

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 4 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659096

研究課題名（和文） 好塩基球のプロテアーゼアレルギー・センシング機構の研究

研究課題名（英文） Mechanism for sensing protease allergens by basophils

研究代表者

瀧 伸介 (TAKI SHINSUKE)

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50262027

研究成果の概要（和文）：アレルギーであるパパインに対する好塩基球のセンサーのシグナル伝達について検討した。パパインに対する応答は活性化していない好塩基球では見られなかった。さらに、FcεRI を細胞表面に発現できない FcεRIβ 鎖を欠損する好塩基球のパパイン応答性は、約 50%の低下が見られた。従って、FcεRI はパパインセンサーとしての機能を持つが、それ以外の分子もまたセンサーとして機能しており、それらの応答性も FcεRI と同様な制御の下にあることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Intracellular signal transduction through putative ‘sensor’ for the allergen papain on murine basophils leading to IL-4 production was studied. IFcεRIβ-deficient basophils unable to display FcεRI on their cell surface mounted only around 50% magnitude of papain responses compared with those in wild-type basophils, indicating that FcεRI constitutes a fraction of papain sensors, while other, as yet unidentified, surface molecules could serve as papain sensors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

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、サイトカイン、好塩基球

1. 研究開始当初の背景

アレルギーは、通常の抗原と同様に抗原提示細胞に取り込まれ CD4⁺T 細胞に提示されることによって、2 型ヘルパー T (Th) 細胞を誘導しアレルギー反応を開始すると一般に考えられてきた。しかしながら、このようなとらえ方ではアレルギーがなぜ Th1 や Th17 ではなく Th2 を誘導するのか、という疑問には答えられなかった。これに対し、申請者自身の研究 (Hida ほか Blood 106:

2011-2017, 2005) を含む多くの先駆的研究に加え、2008 年になって好塩基球が in vivo での Th2 応答に重要であること、好塩基球がそれ自身抗原提示細胞として機能して Th2 応答を開始できることなどが Nature Immunol 誌に相次いでなされ、Th2 応答のプライマリポイントとしての好塩基球がにわかに大きな注目を集めている。特に Sokol らの報告 (Sokol ら、9:310-318, 2008 および 10, 713-720, 2009) では、モデルアレルギーであ

るパピインがプロテアーゼ活性依存的に好塩基球を直接刺激し、抗原提示能を付与するとともに IL-4 を産生させることを示した。すなわち、マウス好塩基球はアレルゲンのプロテアーゼ活性を感知しているのであって、Th1 応答における樹状細胞の pathogen receptors (TLR など) による分子構造に基づいた異物認識パラダイムとは異なる Th2 応答における異物認識機構の新しい概念の確立が求められている。申請者は独自に、これまでほとんどブラックボックスであったマウス好塩基球のシグナル伝達メカニズムの研究を行い、2009 年に IL-3 刺激で誘導される IL-4 産生機構について新知見を得て報告した (Hida ほか、Nature Immunol. 10: 214-222, 2009)。また、好塩基球は活性化されなければパピインによる IL-4 産生を示さないこと、パピイン応答が ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) 含有アダプター FcR γ を欠損する好塩基球では見られないこと、すなわちアレルゲンセンシングには FcR γ に associate した分子が関与しているという極めて重要かつ予想外の知見を得ている (肥田ら、未発表)。本研究は、このような好塩基球を取り巻く状況と申請者自身の成果に基づき計画された。

2. 研究の目的

本研究では、マウス好塩基球がどのような機構でアレルゲンとしてのパピインをセンシングするのかを明らかにする。特に、1) プロテアーゼによる細胞表面抑制性分子の切断によって抑制が解除され、FcR γ に会合する別の活性化分子による tonic シグナルが伝達される (抑制解除モデル)、2) プロテアーゼによって限定分解を受けることによって「センサー」分子が直接活性化されシグナルが伝達される (直接認識モデル)、という 2 つの仮説の検証が中心となる。そして、明らかにされる機構に応じて、センサーの分子的同定、もしくはセンシングに至るシグナル伝達機構の解明へと進む。

本研究は、申請者自身の長年の好塩基球研究の成果 (未発表を含む) と、その間に蓄積した実験システム、手技、ノウハウなどに基づき計画されており、他に類を見ないユニークなものである。本研究が順調に成果を上げれば、アレルギー研究に新たな局面が展開され、ヒトでの研究に対しても大きなインパクトが期待できる。さらに、このセンシング機構を標的としたアレルギー制御法の策定へとつながることも期待されると同時に、生体の異物認識機構にパラダイム転換をもたらす可能性を秘めている。

3. 研究の方法

骨髓もしくは脾臓より単離した直後の好塩基球は非活性化状態 (CD69⁻) であり、非感染状態では好塩基球は IgE の架橋には反応しないように制御されている。一方、骨髓細胞を IL-3 存在下で培養した好塩基球は活性化状態にあり (CD69⁺)、Fc ϵ RI 架橋には反応して IL-4 を産生する。ところが、引き続いて IL-3 不在下で 12 時間以上培養した”starved”好塩基球は休止状態に戻っており (CD69⁻)、Fc ϵ RI 架橋に対する反応性を失っていることが明らかになっている (未発表)。そこで、休止期および活性化好塩基球から mRNA を調製し、マイクロレイ解析を行い遺伝子発現パターンの包括的な解析を行い、いずれかの状態の好塩基球に特異的に発現している遺伝子、および発現量が活性化状態に応じて変化する遺伝子を同定した。IL-3 starvation によって、当然培養好塩基球には apoptosis が誘導されるため、apoptosis 関連遺伝子の発現変化が起きることが予想される。これらの遺伝子の影響を排除するために、抗 apoptosis 因子である Bcl-X_L をレトロウイルスを用いて強制発現させた好塩基球を準備し、同様な網羅的解析を行った。同定された遺伝子からいくつかを選択し、RT-PCR 法によって発現の変化を確認し、さらに好塩基球に強制発現させることで starvation に伴う Fc ϵ RI 架橋シグナルへの応答性の低下が補償できるか否かを指標に機能的な検討を行った。

4. 研究成果

好塩基球は、その IL-4 産生能から 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞応答やアレルギー反応に重要であり、その頻度や IL-4 などのサイトカイン産生能の制御異常は、非感染時において自発的な Th2 バイアス、SLE 様自己免疫疾患を引き起こすことが知られている。本研究では、IL-3 によって刺激した活性化好塩基球とは対照的に IL-3 非存在下で同時培養 (starvation) した”starved”好塩基球は Fc ϵ RI 架橋に対する IL-4 産生応答を示さず、好塩基球は Fc ϵ RI 架橋に反応するためには活性化状態に無ければならない。抗アポトーシス因子 Bcl-XL をレトロウイルスベクターを用いて導入した好塩基球についても同様な解析を行い、IL-3 除去によるアポトーシスは応答性には無関係であることを見いだした。マイクロレイ解析によって様々な遺伝子が starvation によって低下することが明らかになっており、これら遺伝子のうち Bcl6 や SOCS-1 などが Fc ϵ RI 応答性制御に関与している可能性を見だし、これら分子がどのようにして IL-4 産生を制御しているのかについて検討を加えている。一方、好塩基球の IL-4 産生を誘導することが知られているプロテアーゼアレルゲン、パピインに対するセンサーのシグナル伝達についても検討を行った。

パパイイン刺激にも FcγR 分子が必要であるが、FcεRI 応答と同様にパパイインに対する応答も "starved" 好塩基球では見られないことが明らかとなった。さらに、FcεRI を細胞表面に発現できない FcεRIβ 鎖を欠損するマウス由来の好塩基球のパパイイン応答性は、野生型好塩基球に比較して約 50% に低下していることが見いだされた。従って、FcεRI はパパイインセンサーとしての機能を持つが、それ以外の分子もまたセンサーとして機能しており、すなわち好塩基球は複数のセンサーを用いてプロテアーゼアレルゲンの情報を感知していることが明らかとなった。通常、好塩基球が発現しない CD8 分子の細胞外および膜貫通部を FcγR 鎖細胞内部分と融合させた分子を作成し、FcγR 欠損好塩基球に導入したところ、パパイイン処理による IL-4 産生がわずかながら回復した。このことは、パパイインセンサーは特定の分子ではなく、何らかの構造的特徴(現時点では不明であるが)を共有する一連の分子群によってその機能が担われているものと考えられる。それらの応答性も FcεRI と同様な制御、すなわち IL-3 によって活性化された時のみシグナルを伝達できるようになる、という制御の下にあることが明らかとなった。

以上の結果から、以下のことが示唆された。好塩基球は、resting 状態では FcεRI 架橋やパパイイン刺激に反応しないが、同じく FcγR をアダプターとして用いる IL-3 受容体を介する刺激には応答する。このことは、ナイーブなマウスが IgE+ 抗原で誘導されるアナフィラキシーに反応しないこと、好塩基球は、寄生虫の感染やメモリー B 細胞応答などの 2 次応答の際に重要であり、primary response にはそれほど関与していないこと、などすでに知られている現象のメカニスティックな基礎が、好塩基球の活性化状態による応答性の制御機構によって説明できるのではないかと示唆する。また Lyn キナーゼを欠損して、FcεRI 反応性が亢進した好塩基球は全身性ループス様の疾患を発症することが報告されている。この研究で検討している活性化状態に応じた FcεRI 反応性の制御機構が明らかになれば、好塩基球の関与する免疫応答、免疫疾患の理解が進むものと期待される。この研究の結果、いくつかの FcεRI シグナル制御の候補分子が見出され、その機能的な検討を進めているが、それらの分子が、やはり FcγR を介するにもかかわらず FcεRI シグナルとは異なる制御下にある IL-3 シグナルに対して何らかの作用を持っているのかどうかにも興味を持たれる。また、プロテアーゼアレルゲンであるパパイインの刺激受容機構に関して、ITAM-Syk 経路が重要であること、FcεRI がパパイインセンサーとして機能しうるが、唯一のセンサーではないことが明らかになった。やはり Th2 応答を誘導する

Schistosoma 卵成分 IPSE-alpha は FcεRI を介して好塩基球に IL-4 産生を誘導することが知られているが、この場合 IPSE-alpha は FcεRI 自体ではなく、そこに結合した IgE に抗原非特異的に作用している。これに対して、培養好塩基球ではおそらく FcεRI に結合した IgE は失われているものと考えられるため、パパイインの好塩基球刺激機構は IgE ではなく FcεRI 自体に向けられたものであり、IPSE-alpha のそれとは異なると予想される。

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 9 件)

①Minamoto K, Takahara K, Adachi T, Nagaoka K, Iyoda T, Taki S, Inaba K. IRF-2 regulates B cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms. *Int Immunol*. 2012 印刷中. 査読有り

②Notake T, Horisawa S, Sanjo H, Miyagawa S, Hida S, Taki S. Differential requirements for IFN regulatory factor-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors. *J. Immunol*. 188:4838-4845, 2012. DOI:10.4049/jimmunol.1200210, 査読有り

③Yoshizawa K, Nakajima S, Notake S, Miyagawa S, Hida S, Taki S. IL-15-high-responder developing NK cells bearing Ly49 receptors in IL-15-/- mice. *J. Immunol*. 187: 5162-5169, 2011. DOI:10.4049/jimmunol.1101561, 査読有り

④Hata T, Takahashi M, Hida S, Kawaguchi M, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Nishiyama A, Izawa A, Koyama J, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Critical role of Th17 cells in inflammation and neovascularization after ischaemia. *Cardiovasc Res* 90: 362-372, 2011. DOI: 10.1093/cvr/cvq397, 査読有り

⑤野竹剛、瀧伸介. 活性化 T 細胞における NK レセプターの発現. *臨床免疫・アレルギー科* 55 : 475-482, 2011. 査読無し

⑥Yamazaki K, Yamazaki T, Taki S, Miyake K, Hayashi T, Ochs HD, Agematsu K. Potentiation of TLR9 responses for human naive B-cell growth through RP105 signaling. *J. Clin. Immunol*. 135:125-136, 2010. DOI:10.1016/j.clim.2009.12.013, 査読有り

⑦小田朗永、瀧伸介. 好塩基球における IL-4 産生誘導シグナル伝達機構と Th2 分化.

臨床免疫・アレルギー科 54: 546-553, 2010.
査読無し

⑧肥田重明、瀧伸介. Th2 分化と好塩基球. 実験医学 28 : 1879-1884, 2010. 査読無し

⑨肥田重明、瀧伸介. 好塩基球からの IL-4 産生誘導機序. 炎症と免疫 18:9-13, 2010. 査読無し

[学会発表] (計 8 件)

①瀧伸介. 好塩基球におけるサイトカイン・シグナルの正と負の制御. 第 117 回日本解剖学会総会, リンパ系・免疫系懇話会, 2012.3.26, 甲府

②A. Oda, Y. Sakamoto, H. Sanjo, T. Notake, T. Takai, S. Hida, S. Taki, IL-3-induced IL-13 production by basophils but not mast cells was sensitive to Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B mediated inhibitory signals. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011.11.28、千葉

③T. Notake, A. Oda, H. Sanjo, S. Hida, S. Taki, IL-15-independent generation of memory-like 'innate' CD8+ T cells in IRF-2-deficient mice. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011.11.28、千葉

④A. Oda, Y. Sakamoto, T. Takai, S. Hida, S. Taki, Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B attenuates IL-3-induced IL-4 production in a novel ITIM-independent manner in murine basophils. 14th international congress of immunology, 2010. 8. 27, Kobe, Japan.

⑤T. Notake, S. Horisawa, F. Arakura, S. Hida, S. Taki. Generation of CD1d-independent T cells bearing various NK receptors requires interferon regulatory factor-2 differentially. 14th international congress of immunology, 2010. 8. 25, Kobe, Japan.

⑥K. Minamino, T. Adachi, K. Nagaoka, K. Takahara, S. Taki, K. Inaba. Regulation of B cell function and development through IRF-2 in type I interferon receptor-dependent and -independent mechanisms. 14th international congress of immunology, 2010. 8. 24, Kobe, Japan.

⑦S. Hida, A. Oda, I. Koshi, S. Taki. Basophils sense various external signals with their Fcγ-associated cell surface molecule(s) to produce IL-4 in eliciting Th2 responses. 14th

international congress of immunology, 2010. 8. 23, Kobe, Japan.

⑧K. Yamazaki, T Hayashi, S. Taki, K. Miyake, H.D.Ochs, K. Agematsu, Potentiation of TLR9 responses for human naïve B-cell growth through RP105 signaling. 14th international congress of immunology, 2010. 8. 23, Kobe, Japan.

[その他]

ホームページ ;
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・医学系研究科・教授
研究者番号 : 50262027

(3) 連携研究者

肥田重明 (HIDA SHIGEAKI)
信州大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 10345762