

気道炎症における 2 型自然リンパ球の維持及び活性化  
に対する局所インターロイキン 7 の機能に関する研究

2 0 2 2

高見 大地

## 目次

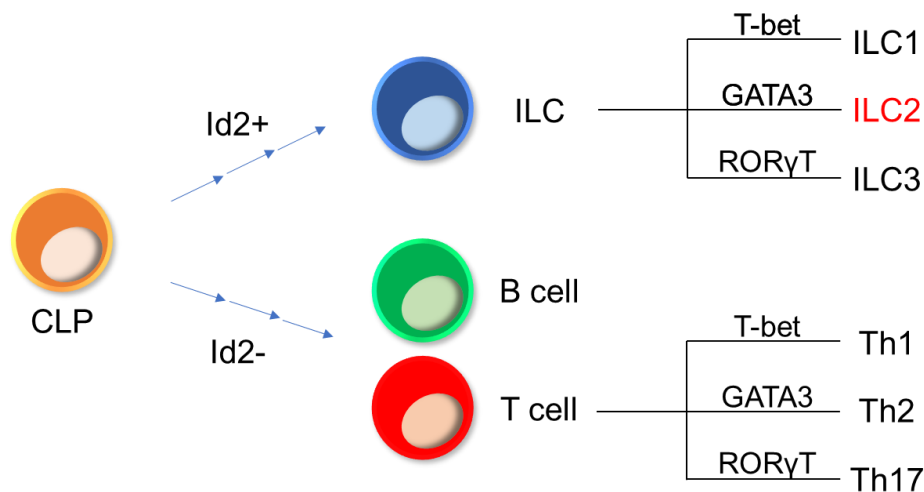
略語表	3
序論	4
第1章 IL-7 産生細胞の同定と ILC2 に対する肺局所 IL-7 の機能解明	8
第2章 IL-5-Venus レポーターマウスを用いた肺 ILC2 の局在変化解析	10
結論	11
実験材料と方法	12
謝辞	17
参考文献	18

略号表

ANOVA	analysis of variance
cKO	conditional knock-out
CLP	common lymphoid progenitor
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
HDM	house dust mite
IL	interleukin
IL-7R	interleukin-7 receptor
ILC2	group 2 innate lymphoid cell
NFIL-3	nuclear factor, IL-3-regulated
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
RNA-seq	RNA-sequencing
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCR	T-cell receptor
Th2	type 2 T helper
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

## 序論

生物は細菌やウイルスなどの病原微生物に曝露され、常に感染の危険にさらされている。我々に元来備わっている免疫機構は、外敵の侵入を防ぎ、侵入後に排除し、破壊された組織を修復する、優れた防御システムである。免疫応答には、抗原の曝露に対して速やかに起こる自然免疫応答と、比較的時間のかかる適応免疫応答がある。自然免疫応答は、マクロファージや樹状細胞、顆粒球などの骨髄系細胞が中心となり、パターン認識受容体と呼ばれる多様性のない自然認識受容体を発現し、単純な分子や病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識し、サイトカインやケモカインを産生することによって炎症反応を誘導する。一方、適応免疫応答は、B 細胞と樹状細胞などの抗原提示によって活性化される T 細胞が、個々の病原体の構造を認識する抗原 T 細胞受容体 (TCR) を用いて、特異的に異物を排除する。近年、自然免疫応答を担う細胞の一つとして、自然リンパ球 (ILC) が同定された。ILC は、T 細胞や B 細胞と同じ前駆細胞であるリンパ球性共通前駆細胞 (CLP) から分化し、ヘルパーT細胞の分化と同様の転写因子によって分化する特徴を持つ (Fig. 0-1)。一方で適応免疫系である T 細胞とは異なり、ILC は小腸、肺、皮膚、肝臓などの末梢組織に常在し異物侵入後の初期の生体防御を担う(1)。

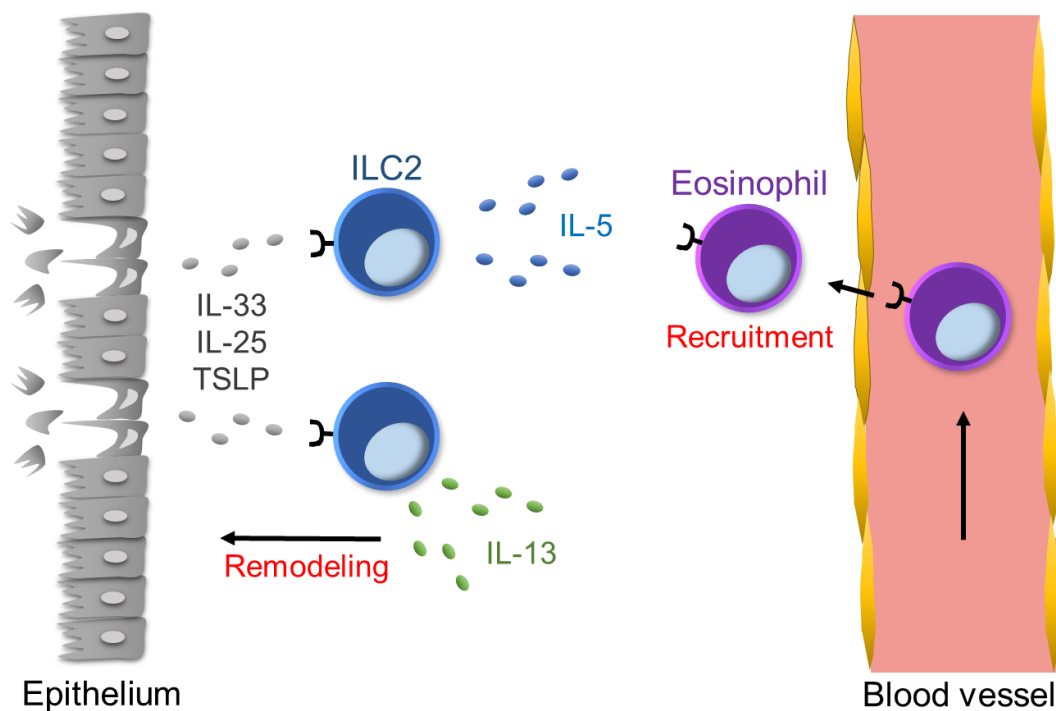


**Fig. 0-1** ILC は CLP から分化し、ILC サブタイプはヘルパーT細胞サブセットの分化と同様の転写因子によって制御される

ILC の中でも、アレルギーや喘息、寄生虫感染時に応答する自然リンパ球は 2 型自然リンパ球 (ILC2) と呼ばれている(2)。ILC2 は肺、皮膚、腸管などに常在し、外敵の侵入に

迅速に応答し活性化される(3,4)。活性化 ILC2 は IL-5、IL-13 などの 2 型サイトカインを産生し、好酸球を遊走させ炎症を引き起こす一方で、組織リモデリングを誘導する(2,5) (Fig. 0-2)。ILC2 は 2 型ヘルパーT (Th2) 細胞と同様に 2 型サイトカインを産生するが、Th2 細胞が TCR のシグナルによって活性化されるのに対して、ILC2 は炎症性サイトカイン IL-33、TSLP、IL-25 に反応して活性化されるという点で異なる(2,5-7)。

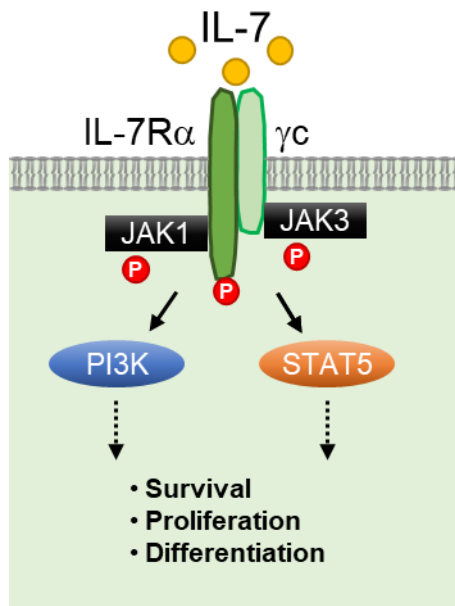
呼吸器系である肺は、外界と接するがゆえに外敵に暴露されやすい臓器の一つである。肺では緻密な免疫機構が構築されているが、外敵を排除する過程で免疫系が過度に活性化し、組織に傷害を与えてしまうことがある。気道炎症は主に Th2 細胞や ILC2 が産生する 2 型サイトカインとそれによる好酸球の流入によって炎症が起こる病態である。ILC2 は肺実質に常在し、上皮細胞が産生する炎症性サイトカインからのシグナルを受けて活性化され、2 型サイトカインを産生することで炎症を誘発する (Fig. 0-2)。ILC2 は定常状態において



**Fig. 0-2** ILC2 は上皮細胞から産生されたサイトカインによって IL-5 や IL-13 を産生し炎症を惹起する気管支近傍に局在しており(5,8,9)、上皮細胞からのシグナルに迅速に応答することができる。一方で、Th2 細胞が大量の 2 型サイトカインを産生する喘息などのアレルギー性気道炎症では、ILC2 が Th2 細胞の 2 型サイトカイン産生を増強する機能を持つことが報告されてきており(10,11)、ILC2 の役割や局在は解明されていないことが多い。

IL-7 は T 細胞や B 細胞、ILC の分化や維持に必須のサイトカインである。IL-7 は骨髄や

胸腺でそれぞれ B 細胞、T 細胞の初期分化を促進し(12,13)、末梢組織ではナイーブ T 細胞及びメモリーT細胞の恒常性を維持する(14,15)。T 細胞や B 細胞、ILC などのリンパ球は、IL-7 欠損マウスや IL-7 受容体 (IL-7R) 欠損マウスにおいて劇的に減少する(16,17)。IL-7R は IL-7R $\alpha$ 鎖と共通 $\gamma$ 鎖のヘテロ二量体から構成されている。IL-7 は IL-7R に結合すると、JAK1 及び JAK3 チロシンキナーゼを活性化し、リン酸化を介して STAT5 及び PI3K を活性化する(18,19)。STAT5 や PI3K はリンパ球の増殖、生存、分化に関連したシグナルを伝達する(18) (Fig. 0-3)。リンパ組織においては、IL-7 は骨髄間葉系細胞、胸腺上皮細胞、リンパ管内皮細胞、細網線維芽細胞などのストローマ細胞によって産生される(20)。末梢組織においては、皮膚ではリンパ管内皮細胞、腸管ではリンパ管内皮細胞及び上皮細胞によって IL-7 が産生される(20)。肺においては、リンパ管内皮細胞から産生された IL-7 が、アレルギー性気道炎症において、組織常在性メモリーTh2 細胞の維持を促進することが報告されている(21)。しかしながら、肺においてリンパ管内皮細胞以外に IL-7 産生細胞が存在する



のか、各ストローマ細胞の IL-7 産生量の比較の詳細がどうなっているのかは明らかになっていない。

**Fig. 0-3** IL-7 は JAK-STAT、PI3K 経路を介して細胞の維持や分化を促進する

ILC2 は IL-7R を高発現し、分化(2,22,23)や維持(2,10,23,24)に IL-7 を必要とする。IL-7KO や IL-7RKO マウスにおいて ILC2 が消失することから、生体内では骨髄における分化の段階に IL-7 が必要であることが報告されている(2)。骨髄の IL-7 は ILC2 の分化の転写因子である NFIL-3 の発現を誘導することによって CLP から ILC2 への分化を制御する(23,25)。さ

らに、ILC2の培養ではIL-7を加えることによって細胞数が維持され、2型サイトカイン産生を助けることも報告されている(2,5)。したがって、生体内ではILC2は肺や腸管などの末梢組織に常在しているため、組織局所で産生されたIL-7が末梢ILC2の維持や活性化を促進していることが予想される。しかしながら、局所のIL-7がILC2に対してどのような影響を及ぼしているのかは明らかになっていない。

本研究では、まず肺ILC2に対する局所IL-7の機能を明らかにすること、肺ILC2の局在微小環境を明らかにすることを目的として遺伝子改変マウスを用いた免疫学的研究を行い、以下の新知見を得た。

第1章では、まず肺におけるIL-7産生細胞を同定し、続いて細胞特異的IL-7欠損マウスの解析によって、パパインによる急性気道炎症時には気管支肺胞上皮細胞由来のIL-7がILC2の活性化を促進し、イエダニ(HDM)抗原によるアレルギー性気道炎症時にはリンパ管内皮細胞由来のIL-7がILC2の維持を促進していることが明らかになった。

したがって、炎症状態の違いによってILC2の肺での局在が変化している可能性が考えられた。そこで第2章では、IL-5-Venusレポーターマウスを用いてパパイン及びHDMによる気道炎症を誘導し、ILC2の局在を解析した。ILC2は定常状態やパパインによる急性気道炎症時には肺上皮細胞近傍に局在し、HDMによるアレルギー性気道炎症時にはリンパ管近傍に局在していることが明らかになった。また、ILC2の局在は、ケモカイン受容体であるCCR2及びCCR4によって制御されていることが示唆された。CCR2、CCR4それぞれのリガンドであるCCL2、CCL17の抗体を投与した実験においては、ILC2の局在変化が消失した。以上の結果から、ILC2は急性気道炎症時にCCR4発現を上昇させ気管支上皮近傍に局在し、アレルギー性気道炎症時にCCR2発現を上昇させリンパ管近傍に局在するということが明らかになった。

これらの研究成果について、以下に論述する。

## 第1章

### IL-7 産生細胞の同定と ILC2 に対する肺局所 IL-7 の機能解明

IL-7 はリンパ球を分化、維持するサイトカインとして知られており(19,20)、近年では ILC の分化と維持も促進することが報告されてきた(2,26)。ILC は末梢組織に常在し抗原に対して初期に迅速に応答する役割を担うが、その中でも ILC2 は抗原が侵入する頻度の高い肺組織に常在することが知られている(2)。ILC2 は IL-7KO マウスや IL-7RKO マウスではほぼ消失し、IL-7 を添加し培養すると ILC2 が増殖及び維持されることが報告されている(2,5,10)。これらの知見から、ILC2 は生体内において分化段階に IL-7 が必要であること、培養系において ILC2 の増殖と維持に IL-7 が必要であることが明らかにされている。しかしながら、ILC2 は組織常在性であるので、骨髄や培養系だけではなく末梢の微小環境におけるサイトカインの作用を評価することが重要である。末梢に常在する ILC2 は、末梢の微小環境における IL-33、IL-25、TSLP などの様々なサイトカインによって維持され機能を発揮しているが(2,5,6)、ILC2 が局所でどのような IL-7 の作用を受けているかは明らかになっていない。また、近年では ILC2 が 2 型サイトカインを産生するだけでなく、アレルギー性気道炎症において ILC2 が抗原提示細胞として働き、Th2 細胞の 2 型サイトカイン産生を増強するという報告もある(11)。したがって、肺局所における IL-7 の機能を定常状態だけでなく気道炎症においても明らかにする必要がある。

本章では、まず IL-7-GFP レポーターマウスを用いて肺における IL-7 産生細胞を同定した。その結果、気管支上皮細胞、2 型肺胞上皮細胞、リンパ管内皮細胞が IL-7 を産生していることが明らかになった。また、肺ストローマ細胞のシングルセル RNA-seq 解析でもリンパ管内皮細胞が IL-7 を高発現し、気管支上皮細胞が IL-7 を低発現していることが明らかになった。そして、細胞特異的な IL-7 欠損 (IL-7 コンディショナルノックアウト: IL-7 c KO) マウスを用いて、肺の局所で産生された IL-7 が ILC2 に対して及ぼす作用を定常状態と炎症状態において評価した。定常状態では、肺の局所で産生された IL-7 は ILC2 の維持に必要不可欠ではないことが示唆された。ILC2 を活性化するモデルとして、パピンをを用いた急性気道炎症を誘導したマウスを解析したところ、気管支上皮細胞由来の IL-7 が ILC2 の活性化を促進することが示唆された。さらに、Th2 細胞が主に 2 型サイトカインを産生するようなアレルギー性気道炎症を、HDM を用いて誘導し解析を行った。その結果、リンパ管内皮細胞由来の IL-7 が ILC2 の維持を亢進していることが示唆された。急性気道炎症は抗 IL-7 抗体の投与によって減弱し、IL-7 抗体が ILC2 の活性化を抑制することが明



らかになった。次に、Th2 細胞が主に 2 型サイトカインを産生するようなアレルギー性気道炎症を、HDM を用いて誘導し解析を行った。その結果、リンパ管内皮細胞由来の IL-7 が ILC2 の維持を亢進していることが示唆された。

これらの結果から、肺局所における IL-7 は ILC2 の活性化及び維持を促進していることが明らかになった。急性気道炎症において気管支上皮細胞が産生する IL-7 が ILC2 の活性化を促進し、アレルギー性気道炎症においてリンパ管内皮細胞が産生する IL-7 が ILC2 の維持を促進することが明らかになった。

## 第2章

### IL-5-Venus レポーターマウスを用いた肺 ILC2 の局在変化解析

第1章ではパパインによる急性気道炎症時には気管支肺胞上皮細胞由来の IL-7 が ILC2 の活性化を促進し、HDM によるアレルギー性気道炎症時にはリンパ管内皮細胞由来の IL-7 が ILC2 の維持を促進することを明らかにした。したがって、炎症状態の違いによって ILC2 は異なる細胞種由来の IL-7 に依存して活性化あるいは維持されていることが示唆された。その理由の一つとして考えられるのが、ILC2 の肺における局在がパパイン誘導性の急性気道炎症では気管支上皮近傍に、HDM によるアレルギー性気道炎症時にはリンパ管近傍に、変化している可能性である。

先行研究では、定常状態において肺 ILC2 は気管支や太い血管、リンパ管近傍に局在することが報告されている(5,8,9)。また、炎症状態においても血管周囲や気管支周囲の領域に局在することが報告されている(27,28)。しかしながら、定常状態や炎症状態における肺 ILC2 の局在の違いはこれまで詳細に比較されていない。また、どのような生理活性物質によって ILC2 の局在が制御されているのかほとんど明らかになっていない。

本章では ILC2 を部分的に標識することができる IL-5-Venus レポーターマウス(9,29)を用いて、定常状態、パパインによる気道炎症、HDM による気道炎症における ILC2 の局在を定量的に解析し比較評価した。さらに ILC2 の局在に重要なケモカイン受容体を特定し、ILC2 の局在が気道炎症に与える影響を評価した。その結果、ILC2 は定常時及び急性気道炎症において気管支近傍に局在し、アレルギー性気道炎症においてリンパ管近傍に局在していることが明らかになった。また、急性気道炎症と慢性気道炎症における気管支肺胞洗浄液中の ILC2 の RNA-seq データ(30)を再解析したところ、急性気道炎症における ILC2 の CCR4 が上昇し、一方で慢性気道炎症における ILC2 の CCR2 が高発現していた。同様に、パパインによる急性気道炎症では *Ccr4* 発現が上昇し、HDM によるアレルギー性気道炎症では *Ccr2* が高発現していた。CCR4 のリガンドである CCL17 を遮断する抗体を投与したところ、パパインによる急性気道炎症で気管支近傍への局在の偏向が消失した。また、CCR2 のリガンドである CCL2 を遮断する抗体を投与したところ、HDM によるアレルギー性気道炎症においてリンパ管近傍への局在の偏向が消失した。

これらの結果より、ILC2 は急性気道炎症において CCR4 の発現を上昇させ気管支近傍に局在し、アレルギー性気道炎症において CCR2 の発現を上昇させリンパ管近傍に局在することが明らかになった。

## 結論

本研究では、肺微小環境から産生された IL-7 が肺に常在する ILC2 に対して与える影響、及び ILC2 の肺における局在変化を、定常状態と炎症状態で評価し、以下の新知見を得た。

第 1 章では、肺上皮細胞特異的な IL-7cKO マウス及びリンパ管内皮細胞特異的な IL-7cKO マウスを用いて ILC2 の機能や細胞数、遺伝子発現変化を解析した結果、急性気道炎症において肺上皮細胞由来の IL-7 が ILC2 の活性化を促進しており、アレルギー性気道炎症においてリンパ管内皮細胞由来の IL-7 が ILC2 の肺での維持を促進していることが明らかになった、また、抗 IL-7 抗体を投与すると ILC2 の活性化が抑制され、急性気道炎症が減弱する効果が認められた。

第 2 章では、急性気道炎症とアレルギー性気道炎症において、ILC2 が依存する IL-7 が異なる細胞種由来であるという点に着目し、ILC2 の局在を定量的に比較した。その結果、ILC2 は定常時及び急性気道炎症において気管支近傍に局在し、アレルギー性気道炎症においてリンパ管近傍に局在していることが判明した。また、急性気道炎症時の ILC2 では CCR4 の発現が上昇し気管支近傍に誘引され、一方、アレルギー性気道炎症時の ILC2 では CCR2 の発現が上昇しリンパ管近傍に誘引されることが示唆された。

以上から、本研究で、ILC2 の肺における維持や機能が、局所の IL-7 によって促進されることを明らかにした。また、ILC2 はケモカイン受容体 CCR4 及び CCR2 によって肺における局在が変化、制御されることを明らかにした。これらの知見は、気管支喘息をはじめとした ILC2 が関連する肺気道炎症疾患の病態の解明や IL-7 及び ILC2 を標的にした薬剤の創成に寄与することが期待される。

## 実験材料と方法

### マウス

C57BL/6 マウスは日本 SLC 株式会社から購入した。8 週~12 週齢の C57BL/6 マウスを解析に用いた。IL-7<sup>GFP/+</sup> マウス及び IL-7<sup>flox/flox</sup> マウスは我々の研究室で作製されたものを用いた。IL-5<sup>Venus/+</sup> ノックインマウスは理研 BRC から入手した。Sftpc-Cre (SPC-Cre) マウス及び Lyve1-Cre マウスは、それぞれ尾池雄一博士（熊本大学）及び Jason Cyster 博士（カリフォルニア大学サンフランシスコ校）から提供された。すべてのマウスは京都大学医生物学研究所感染症モデル研究センターの SPF 環境下で維持されたものを用いた。また、すべてのマウス実験は京都大学動物実験委員会の承認を得ており、「京都大学における動物実験実施に関する規定」に従って行った。

### 抗体及びフローサイトメトリー

以下の蛍光色素またはビオチンが標識された抗体を用いた：CD3 $\epsilon$  (145-2C11)、CD4 (RM4-5)、CD8 $\alpha$  (53-6.7)、NK1.1 (PK136)、CD11b (M1/70)、CD11c (N418)、Gr-1 (RB6-8C5)、CD45 (30-F11)、Ter119 (Ter119)、CD19 (6D5)、B220 (RA3-6B2)、CD5 (53-7.3)、Fc $\epsilon$ RI (MAR-1)、CD25 (PC61)、KLRG1 (2F1/KLRG1)、Sca-1 (E13-161.7)、CD127 (IL-7R) (A7R34)、ST2 (RMST2-2)、GFP、EpCAM (G8.8)、CD31 (MEC13.3)、F4/80 (BM8)、Siglec-F (E50-2440)、MHC I-A/I-E (M5/114.15.2)、gp38 (podoplanin) (8.1.1)、CD69 (H1.2F3)、CD103 (APC, 2E7)、TCR $\beta$  (H57-597)、CCR2 (475301)、CCR4 (2G12)、CD44 (IM7)、IL-5 (TRFK5)、IL-13 (eBio13A)、Bcl-2 (BCL/10C4) 及び Ki-67 (SolA15)。蛍光色素またはビオチン標識抗体は BioLegend、eBioscience、Invitrogen から購入した。PBS57-loaded CD1d テトラマーは NIH Tetramer Core Faculty から入手した。ビオチン化したモノクローナル抗体は Brilliant Violet 421 あるいは 510 で標識されたストレプトアビジン (BioLegend) で検出された。Bcl-2 及び Ki67 の細胞内染色には、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) を用いて、細胞を固定、透過性を付与した。IL-5 及び IL-13 の細胞内染色では、Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set (eBioscience) を用いて、細胞を固定、透過性を付与した。生細胞は FlowJo ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて BD LSRFortessa (BD Biosciences) で解析した。

### 細胞の調整

肺を PBS で灌流し摘出後、ハサミを用いて細かく刻み、10% FBS、1mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics)、50 µg/ml DNase I (Worthington Biochemical) を含む RPMI1640 培地で、37°C で 45 分間インキュベートした。消化された肺の断片は、40 µm セルストレイナーを通し、30% Percoll 溶液を用いて遠心し免疫細胞を分離した。赤血球を溶血処理で除去し、細胞をフローサイトメトリーで解析した。BALF は気道に 1 ml の PBS を注入することによって得られた。RNA-seq 解析と培養に用いた ILC2 (Lineage<sup>-</sup>IL-7R<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>) は、肺の細胞調整液から FACS Aria III cell sorter (BD Biosciences) を用いて単離された。Lineage のマーカーは CD3ε、CD4、CD8α、CD11b、CD11c、CD19、Gr-1、B220、CD5、FcεRI、Ter119 を含む。

### 細胞培養

単離した ILC2 は丸底 96 ウェルプレートで 10% FBS、50 µM 2-mercaptethanol、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を含む RPMI1640 溶液で種々のサイトカインを添加し 3 日間培養した。IL-7 (10 ng/ml)、IL-33 (10 ng/ml)、IL-2 (10 ng/ml) を添加した。

### 免疫組織染色

マウスから単離した肺の左葉を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で、4°C で 6 時間固定し、10%、20%、30% スクロース溶液で 3 日間置換した。組織は O.T.C コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社) に包埋し、液体窒素で凍結後、クライオスタット (Leica CM3050 S) で 30 µm の切片を作製した。固定し作製した切片のサンプルは、DAPI、PE-EpCAM (G8.8)、PE-NKp46 (29A1.4)、Alexa Fluor 488-Lyve1 (ALY7)、Brilliant Violet 421-CD3ε (145-2C11)、抗 CD25 ヤギ IgG、Alexa Fluor 647 抗ヤギ IgG 抗体、抗 GFP ウサギ IgG、Dylight649 抗ウサギ IgG 抗体を用いて染色し、PermaFluor Aqueous Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) によって包埋し、共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP8) によって観察した。抗体は BioLegend 及び Invitrogen から購入した。

### 画像解析

免疫組織染色画像は、Imaris Bitplane 7.6 (Zeiss) を用いて解析した。IL-5<sup>Venus/+</sup>マウスにおいて Venus<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>を ILC2 とした。気管支上皮 (EpCAM<sup>+</sup>)、リンパ管 (Lyve1<sup>+</sup>)、T 細胞 (CD3<sup>+</sup>) としてソフトウェアで異なる構造として 3 つのチャンネルを作製した。ILC2 とストローマ細胞の距離を計算するために、Imaris のツールを用いて細胞表面をボクセル化した。ILC2 と気管支上皮、ILC2 とリンパ管内皮、ILC2 と T 細胞のそれぞれの最短距離を

計測した。画像解析は京都大学大学院医学研究科医学研究支援センターで行った。

### 組織学的観察

灌流後に単離した肺の左葉を 4% PFA で、4°C で 12 時間固定し、10%、20%、30% スクロース溶液で 3 日間置換した。組織は O.T.C コンパウンド（サクラファインテックジャパン株式会社）に包埋し、液体窒素で凍結後、クライオスタット（Leica CM3050 S）で 10  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン染色し、観察、撮影した。

### 気道炎症モデル

パパインによる急性気道炎症は、100  $\mu\text{g}$  パパイン（Sigma）/50  $\mu\text{l}$  PBS 溶液を days 0、1、2 に鼻腔内投与することで誘導し、day 3 にマウスを解剖し、肺及び BALF を採取した。HDM によるアレルギー性気道炎症は、10  $\mu\text{g}$  ダニ虫体抽出物（ITEA Inc.）を Imject Alum（Thermo Scientific）で乳状にした PBS 溶液を day 0 及び day 14 に腹腔内投与し、day 21、22、23 に 10  $\mu\text{g}$  ダニ虫体抽出物/50  $\mu\text{l}$  PBS 溶液を鼻腔内投与し誘導した。マウスは day 37 に解剖し、肺及び BALF を採取した。

### マウスへの抗体の投与

#### 抗 IL-7 抗体の投与実験

ヒト抗マウス/ヒト IL-7 抗体（M25、Bio X Cell）及びアイソタイプコントロール抗体を用いた。500  $\mu\text{g}$  の各抗体を day 0 に腹腔内投与し、3 時間後にパパイン 100  $\mu\text{g}$  を鼻腔内に投与した。day 1、day 2 に 100  $\mu\text{g}$  パパインを鼻腔内投与し、day 3 にマウスを解剖し解析を行った。

#### 抗 CCL17 抗体の投与実験

ヤギ抗マウス CCL17 抗体（R & D Systems）及びアイソタイプコントロール抗体を用いた。20  $\mu\text{g}$  の各抗体を day 0 に腹腔内投与し、3 時間後にパパイン 100  $\mu\text{g}$  を鼻腔内に投与した。day 1、day 2 に 100  $\mu\text{g}$  パパインを鼻腔内投与し、day 3 にマウスを解剖し解析を行った。

#### 抗 CCL2 抗体の投与実験

アルメニアンハムスター抗マウス/ヒト/ラット CCL2 抗体（2H5、Bio X Cell）及びアイソタイプコントロール抗体を用いた。10  $\mu\text{g}$  ダニ虫体抽出物を Imject Alum で乳状にした PBS 溶液を day 0 及び day 14 に腹腔内投与した。200  $\mu\text{g}$  の CCL2 抗体あるいはアイソタイプコントロール抗体を day 21 に腹腔内投与し、3 時間後にダニ虫体抽出物 10  $\mu\text{g}$  を鼻腔内に投与した。day 22 及び day 23 に 10  $\mu\text{g}$  のダニ虫体抽出物を鼻腔内投与し、day 37 に解剖

し解析を行った。

### ELISA

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 及び培養液に含まれる IL-5 及び IL-13 の濃度は IL-5 Mouse Uncoated ELISA Kit (Invitrogen) 及び IL-13 Mouse Uncoated ELISA Kit (Invitrogen) を用いて測定した。

### RT-PCR

単離した細胞を Buffer LTR (Qiagen) によって溶出し、RNAClean XP (Beckman Coulter) によって RNA を抽出した。RNA は Reveal Ace (東洋紡株式会社)、ランダムプライマー (Invitrogen) あるいは Oligo(dT)12-18 primer (Thermo Fisher) を用いて逆転写した。cDNA は TB Green Premix ExTaqII (Takara)、ROX reference dye (Takara) を用いて、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) によって増幅された。PCR は 95°C で 30 秒の後、95°C で 5 秒、60°C で 30 秒のサイクルを 45 回繰り返した。目的の遺伝子の転写量は HPRT で標準化した。プライマーの配列を以下に示す： IL-7, 5'-TCCTCCACTGATCCTTGTTTC-3' と 5'-CTTCAACTTGCGAGCAGCAC-3'; CCR2, 5'-GATTCACCACATGTGCTAAG-3' と 5'-CGTAGTCATACGGTGTGGTG-3'; CCR4, 5'-GGAAGGTATCAAGGCATTTGGG-3' と 5'-GTACACGTCCGTCATGGACTT-3'; HPRT, 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' と 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'。

### RNA-seq 解析

単離した ILC2 を Buffer LTR (Qiagen) によって溶出し、RNAClean XP (Beckman Coulter) によって RNA を抽出した。2 本鎖 cDNA を SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for Sequencing (Takara) を用いて合成し、ライブラリーを Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) によって作成した。ライブラリーを Illumina HiSeq X Ten sequencer (Illumina) によってペアエンドのリードにした。質の低い配列を除くために、シングルエンドリードを Trimmomatic (バージョン 0.33) (41) によってフィルタリングした。リードを Hisat2 (バージョン 2.1.0) (42) を用いて、マウスのリファレンスゲノムに当てはめ、そのリードを featureCounts (バージョン 1.6.5) (43) によって転写量を定量化した。DESeq2 によって正規化し、adjusted  $p < 0.3$  の遺伝子を特定した(44)。正規化したデータは R パッケージの pheatmap (バージョン 1.0.12) を用いて MA プロット及びヒートマップで可視化した。SPC-Cre IL-7cKO マウスの ILC2 の RNA-seq データのアクセッション番号は GEO:

GSE200372 である。

また、先行研究から得られた急性炎症時及び慢性炎症時の ILC2 の RNA-seq データ (GSE99780) (34)を Trimmomatic、Hisat2、featureCounts、pheatmap を用いて再解析した。

#### シングルセル RNA-seq 再解析

CD45<sup>-</sup>の肺ストローマ細胞のデータ (GSM3575497) (8)を R パッケージの Seurat (バージョン 4.0.2) (45)及び pheatmap (バージョン 1.0.12) を用いて再解析した。

#### 統計解析

すべてのデータは平均値 ± SEM (標準誤差) で表している。2 群間比較には Student の t 検定を用いた。多群間比較には一元配置分散分析: one-way ANOVA を用いた。統計処理は、Prism ソフトウェア (8.4.3、GraphPad) を用いて行った。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  及び\*\*\*\*  $p < 0.0001$  を示す。



## 謝辞

本研究に際しまして、終始熱心なご指導ご鞭撻を賜りました、京都大学医生物学研究所教授 生田宏一 先生に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を通じ実験実施や日々のご議論、ご助言を賜りました免疫制御学分野の教室員諸氏に感謝いたします。

画像解析ソフト Imaris を使用させていただきました、医学・生命科学研究支援機構及び医学研究支援センターに感謝いたします。

SPC-Cre マウスを譲って頂きました熊本大学の尾池雄一教授、Lyve1-Cre マウスを譲って頂きましたカリフォルニア大学サンフランシスコ校の Jason Cyster 博士に深く感謝いたします。

本研究の一部は、京都大学大学院薬学研究科藤田仁生奨学金、及び京都大学メディカルイノベーション大学院プログラムのリサーチアシスタントプログラムの助成を受け行われたものです。

最後に、長年にわたる研究生生活を支え温かく見守ってくれた母、祖父母に心から感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1 Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., and Spits, H. 2018. Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell* 174:1054.
- 2 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<sub>H</sub>2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. *Nature* 463:540.
- 3 Moro, K., Kabata, H., Tanabe, M., Koga, S., Takeno, N., Mochizuki, M., Fukunaga, K., Asano, K., Betsuyaku, T., and Koyasu, S. 2016. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat. Immunol.* 17:76.
- 4 Koga, S., Hozumi, K., Hirano, K., Yazawa, M., Terooatea, T., Minoda, A., Nagasawa, T., Koyasu, S., and Moro, K. 2018. Peripheral PDGFR a<sup>+</sup> gp38<sup>+</sup> mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. *J. Exp. Med.* 215:1609.
- 5 Nussbaum, J. C., Van Dyken, S. J., von Moltke, J., Cheng, L. E., Mohapatra, A., Molofsky, A. B., Thornton, E. E., Krummel, M. F., Chawla, A., Liang, H. E., and Locksley, R. M. 2013. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502:245.
- 6 Kabata, H., Moro, K., Koyasu, S., and Asano, K. 2015. Group 2 innate lymphoid cells and asthma. *Allergol. Int.* 64:227.
- 7 Kabata, H., Moro, K., and Koyasu, S. 2018. The group 2 innate lymphoid cell (ILC2) regulatory network and its underlying mechanisms. *Immunol. Rev.* 286:37.
- 8 Dahlgren, M. W., Jones, S. W., Cautivo, K. M., Dubinin, A., Ortiz-Carpena, J. F., Farhat, S., Yu, K. S., Lee, K., Wang, C. Q., Molofsky, A. V., Tward, A. D., Krummel, M. F., Peng, T., and Molofsky, A. B. 2019. Adventitial stromal cells define group 2 innate lymphoid cell tissue niches. *Immunity* 50:707.
- 9 Ikutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S., and Takatsu, K. 2012. Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. *J. Immunol.* 188:703.

- 10 Halim, T. Y. F., Krauss, R. H., Sun, A. C., and Takei, F. 2012. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 36:451.
- 11 Mirchandani, A. S., Besnard, A. G., Yip, E., Scott, C., Bain, C. C., Cerovic, V., Salmond, R. J., and Liew, F. Y. 2014. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4<sup>+</sup> Th2 cell responses. *J. Immunol.* 192:2442.
- 12 Patton, D. T., Plumb, A. W., Redpath, S. A., Osborne, L. C., and Perona-Wright, G. 2014. The development and survival but not function of follicular B cells is dependent on IL-7R alpha Tyr449 signaling. *PLOS One* 9: e88771.
- 13 Park, J. H., Adoro, S., Guinter, T., Erman, B., Alag, A. S., Catalfamo, M., Kimura, M. Y., Cui, Y. Z., Lucas, P. J., Gress, R. E., Kubo, M., Hennighausen, L., Feigenbaum, L., and Singer, A. 2010. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat. Immunol.* 11:257.
- 14 Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8732.
- 15 Surh, C. D. and Sprent, J. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29:848.
- 16 Vonfreedenjeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E. G., and Murray, R. 1995. Lymphopenia in interleukin(IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181:1519.
- 17 Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D., and Davison, B. L. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180:1955.
- 18 Jiang, Q., Li, W. Q., Aiello, F. B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A. R., and Durum, S. K. 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:513.
- 19 Tani-ichi, S., Shimba, A., Wagatsuma, K., Miyachi, H., Kitano, S., Imai, K., Hara, T., and Ikuta, K. 2013. Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:612.

- 20 Hara, T., Shitara, S., Imai, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yao, H., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. 2012. Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *J. Immunol.* 189:1577.
- 21 Shinoda, K., Hirahara, K., Inuma, T., Ichikawa, T., Suzuki, A. S., Sugaya, K., Tumes, D. J., Yamamoto, H., Hara, T., Tani-Ichie, S., Ikuta, K., Okamoto, Y., and Nakayama, T. 2016. Thy1<sup>+</sup>IL-7<sup>+</sup> lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113:E2842.
- 22 Robinette, M. L., Bando, J. K., Song, W., Ulland, T. K., Gilfillan, S., and Colonna, M. 2017. IL-15 sustains IL-7R-independent ILC2 and ILC3 development. *Nat. Commun.* 8:14601:13.
- 23 Sheikh, A. and Abraham, N. 2019. Interleukin-7 receptor alpha in innate lymphoid cells: more than a marker. *Front. Immunol.* 10:2897.
- 24 Mohapatra, A., Van Dyken, S. J., Schneider, C., Nussbaum, J. C., Liang, H. E., and Locksley, R. M. 2016. Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. *Mucosal Immunol.* 9:275.
- 25 Xu, W., Domingues, R. G., Fonseca-Pereira, D., Ferreira, M., Ribeiro, H., Lopez-Lastra, S., Motomura, Y., Moreira-Santos, L., Bihl, F., Braud, V., Kee, B., Brady, H., Coles, M. C., Vosshenrich, C., Kubo, M., Di Santo, J. P., and Veiga-Fernandes, H. 2015. NFIL3 orchestrates the emergence of common helper innate lymphoid cell precursors. *Cell Rep.* 10:2043.
- 26 Vonarbourg, C. and Diefenbach, A. 2012. Multifaceted roles of interleukin-7 signaling for the development and function of innate lymphoid cells. *Semin. Immun.* 24:165.
- 27 Sui, P. F., Wiesner, D. L., Xu, J. H., Zhang, Y., Lee, J., Van Dyken, S., Lashua, A., Yu, C. Y., Klein, B. S., Locksley, R. M., Deutsch, G., and Sun, X. 2018. Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses. *Science* 360:eaan8546.
- 28 Puttur, F., Denney, L., Gregory, L. G., Vuononvirta, J., Oliver, R., Entwistle, L. J., Walker, S. A., Headley, M. B., McGhee, E. J., Pease, J. E., Krummel, M. F., Carli, L. M., and Lloyd, C. M. 2019. Pulmonary environmental cues drive group 2 innate lymphoid cell dynamics in mice and humans. *Sci Immunol.* 4.
- 29 Ikutani, M., Tsuneyama, K., Kawaguchi, M., Fukuoka, J., Kudo, F., Nakae, S., Arita, M., Nagai, Y., Takaki, S., and Takatsu, K. 2017. Prolonged activation of IL-5-producing

- ILC2 causes pulmonary arterial hypertrophy. *JCI Insight* 2:e90721.
- 30 Li, B. W. S., Stadhouders, R., de Bruijn, M. J. W., Lukkes, M., Beerens, D., Brem, M. D., KleinJan, A., Bergen, I., Vroman, H., Kool, M., van Ijcken, W. F. J., Rao, T. N., Fehling, H. J., and Hendriks, R. W. 2017. Group 2 innate lymphoid cells exhibit a dynamic phenotype in allergic airway inflammation. *Front. Immunol.* 8:1684.
- 31 Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114.
- 32 Kim, D., Landmead, B., and Salzberg, S. L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12:357.
- 33 Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923.
- 34 Anders, S. and Huber, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11:R106.
- 35 Satija, R., Farrell, J. A., Gennert, D., Schier, A. F., and Regev, A. 2015. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat. Biotechnol.* 33:495.