

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2011

課題番号：22689013

研究課題名（和文）

新たなるリンパ球ナチュラルヘルパー細胞の寄生虫排除機構における役割

研究課題名（英文）

The role of natural helper cells during helminth infection.

研究代表者

茂呂 和世 (MORO KAZUYO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教（非常勤）

研究者番号：90468489

## 研究成果の概要（和文）：

自然免疫系リンパ球として我々が報告したナチュラルヘルパー（Natural helper: NH）細胞は、IL-33やIL-2+IL-25刺激によってIL-5、IL-13産生だけでなく、好酸球遊走を促すことで知られるeotaxinを産生し、増殖することが明らかになった。脂肪組織のNH細胞はCCR2を発現しているが、IL-33やIL-2+IL-25刺激はこの発現を低下させ、CCR4の発現を促進することでNH細胞を肺へと出現させた。肺に現れたNH細胞はMHC class IIを発現しないことから、Nuocyteをはじめとする他のTh2サイトカイン産生リンパ球とは異なる細胞であると考えられた。

NH細胞を欠損する $\text{Ccr}2^{-/-}$  Rag-2 $^{-/-}$ マウスでは、*Nippostrongylus brasiliensis*感染やIL-33またはIL-2+IL-25の気管内投与を行っても肺でのNH細胞出現は見られなかった。しかし、 $\text{Ccr}2^{-/-}$  Rag-2 $^{-/-}$ マウスに腸間膜から得たNH細胞を移植することで肺のNH細胞出現が回復した。これらの結果から、NH細胞は寄生虫感染においてIL-33やIL-25に反応することで肺での好酸球誘導や杯細胞過形成を誘導し、感染防御機構に働く細胞であるという結論を得た。

## 研究成果の概要（英文）：

Natural helper (NH) cells, which we reported to be novel innate lymphoid cell, proliferated and produced IL-5, IL-13 and eotaxin in response to IL-33 or the combination of IL-2 and IL-25 (IL-2+IL-25). While naïve NH cells expressed CCR2, IL-33 or IL-2+IL-25 stimulation downregulated CCR2 and induced CCR4, enabling NH cells to migrate to the lung. These cells do not migrate to lymph nodes or express MHC class II, and are distinct from other Th2-type innate lymphocytes present in lymph nodes such as nuocyte. Although *Nippostrongylus brasiliensis* infection or intratracheal administration of IL-33 or IL-2+IL-25 failed to induce lung eosinophilia in  $\text{Ccr}2^{-/-}$  Rag-2 $^{-/-}$  mice lacking NH cells, adoptive transfer of NH cells restored the accumulation of CCR4 $^{+}$  NH cells and eosinophilia in the lung. NH cells thus play an important role by inducing goblet cell hyperplasia and eosinophilia in the lung during helminth infection.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2011年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
総計	18,900,000	5,670,000	24,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：ナチュラルヘルパー細胞、寄生虫感染、IL-33、IL-25、Th2 サイトカイン、好酸球浸潤、肺、ケモカイン受容体

## 1．研究開始当初の背景

我々はマウス腸間膜脂肪組織に Lineage マーカー (CD3, CD4, CD8, CD11c, CD19, TCR $\alpha$ , TCR $\gamma$ , B220, NK1.1, Mac-1, Gr-1, FcR1) 陰性で cKit および Sca-1 を発現する細胞が 20~40% 存在することを発見し、ナチュラルヘルパー (Natural helper: NH) 細胞と名付けた。

NH細胞はその分化に IL-7 を必要とし、IL-2 刺激によって増殖し、IL-33 刺激により多量の Th2 サイトカイン (IL-5, IL-13) 産生をする新しいリンパ球であることを明らかにした。また、NH細胞から恒常的に産生される IL-5 が腹腔に存在する B1 細胞の維持・増殖を担うこと、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した。

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  $\gamma_c^{-/-}$  Rag2<sup>-/-</sup> マウスに感染させ、NH 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、 $\gamma_c^{-/-}$  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、NH 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個移入した  $\gamma_c^{-/-}$  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た。これらの結果と、 $\gamma_c^{-/-}$  Rag2<sup>-/-</sup> マウスには正常な数の肥満細胞、好塩基球が存在することをふまえると、*N. brasiliensis* 感染には、これまでターゲットとされてきた肥満細胞、好塩基球とは別の感染防御機構が存

在することが示唆された。

## 2．研究の目的

これまでの寄生虫感染実験は、既知の Th2 サイトカイン産生細胞である Th2 細胞、肥満細胞、好塩基球をターゲットに行われており、高い Th2 サイトカイン産生能をもつ NH 細胞の存在を加味せずに行われてきた。本研究では、寄生虫感染における NH 細胞の自然免疫細胞としての役割を明らかにするとともに、既知の Th2 サイトカイン産生細胞の寄生虫感染への関与を再検討することを目的とする。

## 3．研究の方法

(1) NH 細胞の報告から 2 か月後、Nuocyte および MPP<sup>type2</sup> と名付けられた Th2 サイトカイン産生細胞が他グループから報告された。これらの細胞はどちらも IL-25 によって *N. b.* 感染時に IL-13 産生を行う点で NH 細胞に類似した細胞と考えられた。NH 細胞、Nuocyte、MPP<sup>type2</sup> 細胞の相違点を明らかにするために、分化、表現型、サイトカイン反応性について検討を行った。

(2) NH 細胞の Th2 サイトカイン産生を誘導する IL-25 や IL-33 は、寄生虫感染において、肺や小腸で産生が見られるサイトカインとして知られていることから、*N. b.* 感染時の肺における NH 細胞の役割に着目し解析を行った。

## 4．研究成果

(1) MPP<sup>type2</sup> 細胞は、ミエロイド系細胞へ分化する細胞として報告されたが、NH 細胞はいかなる細胞へも分化しなかった。一方、Nuocyte は NH 細胞と同様、

Lin<sup>c</sup> Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> IL-7R<sup>+</sup> IL-25R<sup>+</sup> IL-33R<sup>+</sup>の細胞で、表現型の相違点は IL-2R 発現が NH 細胞では見られるが Nuocyte では見られず、NH 細胞が MHC class II 陰性なのに対し Nuocyte では陽性であることであった。そこで、両者のサイトカイン反応性を見るために野生型マウスに対し、IL-25 および IL-33 投与を行った。NH 細胞の存在する腸間膜、および Nuocyte が出現すると報告されている腸間膜リンパ節からリンパ球を分離し、フローサイトメトリー解析を行ったところ、NH 細胞は IL-33 によって増殖したが、Nuocyte の出現は見られなかった。Nuocyte の存在数が少ないため検出が困難になっている可能性を考慮し、T 細胞、B 細胞を欠損する Rag-2<sup>-/-</sup>マウスを用いて同様の実験を行ったところ、Nuocyte は IL-25 投与時のみ出現がみられ、IL-33 投与では存在が確認されなかったことから、IL-25 単独では増殖せず、IL-33 によって増殖する NH 細胞とは異なる細胞であるとの結論を得た。

(2) これまで NH 細胞は脂肪組織にのみ存在する細胞であると考えられてきたが、気管内に IL-33 を投与することで NH 細胞は肺にも出現し IL-5 を産生することで好酸球浸潤を誘導する細胞であることが明らかになった。寄生虫 *N.b.* は、皮下から感染し血行性に肺へと移動し、気管支、食道を経て腸内に寄生する。*N.b.* は小腸において IL-13 の誘導した杯細胞過形成によって分泌されるムチンにより腸管外へ洗い流されるが、肺を通過する段階で起こる好酸球増多も *N.b.* の感染排除に重要である事が知られる。今回の解析から、*N.b.* 感染 5 日目の肺胞洗浄液には NH 細胞の浸潤が見られ、IL-5 を産生することで好酸球を誘導し *N.b.* の排除を行うことが明らかになった。さらに NH 細胞は好酸球の遊走を誘導する Eotaxin を産生することも明らかにな

った。

以上の結果から、NH 細胞は寄生虫感染時によって傷害を受けた上皮細胞や血管内皮細胞が放出する IL-33 に反応することで IL-5 や Eotaxin を産生する細胞であることが明らかになった。また、これまでは寄生部位である小腸が研究対象となりがちだった *N.b.* 感染において、NH 細胞は小腸に寄生する前の肺の段階ですでに好酸球誘導による排除を促すことが明らかになった。

## 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4件)

Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro. Natural "Helper" Cells in the Lung: Good or Bad Help? *Immunity*. 2012, 36(23), 317-319

DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.001 査読無

Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro. Innate Th2-type immune responses and the natural helper cell, a newly identified lymphocyte population. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 11, 109-114, 2011, 査読無

DOI: 10.1097/ACI.0b013e3283448808

Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro. Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology*, 132, 475-481, 2011, 査読無

DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03413.x

Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, Tanabe Masanobu, Takeuchi Tutomu. Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. *Adv. Immunol.*, 108, 21-44, 2010, 査読無

DOI: 10.1016/S0065-2776(10)08002-8

〔学会発表〕(計7件)

Kazuyo Moro, Shigeo Koyasu, Th2 -type innate immune responses and the natural helper cell. The 4th Stage Surface Barrier Immunology Group (SBARIS) 3rd Meeting, 2012年3月24日、Osaka

茂呂和世、ナチュラルヘルパー細胞のTh2型免疫応答、第8回宮崎サイエンスキャンプ、2012年2月18日、宮崎

Kazuyo Moro, Shigeo Koyasu, IL -25 and IL -33 induced innate Th1 -type immune responses of natural helper cell, 第40回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2011年11月27日、幕張

茂呂和世、古賀諭、小安重夫、肺におけるナチュラルヘルパー細胞の好酸球誘導機構、第23回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、2011年8月25日、高遠

古賀諭、茂呂和世、田邊将信、竹内勤、小安重夫、Nippostrongylus brasiliensis 感染におけるナチュラルヘルパー細胞の機能解析、第80回日本寄生虫学会大、2011年7月18日、東京

Kazuyo Moro, Shigeo Koyasu, Th2 -type innate immune responses and the natural helper cell. 15th International Congress of Mucosal Immunology, 2011年7月6日、Paris

茂呂和世、小安重夫、ナチュラルヘルパー細胞のアレルギー性喘息における役割、Kyoto T Cell Conference 第21回学術集会、2011年6月11日、京都

〔図書〕(計8件)

茂呂和世、小安重夫：腹腔内脂肪組織に発見されたナチュラルヘルパー細胞、北隆館、BIO Clinica、臨時増刊号、Vol. 25、327、p54 -59、2010

茂呂和世、小安重夫：新しいリンパ球：ナチュラルヘルパー細胞、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、第234巻、第5号、438 -444、2010

茂呂和世、小安重夫：高いTh2サイトカイン産生能をもつ新しいリンパ球ナチュラルヘルパー細胞の機能、羊土社、実験医学、増刊153、138 -145、2010

茂呂和世、小安重夫：アレルギー治療に新しい光明が見えるか：ナチュラルヘルパー細胞とその免疫機構における役割、日本薬学会、ファルマシア、46巻、8号、755 -759、2010  
茂呂和世、小安重夫：ナチュラルヘルパー細胞の発見、先端医学社、分子消化器病、第7巻、第3号、94 -97、2010

茂呂和世、小安重夫：Natural helper cell、科学評論社、臨床免疫・アレルギー、第54巻、第3号、361 -367、2010

茂呂和世、小安重夫：Natural helper cell、医薬の門社、感染炎症免疫、Vol. 40.3、22 -29、2010

茂呂和世、小安重夫：ナチュラルヘルパー細胞の寄生虫感染・アレルギーにおける役割、秀潤社、細胞工学、第30巻/第4号/387 -392、2011

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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・特任助教(非常勤)  
研究者番号：90468489