

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07170

研究課題名(和文) 自然リンパ球および上皮内リンパ球の分化と機能の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of development and function of innate lymphoid cells and intraepithelial lymphocytes

研究代表者

瀧 伸介 (Taki, Shinsuke)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：50262027

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)：腸管粘膜組織を中心に分布する上皮内リンパ球(IEL)や自然リンパ球(ILC)の分化、機能の制御機構について研究を行った。前者については、転写因子IRF-2の役割について検討を加え、IRF-2が胸腺内のIEL前駆細胞の選択に関わっている可能性を見出し、後者については小腸粘膜内ILCのホメオスタシスにTおよびB細胞が関わっている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管には、他のリンパ組織とは異なる特殊化したリンパ球が存在し、常在細菌などに対する免疫応答を調節するなどして消化管における恒常性の維持に関わっている。そのような特殊化したリンパ球の仲間である上皮内リンパ球がどのようにして生成されるか、また自然リンパ球と呼ばれる細胞の数がどうやって一定に保たれているかの一端を明らかにした本研究は、消化管の健康に関わる重要なメカニズムである粘膜における自然免疫の制御の理解に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Studies were carried out on the development, homeostasis and function of intraepithelial lymphocytes (IELs) and innate lymphoid cells (ILCs) distributing mainly in mucosal tissues. As to IELs, by pursuing why mice deficient for the transcription factor IRF-2 had only reduced numbers of intestinal IELs, IRF-2 was suggested to work in the IEL precursor cells particularly during the 'agonist selection' process. Also found was the role for T and B cells in the homeostasis of ILCs in the intestinal lamina propria, possibly competing the niche.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 上皮内リンパ球 転写因子 粘膜免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体表面を取り巻く粘膜組織が、環境と免疫機構の相互作用点として免疫学的寛容および自己免疫・アレルギー疾患との関連においてきわめて重要であることは、すでに十分に確立された概念となっていた。腸管粘膜組織におけるリンパ系細胞には conventional な T 細胞や制御性 T (Treg) 細胞に加えて、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体 (TCR) を発現する $\gamma\delta$ T 細胞、そして $\alpha\beta$ 型 TCR を発現するものの非古典的クラス I 分子に依存性を示し CD8 α ホモダイマーを発現する unconventional CD8 $\alpha\alpha^+$ $\alpha\beta$ T 細胞の二つの非定型 T 細胞が粘膜上皮内リンパ球 (intraepithelial lymphocytes; IELs) として存在している。一方、粘膜固有層には自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cells; ILCs) が常在しているが、この細胞群は、NK、ILC1、ILC2、ILC3 として分類され、そのアレルギーや炎症性腸疾患への関与が明らかになるにつれて、近年ますます注目を集めるに至っていた。これら粘膜組織常在性のリンパ球の分化成熟、ホメオスタシス、機能の制御のメカニズムを明らかにすることは、従って、以前にも増して重要な研究課題となっていた。申請者も過去この課題に取り組んでおり (平成 27~29 年度基盤研究など)、転写因子インターフェロン制御因子 (IRF-) 2 が ILCs および IELs の分化に重要な役割を果たすことを見いだしていた。本研究はこのような背景に基づき、粘膜組織、特に腸管粘膜に常在するリンパ系細胞の分化およびホメオスタシスの背景で機能する遺伝子ネットワークを明らかにしようとして企図されたものであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者自身の先行研究における発見を発展させ、具体的な研究対象として ILCs および IELs の分化過程に絞って、それらを転写因子 IRF-2 による制御という観点から検討することであり、IRF-2 が既報の転写因子、サイトカイン等の細胞外因子とともに形成するこれまでに知られていないシグナル-遺伝子ネットワークを浮かび上がらせようとするものであるとともに、やはり申請者が見いだした獲得免疫細胞、特に T 細胞と B 細胞を欠く RAG1 欠損マウスにおいて、ILC 数が上昇し、ILC 集団が拡大しているという観察の背景にあるメカニズムを明らかにし、もって ILC ホメオスタシスの制御機構に関するより深い insight を獲得することであった。

3. 研究の方法

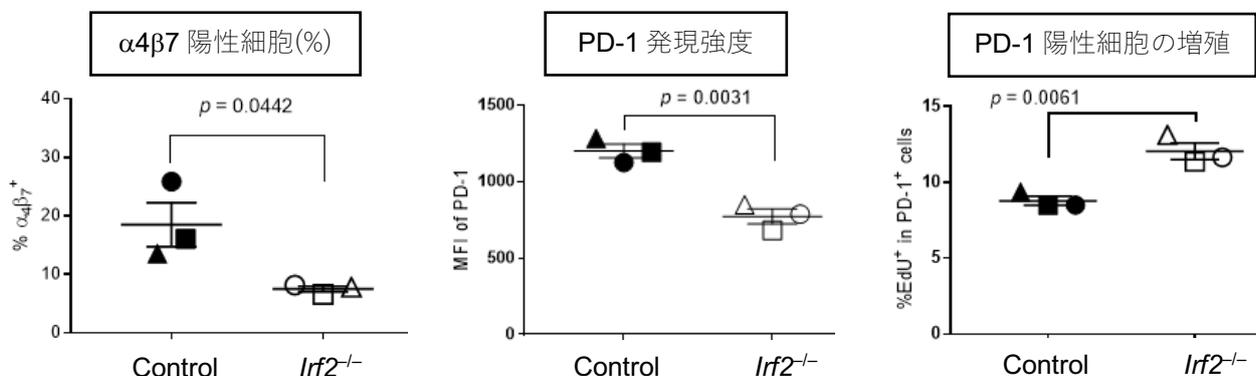
本研究では 1) 小腸 IEL、2) ILCs の分化とホメオスタシスの制御機構を明らかにするために、以下の検討を行った。1) については、*Irf2*^{-/-} マウス胸腺内の CD5⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻ IEL 前駆細胞 (IELp) の機能的成熟プロセスにおける異常を明らかにしようとした。すなわち、先行研究で明らかにした *Irf2*^{-/-} マウス由来 IELp 細胞が *in vitro* で IL-15 存在下に CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta$ 型 IEL を生成できないという観察のメカニズムを明らかにするために、野生型および *Irf2*^{-/-} マウス胸腺由来の IELp を IL-15 存在中で培養し、フローサイトメトリーによる Stat5 のリン酸化の度合い、また RT-PCR による SOCS1 などの IL-15 誘導遺伝子の発現定量によって IL-15 応答性を検討した。また、同細胞の様々な細胞表面分子を定量するとともに、Ki67 の発現を定量し、細胞増殖を検討した。細胞増殖については、2 週齢マウスに 5'-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) を i.p. して、4 時間後にその取り込みを Click 反応、フローサイトメトリーによって定量し、増殖を検討した。2) に関して、小腸 ILC のホメオスタシスに対する獲得免疫細胞、すなわち T 細胞および B 細胞の影響を検討するため、以下の解析を行った。まず、RAG1 を欠損するマウス (*Rag1*^{-/-} マウス)

と対照マウス小腸より単核細胞を単離し、各種 ILC サブセットの定量をフローサイトメトリーを用いて行った。同様な検討を、様々な自然免疫系に関わる遺伝子 (Asc、MyD88、TNF- α 、IL-15、ROR γ t など) を欠損するマウスについても行い、ILC のホメオスタシスに関する遺伝子の探索を行った。また飲料水に EdU を添加し、上記と同様に小腸の ILC の定常期における増殖を定量した。次に獲得免疫細胞の影響を直接的に検討するために、野生型マウスや各種遺伝子欠損マウスより脾臓、リンパ節より CD4⁺T 細胞、B 細胞を単離して、*Rag1*^{-/-}マウスなどに移入して小腸 ILC 数への影響を検討した。さらに、2 匹のマウスの血流を結合させ、循環型免疫細胞を共有するパラビオーシスを *Rag1*^{-/-}マウスなどを用いて成立させ、パートナーマウスから流入してくる免疫細胞の、腸管 ILC のホメオスタシスに対する影響を検討した。

4. 研究成果

1) IEL 前駆細胞のアゴニストセレクションの過程における IRF-2 の関与

IRF-2 を欠損するマウスの胸腺 IELp は野生型マウス由来に比較して、IL-15 受容体のコンポーネントである CD122 の発現がわずかに低下していたが、胸腺 IELp 細胞を IL-15 で刺激すると Stat5 がリン酸化されるが、*Irf2*^{-/-}マウス由来細胞についても Stat5 のリン酸化は十分に起き、また SOCS1 の発現も従って CD122 発現の低下が *Irf2*^{-/-}マウスにおける小腸 IEL の減少の主たる原因ではないことが示唆された。このことから、先行研究における観察の説明には、IL-15 レセプターの発現制御以外のメカニズム、おそらく、さらに下流の遺伝子発現制御を考えなければならないと考えられる。一方で、IRF-2 欠損 IELp 細胞は野生型細胞に比較して、インテグリン α 4 β 7 の発現細胞の頻度、および PD-1 の発現強度が低いことが見いだされた (下左および中図)。また、野生型マウスでは PD-1⁺ IELp 細胞はそのおよそ 10%程度が 4 時間の間に DNA 合成を行っており高い増殖率を示すが、IRF-2 を欠損する IELp ではその増殖率はさらに上昇していた (下右図)。

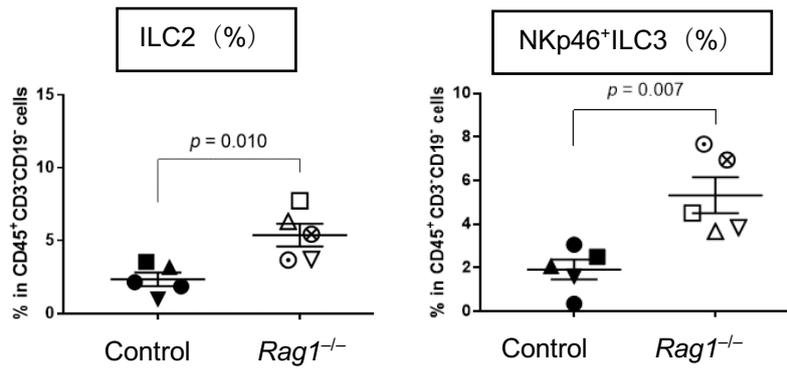


α 4 β 7 は、IEL が腸管にホーミングするために必要とされる分子であり、一方 PD-1 は IEL を誘導するための胸腺における選択過程 (アゴニストセレクション) の結果誘導される分子であるため、IRF-2 が機能している IELp の分化ステージとアゴニストセレクション・ステージの関連が示唆される。IRF-2 欠損 IELp における遺伝子発現の全体的な傾向を把握するために、野生型、*Irf2*^{-/-}マウス胸腺より IELp をソートし RNA sequence を試みたが、残念ながら、標的細胞数が著しく少数であるために他の細胞の混入が完全にコントロールできず、そのため解析可能なデータが得られず、当初企図した遺伝子ネットワークに関する情報は得られなかった。

2) 獲得免疫細胞による ILC のホメオスタシスの制御

予備研究で見出した *Rag1*^{-/-}マウスにおける ILC 細胞集団の増大をさらに詳細に検討し、小腸の

粘膜固有層 (LP) では、ILC2 や NKp46⁺ILC3 だけでなく (下図)、ILC1 や NK 細胞、NKp46⁺ILC3 についても有意な増加が見られることを確認した。これに対して、CD4⁺NKp46⁺ILC3 として定義



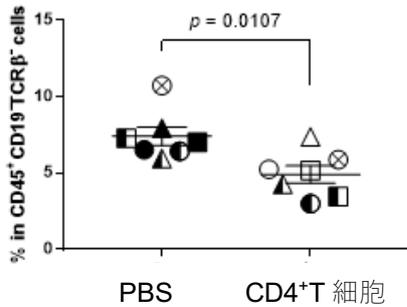
されるいわゆる Lymphoid tissue inducer (LTi) 様細胞については、有意な変化が見られなかった。このことによって、獲得免疫細胞である T 細胞もしくは B 細胞、その両方が ILC 細胞集団 (LTi 様細胞以外) と小腸粘膜固有層においてニッチを共有して、細胞集団のホ

メオスタシスについて競合関係にあることが示唆された。このうち ILC3 の関しては、Korn らの報告 (Mucosal Immunology 7 (5):1045-57, 2014, doi: 10.1038/mi.2013.121) と一致する結果である。

野生型マウスより単離した CD4⁺T 細胞を Rag1^{-/-}マウスにトランスファーしたところ、小腸粘膜

固有層内の ILC2 数が低下したが (左上図)、一方、同様に B 細胞をトランスファーしても脾臓には移入 B 細胞が確認できたが、LP には移行しなかったため、B 細胞の効果は検討できなかった。次に長期間にわたって外来リンパ球が LP に移行し続ける状況を作成するためにパラピオーシスを行った。すなわち、野生型マウスと Rag1^{-/-}マウス、それぞれの表皮を切開し、真皮を密着させることによって、血管を共有させたところ、術後 4~5 週で、Rag1^{-/-}マウスにおける NK 細胞の非ホストキメラ

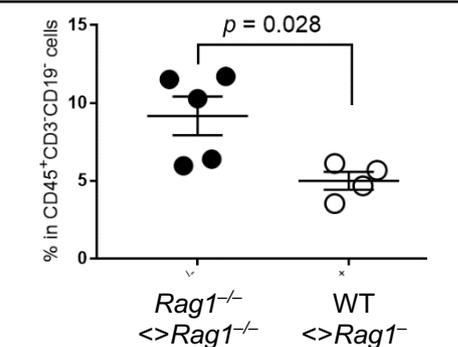
CD4⁺T 細胞トランスファーの効果



ムは 3 割に達し、LP における T および B 細胞の頻度はパートナーマウス (この場合 Ly5 コンジェニック野生型マウス) におけるそれらと同等になったが、ILC1~3 はほとんど全くパートナーマウス間での交換が見られず、ILC 細胞は厳密に組織定住性であることが確認された。

このような条件下で、ILC2 数は Rag1^{-/-}マウス同士のパラピオーシスよりも低下していた (左下図)。したがって、B 細胞についてもその ILC 細胞集団に対する作用を検討できる実験系が利用可能となった。ただし、T 細胞と B 細胞の効果を実験系を個別に検討するためには、それぞれを

パラピオーシスの効果



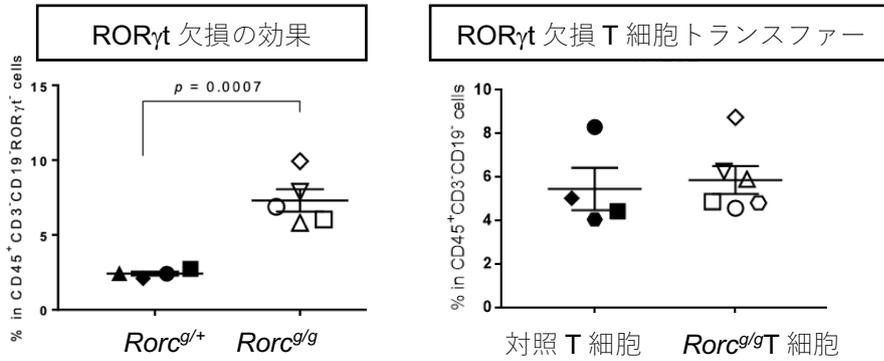
欠損するマウスを用いる必要があるが、本研究の研究期間内には、それらマウスを取り揃えることが出来なかったため、この実験は今後の課題として残された。

次に、腸管の免疫系の制御に関係していると考えられている様々な遺伝子の変異マウスについて ILC 細胞集団を検討したところ、唯一 RORγt を欠損するマウス (Rorc^{ep/ep}) において ILC2 細胞集団の拡大が観察された (下左図)。RORγt は Th17 細胞の分化に必須な転写因子であるが、Rorc^{ep/ep} マウス由来の CD4⁺T 細胞は、Rag1^{-/-}マウスにトランスファーすると野生型 CD4⁺T 細胞と同様に ILC2 細胞数を減少させたため、Th17 細胞は ILC のホメオスタシスには無関係であることが示された (下右図)。一方、RORγt は、ILC3 の分化にも必須な転写因子であり、このマ

欠損するマウスを用いる必要があるが、本研究の研究期間内には、それらマウスを取り揃えることが出来なかったため、この実験は今後の課題として残された。

次に、腸管の免疫系の制御に関係していると考えられている様々な遺伝子の変異マウスについて ILC 細胞集団を検討したところ、唯一 RORγt を欠損するマウス (Rorc^{ep/ep}) において ILC2 細胞集団の拡大が観察された (下左図)。RORγt は Th17 細胞の分化に必須な転写因子であるが、Rorc^{ep/ep} マウス由来の CD4⁺T 細胞は、Rag1^{-/-}マウスにトランスファーすると野生型 CD4⁺T 細胞と同様に ILC2 細胞数を減少させたため、Th17 細胞は ILC のホメオスタシスには無関係であることが示された (下右図)。一方、RORγt は、ILC3 の分化にも必須な転写因子であり、このマ

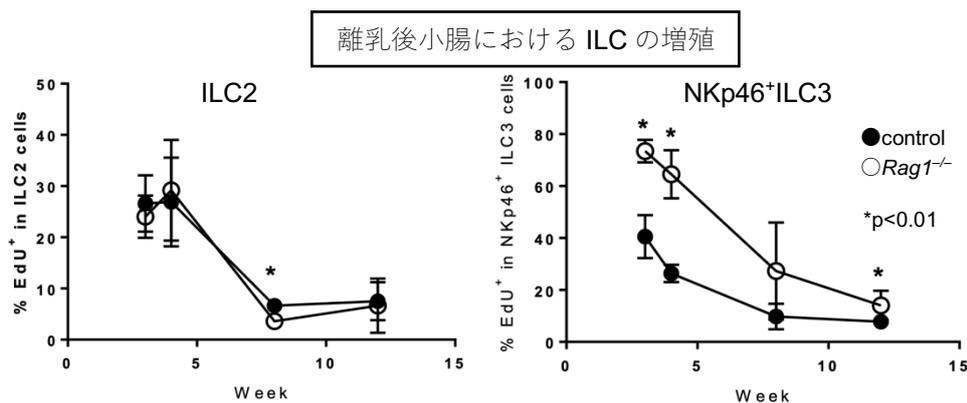
ウスの小腸 LP では ILC3 が分化しないことは予想通りであったが、驚いたことに B 細胞もほとんど確認できなかった。野生型マウスと RAG1 を欠損する *Rorc^{gfp/gfp}* マウスとの間で、パラビオーシスを成立させたところ、*Ragl^{-/-}Rorc^{gfp/gfp}* マウス脾臓における B 細胞数および小腸 LP における T 細胞数は正常範囲に復帰しているにも関わらず、小腸 LP 内の B 細胞数は全く復帰しなかった。この発見は、ILC3 の一種である LTI 様細胞が、よく知られている胎生期におけるリンパ組織誘導機能に加えて、成獣においても小腸 LP における B 細胞ニッチの構成に必須であることを示唆する極めて興味深いものである。この観察によって、*Rorc^{gfp/gfp}* マウスにおける ILC2 集団の



拡大は、小腸 LP における B 細胞の欠損も寄与している可能性が示唆されたが、この検証のためには B 細胞のみを欠損するマウスと T 細胞のみを欠損するマウスとの間でパラビオーシスを

成立させて、移行する B 細胞の効果を検討する必要がある、そのための変異マウスの準備が本研究の研究期間内には終了しなかった。今後の課題である。

獲得免疫細胞の不在化に、どのようにして ILC 集団が拡大するのかについて、細胞増殖を定量することによって検討を加えた。離乳後のマウスに飲料水に添加することによって経口的に EdU を 3 日間にわたって投与したところ、既報 (Huang ら *Science* 359:114-119, 2018, 10.1126/science.aam5809) にある通り、離乳直後 3 週齢程度で ILC2、NKp46⁺ILC3 とも高い DNA 合成を行っていることが観察された (下図、黒シンボル)。注目すべきは、NKp46⁺ILC3 においては、*Ragl^{-/-}* マウスにおいて対照マウスに比較して高い増殖が見られるのに対し、ILC2 では増殖細胞の頻度は変わらないことである。このことから、NKp46⁺ILC3 では獲得免疫細胞の不在によって細胞増殖が亢進し、そのために細胞集団が拡大しているものと考えられ、増殖に関わるニッ



チやサイトカイン等の T、B 細胞と ILC3 との間での競合の存在が示唆される。これに対し、ILC2 集団が拡大しているの

は増殖の制御の不在によってではないと考えられ、ILC2 にユニークなホメオスタシス制御機構の存在が示唆される。

このように、本研究は、完成を見たわけではないが、多くの興味深い観察がなされ、IEL の初期分化や ILC のホメオスタシスの理解の深化に寄与するところが多かったものと考えている。また、今後明らかにしなければならない課題についても、いくつかは明確にできたため、今後の計画立案の基礎になりうるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sanjo Hideki, Nakayama Jun, Yoshizawa Takahiro, Fehling Hans Joerg, Akira Shizuo, Taki Shinsuke	4. 巻 203
2. 論文標題 Cutting Edge: TAK1 Safeguards Macrophages against Proinflammatory Cell Death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 783 ~ 788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900202	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 Masato, Kitano Takuma, Nishiyama Saishi, Sanjo Hideki, Onozaki Kikuo, Taki Shinsuke, Itoh Saotomo, Hida Shigeaki	4. 巻 511
2. 論文標題 Staphylococcal superantigen-like 12 activates murine bone marrow derived mast cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 350 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.052	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 Okubo Yohei, Tokumaru Shigeo, Yamamoto Yuta, Miyagawa Shin-ichi, Sanjo Hideki, Taki Shinsuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Generation of a common innate lymphoid cell progenitor requires interferon regulatory factor 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 489-498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz019	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 Hayashi Kazuhito, Itoh Saotomo, Morikawa Arisa, Onozaki Kikuo, Taki Shinsuke, Tsuji Tsutomu, Hida Shigeaki	4. 巻 508
2. 論文標題 Staphylococcal α -hemolysin does not induce cell damage in murine mast cells but it augments the degranulation induced by Fc RI cross-linking and ionomycin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 263 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.113	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 Nagashio Sachiho, Ajima Kumiko, Maejima Daisuke, Sanjo Hideki, Kajihara Ryo, Hayashi Moyuru, Watanabe-Asaka Tomomi, Kaidoh Maki, Yokoyama Yumiko, Taki Shinshuke, Kawai Yoshiko, Ohhashi Toshio	4. 巻 316
2. 論文標題 Water intake increases mesenteric lymph flow and the total flux of albumin, long-chain fatty acids, and IL-22 in rats: new concept of absorption in jejunum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G155 ~ G165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00325.2018	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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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