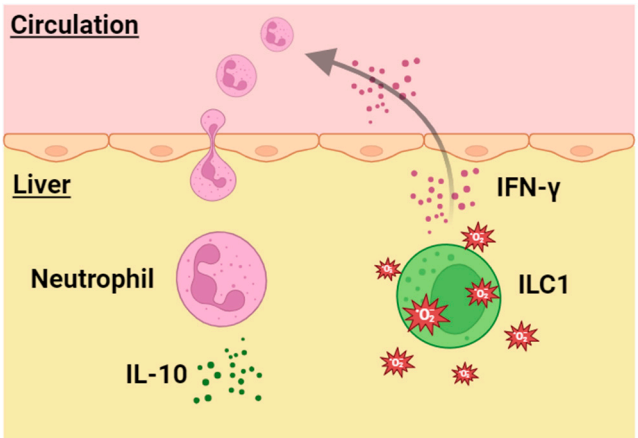
136　グルタミン酸受容体を介したILC1の酸素ストレス応答	松田　研史郎

【目的】1 型自然リンパ球（ILC1）は肝臓に豊富に存在し、インターフェロン-γ（IFN-γ）産生能を有し、組織修復・保護に働く。近年、ILC1 が酸素ストレス応答を介して IFN-γ を産生することが示唆されている。これらのことから、ILC1 は酸素ストレス応答を有し、IFN-γ を産生することで肝保護に働くと推論される。そこで、ILC1 で高発現するグルタミン酸受容体に着目し、免疫細胞遺伝子発現データベース ImmGen にて発現解析を実施したところ、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR4 をエンコードする *Grm4* が高発現することを見出した。しかし、詳細な分子制御機構と ILC1 の虚血性障害における役割は明らかとなっていない。そこで本研究では、肝虚血再灌流障害（IRI）モデルマウスを用いて ILC1 の酸素ストレス応答と病態増悪機構を解明した。

【方法】1. 肝 IRI 後の血中グルタミン酸濃度及び ILC1 の mGluR4、IFN-γ 発現解析：ナイーブ肝、虚血中及び肝 IRI 1 時間後のマウスから血漿を採取し、血中グルタミン酸濃度を解析する。また、ナイーブ肝 ILC1、虚血中及び肝 IRI 1 時間後の肝 ILC1 の細胞数、mGluR4 及び IFN-γ の発現を FACS 及び qPCR で解析した。2. mGluR4 の二量体形成の解析：代謝型グルタミン酸受容体の大部分は、二量体を形成することで下流のシグナルが活性化される。そこで、ナイーブ肝 ILC1、虚血終了直後及び肝 IRI 1 時間後の ILC1 を純化し、二量体形成をウェスタンブロット法により解析した。3. IFN-γ 依存的炎症性細胞動員数及び肝障害の評価：野生型及び *Ifng*$^{-/-}$マウスに肝 IRI を惹起し、5 時間後の肝臓における好中球、炎症性単球、クッパー細胞、樹状細胞数を評価した。また、血中 ALT、肝壊死領域を評価した。4. IFN-γ 依存的肝保護因子の同定：抗炎症性サイトカインに着目し、肝 IRI 5 時間後の好中球、炎症性単球、クッパー細胞、樹状細胞の IL-10 の発現を qPCR で解析した。5. IFN-γ を介した IL-10 依存的肝障害の評価：野生型及び *Ifng*$^{-/-}$マウスに肝 IRI を惹起し、虚血終了直後に IL-10 中和抗体を投与する。肝 IRI 6 時間後の血中 ALT 及び肝壊死領域を評価した。

【結果】肝 IRI 後の血中グルタミン酸濃度及び ILC1 の mGluR4、IFN-γ 発現解析：ナイーブ肝と比較して、虚血終了直後のグルタミン酸濃度に変化はなかったが、肝 IRI 1 時間後のグルタミン酸濃度は有意に増加した。虚血直後、肝 IRI 1 時間後に mGluR4 陽性 ILC1 は確認されたが、陽性細胞数の割合に変化はなかった。一方、肝 IRI 1 時間後の肝 ILC1 の *Ifng* mRNA 発現量は有意に増加した。肝 IRI 5 時間後の炎症性細胞数を比較したところ、IFN-γ 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して好中球及び炎症性単球の細胞数が有意に減少した。また、肝 IRI 5 時間後の炎症性細胞における *Il10* mRNA 発現量を解析したところ、好中球で *Il10* 発現量が有意に増加した。最後に野生型及び IFN-γ 欠損マウスに肝 IRI を惹起し、虚血終了直後に IL-10 中和抗体を投与し肝障害を評価したところ、野生型マウスではコントロール抗体を投与したマウスと比較して、肝障害が増悪した。一方 IFN-γ 欠損マウスでは肝障害に差異はなかった。

肝 IRI における酸素ストレス応答を介した ILC1 の肝保護機構



136. グルタミン酸受容体を介したILC1の酸素ストレス応答

松田　研史郎

*筑波大学 生存ダイナミクス研究センター

Key words：1型自然リンパ球，IFN-γ，好中球，IL-10

緒　言

自然リンパ球（ILC）は組織常在性のリンパ球であり、障害の際に即急に応答し、特定のサイトカインを産生することで常在組織の炎症の惹起や組織修復に寄与する［1，5］。これまで3つのサブセットが同定されており、中でも、1型自然リンパ球（ILC1）は T-bet 依存的に分化する。肝臓に豊富に存在し、インターフェロン-γ（IFN-γ）産生能を有し、組織修復・保護に働く［1］。近年、ヒトILC1に対して、活性酸素種の一種であるH_2O_2を添加することにより、IFN-γ産生が惹起されることが明らかとなった［2］。さらに、低酸素誘導性因子 HIF-1α存在下で、IFN-γを産生する ILC1 の割合が増加することが報告された［3］。これらのことから、ILC1 は酸素ストレス応答を有し、IFN-γを産生することで常在組織を保護すると推論される。しかし、虚血性障害に対するILC1の役割は明らかでない。そこで、ILC1 で高発現するグルタミン酸受容体に着目し、免疫細胞遺伝子発現データベース ImmGen にて発現解析を実施したところ、ILC1 で代謝型グルタミン酸受容体 mGluR4 をエンコードする *Grm4* が高発現することを見出した。このことから、ILC1 は酸素ストレスによって活性化し、肝 IRI に対して即効性の高い、より恒常的な制御機能を有し、虚血性肝障害の収束を迅速にもたらすためにIFN-γを産生すると推測される。そこで本研究では、ILC1の酸素ストレス応答と肝IRIにおける役割を明らかにした。

方　法

1. 肝IRI後の血中グルタミン酸濃度及びILC1のmGluR4、IFN-γ発現解析

ナイーブ肝、虚血中及び肝IRI 1時間後のマウスから血漿を採取し、血中グルタミン酸濃度を解析する。また、ナイーブ肝ILC1、虚血中及び肝IRI 1時間後の肝ILC1の細胞数、mGluR4及びIFN-γの発現をFACS及びqPCRで解析した。

2. mGluR4の二量体形成の解析

代謝型グルタミン酸受容体の大部分は、二量体を形成することで下流のシグナルが活性化される［4］。そこで、ナイーブ肝ILC1、虚血終了直後及び肝IRI 1時間後のILC1を純化し、二量体形成をウェスタンブロット法により解析した。

3. IFN-γ依存的炎症性細胞動員数及び肝障害の評価

野生型及び *Ifng*$^{-/-}$マウスに肝IRI を惹起し、5時間後の肝臓における好中球、炎症性単球、クッパー細胞、樹状細胞数を評価した。また、血中ALT、肝壊死領域を評価した。

4. IFN-γ依存的肝保護因子の同定

抗炎症性サイトカインに着目し、肝IRI 5時間後の好中球、炎症性単球、クッパー細胞、樹状細胞のIL-10の発現をqPCRで解析した。

*現在の所属：筑波大学 医学医療系

5. IFN-γを介したIL-10依存的肝障害の評価

野生型及び *Ifng*$^{-/-}$マウスに肝IRI を惹起し、虚血終了直後にIL-10 中和抗体を投与する。肝IRI 6 時間後の血中ALT 及び肝壊死領域を評価した。

結果および考察

1. 肝IRI 後の血中グルタミン酸濃度及びILC1 のmGluR4、IFN-γ発現解析

肝IRI をマウスに誘導し、未処置、虚血終了直後、肝IRI 1 時間後の血液を採取後、3,000 rpm で15 分間、4℃で遠心し、血漿を採取した。血漿中のグルタミン酸濃度を Glutamate Assay Kit-WST（同仁化学研究所）によって、比色定量法で解析したところ、虚血直後は、未処置群と比較して有意な差が認められなかったが、肝IRI 1 時間後に著明に増加した（図1）。

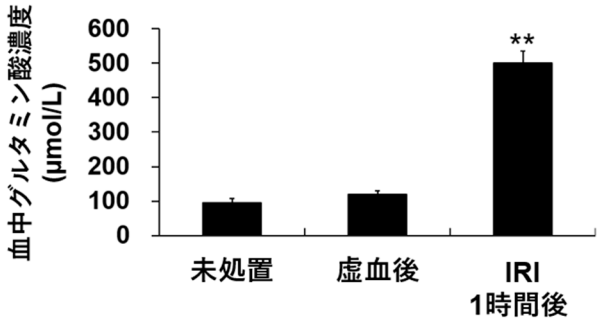


図1. 肝虚血及び肝IRI 後の血漿中のグルタミン酸濃度

マウス肝に対して虚血再灌流障害（IRI）を誘導し、虚血直後、再灌流1 時間後の血漿中のグルタミン酸濃度を解析した。**P<0.01（Tukey's HSD test）。

次にNIH のGene Expression Omnibus に保存されているデータから、「肝NK 細胞と比較して肝ILC1 で高発現しているグルタミン酸受容体」に着目し、その遺伝子解析を実施したところ、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR4 をエンコードする *Grm4* の遺伝子発現が肝 ILC1 で高いことが分かった（図 2a）。そこで、未処置、虚血直後、肝 IRI 1 時間後の肝ILC1 及び肝NK 細胞のmGluR4 の細胞膜上の発現をFACS 解析したところ、mGluR4 陽性ILC1 の割合がNK 細胞と比較して高いことが分かった。また、未処置群と比較して、虚血直後、肝IRI 1 時間後のmGluR4 の発現割合が肝ILC1 で上昇することが分かった。一方、肝NK 細胞では、未処置群と比較してmGluR4 の発現割合に変化は認められなかった（図2b）。

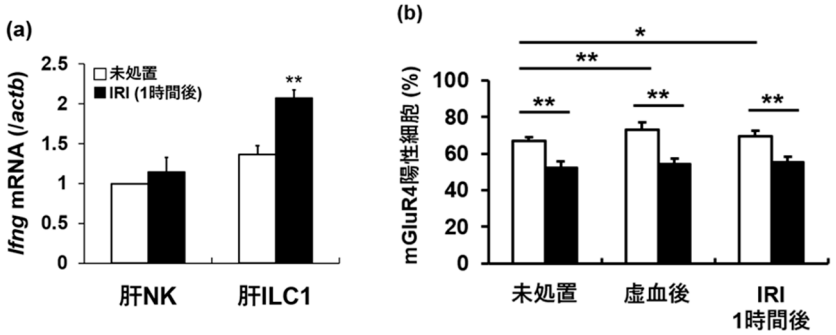


図2. 肝IRI 後のNK 細胞及びILC1 の *Ifng* 及びmGluR4 発現

a） 未処置及び肝IRI 後のNK 細胞及びILC1 の *Ifng* mRNA 発現。

b） 未処置、虚血直後及び肝IRI 後のNK 細胞及びILC1 のmGluR4 発現。

*P< 0.05, **P<0.01（Tukey's HSD test）。

2. mGluR4 の二量体形成の解析

代謝型グルタミン酸受容体 mGluR4 は、二量体を形成することで活性化シグナルを伝達する［5, 6］。そこで、未処置及び肝虚血直後の肝リンパ球を Sorting し、ウェスタンブロット法にて mGluR4 の二量体発現を解析した。この時、十分なタンパク溶解液を調製するために複数匹のマウスの各肝リンパ球のサンプルをプールした。また、mGluR4 が大脳皮質神経細胞に高発現することから、マウス大脳皮質由来神経細胞を培養し、mGluR4 選択的作動体 PHCCC を添加することで mGluR4 の二量体形成を誘導し、陽性対照として用いた。未処置群の各肝リンパ球において、mGluR4 二量体が発現していたが、発現量は $CD4^+$T 細胞及び ILC1 で高いことが分かった。肝虚血後、ILC1 で二量体形成が促進されたが、NKT 細胞や NK 細胞でも二量体形成が促進された（図 3）。このことから、mGluR4 の二量体形成による活性化機序は ILC1 特異的ではないことが示唆された。そこで、ILC1 由来の IFN-γが肝 IRI を軽快する機序に焦点を当て、以降の解析を実施した。

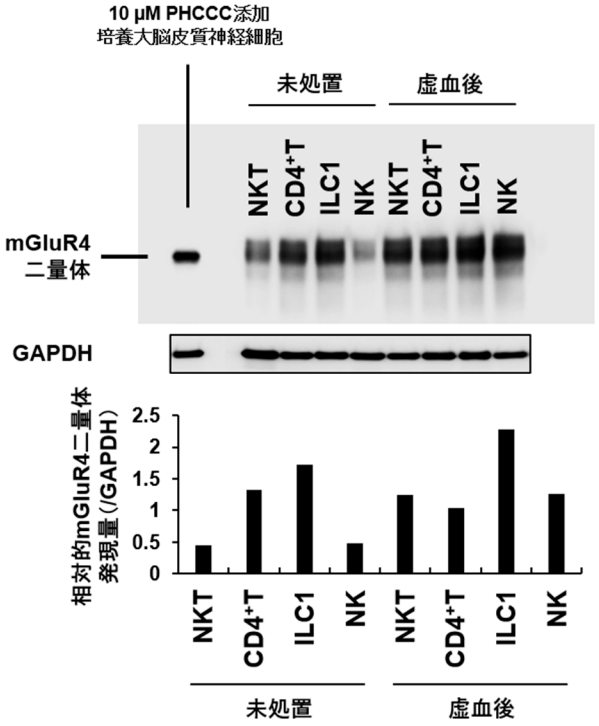


図 3. 未処置及び虚血直後の各肝リンパ球における mGluR4 二量体発現
培養大脳皮質神経細胞に 10μM mGluR4 選択的作動体 PHCCC を添加し、
二量体形成を誘導したサンプルを陽性対照とした。NKT：NKT 細胞、
$CD4^+$T：CD4 陽性 T 細胞、NK：NK 細胞。

3. IFN-γ依存的炎症性細胞動員数及び肝障害の評価

IFN-γが肝 IRI に対して組織保護に働くことから、野生型及び IFN-γ欠損マウスに対して肝 IRI を誘導し、5 時間後の肝ミエロイド細胞の数を解析したところ、炎症性単球（iMo）及び好中球の数が野生型マウスと比較して IFN-γ欠損マウスで有意に減少することが分かった。一方、クッパー細胞及び樹状細胞（cDC）の数に有意な差は認められなかった（図 4）。このことから、IFN-γは炎症性単球及び好中球の炎症部位への浸潤に寄与していることが判明した。

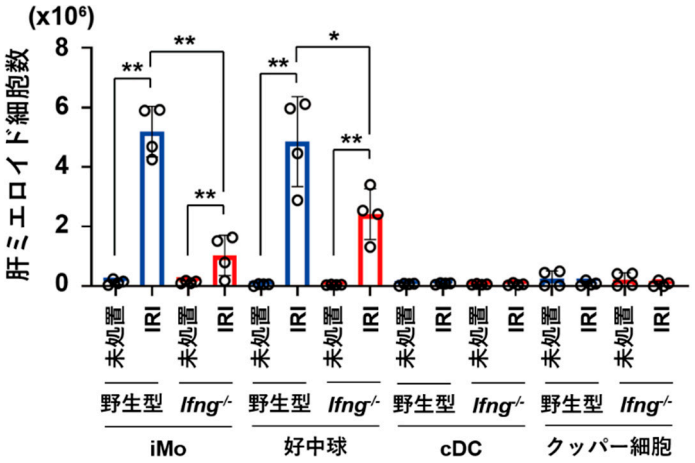


図 4. 野生型及び IFN-γ 欠損マウスにおける未処置及び肝 IRI 5 時間後の肝ミエロイド細胞数
Ifng$^{-/-}$：IFN-γ 欠損マウス、iMo：炎症性単球、cDC：樹状細胞。
*P<0.05、**P<0.01（Tukey's HSD test）。

4. IFN-γ 依存的肝保護因子の同定

IFN-γ 欠損マウスでは、肝における炎症性単球及び好中球数は、野生型マウスと比較して有意に減少した。このことから、炎症性細胞または好中球由来の抗炎症性サイトカインに着目し、肝ミエロイド細胞における *Il10* 発現量を qPCR 法で解析したところ、野生型マウスにおいて好中球の *Il10* 発現量が未処置群と比較して有意に上昇することが分かった。一方、IFN-γ 欠損マウスでは IRI 後も *Il10* 発現量に差は認められなかった。他のミエロイド細胞では、野生型、IFN-γ 欠損マウスの両方において、未処置群と比較して *Il10* 発現量に有意な差は認められなかった。以上により、IFN-γ 依存的に遊走された好中球が、IL-10 産生細胞であることが明らかとなった（図 5）。

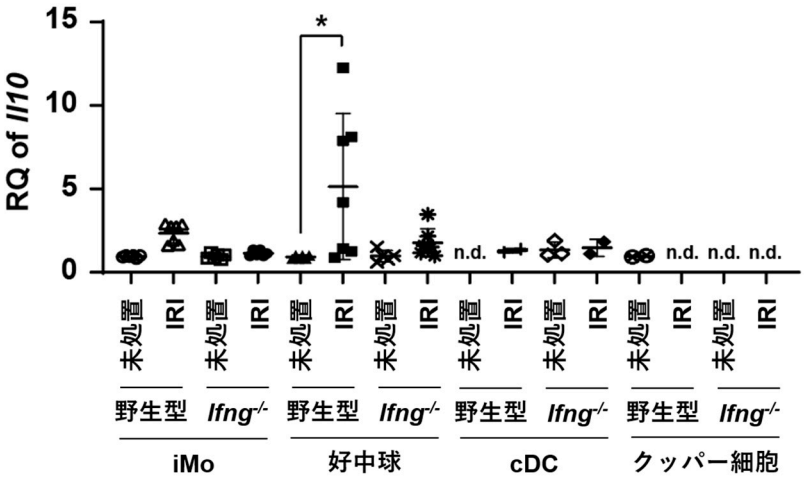


図 5. 野生型及び IFN-γ 欠損マウスにおける未処置及び肝 IRI 5 時間後の肝ミエロイド細胞の *Il10* 発現量
Ifng$^{-/-}$：IFN-γ 欠損マウス、iMo：炎症性単球、cDC：樹状細胞。*P<0.05（Tukey's HSD test）。n.d.：not detected。

5. IFN-γ を介した IL-10 依存的肝障害の評価

図 5 の結果から、IFN-γ 依存的な好中球由来の IL-10 が肝 IRI に対して組織保護に働くことが示唆された。そこで、野生型及び IFN-γ 欠損マウスに対して、虚血終了直後に IL-10 中和抗体、またはアイソタイプコントロール抗体を腹腔投与し、肝 IRI 6 時間後の肝障害を血中 ALT 濃度、肝壊死領域、肝出血領域を定量することで解析した。その結果、野生型マウスでは、IL-10 中和抗体投与群において血中 ALT 濃度が上昇した（図 6a）。さらに、肝壊死領域およ

び肝出血領域が拡大した（図 6b、c）。一方、IFN-γ欠損マウスでは、未処置群と比較して血中 ALT 濃度、肝壊死、肝出血は増加したものの、アイソタイプコントロール抗体投与群と IL-10 中和抗体投与群の間で有意な差は認められなかった（図 6a～c）。これらのことから、IL-10 産生型好中球は IFN-γ依存的に遊走され炎症組織部位で IL-10 を産生することで肝保護に働くことが明らかとなった。以上の結果から、ILC1 が産生する IFN-γは炎症性単球や好中球の遊走を制御しており、中でも IL-10 産生型好中球が炎症部位へ浸潤後、肝 IRI に対して組織保護に働くことが明らかとなった。しかしながら、ILC1 で mGluR4 の二量体形成が肝 IRI 後に誘導されることが分かったが、それは必ずしも ILC1 特異的ではなく、NKT 細胞や $CD4^+$T 細胞でも認められた。従って、グルタミン酸が ILC1 を活性化させる可能性は示されたが、特異的な活性化機序であるかどうかは今後の研究に期待する。

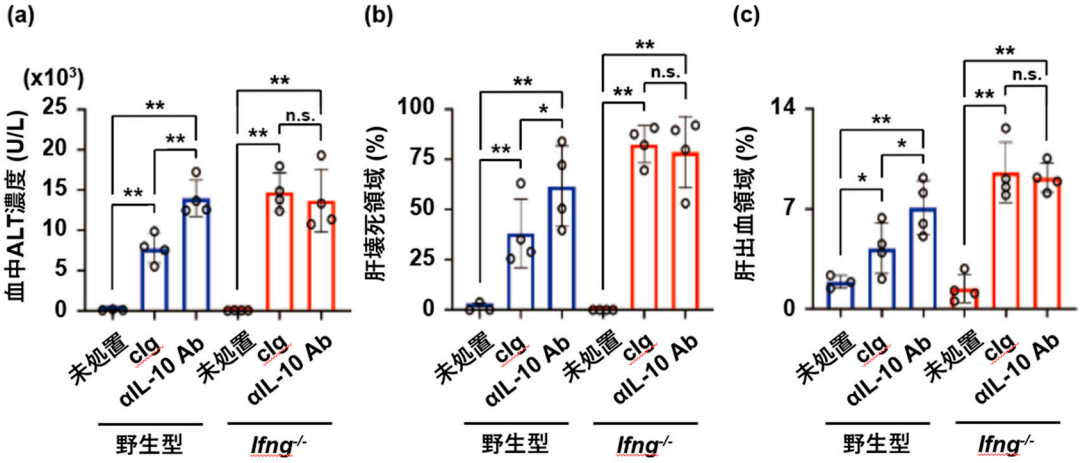


図 6. 肝 IRI モデルにおける虚血直後の IL-10 中和抗体（αIL-10 Ab）投与による肝障害

a）野生型及び IFN-γ欠損マウスを用いた肝 IRI モデルにおけるアイソタイプコントロール抗体（cIg）、またはαIL-10 Ab 投与による血中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）濃度の変化。

b）野生型及び IFN-γ欠損マウスを用いた肝 IRI モデルにおける cIg、またはαIL-10 Ab 投与による肝壊死領域の割合。

c）野生型及び IFN-γ欠損マウスを用いた肝 IRI モデルにおける cIg、またはαIL-10 Ab 投与による肝出血領域の割合。

Ifng$^{-/-}$：IFN-γ欠損マウス。*P<0.05、**P<0.01（Tukey's HSD test）。n.s.：not significant。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、設備・機器使用を快く快諾して下さった筑波大学医学医療系免疫学研究室の澁谷彰教授、澁谷和子教授に謝辞を申し上げる。

文　献

1） Colona M. Innate lymphoid cells: Diversity, Plasticity, and unique functions in immunity. Immunity. 2018 Jun 19;48:1104-1117. PMID: 29924976 DOI: 10.1016/j.immuni.2018.05.013.

2） Tulic MK, Cavazza E, Cheli Y, Jacquel A, Luci C, et al. Innate lymphocyte-induced CXCR3B-mediated melanocyte apoptosis is a potential initiator of T-cell autoreactivity in vitiligo. Nat. Commun. 2019 May 16;10:2178. PMID: 31097717 DOI: 10.1038/s41467-019-09963-8.

3) Krzywinska E, Sobecki M, Nagarajan S, Zacharjasz J, Tambuwala MM, et al. The transcription factor HIF-1 α mediates plasticity of NKp46+ innate lymphoid cells in the gut. J. Exp. Med. 2022 Feb 7;219:e20210909. PMID: 35024767 DOI: 10.1084/jem.20210909.
4) Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Santo JPD, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on. Cell. 2018 Aug 23;174:1054-1066. PMID: 30142344 DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.017.
5) McCullock TW, Kammermeier PJ. The evidence for and consequences of metabotropic glutamate receptor heterodimerization. Neuropharmacology. 2021 Nov 1;199:108801. PMID: 34547332 DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108801.
6) Lee J, Munguba H, Gutzeit VA, Singh DR, Kristt M, et al. Difining the homo- and heterodimerization propensities of metabotropic glutamate receptors. Cell Rep. 2020 May 5;31:107605. PMID: 32375054 DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107605.