

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790378

研究課題名（和文）マウス腸間膜に新たに見出した T 前駆細胞を含むリンパ集積の機能解析

研究課題名（英文） Identification of T-cell progenitor in mouse mesentery

研究代表者

茂呂 和世（MORO KAZUYO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90468489

研究成果の概要（和文）：我々は、腹腔の脂肪組織に存在する新規リンパ球集積構造を発見し、FALC と名付けた。FALC には Lin<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 細胞が存在し、IL-7R および IL-33 受容体を発現することが明らかになった。これらの細胞は IL-5、IL-6 や IL-13 といった Th2 サイトカインを多量に産生することで、B 細胞の抗体産生と B1 細胞の自己複製を調節する。また、蠕虫感染時に IL-33 に応答して多量の IL-13 を産生し杯細胞過形成を誘導する。我々は Th2 型の自然免疫リンパ系細胞である FALC Lin<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 細胞をナチュラルヘルパー細胞と名付けた。

研究成果の概要（英文）：We found novel lymphoid tissue in mesentery, and named 'FALC' (fat-associated lymphoid cluster). We also identified unknown lymphoid cells in FALC which express c-Kit, Sca-1, IL-7R and IL-33R. These cells proliferate in response to IL-2 and produce large amounts of Th2 cytokines such as IL-5, IL-6 and IL-13. IL-5 and IL-6 regulate B-cell antibody production and self-renewal of B1 cells. After helminth infection and in response to IL-33, FALC Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> cells produce large amounts of IL-13, which leads to goblet cell hyperplasia—a critical step for helminth expulsion. In mice devoid of FALC Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> cells, such goblet cell hyperplasia was not induced. Thus, FALC Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> cells are Th2-type innate lymphocytes, and we propose that these cells be called 'natural helper cells'.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫

### 1. 研究開始当初の背景

マウス腸間膜において新たなる gut-associated lymphoid tissue (GALT) の 1つと考えられるリンパ球の集積を発見し、この集積には Lineage 陰性で Sca-1 と c-kit を発現する細胞が多数存在することが明らかになった。Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞は形態学的にリンパ球様の細胞で、その表面マーカーから T 前駆細胞である可能性が示された。

### 2. 研究の目的

平成 20 年度はマウス腸間膜に存在する Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞が T 細胞への分化能をもつ細胞であるか否かを明らかにすることを目標に実験を行った。

平成 21 年度は、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞が T 前駆細胞ではなく、これまで報告にない新しいリンパ球であることが明らかになったことから、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞の特性を調べるとともに、生体内でどのような役割を持つ

細胞であるかを明らかにすることを目標に実験を行った。

### 3. 研究の方法

平成 20 年度は、腸間膜 Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞が T 細胞への分化能を持つか否かを検討するために、コンジェニックマウスを用いた移植実験を行った。また、in vivo だけでなく in vitro での分化能を検討するために、T 細胞への分化を誘導する TSt/4-DLL1 細胞との共培養実験を行った。

平成 21 年度は、新しいリンパ球であることが明らかになった Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞のサイトカイン産生能やサイトカイン反応性を明らかにするために、腸間膜から分離した Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞に様々なサイトカインや Toll 様受容体に対するリガンドを加え培養した。また、生体内での Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞の役割を明らかにするために、寄生虫感染実験を行った。

#### 4 . 研究成果

マウス腸間膜で見出したリンパ球集積が、リンパ節とは異なる新しいリンパ組織であることを明らかにし、Fat-associated lymphoid cluster (FALC)と名付けた。FALCに存在するLin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞は、移植実験の結果、T細胞へと分化することが示唆されたが、結果が安定せず、分化能が弱いことから信憑性が問われていた。そこで、in vitroでT細胞への分化を誘導するfeeder細胞として知られているTSt/4-DLL1細胞との共培養を行った結果、T細胞への分化能は全く見られず、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞がT前駆細胞であるという説は完全に否定された。

Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞はT前駆細胞で発現が見られるIL-7R $\alpha$ やThy-1、CD25、CD44といった表面抗原はT前駆細胞だけでなく、リンパ節形成に必須とされるlymphoid tissue inducer (LTi)細胞にも共通するものであったことから、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞がLTi細胞である可能性について検討したところ、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞は、LTi細胞の分化に必須とされるROR $\gamma$ を発現せず、LTi細胞を欠損するROR $\gamma$ 欠損マウスでも存在が確認されたため、LTi細胞とも異なる細胞であるとの結論が得られた。

マイクロアレイによる遺伝子発現の解析から、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞はIL-5、IL-6、IL-13などのTh2サイトカイン産生を行う細胞であることが示唆された。そこで、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞を分離培養し、上清中のサイトカインを測定したところ、これらのサイトカイン産生がタンパクレベルで確認された。また、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞はIL-7により生存が維持され、IL-2によって増殖する細胞であることも明らかになった。

Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞によって恒常的に産生されるIL-5は腹腔に存在するB1細胞の維持・増殖を担うこと、また、IL-6と共に働くことでB細胞のIgA産生を促進することを明らかになった。また、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞によって産生されるTh2サイトカインは、IL-25やIL-33刺激により激しく増加することも明らかになった。

5000個のLin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞をIL-33存在下で5日間培養した場合、産生されるIL-13量は $\mu$ g単位に達した。そこで、IL-13によって誘導される杯細胞過形成が排虫に重要であることが知られている*Nippostrongylus brasiliensis*をT細胞・B細胞欠損Rag2<sup>-/-</sup>マウス、およびT細胞・B細胞・NK細胞・NH細胞欠損 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>マウスに感染させ、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞由来IL-13の重要性について検討した。その結果、Rag2<sup>-/-</sup>マウスでは野生型と同等のIL-13産生が見られたが、 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>マウスではIL-13産生および排虫は全く見られなかった。これに対し、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞を移入した $\gamma$ c<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>マウスでは速やかなIL-13産生と杯細胞過形成の回復が確認され、Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞が寄生虫感染においてIL-13を産生することで杯細胞過形成を誘導する細胞であることを明らかにした。

本研究から、マウス腸間膜で新たに見出したLin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>細胞はこれまでに報告にない表現型、機能を持つ新しいリンパ球であることが明らかになったことから、この細胞をナチュラルヘルパー (Natural Helper: NH)細胞と名付けた。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S., Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):540-4. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

茂呂和世, Th2 サイトカイン産生を介したナチュラルヘルパー細胞の機能解析, 東京免疫フォーラム, 2010年2月24日, 東京

茂呂和世, Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated natural helper cell ~ Role of natural helper cells in helminth infection ~, 日本免疫学会総会, 2009年12月2日, 大阪

茂呂和世, Lin-c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> cells of mesentery lymphoid cluster support IgA production of B cells and B1 cells survival by IL-5 production., International Congress of Mucosal Immunology, 2009年7月4日, ボストン

茂呂和世, Identification of “natural helper cells”, Kyoto T Cell Conference, 2009年6月4日, 京都

茂呂和世, Identification of natural helper cell in mouse mesentery, 日本免疫学会総会, 2008年12月2日, 京都

茂呂和世, マウス腸間膜に存在する Lin-c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞の解析, Kyoto T Cell Conference, 2008年6月13日, 京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

茂呂 和世 (MORO KAZUYO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 90468489

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし