞のRNAseq解析結果

(3) 真菌誘導性喘息ではセロトニン陽性マスト細胞が誘導され活性化 ILC2 の抑制に寄与する

免疫組織染色の結果、アルテルナリアの投与によって気管支上皮層にセロトニン強陽性の細胞が誘導されることが明らかになった。連続切片を用いた解析から、このセロトニン陽性細胞は肺神経内分泌細胞マーカーである CGRP や神経細胞マーカーである β チューブリン III については陰性だが、一部がマスト細胞マーカーである Mcpt1 陽性であることが明らかになった。さらに、アルテルナリア投与肺から ILC2、マスト細胞、肺神経内分泌細胞を単離し、PMA と Ionomycin で 3 時間刺激した際のセロトニン産生能を比較したところ、マスト細胞で顕著に高い産生が認められ、これは生体内の代表的なセロトニン産生細胞である腹腔マスト細胞や腸管エンテロクロマフィン細胞と匹敵するレベルであった。さらに、マスト細胞を欠損する Kit^{W/W^v} マウスではアルテルナリアを投与してもセロトニン陽性細胞が全く誘導されず、BALF 中のセロトニン濃度が減少し、ILC2 や好酸球、M2 マクロファージの細胞数が顕著に増加したことから、アルテルナリア投与により誘導されるセロトニン陽性細胞はマスト細胞であり、主要な喘息肺のセロトニン産生源として ILC2 の抑制に寄与することが明らかになった。興味深いことに、気管支上皮層のセロトニン陽性細胞は、ILC2 の活性化に必須なサイトカインである IL-33 KO マウスでは誘導されたが、獲得免疫系を欠損した Rag2 KO マウスでは誘導されなかった。さらに、アルテルナリアと同じく真菌誘導性喘息モデルであるアスペルギルス投与モデルでは誘導されたが、ダニ誘導性喘息モデル、サイトカイン投与モデル、OVA 投与モデルなど他の喘息モデルではほとんど誘導されなかった。以上の結果から、セロトニン陽性のマスト細胞は獲得免疫系を介して誘導される真菌誘導性喘息に特徴的な細胞であり、獲得免疫系から ILC2 に対するネガティブフィードバック機構として機能することが示唆された。

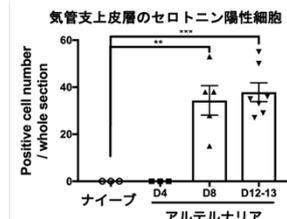
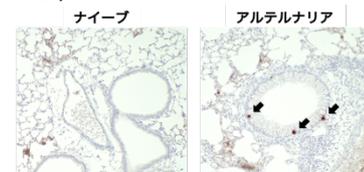


図3. 気管支上皮層のセロトニン陽性細胞

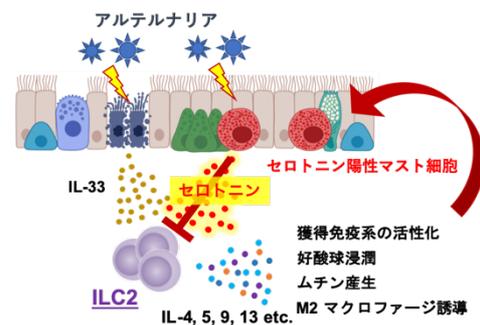


図4. 本研究のまとめ

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 Kiniwa Tsuyoshi, Moro Kazuyo	4. 巻 33
2. 論文標題 Localization and site-specific cell-cell interactions of group 2 innate lymphoid cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 251 ~ 259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab001	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Kiniwa, Kazuyo Moro
2. 発表標題 The novel suppression mechanism for group 2 innate lymphoid cells by serotonin.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------