

研究報告書

「IL-33 産生を伴う慢性疾患と加齢や肥満により増加したナチュラルヘルパー細胞が Th1/Th2 バランスの破綻を惹起するメカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 2 月～平成 28 年 4 月

研究者: 茂呂 和世

1. 研究のねらい

上皮細胞や血管内皮細胞が産生する IL-33 は生体の最前線で生体の異常を感知するセンサーとしての役割を持つ。IL-33 はアトピー患者の皮膚、潰瘍性大腸炎患者の腸管、喘息患者の肺など、様々な疾患、多様な臓器で発現が認められる。当研究室で同定されたナチュラルヘルパー (NH: Natural Helper) 細胞は新しい自然免疫系のリンパ球で、IL-33 に反応することで多量の 2 型サイトカインを産生する。NH 細胞は他のリンパ球と異なりリンパ節には存在せず、脂肪組織や、腸管、肺などに多く存在することから IL-33 関連疾患において炎症局所で重要な役割を持つことが示唆されていた。

IFN などの 1 型サイトカインがウイルスや細菌の細胞内感染防御に働くのに対し、2 型サイトカインは寄生虫や真菌感染に働くことが古くから知られており、2 型サイトカインの過剰な産生はアレルギー性疾患を誘導する事が分かっていた。新生児の体内は 2 型に偏向しているが、生後まもなく様々な感染を経験することで 1 型へのシフトが起きる。ところが、加齢と共に生体内は再度 2 型へと偏向していくことが知られている。加齢による 2 型への偏向は 2 型疾患の誘導のみならず、1 型応答の減弱による感染防御力への低下につながる。そこで本研究では、2 型への偏向の原因が NH 細胞にあるのではないかと考え、NH 細胞の活性化を誘導する IL-33 依存的な疾患に着目し解析を行った。

NH 細胞は 2010 年に報告した細胞であったため、本研究開始当初はこの細胞がいつどこでどのような制御を受けて分化し、どこでどのような役割を持ち、どのように抑制することができるのか何も分からない状態であった。これらの疑問を解決すべく、本研究では NH 細胞の分化機構、制御機構、活性化機構、機能を明らかにし、抑制法を検討することで 1 型/2 型サイトカインバランスと NH 細胞について追究した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では NH 細胞の分化経路と転写因子発現、増殖や 2 型サイトカイン産生制御機構、IL-33 および IL-25 による活性化機構、アレルギー性疾患、特に喘息における機能と喘息に伴うステロイド抵抗性における役割、さらに肥満における役割と 1 型サイトカインによる NH 細胞の抑制機構を明らかにした。

(2) 詳細

1. GATA3 による NH 細胞の分化およびサイトカイン産生制御機構

ROR α が Nuocyte のマスター遺伝子として報告されたことから、同じ Group2 ILC である NH 細胞の分化やサイトカイン産生にも ROR α が重要であることが予想された。しかしながら、ROR α 欠損マウスでは Nuocyte が出現しなくなるのに対し、NH 細胞は脂肪組織で数は減るものの存在し、この NH 細胞を分離し IL-33 存在下で培養した結果、野生型と変わらない 2 型サイトカイン産生をすることが明らかになった。そこで、ROR α 以外のどのような分子が NH 細胞の機能に重要かを明らかにする為に、IL-33 シグナル伝達経路における分子機構解明を試みた。その結果、IL-33 受容体下流には NF- κ B 経路と MAPK 経路が存在し、MAPK 経路は p38 と JNK を介したものが存在することが明らかになり、中でも p38 を介した経路が NH 細胞の IL-5、IL-13 産生には必須であることが明らかになった。さらに、p38 下流で、GATA3 が転写因子として働き、サイトカイン産生だけでなく、増殖と分化にも関わるということが明らかになった。

2. NH 細胞と他の Group2 ILC

NH 細胞の報告後、Nuocyte と MPP^{type2} と名付けられた Th2 サイトカイン産生細胞が相次いで報告された。MPP^{type2} はミエロイド系細胞への分化能を持つことから NH 細胞とは明らかに異なる細胞であることが分かったが、IL-25 投与によってリンパ節に出現する Nuocyte は表現型とサイトカイン産生が NH 細胞と良く似ていた。NH 細胞と Nuocyte が同一の細胞なのか、異なる細胞なのかを明らかにする為に解析を行った結果、NH 細胞が IL-25、IL-33 の両方に反応する細胞なのに対し、Nuocyte は IL-33 受容体の発現が低く、IL-33 投与ではそもそも腸間膜リンパ節への出現が見られないことが分かった。また、NH 細胞の移植実験から、NH 細胞は末梢組織や脂肪組織には出現するが、リンパ節へは出現しない細胞であることが明らかになった。リンパ節への移動には CCR7 や CXCR5 などのケモカインレセプター発現が必要であるが、NH 細胞ではこれらのケモカインレセプター発現が見られない。さらに、各細胞の増殖能を比較したところ、NH 細胞は IL-2、IL-2+IL-25、IL-33 存在下で長期にわたって維持できる細胞であるのに対し、Nuocyte は IL7+IL-33 存在下で最大 9 日間しか生存しない細胞であることも明らかになった。これらの結果から、どちらの細胞も Group2 ILC に分類されるものの、その表現型や機能、存在部位は異なることが明らかになった。

3. 喘息における NH 細胞の 2 型免疫反応

NH 細胞が喘息における好酸球浸潤に重要な細胞かを明らかにするために野生型マウス、T 細胞と B 細胞を欠損する Rag-2^{-/-}マウス、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞に加え NH 細胞を欠損する γ_c -Rag-2^{-/-}マウス、さらに野生型マウスの腸間膜から得た NH 細胞を γ_c -Rag-2^{-/-}マウスへと移植したマウスを用い、IL-33 の気管内投与実験を行った。野生型マウス、Rag-2^{-/-}マウス同様、NH 細胞を移植した γ_c -Rag-2^{-/-}マウスでは肺への NH 細胞の出現と共に著明な好酸球浸潤が認められた。一方、移植をしていない γ_c -Rag-2^{-/-}マウスでは NH 細胞の出現はもちろんのこと、好酸球浸潤は全く認められなかった。また、NH 細胞は *in vitro* だけでなく、*in vivo* でも IL-2+IL-25 および IL-33 投与後の肺においても好酸球の分化増殖に必須とされる IL-5 を多量に産生していることが明らかになった。さらに、好酸球の遊走には Eotaxin が重要であることが知られていたが、IL-2+IL-25 または IL-33 刺激により NH 細胞が Eotaxin を産生することが明らかになった。

NH 細胞は IL-33 だけでなく、IL-25 投与によっても肺胞洗浄液内に出現した。*In vitro* の実験から NH 細胞は IL-25 単独には反応せず、IL-2 と IL-25 の共刺激にのみ反応し、増殖や Th2 サイトカイン産生が誘導されることが分かっていた。そこで、何故 IL-25 の単独投与でも肺へ NH 細胞が出現するのかを明らかにするために T 細胞を欠損する Rag-2^{-/-}マウスに対し IL-25、IL-2+IL-25、IL-33 投与を行った。その結果、IL-25 単独投与では NH 細胞の肺胞洗浄液への出現は見られなくなった。これは T 細胞によって IL-2 が産生されることにより結果的には NH 細胞が IL-2+IL-25 刺激を受け取り 2 型サイトカイン産生が誘導されることを示していた。

4. NH 細胞による重症喘息におけるステロイド抵抗性獲得機構

重症喘息におけるステロイド抵抗性の発症機序を明らかにする為に、まずステロイド抵抗

性が起きる条件を検討した。これまでの多くの喘息に関する研究は OVA 投与によって病態を誘導してきた。OVA 投与では、主に T 細胞を主体とした反応が起きると考えられている。一方、非アトピー性喘息のような、自然免疫を主体とした喘息は IL-33 投与によって誘導できる。そこで、野生型マウスに対し、OVA 投与または、IL-33 投与または、OVA+IL-33 同時投与を行い、デキサメタゾン投与を行った。その結果、OVA 投与、IL-33 投与ではステロイドによって NH 細胞浸潤、IL-5/IL-13 産生、好酸球浸潤、杯細胞過形成が全て消失したのに対し、OVA+IL-33 投与では全ての残存が見られ、ステロイド抵抗性が誘導されたことを示した。IL-33 単独では起きないステロイド抵抗性が OVA 投与のどのような因子によって抵抗性に変わるのかを明らかにする為に、IL-33 とデキサメタゾン存在下で培養した NH 細胞に様々なサイトカインを加えた。その結果、IL-2、IL-7、TSLP を IL-33 と併に加えたときのみ NH 細胞の増殖がステロイドによって抑制されず、ステロイド抵抗性になることが示された。これらのサイトカインは全て STAT5 アクチベーターであることが分かったが、中でも TSLP は重症喘息患者での遺伝子発現上昇が報告されており、OVA 投与によって気管支での発現が上がるということが明らかになったことから、IL-33 と TSLP をデキサメタゾンと共に野生型マウスに投与したところ、IL-33+OVA 同様のステロイド抵抗性が示された。TSLP 受容体欠損マウスではステロイド抵抗性が起きない事も確認した。培養系で NH 細胞のステロイド抵抗性を誘導したサイトカインが全て STAT5 アクチベーターだったことから、NH 細胞の STAT5 発現を確認したところ、TSLP 刺激による発現上昇が見られた。さらに、重症喘息の新しい治療法を確立するために、ステロイドと共に STAT5 阻害薬を投与することで NH 細胞のステロイド抵抗性が解除され、ステロイドによる治療が可能になるのではないかと考え、承認薬の中で STAT5 阻害効果を持つ薬品をスクリーニングした。向精神薬として用いられているピモザイドが STAT5 阻害薬として有効であることがわかったことから、IL-33+TSLP によってステロイド抵抗性になったマウスに対し、ステロイドと共にピモザイドの投与を行ったところ、NH 細胞浸潤、IL-5/IL-13 産生、好酸球浸潤、杯細胞過形成の全てが消失し、ピモザイドが重症喘息の治療薬として有効であることが示された。

5. NH 細胞による肥満の誘導機構

NH 細胞は脂肪組織に存在することから脂肪細胞と何らかの相互作用をもつことが予想されてきたが、本研究からすべてのリンパ球を欠損する $\gamma_c^{-/-}$ Rag-2 $^{-/-}$ マウスが野生型マウスや T、B、NKT 細胞を欠損する Rag-2 $^{-/-}$ マウスに比べ高脂肪食負荷による肥満に対し著明な抵抗性を示すことが明らかになった。 $\gamma_c^{-/-}$ Rag-2 $^{-/-}$ マウスは NH 細胞だけでなく、NK 細胞や LTi 細胞も欠損することから、NK 細胞を欠損する IL-15 $^{-/-}$ マウスや LTi 細胞を欠損する ROR $\gamma_t^{GFP/GFP}$ マウスへの高脂肪食負荷を行ったところ、IL-15 $^{-/-}$ マウスは抵抗性を示さず、LTi 欠損マウスで肥満への抵抗性がやや見られたがその程度は $\gamma_c^{-/-}$ Rag-2 $^{-/-}$ マウスと比較すると弱かった。そこで NH 細胞を欠損する GATA3 コンディショナルノックアウトマウスを用いて高脂肪食負荷実験を行ったところ、NH 細胞欠損マウスでは著名な肥満への抵抗性を呈したことから NH 細胞が肥満への抵抗性へ関与することが示唆された。 $\gamma_c^{-/-}$ Rag-2 $^{-/-}$ マウスへ脂肪組織から分離した NH 細胞を移植しても肥満は誘導されないが、腸管から分離した NH 細胞を移植することで太ることから、高脂肪食依存的に起こる肥満は小腸粘膜固有層に存在する NH 細胞によって制御されている可能性が考えられる。

6. NH 細胞の分化機構

NH 細胞の分化について、転写因子や前駆細胞に関する報告はなされている。しかしながら、その前駆細胞にどのような外的因子が働くことで転写因子が発現し成熟 NH 細胞への分化が開始されるのかについては明らかになっていない。これまでに Nuocyte の分化には Notch シグナルと IL-33 が必要であると報告されていたが、NH 細胞の分化に IL-33 は必要なく、また、IL-7 の濃度、Notch シグナルの強さ、Notch シグナルの長さによって T 細胞、B 細胞と運命を分かちことが明らかになった。また、NH 細胞は骨髄のリンパ球前駆細胞 CLP から分化することが知られているが、骨髄内で最終分化をするのかどうかについては明らかになっ

ていない。NH 細胞は骨髄形成が完了する前の胎児の脂肪組織にも存在することが明らかになったことから、NH 細胞の最終分化は末梢で起きることが示唆されている。骨髄、胸腺、脂肪組織の Notch リガンド発現の強さを比較した実験からもこの結果は支持されている。

7. NH 細胞特異的遺伝子の同定と特異的ノックアウトマウスの作製

NH 細胞特異的欠損マウスを作製するために、特異的遺伝子の検索を行った。まず、様々な免疫細胞(29 種類)から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析から NH 細胞で特異的に発現していると思われる遺伝子を 62 遺伝子抽出した。次に、NH 細胞と役割やサイトカイン産生、表現型が類似する細胞(10 種類)から RNA を抽出し、cDNA を合成後、リアルタイム PCR の SYBR assay で 62 種の特異性の確認を行った。62 種のうち 12 遺伝子が NH 細胞特異的であると考えられたため TaqMan プローブを用いた特異性と発現量の確認を行った。その結果、特に発現量が多かったものに 2 遺伝子について DTR マウス作製することができた。

8. IFN γ と IL-27 による NH 細胞の制御機構

NH 細胞は肺、脂肪組織、腸管、皮膚など様々な組織に存在するが、パラビオーシスマウスを用いた研究から ILC2s は各組織に常駐し、血行性に移動しない細胞であることが明らかになった。このことは、定常状態、IL-33 依存的炎症のどちらに置いても確認されたことから、NH 細胞による炎症の収束はどのようにして起こるのかについて精査した。まず、NH 細胞が IL-10、IL-12、IFN α/β 、IFN γ 受容体発現を発現することが明らかになったことから *in vitro* の系で NH 細胞の増殖を誘導する IL-2、IL-2+IL-25、IL-33 刺激時に IL-10、IL-12、IFN β 、IFN γ を添加したところ、IFN β 、IFN γ が NH 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。この増殖抑制は IL-2、IL-2+IL-25、IL-33 いずれによる増殖も抑え、生存には影響を与えなかった。次に IL-2+IL-25、IL-33 によって誘導される NH 細胞の 2 型サイトカイン産生に対する IL-10、IL-12、IFN β 、IFN γ の影響を調べた。その結果、増殖同様、IFN β 、IFN γ 存在下では NH 細胞の IL-5 および IL-13 産生がほとんど見られなくなった。これらの結果から NH 細胞は I 型、II 型 IFN の両方によって生体内での働きが抑制される可能性が示唆された。I 型、II 型 IFN はどちらも STAT1 依存的に NH 細胞を抑制したことから STAT1 を介するシグナルとして知られる IL-27 を精査したところ、IFN だけでなく IL-27 も NH 細胞の増殖、サイトカイン産生を抑制することが明らかになった。

IFN や IL-27 が生体内でどのような役割を担っているかを調べるために寄生虫感染モデルマウス、真菌感染モデルマウス、IL-33 誘導性喘息モデルマウスを使用して解析を行った結果、IFN および IL-27 は NH 細胞による 2 型免疫反応を収束させ、Th2 細胞による反応へと移行させるために重要であることが明らかになった。これらの結果は、獲得免疫機構において Th1 細胞と Th2 細胞がそれぞれ IFN γ と IL-4 を出すことでそれぞれの分化を抑制し、Th1/Th2 バランスを保つことが明らかになっていることと同様に、自然免疫機構でも 1 型サイトカインと 2 型サイトカインがバランスを取り合って、過剰な炎症の誘導を抑制することを示している。

3. 今後の展開

2 型サイトカインを主体とする疾患はアレルギーや寄生虫感染、真菌感染だけでなく様々な存在する。これらの 2 型疾患はこれまで Th2 細胞を 2 型サイトカインの産生源として解析と治療法の開発が進められてきた。しかしながら、本研究から NH 細胞の重要性が示されたことから、今後はこれらの 2 型疾患に関する研究・開発を NH 細胞の存在を加味した上で再検討すべきだと考えている。また、NH 細胞が肥満を誘導する事が明らかになった事から免疫疾患だけでなく、糖尿病などの代謝疾患における NH 細胞の重要性も示していきたい。さらにアレルギー性疾患については臨床応用に結びつくような治療法の開発を試みていく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

1) 研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

さきがけ研究の機会を得て、1方向の研究ではなく多方向からNH細胞というターゲットに対する研究を行うことができた。また、さきがけ研究が始まった当初は自然リンパ球という言葉すら生まれていなかったが、3年前から日本免疫学会でInnate lymphoid cellというセッションが開始され、昨年はInternational innate lymphoid cellという国際学会も開始した。6年前には誰も知らなかった細胞がこれほど認知されるようになるとは予想以上の成果だったと考えている。また、さきがけ研究を通して領域内の研究者と様々な共同研究を開始できたことも大きな成果の1つである。

2) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

NH細胞が注目され、分野の拡大につながった背景には様々な疾患に関与する細胞であった点が大きな要因として挙げられる。現在はまだ世界的に基礎研究対象の段階であるが、次の5年で臨床での治療ターゲットとなることが予想されている。

3) その他領域独自の評価項目に基づく評価

慢性炎症という言葉の意味を真に理解して研究が始まったわけではなかったが、5年という与えられた期間内に慢性炎症の定義や意味が自分自身の中でも社会的にも理解され、認められて、現在では当たり前の理念として定着した。その一翼を担えた事が非常に有意義であった上に今後の研究への力になったと思っている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

現在2型自然リンパ球(Group 2 innate lymphoid cell, ILC2)に分類される、Th2サイトカインを産生するナチュラルヘルパー(NH)細胞を世界に先駆けて同定し、その解析は世界をリードしている。NH細胞のサイトカイン産生、増殖/分化には転写因子GATA3が関与し、NH細胞のIL-25/IL-33に対する応答性やIL-33受容体発現量・ケモカインレセプター発現・生存へのサイトカイン依存性において他のILC2との相違点を明らかにした。マウスモデルを用いた疾患研究では、1) IL-33の気管内投与で誘導する非アトピー性喘息モデルにおける好酸球浸潤にNH細胞が産生するIL-5とEotaxinが必須であること、2) OVA とIL-33との同時投与による喘息モデルで生じるステロイド抵抗性がOVA投与により発現が上昇するTSLPIに依存し、そのTSLPIがNH細胞をステロイド抵抗性に見事に証明した。さらに、TSLPIにより活性化されるSTAT5を阻害する薬剤スクリーニングの結果、既存薬ピモザイドが阻害効果を持つことを見だし、その投与によりステロイド抵抗性が解除されることを発表した。3) NH細胞の増殖や2型サイトカイン産生をIFN β 、IFN γ やIL-27がSTAT1依存的抑制することを見だし、寄生虫・真菌感染モデル・IL-33誘導性喘息モデルにおけるNH細胞による炎症反応をIFNとIL-27が収束させることを明らかにした。4) パラビオーシスを用いた実験からNH細胞が組織依存的な細胞であり血行性に移動しない細胞であることを明らかにした。5) 高脂肪食誘導性肥満においてNH細胞が肥満やインスリン抵抗性、M1マクロファージの誘導に重要であることを見いだした。今後の研究展開が楽しみである。

さきがけ研究開始当初は自然リンパ球という言葉すら生まれていなかった中で提案された研究目標の一部は、研究の進捗に伴ってNH細胞の分化などの基礎的なものへ振り向けたが、NH細胞のTh1/Th2バランスの破綻を惹起するメカニズムという当初研究課題については、NH細胞の活性化/抑制機構と各種疾患モデルマウスにおけるNH細胞の役割を解析することにより、大きな成果をあげることができたと評価する。研究者としても独立を果たし、今後の益々の成長を期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T, Koyasu S. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nature Immunology*, in press
2. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity*. 2015 Jul 21;43(1):175-86.
3. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, Fagarasan S, Mielke LA, Afshar-Sterle S, Masters SL, Nakae S, Saito H, Wentworth JM, Li P, Liao W, Leonard WJ, Smyth GK, Shi W, Nutt SL, Koyasu S, Kallies A. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2015 Mar;16(3):276-85.
4. Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, Betsuyaku T, Koyasu S, Asano K. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells in the inflamed airways. *Nat Commun*. 2013;4:2675.
5. Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA, Kuroki Y, Ohara O, Koyasu S, Kubo M. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity*. 2014 May 15;40(5):758-71.

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013
2. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014
3. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2015

プレスリリース

1. 「重症喘息のメカニズム解明」薬事日報(2013年11月)
2. 「重い喘息、仕組み解明」朝日新聞(2013年11月)
3. 「抗炎症薬の無効経路解明」日刊工業(2013年10月)