

氏 名	てい りん な 丁 倫 奈
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第826号
学位授与の日付	令和4年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (内科学（呼吸器・アレルギー）)
学位論文題目	TLR3-driven IFN-β antagonizes STAT5-activating cytokines and suppresses innate type 2 response in the lung (TLR3刺激によるIFN- β はSTAT5を活性化させるサイトカインに拮抗することにより肺における2型自然免疫反応を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉原重美 (副査) 教授 春名真一 教授 徳田信子

論文内容の要旨

【背景】

気管支喘息における気道の慢性炎症はインターロイキン（interleukin：IL）-5やIL-13、好酸球の浸潤といった、2型サイトカインの発現の増加で特徴づけられている。この炎症には、CD4陽性T細胞、マスト細胞、好酸球、好中球など、様々な細胞が関与しているが、近年、2型自然リンパ球（group 2 innate lymphoid cells：ILC2s）が粘膜組織に存在し、2型免疫反応や組織の炎症に深く関与していることがわかってきた。ILC2sは抗原特異的な受容体を発現していないが、上皮由来のIL-33、IL-25、胸腺間質性リンパ球新生因子（thymic stromal lymphopoietin：TSLP）に即座に反応し、IL-5やIL-13を産生する。ILC2sを制御している分子や経路については、未だ研究段階である。

パターン認識受容体（pattern recognition receptors：PRRs）は微生物やその構成成分を認識し、Th1やTh17型の免疫反応を促進する一方、気管支喘息に関連したTh2型免疫反応を潜在的に抑制することがわかっている。PRRsの中でも特にToll様受容体（Toll-like receptors：TLRs）の活性化がILC2sを介する自然2型免疫反応を抑制することがわかってきた。TLRsアゴニストを用い、ILC2sを調整する免疫学的メカニズムを解明することが期待できる。

【目的】

本研究の目的は、肺ILC2sを抑制する分子や経路を解明することである。

【対象と方法】

本研究はMayo clinic実験動物委員会の承認を得て、指針に従って行った。

ナイーブBALB/cマウスやC57BL/6マウスに様々なTLRsアゴニストと真菌抗原のアルテルナリアを経鼻投与し、肺組織、肺胞洗浄液を回収し、IL-5やIL-13の測定を行った。ナイーブBALB/cマウスにpolyinosinic-polycytidylic acid (poly (I : C))、R848、CpG Aを経鼻投与し6時間後に肺を回収し肺組織のIFN産生を測定した。IFN受容体の役割を調べるために、interferon- α / β receptor (IFNAR) 1ノックアウトマウスにpoly (I : C) とアルテルナリアを経鼻投与し、肺組織、肺胞洗浄液の2型炎症反応を測定した。また、IFN- β の直接の効果を調べるために、ナイーブBALB/cマウスにIFN- β を3日間連続投与し、アルテルナリア投与後の肺組織、肺胞洗浄液の2型炎症反応を測定した。

ナイーブBALB/cマウスから肺ILC2sをlineage-negative (Lin⁻) CD25⁺CD44^{high}として分離した。分離したILC2sはIL-33、IL-7、IL-2、TSLP、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ などのサイトカインと共に培養し、上清中のIL-5やIL-13を測定した。細胞増殖を測定するために、肺ILC2sはcarboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) で標識された。

データは、平均値 \pm 平均の標準誤差 (SEM) で示した。統計は、Studentの t 検定、ANOVA、反復測定ANOVAを適宜用いて行った。p<0.05を有意とした。

【結 果】

TLRアゴニストの中でpoly (I : C) が最も効果的に2型自然免疫反応を抑制した。Poly (I : C) によりIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ が産生され、その抑制効果はIFN- α / β 受容体に依存していた。IFN- β がIFN- α より約100倍の強さで肺ILC2sからの2型サイトカイン産生を抑制することがわかった。IL-33ではなくIL-2、IL-7、TSLPを含むsignal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) 活性化サイトカインが肺ILC2sの細胞増殖を促進し、さらに転写因子であるGATA3の発現がILC2sの分化や維持に重要であるが、これらがIFN- β により抑制されることがわかった。

【考 察】

今回の研究テーマは2型自然免疫反応の抑制機構を解明し、気管支喘息患者への治療戦略に繋がることを目的とした。Poly (I : C) によるTLR3の活性化が肺においてIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ を誘導し、ILC2誘導性のアレルギー性気道炎症を抑制することがわかった。これまでR848によるTLR7/8やCpG AによるTLR9の活性化によりIFN- α とIFN- γ がそれぞれ誘導され、ILC2由来の気道炎症を抑制することが報告されてきた。また、poly (I : C) によりアスペルギルス誘導性の肺の炎症を抑制することも報告された。我々は、poly (I : C) 由来のIFN- β が肺ILC2sやアレルギー性気道炎症を抑制する主座となることを報告した。*Ifnra1*欠損マウスとブロッキング抗体を用いた実験で、poly (I : C) 由来の抑制経路がIFNARを介することがわかった。IFN- α とIFN- β はIFNAR1とIFNAR2の複合体を共有しているが、*in vitro*の培養実験でIFN- β はIFN- α より約100倍の強さの抑制力を持つことがわかった。このIFN- β 特有の能力に関して、IFN- β の受容体に対する親和性と、下流シグナルの違いが関係していると考えられる。1型IFNはSTAT1やSTAT2を含むIFN-stimulated gene factor 3やIRF9を促進し、2型IFNはSTAT1優位のシグナルを介する。またIFN- β の方がIFNARに対する親和性が高い。

ILC2sにおけるIFN- β のターゲット分子については深く解明されていなかったが、我々はGATA3が関係していると推測した。GATA3はマウスとヒトのILC2sの分化、維持、機能において重要な役

割を担っている。ヒトの末梢血ILC2sにおいてTSLPがGATA3の発現を増加させる報告があるように、我々はSTAT5活性化サイトカインが肺ILC2sにおけるGATA3の発現を高めることを確認し、IFN- β がその発現を抑制することを発見した。この発見から肺ILC2sにおけるGATA3発現はSTAT5とSTAT1/2の2つの転写因子の活性バランスにより調整されていると推測した。ILC2sにおけるGATA3発現に関与する分子メカニズムは今後のさらなる研究が必要である。

マウスにおいて外因性のIFN- β が肺ILC2のGATA3の発現を抑制することがわかった。感冒症状を伴う喘息患者における吸入IFN- β の効果をみる臨床治験が行われた。この臨床治験で、吸入IFN- β が感冒契機の気管支喘息増悪に対する治療を減少させ、IFN- β 吸入の安全性も確認された。IFN- β が抗ウイルス反応を促進することで感冒契機の気管支喘息増悪患者を減少させることが推測されたが、我々の発見を、適切な対象患者に応用させることで、気管支喘息患者におけるIFN- β の効能を検討できると考える。

【結 論】

TLR3由来のIFN- β は肺ILC2においてSTAT5活性化サイトカインにより促進されるGATA3の発現を抑制し、アレルギー誘導性のILC2を介する気道炎症を抑制する。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cells : ILC2s) は粘膜組織に存在し、様々なアレルギー疾患に関与し、パターン認識受容体 (pattern recognition receptors : PRRs) は微生物やその構成成分を認識し、気管支喘息に関連したTh2型免疫反応を潜在的に抑制するが、PRRsの中でも特にToll様受容体 (Toll-like receptors : TLRs) の活性化がILC2sを介する2型自然免疫反応を抑制することが明らかになっている。申請論文では、TLRsアゴニストを用いて肺ILC2sを調整する免疫学的メカニズムを明らかにすることを目的として、TLR3のアゴニストであるpoly(I : C)をマウスに経鼻投与し、アルテルナリア誘導性の2型自然免疫反応の応答を検討している。結果、1) TLRsアゴニストの中でpoly (I : C) が最も効果的に2型自然免疫反応を抑制、2) Poly (I : C) によりIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ が産生され、その抑制効果はIFN- α / β 受容体に依存しており、IFN- β がIFN- α より約100倍の強さで肺ILC2sからの2型サイトカイン産生を抑制し、3) IL-33ではなくIL-2、IL-7、TSLPを含むsignal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) 活性化サイトカインが肺ILC2sの細胞増殖を促進し、さらに転写因子であるGATA3の発現がIFN- β により抑制されることを明らかにしている。これらの結果から、TLR3由来のIFN- β は肺ILC2sにおいてSTAT5活性化サイトカインにより促進されるGATA3の発現を抑制し、アレルギー誘導性のILC2sを介する気道炎症を抑制すると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、Mayo clinic実験動物委員会の承認を得て、指針に従いナイーブBALB/cマウスやC57BL/6マウスに様々なTLRsアゴニストと真菌抗原のアルテルナリアを経鼻投与し、肺組織、肺胞

洗浄液を回収し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によりIL-5やIL-13の測定を行っている。各実験は2回以上行い再現性を得た上で適切な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

気管支喘息、アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎患者においてILC2sの活性化が関係していることが報告されており、どのようにILC2sの活性化が起こり、病態生理と関連しているかが解明されてきている。しかしILC2sを調整する分子や抑制メカニズムは明らかではない。GATA3はILC2sの分化、維持に重要な転写因子であり、申請論文ではIFN- β がSTAT5活性化サイトカインに拮抗することにより肺ILC2sのGATA3発現を抑制することを初めて明らかにしている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、IFN- β と2型自然免疫反応の関係を位置づけている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、外因性のIFN- β が肺ILC2sのGATA3発現を抑制することでアレルギー性気道炎症を抑制することを明らかにしている。IFN- β の全身投与は多発性硬化症の再発抑制治療として実臨床で使用されており、IFN- β の安全性が実証されている。気管支喘息患者におけるIFN- β の吸入療法が実地臨床で反映されるようになれば、気管支喘息患者への治療選択の幅が増えることになり、大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、臨床呼吸器学やアレルギー免疫学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果はアレルギー領域の国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

The Journal of Allergy and Clinical Immunology
(149 : 1044-1059. e5, 2022)