

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791098

研究課題名(和文)新規 IL-5R 鎖の生物活性と好酸球分化機構における役割の解明

研究課題名(英文)Biological activity of IL-5Ra variants and their roles for eosinophilic differentiation

研究代表者

石原 研治 (Ishihara, Kenji)

茨城大学・教育学部・准教授

研究者番号：00312596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：IL-5 は好酸球の分化・成熟に必須なサイトカインであるが、分化・成熟した後の好酸球にも作用し、同細胞を活性化したりアポトーシスを抑制したりする。IL-5 の機能からさらなるレセプターを探索して、ヒト IL-5 レセプター (IL-5R) 鎖の 2 つの新規 splicing variants を同定 (variant 7 および variant 8) した。既知の IL-5R とともに variant 7 および variant 8 を細胞に発現させる系を構築した。Eosinophils in health and diseases という本の分担執筆依頼を受けた。

研究成果の概要(英文)：IL-5 is a cytokine that is necessary for differentiation and maturation for eosinophils from their precursor cells such as hematopoietic stem cells. IL-5 also plays activation and survival for mature eosinophils. This study showed two novel IL-5Ras, namely IL-5Ra V7 and V8, and constructed the expression systems for IL-5Ra V7 and V8 on mammalian cells using retrovirus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：好酸球 IL-5 分化

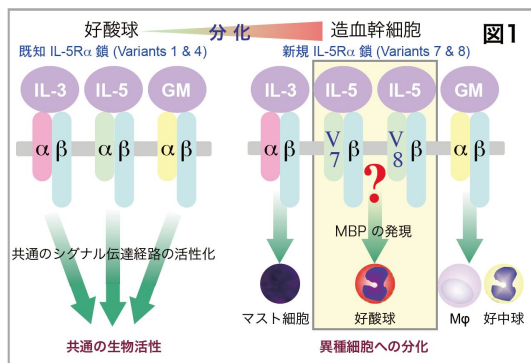
1. 研究開始当初の背景

(1) 好酸球に対する IL-5 の作用

IL-5 は好酸球の分化・成熟に必須なサイトカインであるが、分化・成熟した後の好酸球にも作用し、同細胞を活性化したりアポトーシスを抑制したりする。これまで IL-5 のターゲットとして IL-5R $\alpha$  (variants 1 & 4, 後述) 鎖が同定され、IL-5 の作用はすべてこの既知 IL-5R $\alpha$  鎖を介し発揮されるものと考えられていた。しかし、IL-5 が好酸球に対し分化誘導作用を発揮する分子メカニズムに関しては既知 IL-5R $\alpha$  (variants 1 & 4) 鎖では説明できない。

(2) 予備的知見 [Variants 7 & 8 は分化段階に特異的に発現。既知 IL-5R $\alpha$  (variants 1 & 4) 鎖とは異なるシグナルを伝達し好酸球への分化を誘導する?]

既知 IL-5R は IL-5R に固有の  $\alpha$  鎖 (variants 1 & 4) と IL-3、IL-5 および GM-CSF の受容体に共通の  $\beta c$  鎖のヘテロダイマーから成る。これら 3 つのサイトカインは成熟好酸球に対し既知受容体を介して共通のシグナル伝達経路を活性化して細胞死抑制作用などの共通の生物活性を示す (図 1)。一方、造血幹細胞は IL-5 により好酸球に分化するが、IL-5 と  $\beta c$  鎖を共有する IL-3 や GM-CSF ではそれぞれマスト細胞、マクロファージ・好中球に分化する。また、造血幹細胞が IL-5 により好酸球に分化する過程では好酸球顆粒蛋白質 Major Basic Protein が発現するが、成熟した好酸球を IL-5 で刺激しても発現しない。従って、IL-5 が造血幹細胞を好酸球に分化・成熟させる時のシグナル伝達経路は IL-3 や GM-CSF によるシグナル伝達経路とは異なり、しかもこの好酸球への分化・成熟経路は成熟好酸球のものとも異なると予想されるが未解明である (図 1)。

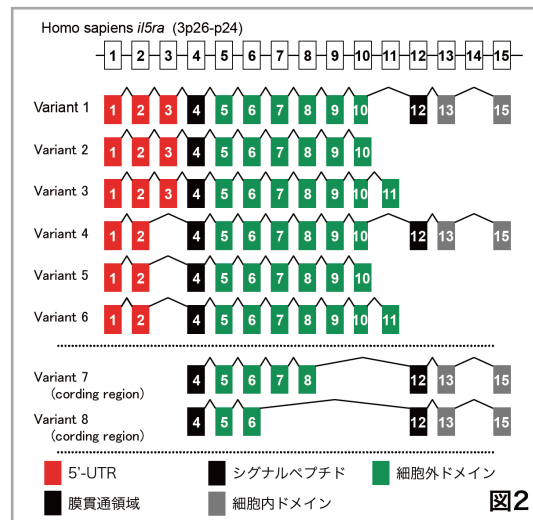


代表者は、好酸球への分化・成熟過程に関与する IL-5R $\alpha$  鎖は既知の IL-5R とは異なると考えて受容体を探索した結果、IL-5R $\alpha$  鎖 variant 7 と variant 8 を同定することに成功した。ヒト造血幹細胞が好酸球に分化する初期段階に variants 7 & 8 が発現し、分化中・後期にかけては既知

IL-5R $\alpha$  (variants 1 & 4) の発現量が増加して variants 7 & 8 に置き換わり、成熟好酸球では既知 IL-5R $\alpha$  (variants 1 & 4) のみが発現することを明らかにした。本知見は、IL-5 が成熟好酸球に対して既知 IL-5R $\alpha$  (variants 1 & 4) 鎖を利用し生物活性を示すというこれまでの報告と一致し、さらに、未解明である造血幹細胞から好酸球への分化に variants 7 & 8 が重要な役割を担っていることを予想させるものである。

(3) 新規 IL-5R $\alpha$  鎖 splicing variants 7 & 8

IL-5R 鎖の遺伝子は 15 個のエクソンにより構成され、6 つの variants が登録されている (図 2)。



しかし、エクソン 1、2、3 は 5'-UTR をコードするので、蛋白質レベルでは variants 1 と 4 は同一、variants 2 と 5 は同一、variants 3 と 6 は同一となり、variant の数は 3 となる (variants 1 & 4, variants 2 & 5, variants 3 & 6)。Variants 1 & 4 は膜貫通型であり受容体として機能するが、variants 2 & 5 および 3 & 6 は可溶性 IL-5R 鎖であり IL-5 のアンタゴニストとして作用する。代表者が同定した 2 つの新規 IL-5R 鎖 splicing variants 7 と 8 はそれぞれエクソン 9-11 と 7-11 を欠損するが、開始コドン、細胞外ドメインの一部、膜貫通領域、細胞内ドメインを持つので、細胞膜上に発現していると考えられる。これまでの IL-5R の構造機能解析結果より、variant 7 および variant 8 は IL-5 結合能を有すると予想される。代表者は、これらの variants が従来の IL-5R (variants 1 & 4) とは異なるシグナル伝達機構を持ち、これにより未解明であった IL-5 による好酸球の分化誘導機構を説明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

好酸球は気管支喘息などのアレルギー疾

患の病態の進行に深く関与するエフェクター細胞である。代表者は、最近、ヒト IL-5 レセプター (IL-5R)  $\alpha$  鎖の 2 つの新規 splicing variants をクローニングし、variant 7 (AB288089) および variant 8 (AB288090) と命名して遺伝子データベースに登録した。これまでの解析により、variants 7 & 8 は分化した好酸球でなく造血幹細胞に特異的に発現することを見出している。この結果は、IL-5 による造血幹細胞から好酸球への分化過程において variants 7 & 8 が何らかの役割を持つことを示唆している。そこで、本研究はこれまでの予備的知見に基づき、「造血幹細胞から好酸球への分化における IL-5R $\alpha$  鎖 variant 7 と variant 8 の役割を明らかにし、今まで未解明であった好酸球分化機構を説明すること」を目的とする。本成果は好酸球数の増加を好酸球の分化レベルで抑制する薬物の開発につながると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨髄幹細胞から好酸球への分化誘導

ヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup> 幹細胞 (Takara) を IL-3、IL-5、GM-CSF、Flt-3、SCF を含む 10%-IMDM 培地中で 3 日間培養した。その後、IL-3 および IL-5 存在下で計 21 日間培養した。好酸球への分化の確認は細胞の塗抹標本を作製後に May-Giemsa 染色および Luxol-fast-blue 染色を行い、顕微鏡下で観察した。

#### (2) HL-60 clone 15 細胞の好酸球への分化誘導

HL-60 clone 15 細胞を 0.5 mM の n-butyrate を含む 10%-RPMI-1640 (pH 7.8) 培地中で 6 日間培養した。

#### (3) Total RNA の採取

ヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup> 幹細胞から好酸球に分化誘導する過程において経時的に Total RNA を採取した。Total RNA は GenElute Mammalian Total RNA Purification (Sigma) を用いた。

#### (4) RT-PCR

採取した total RNA をテンプレートとして逆転写反応を行い cDNA を合成した。この反応には M-MLV Reverse Transcriptase (Life technologies) を用いた。次いで、その cDNA をもとに PCR を行った。用いたプライマーおよび PCR の条件は以下の通りである。

##### ・ IL-5Ra

Sense Primer

5'-AAAAGGATCCACCATGATCATCGTGGCGCATGTATTA-3'

Antisense Primer

5'-AAAAGCGGCCGCTCAAACACACGATCCTCCAGGGTCTC-3'

##### ・ PCR 条件

変性	94°C	30 s	
アニーリング	55°C	30 s	45 cycles
伸長	72°C	30 s	

##### ・ GAPDH

Sense Primer

5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3'

Antisense Primer

5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGCCCAT-3'

##### ・ PCR 条件

変性	94°C	1 min	
アニーリング	57°C	1 min	27 cycles
伸長	72°C	1 min	

#### (5) サブクローニング

PCR で得られたバンドをカッター用いて切り出し、アガロースゲルから PCR 産物を抽出した。

抽出した PCR 産物は pGEM-T vector (Promega) にサブクローニングした。

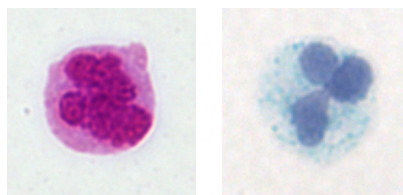
#### (6) 発現ベクターの構築

サブクローニングした IL-5Ra V4、V7、V8 をレトロウイルスベクター pMYs-puro (Cell BioLabs) にクローニングした。すなわち、pGEM-IL-5Ra V4、V7、V8 および pMX-puro を制限酵素 Bam HI (Takara) および Not I (Takara) で切断し、ライゲーションし pMXs-IL-5Ra V4、V7、V8 を得た。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨髄幹細胞から好酸球への分化誘導

ヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup> 幹細胞を各種サイトカイン存在下で 21 日間培養した結果、CD34<sup>+</sup> 幹細胞は好酸球に分化した。

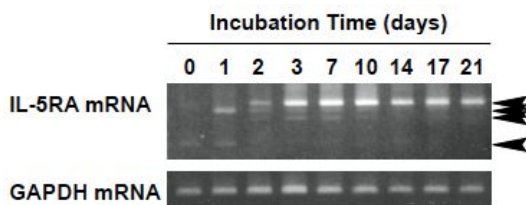


#### (2) RT-PCR

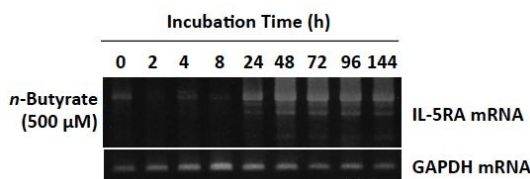
ヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup> 幹細胞を上述したように 21 日間培養し、経時的に total RNA を回収し、RT-PCR 法により全長 IL-5Ra mRNA を増幅した。その結果、培養開始後、複数のバンドが認められ、3 日目以降は 1 本に収束していった。また、HL-60 clone 15 細胞を n-butyrate で 6 日間培養すると好酸球に分化するが、この過程で経時的に total RNA を回収し、RT-PCR 法により全長 IL-5Ra 鎖を増幅した。その結果、ヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup> 幹

細胞の場合と同様に複数の IL-5Ra mRNA のバンドが検出された。

・ヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup> 幹細胞



・HL-60 clone 15 細胞

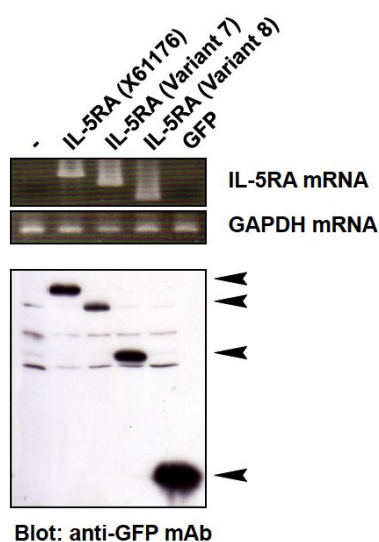


### (3) サブクローニング

PCR 産物をサブクローニングして塩基配列を決定したところ、これらの細胞から既知の IL-5Ra V4 および V7 と V8 が認められた。

### (4) IL-5Ra タンパク質の発現

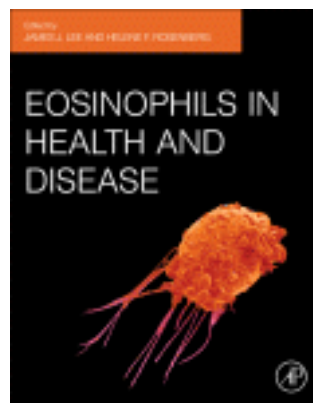
IL-5Ra V4 (X61176)、V7、V8 に GFP を結合させた fusion protein として発現ベクターに組み込み HEK 293 細胞に transfect した。その結果、それぞれの遺伝子がタンパク質として検出された。



### (5) Eosinophils in Health and Diseases 執筆

J Lee and HF Rosenberg からの依頼を受け *Eosinophils in Health and Disease* (Elsevier) の 4.2 Eosinophil Cell Lines. (42-46 頁) を分担執

筆した。この本は、約 20 年ほど前に好酸球の研究を行う世界の研究者が分担執筆した本 (*Eosinophils in Allergy and Inflammation*) の続編・リニューアル版にあたり、その一部を担当した。



### 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)

矢口杏子・石原研治「アレルギーに対する子どもたちの気持ちと養護教諭としての配慮」『茨城大学教育学部紀要 (教育科学)』(茨城大学教育学部) 第 63 巻, 251-265 頁. 2014. (査読無)

熊谷仁美・竹下誠一郎・宮川八平・石原研治「アレルギー疾患に対する養護教諭の保健指導の実態調査 他の職種との連携及び学校生活管理指導表の活用の実態について」『茨城大学教育学部紀要 (教育科学)』(茨城大学教育学部) 第 61 巻, 387-396 頁. 2012. (査読無)

熊谷仁美・竹下誠一郎・宮川八平・石原研治「アレルギー疾患に対する養護教諭の保健指導の実態調査 主に保健指導に関する相談・困難について」『茨城大学教育学部紀要 (教育科学)』(茨城大学教育学部) 第 61 巻, 377-385 頁. 2012. (査読無)

熊谷仁美・竹下誠一郎・宮川八平・石原研治「アトピー性皮膚炎の子どもへの対応について」『茨城大学教育学部紀要 (教育科学)』(茨城大学教育学部) 第 61 巻, 367-376 頁. 2012. (査読無)

熊谷仁美・石原研治「健常者のアレルギー意識と社会的役割について」『茨城大学教育学部紀要 (教育科学)』(茨城大学教育学部) 第 61 巻, 279-298 頁. 2012. (査読無)

Satou N, Ishihara K, Hiratsuka M, Tanaka H,

Endo Y, Saito S, Iwakura Y, Leonard WJ, Hirasawa N. "Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice." *Int Arch Allergy Immunol*. Vol. 157, No. 2, pp. 194-201. 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

熊谷仁美・竹下誠一郎・宮川八平・石原研治「アレルギー疾患の児童生徒への養護教諭の対応」第 58 回日本学校保健学会，2011 年 11 月，名古屋大学.

〔図書〕(計 2 件)

石原研治「好酸球と慢性炎症」炎症の制御と修復 (北陸館) Vol2, 74-77 . 2013.

Ishihara K, Hirasawa N, Ohuchi K. "Chapter 4.2 Eosinophil Cell Lines." JJ Lee and HF Rosenberg (ed.) *Eosinophils in Health and Disease* (Elsevier) 42-46 頁 . 2012.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

石原 研治 ( Kenji Ishihara )  
茨城大学・教育学部・准教授  
研究者番号：00312596

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし