

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790438

研究課題名（和文）好塩基球のサイトカイン産生と 2 型免疫応答発動に關与するシグナル伝達経路の制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of signal transduction involved in cytokine production from basophils and the control of type 2 immune response.

研究代表者

山条 秀樹 (SANJO HIDEKI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：50391967

研究成果の概要（和文）：2 型免疫応答への関与が知られる好塩基球の活性化とサイトカイン産生を制御するシグナル伝達経路の未知の分子機構を明らかにするべく研究を行った。その結果、1)休止期好塩基球はシグナル伝達分子群の発現レベルを負に調節することで IgE 受容体である FcεRI からのシグナル伝達を抑制する、2)休止期好塩基球では、転写抑制因子 Bcl6 により FcεRI 架橋によるサイトカイン産生誘導を負に制御する、という調節機構の存在が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to reveal the unknown molecular mechanisms of signaling pathway that regulate activation of basophils, important for type 2 immune response, as well as cytokine production. As a result the regulatory mechanisms were evident that the resting basophils restrain the signal transduction via FcεRI, a receptor for IgE, by negatively regulating the protein levels of signaling molecules and Bcl6, known as transcriptional corepressor, negatively regulates cytokine production induced by FcεRI crosslinking in the resting basophils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：好塩基球・サイトカイン・シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

生体防御反応の 1 つとして「2 型免疫応答」というものが明らかになっているが、これは細胞性免疫応答の一翼を担うリンパ球ヘルパー T 細胞 (Th) 群の中でも Th2 細胞による機能発揮による事が現在広く認知されている。この 2 型免疫応答の失調は、時に各種アレルギー性疾患を誘導することが明らかとなり、上記疾患の発症機構を正しく理解するための取り組みは、治療法の確立、発症予防の観点から、極めて重要度の高い課題と言える。現在好塩基球は寄生虫感染等により誘導される 2 型免疫応答における関与が注目されている。興味深い事に、好塩基球は Th2 細胞と

同様サイトカイン IL-4 や IL-13 を産生することが明らかとなり、2 型免疫応答における主体的役割が示唆されている。しかしながら、好塩基球がどのようにして Th2 細胞と協調して作動しているのか、そもそも好塩基球は 2 型免疫応答発動時において、どのようにして活性化され、エフェクター細胞となり、その応答に関わっているのか依然として不明な点が多い。そこで本研究は、好塩基球の活性化とサイトカイン産生の作動機構を分子レベルで明らかにすることで、好塩基球が 2 型免疫応答に如何に貢献しているのかについて考察するべく企画立案された。

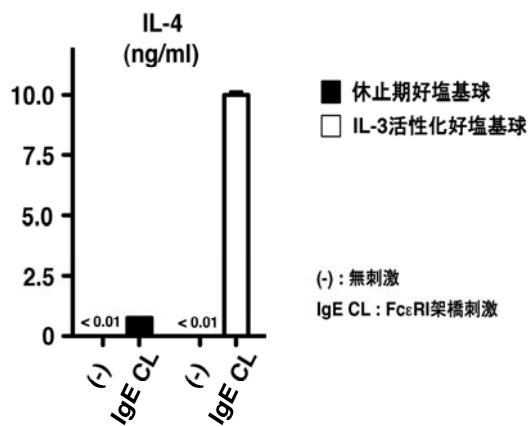
## 2. 研究の目的

我々はこれまでの研究成果から、好塩基球の活性化状態に応じて IL-4 産生を誘発するシグナル伝達経路が緻密に制御されるいわゆる「可逆的スイッチング機構」の存在を提唱し、この機構が後の 2 型免疫応答発動から持続という一連の反応過程の制御に貢献しているのではないかと考えている。そこで本研究において、好塩基球の活性化と IL-4 産生、さらには 2 型免疫応答に対する関連性について着目し、これまでの知見をもとに未知の作動機序の詳細を分子レベルで明らかにする事を目標とする。中でも様々な細胞種において重要な役割を果たすことが知られている転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化するシグナル伝達経路に注目し、「可逆的スイッチング機構」との関連性について検証する。

## 3. 研究の方法

これまでの我々の研究から、好塩基球は IL-3 による活性化の度合いに応じて Fc $\epsilon$ RI 架橋による IL-4 産生能に違いが見られることを明らかにしてきた。具体的には、休止期好塩基球では Fc $\epsilon$ RI を刺激しても IL-4 等のサイトカイン産生は非常に低く制御されているのに対し、好塩基球が IL-3 刺激により活性化されると、Fc $\epsilon$ RI 刺激により速やかに且つ大量のサイトカイン産生を示すようになる (Figure 1)。これが我々の提唱する「可逆的スイッチング機構」の元になっている。

Figure 1



この機構を分子レベルで説明するために次の実験を行った。

(1) マイクロアレイ解析：休止期あるいは活性化好塩基球中に発現するタンパクの違いが上記の機構を説明するのではないかと考えた。そこでマウス骨髄由来培養好塩基球を調製し、IL-3 を除去した休止期好塩基球及び IL-3 刺激活性化好塩基球を準備しこれらの細胞から RNA を単離、精製しマイクロアレイ

解析を行った。

(2) 遺伝子導入実験：上記機構を説明する遺伝子が存在すれば、好塩基球に強制発現させることで休止期好塩基球が Fc $\epsilon$ RI 刺激により IL-4 産生能を獲得するのではないかと考えた。そこで上記マイクロアレイ解析より IL-3 によって発現制御されている遺伝子を整理し、これらの中でもシグナル伝達経路に関係しそうな遺伝子群を選択し、レトロウイルス発現ベクターに導入し、マウス骨髄培養好塩基球に遺伝子導入する。そして不活性化好塩基球に Fc $\epsilon$ RI 刺激をし IL-4 産生能を獲得したかどうか flow cytometry 法あるいは ELISA 法にて検証した。

(3) 休止期または活性化好塩基球における各種受容体シグナル伝達経路の活性化についての検討：増殖因子 IL-3 の受容体 (IL-3R) 及び Fc $\epsilon$ RI を介したシグナル伝達経路の活性化について休止期または活性化状態の好塩基球において違いが存在し、この違いが上記機構を説明するのではないかと考えた。そこで生化学的な解析を計画したが、正常マウス (C57BL/6 等) から調製した骨髄由来培養好塩基球は休止期好塩基球を準備する際、増殖・生存因子である IL-3 を除去すると激しい細胞死を起こすため生化学的な解析は不可能であると判断した。そこで血球系細胞において細胞死抑制因子として知られる Bcl2 を過剰発現する Bcl2 トランスジェニックマウスを利用した。実際このマウスから調製した骨髄培養好塩基球は IL-3 を除去した後も生存していることを確認できたので、それらの細胞を用いて休止期または活性化状態の好塩基球を IL-3 あるいは IgE 複合体で刺激し、細胞内シグナル伝達経路の活性化についてイムノブロット法にて検証した。

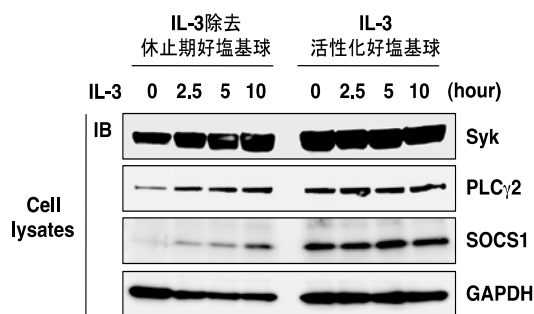
## 4. 研究成果

マイクロアレイ解析の結果から、IL-3 により制御される遺伝子群が多数明らかになった。その中からシグナル伝達経路に関係しそうな遺伝子を選択し、IL-3 により発現誘導される約 20 個の候補遺伝子についてスクリーニングを行った。しかしながら休止期好塩基球における IL-4 産生誘導能獲得に寄与する遺伝子は調べた限り見つからなかった。その一方で、IL-3 刺激により発現が低下する遺伝子として転写抑制因子 Bcl6 を同定した。興味深い事に、Bcl6 を強制発現させた IL-3 活性化好塩基球は対照群と比べて IgE 複合体による Fc $\epsilon$ RI 刺激に伴う IL-4 産生をほとんど示さなかった。この事から Bcl6 が IL-3 刺激による好塩基球活性化及びそれに伴うサイトカイン産生を負に制御する因子であることが示唆された。

次に Bcl2 トランスジェニックマウス由来骨髄培養好塩基球を使った生化学的解析から

以下の事が明らかとなった。IL-3を除いた不活化好塩基球では IL-3 活性化好塩基球と異なり FcεRI シグナル伝達経路に関わる分子で特に NF-κB 活性化に重要な分子(Syk, PLCγ2, CARD9, Bcl10, MALT1, TAK1, IKKβ)の発現がタンパクレベルで著明に減少していた。これらのタンパクは IL-3 刺激に伴い時間依存的にその発現が回復されることも確認した (Figure 2)。

**Figure 2**



次に休止期好塩基球を FcεRI 架橋により刺激しシグナル伝達分子の活性化をリン酸化を指標に検討したところ、活性化好塩基球の場合と同様に Syk, PLCγ2, JNK のリン酸化は認められるのに対し、IKKβ及び IκBαのリン酸化は活性化好塩基球と較べて減弱していた。またこの時 FcεRI 刺激が Syk, PLCγ2 等のタンパクレベルの発現回復をもたらしたのに対し、MALT1 のタンパク発現の回復は認められなかった。

以上の結果をまとめると次のようになる。  
 (1) 休止期好塩基球は何らかの機構により FcεRI シグナル伝達関連分子群のタンパク発現レベルを負に調節している、(2) IL-3 刺激による好塩基球の活性化はシグナル伝達分子のタンパクレベルの安定化を促進する、(3) 不活化好塩基球を FcεRI 刺激しても MALT1 タンパクの発現回復不良のため下流へのシグナルは伝達されにくい(特に NF-κB 活性化に繋がる経路において)、(4) 休止期好塩基球では転写抑制因子 Bcl6 がサイトカイン産生の負の制御に重要な役割を果たしている。  
 これらを踏まえて可逆的スイッチング機構に見られる休止期好塩基球における FcεRI 刺激によるサイトカイン産生不良の原因を考察すると、(1)シグナル伝達経路の不全、(2) 転写抑制因子による負の制御、という複数の制御機構が考えられ、IL-3 刺激による好塩基球の活性化が上記の全ての負の制御を解除し、好塩基球のサイトカイン産性能の獲得に寄与していることが考えられる。これらはある受容体を介したサイトカイン産性能の獲得がその受容体を発現する細胞そのものの活性化状態に極めて依存している事を示す

興味深い知見である。さらに活性化 T 細胞は IL-3 を産生することが知られていることから、2 型免疫応答において好塩基球の活性化とサイトカイン産性能の獲得に T 細胞が関与している可能性が考えられる。今後この分子機構の解明に向けた研究が更に進展すれば、生体内における 2 型免疫応答との関連性 (例えば免疫反応の増強または終息) を考察する上で重要な情報を提示してくれるものと期待される。

## 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 2 件)

- 1) Ori D., Kato H., Sanjo H., Tartey S., Mino T., Akira S., and Takeuchi O. (2013). Essential roles of K63-linked polyubiquitin-binding proteins TAB2 and TAB3 in B cell activation via MAPKs. *J Immunol* 190, 4037-4045. 査読有り  
doi: 10.4049/jimmunol.1300173.
- 2) Notake T., Horisawa S., Sanjo H., Miyagawa S., Hida S., and Taki S. (2012). Differential requirements for IRF-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors. *J Immunol* 188, 4838-4845. 査読有り  
doi: 10.4049/jimmunol.1200210.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Hasegawa A., Hida S., Sanjo H., Oda A., Taki S., Taniguchi S. Paxillin was required for IL-3-induced IL-4 production in basophils.  
日本免疫学会 2012 年 12 月 6 日 神戸
- 2) Ori D., Kato H., Sanjo H., Akira S., Takeuchi O. Essential roles of Tab2 and Tab3 in the activation of MAPK, but not NF-κB, in B cells.  
日本免疫学会 2012 年 12 月 5 日 神戸
- 3) Oda A., Sakamoto Y., Sanjo H., Notake T., Takai T., Hida S., Taki S. IL-3-induced IL-13 production by basophils but not mast cells was sensitive to Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B

mediated inhibitory signals.

日本免疫学会 2011年11月29日 千葉

- 4) Notake T., Oda A., Sanjo H., Hida S., Taki S IL-15-independent generation of memory-like 'innate' CD8+ T cells in IRF-2 deficient mice.

日本免疫学会 2011年11月28日 千葉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山条 秀樹 (SANJO HIDEKI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：50391967

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし