

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間： 2008 年度～2009 年度  
 課題番号：20890232  
 研究課題名（和文）好塩基球の分化・活性化における SLP-76 シグナル分子の役割に関する研究  
 研究課題名（英文）Distinct regulatory functions of SLP-76 is required for the high affinity IgE receptor- and cytokine receptors-induced activation of basophils.  
 研究代表者  
 飛弾野 真也 (HIDANO SHINYA) 東京理科大学 生命科学研究所 助教  
 研究者番号：80516386

研究成果の概要（和文）：アレルギー炎症における高親和性 IgE 受容体ならびにサイトカイン受容体を介した好塩基球の活性化シグナル伝達機構における SLP-76 の機能について解析を行い、これら受容体によるシグナル伝達は、細胞種（肥満細胞と好塩基球）あるいはアウトプット（脱顆粒反応ならびに IL-4 産生）でそれぞれ異なったシグナル伝達経路を介して誘導されること、すなわち SLP-76 が異なる受容体下流シグナル伝達経路をそれぞれ別の機序で制御していることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Whether functions of SLP-76 is required for the high affinity IgE receptor- and cytokine receptors-induced activation of basophils in allergy inflammation, we showed that SLP-76 regulates these receptor-mediate downstream signal pathways by distinct mechanism .

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：医歯薬学・免疫学

キーワード：免疫学、アレルギー・ぜんそく、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

好塩基球は、血液中を循環する顆粒球として 1979 年に Paul Ehrlich によって同定された肥満細胞と同様に FcεRI を発現する顆粒球で

ある。これまで、肥満細胞が気道や腸管などの粘膜や皮膚など全身組織広汎に存在するのに対し、好塩基球は骨髄で成熟し血液中を循環する細胞として考えられていた。寄生虫感染症において好塩基球の増多、浸潤が見ら

れること、アレルギー炎症部位に好塩基球の浸潤が認められることから、好塩基球と寄生虫感染、アレルギー疾患の関連が示唆されていた。しかしながら、好塩基球は血液やリンパ組織中に 1%以下しか存在しない希少な細胞であり、好塩基球を欠損したマウスも存在しなかったため、これら疾患における好塩基球を標的とした研究は行われていなかった。近年、好塩基球が、IgE 依存性慢性アレルギー炎症を誘導することや、IgG 依存性全身性アナフィラキシーの誘導に重要であり、血小板活性化因子 (PAF) を産生し炎症部位へ免疫系細胞を誘導するイニシエーターとして機能することを見だし、アレルギー炎症における好塩基球の役割がクローズアップされている。さらに、花粉や寄生虫などのアレルゲンに曝露、FcεRI の架橋や IL-3 レセプターからの刺激によって IL-4 や IL-6、IL-13 といった Th2 サイトカインを産生すること、さらに寄生虫感染においてもサイトカイン産生が誘導されることが見いだされた。これまで、花粉や寄生虫などのアレルゲンに曝露されると、樹状細胞を介して抗原の情報を受けた CD4T 細胞は、IL-4 の作用で Th2 へ分化すると考えられてきた。しかし、樹状細胞は、アレルゲンに反応して IL-4 を産生することができないため、CD4T 細胞が Th2 細胞に分化するために必要な early IL-4 産生細胞の探索が行われていたが、好塩基球がその early IL-4 を産生するという重要な役割を果たしていることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

このような好塩基球の活性化に至る機構は、FcεRI あるいは IL-3 受容体のようなサイトカイン受容体下流のシグナル伝達によって誘導されている。この機構が、好塩基球特異的なものであるのか、肥満細胞と同様のメカニズムで起きているかどうかはいまだ明確な

証拠は認められていない。本研究では、FcεRI や IL-3 レセプター下流のシグナル伝達の機構をシグナル分子 SLP-76 に焦点をあて、好塩基球の活性化機構を脱顆粒反応、IL-4 を産生するメカニズムについて解析を行った。

## 3. 研究の方法

本研究は、好塩基球における SLP-76 の機能について解析を行うため、SLP-76 欠損マウス脾臓、骨髄由来好塩基球、または、骨髄細胞を IL-3 存在下で培養することにより得られる骨髄誘導性好塩基球を単離することにより解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)FcεRI を介した好塩基球活性化における SLP-76 の役割

FcεRI は、IgE に結合するα鎖とβ鎖ならびに 2 つのシグナル伝達γ鎖を持つ多量体で、レセプターの会合を促進し、シグナル伝達を増強する。β鎖ならびに 2 つのシグナル伝達γ鎖には、immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM)が存在し、シグナル伝達に関与している。FcεRI を発現した肥満細胞ならびに好塩基球では、FcεRIα鎖に結合した抗原特異的 IgE が架橋されると脱顆粒反応と呼ばれる様々な化学メディエーターを含む顆粒の放出や IL-4, IL-6, TNF-αなどのサイトカインを産生することが報告されている。

最近、われわれは、骨髄誘導性 SLP-76 欠損好塩基球に抗原 (DNP) に特異的なモノクローナル IgE を感作し、DNP 結合ヒト血清アルブミン (DNP-HSA) を用いて FcεRI を架橋することにより誘導される脱顆粒反応をβ-hexaminidase の放出を指標に解析を行った。その結果、β-hexaminidase の産生が SLP-76 欠損で著しく低下することを見いだした。また、FcεRI 架橋による IL-4 産生を調べたところ、SLP-76 欠損好塩基球では IL-4 産生がほぼ消失することを見いだした。これらの結果は、SLP-76 欠損肥満細胞で認められる FcεRI 架橋

による脱顆粒反応の低下ならびにサイトカイン産生の減少と相関していることが認められる。では、FcεRI 架橋による肥満細胞ならびに好塩基球の活性化は、同様のシグナル伝達経路によって制御されているのかどうかを明らかにするために、SLP-76 欠損好塩基球の FcεRI 刺激による細胞内シグナル分子のリン酸化を調べた。その結果、SLP-76 の下流に位置する細胞内へのカルシウム流入や PKC の活性化を誘導する PLCγ1/2 のチロシンリン酸化が認められなかった。また、MAP キナーゼの活性化は、JNK の活性化が顕著に減少し、ERK1/2、p38 の活性化にはそれほど影響が認められなかった。さらに PLCγ2 の活性化に伴う細胞内へのカルシウム流入が認められなかった。SLP-76 欠損肥満細胞でも FcεRI 架橋による PLCγ1/2 ならびに JNK のチロシンリン酸化、細胞内カルシウム濃度の上昇が認められないので、FcεRI 下流のシグナル伝達で好塩基球と肥満細胞で相関しており、SLP-76 は好塩基球と肥満細胞ともに脱顆粒反応ならびにサイトカイン産生を正に制御していると考えられる。

しかしながら、Lyn や Fyn といった Src ファミリーキナーゼは、FcεRI 刺激による活性化が好塩基球と肥満細胞で異なっていることが報告されている。Lyn を欠損した好塩基球では、好塩基球増多がみられることや、FcεRI 架橋により IL-4 産生が促進するが、ヒスタミンの産生は抑制されている。一方、Fyn 欠損好塩基球では、FcεRI 架橋による IL-4 産生がわずかに減少する程度であった。ところが、Lyn 欠損肥満細胞では Syk, LAT のリン酸化の低下、Gab2, AKT のリン酸化の上昇、細胞内カルシウム濃度の上昇が認められないのにも関わらず、脱顆粒反応の促進が認められる。一方、Fyn 欠損では、Syk, LAT のリン酸化の低下、Gab2, AKT のリン酸化の上昇、

細胞内カルシウム濃度の上昇に変化が認められないが、脱顆粒反応が低下する。これらのことから、Src ファミリーキナーゼの機能は、好塩基球と肥満細胞は異なる制御が存在すると考えられる。これらの細胞における Lyn あるいは Fyn と下流のシグナル分子である SLP-76 との解明が期待される。

## (2)IL-3 受容体を介した好塩基球活性化における SLP-76 の役割

IL-3は、造血系成長因子であり、造血系幹細胞からリネージにコミットした前駆細胞の増殖や分化を刺激する活性があり、これによりほとんどの主要な血液細胞タイプの分化を誘導する。IL-3のリガンドであるIL-3受容体 (IL-3R) は、IL-3受容体のみで発現しIL-3との結合能を持つα鎖とIL-5、GM-CSF受容体の共通サブユニットであり、リガンドとの結合能がないβ鎖から構成されている。

IL-3によって肥満細胞は、造血幹細胞からの分化ならびに細胞増殖が誘導されるが、好塩基球は、これらの他にサイトカインIL-4を誘導する能力を持っている。しかしながら好塩基球がIL-3によってIL-4を産生するメカニズムはあまりよくわかっていない。また、このIL-4産生は肥満細胞では認められない現象であり、今までに考えられていた細胞増殖を司るシグナル経路とは別の好塩基球特異的なIL-3受容体下流シグナル伝達経路の存在が考えられる。

これまでに、IL-3欠損マウスにおいて好塩基球が存在し発生には影響がないが、IL-3を投与したマウスや *Nippostrongylus Brasiliensis* 等の寄生虫感染マウスでは、好塩基球の増加が認められ、IL-3が好塩基球の増殖に関与していることが考えられている。転写因子である IRF2 欠損マウスでは、IL-3で誘導した骨髄由来好塩基球が野生型に比べ増加が認め

られたが、IL-3 刺激による IL-4 産生には影響が認められず、IL-3 受容体下流のシグナル伝達経路は、増殖と IL-4 産生の 2 つの経路に分岐しており、IRF2 は増殖を負に制御していることが報告されている。また、近年、好塩基球に発現する IL-3 受容体には FcεRI のサブユニットである FcεRIγ鎖が会合しており、FcεRIγ鎖を欠損好塩基球では、正常に増殖することが認められ STAT5 のチロシンリン酸化にも変化は認められなかったが IL-4 の産生が消失するという報告があり、さらに FcεRIγ鎖の ITAM のチロシン残基を変異体や、Syk のキナーゼドメインを欠失したドミナントネガティブ変異体の発現により野生型好塩基球の IL-4 産生を抑制できることから、好塩基球の IL-3 による細胞増殖は IL-3R-FcεRIγ鎖非依存的なシグナル経路、IL-4 産生は IL-3R-FcεRIγ鎖-Syk を介したシグナル経路が関与することが考えられている。我々は、IL-4 産生を誘導する IL-3R-FcεRIγ鎖-Syk 経路の下流に位置するシグナル分子としてアダプター分子である SLP-76 に着目した。

SLP-76 欠損マウスの好塩基球は、正常に認められた。骨髄細胞から分化誘導した SLP-76 欠損好塩基球は、正常に増殖することが認められた。脾臓ならびに骨髄誘導性好塩基球における IL-3 刺激による IL-4 産生は、SLP-76 欠損好塩基球では IL-4 産生が完全に消失した。では、SLP-76 が SLP-76 下流のシグナルをどのように制御しているか明らかにするために、SLP-76 欠損好塩基球における IL-3 受容体下流シグナルのリン酸化を調べたところ、細胞増殖を誘導する STAT5 のチロシンリン酸化に変化は認められなかった。また、IL-4 産生に関与するとされる IL-3R-FcεRIγ鎖-Syk 経路の下流シグナル分子のリン酸化について調べたところ、PI3K の下流に位置する AKT のリン酸化が減少することが認められ、

さらに、PLCγ1/2 の活性化は、PLCγ1 では変化はないが、PLCγ2 のチロシンリン酸化の亢進が認められなかった。MAP キナーゼの活性化は、JNK、ERK1/2、p38 ともに活性化にはそれほど影響が認められなかった。

これらの結果から細胞増殖あるいは IL-4 産生を誘導する異なるシグナル経路のうち、SLP-76 は IL-4 産生を誘導する IL-3R-FcεRIγ鎖-Syk 経路の下流に位置し、AKT あるいは PLCγ2 を介したシグナル伝達経路を制御していることが示唆された。

### (3)まとめ

FcεRI ならびに IL-3 受容体、これら受容体によるシグナル伝達は、細胞種（肥満細胞と好塩基球）あるいはアウトプット（脱顆粒反応ならびに IL-4 産生）でそれぞれ異なったシグナル伝達経路を介して誘導されること、すなわち SLP-76 は異なる受容体下流シグナル伝達経路をそれぞれ別の機序で制御していることが示唆された。これらの本研究による成果は、アレルギー炎症における好塩基球の活性化機構解明に重要な役割を担うこと、ならびに肥満細胞と好塩基球との機能的な共通性、特異性の解明に強く貢献できると考えられる。

### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

HIDANO Shinya, ARIKI Reina, KITAMURA Daisuke, GOITSUKA Ryo ; Distinct regulatory functions of SLP-76 is required for the high affinity IgE receptor- and cytokine receptors -induced activation of basophils.

第38回日本免疫学会総会・学術集会 京都、2008

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

( )

研究者番号：

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

