

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19590494
 研究課題名 (和文) 自然免疫系細胞の分化成熟のメカニズムとその破綻による獲得免疫異常の研究
 研究課題名 (英文) Mechanisms for the differentiation and maturation of cells of the innate immune system and their dysregulation underlying abnormal acquired immunity.
 研究代表者
 瀧 伸介 (TAKI SHINSUKE)
 信州大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50262027

研究成果の概要：

本研究では、遺伝子発現調節因子であるインターフェロン制御因子 2 (IRF-2) を遺伝的に欠損するマウスにおいて、第 4 および 10 染色体上の 1 型インターフェロン (IFN) 応答を調節する遺伝子座が皮膚炎症の発症に影響を与えること、それは CD8⁺T 細胞の 2 型 IFN (IFN- γ) 産生の制御を介していることを明らかにした。一方、活性化ナチュラルキラー細胞が B 細胞の分化を抑制していること、その機構にも IFN- γ が関与していることを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：サイトカイン、NK 細胞、炎症、好塩基球

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに抑制性転写因子インターフェロン制御因子 2 (IRF-2) を欠損するマウスの免疫異常の研究を集中して行ってきており、すでに、皮膚におけるインターフェロン (IFN) 誘導遺伝子発現の異常上昇が原因となり、CD8⁺T 細胞に依存的な炎症性皮膚疾患を発症し (Hida ほか、

Immunity 13: 643, 2000)、CD8⁺T 細胞の末梢性免疫寛容が皮膚局所において破綻していると同時に、さまざまな自然免疫系細胞、すなわち樹状細胞 (DC) サブセット (Ichikawa ほか、Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 2004)、NK 細胞 (Taki ほか、J. Immunol. 2005)、好塩基球 (Hida ほか、Blood 2005) そして NKT 細胞 (未発表)

に異常を示すことを報告している。申請者は、それまでの IRF-1 の免疫調節機構に関する一連の研究（たとえば Taki ほか、*Immunity* 6: 673-679, 1997、Ogasawara ほか、*Nature* 391: 700-703, 1998 など）とあわせて IRF ファミリー転写因子の免疫調節機能研究に関してトップレベルにあるが、このことは最近のレビューにも我々の研究が取り上げられている（Lohoff & Mak、*Nature Immunol.*, 5: 125-135, 2005、DiSanto、*Ann. Rev. Immunol.* 24: 257-286, 2006）ことから明らかである。そして、これらの成果を含む申請者らおよび他研究者の報告によって、IRF ファミリー転写因子の自然免疫系における重要性が認識されてきたことに伴い、その研究は近年、特に米国を中心に急速に拡大し、毎月のように IRF に関する新たな論文が公表されている。これに対して、本邦では IFN- α/β 遺伝子発現に関する IRF-3 の研究は著しく進んでいるものの、他方、免疫系において大きな役割を果たしている IRF-1、IRF-2 の研究は、申請者らの一連の研究がまだその主要な部分を占めているのが現状であり、本邦においてより一層の推進を求められる焦眉の課題のひとつである。

一方、これまでの自己免疫性炎症疾患の発症機構と免疫異常の研究においては、慢性炎症と自然免疫系の異常の関係、言い換えれば炎症性疾患における自然免疫系の異常と免疫寛容の破綻を直接関係するものとして捉えるという視点、はほとんど取り上げられてこなかった。近年、特に臓器特異的自己免疫疾患との関連において、末梢性寛容の重要性が広く認識されるに至っており、また自然免疫系細胞、DC や NKT による獲得免疫応答の負の制御もまた注目を集めるところである。しかしなが

ら、Toll 様受容体の発見、そのリガンドの解析などに代表されるように、自然免疫系の研究はその応答のレベルに集中して行われている傾向があり、自然免疫系の細胞の分化、言い換えれば自然免疫系の成立の過程は、その頻度が T、B 細胞などに比較して著しく低いことや適当な動物モデルの欠如もあって、いまだ多くの未解決の問題を残している。本研究は、自然免疫系の成立の異常から免疫寛容の破綻—炎症性疾患の発症という、細胞分化から疾患に至るまでの一連の現象を、このように注目すべき転写因子による遺伝子発現制御という統一的な観点から追求しようとする意欲的なものであり、かつ世界的に見てもユニークなアプローチである。したがって、本研究は、ともすれば炎症局所の免疫病理学的、細胞免疫学的な解析のみに偏しがちな炎症性疾患研究に大きなインパクトを与えるものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、複数の自然免疫系細胞の増殖分化に異常を示す IRF-2 欠損マウスを用いて、獲得免疫系の制御能を有すると考えられているこれら自然免疫系細胞分化の機構を明らかにし、さらにこれらの異常の、IRF-2 欠損マウスで我々自身が発見した T 細胞依存的炎症性皮膚疾患発症における役割を明らかにすることにある。言い換えれば、これら細胞の分化プロセスにおいて IRF-2 がどのような遺伝子の発現制御を通じて機能しているのか、そして自然免疫系細胞の欠損または異常がいかなる細胞間相互作用を通じて獲得免疫系の失調につながるのかを明らかにすることで、自然免疫系の作動原理に迫ろうとするものである。より具体的には以下の点について明らかにすることを目指す。すなわち、分化停止状態にある NK 細胞においてど

のような遺伝子の発現低下もしくは上昇がその原因となっているのか、NKT 細胞分化異常に関わる IRF-2 標的細胞、遺伝子は何か、どのような IFN 誘導遺伝子が IRF-2 欠損マウスでの DC サブセット欠損の原因であるのか、について明らかにし、それぞれの（もしくは共通の）遺伝子の機能を解明する。また、これら自然免疫系細胞の異常によって、獲得免疫、すなわち T 細胞のホメオスタシスや応答がいかなる影響を受けるのかについても明らかにし自然免疫-獲得免疫相互作用の理解を深める。加えて、末梢（皮膚）における免疫寛容の破綻として捉えられる皮膚疾患発症へのこれら自然免疫系の異常の寄与を、BALB/c の遺伝背景を有する IRF-2 欠損マウスにおいては C57BL/6 背景の IRF-2 欠損マウスで見られる皮膚炎症が見られず、この系統特異的自己免疫現象は複数の遺伝子（QTL）の支配下にあるという予備的なリンケージ解析の結果に基づき、それら候補遺伝子が上記免疫異常のいずれに作用しているのかについて検討することで明らかにする。

3. 研究の方法

予備的に観察している BALB/c 背景および BALB/c x B6 F1 背景の IRF-2 欠損マウスでは DC 亜集団異常が見られないという現象（投稿準備中）について解析を行い、すでにリンケージ解析によって同定している染色体 4 および 10 番上の皮膚炎症の発症、重症度を modify する遺伝子 (IFN- γ , IL-28/IFN- λ 受容体 α 鎖、IL-22 受容体 α 鎖などが含まれる領域) と DC サブセット異常を支配する遺伝子の異同について検討を行う。すなわち、DC 亜集団の異常に関しても大量の F1 x B6 バッククロスマウスを用意しリンケージ解析を行い、皮膚疾患発症と DC サブセット異常の遺伝子支配の機構の異同について結論を得る。その結果同定できた候補遺伝子に関して、

発現量の違いやプロモータの解析、塩基配列の決定を行い、IRF-2 の直接の標的遺伝子であるか否か、ならびに系統間での差異の機構を検討するとともに該遺伝子と IRF-2 をともに欠損する二重変異マウスを作成して、皮膚炎症発症への影響を *in vivo* で確認する。

一方、IL-15 は、NK 細胞の分化および成熟 NK 細胞の survival の両方に必須であると言われているし、IRF-2 の NK 細胞分化における機能についても IL-15 に対する応答性の制御が示唆されている（Lohoff ほか、*J.Exp.Med.* 192: 325-336, 2000）ため、最初に IRF-2 欠損 NK 細胞の分化・成熟異常における IL-15 の役割を検証する。まず、IL-15 マウスと IRF-2 欠損マウスにおける NK 細胞分化・成熟の停止位置を、細胞表面マーカー、例えば Mac-1, CD43, CD51 など、および各種 Ly49, NKG2 を用いて比較する。さらに、両マウスおよび野生型マウス由来の骨髄細胞を IL-15 中で培養し、培養初期における CD69 の発現、ならびに Stat5 のリン酸化をフローサイトメトリによって解析し、IRF-2 欠損 NK 細胞の IL-15 応答性を検討するとともに Annexin-V を用いて apoptosis の程度を比較する。一方で、野生型マウス脾臓、骨髄より純化した NK 細胞およびその各種分化段階にあるサブセットを CFSE でラベルし、やはり IL-15 で培養することによって、どの分化段階の NK 細胞が IL-15 に対して反応するのかという、これまでではっきりとしていない疑問について検討する。さらに、IRF-2 欠損マウスでの NK 細胞異常との類似が指摘されている GATA3 欠損マウスで欠失していることが最近報告された胸腺由来 NK サブセット（Vosshenlich ほか、*Nature Immunol.* 7: 1217, 2006）について IRF-2 欠損マウスでの検討を行う。

4. 研究成果

転写因子 IRF-2 を欠損するマウスでは、I型インターフェロン依存的に炎症性皮膚疾患が自然発症する。ところが、これは遺伝的背景が C57BL/6 の場合にのみ見られ、BALB/c マウスに退交配したマウスでは見られない。そこで、どの背景遺伝子が本疾患に対する感受性の制御に関わっているのかを明らかにするためにリンケージ解析を行った。その結果、第4染色体および第10染色体に強い quantitative trait loci (QTL) が見出された。一方、このマウスはまた、樹状細胞サブセットの I 型インターフェロン依存性の分化異常を示す事でも知られているが、詳細なリンケージ解析の結果、皮膚炎症と樹状細胞サブセット異常の遺伝子支配は異なる遺伝子座によって担われている事が明らかになった。さらに、C57BL/6 および BALB/c の遺伝的背景を有する IRF-2 欠損マウスについて、皮膚における様々な遺伝子の発現異常を検討したところ、いわゆるインターフェロン誘導遺伝子群の発現、インターフェロン γ の発現が、C57BL/6 マウスの遺伝的背景を持つ IRF-2 欠損マウスでのみ亢進していることが明らかとなり、様々な二重欠損マウスの解析を通じて、I 型インターフェロンに対する自発的な応答亢進の結果、CD8⁺T 細胞がインターフェロン γ を産生し、皮膚炎を引き起こしていることが明らかとなった。さらに、インターフェロン γ 受容体欠損マウスと IRF-2 欠損マウスの交配によって、実際にインターフェロン γ が皮膚炎の発症に重要である事も明らかにした。ヒト皮膚疾患である乾癬においても I 型インターフェロンおよびインターフェロン γ の関与が知られており、本モデルマウスは該ヒト疾患における発症の遺伝子支配の研究に有用なシステムである事が明らかとなった。この成果を、2007 年に米国免疫学会オフィシャルジャーナルである

Journal of Immunology 誌に報告したが、この報告が掲載された際には、In this issue の中で取り上げられ高く評価された (J. Immunol. 179: 2665-2666, 2007)。

引き続き、第4および10番染色体上の QTL について詳細に検討するために、これら遺伝子座のみが BALB/c 由来である recombinant inbred マウスの作成を試み、すでに10回以上の退交配を終了した。さらに該遺伝子座についてホモ接合体である個体の樹立を行ったが、本研究の終了時までには皮膚炎症の発症頻度についてのデータは得られていない。現在、個体数を増やし、発症感受性、皮膚における遺伝子発現異常について検討を加えている。一方で、IFN- α/β シグナルと IFN- γ 産生をつなぐ内在性因子として IL-15 に注目し、IRF-2 と IL-15 をともに欠損する二重変異マウスを作成した。その結果、同二重変異マウスにおいては発症頻度が激減した。また、高齢マウスにおいてはまれに皮膚炎の発症が観察され、IRF-2、IFN- γ 受容体二重欠損マウスにおける表現形と酷似していた。この結果は IL-15 が IFN- α/β によって誘導され、CD8⁺T 細胞を活性化する事によって IFN- γ を産生させ、皮膚炎症を引き起こしているという仮説を支持する。ところが、IRF-2 欠損マウス皮膚における IL-15 mRNA 発現量については、IFN- γ mRNA 発現ほどには背景遺伝子の影響が見られなかった。この事は、IFN- α/β シグナルの亢進はむしろ IL-15 に対する CD8⁺T 細胞の反応性を制御している可能性を示唆する。

以上の検討に加えて、IRF-2 欠損マウスにおける NK 細胞分化異常を検討する過程で、IL-15 を用いて骨髄細胞を培養すると様々な NK 受容体、例えば Ly49 などを発現する NK 細胞の頻度が上昇することが明らかになった。しかしながら詳細な解析によって、IL-15 は未熟

なNK細胞にLy49分子の発現を誘導することはできず、すでにLy49分子を発現している比較的成熟したNK細胞を選択的に増殖させることが明らかになった。このことからIL-15の作用点はLy49陽性となった未熟NK細胞であることが結論できた（未発表）。一方、*in vitro*骨髄細胞培養系において、IL-15によって増殖するNK細胞が、IL-7依存的なsyngeneicプレB細胞の増殖をインターフェロン γ (IFN- γ)の産生を介して抑制していることを見出した。この時、Mac-1⁺B220⁺の表現型を示すNK細胞サブセットが選択的に増殖している事を見出した。このNK細胞サブセットは、ごく最近、活性化型NK細胞であり、さまざまなエフェクター機能、すなわちサイトカイン産生やキラー活性に高値を示すサブセットとして記載され注目を集めている細胞である。また、IFN- γ 受容体を欠損するマウス由来の骨髄細胞ではプレB細胞の増殖は抑制されなかったこと、MHCクラスI分子の存在しない β 2ミクログロブリン (β 2m) 欠損マウス由来骨髄細胞を用いた場合でも本システムにおけるプレB細胞の増殖抑制は強く働いたことから、このNK細胞サブセットは、NK細胞のエフェクター機能の獲得に必須ではないかと疑われている「ライセンス」の不在を超えてsyngeneicプレB細胞の増殖抑制に関与していることがわかった。この研究の結果、IL-15が産生される条件下で、すなわち炎症時などに、このNK細胞サブセットが生体内における造血、特にB細胞造血の調整に関与している可能性が示唆された。この成果はBiochem. Biophys. Res. Commun. 誌に報告した。実際にどのような条件の下でこのような抑制作用が機能しているのかについては、今後の課題として残った。

やはりこの検討の過程で、IRF-2欠損マウスではV α 14を発現しないCD1d非依存的NKT細胞

が欠損している事を見出している。野生型マウス脾細胞からNK1.1陽性細胞を除去した後、IL-2存在下で培養するとNK1.1⁺T細胞、NKG2D⁺T細胞およびNK1.1⁺NKG2D⁺T細胞が出現するが、この培養ではV α 14陽性のNKT細胞はほとんど出現せず、さらにCD1d^{-/-}マウス脾細胞を用いても、野生型脾細胞からと同様にNK1.1⁺T細胞、NKG2D⁺T細胞およびDP細胞が出現したことから、この培養中で分化するNK受容体陽性T細胞はCD1d非依存的である事が明らかとなった。一方、NK1.1陽性細胞を除去したIRF-2^{-/-}マウス脾細胞から増殖するT細胞はほとんどすべてがNK1.1陰性であったが一部にはNKG2D陽性細胞が見られた。この事からNK受容体NK1.1とNKG2Dの発現制御は異なっているという興味深い知見が得られた。今後、この過程におけるIRF-2の機能を詳細に検討する予定である。

当初予定していたNK細胞、NKT細胞およびDCサブセットの分化におけるIRF-2の機能、特にその標的遺伝子の同定については、その進捗が遅れ、興味深い観察は多くなされたものの本研究終了時までにはっきりとした成果を得ることができなかった。一方で、IRF-2欠損マウスで異常を示すもう一つの自然免疫細胞である好塩基球についての解析は、予定以上に進捗した。すなわち、IRF-2はIL-3によってトリガーされる細胞内シグナルのうち好塩基球の増殖反応にのみ抑制的に働くが、もう一方の伝達経路であるIL-4産生誘導経路に、これまでいわゆるImmunoreceptorとの会合が示されていたFc γ 分子が関与しており、それはFc γ 分子がIL-3受容体 β 鎖に直接結合するためであることを示すことができ、Nature Immunology 誌に発表した。

以上のように本研究は必ずしも当初の予定通りに進捗したとは言えないかも知れな

いが、本研究の目的の一つであった自然免疫系細胞の分化成熟の破綻による獲得免疫異常と言う観点からは、(1) 自然免疫の重要なエフェクターサイトカインである IFN- α/β 系の IRF-2 による抑制機構の破綻によって、獲得免疫系細胞である CD8⁺T 細胞の IFN-g 産生が亢進し皮膚炎症が発症するというメカニズムを明らかにし、感受性遺伝子座が本メカニズムに関与していること、(2) 自然免疫系細胞である NK 細胞の獲得免疫系細胞 B 細胞分化抑制機能の発見とその機構の解明、そして(3) やはり自然免疫系細胞である好塩基球のシグナル異常 (FcR γ 欠損による) による獲得免疫細胞 Th2 細胞の分化の異常の発見、という 3 つの新規知見が得られ、それぞれ国際誌に発表することができたことから本研究は十分に成果を挙げ得たものとする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Hida, S., Yamasaki, S., Sakamoto, Y., Takamoto, M., Obata, K., Takai, T., Karasuyama, H., Sugane, K., Saito, T., Taki, S., Fc receptor γ -chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils. *Nature Immunol.*, 10:214-222, 2009. 査読有り
- 2) Nagumo, H., Abe, J., Kano, H., Taki, S., Yamazaki, K., Yamazaki, T., Kobayashi, N., Koike, K., Sugane, K., Saito, H., Agematsu, K., Distinct response in maintenance of human naive and memory B cells via IL-21 receptor and TCL1/Akt pathways. *Cell. Immunol.* 256:56-63, 2009. 査読有り
- 3) Jin, D., Takamoto, M., Hu, T., Taki, S., Sugane, K., STAT6 signalling is important in CD8⁺ T-cell activation and defence against *Toxoplasma gondii* infection in the brain. *Immunology* 127:187-195, 2009. 査読有り
- 4) Nakajima, S., Hida, S., Taki, S., IL-15

inhibits pre-B cell proliferation by selectively expanding Mac-1⁺B220⁺ NK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:1139-1143, 2008. 査読有り
<http://hdl.handle.net/10091/1090>

- 5) Mizutani, T., Tsuji, K., Ebihara, Y., Taki, S., Ohba, Y., Taniguchi, T., Honda, K., Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling. *Exp. Hematol.* 36:255-264, 2008. 査読有り
- 6) Arakura, F., Hida, S., Ichikawa, E., Yajima, C., Nakajima, S., Saida, T., Taki, S., Genetic control directed towards spontaneous IFN- α/β responses and downstream IFN- γ expression influences the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disease. *J. Immunol.* 179:3249-3257, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

- 1) Taki, S. Basophils affect the homeostasis regulation of Th1/Th2 balance. World allergy congress 2007, 2007 年 12 月 4 日 Bangkok, Thailand

[その他]

ホームページアドレス:

http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/zouki/immunol/main_frame.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧 伸介 (TAKI SHINSUKE)
信州大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50262027

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者