

博士論文

論文題目 食餌誘導性肥満における自然リンパ球の機能解析

氏 名 佐々木 崇晴

【目次】

P.3 第1章 序論

P.5 第2章 方法

P.11 第3章 結果

P.11 1. 肥満におけるサイトカイン共通受容体 γ_c 鎖の関与

P.12 2. 肥満における自然リンパ球の関与

P.12 3. 肥満における $\gamma_c^{-/-} Rag2^{-/-}$ マウスの腸内細菌についての解析

P.13 4. 肥満に関与する自然リンパ球の探索

P.14 5. 肥満における ILC2 の関与

P.15 6. 肥満における ILC2 の増殖、活性化を促すサイトカインの関与

P.17 第4章 考察

P.19 第5章 文献

P.26 第6章 謝辞

P.27 図

【第1章 序論】

肥満の増加は世界的な問題であり、肥満は糖尿病や高血圧、脂質異常症といった二次疾患を引き起こすことから早期の介入が必要である (Pereira et al., 2009; Popkin et al., 2007)。肥満の誘導には、生活習慣や食事といった環境要因と遺伝的要因が考えられてきたが、これらに加え近年では腸内細菌叢と宿主の相互作用が重要であることがヒト、ラット、およびマウスに関する研究から明らかにされている (Ridaura et al., 2013、Bäckhed et al., 2007; Turnbaugh et al., 2006、Ley et al., 2005)。腸内細菌叢は免疫系に様々な影響を与え、Th17細胞や制御性T細胞 (Treg)の誘導などに関与することが知られている (Furusawa et al., 2013b; Atarashi et al., 2013; Depaolo et al., 2012; Atarashi et al., 2011; Niess et al., 2010; Ivanov et al., 2009)。しかしながら、肥満の誘導における免疫系、特にリンパ球の関与についてはこれまで十分な解析がなされていない。

リンパ球は抗原特異的な受容体を介して活性化される獲得免疫系のリンパ球と、抗原特異的な受容体を有さない自然免疫系のリンパ球に大別される。獲得免疫系のリンパ球に分類される T 細胞、B 細胞、NKT 細胞における抗原特異的な受容体の再構成は Rag (Recombination-activating gene) 酵素を必要とし、Rag1 と Rag2 のうちいずれかを欠損したマウスでは獲得免疫系のリンパ球の欠損がみられる (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992)。一方、自然免疫系のリンパ球は自然リンパ球 (ILCs; innate lymphoid cells) と総称され、その分化には転写抑制因子 Id2 を必要とする。自然リンパ球はヘルパーT細胞 (Th1, Th2, Th17細胞)の分類に対応したサイトカイン産生パターンに準えて3種類に分類されおり、グループ1自然リンパ球にはナチュラルキラー (NK; natural killer) 細胞と ILC1 が含まれ Th1細胞と同様に IFN γ を産生し、グループ2自然リンパ球は Th2細胞と同様に IL-5 や IL-13を産生し、またグループ3自然リンパ球はリンパ組織誘導細胞 (LTi cells; lymphoid tissue inducer cells) と ILC3 が含まれ、Th17細胞と同様に IL-17 や IL-22 の産生を担う (Moro et al., 2015; Artis et al., 2015; Spitz et al., 2013)。グループ1自然リンパ球に属する NK細胞は Granzyme と Perforin といった細胞傷害性タンパク質を介してウイルス感染細胞や細胞内細菌感染細胞を殺傷して除去することで感染防御に働き、その分化には IL-7 ではなく IL-15 を必要とする (Di Santo, 2006; He et al., 1996)。一方、ILC1は細胞傷害性を司る Granzyme や Perforin を発現せず、IL-15 ではなく IL-7 依存的に分化する (Klose et al., 2014; Fuchs et al., 2013)。グループ2自然リンパ球は腸間膜脂肪組織から同定された Natural helper (NH)細胞と Nuocyte、Ih2細胞などを含むが、現在は総じて ILC2 と呼ばれている (Mjösberg et al., 2011、Price et al., 2010; Neill et al., 2010; Moro et al., 2010)。ILC2は IL-7 と転写因子 Gata3 (GATA binding protein 3)を分化と生存に必要とし、IL-2 によって増殖する (Furusawa et al., 2013a; Klein et al., 2013; Hoyler et al., 2012; Mjösberg et al., 2012; Moro et al., 2010)とともに、

IL-2+IL-25 や IL-33 刺激によって多量の IL-5 や IL-13 を産生することで寄生虫感染に対する防御やアレルギーの発症に関与する (Bartemes et al., 2014; Halim et al., 2014; Kabata et al., 2013; Kim et al., 2013; Roediger et al., 2013; Chang et al., 2011; Monticelli et al., 2011、 Neill et al., 2010; Moro et al., 2010、 2015)。また最近では、白色脂肪組織において IL-33 によって活性化された ILC2 が、褐色脂肪細胞と同じように Uncoupling protein 1 (UCP1)を介して熱産生を担う Beige 細胞の誘導に関与することが報告されている (Brestoff et al., 2015; Lee et al., 2015; Hams et al., 2015)。グループ 3 自然リンパ球の分化は転写因子 Ror γ t (Retinoic acid-related orphan receptor γ t) に依存する (Buonocore et al., 2010; Eberl et al., 2004; Sun et al., 2000)。グループ 3 自然リンパ球に属する LTi 細胞は 2 次リンパ組織の発生に必要であり、Ror γ t を欠損したマウスではリンパ組織やパイエル板の形成不全がみられる (Sun et al., 2000)。一方、ILC3 は腸管の恒常性維持とバリア機能の維持に働き (Sonnenberg et al., 2011; Satoh-Takayama et al., 2008)、肥満の誘導にも関与することが報告されている (Upadhyay et al., 2012)。しかしながら、肥満の誘導における ILC3 以外のリンパ球の関与についてはこれまでに明らかとなっていない。

本研究では食餌誘導性肥満における自然リンパ球の役割、特に ILC2 の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

【第2章 方法】

1. マウス

本研究で用いたマウスは全て C57BL/6 の background であり、慶應義塾大学または国立研究開発法人理化学研究所（理研）の動物実験委員会のガイドラインに従い、慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室動物飼育施設または理研統合生命医科学研究センターの動物飼育施設において SPF 条件下で飼育した。野生型 (WT)マウスは日本チャールスリバー社 (Cat. No. C57BL/6N, Cat. No. C57BL/6J), 日本クレア社 (Cat. No. C57BL/6JJcl)と Taconic 社 (Cat. No. B6)から購入した。*Rag2*^{-/-}マウス (Cat. No. RAGN12), γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウス (Cat. No. 004111)、*Il15*^{-/-}マウス (Cat. No. 004269)は Taconic 社から、*Cre-ERT2* トランスジェニックマウス (Cat. No. 004682)は Jackson Laboratory より購入した。*Roryt*^{GFP/+}マウスと *Roryt*^{GFP/GFP}マウス (Eberl et al., 2004)は理研統合生命医科学研究センターの Sidonia Fagarasan 先生より、*Il25*^{-/-}マウス (Ishii et al., 2010) および *Il33*^{GFP/GFP}マウス (Oboki et al., 2010)は東京大学医科学研究センターの中江進先生と国立成育医療研究センターの斎藤博久先生より、*Gata3*^{flx/flx}マウス (Zhu et al., 2004) と *Il2rb*^{-/-}マウスはそれぞれ東京理科大学の久保允人先生と Ontario Cancer Center の T. W. Mak 先生よりご供与いただいた。*Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウス、*Il15*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウス、*Roryt*^{GFP/GFP}*Rag2*^{-/-}マウスはそれぞれ *Il2rb*^{-/-}マウス、*Il15*^{-/-}マウス、*Roryt*^{GFP/GFP}マウスを *Rag2*^{-/-}マウスと交配させて作製した。*Cre-Ert2:Gata3*^{flx/flx}マウスは *Cre-Ert2* トランスフェニックマウスと *Gata3*^{flx/flx}マウスを交配させて作製した。*Il25*^{+/-}マウスと *Il25*^{-/-}マウスは *Il25*^{+/-}マウスと *Il25*^{-/-}マウスを交配して作製した。*Il33*^{GFP/+}マウスと *Il33*^{GFP/GFP}マウスは *Il33*^{GFP/+}マウスと *Il33*^{GFP/GFP}マウスを交配して作製した。無菌マウス (Cat. No. C57BL/6NCr[GF])は三協ラボサービスより購入し、理研統合生命医科学研究センターの動物飼育施設内のビニールアイソレーターで飼育した。

2. 抗体と試薬

フローサイトメトリーで用いた c-Kit (2B8, #558163)、KLRG1 (2F1, #563595, #561620, #561621)、Sca-1 (E13-161.7, #553335, #562729)、CD45.2 (104, #552950)、Thy-1.2 (53-2.1, #551616)、IL-7R α (SB/199, #552543)、NKp46 (29A1.4, #560756)、CD3 ϵ (145-2C11, #553060)、CD4 (GK1.5, #553728)、CD8 α (53-6.7, #553029)、CD5 (53-7.3, #553019)、B220 (RA3-6B2, #553086)、NK1.1 (PK136, #553163, #562921, #553165)、CD11c (HL3, #553800)、Gr-1 (RB6-8C5, #553125)、Siglec-F (E50-2440, #562681)、IL-2 (JES6-5H4, #554428)に対するモノクローナル抗体と rat IgG2b, κ isotype control 抗体 (A95-1, #553989)は BD Pharmingen から、NKp46 (29A1.4, #137618)、CD11b (M1/70, #101204)、F4/80 (BM8, #123118)、CD206 (C068C2, #141708)に対するモノクローナル抗体は BioLegend から、Fc ϵ RI (Mar-1, #13-5898-85)、IL-7R α (A7R34、

#17-1271-82)に対するモノクローナル抗体と Bleferdin A (#00-4506-51)は eBiosciences より購入した。CD16/CD32 に対するモノクローナル抗体(2.4G2)、Ter119 に対するモノクローナル抗体(Ter119)と、パリエル板欠損マウスの作製に使用した IL-7R α に対するモノクローナル抗体(A7R34)は CELLline CL 1000 (Integra Biosciences)で培養したハイブリドーマの培養上清から抗体を硫酸沈殿し、HiTrap Protein G HP Columns (GE ヘルスケア) を用いて精製した。APC 化 (#554067)もしくは APC-Cy7 化 streptavidin は BD Pharmingen より購入し、ビオチン化モノクローナル抗体に蛍光色素を付加するために用いた。4-Hydroxytamoxifen (4-OHT、#7904)、トウモロコシ油 (#C8267)、propidium iodide (PI、#81845)、PMA (#P8139)、BSA (#A3192)、Trisma base (#T1503)、NaN₃ (#S2002)、RPMI-1640 medium(#R8758)、DMEM medium (#D5796) は Sigma-Aldrich から、FCS (#10437-028)、Dispase (#17105-041)と 10 \times HBSS (#14185-052) は GIBCO から、イオノマイシン (#407950) は Calbiochem から、Liberase DH (#05401089001) と DNaseI (#10104159001) は Roche から、Streptavidin MicroBeads (#130-048-101) は Miltenyi Biotec から、Percoll PLUS (#1744501) は GE Healthcare から、リコンビナントマウス IL-2 (#402-ML-100/CF)、IL-7 (#407-ML-200/CF)、IL-25 (#1399-IL-025/CF)、IL-33 (3626-ML-010/CF) は R&D Systems から購入した。生理食塩水 (#3311401A2026) と大塚蒸留水 (#7131400A2129)、大塚糖液 50% (#3231401H6027) は大塚製薬工場から、ヒューマリン R 注 (#24922493A4951) は日本イーライリリーから、EDTA-2Na (#345-01865)、フェノールレッド (#163-01122)、エタノール (#057-00451)、キシレン (#244-00081)は和光純薬工業から、NaCl (#31320-05) と Triton X-100 (#35501-15) はナカライテスクから購入した。ACK lysis buffer は、0.15M NH₄Cl (Sigma-Aldrich、#A9434)、0.01 M KHCO₃ (和光純薬工業、#166-03275)、0.1 mM EDTA-2Na (和光純薬工業、#345-01865) 溶液を蒸留水で調製し、オートクレーブ (121 $^{\circ}$ C、200kPa、20 分) にかけて作製した。FACS Buffer は 0.02% (w/v) フェノールレッド含有 HBSS をオートクレーブにかけたのち、FCS と NaN₃ を、それぞれ 2%(v/v)、0.02% (w/v) となるよう添加して作製した。

3. 食餌誘導性肥満の誘導

すべての実験において雄マウスを用い、高脂肪食として HFD32 (日本クレア) を摂食させた。コントロール群のマウスは通常食として CE-2 (日本クレア社)で飼育した。高脂肪食は 1 週間に 2 回交換し、体重測定は 2 週間毎に行った。

4. インスリン感受性試験 (ITT; Insulin tolerance test)

マウスを 4 時間絶食させたのち、ヒューマリン R 注 (100 U/ml) 15 μ l を 7.2 ml の生理食塩水で希釈し、3.6 μ l/g 体重 (0.75 mU/g 体重)にて腹腔に投与し、血糖値を試験直前 (0 分)と

投与後 20、40、60、80、100、120 分後に尾静脈から採血し、ACCU-CHEK ST Meter (Roche) を用いて測定した。

5. 耐糖能試験 (OGTT; Oral glucose tolerance test)

大塚糖液 50%を注射用水で希釈して 20%ブドウ糖溶液を作製した。マウスを 16 時間絶食させたのち、20%ブドウ糖溶液を 10 μ l/g 体重 (2 mg/g 体重)で経口投与し、血糖値を試験直前 (0 分)と投与後 15、30、60、120 分後に尾静脈から採血し、ACCU-CHEK ST Meter (Roche) を用いて測定した。試験中、同時に 0、15、30 分の時点でおよそ 30 μ l の血液を回収し、30 分常温で置いた後、15,000rpm、4°Cにて 4 分遠心し、血漿を回収し、Mercodia Mouse Insulin ELISA (Mercodia、#10-1247-01)にて血漿インスリン値を測定した。

6. 摂食量の測定

マウスを 1 匹/ケージで飼育し、測定開始時と 24 時間後の測定終了時に重量計 HL-400 (A&D)を用いて餌の量を測定し、差し引いた値を摂食量とした。

7. 細胞の調製

小腸の粘膜固有層と脂肪組織の細胞の調製は既報 (Moro et al., 2015) に少し修正を加えて行った。

小腸粘膜固有層の細胞を採取するにあたり、まず腸管から腸間膜、パイエル板、糞便を取り除き、1 cm の小片に刻んだ後、1 mM EDTA-2Na PBS が 40 ml 入った 100 ml 三角フラスコに磁気回転子と共に入れ、37°C、500xg で 20 分間攪拌することによって上皮を取り除いた。小腸の小片を茶漉しで回収し、PBS 20 ml のはいた 50 ml チューブで 1 分間手で強く振盪した(これを 2 回繰り返した)。次に回収した小腸の小片をハサミで 1-2 mm に細断し、0.56 ng/ml Dispase、2 μ g/ml Liberase DH、50 mg/ml DNaseI を溶解した 2% (v/v) FCS 含有 RPMI-1640 medium (溶液 A)が 30 ml 入った 100 ml 三角フラスコで磁気回転子と共に 37°C、500xg にて攪拌した。攪拌開始後 30 分にて一度フラスコを静置して組織片を沈殿させて上清を 25 ml 回収し、残った 5 ml の組織片懸濁液を 18G の針と 10 ml のシリンジに 10 回通して癒着した組織片を離した後、もう一度新しい溶液 A を 25 ml 添加してさらに 30 分攪拌を行った。攪拌開始後 30 分の時点で回収した 25 ml の上清は 500xg、4°Cにて 10 分間遠心しておき、得られた沈殿を、さらに続けて 30 分攪拌を行った細胞懸濁液と合わせて 70 mm EAST strainer (Greiner Bio-One)に通し、50 ml チューブに回収した。この溶液を 500 x g、4°Cにて 10 分遠心して得られた細胞分画を 15 ml チューブにて 30% Percoll PLUS 入りの 10%FCS 含有 HBSS 10 ml に懸濁した。このチューブを、500xg、4°Cにて 20 分間、遠心機の

ブレーキを解除して遠心し、細胞分画を次の解析に用いた。

脂肪組織からの細胞を調製するにあたっては、脂肪組織を 15ml チューブに入った 4% (w/v) BSA 含有 DMEM 7 ml の中でハサミを用いて細断し、20 $\mu\text{g/ml}$ になるよう Liberase DH を添加して 37°C 150 rpm にて 60 分間振盪した。途中、30 分において手動で強くチューブを振盪した。このチューブを、500xg、4°C にて 5 分間遠心し、細胞分画を次の解析に用いた。

脂肪組織の ILC2 をソーティングするにあたっては、マウスの脂肪組織を gentleMACS C-tubes (Miltenyi Biotec, #130-096-334) に集めてからハサミで細断し、4%BSA 含有 DMEM で 10 ml にメスアップ後、20 $\mu\text{g/ml}$ になるよう Liberase DH を添加して 37°C 150 rpm にて 30 分間振盪した。その後、gentleMACS (Miltenyl Biotec) の program m_brain_01_02 を用いて攪拌させ、再度 37°C 150 rpm にて 30 分振盪し、改めて gentleMACS の program B.01 を用いて攪拌した。このチューブを、500xg、4°C にて 5 分間遠心して分離された細胞分画を 10%FCS 含有 HBSS で洗いながら 100- μm Nylon cell strainer (BD Falcon, #352360) に通して 50 ml チューブに回収し、さらに 40- μm Nylon cell strainer (BD Falcon, #352340) に通して 15 ml チューブに回収した。これを 500 x g、4°C にて 5 分間遠心後、細胞分画に抗 CD16/32 抗体と Lineage マーカー (CD3 ϵ 、CD4、CD8 α 、CD5、NK1.1、B220、CD11b、CD11c、Gr-1、Fc ϵ R1、Ter119) に対するビオチン化抗体を溶解した 0.5% (w/v) BSA 含有 PBS 500 μl を添加して 15 分 4°C にてインキュベートし、0.5% (w/v) BSA 含有 PBS 500 μl で洗って 500xg、4°C にて 5 分間遠心した。細胞分画を 100 μl の streptavidin MicroBeads を混濁した 0.5% BSA 含有 PBS 1 ml で懸濁し、15 分 4°C にてインキュベートした。懸濁液を 37 μm ナイロンメッシュ (東京スクリーン、# N-No.355T) に通して 15 ml チューブに回収後、0.5% BSA 含有 PBS を用いて 5 ml に調製し、autoMACS Pro Separater (Miltenyl Biotec) のプログラム DEPLETES を用いて細胞を分離した。Streptavidin MicroBeads が結合していない細胞として ILC2 が回収されるので、この分画を 500xg、4°C にて 5 分間遠心し、得られた細胞分画に KLRG1、Sca-1 に対する蛍光標識化抗体と APC 化 Streptavidine を添加し、15 分、4°C にてインキュベートした。最後に FACS Buffer で洗って 500xg、4°C にて 5 分間遠心後、セルソーター (FACSAriaIIu あるいは FACSAriaIII、BD Biosciences) を用いてソーティングを行った。

ソーティングに用いる細胞を除き、上記で調製した細胞は赤血球を ACK lysis buffer を用いて溶血し、細胞数を数えた後、蛍光標識化抗体で染色してフローサイトメトリーで解析した。また、サイトカインの細胞内染色を行うにあたっては、6 well 平底プレートに 3×10^5 cells/3ml 10% FCS 含有 RPMI-1640 medium/well で細胞を入れ、PMA (30 ng/ml) + イオノマイシン (1 $\mu\text{g/ml}$) と Bleferdin A (1000 倍希釈) を添加し、37°C 3 時間インキュベートした後、IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter #A07803) を用いて固定と膜透過処理を行ってサイトカインの細胞内染色を行った。

8. フローサイトメトリーによる解析とソーティング

調製した細胞は FACS Buffer 100 μ l に懸濁し、細胞内染色を行う場合を除いて解析直前に 0.5 μ g/ml PI/PBS 20 μ l を死細胞除去のために添加した。フローサイトメーターとして、FACS AriaII もしくは AriaIII を用いて解析を行った。ILC1 は NK1.1⁺NKp46⁺、ILC2 は Linage⁻KLRG1⁺Sca-1⁺、ILC3 は Linage⁻KLRG1⁻Sca-1^{low}IL-7R α ⁺Thy1⁺NKp46⁺の細胞群としてそれぞれ検出した。ILC2 と ILC3 の解析を行うときは Linage マーカーとして CD3 ϵ 、CD4、CD8 α 、CD5、NK1.1、B220、CD11b、CD11c、Gr-1、Fc ϵ R1、Ter119 を用い、ILC1 と ILC2、ILC3 を同時に解析する場合には Lineage マーカーから NK1.1 を除いた。マクロファージの解析を行う際は、CD11b⁺F4/80⁺Siglec-F⁻CD206^{low}CD11c^{high} の細胞群を M1 マクロファージ (M1M ϕ)として、CD11b⁺F4/80⁺Siglec-F⁻CD206^{high} CD11c^{low} の細胞群を M2 マクロファージ (M2M ϕ)として検出した。

ソーティングを行う際には、調製した細胞を FACS Buffer 1~2 ml に懸濁し、0.5 μ g/ml PI/PBS を 100 μ l~200 μ l 添加して Linage⁻KLRG1⁺Sca-1⁺ ILC2 を FACS AriaII もしくは AriaIII によって単離した。

データの解析は FlowJo Software (Tree Star)によって行った。

9. 無菌マウスに対する糞便の移植と高脂肪食負荷

3 ヶ月間高脂肪食で飼育した *Rag2*^{-/-}マウスもしくは γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスから糞便を回収し、1 ml の PBS に BioMasher II (Nippi、#320103)を用いて懸濁した。これらの糞便の懸濁液、もしくは PBS を 8 週齢の野生型無菌マウスに経口投与 (150 μ l/mouse) すると同時に高脂肪食の摂食を開始した。異なる糞便を移植したマウスは異なるビニールアイソレーターで飼育した。

10. 骨髄キメラマウスに対する高脂肪食負荷

骨髄細胞は 7-13 週齢の *Rag2*^{-/-}マウスと γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスから採取した。四肢の骨の両端をハサミで切り落とし、RPMI-1640 medium を充填した 10 ml シリンジ(テルモ、#SS-10ESZ) と 26G の注射針 (NIPRO、#01-518) を用いて骨の中から骨髄細胞を押し出すようにして出した。骨髄細胞は ACK で赤血球を溶血させ、細胞数を数えた後、 1×10^7 cells/mouse にて 6-7 週齢の γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-} mice に尾静脈から移植し、2 週間後に高脂肪食負荷を開始した。移植の際には放射線照射を行わなかった。

11. ILC2 の欠損の誘導

Cre-Ert2:Gata3^{+/+}マウスと *ERT2-Cre:Gata3*^{fllox/fllox}マウスに対し、10%エタノールを含むトウ

モロコシ油に溶解した 4-OHT を 1 mg/25g 体重にて 1 日に 1 回、3 日間腹連続で腹腔に投与した。対照群には 10% エタノールを含むコーン油を投与した。投与最終日から 1 週間後に高脂肪食負荷を誘導した。

12. ILC2 の移植

日本チャールズルバー社から購入した野生型マウス (Retired breeder) の小腸から Linage⁻KLRG1⁺Sca-1⁺ ILC2 をソーティングした。ソーティングした細胞は 1 ml の生理食塩水で懸濁し、200 μ l/mouse にて 5 匹の $\gamma_c^{-/-}$ Rag2^{-/-}マウスに尾静脈から移植した。1 回に 14~20 匹の野生型マウスからソーティングを行い、1 回目の移植から 2 週間以内に 1 回目の移植も含めて 4 回移植を行った。ILC2 を初回に移植した日より高脂肪食負荷を行った。

13. パイエル板欠損マウスの作製とパイエル板のホルマウント染色

パイエル板欠損マウスは以前報告されていた方法を用いて作製した(Yoshida et al., 1999)。具体的には、日本クレアより購入した野生型の妊娠マウス (E14.5) に対して抗 IL-7R α 抗体 (A7R34) を 2 mg/mouse にて尾静脈から注入し、生まれた仔をパイエル板欠損マウスとして用いた。対照群としては無処置の妊娠マウスから生まれたマウスを用いた。

パイエル板の欠損を確認するためにホルマウント染色を行った。マウスの小腸に対し腸間膜が付着していた側面をハサミで開き、糞便を TBS で洗いながした後、上皮を取り除くために 1% フェノールレッド、5 mM EDTA、10% FCS を含む HBSS にて 37°C、170 rpm で 30 分間振盪した。組織をろ紙に挟んで 10% フォルマリン/TBS で 1 時間固定し、TBS で 5 分間 3 回洗浄したら、0.3% H₂O₂ で 15 分間処理することにより内因性ペルオキシダーゼを不活性化したのち、TBS で 5 分間 3 回洗浄した。膜透過処理は 50 mM Tris (pH7.2)、150 mM NaCl、0.6% Triton-X 100、0.1% BSA 溶液 (溶液 B) を用いて 4°C で 1 時間行い、Block Ace (DS Pharma Biomedical, #UKB40) で 1 時間常温でブロッキングを行った。その後、溶液 B で希釈したビオチン化抗 B220 抗体 (RA3-6B2) で一晩 4°C にてインキュベートし、TBS で 30 分間 3 回洗浄した後、Elite ABC Standard Kit (Vector, #PK6100) と DAB substrate kit (Vector, #SK4100) による DAB 染色によってパイエル板を発色させた。組織片をろ紙で挟んで 70% エタノールで 1 回、100% エタノールで 2 回脱水後、組織片をキシレンに浸し、エンテランニュー (Merck, #1.07961.0100) を用いて封入した。

14. 統計処理

データは平均 \pm 標準誤差にて表示した。2 群間の有意差検定にはマンホイットニーの U 検定、3 群以上の多重比較には Tukey-Kramer 法を用いた (*p<0.05, **p<0.01)。

【第3章 結果】

1. 肥満の誘導におけるサイトカイン共通受容体 γ_c 鎖の関与

肥満の誘導におけるリンパ球の関与を調べることを目的として、野生型 (WT)マウス、獲得免疫系のリンパ球を欠損する *Rag2*^{-/-}マウス、獲得免疫系と自然免疫系の両方のリンパ球を欠損する γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスに高脂肪食負荷を行った。その結果、通常食を摂食させたこれらのマウスでは体重増加に差がなかったのに対し (図 1A)、高脂肪食条件下では *Rag2*^{-/-}マウスは WT マウスと同様に体重が増加したのに対し、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでは体重増加が著明に少なかった (図 1B)。また、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでは腸間膜、精巣上体周囲、鼠径部の脂肪組織と肝臓の組織重量増加も少なかった (図 1C、D)。以上の結果から、自然リンパ球が食餌誘導性肥満に関与している可能性が示唆された。

摂食量を測定したところ、通常食で飼育した γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでは WT マウス、*Rag2*^{-/-}マウスと変わらなかったのに対し (図 1E)、高脂肪食で飼育した γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでも WT マウス、*Rag2*^{-/-}マウスと比較して同じであるか増加していたことから (図 1F)、摂食量は γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスで見られた肥満に対する抵抗性とは無関係であることが分かった。

肥満は炎症性マクロファージとして知られる M1 マクロファージ (M1M ϕ)の脂肪組織への浸潤を誘導することでインスリン抵抗性を引き起こすことが知られている。そこで、フローサイトメトリーを用いて精巣上体周囲の脂肪組織における F4/80 陽性のマクロファージ群を、抗炎症性マクロファージとして知られる M2 マクロファージ (M2M ϕ) のマーカーの CD206 と M1M ϕ のマーカーである CD11c を用いて解析した。その結果、高脂肪食負荷を行った *Rag2*^{-/-}マウスの脂肪組織では WT マウスと同様に CD206^{low}CD11c^{high} の M1M ϕ が増加していたが、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスではその浸潤が減少することが明らかになった (図 2A、図 3A)。このことから、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでは肥満に伴うインスリン抵抗性にも関与することが予想された。

そこでインスリン抵抗性をインスリン感受性試験 (ITT; insulin tolerance test) と耐糖能試験 (OGTT; oral glucose tolerance test) を用いて評価した。その結果、ITT では *Rag2*^{-/-}マウスの血糖値は高脂肪食負荷によって WT マウスと同様に血糖値の上昇が認められたが、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでは血糖値が有意に低かったことからインスリン感受性が高いことが明らかとなった (図 2B)。また、OGTT においては高脂肪食負荷によって WT マウス、*Rag2*^{-/-}マウス、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウス全てにおいて血糖値が上昇し、有意差は認められなかった (図 2C)。一方で、OGTT 開始 30 分における血漿インスリン値を測定した結果、*Rag2*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して血漿インスリン値が有意に上昇していたことから、*Rag2*^{-/-}マウスでは WT マウスと同等の血糖値を保つためにより多くのインスリンを必要とする、すなわち耐糖能が悪化していることを意味し (図 2C、D)、獲得免疫系のリンパ球が耐糖能の改善に

働くことが示唆された。一方、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスでは血漿インスリン値が有意に低く、耐糖能が良いことがわかった (図 2D)。通常食で飼育した $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスでは M1M ϕ の細胞数が WT マウスを比較して有意に少なく、ITT、OGTT における血糖値、血漿インスリン値は WT マウスと差はなかった (図 3A-D)。

以上の結果から、自然リンパ球が肥満の誘導と肥満に伴うインスリン抵抗性の発症に関与する可能性が示唆された。

2. 肥満の誘導における自然リンパ球の関与

成体のマウスにおいて自然リンパ球は骨髄の造血幹細胞から分化することから、自然リンパ球が肥満の誘導に関与する可能性を検証するために $Rag2^{-/-}$ マウスまたは $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄細胞を $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに移植したキメラマウスを作製した。その結果、 $Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄を移植したマウスの小腸では NK1.1+NKp46⁺のグループ 1 自然リンパ球 (NK 細胞と ILC1)、Lineage-KLRG1+Sca-1⁺ のグループ 2 自然リンパ球 (ILC2)、Lineage-KLRG1- IL-7R α ⁺Thy-1+NKp46⁺のグループ 3 自然リンパ球 (ILC3)の再構成が認められた (図 4A)。骨髄を移植して 2 週間後よりこのマウスを高脂肪食で飼育したところ、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄を移植したマウスと比較して $Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄を移植したマウスでは体重増加が有意に回復し、脂肪組織と肝臓の重量についても有意な増加が見られた (図 4B、C)。このとき摂食量には差がなかったことからこれらの回復は摂食量とは無関係であることがわかった (図 4D)。

脂肪組織へのマクロファージの浸潤についても検討した結果、 $Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄を移植したマウスにおいて有意に M1M ϕ の浸潤が回復していた (図 5A)。さらにインスリン抵抗性についても評価を行った結果、ITT において $Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄を移植したマウスでは $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄を移植したマウスと比較して有意に血糖値が上昇し、また OGTT においてもこのマウスでは血糖値に有意差がなかったが血漿インスリン値が有意に上昇していた (図 5B-D)。これらの結果から、自然リンパ球が肥満の誘導に関与し、さらに肥満に伴うインスリン抵抗性の発症にも関与すると結論した。

3. 肥満における $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの腸内細菌についての解析

無菌マウスが肥満に抵抗性を示すことから、肥満の誘導には腸内細菌が関与すると報告されている (Ridaura et al., 2013, Bäckhed et al., 2007; Turnbaugh et al., 2006, Ley et al., 2005)。そこで自然リンパ球が腸内細菌の肥満誘導能に影響を与えている可能性を検討した。高脂肪食条件下で飼育した $Rag2^{-/-}$ マウスもしくは $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの糞便を肥満に抵抗性を示す無菌マウスに移植した後、高脂肪食負荷を行った。その結果、無菌マウスと比べて $Rag2^{-/-}$ マ

ウスの糞便を移植したマウスでは体重が有意に増加した (図 6A)。さらに、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの糞便を移植したマウスにおいても $Rag2^{-/-}$ マウスの糞便を移植したマウスと同等の体重増加を示した(図 6A)。 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの糞便を移植したマウスにおける脂肪組織、肝臓の肥大化は $Rag2^{-/-}$ マウスの糞便を移植したマウスと同程度であった(図 6B)。これらの結果から、自然リンパ球は腸内細菌の肥満誘導能には影響を与えないと結論した。

4. 肥満に關与する自然リンパ球の探索

次に我々は、どのグループの自然リンパ球が肥満の誘導に關与するかについて検討した。まず、グループ 1 自然リンパ球に属する NK 細胞の關与を調べるため、NK 細胞を欠損する $Il15^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに高脂肪食負荷を行った。その結果、このマウスは $Rag2^{-/-}$ マウスと同様に体重が増加し、脂肪組織重量についても変化がなかったことから、NK 細胞は肥満の誘導に關与しないと結論した (図 7A、B)。一方、グループ 1 自然リンパ球に属するもう 1 つの自然リンパ球である ILC1 は転写因子 T-bet を介して分化する点において NK 細胞とは異なる(Klose et al., 2014, Fuchs et al., 2013)が、 $T-bet^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスは $Rag2^{-/-}$ マウスと同様に肥満になることが既に報告されていること(Stolarczyk et al., 2013)から、ILC1 も肥満の誘導に關与しないと考えられた。

次に、肥満の誘導における ILC2 の關与を調べた。ILC2 の維持には転写因子 Gata3 が必要であること(Furusawa et al., 2013a; Klein et al., 2013; Hoyler et al., 2012; Mjösberg et al., 2012)から、Gata3 の欠損を薬剤依存的に誘導できる $Cre-ERT2:Gata3^{lox/lox}$ マウスを用いて解析を行った。 $Cre-ERT2:Gata3^{lox/lox}$ マウスと $Cre-ERT2:Gata3^{+/+}$ マウスに 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) の腹腔内投与を行うと、前者では ILC2 の数が劇的に減少した (図 8A)。この ILC2 の減少は、4-OHT 投与後 11 週間後においても存続していた (データ省略)。一方で近年、Gata3 は ILC2 以外にも IL-7R α を発現する自然リンパ球一般の分化にも必要であると報告されているが(Yagi et al., 2014; Serafini et al., 2014)、 $Cre-ERT2:Gata3^{lox/lox}$ マウスに 4-OHT 投与を行っても ILC1, ILC3 は消失しなかったことから、分化後の細胞の維持においては Gata3 は ILC2 のみに重要であることが示唆された (データ省略)。ILC2 を欠損したマウスに高脂肪食負荷を行った結果、ILC2 が存在する $Cre-ERT2:Gata3^{+/+}$ マウスや $Cre-ERT2:Gata3^{lox/lox}$ マウスにコーン油を投与した対照群と比べ、摂食量に変化がないにもかかわらず有意に体重増加が抑制された(図 8B、C)。また、脂肪組織重量についても減少傾向が見られた(図 8D、E)。これらの結果から、ILC2 が肥満の誘導に關与していることが示唆された。

過去に Upadhyay らによって ILC3 と lymphotoxin-IL-23-IL-22 経路が肥満の誘導に關与することが報告された(Upadhyay et al., 2012)。そこで ILC3 を欠損した $Roryt^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに高脂肪食負荷を行って再現性を検討したところ、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスが $Rag2^{-/-}$ マウスと比較して

8週間で10グラム以上の肥満抵抗性を示したのに対し、*Roryt^{-/-}Rag2^{-/-}*マウスでは5グラム程度の抵抗性を見せた。この結果から、ILC3も報告通り肥満の誘導に関与することが確認できたが(図1B、図9A-C)、一方で他の自然リンパ球が関与する可能性も考えられた。

また、*Roryt^{gfp/gfp}Rag2^{-/-}*マウスでは脂肪組織へのM1Mφの浸潤が減少していたことからインスリン抵抗性についても評価した(図10A)。その結果、ITTにおいて*Roryt^{gfp/gfp}Rag2^{-/-}*マウスは*Rag2^{-/-}*マウスと比較して低血糖値を示したとともに、OGTTにおいては血糖値に差がなかったにもかかわらず低い血漿インスリン値を示したことから、インスリン抵抗性にもなりにくいマウスであることが分かった(図10B-D)。以上から、ILC3は肥満に伴うインスリン抵抗性の発症にも関与することが明らかとなった。

グループ3自然リンパ球のうち、LTi細胞は胎児におけるリンパ節やパイエル板の発生に重要である。特にパイエル板はM細胞(Microfold cells)を介した腸内細菌に由来する抗原の取り込みに関与しており、ここで取り込まれた細菌が肥満の誘導に関与する可能性も考えられた(Mabbott et al., 2013, Qiao et al., 2015)。妊娠14.5日目の野生型マウスに抗IL-7Rα抗体を投与して胎仔のLTi細胞を除去すると仔マウスがパイエル板欠損マウスとなることから(Yoshida et al., 1999)、このマウスに高脂肪食を負荷することによってパイエル板の肥満への関与を検証した。その結果、パイエル板欠損マウスは正常マウスと同様に体重が増加したことから、パイエル板の有無は肥満の誘導に関与しないことが明らかとなった(図11A)。このことは、リンパ節やパイエル板を欠損している*γ_c^{-/-}Rag2^{-/-}*マウスに*Rag2^{-/-}*マウスの骨髄を移植することによって自然リンパ球の再構成を行うとパイエル板がないにもかかわらず肥満が回復するという結果と一致している(図4A-C)。

以上の結果から、小腸の粘膜固有層に存在しているILC3が肥満の誘導に関与していること、ILC3に加えてILC2が肥満の誘導に関与していることが示唆された。*Roryt^{gfp/gfp}Rag2^{-/-}*マウスと比べて4-OHTを投与した*Cre-ERT2:Gata3^{flx/flx}*マウスや*γ_c^{-/-}Rag2^{-/-}*マウスの方がより肥満への抵抗性が強かったことも上記の考え方を支持するものである。肥満の誘導にILC2が関与することについてはこれまで報告がないことから、ILC2の関与についてさらに解析を進めることにした。

5. 肥満におけるILC2の関与

ILC2が肥満の誘導に関与するかについて直接調べるために、野生型マウスの腸間膜脂肪組織もしくは小腸粘膜固有層からソーティングによって単離したILC2を 2.1×10^5 cells/mouseの細胞数にて*γ_c^{-/-}Rag2^{-/-}*マウスに移植した後に高脂肪食を負荷した。その結果、脂肪組織のILC2を移植したマウスでは移植を行っていないマウスと同様に肥満に抵抗性を示したのに対し、小腸のILC2を移植したマウスでは有意に体重が増加した(図12A、B)。

脂肪組織重量についても検討した結果、脂肪組織の ILC2 を移植したマウスでは脂肪組織重量が増加しなかったのに対し、小腸の ILC2 を移植したマウスでは脂肪組織重量が有意に増加していた(図 12C、D)。摂食量はどちらの ILC2 を移植しても変わらなかったことから、小腸の ILC2 が摂食量とは無関係に肥満の誘導に関与していることが明らかとなった(図 12E、F)。肝臓の重量については小腸の ILC2 を移植しても肥大化の回復見られなかったのに対し、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに $Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄を移植したマウスでは肥大化が回復していたことから、肝臓の肥大化には他の ILC が関与している可能性が考えられた(図 4C、12D)。

フローサイトメトリーを用いて移植した細胞を追跡した結果、脂肪組織の ILC2 を移植した $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスでは小腸粘膜固有層と腸間膜脂肪組織、精巣上体周囲の脂肪組織の全てにおいて ILC2 が検出された。これに対し、小腸の ILC2 を移植したマウスでは小腸において ILC2 が検出されたが、腸間膜脂肪組織と精巣上体脂肪組織では ILC2 がほとんど検出されなかった(図 13A、B)。脂肪組織の ILC2 と小腸の ILC2 は共に小腸への局在が認められたのにもかかわらず、小腸の ILC2 のみが肥満の誘導に関与していたことから、脂肪組織の ILC2 と小腸の ILC2 では肥満の誘導において異なった機能を有していることが示唆された。

小腸の ILC2 を移植した $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスでは M1Mφ の増加が見られたことからインスリン抵抗性についても評価した(図 14A)。その結果、ITT において小腸 ILC2 を移植したマウスでは移植を行っていないマウスと比べて血糖値が有意に上昇しており、OGTT においても血糖値の有意な上昇が認められ、血漿インスリン値についても増加の傾向が認められた(図 14A)。これらの結果から、小腸の ILC2 は肥満に伴うインスリン抵抗性の発症にも関与していることが明らかになった。一方で、腸間膜脂肪組織の ILC2 を移植した $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスでは脂肪組織への M1Mφ の浸潤、ITT における血糖値、OGTT における血糖値と血漿インスリン値は ILC2 の移植を行っていないマウスと比べて変わらなかった(図 15A-D)。

以上から、脂肪組織の ILC2 ではなく小腸の ILC2 が肥満の誘導とそれに伴うインスリン抵抗性の発症に関与していると結論した。

6. 肥満における ILC2 の増殖、活性化を促すサイトカインの関与

ILC2 は IL-2 によって穏やかに増殖し、IL-25 や IL-33 によって活性化された場合には急激に増殖すると共に多量の IL-5, IL-13 を産生すること (Moro et al., 2010) から、肥満の誘導におけるこれらのサイトカインの関与について検証した。過去の報告では、IL-25 の受容体サブユニットである IL-17Rb、あるいは IL-33 を欠損したマウスでは野生型マウスと比較して肥満になり易く、IL-25 や IL-33 は肥満の誘導に対して抑制性に働くサイトカインであると報告されていた(Miller et al., 2010; Hams et al., 2013, Brestoff et al., 2015)。しかしながら本研究では、高脂肪食を負荷した $Il25^{-/-}$ マウスと $Il33^{GFP/GFP}$ マウスではそれぞれ同腹仔である

Il25^{+/-}マウス、*Il33*^{GFP/+}マウスと同等の体重増加と脂肪組織重量増加が認められ、既報とは異なる結果となった (図 16A, B)。一方、IL-2 と IL-15 の受容体を構成するサブユニットである IL-2Rβ を欠損した *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスは *Rag2*^{-/-}マウスと比較して肥満に抵抗性であり、この表現型は摂食量とは無関係であった (図 17A-C)。先述のように、*Il15*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスは *Rag2*^{-/-}マウスと同様の体重増加を示したことから、獲得免疫系のリンパ球以外の細胞から供給される IL-2 が肥満の誘導に必要であることが示唆された。

また、M1Mφ の浸潤についても *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでは *Rag2*^{-/-}マウスと比較して減少していたことからインスリン抵抗性について評価した(図 18A)。その結果、ITT では *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの血糖値は *Rag2*^{-/-}マウスと比較して有意に低く、OGTT においても血糖値に有意差はなかったが血漿インスリン値が低かったことからこのマウスではインスリン抵抗性になりにくいことが分かった(図 18B-D)。すなわち、獲得免疫系以外の細胞から供給される IL-2 は肥満の誘導とともにそれに伴うインスリン抵抗性の発症に関与することが示唆された。

高脂肪食で飼育した *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスにおける精巣上体周囲の脂肪組織では *Rag2*^{-/-}マウスと比較して ILC2 の細胞数に変化はなかったが、*Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの小腸では ILC2 と ILC3 が有意に減少していたことから、IL-2 は小腸の ILC2、ILC3 の維持に必要であることが示唆された (図 19A-C)。さらに、IL-2 の供給源となりうる細胞を調べる為に野生型マウスより採取した小腸粘膜固有層の白血球を採取して PMA とイオノマイシンによる共刺激を行った結果、ILC1 は IL-2 の産生能を持たなかったのに対し ILC2 と ILC3 が IL-2 の産生能を有していた(図 19D)。これらの結果から、ILC2 と ILC3 から産生される IL-2 がオートクリンによって自らに働きかけ、これらの細胞の維持に働くことが肥満の誘導に必要である可能性が示唆された。

【第4章 考察】

本研究において我々は新規に小腸の自然リンパ球が肥満の発症に関与することを見出した。獲得免疫系のリンパ球については、*Rag2*^{-/-}マウスにおける高脂肪食による体重増加が野生型マウスと差がなかったのに対し、耐糖能については *Rag2*^{-/-}マウスで悪化が見られたことについては、過去の報告において CD4 陽性 T 細胞がインスリン抵抗性の発症に対し抑制的に働くことが報告されていることと一致している (Winer et al., 2009)。一方で、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスでは肥満に抵抗性であると共にインスリン抵抗性が改善していた。

自然リンパ球のなかでも ILC3 については肥満の誘導に対する関与が示唆されていたが (Upadhyay et al., 2012)、今回新たに ILC2 が肥満の誘導に関与していることが明らかになった。脂肪組織の ILC2 は Beige 細胞の誘導を促進し、肥満に対して抑制効果を有することが報告されていたが (Brestoff et al., 2015; Lee et al., 2015)、本研究の結果から、脂肪組織の ILC2 ではなく小腸の ILC2 が肥満の誘導に関与していることが明らかになった。未だどのようなメカニズムで小腸の ILC2 が肥満の誘導に関与するかは不明であるが、ILC2 が小腸における脂肪の吸収を制御している可能性が考えられるため、今後調べる必要がある。これまでに知られている ILC2 の機能のうち、好酸球を誘導する IL-5 を欠損したマウスや好酸球を欠損した $\Delta dbfGata1$ マウスが野生型マウスよりも肥満になりやすいことが報告されている (Molofsky et al., 2013; Wu et al., 2011)。しかし、我々の結果からは ILC2 の欠損は好酸球誘導にも障害があるにもかかわらず肥満に抵抗性を誘導することから、我々の系における IL-5-好酸球の関与は考えにくい。これに対し、IL-13 については IL-4/IL-13 の下流で働くシグナル分子である Stat6 を欠損したマウスが肥満に抵抗性を有することが報告されていることから、その関与が疑われる (Ricardo-Gonzalez et al., 2010)。特に腸において IL-13 は上皮細胞に働きムチンの産生を担う杯細胞の過形成を誘導する一方で、食餌に含まれる脂肪の量を増加させるとマウスの杯細胞が増えることも報告されていることから、肥満の誘導における IL-13 を介した杯細胞過形成の誘導の関与についても今後検討する必要がある (Benoit et al., 2015)。

小腸の ILC2 と脂肪組織の ILC2 の違いとしては、小腸や脂肪組織へのリンパ球のホーミングに関与するケモカインに対する感受性の違いがあると考えられる。小腸のリンパ球のホーミングには $\alpha 4\beta 7$ インテグリンや CCL25 の受容体である CCR9 が関与しており (Iwata et al., 2009)、これらの分子の発現や反応性が小腸への ILC2 のホーミングを制御している可能性が考えられる。一方、脂肪組織へのリンパ球の誘導を制御する受容体については我々が調べた限り過去の報告はなかったが、脂肪組織に発現するケモカインやアディポカインに対する反応性の違いが小腸の ILC2 と脂肪組織の ILC2 の組織局在に違いを与えているかもしれない。また、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスに脂肪組織の ILC2 を移植すると ILC2 が小腸に誘導され

たにもかかわらず肥満の誘導が回復しなかった理由として、小腸の ILC2 は肥満を誘導するのに対し、脂肪組織の ILC2 が肥満の抑制に関与することが知られていること (Brestoff et al., 2015) から、この実験条件下では前者の肥満誘導能を脂肪組織に誘導された ILC2 の肥満抑制能が上回った可能性が考えられる。

肝臓の肥大化については ILC2 以外の自然リンパ球が必要であることが示唆された。肝臓における脂肪の蓄積には炎症性マクロファージ由来の TNF α が関与することが報告されていること (De Taeye et al., 2007) とから、炎症性マクロファージの誘導に必要な IFN γ を産生する ILC1 が肝臓の肥大化に関与している可能性が考えられる。

ILC2 の増殖および活性化に関与するサイトカインのうち、IL-25 と IL-33 は肥満の誘導とは無関係であった。過去の報告では、*Il25*^{-/-}マウスや *Il33*^{-/-}マウスが野生型マウスと比べて肥満になりやすいという報告されているが (Miller et al., 2010; Hams et al., 2013, Brestoff et al., 2015)、我々の手では再現性が取れなかった。他のグループがどのようなコントロールを用いたか定かではないが、肥満の研究はマウスのバックグラウンドに左右されることが多いため (Ussar et al., 2015)、*littermate* を用いた我々の実験は信憑性が高いと思われる。

一方、本研究では獲得免疫系の細胞以外から供給される IL-2 が *in vivo* で自然リンパ球の機能に関与していることが示唆された。過去の報告においても IL-2 が *in vivo* において肺と皮膚の ILC の機能に関与することが明らかになっている (Roediger et al., 2013; Roediger et al., 2015) が、腸におけるその機能についての報告はない。IL-2 の産生源として ILC2 と ILC3 が可能性として考えられるが、どのように IL-2 が ILC2 と ILC3 から産生されるかについては不明である。これらの結果に加え、樹状細胞も IL-2 を産生することが知られていること (Zelante et al., 2012) から、樹状細胞も肥満の誘導における IL-2 の供給源として働く可能性がある。さらに、獲得免疫系の細胞の中では T 細胞が IL-2 を産生することから、野生型マウスにおいては T 細胞に関与している可能性もあり、IL-2 の産生に関連した免疫細胞の関与について今後の研究が待たれる。

腸内細菌の関与という点については、 γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの糞便に含まれる腸内細菌の肥満誘導能と *Rag2*^{-/-}マウスの腸内細菌の肥満誘導能が変わらなかったことから、自然リンパ球は腸内細菌の肥満誘導能には影響を与えないことが示唆された。ILC3 と腸内細菌との相互作用についてはこれまでに報告があるが、腸内細菌との関係性における ILC2 の機能については全く知られておらず、今後の課題である。

本研究の結果から、今後 IL-2 と自然リンパ球を基軸とした肥満の病態解明が進むことが期待される。

【第 5 章 文献】

- Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293-301.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., *et al.* (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232-236.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., *et al.* (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331, 337-341.
- Bando, J.K., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2015). Identification and distribution of developing innate lymphoid cells in the fetal mouse intestine. *Nat Immunol* 16, 153-160.
- Bartemes, K.R., Kephart, G.M., Fox, S.J., and Kita, H. (2014). Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 134, 671-678.e674.
- Benoit, B., Laugerette, F., Plaisancié, P., Géloën, A., Bodennec, J., Estienne, M., Pineau, G., Bernalier-Donadille, A., Vidal, H., and Michalski, M.C. (2015). Increasing fat content from 20 to 45 wt% in a complex diet induces lower endotoxemia in parallel with an increased number of intestinal goblet cells in mice. *Nutr Res* 35, 346-356.
- Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., *et al.* (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 519, 242-246.
- Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, I.I., Littman, D.R., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464, 1371-1375.
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 979-984.
- Cao, X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russell, S.M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., and Bloom, E.T. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2, 223-238.
- Chang, Y.J., Kim, H.Y., Albacker, L.A., Baumgarth, N., McKenzie, A.N., Smith, D.E., Dekruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2011). Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol* 12, 631-638.
- Crellin, N.K., Trifari, S., Kaplan, C.D., Satoh-Takayama, N., Di Santo, J.P., and Spits, H. (2010). Regulation of cytokine secretion in human CD127(+) LTI-like innate lymphoid cells by Toll-like receptor 2. *Immunity* 33, 752-764.

- De Taeye, B.M., Novitskaya, T., McGuinness, O.P., Gleaves, L., Medda, M., Covington, J.W., and Vaughan, D.E. (2007). Macrophage TNF-alpha contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E713-725.
- DePaolo, R.W., Kamdar, K., Khakpour, S., Sugiura, Y., Wang, W., and Jabri, B. (2012). A specific role for TLR1 in protective T(H)17 immunity during mucosal infection. *J Exp Med* 209, 1437-1444.
- Di Santo, J.P. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* 24, 257-286.
- Eberl, G., and Littman, D.R. (2004). Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells. *Science* 305, 248-251.
- Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y., and Littman, D.R. (2004). An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* 5, 64-73.
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013). Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 38, 769-781.
- Furusawa, J., Moro, K., Motomura, Y., Okamoto, K., Zhu, J., Takayanagi, H., Kubo, M., and Koyasu, S. (2013a). Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J Immunol* 191, 1818-1826.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., *et al.* (2013b). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446-450.
- Halim, T.Y., Steer, C.A., Mathä, L., Gold, M.J., Martinez-Gonzalez, I., McNagny, K.M., McKenzie, A.N., and Takei, F. (2014). Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity* 40, 425-435.
- Hams, E., Bermingham, R., Wurlod, F.A., Hogan, A.E., O'Shea, D., Preston, R.J., Rodewald, H.R., McKenzie, A.N., and Fallon, P.G. (2015). The helminth T2 RNase ω 1 promotes metabolic homeostasis in an IL-33 and group 2 innate lymphoid cell-dependent mechanism. *FASEB J*.
- Hams, E., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., and Fallon, P.G. (2013). Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. *J Immunol* 191, 5349-5353.
- He, Y.W., and Malek, T.R. (1996). Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* 184, 289-293.

Hoyler, T., Klose, C.S., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E.L., Voehringer, D., Busslinger, M., and Diefenbach, A. (2012). The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 37, 634-648.

Ishii, A., Oboki, K., Nambu, A., Morita, H., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Sudo, H., Okumura, K., Saito, H., *et al.* (2010). Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression. *Allergol Int* 59, 399-408.

Iwata, M. (2009). Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin Immunol* 21, 8-13.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498.

Kabata, H., Moro, K., Fukunaga, K., Suzuki, Y., Miyata, J., Masaki, K., Betsuyaku, T., Koyasu, S., and Asano, K. (2013). Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun* 4, 2675.

Kanamori, Y., Ishimaru, K., Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., and Ishikawa, H. (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J Exp Med* 184, 1449-1459.

Kato, T., Fukuda, S., Fujiwara, A., Suda, W., Hattori, M., Kikuchi, J., and Ohno, H. (2014). Multiple omics uncovers host-gut microbial mutualism during prebiotic fructooligosaccharide supplementation. *DNA Res* 21, 469-480.

Kim, B.S., Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Noti, M., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Hepworth, M.R., Van Voorhees, A.S., Comeau, M.R., and Artis, D. (2013). TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med* 5, 170ra116.

Klein Wolterink, R.G., Serafini, N., van Nimwegen, M., Vosshenrich, C.A., de Bruijn, M.J., Fonseca Pereira, D., Veiga Fernandes, H., Hendriks, R.W., and Di Santo, J.P. (2013). Essential, dose-dependent role for the transcription factor Gata3 in the development of IL-5⁺ and IL-13⁺ type 2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 10240-10245.

Klose, C.S., Flach, M., Möhle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., Fabiunke, C., Pfeifer, D., Sexl, V., Fonseca-Pereira, D., *et al.* (2014). Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 157, 340-356.

Kovanen, P.E., and Leonard, W.J. (2004). Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev* 202, 67-83.

- Lee, M.W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* *160*, 74-87.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11070-11075.
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* *71*, 8228-8235.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* *6*, 666-677.
- Maki, K., Sunaga, S., Komagata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J.I., and Ikuta, K. (1996). Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7172-7177.
- Meier, D., Bornmann, C., Chappaz, S., Schmutz, S., Otten, L.A., Ceredig, R., Acha-Orbea, H., and Finke, D. (2007). Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* *26*, 643-654.
- Miller, A.M., Asquith, D.L., Hueber, A.J., Anderson, L.A., Holmes, W.M., McKenzie, A.N., Xu, D., Sattar, N., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2010). Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res* *107*, 650-658.
- Mjösberg, J., Bernink, J., Golebski, K., Karrich, J.J., Peters, C.P., Blom, B., te Velde, A.A., Fokkens, W.J., van Drunen, C.M., and Spits, H. (2012). The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* *37*, 649-659.
- Mjösberg, J.M., Trifari, S., Crellin, N.K., Peters, C.P., van Drunen, C.M., Piet, B., Fokkens, W.J., Cupedo, T., and Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol* *12*, 1055-1062.
- Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med* *210*, 535-549.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.

- Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., *et al.* (2011). Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol* *12*, 1045-1054.
- Moro, K., Ealey, K.N., Kabata, H., and Koyasu, S. (2015). Isolation and analysis of group 2 innate lymphoid cells in mice. *Nat Protoc* *10*, 792-806.
- Moro, K., and Koyasu, S. (2015). Innate lymphoid cells, possible interaction with microbiota. *Semin Immunopathol* *37*, 27-37.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* *463*, 540-544.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., *et al.* (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* *464*, 1367-1370.
- Niess, J.H., and Adler, G. (2010). Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *J Immunol* *184*, 2026-2037.
- Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Matsumoto, K., *et al.* (2010). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18581-18586.
- Pereira, M.A., Kottke, T.E., Jordan, C., O'Connor, P.J., Pronk, N.P., and Carreón, R. (2009). Preventing and managing cardiometabolic risk: the logic for intervention. *Int J Environ Res Public Health* *6*, 2568-2584.
- Popkin, B.M. (2007). The world is fat. *Sci Am* *297*, 88-95.
- Price, A.E., Liang, H.E., Sullivan, B.M., Reinhardt, R.L., Easley, C.J., Erle, D.J., and Locksley, R.M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 11489-11494.
- Qiao, Y., Sun, J., Xie, Z., Shi, Y., and Le, G. (2014). Propensity to high-fat diet-induced obesity in mice is associated with the indigenous opportunistic bacteria on the interior of Peyer's patches. *J Clin Biochem Nutr* *55*, 120-128.
- Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Odegaard, J.I., Jouihan, H., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mukundan, L., Wu, D., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2010). IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 22617-22622.

- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., *et al.* (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* *341*, 1241-1244.
- Roediger, B., Kyle, R., Tay, S.S., Mitchell, A.J., Bolton, H.A., Guy, T.V., Tan, S.Y., Forbes-Blom, E., Tong, P.L., Köller, Y., *et al.* (2015). IL-2 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function during pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol*.
- Roediger, B., Kyle, R., Yip, K.H., Sumaria, N., Guy, T.V., Kim, B.S., Mitchell, A.J., Tay, S.S., Jain, R., Forbes-Blom, E., *et al.* (2013). Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* *14*, 564-573.
- Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., *et al.* (2008). Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* *29*, 958-970.
- Serafini, N., Klein Wolterink, R.G., Satoh-Takayama, N., Xu, W., Vosshenrich, C.A., Hendriks, R.W., and Di Santo, J.P. (2014). Gata3 drives development of ROR γ t+ group 3 innate lymphoid cells. *J Exp Med* *211*, 199-208.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855-867.
- Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* *12*, 383-390.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., *et al.* (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* *13*, 145-149.
- Stolarczyk, E., Vong, C.T., Perucha, E., Jackson, I., Cawthorne, M.A., Wargent, E.T., Powell, N., Canavan, J.B., Lord, G.M., and Howard, J.K. (2013). Improved insulin sensitivity despite increased visceral adiposity in mice deficient for the immune cell transcription factor T-bet. *Cell Metab* *17*, 520-533.
- Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E., and Littman, D.R. (2000). Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* *288*, 2369-2373.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027-1031.
- Upadhyay, V., Poroyko, V., Kim, T.J., Devkota, S., Fu, S., Liu, D., Tumanov, A.V., Koroleva, E.P., Deng, L., Nagler, C., *et al.* (2012). Lymphotoxin regulates commensal responses to enable diet-induced obesity. *Nat Immunol* *13*, 947-953.
- Ussar, S., Griffin, N.W., Bezy, O., Fujisaka, S., Vienberg, S., Softic, S., Deng, L., Bry, L., Gordon, J.I., and Kahn, C.R. (2015). Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab* *22*, 516-530.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* *328*, 228-231.
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., *et al.* (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* *15*, 921-929.
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* *332*, 243-247.
- Yagi, R., Zhong, C., Northrup, D.L., Yu, F., Bouladoux, N., Spencer, S., Hu, G., Barron, L., Sharma, S., Nakayama, T., *et al.* (2014). The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7R α -expressing innate lymphoid cells. *Immunity* *40*, 378-388.
- Yoshida, H., Honda, K., Shinkura, R., Adachi, S., Nishikawa, S., Maki, K., Ikuta, K., and Nishikawa, S.I. (1999). IL-7 receptor α^+ CD3 $^-$ cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int Immunol* *11*, 643-655.
- Zelante, T., Fric, J., Wong, A.Y., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2012). Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Front Immunol* *3*, 161.
- Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C.J., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J.F., Guo, L., and Paul, W.E. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* *5*, 1157-1165.

【第6章 謝辞】

本研究を遂行しまとめるにあたり、研究委託先の理化学研究所統合生命医科学研究センター (IMS) にて常日頃ご指導、多大なご支援をくださいました免疫細胞システム研究グループの小安重夫先生と自然免疫システム研究チームの茂呂和世先生に深く感謝申し上げます。研究室における先生方のご指導は、常に私の至らなさを実感できるものであり、今後の糧になるものであります。研究に5年間携わることを承諾していただき、辛抱強く見守ってくださり有難うございました。

本研究の解析にあたり、代謝関連の解析につきまして常日頃助言をくださいましたIMS代謝恒常性研究チームの窪田直人先生、窪田哲也先生と東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科の門脇孝先生、腸内細菌の解析にあたりご協力いただいたIMS粘膜システム研究グループの大野博司先生と加藤完先生、無菌マウスを用いた実験についてご協力いただいたIMS免疫器官形成研究グループの大縄悟志先生に深く御礼申し上げます。

また、研究室内では研究に限らず様々なことについて相談にのっていただいた伊川友活先生、北見俊守先生、加畑宏樹先生、Kafi Nequan Ealey先生、本村泰隆先生、同じ学生としてプライベートから研究に至るまで日頃からお世話になった古澤純一博士、古賀諭さん、宮井智浩さん、宮島優里奈さん、小林貴人さん、山菅駿さん、鉄啓恵さん、引地侑希さん、研究を遂行する上でマウスの管理や物品の管理、研究環境の整備など多方面でお世話になりました岳野なつきさん、望月美穂さん、和田祥佳さん、山本千夏さん、Uyen Thi Tranさん、下道朋絵さん、多田さつきさん、笹子由江さん、奥野さん、木村玲子さん、に心より感謝致します。

さらに、理化学研究所に出向いて研究することを承諾していただき学位取得までサポートしてくださいました新井洋由先生、有田誠先生に深く感謝致します。

理化学研究所で大学院生として研究をさせていただくにあたり、大学院生リサーチ・アソシエイト (JRA) として理化学研究所より待遇を受け研究させていただきましたことに御礼申し上げます。

学位審査にあたり、お忙しいところ審査に時間を割いてくださいました村田茂穂先生、池谷裕二先生、秋光信佳先生、河野望先生にも深く感謝いたします。

最後に、長い間学生として多大な支援をしてくださいました両親に深く御礼を申し上げ謝辞とさせていただきます。

平成28年1月8日

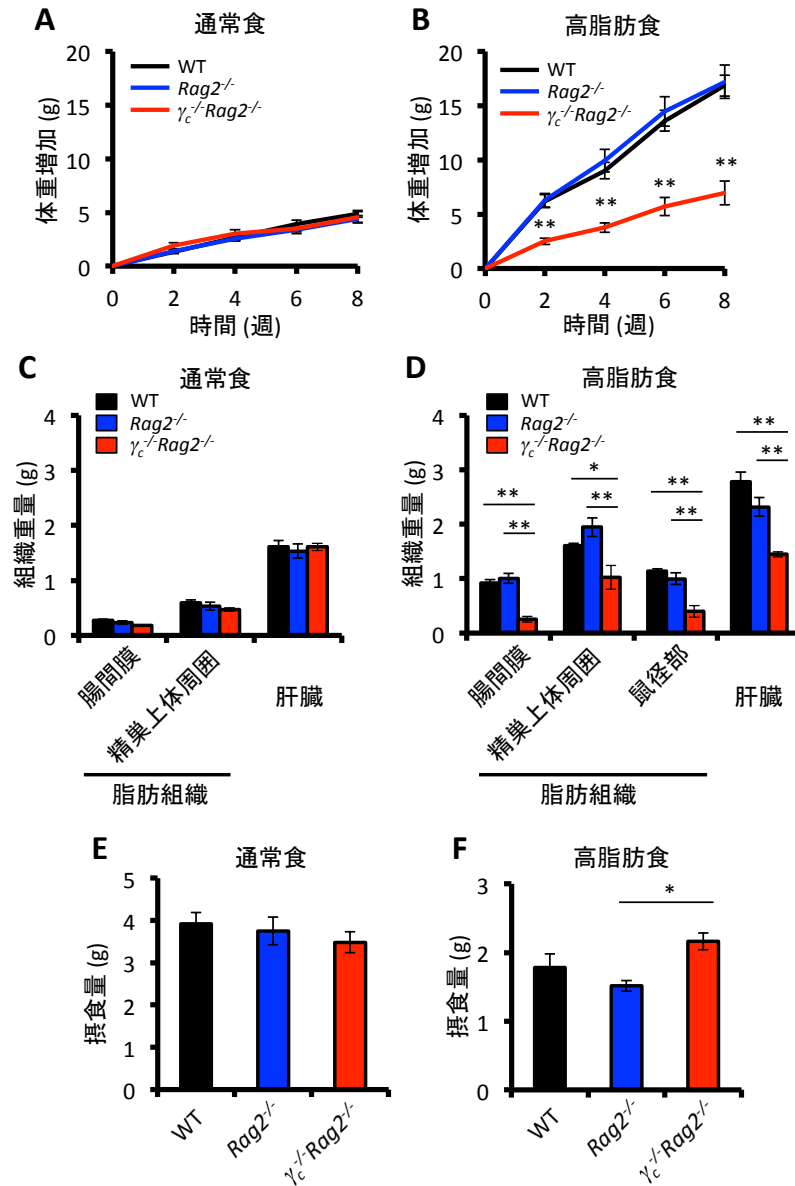


図 1. γ_c 鎖は食餌誘導性肥満の誘導に必要である。(A) 8 週齢より通常食で飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの体重を測定し、測定開始時を 0 として体重増加を求めた。(B) 7~10 週齢より高脂肪食で飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの体重増加を示した。(C) 通常食で飼育した 24 週齢の WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの組織重量を測定した。(D) 高脂肪食で 13 週間飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの組織重量を測定した。(E) 通常食で飼育した 20 週齢の WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの摂食量を測定した。(F) 高脂肪食で 12 週間飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの摂食量を測定した。(A、C、E)は N=4~5、(B、D、F)は N=7~10。データは平均 \pm 標準誤差で表示した。* p <0.05、** p <0.01。

高脂肪食

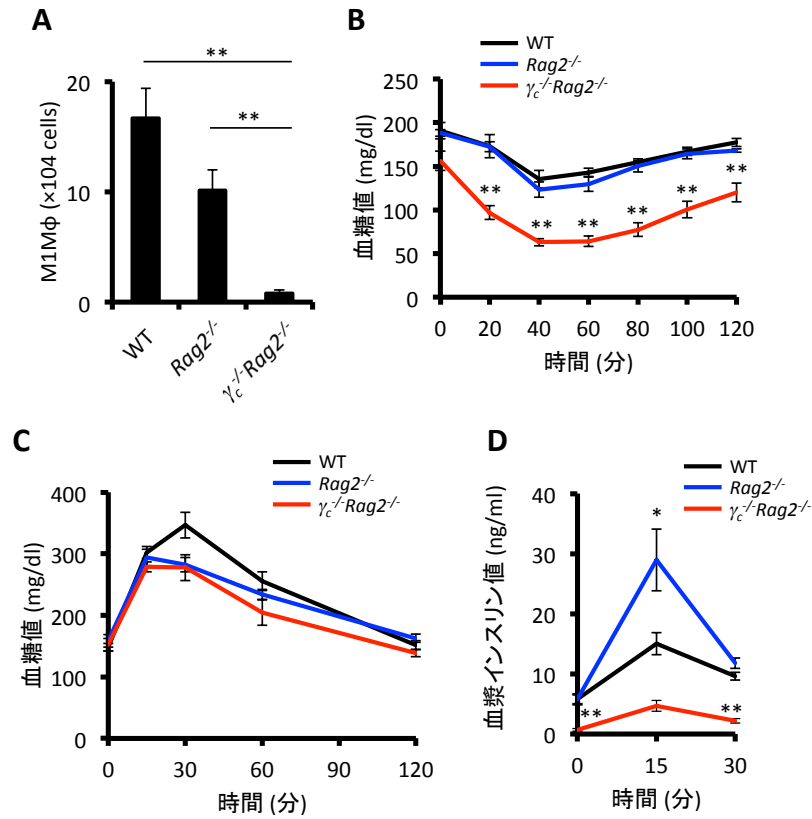


図 2. γ_c 鎖は肥満に伴うインスリン抵抗性の発症に必要である。(A) 7~10 週齢より高脂肪食で 13 週間飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウス (20~22 週齢) の精巣上体周囲の脂肪組織における $F4/80^+CD206^{low}CD11c^{high}$ M1M ϕ をフローサイトメトリーで解析し、細胞数を計算した。(B) 高脂肪食で 11 週間飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスにおける ITT の結果。4 時間絶食したマウスにインスリンを腹腔投与(0.75 mU/g 体重)し、0、20、40、60、80、100、120 分後の血糖値を測定した。(C、D) 高脂肪食で 11 週間飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスにおける OGTT の結果。16 時間絶食したマウスにブドウ糖水溶液を経口投与 (2 mg/g 体重) し、0、15、30、60、120 分後の血糖値を測定した (C)。これと同時に、0、30、60 分において血液を回収し、血漿インスリン値を ELISA で測定した (D)。(D) 高脂肪食で 13 週間飼育した WT、 $Rag2^{-/-}$ 、 $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの組織重量を測定した。N=7~10。データは平均 \pm 標準誤差で表示した。* p <0.05、** p <0.01。

通常食

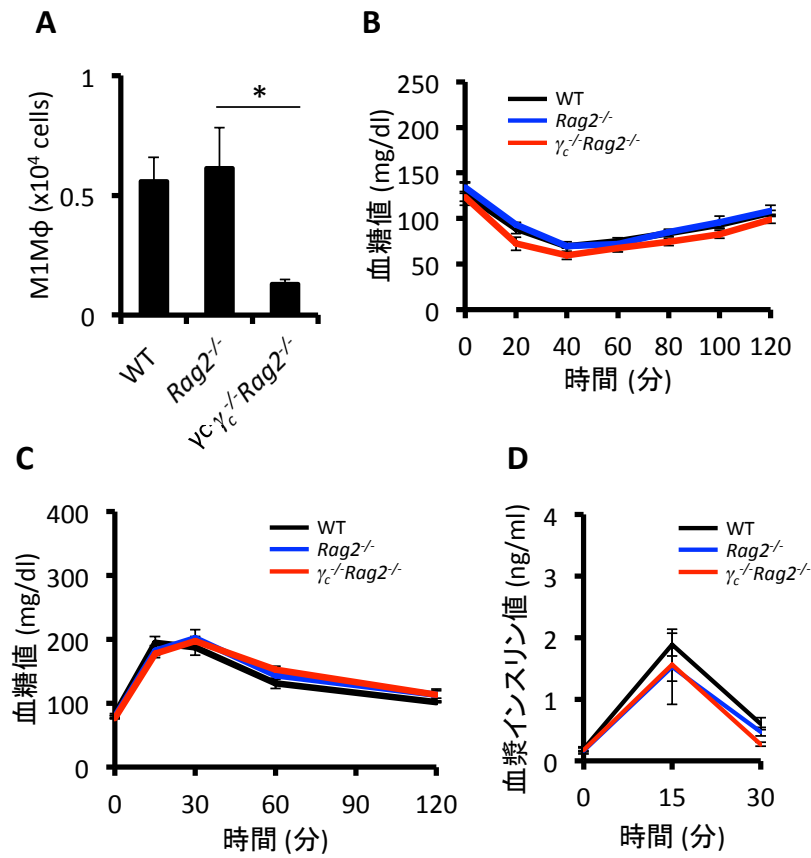


図 3. γ_c 鎖は通常食で飼育したマウスにおけるインスリン感受性と耐糖能に影響を与えない。(A) 7~8 週齢より高脂肪食で 12 週間飼育し続けた WT、Rag2^{-/-}、 γ_c ^{-/-}Rag2^{-/-}マウス (19~20 週齢)の精巣上体周囲の脂肪組織における F4/80⁺CD206^{low}CD11c^{high} M1Mφ の細胞数を測定した。(B) 通常食で飼育した 16~17 週齢の WT、Rag2^{-/-}、 γ_c ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスにおける ITT の結果。(C、D) 通常食で飼育した 17~18 週齢の WT、Rag2^{-/-}、 γ_c ^{-/-}Rag2^{-/-}マウスで行った OGTT における血糖値 (C) と血漿インスリン値 (D)を測定した。N=5~6。データは平均±標準誤差で表示した。*p<0.05、**p<0.01。

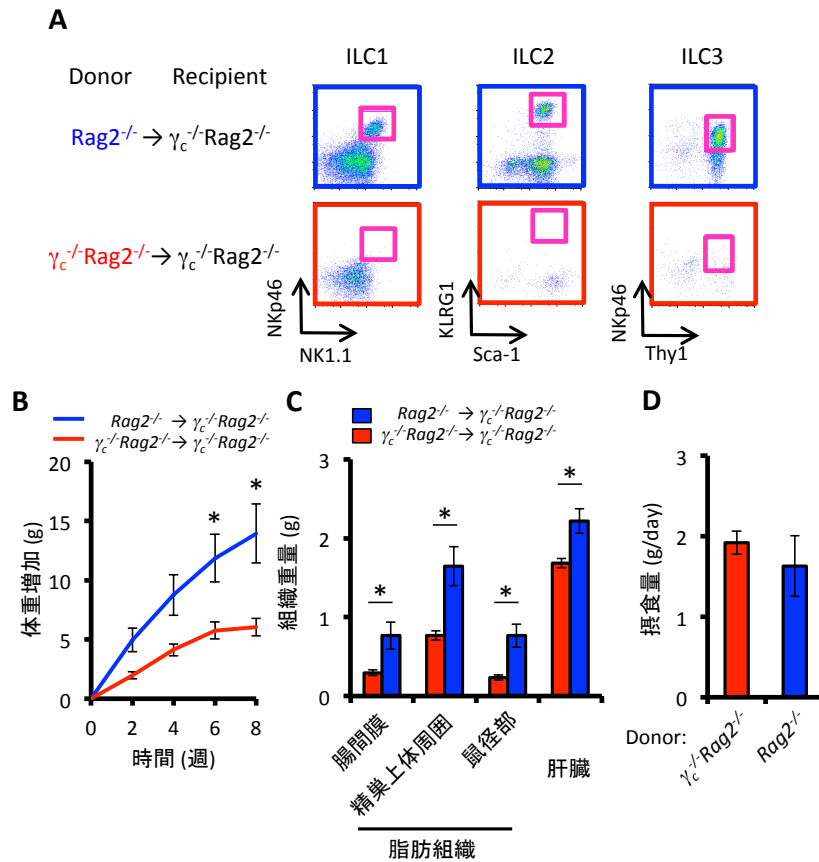


図 4. 自然リンパ球は肥満の誘導に必要である。(A) $Rag2^{-/-}$ マウスもしくは $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄細胞を6週齢の $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに尾静脈から移植し (1×10^7 cells /mouse)、13週間後に小腸粘膜固有層の $NK1.1^+NKp46^+$ ILC1、 $Lineage^-KLRG1^+Sca-1^+$ ILC2、 $Lineage^-KLRG1^-IL-7\alpha^+Thy-1^+NKp46^+$ ILC3 をフローサイトメトリーを用いて解析した。(B-D) $Rag2^{-/-}$ マウスもしくは $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄細胞を6週齢の $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに尾静脈から移植し (1×10^7 cells /mouse)、8週齢より高脂肪食で飼育したときの体重増加 (B)、11週間高脂肪食で飼育したときの組織重量 (C)、10週間高脂肪食で飼育したときの摂食量 (D)を測定した。N=5。データは平均 \pm 標準誤差で表示した。* $p < 0.05$ 。

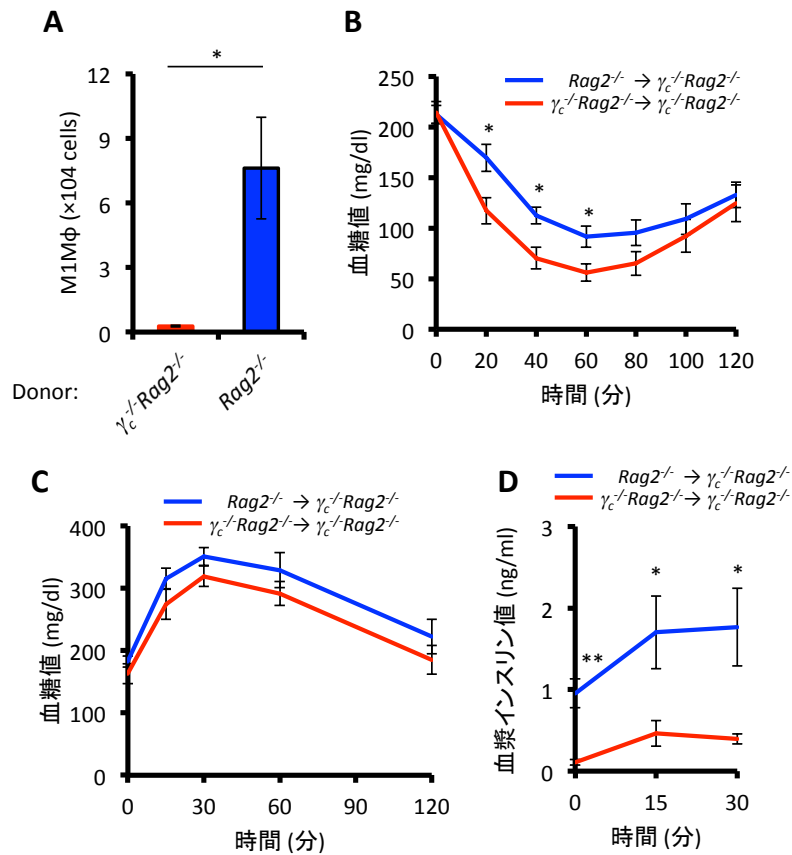


図 5. 自然リンパ球は肥満に伴うインスリン抵抗性の発症に必要である。(A) $Rag2^{-/-}$ マウスもしくは $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスの骨髄細胞を 6 週齢の $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに尾静脈から移植し (1×10^7 cells /mouse)、11 週間高脂肪食を与えた時の精巣上体周囲の脂肪組織における $F4/80^+CD206^{low}CD11c^{high}$ M1Mφ の細胞数を測定した。(B) (A)のマウスにおいて、高脂肪食で 8 週間飼育した後、ITT を行い、血糖値を測定した。(C、D) (A)のマウスにおいて、高脂肪食で 9 週間飼育した後、OGTT において血糖値 (C) と血漿インスリン値 (D)を測定した。N=5。データは平均±標準誤差で表示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

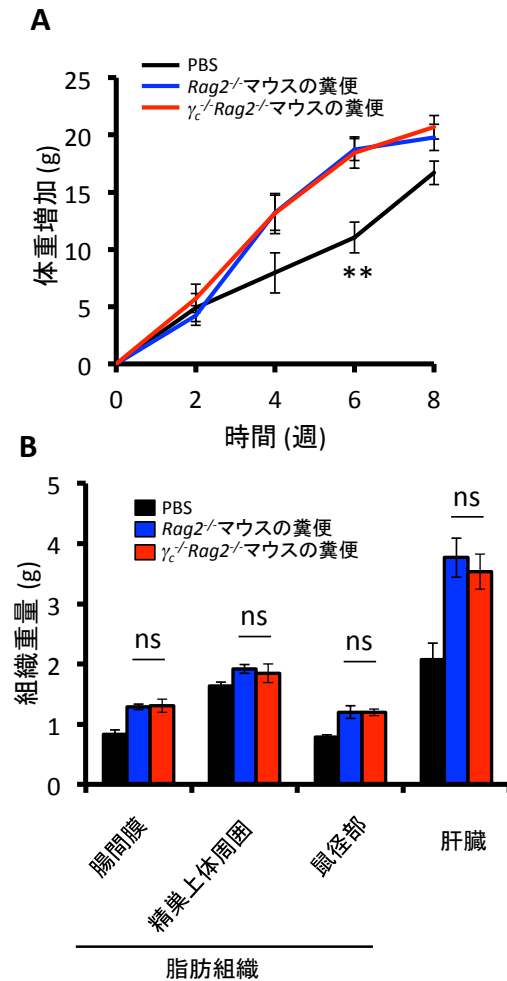


図 6. 自然リンパ球は腸内細菌の肥満誘導に影響しない。(A) 2ヶ月間高脂肪食で飼育した *Rag2*^{-/-}マウスもしくは γ_c ^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの糞便を回収して 8 週齢の野生型無菌マウスに経口から移植すると同時に高脂肪食負荷を行い体重増加をグラフ化した。(B) (A)のマウスを高脂肪食で 9 週間飼育した後、組織重量を測定した。N=5。データは平均±標準誤差で表示した。**p<0.01。ns は not significant の意。

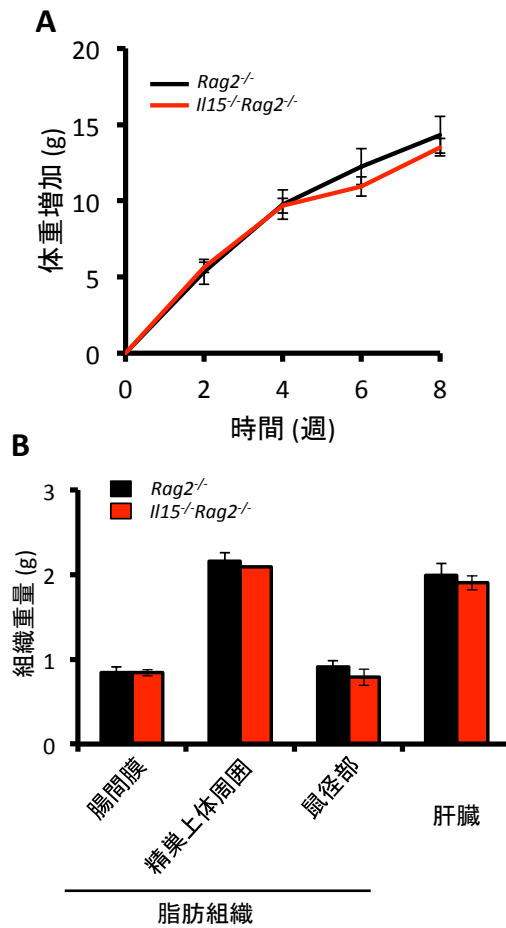


図 7. NK 細胞は肥満の誘導に無関係である。(A) 8 週齢より高脂肪食で飼育した *Rag2*^{-/-} マウスと *Il15*^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスの体重増加を測定した。(B) (A) のマウスを高脂肪食で 11 週間飼育した後、組織重量を測定した。N=4-5。データは平均±標準誤差で表示した。

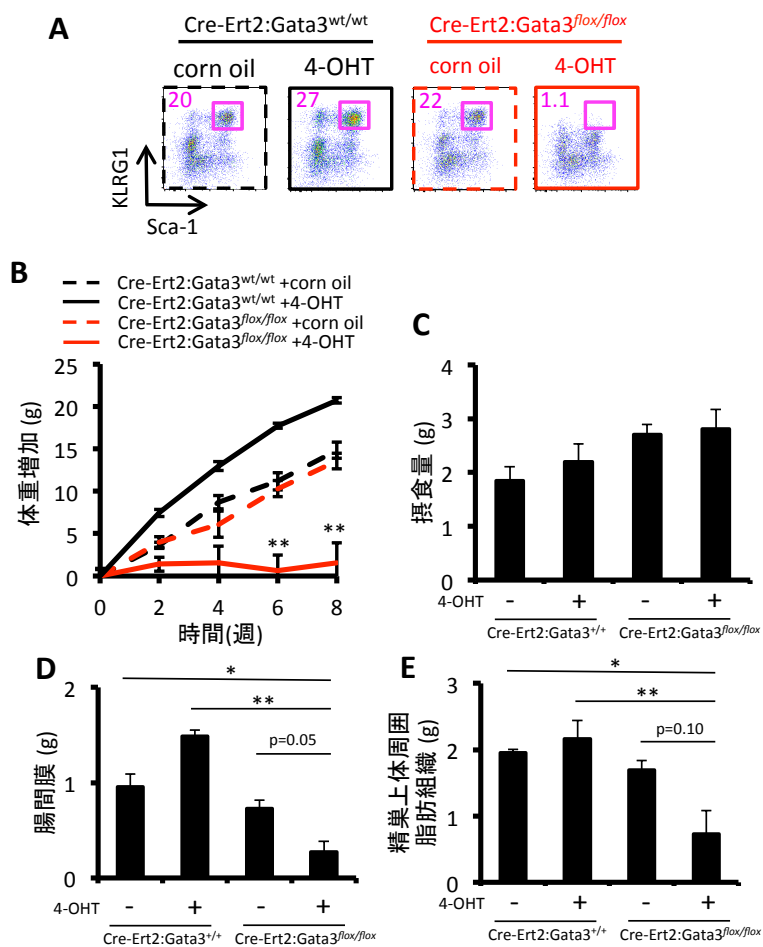


図 8. ILC2 は肥満の誘導に関与する。(A) *Cre-ERT2:Gata3^{flax/flax}* マウスもしくは *Cre-ERT2:Gata3^{+/+}* マウスに 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) を 3 日連続で腹腔投与 (1 mg/25g 体重/day) し、最後の投与から 2 週間後にフローサイトメトリーを用いて小腸粘膜固有層の ILC2 を解析した。(B) (A) のマウスについて、最後の投与から 1 週間後に高脂肪食負荷を行った時の体重増加を測定した。(C) (B) と同じマウスに高脂肪食を 9 週間負荷した後、摂食量を測定した。(D、E) (B) と同じマウスに高脂肪食を負荷して 11 週間後、腸間膜 (D) と精巣上体周囲の脂肪組織 (E) の組織重量を測定した。N=3-4。データは平均±標準誤差で表示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

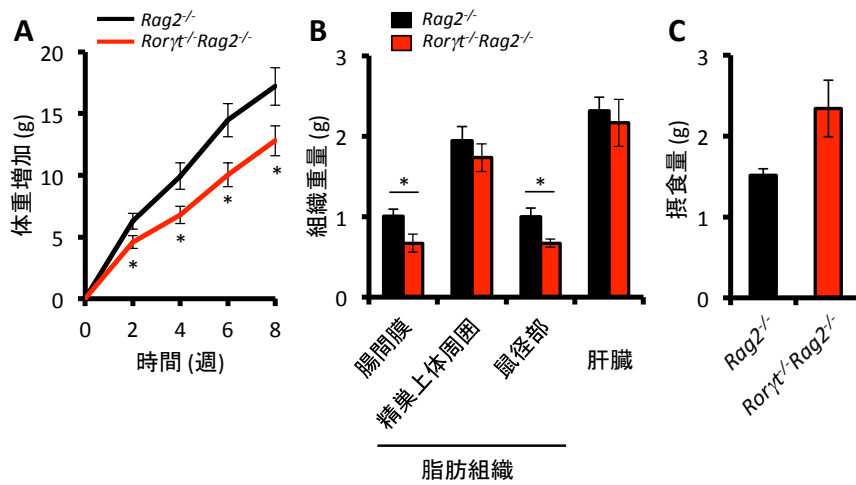


図 9. ILC3 は肥満の誘導に関与する。(A) 7~10 週齢の *Rag2*^{-/-}マウスと *Roryt*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスに高脂肪食を負荷したときの体重増加を測定した。(B) 高脂肪食で 13 週間飼育した *Rag2*^{-/-}マウスと *Roryt*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの組織重量を測定した。(C) 高脂肪食で 12 週間飼育した *Rag2*^{-/-}マウスと *Roryt*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの摂食量を測定した。N=7-8。データは平均±標準誤差で表示した。**p*<0.05。

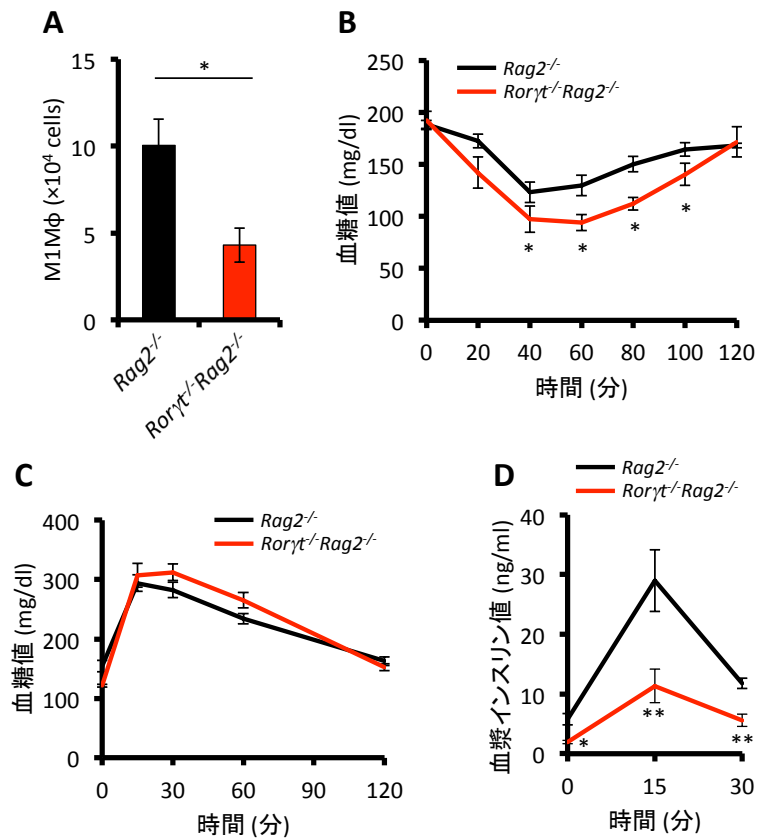


図 10. ILC3 は肥満に伴うインスリン抵抗性の発症に関与する。(A) 7~10 週齢の *Rag2*^{-/-} マウスと *Roryt*^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスに高脂肪食を 13 週間負荷した後、精巣上体周囲の脂肪組織の M1Mφ の細胞数を測定した。(B) 高脂肪食で 11 週間飼育した *Rag2*^{-/-} マウスと *Roryt*^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスを用いて ITT を行い、血糖値を測定した。(C、D) 高脂肪食で 11 週間飼育した *Rag2*^{-/-} マウスと *Roryt*^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスを用いた OGTT において、マウスの血糖値 (C) と血漿インスリン値 (D) を測定した。N=7-8。データは平均±標準誤差で表示した。*p<0.05。

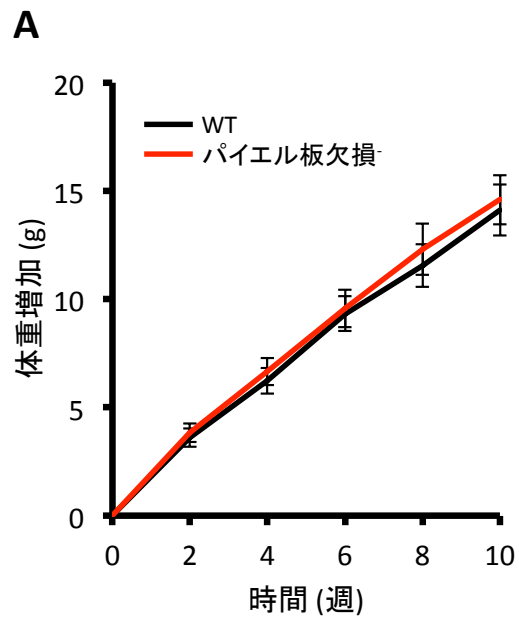


図 11. パイエル板は肥満の誘導に関与しない。(A) 野生型の妊娠マウス (E14.5) の尾静脈に抗 IL-7R α 抗体を投与 (2mg/mouse)して生まれた仔をパイエル板欠損マウスとして用いた。また同時に、抗体を投与していない妊娠マウスから生まれた仔をコントロールの野生型マウスとして用いた。これらのマウスに 8 週齢から高脂肪食を負荷して体重増加を測定した。

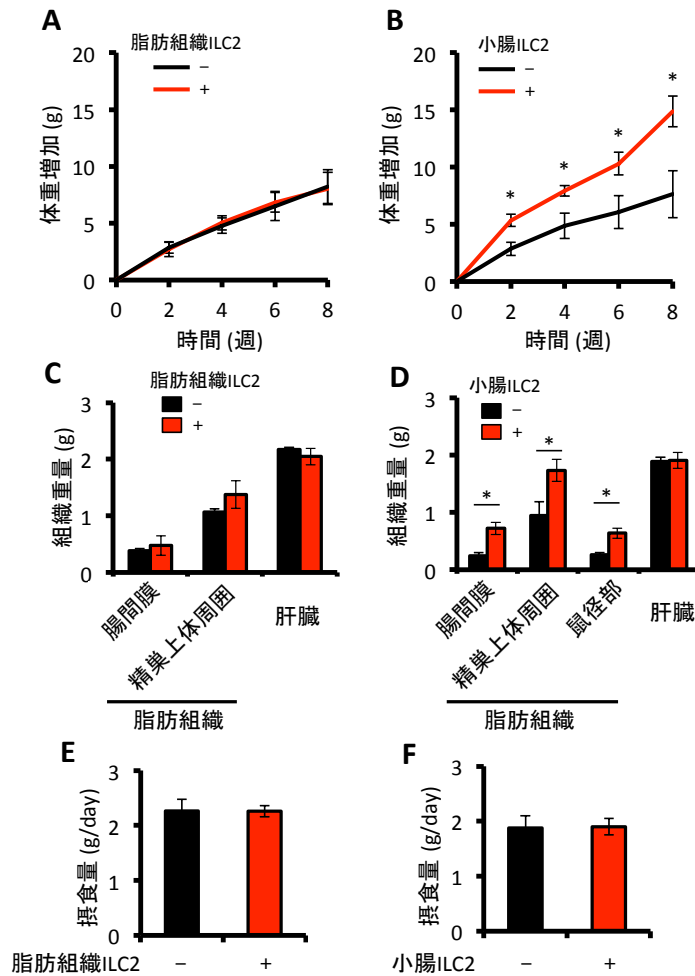


図 12. 脂肪組織の ILC2 ではなく小腸の ILC2 が肥満の誘導に関与する。(A) 脂肪組織の ILC2 (2.1×10^5 cells/mouse) を移植し、高脂肪食負荷を負荷した $\gamma_c^{-/-} Rag2^{-/-}$ マウスと移植していない $\gamma_c^{-/-} Rag2^{-/-}$ マウスの体重増加を測定した。(B) 小腸の ILC2 (2.1×10^5 cells/mouse) を移植し、高脂肪食負荷を負荷した $\gamma_c^{-/-} Rag2^{-/-}$ マウスと移植していない $\gamma_c^{-/-} Rag2^{-/-}$ マウスの体重増加を測定した。(C) (A) のマウスにおいて高脂肪食で 11 週間飼育したマウスの組織重量を測定した。(D) (B) のマウスにおいて高脂肪食で 11 週間飼育したマウスの組織重量を測定した。(E) (A) のマウスにおいて高脂肪食で 10 週間飼育したマウスの摂食量を測定した。(F) (B) のマウスにおいて高脂肪食で 10 週間飼育したマウスの摂食量を測定した。(A、C、E) は $N=5$ 、(B、D、F) は $N=5-6$ 。データは平均 \pm 標準誤差で表示した。* $p < 0.05$ 。

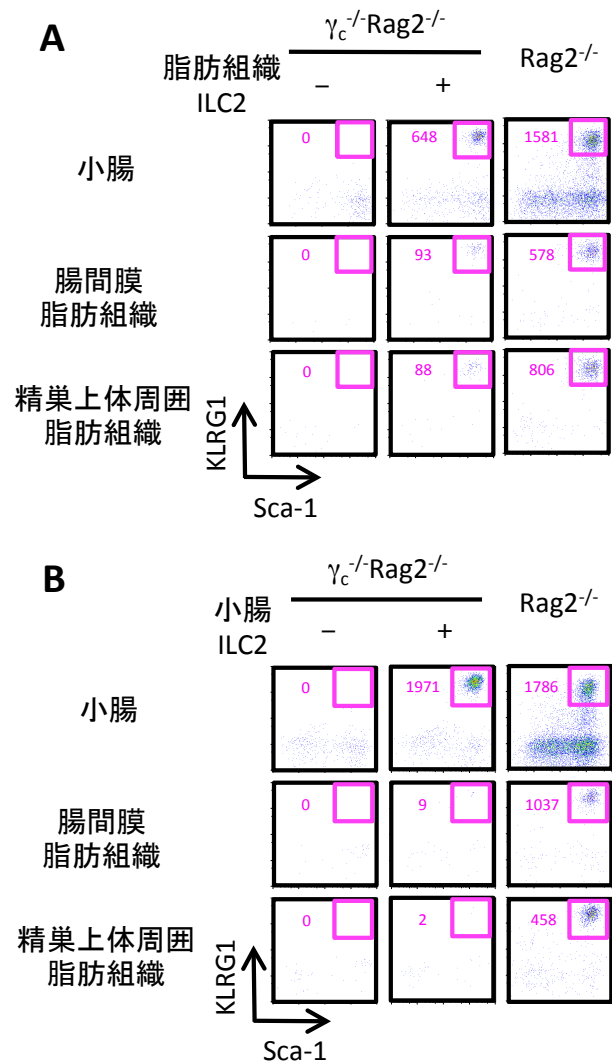


図 13. $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスに移植した脂肪組織の ILC2 と小腸の ILC2 は異なる臓器局在を示す。(A) 脂肪組織の ILC2 (2.1×10^5 cells/mouse) を移植した $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスと移植していない $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウス、Rag2^{-/-}マウスを高脂肪食で 11 週間飼育した後、小腸、腸間膜脂肪組織、精巣上体周囲脂肪組織の ILC2 をフローサイトメトリーを用いて解析した。(B) 小腸の ILC2 (2.1×10^5 cells/mouse) を移植し、高脂肪食で 11 週間飼育した $\gamma_c^{-/-}Rag2^{-/-}$ マウスを用いて (A)と同じ解析を行った。(A)と(B)いずれにおいてもすべてのサンプルにおいて、100000 個の細胞をフローサイトメトリーで取り込み、このうちの ILC2 の細胞数を数値として表示した。

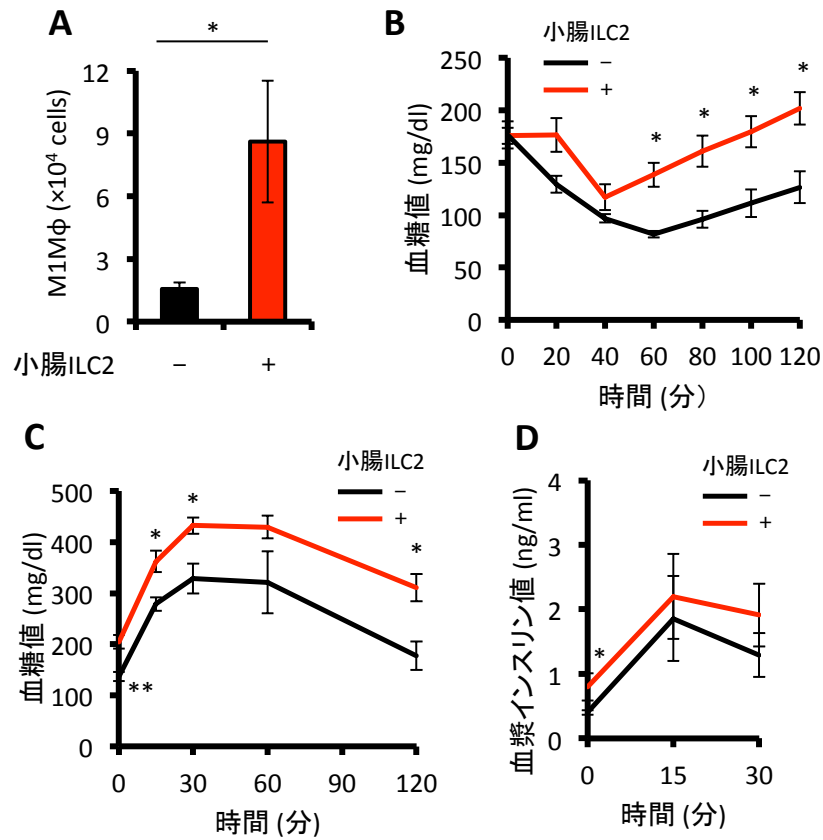


図 14. 小腸の ILC2 が肥満に伴うインスリン抵抗性の発症に関与する。(A) 小腸の ILC2 (2.1×10^5 cells/mouse) を移植した $\gamma_c^{-/-} Rag2^{-/-}$ マウスと移植していない $\gamma_c^{-/-} Rag2^{-/-}$ マウスを高脂肪食で 11 週間飼育したのち、精巣上体周囲の脂肪組織における M1Mφ の細胞数を測定した。(B) (A) のマウスについて、高脂肪食を 8 週間負荷した後、ITT を行い、血糖値を測定した。(C、D) (A) のマウスについて、高脂肪食を 9 週間負荷した後、OGTT を行い血糖値 (C) と血漿インスリン値 (D) を測定した。N=5。データは平均±標準誤差で表示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

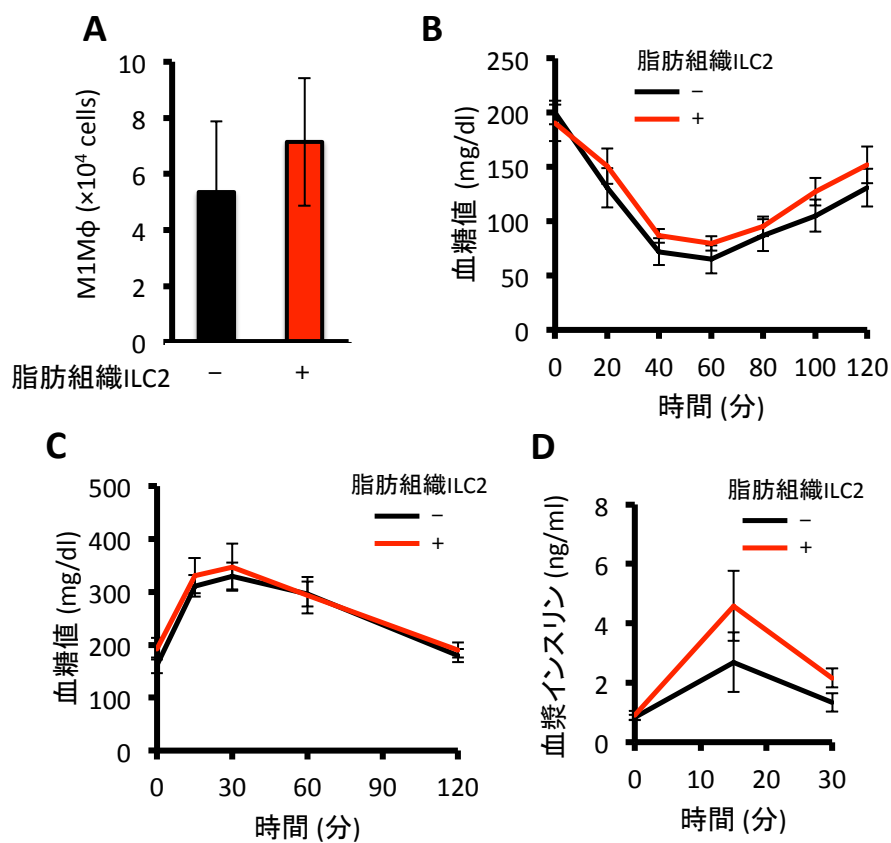


図 15. 脂肪組織の ILC2 はインスリン抵抗性の発症に関与しない。(A) 脂肪組織の ILC2 (2.1×10^5 cells/mouse) を移植し、高脂肪食を 11 週間負荷した $\gamma_c^+ Rag2^-$ マウスと移植していない $\gamma_c^+ Rag2^-$ マウスの精巣上体周囲の脂肪組織における M1Mφ の細胞数を測定した。(B) (A) のマウスについて、高脂肪食を 8 週間負荷したのち、ITT を行い、血糖値を測定した。(C、D) (A) のマウスについて、高脂肪食を 9 週間負荷した後、OGTT における血糖値 (C) と血漿インスリン値 (D) を測定した。N=5~6。データは平均±標準誤差で表示した。* $p < 0.05$ 。

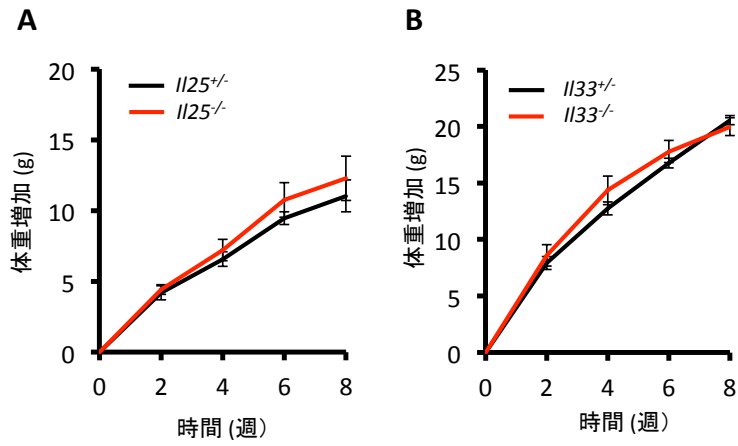


図 16. IL-25, IL-33 は肥満の誘導に関与しない。(A) 8~9 週齢の *Il25^{+/+}* マウスと *Il25^{-/-}* マウスに高脂肪食を負荷した時の体重増加を測定した。(B) 8 週齢の *Il33^{+/+}* マウスと *Il33^{-/-}* マウスに高脂肪食を負荷した時の体重増加を測定した。(A)は N=4~5、(B)は N=5~6。データは平均 ± 標準誤差で表示した。

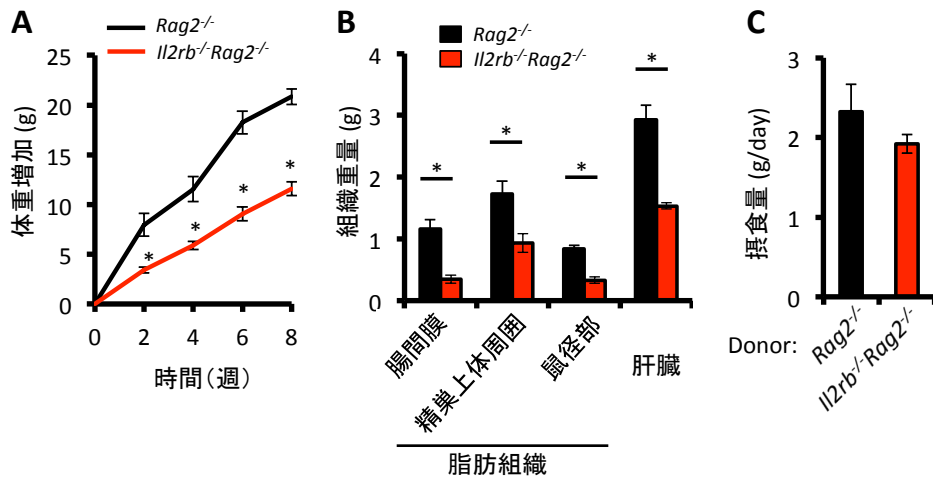


図 17. IL-2 が肥満の誘導に関与する。(A) 7~8 週齢の *Rag2*^{-/-}マウスと *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスに高脂肪食を負荷したときの体重増加を測定した。(B) 高脂肪食で 11 週間飼育した *Rag2*^{-/-}マウスと *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの組織重量を測定した。(C) 高脂肪食で 10 週間飼育した *Rag2*^{-/-}マウスと *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスの摂食量を測定した。N=4-5。データは平均±標準誤差で表示した。*p<0.05。

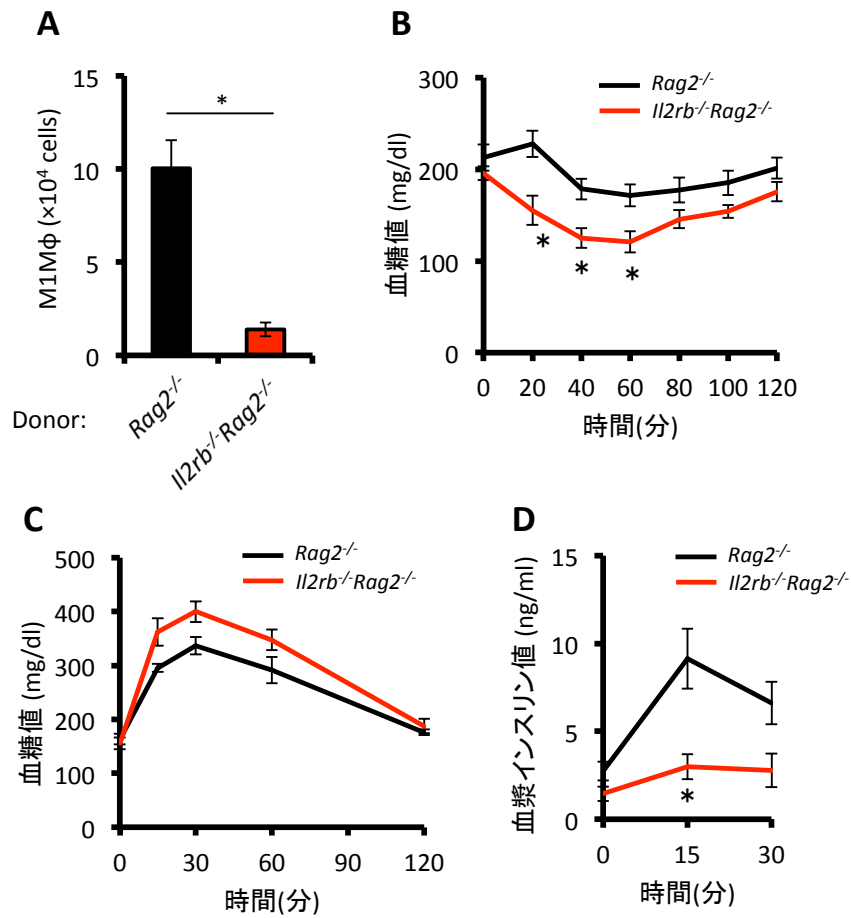


図 18. IL-2 は肥満に伴うインスリン抵抗性の発症に関与する。(A) 7~8 週齢の *Rag2*^{-/-} マウスと *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスに高脂肪食を負荷して 11 週間目における精巢上体周囲の脂肪組織中の M1Mφ の細胞数を測定した。(B) 高脂肪食で 8 週間飼育した *Rag2*^{-/-} マウスと *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスを用いて ITT を行い、血糖値を測定した。(C、D) 高脂肪食で 9 週間飼育した *Rag2*^{-/-} マウスと *Il2rb*^{-/-}*Rag2*^{-/-} マウスを用いた OGTT においてマウスの血糖値 (C) と血漿インスリン値 (D) を測定した。N=4-5。データは平均±標準誤差で表示した。*p<0.05。

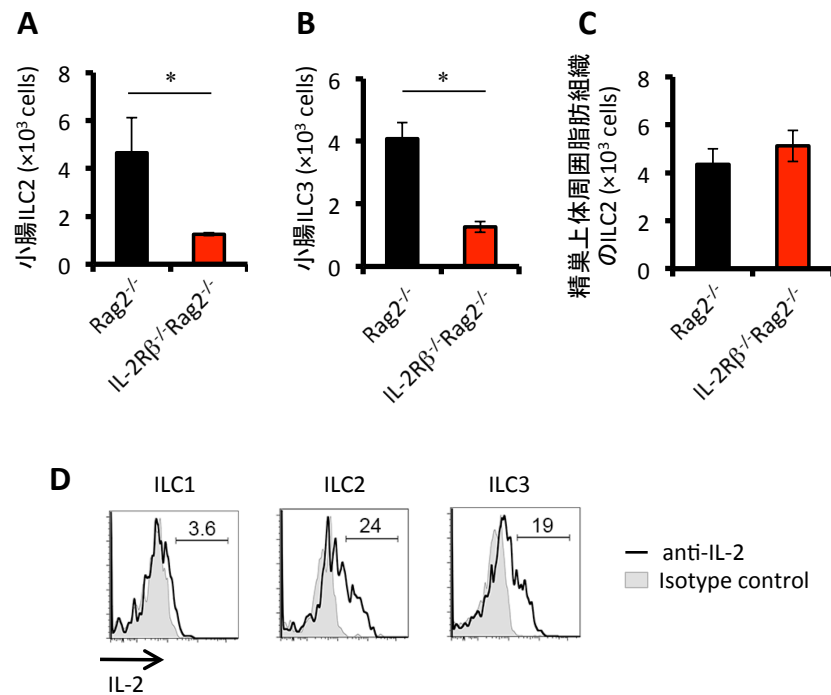


図 19. IL-2 は小腸の ILC2 と ILC3 の維持に働く。(A-C) 7~8 週齢より高脂肪食で 11 週間飼育した *Rag2*^{-/-} マウスと *Il2rb*^{-/-} *Rag2*^{-/-} マウスの小腸粘膜固有層における ILC2 と ILC3 の細胞数 (A, B) 及び、精巣上体脂肪組織における ILC2 細胞数 (C) を測定した。(D) 野生型マウスの小腸粘膜固有層の白血球 (3×10^5 cells) を Brefeldin A 存在下で PMA (30 ng/ml) とイオノマイシン (1 μ g/ml) で 3 時間刺激し、ILC1、ILC2、ILC3 における IL-2 タンパク質の産生をフローサイトメトリーを用いて解析した。