ニッポンハム食の未来財団　2019 年度個人研究助成　研究完了報告書

研究課題名	3 型自然リンパ球を利用した新規食物アレルギー予防法の開発
フリガナ	サワ　シンイチロウ
代表者名	澤　新一郎
所属機関　（機関名） （役職名）	九州大学生体防御医学研究所 教授
本助成金による 発表論文，学会発表	

研究結果要約

腸管制御性 T 細胞（Treg）の維持は腸管免疫寛容の成立と食物アレルギーの予防に極めて重要であるが、腸管 Treg の分化、維持を担う分子基盤は完全には解明されていない。近年、腸管内に同定された 3 型自然リンパ球（ILC3）による腸管免疫恒常性維持機構が注目されている。Csf2 遺伝子にコードされたサイトカイン、GM-CSF は腸管において ILC3 や Th17 細胞から分泌され、骨髄球系細胞の分化を介して腸管 Treg の維持に重要な役割を果たすことが報告されている。

本研究では、ILC3 が産生する GM-CSF の役割を解明するために、① ILC3 特異的な GM-CSF 欠損マウスの作成を試み、②腸管免疫寛容の成立に果たす ILC3 由来 GM-CSF の役割を検討し、③食物アレルギーの予防への GM-CSF の利用可能性を計画した。

これらの研究目標を達成するため、まずゲノム編集により作成した $Csf2^{flox}$ マウスおよび $KLRp1b^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ ノックインマウスを用いて ILC3 特異的に GM-CSF 発現を欠損する KLRp1b-ΔCsf2 マウスを作成した。若齢の KLRp1b-ΔCsf2 マウスは対象群同様の体重増加が観察されたが、

20 週齢以上の加齢マウスにおいては対象群の 25%に相当する体重減少が観察された。一方、8 週齢の KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおいて、Th17 細胞の減少が観察され始め、20 週齢においてより顕著な減少を認めた。一方、予想に反し、大腸、小腸ともに KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおける Treg 数の低下は観察されなかった。

現在、GM-CSF 欠損による Th17 細胞の低下が腸管バリア機能を低下させ、腸管 Dysbiosis を引き起こすのではないかとの仮説を立て、加齢 KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおける体重減少の原因解明を骨髄球系細胞分化と腸管細菌叢の変容という観点から引き続き解析を行っている。

研究目的

食物アレルギーの予防は人命救助と生活の質向上に直結する医学上の重要な命題である。食物アレルギーを予防するためには食物抗原に対する感作を防ぐ必要があるが、実生活において抗原の侵入を完全に遮断することは不可能である。また、生体が特定の抗原に対する特異的 IgE を誘導する機序は明らかになっていない。そのため、食物抗原に暴露される環境であっても何らかの方法で抗原特異的 IgE 産生を抑制することができれば食物アレルギーの予防に繋がると考えられる。

マウスを用いた動物実験では卵白アルブミン（OVA）に対する特異的 IgE 産生が制御性 T 細胞（Treg）により抑制されることが証明されている。しかし、腸管の Treg がどのような機構で誘導され、食物アレルギーの予防に作用するか殆ど明らかになっていない。

近年、サイトカインの一種である colony stimulating factor 2(CSF2,別名 GM-CSF)欠損マウスでは腸管 Treg 数が激減することや経口摂取した OVA に対する腸管アレルギー反応が増悪することが他の研究グループから報告されている[1]。一方、申請者らは GM-CSF レポーターマウスを作成し、腸管における主要な GM-CSF 産生細胞が３型自然リンパ球（ILC3）[2]であるとの予備的データを得ていた。ILC3 は申請者らが 2010 年に発見した抗原受容体を有さないリンパ球群であり、転写因子 RORgt 依存的に分化成熟することが知られている。

本研究では、**ILC3 から産生される GM-CSF が腸管 Treg 誘導に必須のサイトカインであるかを検証する。さらに、ILC3 由来の GM-CSF が食物アレルギーを抑制するか？という命題を解決**する。

本研究により、GM-CSF の cryptopatch への送達や、ILC3 機能の増強を実現することで、腸管 Treg 数を増加させ、食物アレルギーを未然に予防する新規治療戦略が開拓可能になる。

研究計画及び研究手法

本研究では、上記研究目的を達成するため、第一の目標として ILC3 特異的な GM-CSF 欠損が腸管骨髄球系細胞の分化ら腸管 Treg の分化に影響を与えるか否かを検討することにした。さらに、樹立した ILC3 特異的な GM-CSF 欠損マウスを用い、腸管免疫寛容の成立に果たす ILC3 由来の GM-CSF の役割について検討することにした。

① $Csf2^{flox/+}$マウスの作成

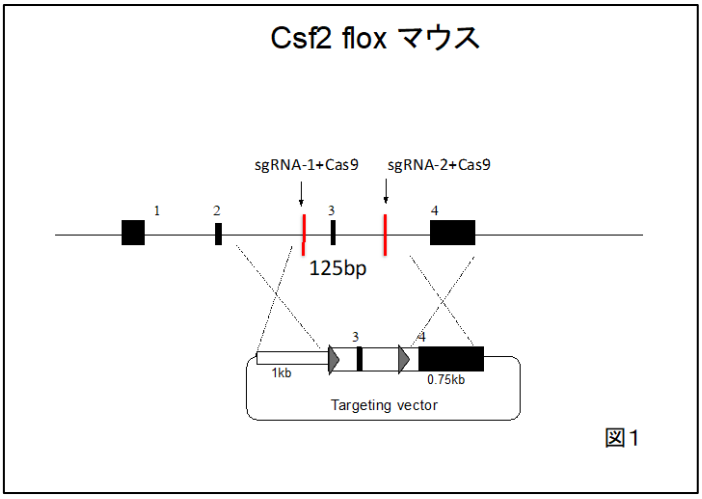

図1

マウスの GM-CSF は 11 番染色体に存在する Csf2 遺伝子によりコードされる 142 アミノ酸からなる分泌型タンパクである。Csf2 遺伝子はシグナルペプチドのコード領域を含む exon1 をはじめ、合計 4 つの exon と 3 つの intron から構成されている。本研究では CRISPR/Cas ゲノム編集技術を用い、Csf2 遺伝子の intron 2 および intron 3 内に loxP 配列をノックインした $Csf2^{flox}$ マウスの作出を試みた。まず、Csf2 遺伝子の exon3 の 5'側、 3 '側に loxP 配列をノックインした塩基配列（KI fragment）を PCR によりクローニングした。次に、KI fragment の 5 '側 1 kb、3'側 1 kb を繋げたターゲッティングベクターを構築した（図 1 ）。

さらに、intron 2 内の塩基配列（CCAAGTGTCCATAGAATACAAGC）を対象とした Crispr RNA(gRNA1)および intron 3 内の塩基配列（GTCCAGGTAAGTGGGCCACGTGG）を対象とした gRNA2 を各々TracrRNA とアニーリングさせたのち、作成した上記ターゲッティングベクター、Cas9 タンパクとともにマウス受精卵前核にインジェクション後、偽妊娠状態の ICR 雌マウスの子

宮内に移植した。

② ILC3 特異的な GM-CSF 欠損マウスの作出

ILC3 は IL-17 を産生するヘルパーT 細胞（Th17 細胞）と同じく転写因子 RORgt 依存的に分化することが知られている。その結果、ILC3 の機能を特徴付ける遺伝子の多くは Th17 細胞と発現が重複しており、ILC3 特異的に発現するマーカー遺伝子は報告されていなかった。これまでの研究において、研究代表者が ILC3 と Th17 細胞に各々発現する遺伝子を DNA マイクロアレイで網羅的に検索したところ、NK 受容体の一種、KLRp1b が ILC3 に強発現しており、Th17 細胞において発現がほとんど見られないことを明らかにしている。さらに、KLRp1b のプロモーターの下流で DNA リコンビナーゼ Cre および蛍光タンパク EBFP2 を発現する KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスの樹立に成功している。本研究では、まず、作成した KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスにおける EBFP2 の発現細胞をフローサイトメーターを用いて解析し、生体内における KLRp1b の発現パターンを解析する。次に、KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスを Rosa26-tdTomato レポーターマウスラインと交配し、KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$;Rosa26-tdTomato マウス（KLRCre-fate map マウス）を作成することで発生および加齢過程における KLRp1b の発現履歴を解明する。最後に、KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$マウスと Csf2$^{flox/+}$マウスを交配し、KLRp1b 発現細胞のみに Csf2 遺伝子を欠損する KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$;Csf2$^{flox/flox}$ マウス（KLRp1b-ΔCsf2 マウス）を作成する。

③ KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおける免疫細胞の解析

(i)8 週齢マウスにおける KLRp1b 発現細胞由来 GM-CSF の意義の検討

上記①および②から、８週齢の KLRp1b-ΔCsf2 マウスは ILC3、NK 細胞、gd17 細胞における GM-CSF の機能を評価するうえで有用なマウスと考えられた。小腸および大腸の粘膜固有層において、ILC3 は非 T, 非 B 細胞のうち 80％を占める最大の細胞分画であることから、腸管粘膜固有層における主要な KLRp1b 発現細胞は ILC3 と考えられる。そのため、KLRp1b-ΔCsf2 マウスの腸管において観察される様々な表現型は ILC3 由来 GM-CSF の欠損に起因すると想定され

る。そこで、本研究では、小腸および大腸における免疫細胞の変容や病理学的変化を細胞生物学的および組織学的に検討した。

(ii)20 週齢以上の加齢マウスにおける KLRp1b 発現細胞由来 GM-CSF の意義の検討

KLRp1b-Δ Csf2 マウスおよび対象群マウス（$KLRp1b^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$;$Csf2^{flox/+}$マウス）を 4 ヶ月以上飼育し、両群間で体重増加や生存率に差が生じるか検討した。

結果と考察

① $Csf2^{flox/+}$マウスの作成

結果：上記方法により生まれた産仔 28 匹のうち、1 匹のマウスにおいて Csf2 遺伝子の intron2 および intron3 内に loxP 配列がノックインされていることが確認できた。これらのノックイン配列は野生型 C57/BL6J マウスとの交配によって生まれた次世代マウスにも確認できたため、loxP を含むアリルは生殖細胞においてもノックインされていると考えられる（図 2)。以上から、Csf2 遺伝子の exon3 の 5'側および 3 '側の 2 箇所に loxP 配列をノックインした $Csf2^{flox/+}$マウスの樹立に成功したと結論づけた。

図2

② ILC3 特異的な GM-CSF 欠損マウスの作出

結果： 8 週齢の $KLRp1b^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスの腸管（大腸、小腸およびパイエル板)、肺、肝臓、リンパ節、脾臓からリンパ球を採取し、KLRp1b の発現細胞を調べたところ、いずれの臓器に存在する ILC3 においても KLRb1b の発現が EBFP2 蛍光タンパクとして検出され

たが、Th17 細胞においては EBFP2 発現が見られなかった。また、GM-CSF の産生細胞として知られる GATA3^{high}ST2 陽性の ILC2 においては EBFP2 発現が見られなかった。一方、自然免疫系の T 細胞として知られる gdT 細胞のうち、RORgt を発現するサブセット（gd17）および NK 細胞に EBFP2 発現が観察された。以上から、KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスは ILC3 と Th17 細胞、ILC2 の機能切り分けには有用であるが、本マウスを使用する際は gd17 細胞および NK 細胞の機能も考慮する必要があると考えられる。

KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスを Rosa26-tdTomato レポーターマウスラインと交配し、作成した 20 週齢以上の KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$;Rosa26-tdTomato マウス（KLRCre-fate map マウス）において、腸管 Th17 細胞の 2-5%に KLRp1 発現履歴を示唆する tdTomato のシグナルが検出された。このことから、KLRp1b は若年マウスにおける ILC3 と Th17 細胞の識別に有用であるが、加齢および（おそらく）炎症条件下においては Th17 細胞においても発現しうるため、KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスを用いた ILC3 と Th17 細胞の識別には留意する必要があると考えられた。

③ KLRp1b-ΔCsf2 マウスにおける免疫細胞の解析

(i)若齢マウスにおける KLRp1b 発現細胞由来 GM-CSF の意義の検討

8 週齢の KLRp1b-ΔCsf2 マウスは体重減少や下血、下痢症状などの腸炎症状がみられなかった。また、大腸、小腸とも全腸管に肉眼的な出血や組織浮腫は観察されなかった。フローサイトメーターを用い、粘膜固有層の免疫細胞を解析したところ、全細胞数に著明な差は見られなかった。大腸、小腸とも CD4 陽性ヘルパーT 細胞数が減少しており、そのうち RORgt 陽性 FoxP3 陰性の Th17 細胞が著明に減少していた。予想に反し、Foxp3 を発現する Treg の減少は小腸、大腸とも確認できなかった。（図 3）

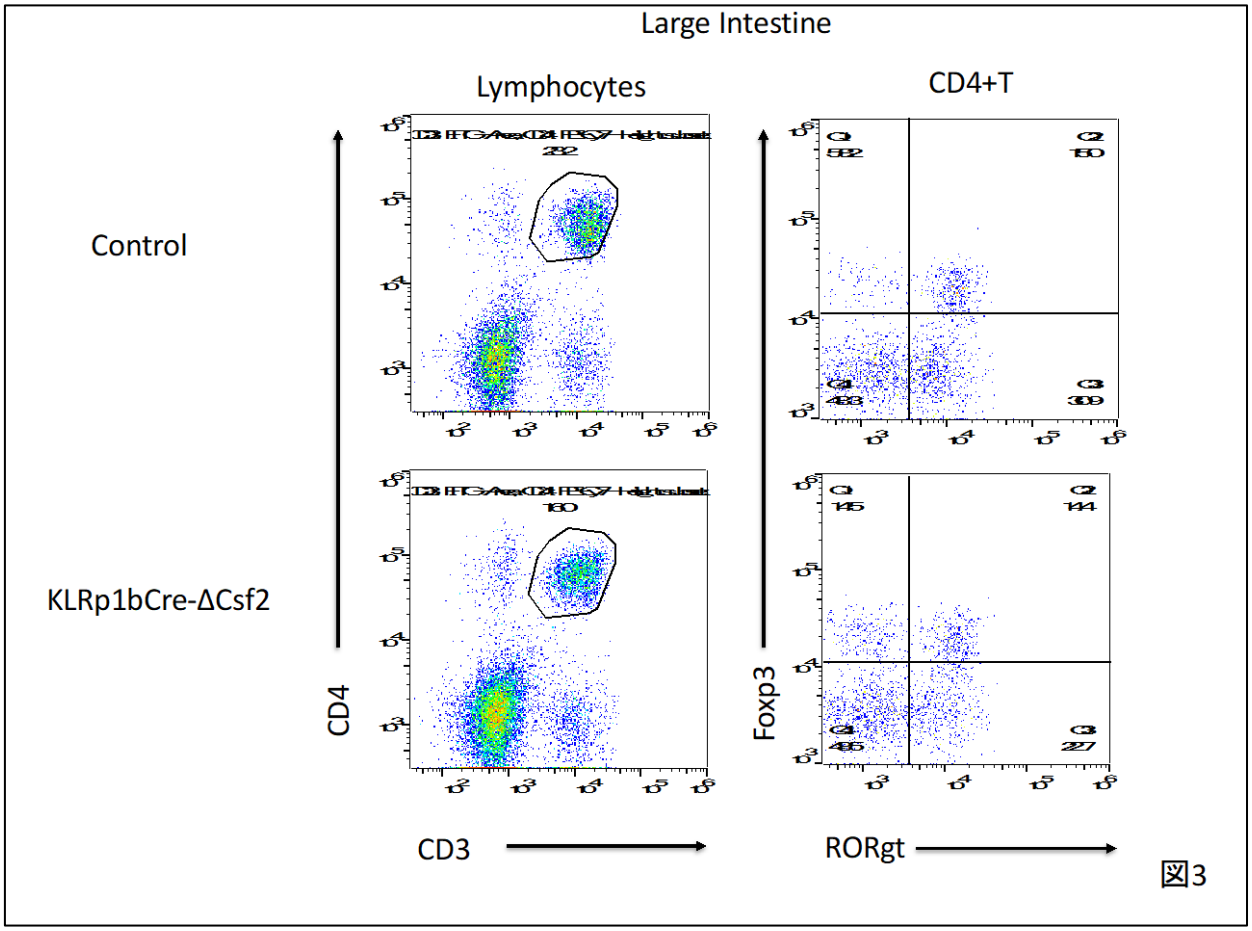

図3

(ii)加齢マウスにおける KLRp1b 発現細胞由来 GM-CSF の意義の検討

25 週齢以降の KLRp1b-ΔCsf2 マウスは対象群比 25%の著明な体重減少が観察され、30 週までの生存率も有意に低下していた。雌雄間での体重減少の程度に差は見られなかった。興味深いことに、明らかな腸炎症状も観察されなかった。フローサイトメータを用いた免疫細胞の解析から、KLRp1b-ΔCsf2 マウスの大腸、肝臓、肺において Th17 細胞の減少と MHC ClassII 陽性細胞数の著しい減少が観察された。

本研究の本質は Mortha らが 2014 年に Science 誌に報告した論文[1] の真偽を確かめ、GM-CSF による食物アレルギー予防の効果を検証することにある。Mortha らは大腸 Treg の分化に ILC3 由来の GM-CSF が重要であると報告したが、ILC3 特異的な GM-CSF 欠損マウスを用いた検証をしていなかった。本研究ではゲノム編集技術を用い、世界で初めて $Csf2^{flox}$ マウスを樹立できた。また、

ILC3 の Cre 発現特異性が比較的高い KLRp1b$^{Cre\text{-}P2A\text{-}EBFP2/+}$ノックインマウスの樹立にも成功した。KLRp1b-ΔCsf2 マウス樹立により、腸管 Treg の分化および維持には ILC3 由来 GM-CSF は必須でないことが明らかになった。

助成期間後に残された課題

KLRp1b-ΔCsf2 マウスは小腸および大腸における Th17 細胞分化が障害されていることが新たな知見として得られた。しかし、KLRp1b が発現する腸管リンパ球として ILC3 の他に NK 細胞や gd17 細胞が存在しており、これらの 3 者のうちどの細胞が Th17 細胞分化を担う GM-CSF の産生源か明らかでない。また、GM-CSF による Th17 細胞分化は骨髄球系の細胞により担われていると考えられるが、GM-CSF に反応するどの骨髄球系細胞サブセットが重要かも明らかになっていない。

また、加齢 KLRp1b-ΔCsf2 マウスは有意な体重減少が観察されたが、その病理学的検討は進んでいない。これまで、Csf2 の全身性欠損マウスには同様の体重減少が報告されていないことが奇異である。マウス飼育環境の違いが原因であれば、KLRp1b-ΔCsf2 の腸内細菌叢が変容していると考えられる。また、KLRp1b を発現する ILC3 以外のリンパ球が産生する GM-CSF と体重減少の関係についても不明点が残されたままである。

学会や論文発表等の予定

KLRp1b-ΔCsf2 マウスで観察された Th17 細胞分化のメカニズムを解明したうえで論文発表を行う予定

Mortha らが 2014 年に Science 誌に報告した論文[1]では、腸内細菌が大腸のマクロファージに作用した結果、産生された IL-1b 依存的に ILC3 からの GM-CSF 産生が促されることが提唱された。しかし、今回我々が新規作成した KLRp1b-ΔCsf2 マウスでは主要な KLRp1b 発現細胞である ILC3 が産生する GM-CSF が欠損するにもかかわらず、大腸の Treg 数に変化はなかった。GM-CSF が Treg 数の維持に果たす役割については 2014 年以降も解明されていない。興味深いことに、当該論

文で GM-CSF 欠損により著明な減少が見られる樹状細胞は CD103 陰性 CD11b 陽性サブセットであり[3]、これは Th17 細胞の機能維持に重要な IL-23 の産生樹状細胞としても知られている。我々の研究で明らかになった Th17 細胞の減少は GM-CSF 依存的に分化する CD103 陰性樹状細胞の減少に起因するのではないかと考えている。

今後の研究活動について

KLRp1b-ΔCsf2 マウスの体重減少はバリア機能の低下による Dysbiosis が原因ではないかと考えている。その理由として、KLRp1b-ΔCsf2 マウスに co-housing した野生型マウスにおける体重減少傾向が挙げられる。本現象について再現性をとり、体重減少の原因となりうる腸内細菌叢の特徴、さらには病原性の高い細菌株の同定を進める必要がある。

GM-CSF を軸とした Treg 分化誘導と食物アレルギー予防戦略は一旦保留し、KLRp1b-ΔCsf2 マウスで観察された Th17 細胞分化機構および加齢 KLRp1b-ΔCsf2 マウスで観察された体重減少について微生物学的観点から検討する。

参考文献

1）Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y and Merad M. Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis. Science. 343(6178):1249288, 2014.

2）Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy, S, Berard M, Kleinschek M, Cua D, Disanto JP and Eberl G. RORγt^{+} innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. Nature Immunology. 1, 320-326, 2011

3) Longman RS, Diehl GE, Victorio DA, Huh JR, Galan C, Miraldi ER, Swaminath A, Bonneau R, Scherl EJ and Littman DR. CX_3CR1^{+} mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J Exp Med* 211 (8): 1571–1583, 2014

以上