

## 論文の内容の要旨

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

### 【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治療が必要な疾患である。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肥満の誘導に重要であることが明らかにされている。腸内細菌は免疫系に様々な影響を与えることが知られているが、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成されていない。

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。一方、自然免疫系のリンパ球は自然リンパ球 (ILCs; innate lymphoid cells) と呼ばれ、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) 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 $\gamma$  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 に分類することができ、Th17 細胞と同様に IL-17 や IL-22 の産生を担う。グループ 1 自然リンパ球である 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。一方、ILC1 は Granzyme や Perforin を発現せず、細胞傷害性を持たず、IL-15 ではなく IL-7 依存的に分化する。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、現在総じて ILC2 と呼ばれている。ILC2 は IL-7 と転写因子 Gata3 を分化と維持に必要とし、IL-2 によって増殖すると共に、IL-2+IL-25 と IL-33 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。グループ 3 自然リンパ球は転写因子 Ror $\gamma$ t (Retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t)依存的に分化する。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 $\gamma$ 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。一方、ILC3 は腸管の恒常性維持とバリア機能の維持に働き、肥満の誘導にも関与することが報告されている。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報告がない。

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。

## 【方法と結果】

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*<sup>-/-</sup>マウス、獲得免疫と自然免疫の両方のリンパ球を欠損する  *$\gamma$ c*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスに高脂肪食を負荷した。その結果、*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスは野生型と同様に肥満になったのに対し、 *$\gamma$ c*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスは肥満に対する抵抗性を示した。また、インスリン抵抗性試験、耐糖能試験を行ったところ、*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスでは WT マウスと同様にインスリン抵抗性の発症が認められたのに対し、 *$\gamma$ c*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスではインスリン抵抗性が抑制されたことから、自然リンパ球が肥満の惹起とそれ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。自然リンパ球の関与を調べるため、*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスの骨髄細胞を  *$\gamma$ c*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスに移植したところ、このマウスでは自然リンパ球の再構成が認められるとともに、高脂肪食による肥満の誘導およびインスリン抵抗性の発症が回復した。このことから、肥満の誘導および肥満に伴うインスリン抵抗性の発症に自然リンパ球が関与すると結論した。

次に、どのグループの自然リンパ球が肥満の誘導に関与しているかについて解析を行った。その結果、NK 細胞を欠損した *Il15*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスは *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスと同様に肥満となったことから、NK 細胞は肥満の誘導に無関係であることが明らかとなった。

また ILC2 については、*Cre-ERT2:Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスに 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) を投与して *Gata3* の欠損を誘導することにより ILC2 を欠損させた。このマウスでは食餌誘導性肥満に抵抗性となったことから肥満の誘導における ILC2 の関与が示唆された。さらに、既報にあった ILC3 の関与についても ILC3 を欠損した *Roryt<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスに高脂肪食負荷を行って再現性を確かめたところ、ILC3 も報告通り肥満の誘導に関与することが確認できた。このマウスはインスリン抵抗性も抑制されたことから 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示唆された。ただし、*γc<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスが *Rag2<sup>-/-</sup>* 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<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスでは 5 グラム程度の抵抗性を見せたこと、*Roryt<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスと比較して 4-OHT を投与した *Cre-ERT2:Gata3<sup>flx/flx</sup>* マウスや *γc<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスの方がより肥満に抵抗性であったことから、肥満の誘導における ILC2 の関与についてさらに解析を行うことにした。

野生型マウスから脂肪組織もしくは小腸の ILC2 を単離して *γc<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* 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肥満の誘導が回復しなかったのに対し、小腸の ILC2 を移植したマウスでは肥満の誘導が回復したことから、小腸の ILC2 が肥満の誘導に関与することが明らかとなった。さらに、小腸の ILC2 を移植した *γc<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスでは肥満に伴うインスリン抵抗性の発症も回復した。移植した細胞の行方を追跡したところ。脂肪組織の ILC2 を移植した *γc<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスでは小腸と脂肪組織の両方において ILC2 が検出されたが、小腸の ILC2 を移植した *γc<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスでは小腸のみに ILC2 が検出され、脂肪組織ではほとんど ILC2 が検出されなかった。脂肪組織の ILC2 と小腸の ILC2 は両方とも小腸に局在できるが、小腸の ILC2 のみが肥満を誘導できることから、これらの細胞が機能的に異なっていることが示唆された。

肥満の誘導における ILC2 の関与が明らかとなったことから、ILC2 の増殖、活性化に働く IL-2, IL-25, IL-33 などのサイトカインの関与について調べた。これまでに、IL-25 の受容体サブユニットおよび IL-33 を欠損したマウスは肥満になりやすいと報告されていたが、我々の実験では *IL-25<sup>-/-</sup>*, *IL-33<sup>-/-</sup>* マウスは *Il25<sup>-/-</sup>*, *Il33<sup>-/-</sup>* マウスと同様に肥満になったことから、IL-25, IL-33 は肥満の誘導に無関係であることが示唆された。肥満に関する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、他のグループがどのようなコントロールを用いたかは定かではないが、*littermate* を用いた我々の実験は信憑性が高いと思われる。一方 IL-2 受容体の  $\beta$  サブユニットを欠損した *Il2rb<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>* マウスは *Rag2<sup>-/-</sup>* マウスと比較して肥満に抵抗性を示し、肥満に伴うインスリン抵抗性にもなりにくかったことから、獲得免疫系以外の細胞から供給される IL-2 が肥満の誘導とインスリン抵抗性の発症に関与することが明らかになっ

た。さらに高脂肪食を負荷した *Il2rb<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>*マウスでは *Rag2<sup>-/-</sup>*マウスと比べて小腸の ILC2, ILC3 の数が減少しており、IL-2 が小腸におけるこれらの細胞の維持に働くことが示唆された。

#### 【まとめと考察】

本研究では、IL-2 による ILC2, ILC3 の維持が肥満の誘導に関与することが示唆された。これまでに脂肪組織の ILC2 は IL-33 による活性化を受けて肥満を抑制する働きを有すると報告されてきたが、本研究では小腸の ILC2 が肥満の誘導に関与することが明らかとなった点で新規性がある。しかしながら、どのようなメカニズムで ILC2 が肥満を誘導するかについては未だ不明であり、今後の検討課題である。また、既報通り腸管に多く存在する ILC3 も肥満に関与することが確認できたが、ILC2 との関係についても興味もたれる。