

自然リンパ球における免疫受容体の機能解析

井出 夏暉（筑波大学 生物学類） 指導教員：渋谷 和子（筑波大学 医学医療系）

自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cell, ILC) はT細胞、B細胞と同じリンパ球に属する細胞群である。獲得免疫応答の中心となるT細胞やB細胞は抗原受容体を介した活性化によって非自己に対する抗原特異的な免疫応答の主要な役割を担う。しかしながら、抗原特異的な細胞への分化や活性化には時間を要するため、獲得免疫応答のピークは1-2週目となる。一方、自然免疫細胞に属するILCは抗原受容体を発現しておらず、抗原非特異的な活性化機構を有する。そのため、ILCの活性化やエフェクター機能の開始は即時的である。他の免疫細胞と比較して、組織に常在するILCが少数であるため、ILCの存在は2010年に初めて報告された。しかしながら、組織におけるILCの希少性に反して、ILCが産生する1細胞あたりのサイトカインの量が他の免疫細胞と比較して数~100倍も多いため、ILCが組織の恒常性維持や病原体に対する最初の免疫応答に重要な役割を担っていることが相次いで報告されている。

ILCが有する抗原非特異的な活性化機構と、サイトカイン産生能力の高さは、病原体の排除を含めた組織の恒常性維持にとって理想的であると思われた。しかしながら、過剰なILCの活性化が組織の炎症を引き起こし、疾患の発症や増悪への関与も報告されている。特に、常時外界から刺激を受け続ける肺や腸管、皮膚などの上皮組織を含む臓器においては、ILCの活性化が起りやすく、ILCと疾患の関与が多く報告されている。ILCの過剰な活性化を抑えることを目的として、ILCは様々な疾患の治療標的として近年注目を集めている。しかしながら、ILCを対象とした研究の歴史は浅く、ILCの活性化機構については未解明な部分が多いため、その過剰な活性化の原因の理解や過剰な活性化を抑える方法の構築には知見が不十分である。

ILCは常在細菌叢由来の代謝産物や、組織傷害に際して産生される炎症性サイトカインに対する受容体を高発現しているため、ILCの活性化は可溶性分子によるものだと考えられている。加えて、抗原受容体を発現していないため、細胞接着を介した他の細胞との相互作用がILCの活性化に与える影響は全く議論されていない。しかしながら、組織より単離したILCを可溶性分子で活性化させる際に、同様の組織より単離したミエロイド系細胞（マクロファージや樹状細胞など）と共培養した場合に、ILCの活性化が飛躍的に向上することが報告された。これは、可溶性分子による活性化以外にも細胞接着を介した活性化機構が存在することを示唆しているが、その分子機構は全く明らかになっていない。

我々は、ILCに高発現する免疫受容体に着目した。免疫受容体は、免疫細胞の細胞膜、細胞質または核内にあるタンパク質で、特異的な物質（リガンド）と結合して免疫反応を開始させる。その中でも、ILCの細胞膜上に高発現し、活性化シグナルを伝達する免疫受容体XがILCの細胞接着を介した活性化機構に重要な役割を担うと仮説を立てた。活性化シグナル伝達モチーフを有する免疫受容体XはT細胞やNK細胞の細胞傷害活性やサイトカイン産生を促進する。しかしながら、ILC上の免疫受容体Xを介した活性化シグナルや細胞接着の上皮組織に常在するILC機能への影

響は不明である。本研究では上皮組織に常在するILCの活性化機構に、免疫受容体Xが関与しているか検証することを目的とした。

【方法】

・ILC、およびミエロイド系細胞の単離

Naïve B6N マウスより単離した上皮組織を含む臓器をコラゲナーゼIVで処理し、単一細胞懸濁液を得た。その後、細胞膜表面抗原に対する蛍光標識抗体を用いた染色を行い、セルソーターを使用してILCおよびミエロイド系細胞を単離した。単離した各細胞集団は90%以上の純度で得られたことを確認している。

・ILCの活性化の評価

ILCをIL-2, IL-7, IL-33(10 ng/ml)を含むcRPMIにて培養し、固相化したコントロール抗体または抗免疫受容体X抗体(10 ug/ml)による刺激を行った。ILC培養上清中に含まれるサイトカインの量をCytometric Bead Array (CBA) によって定量し、ILCの活性化の指標とした。

・ミエロイド細胞上の免疫受容体Xのリガンド発現

単離後のミエロイド細胞を培養し、免疫受容体Xリガンドに対する蛍光標識抗体を用いた染色を行い、フローサイトメトリー(FACS)により、リガンドの発現を経時的に定量した。

【結果と考察】

ILCに対し、IL-33刺激の下で免疫受容体X刺激を行うと、刺激後にILCから産生されるサイトカイン量が有意に上昇した。このことから、肺のILC上の免疫受容体Xはサイトカイン産生の増強に寄与していると考えられる。

酵素処理によりILC上の免疫受容体Xおよびミエロイド細胞上の免疫受容体Xリガンドの発現が低下していた。この発現の低下は経時的に回復した。腸管のILCとミエロイド細胞を共培養したときに免疫受容体Xのブロッキング抗体を入れても、サイトカイン発現に減少がみられなかったことの一因として、免疫受容体Xやそのリガンド発現の低下があったことが考えられる。

【今後の予定】

今回得られた結果では、免疫受容体X刺激を入れた群と入れていない群との差が非常に小さかったため、今後は条件検討を行い、この差がより顕著になるような系の構築を進めていく。また、生体内でILC上の免疫受容体Xと相互作用している細胞を特定し、その細胞と共培養したときに、免疫受容体Xのブロッキング抗体を入れることでサイトカイン産生が落ちるかどうかを確かめる実験も行う予定である。

腸管ILCについては、酵素処理により、ILC上の免疫受容体Xとミエロイド細胞上のリガンドの発現が減弱することがわかったため、単離後数日間培養し、発現が回復してから共培養、および刺激を行う実験を予定している。また肺のILCの方で行った方法と同様に、固相化した免疫受容体X抗体によってILCに刺激を入れた時のサイトカイン発現を確認する実験も行う予定である。