

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659373

研究課題名(和文)炎症性腸疾患におけるナチュラルヘルパー細胞の機能解析

研究課題名(英文)Role of Natural Helper cells in inflammatory bowel disease.

研究代表者

茂呂 和世 (Moro, Kazuyo)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：90468489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)は1万人に40人ほど発症する原因不明の難治性疾患で、我が国でも近年患者数が増加している炎症疾患である。本研究では、自然免疫系のリンパ球であるナチュラルヘルパー(Natural Helper: NH)細胞に着目し解析を行った。NH細胞は脂肪組織や肺に存在することが知られていたが、小腸、大腸のいずれにも存在することが明らかになった。潰瘍性大腸炎では腸管上皮においてIL-33が発現することからNH細胞はIL-33に反応し、2型サイトカインを産生し好酸球の誘導や杯細胞の過形成を起こすことで病態悪化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory Bowel Diseases (IBD) is associated with chronic or recurring immune response and inflammation of the gastrointestinal tract. Prevalence rate of IBD reaching up to 396/100,000 persons (WHO), and two most common IBD are ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). IL-33, an epithelial cell-derived cytokine, has been reported to increase in UC patients. Natural Helper (NH) cell, a new member of innate immune system, produces large amounts of IL-5 and IL-13 in response to IL-33, and induces eosinophilia and goblet cell hyperplasia. In this study, we examined the distribution of NH cells in the intestine and the role of NH cells in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis model mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：ナチュラルヘルパー細胞 ILC2 IBD

1. 研究開始当初の背景

ナチュラルヘルパー (natural helper: NH) 細胞は、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞に次ぐ第 5 のリンパ球として、当研究室で脂肪組織において見出した自然免疫系の細胞であるが、本研究が開始したころ、腸管での存在は確認されていたもののその役割はほとんど知られていなかった。NH 細胞は lineage 陰性で c-Kit を発現し、IL-2、IL-7、IL-25、IL-33 受容体を発現することから、これらのサイトカインが産生されるような病態で働くことが示唆された。IL-2 は NH 細胞の増殖に、IL-7 は NH 細胞の分化に必須であること、IL-2 と IL-25 の共刺激、または IL-33 の単独刺激によって多量の Th2 サイトカイン産生を行うことは明らかになっていた。

2. 研究の目的

本研究は NH 細胞に着目し、炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) の発症および進行に NH 細胞がどのように関わっているかを明らかにすることを目的として行った。NH 細胞は IL-33 に対して増殖、遊走、Th2 サイトカイン産生など、強力に反応する細胞であるが、ヒトの潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) 患者では IL-33 を発現する腸管上皮細胞 (L. Pastorelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 8017, 2010) や筋繊維芽細胞 (J. Sponheim *et al.*, Am. J. Pathol., 177, 2804, 2010) が優位に増加することが報告されたことから、IBD における NH 細胞を切り口とした研究を行うことが重要と考えた。NH 細胞が IL-33 に反応し Th2 サイトカインを産生することで、IL-13 による腸管杯細胞過形成や IL-5 による好酸球の増多が誘導され、IL-5、IL-6 による B 細胞からの抗体産生を促進、IL-6、IL-13 によるマクロファージの M1/M2 バランスに影響を与え、IBD の病態形成に関与すると予想された。

3. 研究の方法

①正常腸管組織における NH 細胞の分布を精査するために C57BL/6 マウスを用いて小腸、大腸から細胞を分離し、フローサイトメトリー解析を行うことで NH 細胞の表現型を精査した。最終的には NH 細胞で発現が見られる転写因子の細胞内染色を行うことで、他の自然リンパ球の鑑別を行った。

②デキストラン硫酸ナトリウム (DSS: Dextran Sulfate Sodium Salt) 誘発性炎症モデルマウスにおける NH 細胞の動態をフローサイトメトリーを用いて調べた。DSS を飲水させることで腸粘膜上皮を傷害し、ネクロシスを起こした上皮細胞からの IL-33 放出を狙いとした。

③DSS 誘発性炎症モデルマウスにおける NH 細胞の 2 型サイトカイン産生量の変化を計測した。

4. 研究成果

①小腸、大腸の粘膜固有層 (Lamina propria: LP) および、小腸の IEL 分画、パイエル板分画に細胞を分け、フローサイトメトリーによる解析を行ったところ、両 LP においてのみ NH 細胞と思われる細胞の存在が確認出来た。LP NH 細胞は、脂肪組織や肺の NH 細胞同様、lineage マーカー陰性で Sca-1、KLRG1、CD44、GITR を発現した。一方、Thy-1.2、CD25 (IL-2R α)、IL-7R α 、T1/ST2 (IL-33R) の発現は他の NH 細胞に比較し発現が低く、c-Kit の発現は見られなかった。NH 細胞の表現型は L^{Ti} 細胞と非常に良く似ていることから、細胞内サイトカイン染色を行ったところ、腸管の Lin⁻Sca-1⁺KLRG1⁺細胞は GATA3 を発現していることが明らかになり、L^{Ti} 細胞で発現が見られる ROR α を発現しないことが明らかになったことから、小腸、大腸 LP の Lin⁻Sca-1⁺KLRG1⁺細胞は NH 細胞であると結論づけた。

②DSS 誘発性大腸炎モデルマウスを作製し、NH 細胞の動態を調べたところ、NH 細胞は DSS 投与後時間経過に伴い数が少なくなることが明らかになった。その間、表現型に変化は見られなかったが、数の減少と体重減少は一致していた。体重減少が 25%見られた時点で DSS 投与を中止したところ NH 細胞の数回復が見られた。

③DSS 誘発性大腸炎モデルマウスでは IL-33 産生が予想されたことから、NH 細胞の経時的な 2 型サイトカイン産生の検出を試みたが、*in vivo* でのサイトカイン産生を検出することは出来なかった。現在、BreferrdinA を *in vivo* で投与することによりサイトカイン放出を阻害し、フローサイトメトリーによる検出を試みている。

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)

- ① Hiroki Kabata, Kazuyo Moro, Koichi Fukunaga, Yusuke Suzuki, Jun Miyata, Katsunori Masaki, Tomoko Betsuyaku, Shigeo Koyasu, and Koichiro Asano. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells in the inflamed airways. Nat Commun. 2013;4:2675. 査読有, doi: 10.1038/ncomms3675.
- ② Furusawa J, Moro K, Motomura Y, Okamoto K, Zhu J, Takayanagi H, Kubo M, Koyasu S. Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. J Immunol. 2013 Aug 15;191(4):1818-26. 査読有, doi: 10.4049/jimmunol.1300379.
- ③ Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M,

- Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, Kubo A, Cho YH, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, Amagai M. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol.* 13: 744-752. 2012, 査読有, doi: 10.1038/ni.2353.
- ④ Koyasu S, Moro K. Role of Innate lymphocytes in infection and inflammation. *Frontiers in Immunology.* 3:101,1-13 2012, 査読無, doi: 10.3389/fimmu.2012.00101
- [学会発表] (計 21 件)
- ① 茂呂和世, ナチュラルヘルパー細胞とアレルギー疾患, 2th Academy of Aging and Cardiovascular- Diabetes Research, 2014 年 1 月 11 日、東京
- ② Kazuyo Moro, Natural Helper Cell ~ a new player in innate immune system ~ Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013 年 12 月 22 日、千葉
- ③ 茂呂和世, Th2 型疾患におけるナチュラルヘルパー細胞の役割, 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 2013 年 11 月 28 日、金沢
- ④ Kazuyo Moro, Role of natural helper cells a member of group 2 innate lymphoid cells, The 12th FIMSA Advanced Training Course, 2013 年 10 月 22 日、タイ
- ⑤ 茂呂和世, Th2 型アレルギーにおけるナチュラルヘルパー細胞の役割, 第 7 回順天堂眼アレルギー研究会, 2013 年 9 月 26 日、東京
- ⑥ 茂呂和世, 新規同定されたリンパ球ナチュラルヘルパー細胞が喘息を悪化させるメカニズム, 第 15 回愛知免疫アレルギーを語る会, 2013 年 9 月 11 日、愛知
- ⑦ Kazuyo Moro, TSLP induces corticosteroid resistance of natural helper cell and evokes severe asthma, 15th International Congress of Immunology, 2013 年 8 月 27 日、ミラノ
- ⑧ 茂呂和世, 新しいリンパ球「ナチュラルヘルパー細胞」、第 37 回阿蘇シンポジウム, 2013 年 8 月 3 日、熊本
- ⑨ Kazuyo Moro, Role of NH cells in IL-33-mediate diseases in the lung, The 23rd congress of Interasma Japan / North Asia, 2013 年 6 月 29 日、東京
- ⑩ 茂呂和世, ナチュラルヘルパー細胞とアレルギー疾患, 第 17 回 GI Cell Biology 研究会, 2013 年 6 月 20 日、東京
- ⑪ Kazuyo Moro, TSLP induces corticosteroid resistance of natural helper cell and evokes severe asthma, 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, 2013 年 6 月 6 日、京都
- ⑫ 茂呂和世, 加畑宏樹, 浅野浩一郎, 小安重夫, 重症喘息におけるナチュラルヘルパー細胞の役割, 第 25 回アレルギー学会春期臨床大会, 2013 年 5 月 11 日、横浜
- ⑬ 茂呂和世, 寄生虫感染におけるナチュラルヘルパー細胞の役割, 第 6 回 寄生虫感染免疫研究会, 2013 年 3 月 9 日、大分
- ⑭ Kazuyo Moro, IL-33-dependent eosinophilia in the lung mediated by natural helper cells. *Frontiers in Immunology and Inflammation*, 2013 年 2 月 13 日、東京
- ⑮ Kazuyo Moro, Shigeo Koyasu, Structural characteristics of Fat-associated lymphoid cluster in adipose tissue. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2012 年 12 月 5 日、神戸
- ⑯ Kazuyo Moro, Critical roles of natural helper cells in IL-33 dependent lung eosinophilia upon helminth infection, International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012, 2012 年 10 月 24 日、東京
- ⑰ 茂呂和世, 自然免疫機構におけるナチュラルヘルパー細胞の役割, 第 6 回 Tokushima Young Investigators Conference, 2012 年 9 月 18 日、徳島
- ⑱ 茂呂和世, 新しいリンパ球ナチュラルヘルパー細胞, 第 52 回 生化学若い研究者の会, 2012 年 8 月 24 日、愛知
- ⑲ 茂呂和世, アレルギーにおけるナチュラルヘルパー細胞の役割, ロチェスター・カンファレンス, 2012 年 6 月 27 日、東京
- ⑳ 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, 第 77 回日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会, 2012 年 6 月 22 日、神戸
- ㉑ Kazuyo Moro, IL-33-dependent

eosinophilia in the lung mediated by natural helper cells. 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages , 2012年6月15日、東京

[その他]

ホームページ等

<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/immune-cellsystem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂呂和世 (Kazuyo Moro)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：90468489