

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790933

研究課題名(和文) 好酸球分化における新規インターロイキン-5受容体の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of interleukin-5 receptors on 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

研究成果の概要(和文)：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。インターロイキン-5 (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 α (variants 1, 4) 鎖が同定され、IL-5 の作用はすべてこの既知 IL-5R α 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 α (variants 1, 4) 鎖では説明できない。本研究では新たなレセプターを探索した結果、ヒト IL-5 レセプター (IL-5R) α 鎖の 2 つの新規 splicing variants を見だし、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。

研究成果の概要(英文)：Chronic allergic inflammation including bronchial asthma and atopic dermatitis is difficult to treat and the number of patients suffering from such diseases is increasing, probably reflecting environmental changes to life style. Eosinophils are one of the cells that play a critical role in the pathogenesis of allergic diseases. In bronchial asthma, eosinophils increase in number in bone marrow and peripheral blood, and accumulate at inflammatory sites in response to various kinds of cytokines and chemical mediators. Studies have demonstrated the mechanism by which eosinophils prolong their survival, infiltrate inflammatory sites and release granule proteins. However, the mechanism behind the differentiation of stem cells such as CD34⁺ cells into mature eosinophils has not been clarified. Clarification of this mechanism is important if one is to understand the generation and maturation of white blood cells, especially myeloid lineages, and may contribute to the development of novel medications for allergic inflammation. Inhibition of the differentiation toward the eosinophil lineage might be useful for the control of allergic inflammation as a preventive measure. In this study, two novel receptors for IL-5R are identified, and named as variant 7 and variant 8.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、アレルギー、分化

1. 研究開始当初の背景

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 α (variants 1, 4) 鎖が同定され、IL-5 の作用はすべてこの既知 IL-5R α 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 α (variants 1, 4) 鎖では説明できない。

2. 研究の目的

IL-5R は IL-5R に固有の α 鎖と IL-3、IL-5 および GM-CSF の受容体に共通の β 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。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 β 鎖を共有する IL-3 や GM-CSF によってそれぞれマスト細胞、マクロファージ・好中球に分化する。さらに、major basic protein は造血幹細胞が IL-5 により好酸球に分化する過程で発現し、成熟好酸球を 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、しかも成熟好酸球とも異なると予想される。このような観点から申請者は IL-5R α 鎖の variant を探した結果、variants 7, 8 を同定した。Variants 7, 8 は造血幹細胞から好酸球に分化する初期の段階で認められ、成熟した好酸球では発現していないこともすでに明らかにしている。成熟した好酸球には既知 IL-5R α (variants 1, 4) 鎖が発現していることが報告されているので、IL-5 は成熟好酸球に対しては既知 IL-5R α (variants 1, 4) 鎖を利用し、造血幹細胞から好酸球への分化には variants 7, 8 を利用しているのではないかと予想される。IL-5R α 鎖 variants 7, 8 は、既知 IL-5R α (variants 1, 4) 鎖とは異なるシグナルを伝達すること、さらに、造血幹細胞から成熟好酸球への分化を誘導する受容体であることが予想される。

慢性気管支喘息などのアレルギー性疾患は、その難治性と近年の環境変化に伴う患者数の増加により社会的な問題になっている。好酸球はこのようなアレルギー性疾患においてその細胞数が有意に増加しており、炎症局所へ集積し各種サイトカイン、ケミカルメディエーター、顆粒内の塩基性

蛋白質を産生・放出することにより気道上皮細胞の傷害・気道組織の線維化を引き起こす。このように好酸球は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。本研究は、造血幹細胞から好酸球への分化機序を解明しようとするものであり、学術的に意義深いだけでなく、その成果は好酸球の分化を抑制する薬物の開発につながるという意味において社会的な意義・貢献も大きい。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

HL-60 clone 15 細胞 (CRL-1964, American Type Culture Collection) は 10% FBS を含む RPMI-1640 medium (pH 7.8) 中で維持した。

(2) 分化誘導

ヒト骨髄由来 CD34⁺ 幹細胞から好酸球への分化誘導は、Buitenhuis *et al.* (Blood, 101:134-142, 2003) で述べられた方法に従った。すなわち、CD34⁺ 幹細胞を SCF、Flt-3L、IL-3、IL-5、GM-CSF を含む 10% FBS 含有 IMDM で 3 日間培養し、その後、IL-3 および IL-5 を含む培地に置換して 21 日まで培養した。好酸球への分化は培養後に塗沫標本作製して Luxol-fast-blue 染色および May-Giemsa 染色をして確認した。

HL-60 clone 15 細胞から好酸球への分化誘導は、HL-60 clone 15 細胞 (1×10^5 cells) を 0.5 mM の *n*-butyrate を含む 10% FBS 含有 RPMI-1640 medium (pH 7.8) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下で一定時間培養した。*n*-Butyrate は滅菌水に溶解し、medium 中に最終濃度が 0.1% (v/v) になるように添加した。

(3) RT-PCR 法

Total RNA は GenEluteTM Mammalian Total RNA Kit (Sigma) のプロトコールに従って抽出した。Reverse transcription (RT) は M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) の付属のプロトコールに従って行った。すなわち、1 μ g 相当量の total RNA 溶液となるように RNase-free-water を加え全量を 8 μ l にした。RNase-free-water で 60 倍希釈した random primer 溶液を 1 μ l、2.5 mM dNTP mixture を 4 μ l 加えた後、65°C で 5 分間インキュベートし、氷上で急冷後、スピンドウンして以下の組成の RT solution を 7 μ l 加え、37°C で 50 分間インキュベートした。その後、70°C で 15 分間インキュベートし、この産物を

cDNA とした。PCR は ExTaq ポリメラーゼ (Takara Bio) を用いて付属のプロトコールに従って行った。すなわち、cDNA (5 μ l)、10 x buffer (5 μ l)、dNTP mixture (4 μ l)、MilliQ H₂O (34.75 μ l)、sense primer (0.5 μ l)、antisense primer (0.5 μ l)、rTaq DNA polymerase (0.25 μ l) 中で反応させ、PCR 後、反応液を loading buffer と混合し、全量を 1.5 % (w/v) agarose gel にアプライして TBE buffer 中で 100 V、一定時間電気泳動を行った。泳動後、アガロースゲルを ethidium bromide で染色し、紫外線により発光させた。

PCR 条件

Denaturation	94°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	90 sec (40 cycles)

(4) IL-5R α 鎖のクローニング

アガロースゲル電気泳動後に、IL-5R α 鎖と思われるバンドをカッターで切り出し、Mag extractor (Toyobo) を用いて PCR 産物を抽出した。この PCR 産物を pENTR directional TOPO cloning kit (Invitrogen) を用い pENTR vector に ligation し、大腸菌 TOP10 を形質転換して 1 ml の LB medium 中で培養した。次いで、37°C に加温しておいた LB kanamycin plate に大腸菌培養液を塗布して 37°C で 12 時間培養した。

培養後に形成されたコロニーを釣菌して 1 ml の LB kanamycin medium 中で培養した後、上記同様の手順で PCR および電気泳動を行った。IL-5R α 鎖が pENTR vector に挿入されていることを確認した後、700 μ l の大腸菌液に 300 μ l の 50% glycerol 溶液を加え冷凍で保存した。

(5) シークエンス

1.5 μ g 相当量の plasmid を template として Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP を用いて PCR を下記のように行った。反応終了後、各反応液に 4 μ l の stop solution を加えて冷蔵保存し、ゲルへロードする直前に 95°C、5 分間の熱変性と氷冷を行った。DNA のシークエンスは DNA sequencer (DSQ-2000L, Shimadzu) を用いて 12 時間泳動し塩基配列を解析した。

PCR 条件

Denaturation	98°C	60 sec
Annealing	50°C	45 sec

Extension	72°C	90 sec (30 cycles)
-----------	------	-----------------------

(6) 遺伝子相同性検索

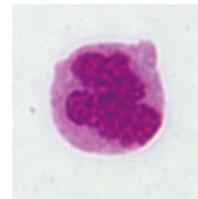
DNA シークエンスにより得られた配列をもとに、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の web site 内のコンテンツでヒト IL-5R α 鎖 (X61176) を対象に相同性検索を行った。

4. 研究成果

(1) 好酸球への分化誘導

研究の方法に記したように、ヒト骨髄由来 CD34⁺ 幹細胞を好酸球に分化させて May-Giemsa 染色および Luxol-fast-blue 染色を行った (図 1)。その結果、細胞は好酸球に分化誘導されていることがわかった。

May-Grünward-Giemsa



Luxol-Fast-Blue

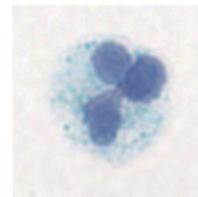


図 1 分化誘導後の染色

CD34⁺ 幹細胞をサイトカインカクテルを含む培地中で 21 日間培養し、May-Giemsa 染色 (上段)、Luxol-fast-blue 染色 (下段) を行った。

(2) 新規 IL-5R α 鎖 splicing variants 7, 8

IL-5R α 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 variant の数は 3 つである。Variants 1 および 4 は膜貫通型であり受容体として機能するが、variants 2、3、5 および 6 は可溶性 IL-5R α 鎖であり IL-5 のアンタゴニストとして作用することが報告されている。

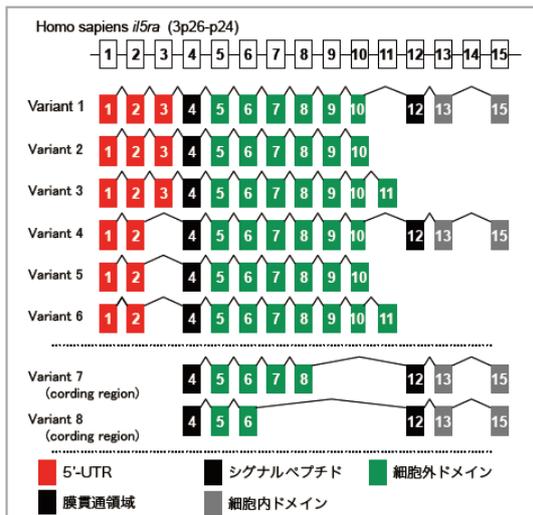


図 2 ヒト IL-5R α 鎖遺伝子の構成

これまで報告されているヒト IL-5R α 鎖遺伝子 (variants 1 ~ 4) および新たに同定したヒト IL-5R α 鎖遺伝子 (variants 7 および 8)。

新たなレセプターを探索した結果、ヒト IL-5 レセプター (IL-5R) α 鎖の 2 つの新規 splicing variants を見だし、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。期待長はそれぞれ 978 bp および 636 bp であった (図 2, 3)。同定した 2 つの新規 IL-5R α 鎖 variants 7 および 8 はそれぞれエクソン 9-11、7-11 を欠損するが、開始コドン、膜貫通領域、細胞内ドメインを含む (図 2) ので、細胞膜上に発現していると考えられる。



図 3 IL-5R α variants 7 および 8 の泳動結果

(3) IL-5R α variants 7 および 8 の発現解析

ヒト骨髄由来 CD34⁺ 幹細胞が好酸球に分化する過程で既知 IL-5R α (Variant 4) および IL-5R α variants 7 および 8 がどのようなパターンで発現するかを解析した。その結果、IL-5R α variants 7 および 8 は、既知 IL-5R α

(Variant 4) の発現に先駆けてその発現レベルが増加し、好酸球への分化が完了するに従って減少した。また、HL-60 clone 15 細胞を n-butyrate を用いて分化誘導した場合でも IL-5R α variants 7 および 8 の発現が認められた。

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 8 件)

① Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, Ueda K, Narushima T, Ohtsu H, Hiratsuka M, Hirasawa N. Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Dermatol Sci.* 2011; 62:50-57. (査読有)

② Hong J, Aoyama S, Hirasawa N, Zee O, Ishihara K, Hashida C, Kimura M, Seyama T, Ohuchi K. Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide. *Planta Med.* 2011; 77:252-256. (査読有)

③ Ishihara K, Okuyama S, Kumano S, Iida K, Hamana H, Murakoshi M, Kobayashi T, Usami S, Ikeda K, Haga Y, Tsumoto K, Nakamura H, Hirasawa N, Wada H. Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations. *Hear Res.* 2010; 270:110-118. (査読有)

④ Hirasawa N, Goi Y, Tanaka R, Ishihara K, Ohtsu H, Ohuchi K. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 93:1306-1311. (査読有)

⑤ Hirasawa N, Yashima K, Ishihara K. Enhancement of ligand-dependent down-regulation of glucocorticoid receptor by lipopolysaccharide. *Life Sci.* 2009; 85:578-585. (査読有)

⑥ Hirasawa N, Ohsawa Y, Ishihara K, Seyama T, Hong J, Ohuchi K. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: establishment of a modified allergic dermatitis model in mouse ear lobes by application of 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate: putative involvement of thymic

stromal lymphopoietin and roles of histamine. *J Pharmacol Sci.* 2009; 110:245-250. (査読有)

⑦Hong J, Sasaki H, Hirasawa N, Ishihara K, Kwak JH, Zee O, Schmitz FJ, Seyama T, Ohuchi K. Suppression of the antigen-stimulated RBL-2H3 mast cell activation by Artekeiskeanol A. *Planta Med.* 2009; 75:1494-1498. (査読有)

⑧Ishihara K, Goi Y, Hong JJ, Seyama T, Ohtsu H, Wada H, Ohuchi K, Hirasawa N. Effects of nickel on eosinophil survival. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009; 149 Suppl 1:57-60. (査読有)

[その他]

ホームページ等

<http://yk2000.edu.ibaraki.ac.jp/ISHIHARA-web/index.html>

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