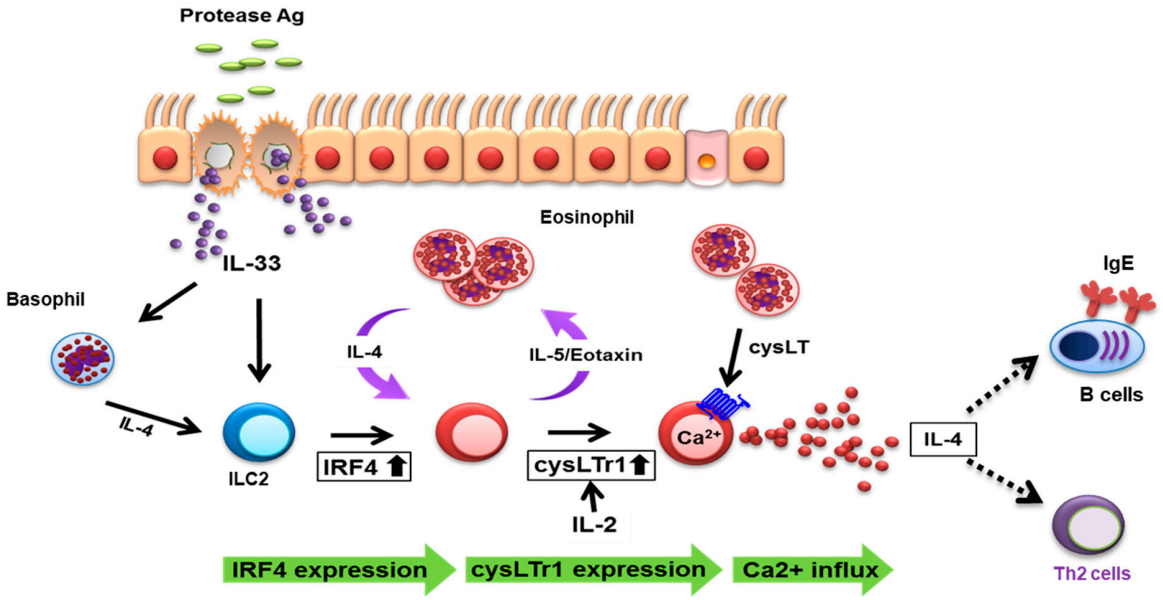
63　アレルギーにおけるILC2の獲得免疫活性化機構の解明	茂呂　和世

【目的】6 番目のリンパ球として 2010 年に報告した 2 型自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cells：ILC2）は、上皮細胞から産生される IL-25 や IL-33 によって多量の 2 型サイトカイン、IL-5、IL-6、IL-13 を産生する。ILC2 の発見は 2 型サイトカインが関与する寄生虫感染機構やアレルギー性疾患発症機構の理解へとつながったが、ILC2 同様に 2 型サイトカインを抗原刺激によって産生する Th2 細胞が IL-5、IL-6、IL-13 に加え IL-4 を産生するのに対し、ILC2 の IL-4 産生は遺伝子発現レベルはでは検出されるもののタンパクレベルでの検出は疑問視されてきた。そこで本研究では、ILC2 がどのような状況で IL-4 を産生し、その IL-4 がどのように獲得免疫機構に影響を与えるかについて調べた。

【方法】本研究では、計画を①ILC2 による IL-4 産生機構の解明と②ILC2 による IL-4 を介した獲得免疫誘導機構の解明に分け解析を行った。①では ILC2 による IL-4 産生がどのような因子がどの時期に働くかことによって起きるかを中心に papain 誘導性喘息モデルマウスを用いて解析した。②では IL-4 によって誘導されることが知られている Th2 細胞の分化と B 細胞による IgE 産生に焦点を当て解析した。

【結果】本研究から ILC2 は IL-33 によって活性化することで転写因子である IRF4 を発現し、その後 IL-2 刺激が入ることで LTD4 受容体である cycLTr1 を発現することが明らかになった。LTD4 刺激を受けることでカルシウムシグナルが ILC2 内で伝達され、その結果 IL-4 産生が起こる。ILC2 によって産生された IL-4 は Th2 細胞を誘導し、ナイーブな B 細胞を IgE 産生 B 細胞へとクラススイッチさせことが明らかになった。この抗原非依存的な IgE は肥満細胞や好塩基球などの Fcε 受容体に結合し、生存維持に働くことが明らかになった。

ILC2 の IL-4 産生機構と獲得免疫誘導機構



63. アレルギーにおける ILC2 の獲得免疫活性化機構の解明

茂呂　和世

理化学研究所 統合生命医科学研究センター 自然免疫システム研究チーム

Key words：ILC2，IL-33，IL-4，IRF4，IgE

緒　言

2 型自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cell：ILC2）は、寄生虫・真菌感染やアレルギー性疾患で産生がみられる IL-25 や IL-33 に反応することで 2 型サイトカインである IL-5、IL-6、IL-13 を産生する。IL-5 は好酸球の浸潤を、IL-6 は B 細胞による抗体産生を、IL-13 は杯細胞過形成によるムチン産生を促進することで寄生虫・真菌感染では積極的な排除に働き、アレルギー性疾患では病態の悪化因子として働く。我々が ILC2 を報告するまでは、2 型ヘルパーT 細胞（Th2 細胞）が 2 型サイトカインの主な産生源であると考えられてきたが、ILC2 の発見によって生体内には 2 種類の主要な 2 型サイトカイン産生細胞が存在し、ILC2 は自然免疫において、Th2 細胞は獲得免疫において 2 型免疫反応を誘導することが明らかになった。2 つの 2 型サイトカイン産生細胞の大きな相違点は、活性化のトリガーと、産生するサイトカイン種類であると考えられてきた。ILC2 は抗原認識受容体を持たないが、寄生虫や真菌、アレルゲンのもつ酵素が引き起こす上皮細胞のネクローシスに伴い産生される IL-33 によって活性化する。一方、抗原認識受容体を持つ Th2 細胞は寄生虫や真菌、アレルゲン自体を抗原として特異的に認識することで活性化する。どちらの細胞も IL-5、IL-6、IL-13 を産生するが、Th2 細胞が抗原刺激によって IL-4 を産生するのに対し、ILC2 は IL-33 刺激を受けても IL-4 を産生しないことがわかっている。2 型サイトカインの中でも IL-4 は多様な細胞に影響を与えることから、その重要性は膨大な報告によって示されており、特に、Th2 細胞の分化誘導と、アレルギー診断の指標としても使われる IgE のクラススイッチに必須であることが知られている。Th2 細胞は IL-4 を産生し IgE 産生を誘導することが知られているが、Th2 細胞の分化自体にも IL-4 が必須であることから、Th2 細胞の分化を促す IL-4 の産生源については長きに渡り議論されてきた。好塩基球、メモリーT 細胞、NKT 細胞、肥満細胞などがその産生源として報告されてきたが、議論の決着には未だ至っていない。

ILC2 の IL-4 産生は IL-33 刺激で見られないものの、ChIP アッセイから IL-4 遺伝子座が常にオープンであること、また、非生理的刺激である PMA＋ionomycin 刺激では IL-4 を産生することが *in vitro* の実験からわかっていた。生理的刺激によって ILC2 が IL-4 を産生する可能性を探るため、様々な条件検討を重ねた結果、喘息モデルマウスから分離した ILC2 に炎症時に産生される脂質メディエーターの 1 つであるロイコトリエン D4（LTD4）で刺激すると IL-4 産生が見られることが明らかになった。IL-4 産生はナイーブなマウスから分離した ILC2 では見られないことから、アレルギー発症によって誘導される何らかの因子が ILC2 の IL-4 産生能に寄与することが示唆された。また、ナイーブな ILC2 は LTD4 受容体である cysLTr1 を発現しないが、IL-2 や IL-7 刺激によって受容体発現が誘導されること、さらに受容体発現には IRF4 シグナルが必須であることが明らかになった。ILC2 の IRF4 発現を促進する因子については明らかになっていなかった。

自然免疫系の細胞である ILC2 による 2 型サイトカイン産生は Th2 細胞と比べて非常に早いことを特徴とし、好酸球の浸潤に必須である IL-5 に関しては恒常的に少量ずつ、短時間の IL-33 刺激で多量に産生する。これまでの研究から、アレルゲンが体内に侵入すると酵素活性により上皮細胞が傷害され、IL-33 を産生させることで急速な ILC2 の IL-5 産生を誘導し、好酸球の浸潤が起こることがわかっていた。好酸球性炎症の結果上昇した IL-2、IL-7 発現が cysLTr1 を発現させると予想された。さらに好酸球性炎症では LTD4 の産生が起こることが知られていたため、これらの刺激を受けた ILC2 が IL-4 を産生し始めると考えられた。このようにして ILC2 の産生する IL-4 が 5 日前後で立ち上がる Th2 細胞や B 細胞からの IgE 産生などの獲得免疫反応を誘導すると予想された。ILC2 の IL-4 産生能については国内

外の多数のグループが検討を重ねてきたが、生理的条件下での産生は未だ明らかになっていない。本研究ではこれまで得られた知見をもとに、ILC2 の IL-4 産生機構を明らかにし、ILC2 の IL-4 が獲得免疫系へ与える影響を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. ILC2 による IL-4 産生機構の解明

ILC2 の IL-4 産生には LTD4、IL-2 や IL-7、IRF4 の発現が必要であることが明らかになっていたが、これらの因子がどのような相互作用を持つことで最終的に IL-4 産生へと至るのかは明らかになっていなかった。そこで、*in vitro* の系やノックアウトマウスを用いた解析を行うことで、ILC2 の IL-4 産生機構の全貌を明らかにした。

2. ILC2 による IL-4 を介した獲得免疫誘導機構の解明

ILC2 の IL-4 産生機構が明らかになった後、ILC2 の産生する IL-4 がどのような役割を持つかを明らかにするために、IL-4 が誘導する獲得免疫反応に着目し解析を行った。IL-4 は多様な機能を持つが、特に Th2 細胞の分化誘導と B 細胞による IgE 産生での重要性はよく知られている。そこで、Th2 細胞については *in vitro* の系を用いて、B 細胞について *in vitro* と *in vivo* の両方の系を用いて解析した。

結果および考察

1. ILC2 による IL-4 産生機構の解明

ILC2 の IL-4 産生には IRF4 発現が必須であることが IRF4 欠損マウスを用いた解析から明らかになっていたが、ILC2 の IRF4 がどのようにして発現するかが明らかになっていなかったため、肺のナイーブな ILC2 を分離し、様々なサイトカイン刺激を行ったところ、IL-33 刺激によって ILC2 の IRF4 発現が上昇することが明らかになった（図 1a）。生理的な条件下で ILC2 の IRF4 発現が IL-33 依存的に誘導されるかを調べるために IL-33 欠損マウスや IL-33 同様 ILC2 の 2 型サイトカイン産生を誘導することが知られている IL-25 欠損マウスを用いて papain 誘導性喘息モデルマウスを作製したところ、IL-33 の欠損によって ILC2 の IRF4 発現が消失することが確認できた（図 1b）。さらに papain 誘導性喘息モデルマウスで出現する IL-4 陽性 IRF4 陽性 ILC2 が IL-33 欠損マウスでは消失することも確認した（図 1c）。

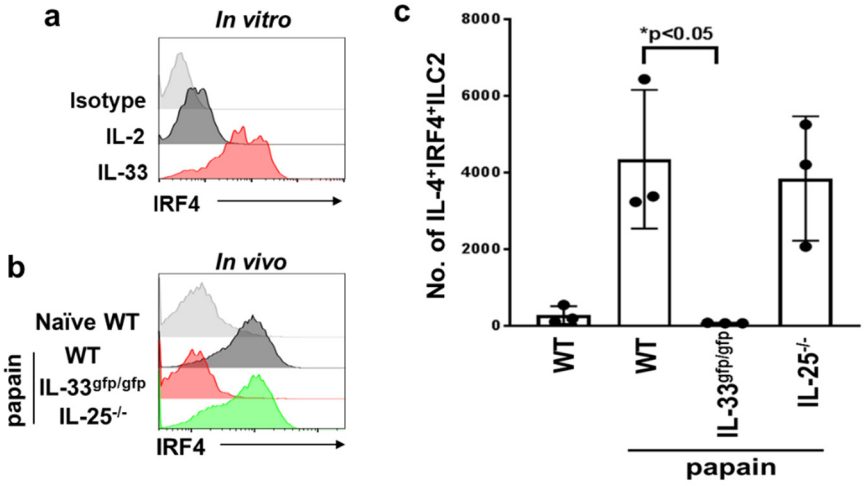


図 1. ILC2 の IRF4 発現は IL-33 によって誘導される

a）ILC2 にサイトカイン刺激を行った際の IRF4 発現

b）サイトカイン欠損マウスを用いた papain 誘導性喘息における肺の ILC2 の IRF4 発現

c）サイトカイン欠損マウスを用いた papain 誘導性喘息における肺の IL-4^{+}ILC2 の数（統計：One way ANOVA）

気管支喘息では上皮細胞がネクローシスを起こすことで IL-33 が放出されることが分かっていたが、この IL-33 は ILC2 の IRF4 発現を亢進することで ILC2 からの IL-4 産生を誘導することが明らかになった。その際、IL-33 刺激によって ILC2 が IL-5 を産生することで好酸球が浸潤し、この好酸球が LTD4 を産生する。ILC2 が LTD4 刺激を受け取るためには LTD4 受容体である cysLTr1 を発現しなくてはいけないがこれは IL-2 刺激によって誘導される。これらの結果は、ILC2 の IL-4 産生は IL-2 と IL-33 というサイトカインのみで誘導可能であることを示している。そこで、抗原非依存的にサイトカインのみで本当に ILC2 が生体内で IL-4 を産生できるのかを調べるために、IL-4／GFP レポーターマウスの肺にリコンビナント IL-2 と IL-33 投与を行った。その結果、ILC2 による IL-5 や IL-13 産生は早期に起こることが知られているのに対し、IL-4 産生は 4 日以上の時間をかけて産生されることが明らかになった（図２）。獲得免疫系は 5～7 日の時間をかけて誘導されることが知られていることから、サイトカインによって誘導される ILC2 の IL-4 産生が獲得免疫系に影響を当たれる可能性が強く示唆された。

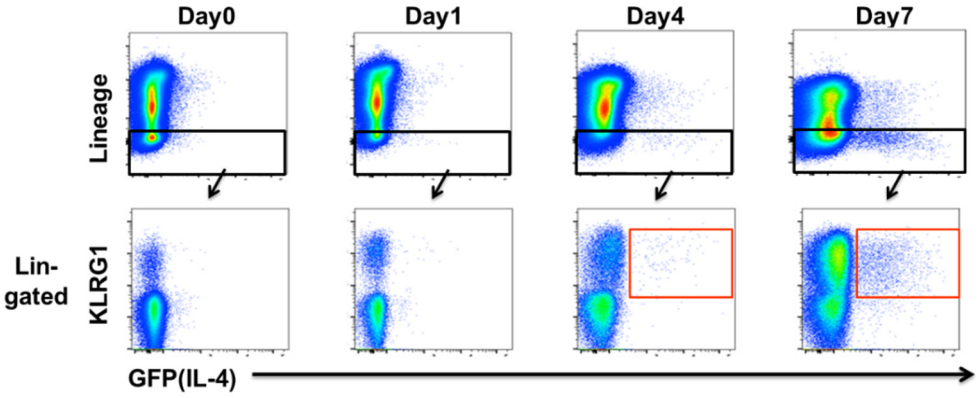


図 2. ILC2 の IL-4 産生は抗原非依存的にサイトカインによって誘導される

リコンビナント IL-2 と IL-33 を経鼻的に肺に 3 回投与した結果、Lineage 陰性で KLRG1 を発現する ILC2 が 4 日目から IL-4 を産生することが IL-4／GFP レポーターマウスを用いることで明らかになった。

2. ILC2 による獲得免疫活性化機構の解明

ILC2 の IL-4 産生の意義を調べるためにまず T 細胞の Th2 細胞への分化に注目した。papain 誘導性喘息モデルマウスの肺から分離した ILC2 をナイーブマウスの脾臓から分離した T 細胞と LTD4 存在下で共培養し、5 日目の T 細胞をフローサイトメトリー解析によって評価した。Th2 細胞は GATA3 と CD4 を共発現することが知られているが、$GATA3^{+}CD4^{+}$T 細胞がポジティブコントロールとして用いた IL-4 添加サンプルと ILC2 と LTD4 添加したサンプルで著明に増加した（図 3）。一方、抗 IL-4 抗体を添加した ILC2 と LTD4 添加サンプルでは Th2 細胞は検出されなかった。この結果は ILC2 が LTD4 存在下で IL-4 産生を促進することで Th2 細胞分化を誘導することを示した（図 3）。

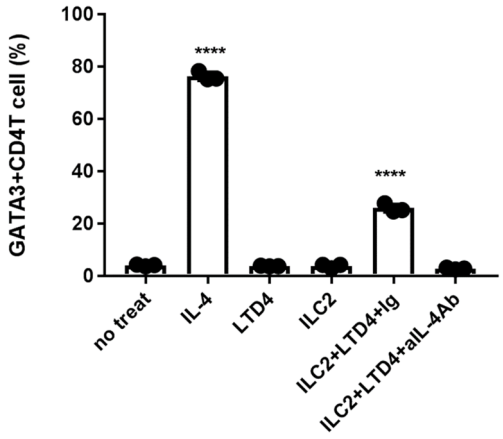


図 3. ILC2 の IL-4 産生は T 細胞を Th2 細胞へと分化させる

papain 誘導喘息モデルマウスから活性化した ILC2 を分離し、脾臓 T 細胞との共培養を行った。GATA3 を発現する Th2 細胞が LTD4 刺激を受けた ILC2 との共培養で誘導された。（統計：One way ANOVA, ****P < 0.0001）

次に ILC2 の IL-4 産生が B 細胞の抗体産生にどのような影響を与えるかを調べるために、野生型および IL-4 欠損マウスの肺に IL-2 および IL-33 を投与し血清中の抗体産生を確認した。IL-2 と IL-33 投与を行った野生型マウスで特異的に IgE 産生が誘導されたことから、これらのサイトカインに反応する ILC2 が IL-4 依存的に IgE 産生を誘導することが示唆された。一方、IL-4 依存的に産生される IgG1 については恒常的な産生が見られることが確認された（図 4）。ILC2 の産生する IL-4 が B 細胞の IgE 産生に関わることが明らかになったが、この IgE 産生は B1 細胞が産生源であること、さらに B1 細胞の産生する IgE が好塩基球や肥満細胞などの Fcε 受容体を持つ細胞の生存に寄与することが明らかになった。

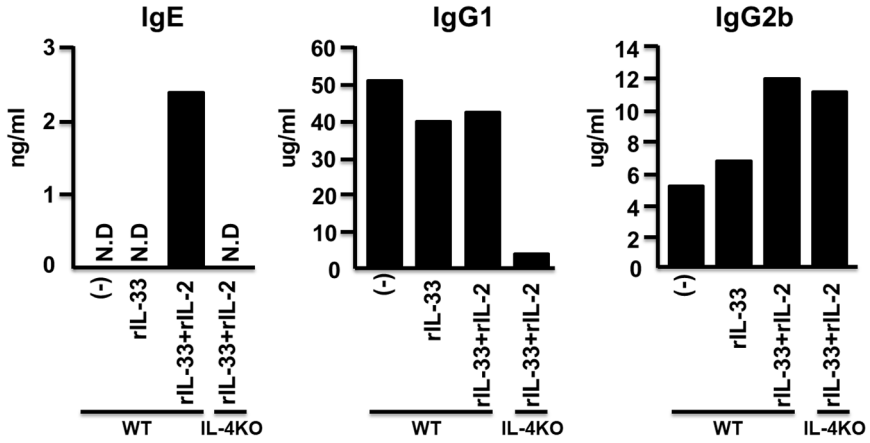


図 4. IL-2 と IL-33 の肺への投与は IL-4 依存的に血清 IgE 産生を促進する

以上の結果から、本研究では ILC2 による IL-4 産生機構が明らかになり、この IL-4 産生が Th2 細胞や B1 細胞による IgE 産生といった獲得免疫機構の誘導に重要であることが分かった。自然免疫系の細胞である ILC2 が獲得免疫系を誘導し、さらにそれによって出された IgE がまた自然免疫系の細胞であるミエロイド系細胞の生存に寄与することは興味深い。IL-4、IgE、LTD4 は現在、誘導メカニズムが明らかになっていない NSAID 過敏症（アスピリン喘息など）で高発現する共通因子である。NSAID 過敏症は抗原非依存的に起こるアレルギーとして知られているが、ILC2 による IL-4 産生がこの病態を誘導するのではないかと考えさらなる解析を行っている。

共同研究者・謝辞

本研究は理化学研究所生命医科学研究センター自然免疫システム研究チーム本村泰隆が行った。共同研究者は、理化学研究所生命医科学研究センター免疫細胞システム研究グループの小安重夫、長崎大学大学院医師役総合研究科免疫学分野の由井克之先生である。

文　献

1) Satoshi Koga, Katsuto Hozumi, Ken-ichi Hirano, Masaki Yazawa, Tommy Terooatea, Aki Minoda, Takashi Nagasawa, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro Peripheral PDGFRα+gp38+ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver–derived ILC2. J Exp Med. 2018 in press

2) Kojo S, Tanaka H, Endo TA, Muroi S, Liu Y, Seo W, et al. Priming of lineage-specifying genes by Bcl11b is required for lineage choice in post-selection thymocytes. Nat Commun. 2017;8(1):702. Epub 2017/09/28. PubMed PMID: 28951542. doi: 10.1038/s41467-017-00768-1.

3) Moro K, Ealey KN, Kabata H, Koyasu S. Isolation and analysis of group 2 innate lymphoid cells in mice. Nat Protoc. 2015;10(5):792-806. PubMed PMID: 25927389. doi: 10.1038/nprot.2015.047.

4) Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, et al. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. Nat Immunol. 2016;17(1):76-86. PubMed PMID: 26595888. doi: 10.1038/ni.3309.

5) Moro K, Koyasu S. Innate lymphoid cells, possible interaction with microbiota. Semin Immunopathol. 2015;37(1):27-37. PubMed PMID: 25502370. doi: 10.1007/s00281-014-0470-4.

6) Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. Nat Immunol. 2015;16(3):276-85. PubMed PMID: 25599561. doi: 10.1038/ni.3085.

7) Forrest AR, Kawaji H, Rehli M, Baillie JK, de Hoon MJ, Haberle V, et al. A promoter-level mammalian expression atlas. Nature. 2014;507(7493):462-70. PubMed PMID: 24670764. doi: 10.1038/nature13182.

8) Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA, et al. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. Immunity. 2014;40(5):758-71. PubMed PMID: 24837103. doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.013.

9) Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. Nat Commun. 2013;4:2675. PubMed PMID: 24157859. doi: 10.1038/ncomms3675.

10) Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. Nature. 2010;463(7280):540-4. PubMed PMID: 20023630. doi: 10.1038/nature08636.