

平成21年 5月 1日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19591162
 研究課題名 (和文) 好塩基球の増殖およびサイトカイン産生機構の解明とその制御
 研究課題名 (英文) Regulation of cell growth and cytokine production in basophils
 研究代表者
 肥田 重明 (HIDA SHIGEAKI)
 信州大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：10345762

研究成果の概要： 近年、アレルギー反応やアレルゲンに反応する初期免疫応答における好塩基球の役割がマウスモデルで明らかになりつつあるが、好塩基球の活性化における分子機構に関して不明な点が多い。本研究課題では、これまでの好塩基球依存的な免疫制御についての成果から、好塩基球のサイトカイン産生機構や細胞増殖の分子機構について解析し、FcR γ 分子を介した新規のシグナル伝達経路を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： サイトカイン

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学、膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード： サイトカイン, シグナル伝達, 好塩基球, Th2, インターロイキン, FcR γ , IRF

1. 研究開始当初の背景

今日、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー性疾患は、その罹患率が上昇し国民のQOLに影響を与えている重要な疾患の一つとして認められている。これまでの対処療法ではない新規治療法の開発が望まれており、臨床および基礎研究の成果も重要性が高い。これまでに数多くの研究報告でアレルギー性疾患における種々の免疫担当細胞の役割が検証されている。その免疫担当細胞として好塩基球や肥満細胞の活性化メカニズムは、こ

れまで Fc ϵ RI を介したシグナルを中心に、化学伝達物質を放出するエフェクター細胞として、アレルギー性疾患との関連において研究されてきた。肥満細胞は皮膚や粘膜といった組織における感染防御機構において重要な細胞として広く認識されるその一方で好塩基球については、その解析が遅れている。好塩基球は骨髄で分化・成熟し、末梢血中を循環している白血球の一つである。最近では肥満細胞・好塩基球の共通の前駆細胞の存在が示され、転写因子の発現によって肥満細胞と好塩基球の最終的な分化決定がなされる

ということが明らかになり、これまで血液学の問題であった好塩基球の分化についても少しずつ明らかになってきた。好塩基球や肥満細胞の増殖因子として知られているインターロイキン(IL)-3は、その遺伝子を欠損するマウス(*IL-3*^{-/-})を用いた感染実験から、寄生虫感染時の好塩基球増殖因子として作用し、排虫に重要なサイトカインであることが証明されている。しかし、*IL-3*^{-/-}マウスでも正常と同程度好塩基球は存在していることから、好塩基球の分化に必須の液性因子ではなく、感染免疫応答時に好塩基球を増加させる因子として作用していると考えられる。近年、好塩基球の寄生虫感染時の生理的な役割が検証され、さらにIgE依存的な慢性炎症においても好塩基球が主要な役割を果たしていることが報告されたことから、生体内において極少数しか存在しない好塩基球の免疫応答のエフェクターとしての重要な役割が注目されつつある。今後、好塩基球の活性化制御機構を明らかにすることは、好塩基球を介した感染症に対する免疫監視機構やアレルギー性疾患に対する新しい知見や新規治療方針の指針をもたらすものと考えられる。

2. 研究の目的

申請者は、これまで長年にわたって IFN regulatory factor (IRF) ファミリー転写因子の免疫調節機構を解析しており、そのメンバーである転写因子 IRF-1 および IRF-2 に依存的なサイトカイン産生およびその応答、Th1/Th2 免疫応答制御機構、細胞分化における機能を明らかにしてきた。その過程で IRF-2 欠損マウスにおいて、好塩基球の異常増多に起因する Th1/Th2/Th17 バランスへの影響に関する研究から、好塩基球が非感染状態において Th1/Th2/Th17 バランスを監視するという重要な役割を担っていることが示唆された。これまでの好塩基球の解析で高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に関係する報告以外は、好塩基球の活性化や抑制に関する様々な刺激に対する細胞増殖やシグナル伝達、そして遺伝子発現機構が十分に解明されたとはいえない。その理由の一つには好塩基球が生体内で極めて少数しか存在せず解析が困難であること、生理的な機能を完全に再現できる培養細胞系がないことが考えられる。そこで申請者は、まず好塩基球の活性化制御機構を解明するために遺伝子変異マウスを用いた *in vivo*, *in vitro* の実験系を確立し、生理的な好塩基球の活性や遺伝子発現について検討する。これまでに確立した実験系を用いた結果、幾つかの遺伝子変異マウスにおいて好塩基球の機能に異常が観察された。抗体受容体のシグナル伝達に重要な受容体を

構成しているサブユニットの一つに FcRγ 分子があり、その遺伝子欠損マウスの好塩基球ではサイトカインの一つである IL-3 の刺激に対して、Th2 免疫応答に重要な IL-4, IL-6 等のサイトカインを産生できないという興味深い現象を観察した。この結果は好塩基球の細胞分化もしくは細胞の活性化に FcRγ 分子が重要であることを意味している。以上のように、これまでの申請者の研究に基づき、本研究においては、IRF-2 依存的な好塩基球の増殖制御、及び FcRγ 分子依存的なサイトカイン産生経路の分子機構の解析をまず主要目的とし、さらに免疫監視機構として、定常状態や免疫応答時の Th1/Th2/Th17 バランス、さらに細菌・寄生虫感染、アレルギー性疾患における好塩基球の役割を明らかにしていく。そして、Th2 細胞、B 細胞、抗原提示細胞などの免疫細胞と好塩基球の細胞間相互作用の制御を通じて 2 型免疫応答を制御する技術を開発し、感染やアレルギー性疾患のみならず、自己免疫疾患等の免疫疾患に対する治療効果を改善するために、新たな指針の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 好塩基球の研究の問題点の一つとして、その細胞数が極めて少ないことが挙げられる。この問題を解決するために、種々の遺伝子改変マウスの骨髄細胞を用いて *in vitro* で好塩基球を培養し、さらに様々な好塩基球の活性を制御する分子およびその変異体のレトロウイルスベクターを用いた高発現系、shRNA を利用した発現抑制の実験系を樹立した。

(2) 申請者のこれまでの予備的知見から FcRγ 欠損好塩基球の IL-3 刺激による IL-4 の産生異常の原因が好塩基球の分化不全なのか活性化不全かを検討した。

① FcRγ 欠損マウスにおいても野生型マウスと同様に好塩基球は存在することをフローサイトメトリ及び細胞染色によって明らかにした。また免疫応答時の好塩基球の増殖について検討するため、寄生虫感染時の好塩基球の分化・増殖について検討した。

② 理研免疫アレルギー科学総合研究所・久保博士より供与された IL-4 転写領域-GFP トランスジェニック (tg) マウスでは、無刺激において好塩基球で GFP が発現している。これは好塩基球特異的な分化に伴う IL-4 転写調節領域にクロマチンのリモデリングが存在することを示していると考えられる。そこで FcRγ 欠損マウスとの交配によって IL-4-GFPtg x FcRγ 欠損マウスを作成し、FcRγ 分子の IL-4 転写調節領域のクロマチンリモデリングへの影響についても検討を行う

た。また、RAG 欠損マウスや STAT6 欠損マウス由来の好塩基球についても検討し、ヒムノグロブリンに依存した現象か否かについても検証した。

(2) FcR γ 欠損マウスにおけるサイトカイン産生不全に関して、IL-3 シグナルと FcR γ 分子のクロストークの分子機序を明らかにするために下記の実験を行った。

① 野生型および FcR γ 欠損マウスより骨髓細胞を IL-3 存在下で培養し、その分化増殖能について検討した。さらに、IL-3 シグナルに重要な分子である STAT5 の活性化(リン酸化)について検討し、さらに他のシグナル伝達分子である MAP Kinase, Syk などのシグナル分子や転写因子についても検討した。また *in vivo* においては、細胞数が少ないことから、フローサイトメトリを用いた STAT 分子のリン酸化測定法を用いて *in vivo* の極少数の好塩基球のシグナル伝達分子の活性化を定量的に解析した。

② FcR γ 欠損マウスの骨髓より好塩基球を培養し、レトロウイルスベクターにより FcR γ を再構築し、IL-3 依存性 IL-4 産生能が回復することを明らかにした。さらにレトロウイルスベクターを用いた再構築系を用いて、(a) ITAM 領域の変異をもつ FcR γ 鎖、(b) FcR γ 鎖の細胞膜領域の変異体、(c) DAP12 分子との融合タンパク質を FcR γ 欠損培養好塩基球に発現させ、IL-4 産生に重要な領域を明らかにした。

③ 一方、Rag 欠損マウスなどの抗体を欠損したマウスにおいても好塩基球は存在し、IL-3 刺激によって IL-4 を産生することから、Fc ϵ RI α などの抗体受容体以外の FcR γ 会合分子が、好塩基球の活性化に重要な新規活性化分子が存在すると考えられる。このような分子について検討するために既に FcR γ と会合するという報告がある分子に関して、好塩基球においても発現しているか否かを RT-PCR を用いて確認し、発現が確認された分子に関しては、骨髓由来培養好塩基球や primary 細胞において、Western Blot やフローサイトメトリを用いてタンパクレベルでその発現および FcR γ との結合を確認した。

④ さらにレトロウイルスを用いて骨髓由来好塩基球に FcR γ と結合する種々の遺伝子を高発現もしくは RNAi を用いて発現抑制させ、IL-3 依存的な IL-4 産生への影響について検討した。

(3) 好塩基球の機能異常とそれに伴う現象として Th1/Th2/Th17 バランスへの影響を *in vivo*, *in vitro* で明らかにするために、卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR tg(OT-II)と FcR γ 欠損マウスを交配し、OT-II tg x FcR γ 欠損マウスを作成した。まず、近年一般的に用

いられている *in vitro* の Th1/Th2/Th17 分化誘導系において、対照マウス由来 T 細胞に対し OT-II tg x FcR γ 欠損の T 細胞は Th2 分化が抑制されるか検討した。また、OVA による免疫、寄生虫感染・アレルギー性疾患モデルで検証を行った。また細胞内寄生菌に感受性を示す BALB/c 系統のマウスにおいて BALB/c の遺伝子背景を持つ FcR γ 欠損マウスを作成し、Th1 分化の誘導と細胞内寄生菌に対する抵抗性を獲得できるようになるかについても検討を加え、マウスの系統による好塩基球の機能の違いについても考察していく。

4. 研究成果

生体にとって障害をなす病原体の感染に応じて効率よく免疫応答を行うため、定常状態におけるヘルパーT細胞のTh1/Th2/Th17バランスや記憶B細胞の維持は厳密に制御されなければならない。最近になり好塩基球によるサイトカイン産生に依存した生体内でのTh1/Th2/Th17バランスや記憶B細胞の維持が報告され(Denzel A. et al., Nature Immunol. 9, 733-742, 2008)、好塩基球の生理的な役割が非常に注目されつつある。しかし、好塩基球は生体内における細胞数が少ないことから、その解析は遅れてきた。本研究課題の成果としてマウス好塩基球の解析に必要な *in vivo*, *in vitro* 実験系の確立、そして好塩基球の活性化に重要な分子機構の解析結果を報告する。

(1) 好塩基球の活性化制御機構の解析に必要な培養系、および遺伝子発現系の確立

マウスの生体内に存在する好塩基球について、フローサイトメトリを用いて同定できる細胞表面分子について解析した。末梢に存在する好塩基球は高親和性IgE受容体であるFc ϵ RI、IL-3R(CD123および β c)、DX5(CD49b)、CD90、F4/80、CD11b、ICAM-1、CD44、CD43を発現し、そしてCD11c、Sca-1(Ly6A/E)、Ly6G/C、c-kit、NK1.1、NKG2Dの発現を欠く細胞として同定できた。さらに詳細に遺伝子発現、シグナル伝達を解析するために骨髓細胞をIL-3存在下で培養し骨髓由来好塩基球を誘導した。その培養期間中にレトロウイルスベクター(pMX)を用いて、既知の遺伝子やその変異体を発現させる系、またその逆にレトロウイルスベクター(pSINsi)を用いてshRNAによる遺伝子発現抑制の実験系をそれぞれ確立した。

(2) FcR γ 鎖欠損 (FcR γ ^{-/-}) 好塩基球のサイトカイン産生不全

高親和性IgE受容体(Fc ϵ RI)のシグナル伝達分子である γ 鎖(FcR γ)が、これまでに知られているFc ϵ RIの細胞表面への発現やFc

ϵ RI を介したシグナル伝達のみならず、IL-4、IL-6 産生にいたる IL-3 シグナルの伝達に必須であることを見出した。組織中の好塩基球数は野生型マウスに比較して変化がなく、寄生虫感染時における骨髓・脾臓の好塩基球の増加についても検討したが、野生型と FcR γ ^{-/-}マウスで差は認められなかった。この結果から FcR γ 鎖は好塩基球の分化や増殖には関与しておらず、サイトカイン産生に必須の分子であると考えられた。また、骨髓細胞を IL-3 の存在下で培養すると好塩基球が増殖するが、FcR γ 欠損マウス骨髓細胞を用いた場合でも、野生型マウスと好塩基球の増殖に差は認められなかった。これは、FcR γ および Fc ϵ RI の発現は好塩基球の増殖には無関係であることを示している。また、IL-3 の増殖誘導機能に関係していると考えられている STAT5 は、FcR γ 欠損好塩基球でも活性化されたことから FcR γ は増殖に関与しないといえる。一方、FcR γ 欠損好塩基球では IL-3 による Syk のリン酸化は起こらず、FcR γ -Syk 経路が重要であることが示唆された。また、IL-4-GFP-tg x FcR γ 欠損マウスを作製し、細胞分化に伴う IL-4 転写調節領域のクロマチンリモデリングについても調べたところ、好塩基球の GFP の発現に差は認められず、細胞分化に伴う異常は特に認められなかった。

(3) 好塩基球の IL-4、IL-6 産生における FcR γ 鎖の機能

申請者らは骨髓細胞由来の好塩基球培養系を応用し、FcR γ 鎖の IL-3 シグナル伝達経路における役割を検討した。FcR γ 欠損マウス骨髓細胞を IL-3 で培養して好塩基球を増殖させる際に、レトロウイルスベクターを用いて FcR γ 鎖を導入した。この細胞を starvation 後、再び IL-3 で刺激し IL-4 の産生を検討したところ、野生型 FcR γ を導入すると IL-4 産生が回復するが、FcR γ 鎖細胞質部分の Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) 配列中のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体を導入した場合には IL-4 産生は回復しなかった。この FcR γ 変異体を導入した好塩基球でも Fc ϵ RI の細胞表面への発現は回復しており、Fc ϵ RI の発現に関しては FcR γ のシグナル伝達機能は必要とされないことが確認された。さらにシグナル伝達分子である Syk のドミナントネガティブ体の発現、shRNA を用いた Syk の抑制においても同様に IL-4 産生を抑制することができたことから、FcR γ の ITAM-Syk が IL-4 産生に必須であることが明らかになった。FcR γ と同様にアダプター分子である DAP12 も ITAM を持っており、好塩基球に発現している。DAP12 欠損好塩基球は、IL-3 刺激によって IL-4 は正常に産生

することから、DAP12 は IL-3 シグナルに必須ではない。

(4) IL-3 受容体のサブユニットとしての FcR γ 鎖の役割

FcR γ はこれまで抗体受容体を含め様々な受容体と結合していることが報告されている。Rag 欠損、STAT6 欠損マウス由来の好塩基球においても好塩基球は存在し、IL-3 依存性の IL-4 産生は正常であったことから、IgG、IgE などの抗体は関与していない。興味深いことに免疫沈降法で IL-3 受容体 (βc) と FcR γ が結合していることが明らかになり、IL-3 受容体のサブユニットとして FcR γ 鎖が機能していることが証明された。FcR γ は細胞膜領域を介して、抗体受容体をはじめ様々な受容体と結合していることが知られている、これらの結合に重要な 11 番目のアルギニン (11D-A)、もしくは 21 番目のロイシンをアラニン (21L-A) に置換した変異体を作成した。11 番目のアルギニンは Fc ϵ RI α - の発現や βc -FcR γ の結合と IL-4 産生に重要であるが、21 番目のロイシンの変異体は Fc ϵ RI α - の発現には必須であるが、 βc との結合には関与せず、IL-4 産生も正常であった。さらに細胞質領域を DAP12 に置換した変異体でも IL-4 産生は認められた。この結果から βc -FcR γ 結合には FcR γ の細胞質領域が重要であり、その結合様式はこれまで報告された様式とは異なることを示している。

(5) Th2 細胞誘導細胞としての好塩基球

好塩基球由来の IL-4 は Th2 分化に重要であることを申請者らを始め幾つかのグループで既に報告されている (Hida S. et al., Blood 106 (6), 2011-2017, 2005)。しかしながら、FcR γ 鎖欠損マウス脾細胞では in vitro で CD4⁺T 細胞を Th2 へと分化させることが出来なかった。さらに旋毛虫 *Trichinella spiralis* の感染において、FcR γ 欠損マウスは感染 10 日目の腸管リンパ節における Th2 細胞や血清中 IL-5 が野生型マウスに比較して低下しており、in vitro の観察と合わせて実際に FcR γ が Th2 分化誘導に重要であることを示している。つまり、本研究における我々の発見から、FcR γ 欠損好塩基球の IL-4 産生の異常がその原因のひとつである可能性が示唆された。

(6) まとめ

好塩基球に関しては、これまで IgE 依存的な活性化・サイトカイン産生に関する報告が主であり、免疫応答初期の IL-3 依存的な IL-4、IL-6 産生機序と増殖については不明な点が多かった。このような観点からも、本研究課題は重要な研究であり、この成果は論文として評価された (Hida S. et al., Nature

Immunol. 10, 214-222, 2009)。好塩基球のIL-3 依存的な増殖・活性化の分子機構の解明は、これまで不明であった免疫反応初期における2型免疫反応の中心として作用する好塩基球の役割を明らかにした世界をリードする研究という位置づけを持つだけでなく、好塩基球の活性化と抑制機構を追求する本研究は、これまでに無かった全く新しいアプローチであり、2型免疫疾患の理解とその制御が本研究の成果として期待される。

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 3 件)

① Hida, S., Yamasaki, S., Sakamoto, Y., Takamoto, M., Obata, K., Takai, T., Karasuyama, H., Sugane, K., Saito, T. and Taki, S. (Fc receptor γ -chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils), *Nature Immunol.* 10:214-222, 2009. 査読有
<http://www.nature.com/ni/journal/v10/n2/abs/ni.1686.html>

② Nakajima, S., Hida, S. and Taki, S. (IL-15 inhibits pre-B cell proliferation by selectively expanding Mac-1⁺B220⁺ NK cells), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:1139-1143, 2008. 査読有
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WBK-4S1JHR9-7&_user=4307883&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050561&_version=1&_urlVersion=0&_userid=4307883&md5=96abb319aded6003c3c9719e7c5a971e

③ 肥田重明、瀧伸介, (好塩基球を介する Th2 細胞の誘導), 分子細胞治療 7:149-155, 2008. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

① Hu Tao, Takamoto M., Hida S., Sugane K., (The role of IFN- γ and IL-17 on *Pneumocystis pneumonia* in nude mice), 第38回日本免疫学会総会, 2008. 12. 1, 京都

② Hida S., Yamasaki S., Saito T., Taki S., (Fc receptor γ -chain is a subunit of IL-3 receptor complexes, required for IL-4 expression by but not proliferation of murine basophils), 第37回日本免疫学会総会, 2007. 11. 21, 東京

③ Kikuchi H., Sakamoto Y., Takai T., Hida S., Taki S., (Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B regulates IL-3 responses in basophils), 第37回日本免疫学会総会, 2007. 11. 21, 東京

[その他]

ホームページアドレス

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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし