

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08766

研究課題名(和文) 自然リンパ球-T細胞相互作用を介するアレルギー・自己免疫疾患発症機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of allergic and autoimmune responses by ILC2-T cell interaction

研究代表者

石井 直人 (Ishii, Naoto)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60291267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて、IL-33刺激を受けた2型自然リンパ球(ILC2)上にOX40-Lが発現し、キラーT細胞にOX40刺激を供与することにより抗腫瘍効果を発揮する可能性を見出した。ILC2とT細胞の相互作用による免疫制御機構を示す重要な知見である。成人アトピー性皮膚炎患者末梢血ILC2上のOX40発現が健常人に比し高いことを発見した。さらに、アトピー性皮膚炎の重症度の指標であるPOEMスコアとOX40の発現量が正の相関を示すことを見出した。活性化ILC2をOX40刺激するILC2の増殖と炎症性物質の発現が上昇することからOX40発現ILC2がアトピー性皮膚炎の病態形成に関与する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OX40はT細胞に活性化シグナルを伝達する共刺激分子として知られており、人為的なOX40阻害はアレルギー・自己免疫疾患の治療標的であり、OX40刺激はヒトにおいても抗腫瘍効果を発揮する。OX40-OX40L系がILC2の活性化やT細胞との相互作用で機能するとの本知見は学術的にも臨床医学的にも重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：We found that OX40-L is expressed on IL-33-stimulated group 2 innate lymphoid cells (ILC2) in mice and may exert anti-tumor effects by providing OX40 stimulation to killer T cells, an important finding indicating an immune activation mechanism through the interaction between ILC2 and T cells.

We also found that OX40 expression on peripheral blood ILC2 of adult patients with atopic dermatitis was higher than that of healthy subjects. Furthermore, we found that the expression level of OX40 is positively correlated with the POEM score, an index of the severity of atopic dermatitis. The increased proliferation and expression of Th2 cytokines in in vitro OX40-stimulated ILC2 suggests that OX40-expressing ILC2 may be involved in the pathogenesis of atopic dermatitis.

研究分野：免疫学

キーワード：2型自然リンパ球 腫瘍免疫 アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

2 型自然リンパ球(以下 ILC2)の発見によりアレルギー性炎症の理解が大きく進展した。すなわち、ILC2 が産生する 2 型サイトカインが Th2 細胞の分化を促し組織局所で惹起されるアレルギー反応を誘導し、気管支喘息などのアレルギー性炎症のトリガーであることがマウスモデルでわかってきた。しかし、ILC2 とその周囲の細胞 (ILC2 自身や T 細胞など) との直接的な細胞間相互作用による免疫応答制御の詳細は明らかではなく、ヒトアレルギー疾患での ILC2 の関与についても不明な点が多い。研究代表者は、TNF 受容体型 T 細胞共刺激分子として知られていた GITR がマウス ILC2 に発現し、アレルギー性肺炎に GITR シグナルが必須であることを報告した (*J Allergy Clin Immunol*, 2018)。さらにマウス ILC2 を IL-33 刺激で活性化させるとその細胞上に GITR-L と OX40-L の強い発現が誘導されることを見いだした。これらの知見は、活性化 ILC2 上の GITR-L / OX40-L が、その受容体 (GITR / OX40) を発現する細胞 (ILC2 自身と T 細胞) に GITR / OX40 刺激を供与する可能性を示唆した。従来、T 細胞共刺激分子として知られている GITR および OX40 が ILC2 の活性化や ILC2 依存的なアレルギー反応に関与する可能性が考えられ、その可能性を検討することは免疫学的にも臨床医学的にも重要な研究課題である。

2. 研究の目的

T 細胞共刺激分子である OX40 と GITR は活性化 T 細胞に発現する TNF 受容体型分子である。OX40 / GITR を介する共刺激シグナルは、T 細胞の活性化や記憶 T 細胞産生に必須である一方、Treg 細胞の分化と機能を抑制することでアレルギー・膠原病の発症に関与する。これらのリガンド (OX40-L と GITR-L) は樹状細胞などの抗原提示細胞表面上に発現し、抗原提示時に T 細胞上の OX40/GITR を介して補助刺激を供与すると考えられてきた。研究代表者は ILC2 を IL-33 刺激で活性化するとその表面に GITR-L と OX40-L が強く誘導されることを見いだした。これらの発見は、OX40-L / GITR-L が、抗原提示とは異なる機序で、T 細胞の運命決定に寄与する可能性を示唆する。そこで本研究では、OX40/OX40-L 系および GITR/GITR-L 系による ILC2 活性化制御と ILC2 による T 細胞分化制御に焦点を当てて、アレルギー・膠原病発症および抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト ILC2 上の OX40/OX40-L および GITR/GITR-L の *in vitro* 発現誘導

マウスおよびヒト ILC2 を IL-33 で活性化させることにより、GITR および OX40-L が発現誘導されることを見出した。そこで、ヒト ILC2 を様々なサイトカインで刺激し活性化させた際に、OX40/OX40-L および GITR/GITR-L が誘導されるかについて、タンパク質および遺伝子レベルで検討した。その結果により、発現が確認された分子の ILC2 の活性化マーカーの妥当性を検証した。

(2) OX40-L 発現 ILC2 による T 細胞活性化

樹状細胞や B 細胞に発現する OX40-L は活性化 T 細胞に発現する OX40 に共刺激を供与することにより T 細胞活性化を促進する。そこで、ILC2 上に発現する OX40-L が、樹状細胞と同様に T 細胞活性化促進効果を有するかを明らかにする。これまで、ILC2 が細胞相互作用を介して T 細胞に共刺激を供与することは知られておらず、この作業仮説が証明されれば、新たな T 細胞活性化機構が明らかになる。そこで、*in vitro* において、あらかじめ IL-33 で刺激し OX40-L 発現を誘導した ILC2 と活性化 T 細胞を共培養し、ILC2 上の OX40-L が T 細胞に OX40 共刺激を供与できるかを、T 細胞の増殖とサイトカイン産生を指標として検討を行った。

(3) OX40-L 発現 ILC2 による抗腫瘍効果

人為的 OX40 シグナル供与は T 細胞活性化を促進することで抗腫瘍効果を発揮し、ヒトの悪性腫瘍治療法として注目されている。IL-33 刺激により活性化した ILC2 上に OX40-L が強く発現誘導されることから、IL-33 による抗腫瘍効果が、ILC2 上に発現した OX40-L を介して発揮される可能性が考えられた。そこで、担癌マウスモデルを用いて、IL-33-OX40L 発現 ILC2-OX40 発現キラー T 細胞系による抗腫瘍効果発現メカニズムの解明を行った。

(4) アトピー性皮膚炎患者の ILC2 性状の解析

小児および成人アトピー性皮膚炎患者 20 名の末梢血 ILC2 の細胞数および OX40/OX40-L、GITR/GITR-L、GATA3 などのタンパク質発現量を測定し、同一年齢健常者の末梢血 ILC2 と比較することにより、アトピー性皮膚炎の重症度マーカーの探索と発現分子の病態形成への関与について検討を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト ILC2 上の OX40/OX40-L および GITR/GITR-L の *in vitro* 発現誘導

マウス脾臓由来の ILC2 を、IL-33、IL-3、TSLP、IL-25、IL-2、IL-7 で刺激したところ、IL-33 で刺激した時にのみ OX40-L の発現誘導が観察された（業績 1）。上述のサイトカインはいずれも ILC2 を活性化することが知られているが、マウス ILC-2 上の OX40-L 発現誘導は IL-33 に特異的であることがわかった。一方、ヒト健常者末梢血由来の ILC2 を IL-33、IL-25、TSLP の 3 者で刺激すると ILC2 上に OX40 および GITR の発現誘導が観察されたが、OX40-L および GITR-L の発現は観察されなかった。ヒトにおいて OX40 発現は ILC2 の活性化マーカーになる可能性が示唆された（投稿中）。

(2) OX40-L 発現 ILC2 による T 細胞活性化

あらかじめ IL-33 刺激により活性化し、細胞表面上に OX40-L 発現を誘導したマウス ILC2 を抗 CD3 抗体存在下でマウス CD8 陽性 T 細胞と共培養を行った。IL-33 で刺激していない ILC2（OX40-L 発現無し）との共培養に比し、CD8 陽性 T 細胞上の活性化マーカー CD44 陽性率が 34.0% から 50.0% に増加し、細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性率が 6.2% から 22.6% に増加した。したがって、IL-33 刺激により活性化された ILC2 は CD8 陽性 T 細胞の活性化と増殖を促進することが明らかになった（業績 1）。さらに、OX40-L 発現 ILC2 と T 細胞との共培養系に阻害性抗 OX40-L 抗体を投与したところ、上述の CD44 陽性率が 36.6%、Ki-67 陽性率が 10.9% にまで低下し、活性化 ILC2 による CD8 陽性 T 細胞活性化促進効果のほとんどが OX40-L 依存的であることが示された（業績 1）。以上の結果より、ILC2 が OX40/OX40-L 系を介した細胞相互作用により T 細胞活性化を直接的に促進できることが明らかになった。今後、この機構が *in vivo* においても機能することを証明する予定である。

(3) OX40-L 発現 ILC2 による抗腫瘍効果

悪性黒色腫がんマウスに IL-33 を投与すると腫瘍の増大が抑制されることが知られていた。OX40-L がマウスにおいてもヒトにおいても抗腫瘍効果を発揮すること、および上述のように、IL-33 刺激により ILC2 上に OX40-L が強く発現誘導されることから、IL-33 により ILC2 上に発現誘導された OX40-L が CD8 陽性キラー T 細胞の OX40 を刺激することで、IL-33 の抗腫瘍効果が発揮される可能性が考えられた。そこで、悪性黒色腫がんマウスに IL-33 を投与すると同時に阻害性抗 OX40-L 抗体を投与したところ、IL-33 による抗腫瘍効果が有意に抑制された。すなわち、IL-33 の抗腫瘍効果が OX40-L 依存的であることが示された（業績 1）。一方、CD8 陽性 T 細胞を欠損させたがんマウスに IL-33 を投与しても抗腫瘍効果が観察されなかったことから、IL-33 の抗腫瘍効果は CD8 陽性キラー T 細胞によって担われていることが判明した。しかし、CD8 陽性 T 細胞には IL-33 受容体は発現せず IL-33 への応答も知られていないことから、IL-33 により ILC2 上に発現誘導された OX40-L が CD8 陽性キラー T 細胞の OX40 を刺激することでその抗腫瘍効果が発揮されている可能性が高まった。実際に *in vitro* 実験によってその可能性を支持する結果が得られた（成果 2）。今後、*in vivo* でのさらなる検証が必要である。

(4) アトピー性皮膚炎患者の ILC2 性状の解析（投稿中）

成人アトピー性皮膚炎患者末梢血由来 ILC2 において、健常者のそれに比し、OX40 の有意な発現上昇が認められた。一方、小児アトピー性皮膚炎患者では OX40 の発現上昇は認められなかった。したがって、成人と小児ではアトピー性皮膚炎患者の ILC2 の性状が異なることが示された。

成人アトピー性皮膚炎患者において、POEM スコアと ILC2 上の OX40 発現量に有意な正の相関が認められたが、一方、末梢血 ILC2 細胞数と OX40 発現量に有意な負の相関が認められた。

成果（1）に記した通り、ILC2 を活性化させると OX40 が発現することから、*in vitro* で ILC2 を活性化し OX40 を発現した後に OX40 を人為的に架橋し OX40 刺激を加えたところ、ILC2 の増殖および IL-5 と CCR4（TARC 受容体）のタンパク質発現量が有意に上昇することが明らかになった。すなわち、OX40 を発現する ILC2 は OX40 刺激を受けることで CCR4 を発現し末梢血から皮膚へと遊走し IL-5 産生を介してアトピー性皮膚炎の病態形成に関与する可能性が示唆された。本成果はアトピー性皮膚炎における ILC2 の関与機構を理解する上でも、成人と小児の病態の違いを考察する上でも重要な知見である。

業績

1 . Okuyama Y, Okajima A, Sakamoto N, Hashimoto A, Tanabe R, Kawajiri A, Kawabe T, Ishii N.: IL-33-ILC2 axis promotes anti-tumor CD8+ T cell responses via OX40 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 637: 9-16, 2022. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.11.006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Terui Hitoshi, Yamasaki Kenshi, Wada-Irimada Moyuka, Onodera-Amagai Mayuko, Hatchome Naokazu, Mizuashi Masato, Yamashita Riu, Kawabe Takeshi, Ishii Naoto, Abe Takaaki, Asano Yoshihide, Aiba Setsuya	4. 巻 7
2. 論文標題 Staphylococcus aureus skin colonization promotes SLE-like autoimmune inflammation via neutrophil activation and the IL-23/IL-17 axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eabm9811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abm9811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawabe Takeshi, Ciucci Thomas, Kim Kwang Soon, Tayama Shunichi, Kawajiri Akihisa, Suzuki Takumi, Tanaka Riou, Ishii Naoto, Jankovic Dragana, Zhu Jinfang, Sprent Jonathan, Bosselut Remy, Sher Alan	4. 巻 13
2. 論文標題 Redefining the Foreign Antigen and Self-Driven Memory CD4+ T-Cell Compartments via Transcriptomic, Phenotypic, and Functional Analyses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 870542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.870542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Ayaka, Azuma Mitsuki, Nagai Hodaka, Imai Wakana, Kawaguchi Kosuke, Morita Masashi, Okuyama Yuko, Ishii Naoto, So Takanori	4. 巻 45
2. 論文標題 OX40 Ligand-Mannose-Binding Lectin Fusion Protein Induces Potent OX40 Cosignaling in CD4+ T Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1798 ~ 1804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niihori Tetsuya, Tanoshima Reo, Sasahara Yoji, Sato Atsushi, Irie Masahiro, Saito-Nanjo Yuka, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Abe Taiki, Okuyama Yuko, Ishii Naoto, Nakayama Keiko, Kure Shigeo, Imaizumi Masue, Aoki Yoko	4. 巻 6
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity in individuals with MECOM variants in 2 families	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5257 ~ 5261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawahara Eigo, Azuma Mitsuki, Nagashima Hiroyuki, Omori Koki, Akiyama Sho, Fujimori Yuka, Oishi Mayu, Shibui Nagito, Kawaguchi Kosuke, Morita Masashi, Okuyama Yuko, Ishii Naoto, So Takanori	4. 巻 208
2. 論文標題 TNF Receptor-Associated Factor 5 Limits IL-27 Receptor Signaling in CD4+ T Lymphocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 642 ~ 650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2001358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MaruYama Takashi, Kobayashi Shuhei, Nakatsukasa Hiroko, Moritoki Yuki, Taguchi Daiki, Sunagawa Yoichi, Morimoto Tatsuya, Asao Atsuko, Jin Wenwen, Owada Yuji, Ishii Naoto, Iwabuchi Yoshiharu, Yoshimura Akihiko, Chen WanJun, Shibata Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Curcumin Analog G0-Y030 Controls the Generation and Stability of Regulatory T Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 687669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.687669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki Tomoki, Nagashima Hiroyuki, Okuma Atsushi, Yamauchi Takeshi, Yamasaki Kenshi, Aiba Setsuya, So Takanori, Ishii Naoto, Owada Yuji, MaruYama Takashi, Kobayashi Shuhei	4. 巻 67
2. 論文標題 Functional Analysis of the Transcriptional Regulator I B- in Intestinal Homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1252-1259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-021-06958-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tashiro Ryosuke, Niizuma Kuniyasu, Kasamatsu Jun, Okuyama Yuko, Rashad Sherif, Kikuchi Atsuo, Fujimura Miki, Kure Shigeo, Ishii Naoto, Tominaga Teiji	4. 巻 236
2. 論文標題 Dysregulation of Rnf 213 gene contributes to T cell response via antigen uptake, processing, and presentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7554 ~ 7564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi S, Tayama S, Phung TH, Kagawa Y, Miyazaki H, Takahashi Y, Maruyama T, Ishii N, Owada Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Fatty acid-binding protein 5 limits ILC2-mediated allergic lung inflammation in a murine asthma model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73935-y	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 -

1. 著者名 Mishima E, Ishijo M, Kawabe T, Kikuchi K, Akiyama Y, Toyohara T, Suzuki C, Asao A, Ishii N, Fukuda S, Abe T	4. 巻 12
2. 論文標題 Germ-free conditions modulate host purine metabolism, exacerbating adenine-induced kidney damage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 E547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12090547	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 -

1. 著者名 Sakurai T, Okuyama Y, Kobayashi S, Phung HT, Asao A, Kawabe T, Ndhlovu LC, Riccardi C, Kudo H, Wada M, Nio M, So T, Ishii N	4. 巻 34
2. 論文標題 GITR controls intestinal inflammation by suppressing IL-15 dependent NK cell activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 14820-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001675R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawabe T, Yi J, Kawajiri A, Hilligan K, Fang D, Ishii N, Yamane H, Zhu J, Jankovic D, Kim KS, Trinchieri G, Sher A	4. 巻 11
2. 論文標題 Requirements for the differentiation of innate T-bethigh memory-phenotype CD4+ T lymphocytes under steady state.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 3366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17136-1	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 該当する

1. 著者名 Katata Y, Inoue S-I, Asao A, Kobayashi S, Terui H, Inoue-Shibui A, Abe T, Niihori T, Aiba S, Ishii N, Kure S, Aoki Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Costello syndrome model mice with a HRAS G12S/+ mutation are susceptible to develop house dust mite-induced atopic dermatitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-02845-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
研究分担者	宗 孝紀 (So Takanori) (60294964)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	

	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
研究協力者	奥山 祐子 (Okuyama Yuko) (50624475)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究協力者	河部 剛史 (Kawabe Takeshi) (50834652)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

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