

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790488

研究課題名（和文） T S L P の過剰産生によって誘導される自己免疫疾患の発症機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the pathogenic mechanisms of autoimmune diseases induced by overproduction of cytokine TSLP

研究代表者

井関 将典 (ISEKI MASANORI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・免疫制御研究部・免疫応答修飾研究室長

研究者番号：30532353

研究成果の概要（和文）：サイトカイン TSLP は生体内で 2 型ヘルパー T 細胞（Th2 細胞）分化を促進しアレルギー等様々な免疫疾患を引き起こすことが分かっているが、生体内での詳細な作用機構は未だ明らかではなかった。本研究によって生体内で TSLP が CD4 陽性 T 細胞を直接活性化して Th2 環境を促進し、B 細胞の活性化と自己免疫疾患を引き起こす、という新たな機構が明らかとなり、今後の TSLP を標的とした免疫疾患の治療法開発に役立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：It has been known that the cytokine thymic stromal lymphopietin (TSLP) promotes the differentiation of type 2 helper T cells (Th2 cells) and induces allergic inflammations including asthma and atopic dermatitis. However, the details of its pathogenic mechanisms were still remained unclear. In this research, we found that TSLP directly stimulates CD4⁺ T cells and induces Th2 condition in vivo, which leads to polyclonal B cell activation and the autoimmune disease. These results would be applied to the development of novel therapies for immune diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー・免疫関連疾患、自己免疫疾患、サイトカイン、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

Thymic stromal lymphopietin (TSLP) はリンパ球の分化・増殖因子として同定されたサイトカインであるが、近年アレルギーの起始因子として注目を集めている。アトピー性皮膚炎患者の患部や喘息患者の肺で TSLP が高発現していることが発見され、また肺で

TSLP を高発現するマウスは喘息様の症状を、皮膚で高発現するマウスはアトピー性皮膚炎の症状を示すことから TSLP の発現が 2 型ヘルパー T 細胞（Th2 細胞）分化を促進しアレルギー性疾患の発症に強く関与することが示唆されている。

更に我々は皮膚特異的な TSLP の過剰発現マウス (K5-TSLP マウス) を用い、皮膚で

発現誘導された TSLP が血流に乗って全身に回り、結果として全身的な TSLP の濃度が上昇すること、それによってこの K5-TSLP マウスがクリオグロブリン血症、免疫複体の腎臓への沈着といった自己免疫疾患の症状を示すことを明らかにし、報告してきた (Nat. Immunol. 2007)。更なる解析の結果、K5-TSLP マウスの成熟 B 細胞は CD4 陽性 T 細胞と IL-4 依存性に生体内で活性化されていること、このマウスは T 細胞及び IL-4 依存性の自己免疫性溶血性貧血を発症することを見いだしている。自己免疫疾患の発症機構の詳細が解明できれば、TSLP の生体内での機能の一層の理解に繋がり、免疫疾患の治療法開発に役立つと考えられる

2. 研究の目的

上記の様にサイトカイン TSLP の全身的な過剰発現によって自己免疫疾患が誘導される。本研究では TSLP の過剰発現から自己免疫疾患に至る発症機構を解明し、免疫疾患の治療法開発に繋がる分子基盤を得ることを目的とする。具体的な項目を以下に示す。

- (1) TSLP の過剰発現から自己免疫疾患に至るまでの様々な細胞、分子間の相互作用を明らかにする。
- (2) B 細胞抗原受容体トランスジェニックマウスを用いて、K5-TSLP マウスにおいて自己免疫寛容がどのようなメカニズムで破綻するのかを明らかにする。
- (3) マウスの遺伝的背景が TSLP 誘導性自己免疫疾患に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プラスミド DNA を用いた TSLP の生体内での過剰発現システム

トランスジーンに依らない TSLP の過剰発現によっても K5-TSLP マウスと同様の表現型が観察できるかどうかを明らかにするため、プラスミド DNA を用いた簡便な TSLP の過剰発現法の樹立を試みた。PCR 法によってマウス TSLP の cDNA をプラスミドベクター pLIVE (Mirus Bio) にクローニングした。この pLIVE-mTSLP およびコントロールベクターを TransIT Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus Bio) と混合し、野生型マウスの尾静脈より 5 秒以内に投与した。その後末梢血中のリンパ球をフローサイトメトリーによって解析した。またプラスミド投与 7 週間後にマウスの骨髄、脾臓、腹腔内細胞をフローサイトメトリーによって解析した。投与マウスの脾臓細胞を *in vitro* で PMA + ionomycin によって 4 時間刺激し、T 細胞か

らのサイトカイン産生についてフローサイトメトリーによって解析した。また ELISA によって血清中の免疫グロブリン量、サイトカイン量を測定した。

(2) スードマウスを用いた、CD4 陽性 T 細胞の養子移植実験

野生型および TSLP 受容体遺伝子 (*Tslpr*) 欠損マウスから磁気ビーズ法によって CD4 陽性 T 細胞を調製し、T 細胞欠損マウスであるスードマウス一匹あたりに 3.5×10^6 個を静脈注射により移植した。移植の翌日に TSLP をコードする pLIVE-mTSLP プラスミドまたはコントロールプラスミド DNA 50 μg を尾静脈から注射して TSLP の過剰発現を誘導した。4 週間後に脾臓細胞を調製し、フローサイトメトリーにより B 細胞の活性化、移植した T 細胞のサイトカイン産生について調べた。

(3) TSLP 過剰発現後の IL-4 産生が B 細胞に及ぼす影響の解析

K5-TSLP マウスおよびコントロールマウスの飲料水中に 1 mg/ml のドキシサイクリンを 3 週間投与し、TSLP の発現を誘導した。投与前と 3 週間投与後に末梢血を採取、また 3 週間後には脾臓細胞も調製し、フローサイトメトリーにより B 細胞上の IL-4 受容体 α 鎖 (IL-4R α) の発現レベルを調べた。また、3 週間後の血清中の IL-4 の濃度を ELISA によって測定した。

4. 研究成果

(1) プラスミド DNA を用いた TSLP の生体内での過剰発現システム

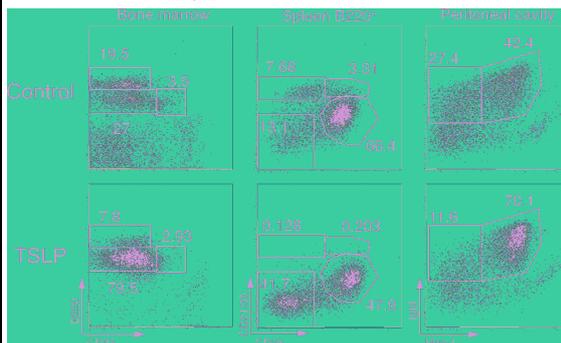


図 1. プラスミド DNA による生体内での TSLP の過剰発現

当施設への K5-TSLP マウスの搬入に時間を要し、また搬入したマウスの繁殖能力に問題が見られたため、代替手段としてプラスミド DNA を用いた TSLP の生体内での過剰発現システムを樹立した。TSLP プラスミドを投与したマウスではコントロールプラスミ

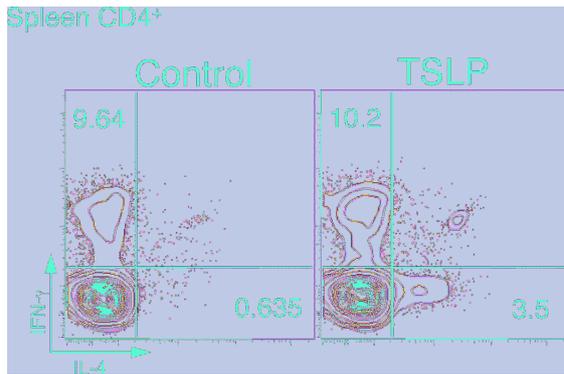


図2. TSLPプラスミド投与によるTh2細胞への分化促進

ドを投与したマウスに比べて末梢血細胞中に未熟 B 細胞の増加が観察され、TSLP が発現していることが示唆された。また骨髄、脾臓における未熟 B 細胞の増加、腹腔内細胞における B-1b 細胞の増加等、各組織において K5-TSLP マウスとほぼ等しい表現型が観察された (図 1)。TSLP プラスミド投与マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞では IL-4 産生細胞 (Th2 細胞) が増加しており (図 2)、血清中の IgE も高い値を示したことから Th2 細胞分化が促進されていることが示唆された。更にコントロールと比べて血中の抗核抗体、抗二重鎖 DNA 抗体も増加しており、自己免疫疾患の症状を呈することが分かった。以上の結果より、プラスミド DNA を用いた TSLP 過剰発現法は簡便かつ有効な方法であるといえる。

(2) CD4 陽性 T 細胞の養子移植実験による生体内での TSLP の標的細胞の同定

我々はこれまでに TSLP の過剰発現が生体内で Th2 細胞分化を促進し、Th2 細胞由来の IL-4 依存的に抗原非特異的な B 細胞の活性化を誘導し、自己免疫疾患を引き起こすことを明らかにしてきたが、このモデルにおける TSLP の標的細胞は不明であった。生体内で TSLP がどの細胞を刺激することが疾患へと繋がるのかを明らかにするため、上記のプラスミド DNA による TSLP の過剰発現系を用いて以下の実験を行った。

野生型および *Tslpr* 遺伝子欠損マウスから CD4 陽性 T 細胞を採取し、T 細胞欠損マウスであるヌードマウスに移植し、翌日に TSLP

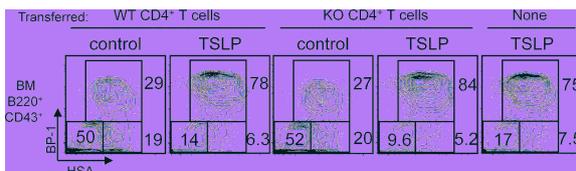


図3. TSLP 過剰発現による骨髄 late pro-B 細胞の増加は直接的効果であり CD4 陽性 T 細胞に依存しない。

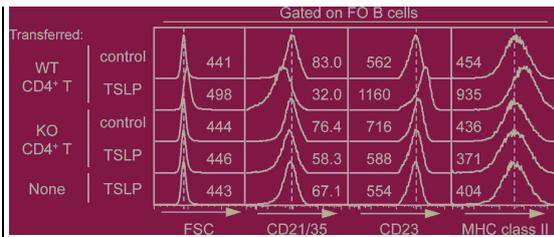


図4. TSLP 過剰発現による B 細胞の活性化には CD4 陽性 T 細胞上の TSLP 受容体が必要である

をコードするプラスミド DNA またはコントロールプラスミド DNA を尾静脈から注射して TSLP の過剰発現を誘導した。4 週間後の血清中の TSLP 濃度を ELISA にて測定したところ、TSLP プラスミド DNA を注射したマウスでは $866 (\pm 219)$ pg/ml であり、K5-TSLP マウスにドキシサイクリンを 1 mg/ml、3 週間投与した場合とほぼ同程度の TSLP 発現が誘導されていることを確認した。また、このマウスの骨髄細胞をフローサイトメトリーで解析すると、T 細胞の移植の有無に関わらず late pro-B 細胞の増加が見られ、機能的な TSLP が過剰発現していることが示唆された (図 3)。

これらのマウスの脾臓 B 細胞の活性化を調べたところ、T 細胞を移植しないヌードマウスに TSLP を過剰発現させても B 細胞の活性化は見られなかったが、野生型の CD4 陽性 T 細胞を移植したマウスでは、TSLP の過剰発現により成熟 B 細胞の細胞径の拡大、細胞表面の CD21/35 の発現低下、CD23 および MHC クラス II の発現上昇が見られ、ポリクローナルな活性化を示すことが分かった (図 4)。しかしながら、*Tslpr* 欠損マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を移植したヌードマウスでは野生型を移植したもので見られたような B 細胞の活性化が見られず、細胞表面の表現型はコントロールプラスミドを投与したもの、または CD4 陽性 T 細胞を移植していないマウスと同じであった (図 4)。

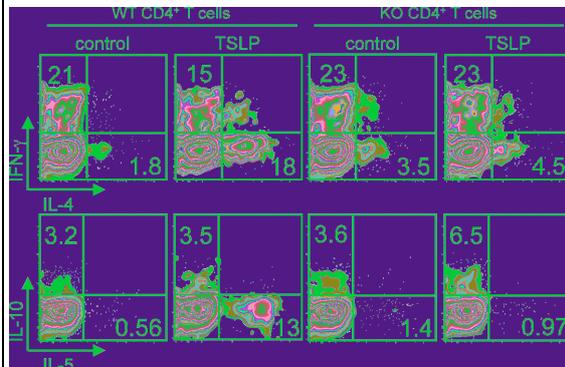


図5. TSLP 過剰発現により野生型 CD4 陽性 T 細胞は IL-4、IL-5 産生細胞 (Th2 細胞) へ分化するが、*Tslpr* 欠損 T 細胞ではそれが見られない

更に移植した CD4 陽性 T 細胞を *in vitro* で刺激しサイトカイン産生を調べると、TSLP の過剰発現によって野生型 CD4 陽性 T 細胞には IL-4、IL-5 産生細胞 (Th2 細胞) が見られるのに対し、*Tslpr* 欠損 CD4 陽性 T 細胞ではそれが大幅に減少していた (図 5)。従って、TSLP が CD4 陽性 T 細胞を直接刺激することが IL-4、IL-5 を産生する Th2 細胞への分化、またそれに続く B 細胞の活性化に必須であることを明らかにした。

TSLP がアレルギー性疾患を引き起こす際の標的細胞については当初は樹状細胞と考えられていたが、その後 CD4、CD8 陽性 T 細胞、肥満細胞、好塩基球等が標的として報告されてきた。本研究によってアレルギーおよび自己免疫疾患に通じる生体内での TSLP の標的細胞は CD4 陽性 T 細胞である、という新たな機構が明らかとなり、今後の TSLP を標的とした免疫疾患の治療法開発に役立つことが期待できる。

(3) TSLP 過剰発現後の IL-4 産生が B 細胞に及ぼす影響の解析

TSLP の過剰発現によって Th2 分化が誘導され、Th2 細胞から大量の IL-4 が産生される。IL-4 は様々な機能を有するサイトカインであり、B 細胞のポリクローナルな活性化と細胞生存、また増殖の補助シグナルとして働き、自己免疫疾患の発症につながることを明らかにしてきた。これらの他にも B 細胞に影響を与える可能性を考え、B 細胞上の IL-4 受容体 α 鎖 (IL-4R α) の発現に注目し、解析を行った。

ドキシサイクリン投与前の K5-TSLP マウスおよびコントロールマウスの末梢血中 B 細胞表面の IL-4R α の発現レベルをフローサイトメトリーで調べたところ、両マウス群間で差は見られなかった。しかしながらドキシ

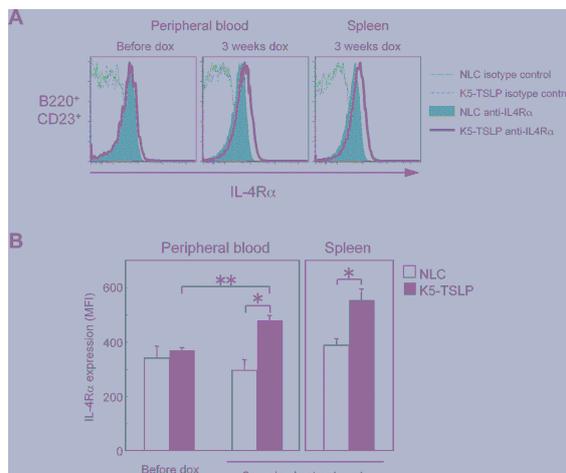


図 6. TSLP 過剰発現による B 細胞上の IL-4 受容体 α 鎖の発現上昇

サイクリンを飲料水中に 1 mg/ml、3 週間投与し TSLP の過剰発現を誘導した後同様に末梢血中 B 細胞上の IL-4R α の発現を調べると、K5-TSLP マウスで有意に上昇していることが分かった。また、脾臓の B 細胞上の IL-4R α の発現も同様に K5-TSLP マウスで有意に高くなっていた (図 6)。これは TSLP の過剰発現によって誘導された IL-4 の正のフィードバック効果によるものと推察される。

TSLP の過剰発現によって誘導される IL-4 は成熟 B 細胞の活性化のみならず、B 細胞上の IL-4R α の発現を誘導することにより、より IL-4 に反応しやすく活性化しやすい状態を作り出し、それを維持する役割もあることが明らかとなった。

以上の結果より、TSLP の過剰発現から Th2 分化の促進を経て自己免疫疾患に至る細胞間相互作用の機構、分子機構の詳細を初めて明らかにすることができた。これまで主にアレルギー疾患の起始因子として注目、解析されてきた TSLP が新たに自己免疫疾患の誘導因子であることが分かり、これまで不明であった複雑な免疫疾患の病態の理解、新たな治療法の開発に役立つと考えられる。今後は本研究でアプローチできなかった B 細胞の免疫寛容破綻のメカニズムを解析し、自己免疫疾患の発症機構の詳細に更に迫りたいと考えている。

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 2 件)

1. Iseki M, Omori-Miyake M, Xu W, Sun X, Takaki S, Rawlings DJ, Ziegler SF, Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B-cell activation and autoimmunity are mediated by CD4⁺ T cells and IL-4、International Immunology、査読有、Vol.24、2012、pp.183-195、DOI: 10.1093/intimm/dxr113
2. Larson RP, Zimmerli SC, Comeau MR, Itano A, Omori M, Iseki M, Hauser C, Ziegler SF, Dibutyl Phthalate-Induced Thymic Stromal Lymphopoietin Is Required for Th2 Contact Hypersensitivity Responses、The Journal of Immunology、査読有、Vol.184、2010、pp.2974-2984、DOI: 10.4049/jimmunol.0803478

[学会発表] (計 9 件)

1. Iseki M, Takaki S、IgE-specific

impairment in humoral immune responses by the absence of Aps/Sh2b2, a member of Lnk/Sh2b adaptor family、第40回日本免疫学会総会・学術集会、2011年11月27日、幕張メッセ(千葉)

2. Iseki M, Omori-Miyake M, Xu W, Sun X, Takaki S, Rawlings DJ, Ziegler SF、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B cell activation and autoimmunity are mediated by CD4⁺ T cells and IL-4、International Congress of Immunology 2010、2010年8月27日、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場(神戸)
3. Iseki M, Omori-Miyake M, Shih WX, Sun X, Rawlings DJ, Ziegler SF、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B cell activation and autoimmunity are mediated by CD4⁺ T cells and IL-4、第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2日、大阪国際会議場(大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井関 将典 (ISEKI MASANORI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・免疫制御研究部・免疫応答修飾研究室
長

研究者番号：30532353

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし