

【要約】

Phenotypic and functional characterization of

Tpath2 cells and ILC2s

(病原性記憶 Th2 細胞と 2 型自然リンパ球の表現型
及び機能的特性について)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学専攻

(主任：下条 直樹教授)

山本 健

【背景】

気管支喘息などのアレルギー症状は主に Th2 細胞及び 2 型自然リンパ球(ILC2s) が産生する IL-5、IL-13 といった Th2 サイトカインによって惹起される。我々は以前、IL-33 受容体を発現し、特に IL-5 を高産生することで、好酸球性気道炎症の病因となる Th2 細胞の亜集団を病原性記憶 Th2 細胞 (Tpath2 cells) として報告している。また、近年、抗原受容体を有さないリンパ球集団 ILC2s の存在が明らかになり、ILC2s もまた IL-33 受容体を有し、IL-33 依存性に好酸球性炎症に寄与することがわかっている。Tpath2 cells 及び ILC2s の両細胞からのサイトカイン産生は、Th2 細胞では主に T 細胞受容体依存的に、ILC2s では IL-33 依存的に起きる。しかし、Th2 細胞もわずかながら IL-33 刺激によってサイトカイン産生することも報告されていた。ただし、この両細胞における IL-33 依存性サイトカイン産生の制御機構はこれまで明らかにされていなかった。

【目的】

Tpath2 cells、ILC2s における IL-33 依存性サイトカイン産生制御機構の解明を目的とした。

【方法】

DO11.10 トランスジェニックマウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を *in vitro* でエフェクター Th2 細胞に分化し、同系のヌードマウスに移入し、4~6 週間後に移入したヌードマウスの脾臓から CD4 陽性 DO11.10 陽性 ST2 陽性の細胞を Tpath2 cells とした。また、ILC2s の単離には過去の報告を参考に、マウスに IL-33 を 5 日間連日、腹腔内投与し ILC2s を増加させたのちに脾臓より Lineage marker 陰性 CD127 陽性 Thy1.2 陽性の細胞を ILC2s として単離しに実験に用いた。両細胞を増殖する目的で各々を *in vitro* で IL-7, IL-25, IL-33 の存在下に 5 日間培養したのち、一連の実験に使用した。両細胞の RNA シークエンスを行い、両細胞のサイトカイン産生を制御しうる候補分子を同定した。Tpath2cells において、RNA 干渉を用いて候補分子の loss of function を、ILC2s で retrovirus vector transduction によって候補分子の gain of function を確認した。さらに、293T 細胞及び D10.G4.1 細胞を用いて免疫沈降法やウェスタンブロット法及び *IL5* 遺伝子座に対する DNA プルダウンアッセイ、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって分子メカニズムの解明を行った。

【結果・考察】

IL-33 刺激は Tpath2 cells における Th2 サイトカイン産生をほとんど誘導しなかったが、ILC2s では IL-33 刺激のみによって多量の IL-5, IL-13 産生を認めた。これは、IL-33 受容体が両細胞で高発現かつ、*Ii5* 遺伝子座のクロマチン構造が permissive status であるにもかかわらず認められた。

そこで、次に我々は Tpath2 cells と ILC2s の転写プロファイルを RNA sequencing を行い比較した。RNA sequencing の結果、MAP kinase phosphatase である *Dusp10* が Tpath2 で特異的に高発現、ILC2 では低発現であった。定量的 PCR 法でも同様の結果を確認した。*DUSP10* はこれまでに p38 の脱リン酸化を起こすことが報告されていたため、IL-33 刺激による p38 のリン酸化をウェスタンブロット法にて確認したところ IL-33 誘導性の p38 リン酸化は Tpath2 cells では ILC2s に比較して非常にわずかであった。我々は続いて、*DUSP10* の機能解析を行った。Tpath2 の中には IL-33 依存性 IL-5 産生細胞がわずかに認められたことから、IL-5 secretion assay キットによって IL-5 陽性 Tpath2 cells と IL-5 陰性 Tpath2 cells に分離し、*Dusp10* 発現を比較した。すると、IL-5 陽性 Tpath2 cells では、IL-5 陰性 Tpath2 cells に比較して、*Dusp10* の mRNA が低発現であった。また、Tpath2 cells において *Dusp10* の RNA 干渉を用いた knockdown により、IL-33 依存性の IL-5 産生が亢進することを確認した。一方で、ILC2s に *Dusp10* を過剰発現すると IL-5、IL-13 の産生が減弱した。さらにこの *Dusp10* を過剰発現した ILC2s では p38 のリン酸化が減弱していることを確認した。続いて、293T 細胞を用いて *DUSP10* はリン酸化 p38 に結合することで、リン酸化 p38 による GATA3 リン酸化を抑制することを確認した。そして、*DUSP10* の存在は、GATA3 の *Ii5* 遺伝子座のプロモーター領域への結合を抑制することで GATA3 の転写活性を抑制していることが明らかとなった。

以上の結果より、Tpath2 cells における IL-33 依存性 IL-5 産生には、*Dusp10* のダウンレギュレーションが必要であること、ILC2s への *Dusp10* の過剰発現は Th2 サイトカイン産生を抑制することが示唆された。またこれらの反応はリン酸化 p38 誘導性のリン酸化 GATA3 が、*Ii5* プロモーター領域の転写活性を誘導することでもたらされることが明らかとなった。今後の展望としては、臓器特異的な Tpath2 における *Dusp10* 発現や IL-33 依存性 IL-5 産生能の評価および *Dusp10* の発現を制御する分子メカニズムの解明が必要と

考えられた。さらに、*Dusp10* 発現の低下した IL-33 依存性 IL-5 産生 Tpath2 cells のヒトアレルギー疾患への関与の有無を確認し、その機能を解明することが必要と考えられた。

【結論】

DUSP10 は p38 の脱リン酸化を介して、IL-33 依存的なサイトカイン産生を負に制御することが示された。今後、Tpath2 cells や ILC2s における IL-33-p38-GATA3 リン酸化カスケード及び DUSP10 は、アレルギー性炎症抑制のための治療ターゲットとなりうると考えられる。