

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02750

研究課題名(和文) サイトカインデコイを介した自然リンパ球による炎症反応収束機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of cytokine decoy-mediated convergence of inflammatory responses by innate lymphoid cells

研究代表者

本村 泰隆 (Motomura, Yasutaka)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10587794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：サイトカインにより惹起する自然リンパ球による炎症反応の収束にサイトカインデコイが寄与する可能性を解析するためシングルセルRNAシーケンスを行ったところ、ILCの活性化を誘導する上皮系細胞が主にそれぞれのサイトカインデコイを発現することを見出した。さらに、IL-33は、ILC2炎症反応を誘導するとともに、IL-33デコイの可溶性ST2産生を誘導した。可溶性ST2の産生は、IL-33を発現する肺胞上皮細胞に加え、IL-33の標的細胞であるマスト細胞、ILC2から見られたことから、ILC炎症の誘導と同時にサイトカインデコイによる炎症反応の収束機構が発動する負のフィードバック機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで免疫疾患の病態は、T細胞やB細胞による獲得免疫を中心に考えられてきた。そのため、獲得免疫を標的とした治療法の開発が試みられている。しかしながら、近年、自然リンパ球の存在が明らかとなり、様々な疾患に関与することが示されてきた。そのため、免疫疾患を理解するうえで、自然リンパ球を加味する必要性が出てきた。しかしながら、自然リンパ球の活性化機序の理解に比べ、自然リンパ球の反応収束機序についてはほとんどわかっていなかった。本研究では、自然リンパ球の炎症反応収束機構を明らかにしたことから、免疫疾患の病態理解、さらには治療法の開発を加速させる研究基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Single cell RNA sequencing was performed to analyze the possible contribution of cytokine decoys to the convergence of inflammatory responses induced by cytokines by innate lymphoid cells, and we found that epithelial cells that induce ILC activation mainly express the respective cytokine decoys. Furthermore, IL-33 induced the ILC2 inflammatory response and soluble ST2 production of IL-33 decoys. The production of soluble ST2 was observed from mast cells, the target cells of IL-33, and ILC2, in addition to alveolar epithelial cells expressing IL-33, indicating a negative feedback mechanism in which the induction of ILC inflammation simultaneously triggers a convergence mechanism of the inflammatory response by cytokine decoys.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 サイトカインデコイ 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムでは、侵入した病原体ごとに **1~3** 型免疫応答のうち最も適した免疫応答を誘導することで迅速な病原体の排除を行うが、その際、細胞の活性化、細胞間の情報伝達の主体をなすのがサイトカインである。**1~3** 型免疫応答は、獲得免疫の司令塔であるヘルパー-T 細胞のサイトカイン産生パターンによって分類され、**1** 型はウイルス感染や細胞内細菌感染に対する **IFN** 産生、**2** 型は寄生虫感染に対する **IL-4** や **IL-13** 産生、そして近年 **3** 型と総称されるようになったのが、細胞外細菌感染に対する **IL-17** や **IL-22** 産生である。これらをそれぞれ産生する **Th1**、**Th2**、**Th17** 細胞は抗原刺激によって分化・活性化し、特異的かつ速やかに病原体を排除するが、抗原が無くなれば鎮静化し、炎症は収束に向かう。さらに獲得免疫機構では **2** 重の抑制機構が準備されており、決して過剰な反応が起こらないように制御性 T 細胞 (**Treg**) が存在し、完全な炎症の収束が実現される。

近年、自然免疫の司令塔となる新規のリンパ球として‘自然リンパ球 (**Innate lymphoid cell: ILC**)’が見いだされ、獲得免疫が駆動するまでの感染初期に重要な役割を担うことが分かってきた。**ILC** は、**3** つのヘルパー-T 細胞サブセットに対応する形で、**ILC1**、**ILC2**、**ILC3** の **3** つに分類される。すべての **ILC** は、主に粘膜組織に常在し、病原体の侵入により破壊された非免疫細胞から産生される危機シグナルを感知し、即座にサイトカインを産生する。代表的な危機シグナルとしては **IL-1** ファミリーサイトカインである **IL-18**、**IL-33**、**IL-1 $\beta$**  が知られており、それぞれ **ILC1**、**ILC2**、**ILC3** の活性化の起点となる。これらのサイトカインは、定常状態から細胞内に前駆体として存在しており、炎症に伴う細胞死が起こることによって切断され活性化型となり、細胞外に放出され **ILC** に作用する。こうした危機シグナルによる **ILC** の活性化は効率よく迅速な免疫応答を誘導するために重要であるが、一方で、危機シグナルによる活性化は、容易に過剰な反応を引き起こす危険を孕んでいる。近年、**ILC** の不適切な活性化が様々な免疫疾患の原因となることが次々と報告されており、例えば、脂肪組織に常在する **ILC1** が過剰な活性化を起こすとインスリン抵抗性を誘導し肥満を引き起こすこと、**ILC2** からの過度な **IL-5** や **IL-13** の産生がアレルギー病態を引き起こすこと、腸管の **ILC3** が **IL-17** や **IL-22** の産生を介して大腸炎の病態に寄与することなどが報告されている。獲得免疫における抗原とは異なり、危機シグナルは内在性の因子であり、やっかいなことに危機シグナルによって惹起された炎症は次なる細胞死を誘導しさらに危機シグナルの放出を助長するため、何らかの抑制機構が介入しなければ枯渇することがない。したがって、上記の病態機序を理解するために、**ILC** が引き起こす炎症反応の収束機構を明らかにすることが急務となっている。

## 2. 研究の目的

サイトカインデコイ受容体は血清中に遊離する分泌型のサイトカイン受容体であり、一般的な膜結合型の受容体がサイトカインの結合により細胞内にシグナルを入れるのに対し、デコイは血清中でサイトカインを捕捉することで、膜型受容体への結合を阻害しシグナルを抑制する。そこで、サイトカインを起点として発動する **ILC** による炎症反応の収束にサイトカインデコイが寄与する可能性を考えた。そこで、本研究では、なぜ自然リンパ球による免疫応答が適切に収束するのかという問いに答えるため、‘サイトカインデコイ受容体’という視点から **ILC** 誘導性炎症反応の収束機構を解き明かす。

### 3. 研究の方法

#### サイトカインデコイ産生細胞の同定

**ILC** サブセットが常在する組織のシングルセル **RNAseq** 解析により **ILC** 反応の抑制に寄与しうるサイトカインデコイ発現細胞を同定するとともに、候補細胞を単離したのちサイトカインデコイの産生を **ELISA** により測定する。また、各 **ILC** 炎症反応におけるサイトカインデコイの発現変動の動態を解析することにより、サイトカインデコイの作用時期を特定する。

#### サイトカインデコイ産生誘導機序の解明

サイトカインデコイの産生細胞の誘導機序を明らかにするため、*in vitro* においてサイトカインデコイの産生を解析する。同定した細胞を単離し、様々な刺激下でサイトカインデコイの産生が誘導されるかを検証することで、サイトカインデコイの誘導因子を同定する。

#### **ILC** による炎症反応におけるサイトカインデコイの役割の解明

**ILC** 炎症反応時に精製サイトカインデコイを用い、**ILC** 炎症反応に与える影響を解析する。特に、サイトカインデコイによる **2** 型免疫応答の抑制が、他の **ILC** 炎症反応を含め免疫応答に与える影響を解析することによりサイトカインデコイ機構の破綻による疾患発症機構の解明を行う。

### 4. 研究成果

抗原により活性化し、抗原の消失と共に炎症が収束する **T** 細胞とは異なり、サイトカインによって活性化する自然リンパ球 (**ILC**) の炎症収束機構はいまだ明らかとなっていない。これまでに、分泌型のサイトカイン受容体であるサイトカインデコイ受容体がその役を担っている可能性を見出した。**ILC** サブセット、**ILC1**、**ILC2**、**ILC3** は、それぞれ **IL-18**、**IL-33**、**IL-1 $\beta$**  によって活性化する。したがって、それぞれのサイトカインに対するデコイである **IL-18bp**、可溶性 **ST2**、**IL-1rn** が炎症反応の収束に寄与することが考えられた。そこで、**ILC1** が常在する脂肪組織と **ILC2** が常在する脂肪組織のシングルセル **RNA** シークエンス (**scRNAseq**) 解析を行い、それぞれのサイトカインデコイを発現する細胞を解析した。また、**ILC3** に関しては、公共データベースにおいて腸管の **scRNAseq** データを用いて解析を行った。その結果、**IL-18bp** の発現が主に脂肪組織の中でも中皮細胞に限定して見られ、可溶性 **ST2** の発現は、肺胞上皮細胞において顕著な発現が認められた。さらに、**IL-1rn** は、主に腸管上皮のマーカーである Villin 陽性の腸管上皮細胞に発現が認められた。興味深いことに、これらのサイトカインデコイを発現する細胞は、主に各 **ILC** を活性化するサイトカインを発現していた。**IL-18bp** を発現する中皮細胞は、**ILC1** を活性化する **IL-18** の主要な産生細胞であり、可溶性 **ST2** を発現する肺胞上皮細胞は、**ILC2** を活性化する **IL-33** の主要な発現細胞である。さらに、腸管上皮細胞は、**ILC3** の活性化因子 **IL-1 $\beta$**  の産生源となる。これらの結果は、**ILC** 反応を誘導する細胞群が、サイトカインデコイを介して **ILC** 反応の抑制にも寄与する可能性を強く示唆する。そこで、可溶性 **ST2** 産生細胞に着目し、**ST2** レポーターマウスを用い、生体内における可溶性 **ST2** 産生細胞の同定を試みた。フローサイトメーターにおいて、レポーターマウスにより **ST2** の発現とともに、細胞表面における **ST2** 発現解析を組み合わせることで可溶性 **ST2** 発現細胞の検出を試みた。その結果、**scRNAseq** 解析の結果と一致し、肺胞上皮細胞において可溶性 **ST2** 発現が確認された。さらに、免疫細胞においてもマスト細胞、**ILC2** から発現が認められた。そこで、*in vitro* に

において、可溶性 **ST2** の発現を解析したところ、肺胞上皮細胞からは無刺激下で産生が確認できた一方で、マスト細胞と **ILC2** からは、**IL-33** 刺激によって可溶性 **ST2** の産生が認められた。したがって、肺胞上皮細胞は、**IL-33** による **ILC2** の活性化に加え、可溶性 **ST2** を介し、**ILC2** の活性化を調節するとともに、**IL-33** による **ILC2** 炎症反応時には、マスト細胞、さらには **ILC2** 自身が可溶性 **ST2** を産生することで **ILC2** 炎症反応を制御する可能性が見えてきた。次に、*in vivo* において、2 型免疫応答時の可溶性 **ST2** の産生を解析した。システインプロテアーゼであるパピンをマウスに点鼻投与することで誘導する肺胞洗浄液中の可溶性 **ST2** 産生を解析した。パピンの投与により **IL-33** を介した肺における好酸球性炎症を誘導したところ、顕著に肺胞洗浄液中の可溶性 **ST2** の産生が亢進した。また、炎症を誘導後、経時的に解析することで、発症時期、炎症ピーク時期、炎症収束時期における可溶性 **ST2** の産生をモニターした結果、可溶性 **ST2** の産生は、発症時期と共に誘導され、その後、徐々に増加した。さらに、炎症収束時期においても産生が維持されていた。この結果は、可溶性 **ST2** が **IL-33** による反応により誘導され、**IL-33** 反応の収束に寄与するという考えを支持する。したがって、可溶性 **ST2** は、**IL-33** のネガティブフィードバック機構として、**ILC2** 反応の収束に寄与することが示唆された。**ILC2** は、**IL-33** によって活性化することで、上皮細胞の増殖因子である **IL-13** やアンフィレグリンを産生することから、**IL-33** 反応時に **ILC2** から可溶性 **ST2** の産生が **ILC2** 反応の抑制に寄与することに加え、**ILC2** が肺胞上皮細胞へのフィードバックを介し、可溶性 **ST2** の産生誘導に寄与する可能性が残されている。今後、各細胞から産生される可溶性 **ST2** の役割の解析を行うことで、**ILC2** の炎症収束機能の全貌を明らかにする。

*in vitro* において、可溶性 **ST2** 存在下では、**IL-33** による **ILC2** 活性化が、濃度依存的に抑制される。そこで、*in vivo* での機能を検証するため、**IL-33** 点鼻投与による喘息モデルマウスに、リコンビナント可溶性 **ST2** を投与することでアレルギー反応への影響を検証したところ、予想に反し、可溶性 **ST2** 投与は **ILC2** 活性化の促進、さらには、気道への好酸球浸潤が亢進した。また、興味深いことに、**ROR $\gamma$ t** 陽性細胞 (**Th17** 細胞、**ILC3**) の増加傾向が認められた。したがって、可溶性 **ST2** 機能は、時期や場所によって厳密に制御される可能性が考えられ、可溶性 **ST2** の過剰発現の方法を工夫する必要がある。一方で、可溶性 **ST2** には、**ILC3** の活性化への寄与が考えられ、単純に、**ILC2** の活性化調節のみならず、二次的な作用として **ILC3** 活性化も調整する作用を持つことが示唆された。したがって、サイトカインデコイを介し、**ILC** サブセット間のネットワークを制御する作用が考えられた。**ILC2** と同様に、**ILC1**、**ILC3** 炎症においても同様の負のフィードバック機構の存在が考えられ、サイトカインデコイによる **ILC** 炎症反応の収束機構の解明に取り組んでいる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Otaki Natsuko, Motomura Yasutaka, Teroatea Tommy, Thomas Kelly S., Mochizuki Miho, Takeno Natsuki, Koyasu Shigeo, Tamamitsu Miu, Sugihara Fuminori, Kikuta Junichi, Kitamura Hideya, Shiraishi Yoshiki, Miyanojima Jun, Nagano Yuji, Saita Yuji, Ogura Takashi, Asano Koichiro, Minoda Aki, Moro Kazuyo	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of ILC2s through constitutive IFN signaling reduction leads to spontaneous pulmonary fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 8120 ~ 8139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-43336-6	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 Kabata Hiroki, Motomura Yasutaka, Kiniwa Tsuyoshi, Kobayashi Tetsuro, Moro Kazuyo	4. 巻 6
2. 論文標題 ILCs and Allergy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-16-8387-9_6	査読の有無 無
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 Tetsuro, Motomura Yasutaka, Moro Kazuyo	4. 巻 33
2. 論文標題 The discovery of group 2 innate lymphoid cells has changed the concept of type 2 immune diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 705 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab063	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本村 泰隆
2. 発表標題 アレルギー病態における抗原非特異的IgEの役割
3. 学会等名 第72回アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本村 泰隆
2. 発表標題 2型自然リンパ球とアレルギー疾患の難治化
3. 学会等名 第7回日本アレルギー学会近畿地方会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本村 泰隆
2. 発表標題 気管支喘息病態を引き起こすサイトカインネットワーク
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本村 泰隆
2. 発表標題 2型自然リンパ球による2型炎症
3. 学会等名 第5回眼科アレルギー学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasutaka Motomura
2. 発表標題 Group 2 innate lymphoid cells exacerbate allergic inflammation via an innate amplification circuit
3. 学会等名 The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2020+1)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本村 泰隆
2. 発表標題 Type 2炎症におけるILC2の新たな役割
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------