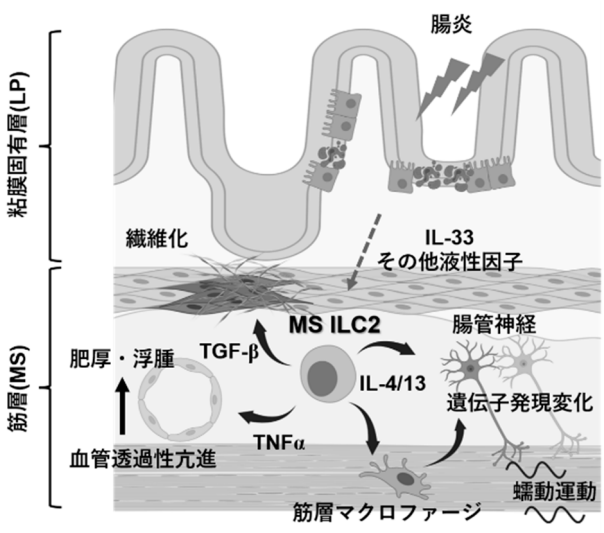
118　新たに見出した腸管筋層2型自然リンパ球の機能解明	古賀　諭

【目的】腸管は上皮、粘膜固有層、粘膜下層、筋層、漿膜といった解剖学的に異なる複数の層から構成され、特に筋層には神経細胞が密集し、蠕動運動、栄養吸収などの生体活動に必須の役割を果たす。2 型自然リンパ球'（Group 2 innate lymphoid cells：ILC2）は、抗原非特異的に 2 型サイトカインを多量に産生し、寄生虫の排除やアレルギー性疾患に重要な役割を果たす自然リンパ球である。腸管における ILC2 に関する研究は、粘膜固有層に注目し行われてきた一方で、筋層内にも ILC2 が存在することは知られていなかった。我々は、腸管筋層に ILC2 が存在し（Muscularis ILC2：MS ILC2）、粘膜固有層 ILC2（Lamina propria ILC2：LP ILC2）とは異なる表現型や性質を持つ集団であることを明らかにした。MS ILC2 は筋層マクロファージや腸管神経細胞と共局在し、腸管神経制御および蠕動運動制御など腸管の機能に重要な役割を果たすことが示唆されている。そこで本研究では、腸管筋層で独自の機能を持つと期待される MS ILC2 の生体内での存在意義を明らかにするため、炎症性腸疾患における MS ILC2 を介した病態形成機構を明らかにする（概略図）。

【方法】MS ILC2 の炎症性腸疾患の病態形成への寄与を明らかにするために、各種マウスを用いて、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性腸炎モデルの解析を行った。DSS 誘発性腸炎誘導後のマウスにおいて、体重減少や大腸の長さといった病態変化を測定した。また、MS ILC2 の機能変化を調べるため、コントロール群および DSS 誘発性腸炎群において、MS ILC2 の IL-5、IL-13 および Amphiregulin（AREG）の発現を比較した。さらに、免疫組織化学染色を用いて免疫細胞および非免疫細胞の局在の変化を観察した。MS ILC2 を介した腸管蠕動運動の制御機構を明らかにするために、2 型寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* を各マウスに感染させ、色素入りの餌の腸内移動時間を計測することで蠕動運動の変化を比較した。

【結果】野生型マウスと比較し、ILC2 を含む全リンパ球が欠損した$\gamma_c^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスおよび、ILC2 活性化因子である IL-33$^{-/-}$マウスにおいて、DSS 誘発性腸炎を誘導後の体重減少が顕著に低下し、水を再飲水させることによる体重の回復が見られず、大腸の長さも有意に短縮した。MS ILC2 由来の IL-5、IL-13 および AREG 発現が DSS 誘発性腸炎誘導後に顕著に増加した。さらに、免疫組織化学染色を用いた解析から腸炎誘導後に IL-33^{+}細胞が粘膜下層および筋層で増加することが明らかになった。*Nippostrongylus brasiliensis* 感染後の蠕動運動の変化を観察したところ、餌の腸内移動時間が遅延することを見出した。さらに、ILC2 関連サイトカインである IL-25、IL-33、TSLP に対する欠損マウスにおいてこの遅延が回復することを見出し、ILC2 を介した蠕動運動障害への寄与が示唆された。

筋層 ILC2 の腸炎における組織特異的機能（仮説）



118. 新たに見出した腸管筋層 2 型自然リンパ球の機能解明

古賀　諭

大阪大学 大学院医学系研究科 感染症・免疫学講座 生体防御学教室

Key words：ILC2，筋層，潰瘍性大腸炎，IL-33，蠕動運動

緒　言

2 型自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cells：ILC2）は、上皮細胞などから産生される IL-33 や IL-25 などに反応し、IL-5、IL-13 といった 2 型サイトカインを多量に産生することで寄生虫排除やアレルギー性疾患などの 2 型関連疾患に重要な役割を果たす。生体における重要性を裏付けるように、ILC2 に関する新知見は 2010 年に発見以降、後を絶たない。特に、これまで獲得免疫細胞が主役であると考えられてきたアレルギーの概念を大きく変え、アレルギー性疾患の予防法、治療法の確立には ILC2 の制御機構の解明が必須であると考えられるようになってきた。ILC2 は肺、皮膚、腸管、脂肪組織など様々な末梢組織に存在することが知られているが、我々はこれまでに ILC2 は胎仔期に前駆細胞が各臓器に移動し、臓器特異的なストローマ細胞の助けを受けて末梢組織内で分化することを明らかにした［1］。そのため ILC2 は組織ごとに独自の表現型を持ち、同一組織内でも局在場所により表現型が異なる［2］。これらの事実は ILC2 が組織内の微小環境ごとに特異的な機能を持つことを示唆する。近年、ILC2 はアレルギー性疾患だけでなく、肺線維症、心筋炎、腸炎など様々な臓器の疾患に関与することから、末梢組織環境ごとの ILC2 の活性化機構や機能を理解し、組織特異的な生理的役割を明らかにすることは、ILC2 関連疾患を理解する上で極めて重要な課題といえる。

腸管において ILC2 は粘膜固有層に局在する（Lamina propria ILC2：LP ILC2）とされており、食物アレルギーなどを視野に入れた研究が進められている。一方で、腸管は上皮、粘膜固有層、粘膜下層、筋層、漿膜といった解剖学的に異なる複数の層で構成されており、特に筋層は神経細胞が密集し、蠕動運動や食物の消化、栄養吸収など生体活動にとって必須の機能を担う重要な組織であるが、ILC2 に関してはこれまで全く議論されてこなかった。我々は、小腸および大腸筋層において ILC2 が存在すること（Muscularis ILC2：MS ILC2）を見出し、MS ILC2 が LP ILC2 とは異なる表現型、遺伝子発現を示すことを明らかにした（論文準備中）。このことは、両者が同一組織内において異なる機能を持つことを示唆しており、これらの違いに着目することで腸管微小環境に適応した ILC2 の機能獲得メカニズムやその違いがもたらす腸管内での MS ILC2 および LP ILC2 それぞれの生理的役割を理解できると考えた。

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は、上皮や粘膜固有層の炎症反応という観点で解析が行われてきた。一方で、炎症時に見られる浮腫・肥厚、線維化は腸管筋層で顕著であり、また、クローン病では炎症反応が筋層で誘導されるにもかかわらず、これらに着目した研究は少ない。さらに、腸炎に伴い腸管神経の機能不全が蠕動運動の障害を引き起こすことで、代謝系と腸内細菌叢を変化させ病態形成を亢進させると考えられており、実際に、クローン病患者では筋層神経の細胞死による蠕動運動の障害が誘導される。このことは、筋層における免疫反応が腸炎の重症化に影響を与えることを示唆し、さらに、潰瘍性大腸炎患者で IL-33 が腸管内で上昇することから、筋層内での MS ILC2 の関与が示唆される。さらに、これまでの解析から MS ILC2 が筋層内のマクロファージと共局在すること、2 型免疫反応を引き起こす寄生虫感染時に筋層マクロファージの増加が誘導されることも見出している。筋層マクロファージは腸管神経細胞の維持、生存に寄与することが知られており［3］、MS ILC2 が筋層マクロファージの活性化を誘導し、間接的に神経細胞へ影響を与え、蠕動運動の制御に役割を果たす可能性が考えられる。

本研究では線維化や神経系との相互作用に重要な役割を持つことが知られている ILC2 の中でも、腸管筋層で独自の機能を持つと考えられる MS ILC2 に着目し、炎症性腸疾患における病態形成への寄与および蠕動運動制御への関与を

明らかにするために、マウス腸炎モデルである DSS 誘発性腸炎モデルを用いて解析を行った。その結果、ILC2 を含む全リンパ球欠損マウスである $\gamma_c^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスおよび、ILC2 活性化因子である IL-33$^{-/-}$マウスにおいて、腸炎病態の悪化が観察され、さらに、MS ILC2 から産生される 2 型サイトカインである IL-5、IL-13 および組織修復に寄与することが知られている AREG 発現が腸炎誘導後に亢進したことから、MS ILC2 の炎症性腸疾患における寄与が示唆された。また、免疫組織化学染色を用いた解析から腸炎誘導後に IL-33^{+}細胞が粘膜下層および筋層で増加することが明らかになった。さらに、2 型寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* 感染後の蠕動運動の障害が起こることを見出し、ILC2 関連サイトカインである IL-25、IL-33、TSLP に対する欠損マウスにおいてこの障害が回復することから、ILC2 を介した蠕動運動障害への寄与が示唆された。

方　法

1. DSS 誘発性腸炎モデルマウスにおける MS ILC2 の役割

ILC2 の炎症性腸疾患への寄与を明らかにするために、野生型マウス、T 細胞および B 細胞を欠損した Rag2$^{-/-}$マウス、ILC2 を含む全リンパ球欠損マウスである $\gamma_c^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスにおいて、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を 7 日間飲水させることで大腸炎を誘導し、各マウスにおける体重変化、大腸の長さの変化といった腸炎の病態変化を比較した。次に、DSS 誘発性腸炎モデルにおいて IL-33 が腸管内で上昇することが知られていることから、大腸における MS ILC2 と LP ILC2 の IL-33 受容体（IL-33R）の発現を比較した。また、IL-33 の炎症性腸疾患における重要性を明らかにするために、野生型マウスおよび IL-33$^{-/-}$マウスにおいて DSS を 5 日間または 7 日間飲水させ、病態変化を比較した。腸炎の炎症急性期だけでなく回復期における IL-33 の寄与も明らかにするため、5 日間 DSS 飲水後のマウスにおいて水をさらに 7 日間再飲水させ、両マウスにおいて腸炎の回復度合いを比較した。続いて、MS ILC2 の腸炎時における機能変化を調べるために、水を飲水させたマウスおよび DSS を 7 日間飲水させたマウスから MS ILC2、LP ILC2 を回収し、IL-5、IL-13、AREG 発現を RT-PCR により測定した。さらに、腸炎誘導時の腸管内における各免疫細胞、非免疫細胞の局在変化を観察するため免疫組織化学染色を用いて、ILC2（GATA3、IL-5）、T 細胞（CD3）、血管内皮細胞（CD31）、腸管神経細胞（TUBBⅢ）などを染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。IL-33 欠損マウスを用いた解析結果から IL-33 の病態形成への寄与が明らかになったため、IL-33-GFP レポーターマウスを用いて IL-33 発現細胞の腸管内における局在変化を観察した。

2. ILC2 を介した腸管蠕動運動の制御

2 型免疫応答が腸管の蠕動運動にどのような影響を与えるかを明らかにするため、2 型免疫応答を引き起こす寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* を野生型マウスに感染させ、感染 5、7、9 日目に色素入りの餌を胃内へ投与し、その後色素入りの糞便が最初に現れるまでの時間を計測することで、餌の腸内移動時間を測定した。また、餌の消化管移動の詳細を明らかにするため、非感染マウスおよび感染マウスにおいて、蛍光色素入りの餌を胃内へ投与し、IVIS イメージングシステムを用いて、120 分後の消化管内を移動した蛍光色素の局在を観察した。

さらに、蠕動運動障害における ILC2 の寄与を明らかにするため、ILC2 の活性化を制御するサイトカインに対する欠損マウスである IL-33R$^{-/-}$マウス、IL-25$^{-/-}$マウス、および IL-33R$^{-/-}$IL-25$^{-/-}$TSLPR$^{-/-}$マウスにおいて、餌の腸内移動時間を比較した。

結果および考察

1. DSS 誘発性腸炎モデルマウスにおける MS ILC2 の役割

DSS を 7 日間各マウスに飲水させ大腸炎を誘導し、体重変化、大腸の長さを比較した。その結果、野生型マウスおよび Rag2$^{-/-}$マウスと比較し、$\gamma_c^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスでは体重が DSS 飲水後初期から顕著に低下し、大腸の長さも退縮した。この結果から、ILC2 の炎症性腸疾患における寄与が示唆された。次に、大腸 MS ILC2 と LP ILC2 のサイ

トカイン受容体発現を比較したところ、MS ILC2 は LP ILC2 とは異なり IL-33R を高発現することが明らかになり、MS ILC2 が炎症性腸疾患において重要な役割を果たす可能性が示唆された。そこで、IL-33 の炎症性腸疾患における重要性を明らかにするため、野生型マウスおよび IL-33$^{-/-}$マウスにおいて DSS を 7 日間飲水させ、病態変化を比較した。IL-33$^{-/-}$マウスでは DSS 飲水 7 日目までに死亡してしまうマウスが見られ、また体重が 20%近く減少するマウス（発見後安楽死させた）も見られた。そこで、DSS の飲水を 5 日間に変更し、病態変化を観察したところ、$\gamma_c^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと同様に、体重が DSS 飲水後顕著に低下し、大腸の長さも有意に退縮した。さらに、腸炎回復期における IL-33 の寄与も明らかにするため、5 日間 DSS 飲水後の両マウスにおいて水を再飲水させた。野生型マウスでは体重減少および大腸退縮の回復が見られた一方で、IL-33$^{-/-}$マウスでは大腸退縮の回復は見られたものの体重の回復度合いが野生型マウスと比較し有意に低下していた。これらの結果から、マウス腸炎モデルにおいて IL-33 が腸炎の重症化に影響を与えることが明らかになり、IL-33 による IL-33R を介した MS ILC2 の活性化誘導が腸炎病態の回復に寄与する可能性が示唆された。続いて、DSS 誘発性大腸炎モデルにおいて MS ILC2 の機能がどのように変化するかを調べるために、水または DSS を 7 日間飲水させた野生型マウスから MS ILC2、LP ILC2 を回収し、各サイトカインの発現を RT-PCR により測定した。その結果、DSS 飲水マウス由来 MS ILC2 の IL-5、IL-13、AREG の発現が亢進しており、特に AREG 発現は LP ILC2 と比較し有意に高かった。AREG は組織修復に重要なサイトカインとして知られており、この結果は、MS ILC2 由来の AREG が腸炎によって誘導される組織破壊を修復することで病態悪化を抑制している可能性を示唆しており、今後、詳細なメカニズムを明らかにしたいと考えている。

最後に、腸炎誘導時の腸管内における各免疫細胞、非免疫細胞の局在変化を観察するため免疫組織化学染色を用いて、共焦点顕微鏡により観察を行った。上記の結果から、IL-33-MS ILC2 の病態形成への寄与が明らかになったため、IL-33-GFP レポーターマウスを用いて IL-33 発現細胞の腸管内における局在変化を観察した。水飲水マウスではほとんど IL-33-GFP$^+$細胞が見られない一方で、DSS 飲水マウスにおいて、粘膜固有層、粘膜下層および筋層で IL-33-GFP$^+$細胞が観察され、特に粘膜下層および筋層に IL-33-GFP$^+$細胞の顕著な増加が見られた。興味深いことに、これらの細胞が各位置によりその形態や方向性が異なり、多様性を持った集団であることが示唆された。LP ILC2 と MS ILC2 のように同一組織内の異なる微小環境下で表現型や遺伝子発現が異なること、またこれまでの報告で、粘膜固有層と筋層に存在するマクロファージはそれぞれ機能が異なることから、IL-33-GFP$^+$細胞も粘膜固有層、粘膜下層、筋層で異なる表現型、機能を有する可能性が考えられ、今後、IL-33-GFP$^+$細胞がどのような細胞であるか、各位置でどのような違いがあるか、腸炎誘発後どのような因子により誘導されるのか、その維持・制御機構の全容を明らかにしていきたい。

2. ILC2 を介した腸管蠕動運動の制御

炎症性腸疾患における ILC2 を介した腸管蠕動運動の役割を明らかにするため、まず、ILC2 を介した 2 型免疫応答が腸管の蠕動運動にどのような影響を与えるかを明らかにする必要があった。そこで、2 型免疫応答を引き起こし ILC2 がその防御機構に重要な役割を担うことが知られている寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* を用いて解析を行った。野生型マウスに *Nippostrongylus brasiliensis* を感染させ、感染 5、7、9 日目に色素入りの餌を胃内へ投与し、その後色素入りの糞便が最初に現れるまでの時間を計測することで、餌の腸内移動時間を測定した。その結果、感染後時間経過とともに餌の腸内移動時間が遅延し、感染 7 日目では有意な遅延が見られた（図 1）。この結果は、寄生虫感染によって引き起こされる 2 型免疫応答が蠕動運動障害を誘導した可能性を示していた。そこで、さらなる詳細な解析を行うために、非感染マウスおよび感染マウスにおいて、蛍光色素入りの餌を胃内へ投与し、IVIS イメージングシステムを用いて消化管内を移動した蛍光色素の局在を観察したところ、胃にとどまっている蛍光色素の量が寄生虫感染マウスにおいて高いことが明らかになった。さらに、寄生虫感染によって誘導される蠕動運動の障害が ILC2 によって制御されているかを明らかにするため、ILC2 の活性化を制御するサイトカインに対する欠損マウスである IL-33R$^{-/-}$マウス、IL-25$^{-/-}$マウス、および IL-33R$^{-/-}$IL-25$^{-/-}$TSLPR$^{-/-}$マウスにおいて、餌の腸内移動時間を比較した。その結果、野生型マウスでは蠕動運動の遅延が見られた一方で、上記マウスにおいて遅延の回復が観察され、ILC2 関連サイトカインが寄生虫感染後の蠕動運動を制御していることが明らかになった（図 2）。今後、ILC2 欠損マウスおよび

MS ILC2 移植実験等を用いて、ILC2 が蠕動運動制御に関与するか、MS ILC2 が重要な役割を果たすかを明らかにし、さらには、炎症性腸疾患においても同様のメカニズムで蠕動運動が制御されているかを解明したいと考えている。これまで、神経細胞由来の神経伝達物質が ILC2 の機能を調節することは知られている一方で、ILC2 を介した神経制御機構は明らかになっていない。腸管神経は蠕動運動だけでなく代謝や腸内細菌層の恒常性維持にも重要であり、その影響は炎症疾患にとどまらない。今回の解析結果により、ILC2 を介した 2 型免疫応答の腸管蠕動運動の寄与が示唆されたことにより、腸炎や他の代謝疾患など ILC2 を起点とした腸管神経制御が予想され、ILC2 分野の新たな研究領域の開拓が可能になると考えられ、免疫系・神経系を介した ILC2 関連疾患病態の真の理解が可能になると期待している。

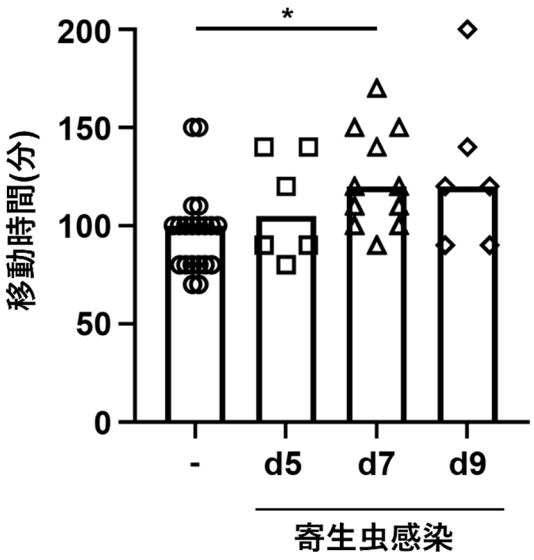


図 1. 2 型免疫応答を介した腸管蠕動運動の制御

Nippostrongylus brasiliensis 感染後 5、7、9 日目において、色素入り餌の腸内移動時間が遅延した（one-way ANOVA、*P＜0.05）。

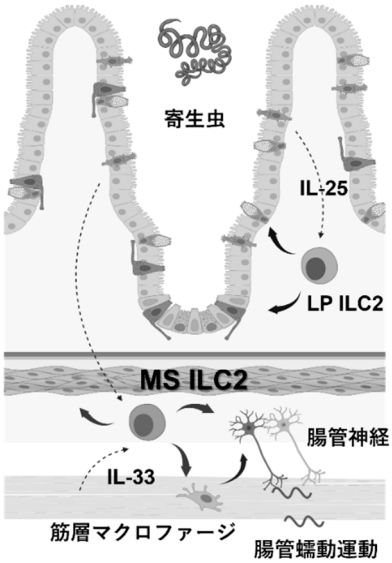


図 2. MS ILC2 による腸管神経制御および蠕動運動への寄与

本研究の解析結果から、IL-25、IL-33、TSLP といった ILC2 関連サイトカインを介した ILC2 の腸管神経制御が示唆され、IL-33 によって誘導される MS ILC2 活性化が蠕動運動の調節に寄与する可能性が考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学大学院医学系研究科生体防御学研究室のサポートを受け行わせていただいた研究である。

文　献

1） Koga S, Hozumi K, Hirano KI, Yazawa M, Terooatea T, Minoda A, Nagasawa T, Koyasu S, Moro K. Peripheral PDGFRα^{+}gp38^{+} mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. J Exp Med. 2018 Jun 4;215(6):1609-1626. Epub 2018 May 4. PMID: 29728440 DOI: 10.1084/jem.20172310.

2） Roberto R Ricardo-Gonzalez, Steven J Van Dyken, Christoph Schneider, Jinwoo Lee, Jesse C Nussbaum, Hong-Erh Liang, Dedeepya Vaka, Walter L Eckalbar, Ari B Molofsky, David J Erle, Richard M Locksley. Tissue signals imprint ILC2 identity with anticipatory function. Nat Immunol. 20218. Oct 19(10):1093-1099. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30201992. DOI: 10.1038/s41590-018-0201-4.

3） Ahrends T, Aydin B, Matheis F, Classon CH, Marchildon F, Furtado GC, Lira SA, Mucida D. Enteric pathogens induce tissue tolerance and prevent neuronal loss from subsequent infection. Cell. 2021 Nov 11;184(23):5715-5727.e12. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34717799. DOI: 10.1016/j.cell.2021.10.004.