

機関番号：13201

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390141

研究課題名 (和文) リンパ球の活性化・分化に及ぼすサイトカインと TLR シグナルの役割

研究課題名 (英文) Roles of cytokines and TLRs in lymphocyte activation and differentiation

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 (医学)

研究者番号：10107055

研究成果の概要 (和文) : IL-5/GFP ノックインマウスの作成に成功し、IL-5 産生細胞が末梢肺と腸管に多くの存在し、それらは CD3 陰性/c-kit 陽性細胞であることを明らかにした。また LPS 刺激による B リンパ球の形質細胞への分化や IgM 産生に RP105 シグナルが必須であることを見出した。さらに、Th1 依存性の抗原交叉提示の増強にインターフェロン誘導遺伝子 Iigp1 が重要な役割を果たしていることを見出した。

研究成果の概要 (英文) : To investigate IL-5-producing cells in the peripheral tissues, we succeeded to generate IL-5/GFP knock-in mice. IL-5/GFP⁺ cells were distributed mainly in the lung and intestinal tissues and they were CD3⁻ c-kit⁺ cells but not CD3⁺ T cells. We also analyzed RP105 signals in B cell activation and found that RP105 was required for TLR4-dependent plasma cell differentiation and IgM production. Finally, we demonstrated that an interferon-inducible gene Iigp1 had a crucial role in Th1-dependent antigen cross-presentation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球、IL-5、TLR、抗原交叉提示

1. 研究開始当初の背景

(1) IL-5 による B リンパ球活性化制御に関して：研究代表者らは、IL-5 が ①B-1 リンパ球の増殖や生存、②自然抗体の産生や腸管粘膜の抗体産生、③クラススイッチ組換えや抗体産生細胞への分化に重要な転写因子の発現誘導、などに重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかし IL-5 産生の時空間的制御や、IL-5 産生細胞と応答細胞との相互作用などについては不明な点が多い。

(2) 自然免疫系による B リンパ球の活性化、クラススイッチ組換え制御に関して：研究代表者らは、CD38 と IL-4 による IgM から IgG1 へのクラススイッチ組換えにグアノシン誘導体 8-mercaptopguanosine (8-SGuo) が必須であり、8-SGuo の作用は TLR7 を介することを見出した。また B リンパ球の LPS 応答性には TLR4 だけではなく、TLR 類似分子 RP105 が重要な役割を果たしていることが分かっていた。しかし、8-SGuo や RP105 が B リンパ球を

活性化する機序については不明な点が多い。
(3) 結核菌抗原による T リンパ球分化制御に関して：研究代表者らは、ヒト結核菌主要抗原である Ag85B とそのペプチドである P25 がマウスに強力かつ選択的に Th1 細胞への分化を誘導し、細胞性免疫応答を増強することを見出した。しかし、Ag85B や P25 による Th1 分化に係わる転写因子やシグナル伝達系は不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) IL-5 による B リンパ球活性化制御に関して：①IL-5-GFP ノックインマウスを作製し、IL-5 を産生する細胞とその時空間的制御を明らかにする。②IL-5 産生細胞と応答細胞との相互作用を探索する。③免疫難病と IL-5 産生との関連を探索する。④B-1 リンパ球の前駆細胞への分化、生存維持における IL-5 の重要性を明らかにする。
(2) 自然免疫系による B リンパ球の活性化、クラススイッチ組換え制御に関して：①8-SGuo 刺激により B リンパ球に発現誘導される転写因子等の遺伝子群を探索する。②マクロファージなどの自然免疫系細胞に対する 8-SGuo の作用を探索する。③TLR4 と RP105 の B リンパ球活性化機構を探索する。④自然免疫系による B リンパ球活性化と自己免疫疾患との関連を探索する。
(3) 結核菌抗原による T リンパ球分化制御に関して：P25 TCR T 細胞を P25 刺激し活性化される転写因子やシグナル伝達分子を解析し、Th1 細胞分化やそれにより関与する細胞群のシグナル伝達系を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) IL-5 による B リンパ球活性化制御に関して：①IL-5-GFP ノックインマウスを作製し、GFP の発現を指標に IL-5 産生細胞を同定した。②IL-5-GFP ノックインマウスを用い、IL-5 産生細胞と応答細胞との相互作用、IL-5 による免疫制御を時空間的に解析した。③IL-5-GFP ノックインマウスを用い、アレルギーなどの免疫異常症における IL-5 産生細胞の関与を GFP の発現を指標に時空間的に解析した。④IL-5 受容体欠損マウスを用い、B-1 リンパ球前駆細胞の分化、生存における IL-5 の役割を解析した。
(2) 自然免疫系による B リンパ球の活性化、クラススイッチ組換え制御に関して：①8-SGuo 刺激により B リンパ球に発現誘導される転写因子等の遺伝子群を Gene-chip 法を用いて探索した。②抗 TLR4 または RP105 抗体を用い、TLR4 と RP105 による B リンパ球の活性化シグナルを解析した。③自己免疫モデルマウスを用い、自然免疫系シグナルの活性化を解析した。
(3) 結核菌抗原による T リンパ球分化制御に

関して：①P25 刺激により CD4 陽性 T リンパ球に発現が誘導される転写因子を Gene-chip 法、リアルタイム PCR 法を用いて解析した。②P25 刺激による TCR シグナルにより TCR 下流のシグナル伝達分子のリン酸化が誘導されるかどうか解析した。

4. 研究成果

(1) IL-5 による B リンパ球活性化制御に関して：①IL-5-GFP ノックインマウスの作製に成功した。ノックインマウスを用い、末梢組織における IL-5 産生細胞の局在を解析した。肺と腸管、特に大腸において IL-5/GFP 陽性細胞を認め、それらは CD3 陰性/c-kit 陽性の細胞群であった。さらに IL-33 刺激により IL-5/GFP 陽性細胞が増加することを見出した。②骨髄の B220 陰性/CD19 陽性 B-1 リンパ球前駆細胞表面において、IL-5 受容体の発現は認められず、IL-5 受容体欠損マウスにおける B-1 リンパ球前駆細胞の数も野生型マウスと同等であった。③細胞移入実験により、胎児肝の B220 陰性/CD19 陽性細胞が B-1 リンパ球前駆細胞であることを明らかにした。さらに、Btk 欠損マウス胎児肝において B-1 リンパ球前駆細胞の数が減少していたことから、B-1 リンパ球前駆細胞の生存・維持に Btk が重要であることが示された。
(2) 自然免疫系による B リンパ球の活性化、抗体のクラススイッチ組換え制御に関して：①8-SGuo のみならず、既知の TLR7 リガンドである loxoribine と CD38, IL-4 の共刺激により、B リンパ球における IgM から IgG1 へのクラススイッチ、IgG1 産生が誘導されることを明らかにした。②8-SGuo または loxoribine 単独刺激により、B リンパ球において Blimp-1 の発現誘導が認められた。一方、loxoribine 単独刺激により AID の発現誘導が認められるが、8-SGuo 刺激では認められなかった。③野生マウス B リンパ球において、抗 TLR4 抗体と抗 RP105 抗体との共刺激で、Marginal zone B リンパ球 (MZB) が十分に活性化され形質細胞に分化し、IgM を産生した。RP105 欠損 B リンパ球では、LPS 刺激による形質細胞分化や IgM 産生がほとんど誘導されなかった。以上より、LPS 刺激による MZB の形質細胞分化と IgM 産生に RP105 シグナルが重要であることが分かった。
(3) 結核菌抗原による T リンパ球分化制御に関して：①P25 特異的 CD4 陽性 T リンパ球と P25 で共培養した抗原提示細胞において発現が増強する遺伝子を Gene-chip 法を用いて探索した。対照群と比較して、インターフェロン誘導遺伝子 p47 GTPase 遺伝子ファミリー分子、中でも Iigp1 の発現が亢進し、その siRNA を導入した抗原提示細胞では抗原交叉提示能が低下した。②トウダイグサ科植物由来の天然物成分が P25 による Th1 依存性の抗

原交叉提示を増強した。Th1 依存性交叉提示を増強する天然物を複数見出した。

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 10 件)

- ① Murakami, M., Takatsu, K. (13 人中 11 番目) Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 査読有, Vol. 208, 2011, 103-114
- ② Ramachandra, L., Takatsu, K. (9 人中 6 番目) Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosome containing MHC-II molecules capable of antigen presentation. *Infection and Immunity*, 査読有, Vol. 78, 2011, 5116-5125
- ③ Shafiani, S., Takatsu, K. (5 人中 4 番目) Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, 査読有, Vol. 207, 2010, 1409-1420
- ④ Yahagi, A., Takatsu, K. (14 人中 13 番目) Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4+ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. *International Immunology*, 査読有, Vol. 20, 2010, 307-318
- ⑤ Fujisaka, S., Ikutani, M., Nagai, Y., Takatsu, K. (12 人中 4, 8, 9 番目) Regulatory mechanism for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 査読有, Vol. 58, 2009, 2574-2682
- ⑥ Kouro, T. and Takatsu, K. IL-5 and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International Immunology*, 査読有, Vol. 21, 2009, 1303-1309
- ⑦ Tsukamoto, Y., Nagai, Y., Kaisho, T., Takatsu, K. (6 人中 2, 6 番目) Toll-like receptor 7 cooperates with antigen receptors and CD38 for induction of class switch recombination and terminal B cell maturation. *Mol. Immunol.*, 査読有, Vol. 46, 2009, 1276-1288.
- ⑧ 長井良憲、高津聖志、IL-5 と好酸球で誘導されるアレルギー性炎症、実験医学増刊号「アレルギー疾患の免疫制御」、査読無、

Vol. 27, 2009, 107-113

- ⑨ Emslie, D., Takatsu, K. (7 人中 5 番目) Oct2 enhances antibody-secreting cell differentiation through regulation of IL-5 receptor alpha chain expression on activated B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 査読有, Vol. 205, 2008, 409-421
- ⑩ Takizawa, H., Takatsu, K. (6 人中 5 番目) Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokines- and integrin-mediated signals. *Experimental Hematology*, 査読有, Vol. 36, 2008, 897-906

[学会発表] (計 18 件)

- ① Kouro, T. Participation of Bruton's tyrosine kinase in immune response to nasal influenza vaccination. The 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22 日, 神戸
- ② Katayama, H. The maintenance of gut-associated lymphoid tissues regulated by Lnk/Sh2B3 adaptor, a shared risk factor gene associated with type 1 diabetes and celiac disease. The 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22 日, 神戸
- ③ Iwasaki, Y. Lnk/SH2B3, a gene associated with risk of several autoimmune diseases regulates proliferation and retinoic acid production of dendritic cells. The 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22 日, 神戸
- ④ Itakura, A. Analysis of mouse strain-dependent contact hypersensitivity: production of antigen-specific IgM antibodies by B-1 cells. The 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22 日, 神戸
- ⑤ Iida, R. B-1 cell lineage specification occurs between hematopoietic stem cell and prolymphocyte stages by differentiation environments. The 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22 日, 神戸
- ⑥ Kariyone, A. IFN- γ -inducible GTPase regulates T cell-mediated antigen cross-presentation by antigen-presenting cells. The 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 22 日, 神戸
- ⑦ Kariyone, A. Molecular mechanisms of Th1-mediated antigen cross-present-

- ation: roles of ligpl and ingenol. The 97th Annual Meeting of the American Association of Immunologists. 2010年5月7日, Baltimore, Maryland
- ⑧ Katayama, H. An adaptor protein Lnk/Sh2B3, negative regulator of lymphohematopoiesis, contributes to the maintenance of gut-associated lymphoid tissues. 第39回日本免疫学会・学術集会、2009年12月4日, 東京
- ⑨ Ogawa, S. Phenotypic and functional analysis of unique intestinal CD3-IL-2R+ cells. 第39回日本免疫学会・学術集会、2009年12月3日, 東京
- ⑩ Takatsu, K. Molecular basis of immune responses and inflammation: Effects of herbal natural products. The 12th International Symposium on Traditional Medicine: Establishment of scientific platform for natural medicine, 2009年11月26日, 富山
- ⑪ Nakamura, T. PDCA-1 and plasmacytoid dendritic cells. The 9th World Congress on Inflammation, 2009年7月8日, 東京
- ⑫ Honda, H. Natural plant products modulate innate immunity via TLRs. The 9th World Congress on Inflammation, 2009年7月8日, 東京
- ⑬ Sasaki, S. Identification of soluble MD-1 and its role in autoimmune diseases. 第38回日本免疫学会・学術集会、2008年12月3日, 京都
- ⑭ Nagai, Y. TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 differentially regulate LPS responsiveness in B cells. 第38回日本免疫学会・学術集会、2008年12月2日, 京都
- ⑮ Kouro, T. B-1 cell restricted differentiation of IL-7R+ lymphoid progenitors from fetal liver. 第38回日本免疫学会・学術集会、2008年12月2日, 京都
- ⑯ Katayama, H. Regulated expression of Lnk/Sh2B3 adaptor protein in lymphohematopoietic system in the Lnk: GFP knock-in reporter mice. 第38回日本免疫学会・学術集会、2008年12月2日, 京都
- ⑰ Iwasaki, Y., Novel regulatory machinery for dendritic cell production mediated by Lnk/SH2B3, a negative regulator of lymphohematopoiesis. 第38回日本免疫学会・学術集会、2008年12月2日, 京都
- ⑱ Takatsu, K. Role of IL-5 in the immune response and inflammation. 4th FIMSA Congress. 2008年10月, Taipei, Taiwan

〔図書〕(計3件)

- ① 生谷尚士、高津聖志、南江堂、「免疫生物学」原著第7版 第Ⅲ部 成熟リンパ球のセレクターレパートリーの発生 6 免疫系レセプターを介するシグナル伝達、2010、
- ② 柳橋努、高津聖志、シナジー、「臨床粘膜免疫学」Th1/Th2/Treg 細胞とサイトカインによる分泌型 IgA 誘導・制御機構、2010、186-194
- ③ 紅露拓、高津聖志、医学書院、医学のあゆみ IL-5による自然免疫制御、2010、

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: トランスジェニック非ヒト哺乳動物およびその利用
 発明者: 高津聖志、生谷尚士、高木智
 権利者: 富山大学、国立国際医療研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2009-177159 号

出願年月日: 平成 21 年 7 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/>

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(医学)・教授

研究者番号: 10107055

(2) 研究分担者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号: 30431761

生谷 尚士 (IKUTANI MASASHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 40513718

(3) 連携研究者