

平成 21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2004～2007

課題番号：16109004

研究課題名（和文） Bリンパ球のホメオスターシスと活性化の制御機構の研究

研究課題名（英文） Investigation of regulatory mechanisms for homeostasis and activation of lymphocyte

研究代表者

高津 聖志（TAKATSU KIYOSHI）

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：10107055

研究成果の概要：Bリンパ球のホメオスターシスと活性化の動態を制御する IL-5 と Lnk アダプターファミリー分子に焦点をあて、B-1細胞の恒常性維持や B-2細胞の IgH クラススイッチ組み換え、造血幹細胞増殖の制御にどのように関わるか明らかにして、Tリンパ球の分化との関係を分子レベルで明らかにする。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	29,700,000	8,910,000	38,610,000
2005年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2006年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2007年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
年度			
総計	76,500,000	22,950,000	99,450,000

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：免疫学、自然免疫、インターロイキン、アダプター分子、クラススイッチ変換

1. 研究開始当初の背景

Bリンパ球の発生と成熟、IgH 遺伝子のクラススイッチ組み替え(CSR)機構が活発に研究され、B細胞系列への分化の決定に Pax5 が重要であり CSR と抗体の可変部領域への変異導入に AID が必須であることが分っていた。しかし、Bリンパ球のホメオスターシスや活性化の制御に関し不明の点が多く、研究領域として注目され始めていた。Th1細胞の選択的な分化に関与する T-bet の役割が解析され始めていた。

2. 研究の目的

本研究は、Bリンパ球のホメオスターシスと活性化の制御機構を多面的に明らかにすることを目的とした。とりわけ、自然免疫に関与する B-1細胞の前駆細胞と成熟 B-1細胞の増殖分化、獲得免疫に重要な B-2細胞の IgH クラススイッチ組み換えと分化制御における IL-5 と Lnk の役割、造血幹細胞の負の制御機構、免疫応答の質の決定に関与する Tリンパ球の分化制御経路を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

マウス B リンパ球のホメオスターシス制御に関し、IL-5 による Lnk アダプター分子の役割を明らかにするために、試験管内培養を中心とした研究、Ag85B とそのペプチド (P25) を認識する TCR の過剰発現マウスや Lnk ファミリー分子に対する遺伝子改変マウスを作成し利用した。研究を迅速かつ効率よく推進するため、炭酸ガス細胞培養装置、遺伝子を増幅するサーマルサイクラー、超純水製造装置を購入した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① IL-5 による B リンパ球ホメオスターシス制御：1) マウス胎児肝の細胞系列陰性細胞を濃縮し、培養系により胎児リンパ球前駆細胞の B 細胞への分化に必須のサイトカインを同定した。Btk の下流でマウス前 B 細胞から前駆 B 細胞への分化を促進する遺伝子を単離しその役割を明らかにした。2) マウス骨髄中の B-1 前駆細胞 (CD19⁺ B220⁻ 細胞) が IL-5 受容体 α 鎖を発現し IL-5 に応答し増殖すること、IL-5 は成熟 B-1 細胞の生存やホメオスターシス、粘膜リンパ固有層での IgA 産生に必須であることを初めて示した。3) IL-5 は CD38 刺激 B-2 細胞に作用し AID の発現亢進と IgG1 への CSR を惹起し、Blimp-1 の発現亢進と IgG1 産生を促進することを見出した。4) 8メルカプトグアノシン (8-SGuo) は BCR や CD38 で活性化された B-2 細胞に作用し AID の発現と DNA の二重鎖切断を惹起すること、IL-4 共刺激により m 鎖から g1 鎖への CSR と IgG1 産生が惹起された。8-SGuo に CSR 誘導は TLR7 および MyD88 に依存することを示した。

② Lnk ファミリー分子による B リンパ球ホメオスターシスと活性化制御：1) Lnk 遺伝子欠損マウスを解析し、Lnk が B 細胞の初期分化を抑制すること、Lnk 欠損によって造血幹細胞が著増するのみならず、個々の幹細胞の造血能が亢進することを明らかにした。2) Lnk の SH2 領域の点変異、PH ドメイン欠損、C 末端領域欠損を組み合わせた変異体は野生型 Lnk の作用を阻害するドミナントネガティブ変異体 (DN-Lnk) として機能することを示した。3) Lnk は c-Kit シグナルを制御するのみならず、トロンボポイエチン受容体

c-Mpl のシグナル系、アクチン細胞骨格を制御することを示した。4) Lnk 欠損巨核球系細胞では c-Mpl 依存性反応の亢進と重合アクチン量の低下がみられ、Lnk 欠損血小板はフィブリノーゲン上で野生型血小板のようなラミリポディア優位な形態を示さず、フィロポディア優位な形態を示すことが分かった。

③ T リンパ球のホメオスターシス制御：

1) 結核菌が分泌する Ag85B やそのポリペプチド (P25) は I-A^b 拘束性に TCRVb11⁺ Th1 細胞の応答を選択的に惹起した。2) P25 特異的な TCR を過剰発現させたマウス (P25 TCR-Tg) の未熟 CD4⁺ T 細胞を副刺激やサイトカインを提供しない I-A^b 強制発現細胞 (I-A^b-CHO) と P25 で共刺激しても、Th1 細胞が選択的に誘導されることを見出した。P25 刺激で Th1 特異的転写因子 T-bet の発現が二相性に亢進し、Th2 特異的 GATA-3 の発現低下を認めた。3) Th1 細胞への分化誘導に必須である T-bet を欠損した P25 TCR-Tg マウスを作成しその CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞と P25 で刺激したところ有意な Th1 細胞が誘導されること、そのレベルは野生型細胞のそれよりも低いことを見出した。Th1 の誘導に T-bet に依存する経路と依存しない経路が存在することが初めて示された。

(2) 国内外における位置付けとインパクト

B 細胞のホメオスターシスに関して IL-5 による制御、アダプター分子による制御の両面から解析し、IL-5 が B 細胞のホメオスターシスの維持および IgH クラススイッチ組み換えにユニークかつきわめて重要であること、Lnk が B 細胞分化や造血幹細胞増殖に抑制的に作用することを初めて見出した。また、結核菌由来の TCR ペプチド (P25) と MHC class II の相互作用により Th1 や Th2 細胞への分化が決定されることを明らかにした。ここで得られた成果は、独創性と質の高い論文として国内のみならず世界をリードするものと考え、免疫学、血液学、炎症学を一つに融合させるような大きなインパクトを持つものと高く発表されている。

(3) 今後の展望

① IL-5 による B リンパ球ホメオスターシス制御：本研究の成果により、IL-5 が獲得免

疫のみならず、自然免疫、自然抗体の産生に重要なサイトカインであることを世界で初めて明らかにした。さらにクラススイッチ変換における IL-5 と新規 TLR7 リガンド 8-SGuo の役割を明らかにした。これらの学術的価値は高く、IL-5 を標的とした創薬研究、アレルギー研究に大きな影響を与え、波及効果は大きいと考えられる。

② Lnk ファミリー分子による B リンパ球ホメオスターシスと活性化制御：本研究の成果により、Lnk ファミリー分子が造血を負に制御することを明らかにした。また、それと同時に血小板産生を試験管内で高める方法を確立したことは、免疫学のみならず血液学の基盤研究と臨床研究に新しい方向性を示すものと考えられる。

③ T リンパ球のホメオスターシス制御：P25 TCR トランスジェニックマウスの T 細胞は、ヒト型結核感染細胞を識別し、IFN- γ を産生するので、結核ワクチンの開発に利用できると考えられ、現在、世界の 10 カ所の代表的な結核研究グループとの共同研究が進行中であり、今後の研究の進展が大いに期待される。

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 56 件)

① Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Role of IL-5 in the Immune response to inflammation. *Adv. Immunol.*, 101: 191-236, 2009.

② Tsukamoto Y, Nagai Y, Kariyone A, Shibata T, Kaisho T, Akira S, Miyake K, Takatsu K. Toll-like receptor 7 cooperates with IL-4 in activated B cells through antigen receptor or CD38 and induces class switch recombination and IgG1 production, *Mol. Immunol.*, 46: 1278-1288, 2009

③ Wolf, AJ, Desvignes L, Linan B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD. Initiation of the adaptive immune response to *M. tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs, *J. Exp. Med.*, 205: 105-115, 2008.

④ Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr. Opin. Immunol.*, 20: 288-295, 2008.

⑤ Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Taanaka

R, T, Kouro T, Kano MR, Miyazono K, Miyazaki J, Takatsu K, Yamamoto K. IL-5-induced eosinophils can suppress the antigen-induced immune response via a TGF- β -dependent mechanism. *J. Immunol.* 179: 284-294, 2007.

⑥ Ariga H, Shimohakamada Y, Tokunaga T, Kikuchi T, Nakata M, Kariyone A, Tamura T, Takatsu K. Instruction of CD4⁺ T cell fate to T-bet expression and Th1 development by Th1-inducing peptide: roles of T cell receptor-mediated signals. *Immunology*, 122: 210-221, 2007.

⑦ Horikawa K, Takatsu K. Interleukin-5 regulates genes involved in B cell terminal maturation, *Immunology*, 118: 497-508, 2006.

⑧ Takizawa H, Kubo-Akashi C, Nobuhisa I, Kwon S.-M., Iseki M, Taga T, Takatsu K, Takaki S. Enhanced engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells by the transient inhibition of an adaptor protein, Lnk, *Blood*, 107: 2968-2975, 2006.

⑨ Tamura T, Ariga H, Kinashi T, Uehara S, Kikuchi T, Nakada M, Tokunaga T, Kariyone A, Saito T, Kitamura T, Maxwell G, Takaki S, Takatsu K. The role of antigenic peptide in CD4⁺ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int. Immunol.*, 15: 1691-1699, 2004.

⑩ Moon B.-G., Takaki S, Miyake K, Takatsu K. *J. Immunol.*, The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J. Immunol.*, 172: 6020-6029, 2004.

他 46 編

[学会発表] (計 157 件)

(1) 国際学会

① Takaki S, Iwasaki Y, Kubo C, Takizawa H, Takatsu K. Control of cell adhesion and migration in B lymphocytes and hematopoietic progenitors by Lnk, a negative regulator of cytokine signaling. 13th International Congress of Immunology, August 2007, Rio de Janeiro, Brazil

② Takizawa H, Eto K, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Lnk, An Adaptor Protein, Modulates Signals mediated through integrins and cytokine receptors in hematopoietic progenitors. 13th International Congress of Immunology, August 2007, Rio de Janeiro, Brazil

③ Ikutani M, Kouro T, Takaki S, Takatsu K. Genes involved in Btk-dependent pro-B to pre-B transition, Keystone Symposia. Banff, January 2007, Canada

④ Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment, A Joint Meeting of the Society of Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society, November 2006, San Antonio, TX

⑤ Mori Y, Iwasaki H, Yoshimoto G, Okeda A, Miyamoto T, Mizuno S, Harada M, Takatsu K, Akashi A. Prospective isolation of human eosinophil lineage-commitment progenitors revealed that the eosinophil differentiation pathway is different in human and mouse hematopoiesis. Am. Soc. Hematol., November, 2006, San Antonio, TX

⑥ Takatsu K. Ag85B and its peptide of Mycobacterium tuberculosis as a potent immunomodulator: Robust induction of Th1 response and cross-priming, The 13th East Asian Joint Symposium - From Genes to Therapeutics, July 2006, Seoul

⑦ Takatsu K. Immunobiology of Ag85B and Peptide-25 of Mycobacterium tuberculosis. 8th Awaji Forum on Infection and Immunity, September 2006, Awaji Island,

⑧ Takatsu K, Tsukamoto Y, Kaisho M. Role of Toll-like receptor in the induction of activation-induced cytidine deaminase (AID) and class switch recombination, Immunology 2006, AAI Annual Meeting, May 2006, Boston,

MA,

他 43 回

(2) 国内学会

- ① 刈米アイ、田村敏生、高津聖志: P25 CD4⁺ T 細胞活性化とクロスプライミング増強の解析 第 37 回日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月、東京
- ② Iwasaki Y, Takizawa H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S. Control of Dendritic Cell Production by Lnk/SH2B3 Adaptor Protein, a Negative Regulator of Lymphohematopoiesis. 第 37 回日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月、東京
- ③ Katayama H, Ikutani M, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. Dynamic expression patterns of Lnk, a negative regulatory adaptor in lymphohematopoiesis revealed by generating a GFP knock-in reporter mice. 第 37 回日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月、東京
- ④ 高津聖志: 免疫バイオ研究と創薬探索、医療薬学フォーラム 2007, 2007 年 7 月、山形
- ⑤ 高津聖志: 免疫と炎症を制御するシグナル、IL-5 の関与とその謎、第 16 回東京免疫フォーラム (特別講演)、2007 年 3 月、東京
- ⑥ Kouro T, Ikutani M, Takatsu K. Expression of IL-5 receptor a chain on B-1 cell progression、第 36 回日本免疫学会学術集会、12, 2006, 大阪
- ⑦ 刈米アイ、田村敏生、高津聖志: Ag85B 由来 Peptide-25 によるクロスプライミング増強効果の解析、第 36 回日本免疫学会学術集会、2006 年 12 月、大阪
- ⑧ Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment、第 36 回日本免疫学会学術集会、2006 年 12 月、大阪
- ⑨ 高津聖志: Ag85B とそのペプチドによる免疫制御: Th1 誘導とクロスプライミング増強、第 34 回 BCG・BRM 療法研究会、2006 年 7 月、東京
- ⑩ 下袴田陽子、徳永岳史、仲田真己代、有賀晴之、刈米アイ、田村敏生、高津聖志:

TCR シグナルを介する Th1 分化における転写因子 T-betの役割：T-bet ノックアウトマウスを用いた解析。第 35 回日本免疫学会学術集会、2005 年 12 月、横浜

他 96 回

〔図書〕(計 28 件)

- ① 小池正道、高津聖志：羊土社、基礎科学を支える研究ツールとしての抗体に関する基礎知識、「タンパク質実験のための抗体実験マニュアル」(実験医学別冊)(高津聖志、三宅健介、山元 弘、瀧 信介編)、2004、6ページ(pp12-17)
- ② 高津聖志：日本医学館、インターロイキン5、サイトカイン・ケモカインのすべて(笠倉新平、松島綱治編)、2004、14ページ(pp128-141)
- ③ 高津聖志：朝倉書店、7 サイトカイン、予防医学事典(松島剛治、酒井敏行、石川 昌、稲寺秀邦編)、2005、8ページ(pp16-23)
- ④ 高津聖志：医薬の門社、IL-5 ものがたり(連載第3回)、感染・炎症・免疫、36：2006、16ページ(pp42-57)
- ⑤ 高津聖志：ミノファージェン製薬、Ag85BによるTh1誘導と免疫腑活活性、MINOPGAGEN MEDICAL REVIEW 52：2007、16ページ(pp65-80)
- ⑥ 長井 良憲、塚本 裕美子、高津 聖志：科学評論社、TLRシグナルとクラススイッチ組換え 臨床免疫・アレルギー科 49：2008、6ページ(pp246-251)

他 22 編

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高津 聖志 (TAKATSU KIYOSHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：10107055

(2) 研究分担者

高木 智 (TAKAKI SATOSHI)
国立国際医療センター・研究所・部長
研究者番号：10242116

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)
富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号：30431761

紅露 拓 (KOURO TAKU)
(独) 医薬基盤研究所・免疫応答制御プロジェクト・プロジェクトリーダー
研究者番号：90372424

田村 敏生 (TAMURA TOSHIKI)
国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・室長
研究者番号：40291306

刈米 アイ (KARIYONE AI)
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：50114450