

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17348

研究課題名(和文) Keap1-Nrf2系と自然リンパ球による小児IBD制御機構の解明と治療への展開

研究課題名(英文) Elucidation of pediatric IBD control mechanism by Keap1-Nrf2 system and innate lymphoid cells and development to treatment

研究代表者

長島 隆一 (Nagashima, Ryuichi)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・研究技師

研究者番号：20783707

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)：炎症性腸疾患(IBD)はその発症に自然免疫系の関与が深いことから、3型自然リンパ球(ILC3)における酸化ストレス応答系Keap1-Nrf2経路の関与を解析した。DSS腸炎モデルにおいて、粘膜固有層由来のNKp46を発現するILC3はNrf2遺伝子欠損マウスで優位に増加し、IL-22産生能も高かった。Nrf2活性化剤を投与すると、Nrf2欠損マウスで観察された一連の減少が逆転し、腸炎改善に寄与することが示唆された。本研究は、ILC3が腸炎制御に重要な役割を担い、それらが酸化ストレス応答系Keap1-Nrf2経路により制御される可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、小児期に克服すべき炎症性腸疾患(IBD)の病態解明を目指し、比較的安全性の高いNrf2活性化剤を使用することで、腸炎に関与する新規リンパ球であるILC3の側面からIBDを捉えることに着目した。また、ILC3とKeap1-Nrf2経路の関連性は明らかになっておらず、本研究はその新しい制御機構の解析に迫った点で学術的意義は高い。小児期にIBDを克服することは、その後の社会生活への影響も抑えることができ社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since the innate immune system is deeply involved in the onset of inflammatory bowel disease (IBD), I analyzed the involvement of the Keap1-Nrf2 pathway in the oxidative stress response system in type 3 innate lymphoid cells (ILC3). In the DSS colitis model, NKp46-expressing ILC3 derived from the lamina propria was significantly increased in Nrf2-deficient mice, and IL-22 productive capacity was also high compared with WT mice. It was suggested that administration of Nrf2 activator reversed the series of reductions observed in Nrf2-deficient mice and contributed to the improvement of colitis. This study suggests that ILC3 plays an important role in colitis control and that they may be regulated by the Keap1-Nrf2 pathway of the oxidative stress response system.

研究分野：慢性炎症

キーワード：ILC3 IBD Nrf2

1. 研究開始当初の背景

幼児~小児期のIBDは増加の一途を辿っており、小児科領域における大きな課題である。成人型IBD患者数はCDが約4万人、UCは約20万人を超えており、今後も増加が見込まれている。IBD克服は小児科領域での大きな課題であり、小児期に根治すべき疾患である。IBD治療には、抗TNF- α 抗体や抗IL-12/IL-23抗体が用いられているが、部分的な奏効に留まることから、DC・マクロファージが病態に関与するものの、これまで未解明の自然免疫細胞がIBD病態を制御しているのではないかと疑問に至った。そこで申請者は、新たな標的細胞として近年急速に解析が進んでいる自然リンパ球 (innate lymphoid cells; ILC) に着目した。3型ILC

(ILC3) の一種であるLTI細胞 (Lymphoid tissue inducer cells) は胎児期リンパ組織形成に重要である。小児期以降では、粘膜固有層に多数のILC3が存在しており、IBD病態にも関連することが示唆されている。定常状態のILC3は、DC・マクロファージと相互作用し腸内環境を維持している。一方、酸化ストレスはIBDリスクファクターの1つであり、腸内環境変化を介してILC3を異常に活性化させ、炎症を惹起している可能性が高い。これまで、酸化ストレスとILC3との関係性はほぼ未解明のまま残されており、酸化ストレス環境下でのILC3動態は全く知られていない。

2. 研究の目的

IBDにおけるILC3の役割は未だ不明の点が多い。腸内自然免疫系と酸化ストレスの関係も解明が不十分である。本研究の目的は、①酸化ストレスを制御する転写因子Nrf2とILC3の関係を明らかにしIBD病態制御の新たな機構を解明すること、②Nrf2活性化による小児IBDの治療基盤を樹立することである。

3. 研究の方法

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を飲水投与し、野生型およびNrf2-KOマウスにIBDを誘導し、以下の実験を行った。

計画1

IBD発症に対するNrf2の貢献を検討するため、WTとNrf2-KOマウスに腸炎を誘導し、小腸および大腸の腸管粘膜固有層からリンパ球分画を分離する。得られた分画はFACSにて、ILC3 (Lineage-, CD127+, ROR γ t+) を中心に、相互作用をもたらすDC (CD11c+, MHC-II+) やマクロファージ (CD11b+, F4/80+) 等の自然免疫細胞を解析する。

計画2

Nrf2はILC3機能を制御している可能性がある。WTおよびNrf2-KOマウスの小腸および大腸からセルソーターによりILC3を分取し、①サイトカイン産生能 (IL-22、IFN- γ 、GM-CSF、IL-17)、②細胞増殖能を解析する。

計画3

腸内環境維持を担うDCやマクロファージなどの自然免疫細胞、T細胞およびB細胞などの獲得免疫細胞との相互作用によるILC3応答を検討する。具体的には、WTおよびNrf2-KOマウスから各細胞をセルソーターにより分取したのち、ILC3と組み合わせてin vitroで共培養し、①細

胞増殖能、②サイトカイン・抗体産生能、③細胞分化能への影響を検討する。また、その相互作用が酸化ストレス応答によってどのように変化するのか、Nrf2活性化剤（CDDO-Im）を培養中に添加することで、Nrf2活性化による影響を解析する。

計画4

Nrf2-KOマウスで腸炎が悪化することから、Nrf2活性化は腸炎を改善する可能性が高い。そこで、DSS誘導腸炎所見がNrf2活性化剤（CDDO-Im）投与で改善がみられるか解析し、Nrf2活性化がIBD治療に有効であるかに挑む。さらに、免疫不全（Rag1/Rag2/IL2rg-KO）マウスにDSS腸炎誘導マウス由来ILC3を移入し、レシピエントに腸炎が誘導されるか検討する。また、ILC3移入前にレシピエントのNrf2を活性化しておくことで、ドナーILC3による腸炎発症を制御し、Nrf2活性化がIBD発症予防にも寄与するか解析する。

4. 研究成果

計画1

DSS 腸炎モデルにおいて、Nrf2-KO マウス由来 LPL において NKp46+ ILC3 が著明に増加していた。一方で、胎児期のリンパ組織形成に重要な LTi 細胞や Th17 には影響は認めなかった。また、DC の中でも CX3CR1+ DC は Nrf2-KO マウスで優位に増加していた。なお、この DC の増減に活性酸素種(ROS)は無関係であった。

計画2

上記のモデルにおいて、① NKp46+ ILC3 のサイトカイン IL-22 産生能は Nrf2-KO マウスで優位に高く、IFN- γ は低いことが明らかとなった。②細胞増殖能は Nrf2 の有無で影響は認めなかった。

計画3

WT および Nrf2-KO マウスから ILC3 と DC をソーティングで分取し、ex vivo で共培養した。① 細胞増殖能は変わらなかった、② サイトカイン産生能は、Nrf2-KO マウス由来 DC と共培養した NKp46+ ILC3 で IL-22 産生が増加した。この増加は、Nrf2-KO マウス由来 DC と野生型由来の NKp46+ ILC3 との共培養でも同程度に維持された。③Nrf2 有無で細胞分化能には影響しなかった。Nrf2 活性化剤(CDDO-Im)を添加し活性化したが影響はなかった。

計画4

DSS 腸炎モデルにおいて、Nrf2 活性化剤(CDDO-Im)を投与すると、体重減少が抑えられた。また、Nrf2-KO マウスで認められた NKp46+ ILC3 の増加、DC の増加は、Nrf2 活性化によって逆転した。

免疫不全（Rag1/Rag2/IL2rg-KO）マウスに DSS 腸炎誘導マウス由来 ILC3 を移入する予定であったが、得られる細胞数が少なく実施が困難であった。その代替として、Rag2 欠損マウス、Rag2 JAK3 二重欠損マウス、Rag2 Nrf2 二重欠損マウスでそれぞれ DSS 腸炎を誘導し、ILC3 および DC を解析し、腸炎における ILC の影響を検討した。Rag2 欠損マウスに Nrf2 活性化剤を投与すると、野生型マウスと同様に、NLp46+ ILC3 および DC も減少したが、DC は CD103+ DC に限定された。Rag2 JAK3 二重欠損マウス(T, B, NK, ILC 欠損)では、DC 細胞数に変化は認めなかった。このことから、粘膜固有層の CD103+ DC 数は ILC に依存的であることが示唆された。

さらに、Rag2 Nrf2 二重欠損マウスでは、Nrf2-KO マウスと同様に、NKp46+ ILC3 および DC が増加していたことから、腸炎制御には ILC(特に腸管に豊富な ILC3)が重要な役割を果たすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Ryuichi Nagashima, Nobuyuki Tanaka
2. 発表標題 Keap1-Nrf2 system regulates ILC3 function and plasticity in intestinal inflammation.
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会
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
---------	---------