

審査の結果の要旨

氏名 佐々木 崇晴

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、近年では腸内細菌叢と宿主の相互作用も肥満の誘導に重要であることが明らかとなっている。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 3 種類に分類されおり、グループ 1 自然リンパ球 (ILC1) 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 (ILC2) 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 (ILC3) 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。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。そこで本研究で佐々木は各種免疫細胞の欠損マウスを駆使し、肥満におけるリンパ球、特に ILC2 の関与の解明を目指した。

まず佐々木は、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、獲得免疫と自然免疫の両方のリンパ球を欠損する *g_c*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスに高脂肪食を負荷した。その結果、*Rag2*^{-/-}マウスは野生型と同様に肥満になったのに対し、*g_c*^{-/-}*Rag2*^{-/-}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*^{-/-}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、*g_c*^{-/-}*Rag2*^{-/-}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。次に自然リンパ球の関与を調べるため、*Rag2*^{-/-}マウスの骨髄細胞を *g_c*^{-/-}*Rag2*^{-/-}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。以上から、肥満の誘導およびインスリン抵抗性の発症に自然リンパ球が関与することを示した。

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*^{-/-}*Rag2*^{-/-}マウスは *Rag2*^{-/-}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*^{fl α /fl α} 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 *Rorgt^{-/-}Rag2^{-/-}* 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、*g_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、*Rorgt^{-/-}Rag2^{-/-}* マウスでは 5 グラム程度の抵抗性を見せたこと、*Rorgt^{-/-}Rag2^{-/-}* マウスと比較して 4-OHT を投与した *Cre-ERT2:Gata3^{flx/flx}* マウスや *g_c^{-/-}Rag2^{-/-}* 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った。

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 *g_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及びインスリン感受性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。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 *g_c^{-/-}Rag2^{-/-}* 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 *g_c^{-/-}Rag2^{-/-}* 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。

最後に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、活性化に働くサイトカインである IL-2, IL-25, IL-33 の関与について調べた。これらサイトカインの受容体欠損マウスを解析した結果、IL-2 受容体の β サブユニットを欠損した *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^{-/-}Rag2^{-/-}* マウスでは *Rag2^{-/-}* 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。

本研究により佐々木は、IL-2 による ILC2, ILC3 の維持が肥満の誘導に関与することを明らかとした。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しており、脂肪組織の ILC2 と小腸の ILC2 の性質が異なることを示した点で新規性がある。本研究により、リンパ球による全く新しい肥満誘導機構を明らかにしたという点でも意義深い。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。