

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890080

研究課題名（和文） B-1細胞の恒常性の維持と免疫疾患におけるIL-5の役割

研究課題名（英文） The roles of IL-5 in homeostasis of B-1 Cell and immune diseases

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

自然免疫に貢献する腹腔B-1細胞の恒常性の維持にはIL-5が必須である。B-1細胞の制御機構の解明にはIL-5産生細胞の同定が不可欠であるが、未だ同定には至っていない。本研究から腹腔において少なくとも2種類の免疫細胞がIL-5を産生しており、一つはCD3ε陽性CD4陽性のヘルパーT細胞であり、もう一方の細胞はc-kit抗原を発現していることが明らかとなった。2種類のマウスストレイン（C57BL/6とBALB/c）を用いてIL-5産生細胞を検出した結果、C57BL/6マウスではc-kit陽性細胞が、BALB/cマウスではヘルパーT細胞が主要なIL-5産生細胞であり、またBALB/cマウスにおいてはIL-5産生の亢進が観察された。そのためB-1細胞数を検討したところ、BALB/cマウスではC57BL/6マウスの約3倍のB-1細胞が確認され、B-1細胞のIL-5に対する応答性も亢進していた。これらの結果から、BALB/cマウスでみられる接触性皮膚過敏症の増悪は腹腔でのIL-5産生細胞とIL-5産生量の違いから生じるB-1細胞の増加が一因ではないかと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

IL-5 is necessary for homeostasis of B-1 cell in the peritoneal cavity. In order to clarify the mechanism underlining B-1 cell regulation, identification of IL-5-producing cells is a key clue. In this project, at least two kinds of immune cells that produce IL-5 in steady state have been revealed. One is CD3ε positive CD4 positive helper T cell and the other is c-kit positive cell. In comparison between two wild type mouse strains, C57BL/6 and BALB/c, the cell frequency of IL-5-producing c-kit positive cell was higher in C57BL/6 mice. On the other hand, IL-5-producing helper T cell is increased in BALB/c mice. In addition, total IL-5-producing cells were more frequent in BALB/c mice. These results suggest that B-1 cells are differently regulated in those mice. Indeed, the number of B-1 cells in BALB/c mice is increased almost three times compared to C57BL/6 mice and the

responsiveness of B-1 cells to IL-5 in BALB/c mice is higher than those of C57BL/6 mice. These results indicate that more prominent allergic disorders observed in BALB/c mice are caused by such differences in B-1 cell regulation. This might explain the differences in responsiveness of allergic diseases in humans.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

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：細胞・組織、サイトカイン、B細胞

1. 研究開始当初の背景

マウスB-1細胞は胎児期に分化し成体では腹腔において自己複製により維持されると考えられているが、その前駆細胞や分化経路、そして抗体産生細胞への終末分化の詳細は解明されていない。B-1細胞は産生する抗体の多様性は制限されているが、T細胞非依存的にグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるLPSやホスファチジルコリンなどの細菌成分に対する抗体を自発的に産生し自然免疫を担っている。また、腸管免疫に必須であるIgA産生細胞の大多数はB-1細胞由来であることが報告されており、腸管免疫の実行組織への遊走に必要な接着分子、腸管樹状細胞によるIgA産生細胞への分化機構が明らかとなるなど近年盛んに研究されてきている。

一方、自身が産生する抗体の多反応性のため、B-1細胞の制御機構の障害は疾患の誘発や重症化に陥る。NZBや(NZB×NZW)F1マウスなどの自己免疫疾患モデルマウス

や関節リウマチ誘導時などではB-1細胞が増加しており自己免疫疾患との関連性が指摘されている。そのためにB-1細胞を制御し自己免疫疾患を克服しようという動きは益々強くなっている。

2. 研究の目的

B-1細胞の恒常性の維持にはB細胞受容体シグナルの調節因子やCD5など様々な分子が報告されている。この制御にはIL-5も深く関わっており、これまでに国内外で多数報告されている。IL-5とそのレセプターは当該研究室で発見され、遺伝子クローニングと構造解析やシグナル伝達機構、生理作用などが世界に先駆けて解明されてきた。過剰なIL-5を発現するトランスジェニックマウスでは血清中のIgM、IgA、IgEの増加やB-1細胞の増加、自己抗体の産生が認められた。反対にIL-5やIL-5レセプターα鎖欠損マウスではB-1細胞が減少し、血清中のIgM、IgG₁、IgAが減少

していた。アテローム性動脈硬化症は酸化低密度リポタンパク質（OxLDL）が継続的にマクロファージに取り込まれて重症化するが、この症状を抑制する抗OxLDL抗体はB-1細胞由来でありIL-5の欠損により減少してしまう。さらにB-1細胞が粘膜免疫を増強するアジュバントにより粘膜免疫実行組織に浸潤しIL-5シグナルを介してIgA産生に寄与することが報告され、ワクチン開発などの臨床応用の観点からもIL-5によるB-1細胞の制御機構の重要性は益々高まってきている。また接触性皮膚過敏症などのアレルギー疾患におけるB-1細胞の役割も指摘されている。これらの報告からB-1細胞の恒常性の維持や抗体産生細胞への分化機構、そしてB-1細胞の制御不能による免疫疾患の機序をIL-5および関与するサイトカインの役割に着目し解明しようと思いついた。本研究の目的はIL-5によるB-1細胞の制御機構の解明を糸口とし、疾患の予防および治療法開発の基盤を得ることである。

3. 研究の方法

B-1細胞の制御機構の解明にはIL-5産生細胞の同定が必須であるが、いつ、いかなる細胞がIL-5産生を行いB-1細胞の恒常性の維持、活性化に関与しているかは不明である。IL-5は主に抗原感作されたT細胞やマスト細胞から産生されるサイトカインであるが、T細胞やマスト細胞を欠損するマウスにおいてもB-1細胞が局在する腹腔内のIL-5の発現は認められる。また生体内においてIL-5は細胞内で合成されるとすぐに分泌されてしまうため、定常状態のIL-5産生細胞を同定することは極めて困難である。これらの問題を解決するためにIL-5の遺伝子座を蛍光タンパク質であるGFPで置換したIL-5/GFPノックインマウスの作製に着手した。この

マウスでは内因性のIL-5プロモーターでGFPの発現が制御され、またGFPは細胞外に分泌されないため、生体内でGFPの発現をフローサイトメトリー法でモニターすることでIL-5産生細胞を同定することが可能である。自己免疫疾患でのIL-5応答性のB-1細胞の増加に関与する細胞の同定にもつながり、疾患の治療法開発にも貢献できると考える。さらにアレルギー性炎症誘導時の好酸球の遊走作用にもIL-5が深く関わっているためIL-5/GFPノックインマウスを用いてIL-5産生細胞を同定し病態の変化との関連性の点からも研究を行った。

本研究初年度は腹腔、脾臓、リンパ節等におけるGFP陽性細胞を同定し、その細胞表面抗原を詳細に解析した。次年度はIL-5/GFPノックインマウスを二種類の野生型マウス（C57BL/6とBALB/c）と交配させIL-5産生細胞の違いを比較検討した。BALB/cマウスはC57BL/6に比べ、アレルギー応答が増悪して起こるため、これらのマウスではIL-5産生に違いがあるのではないかと予想した。IL-5レセプター α 鎖欠損マウスではアレルギー応答が顕著に障害されていたため、アレルギー応答のモデルとして耳介の浮腫を測定する接触性皮膚過敏反応を用いた。

4. 研究成果

IL-5/GFPノックインマウスの解析から免疫関連組織である骨髄、脾臓、リンパ節ではほとんどGFP陽性細胞は検出されなかったが、予想通りに腹腔にはGFP陽性細胞がリンパ球の0.02%の割合で検出された。フローサイトメトリー法による詳細な解析の結果、腹腔において少なくとも2種類の免疫細胞がIL-5を産生しており、一つはCD3 Σ 陽性CD4陽性のヘルパーT細胞

であることが判明した。もう一方の細胞は、幼若な細胞に発現する c - k i t を発現していることが明らかとなった。研究に汎用される 2 種類のマウスストレイン (C 5 7 B L / 6 と B A L B / c) を用いて I L - 5 産生細胞を検出した結果、これらのマウスで I L - 5 産生細胞の割合が大きく異なっていた。 C 5 7 B L / 6 マウスでは c - k i t 陽性細胞が、 B A L B / c マウスではヘルパー T 細胞が主要な I L - 5 産生細胞であり、また B A L B / c マウスにおいては I L - 5 産生の亢進が観察された。 B A L B / c マウスはアレルギー応答が C 5 7 B L / 6 マウスに比べ増悪していること、遅延型アレルギー疾患の一種である接触性皮膚過敏症は B - 1 細胞が産生する抗原特異的イムノグロブリン M により炎症反応が惹起されることから、 B A L B / c マウスでは B - 1 細胞が増加していると予測された。 B A L B / c マウスの腹腔細胞の解析では C 5 7 B L / 6 マウスの約 3 倍の B - 1 細胞が観察され、 B - 1 細胞の I L - 5 応答性も亢進していた。さらには抗原特異的 B - 1 細胞の増加も認められた。これらの結果から、 B A L B / c マウスにおける接触性皮膚過敏症の増悪は腹腔での I L - 5 産生細胞と産生量の違いから生じる B - 1 細胞の増加が一因ではないかと思われる。この結果はヒトのアレルギー応答への感受性の違いを説明できる可能性もあり、臨床応用の観点からも極めて興味深い研究成果である。

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 2 件)

① Kouro Taku, Ikutani Masashi, Kariyone Ai, Takatsu Kiyoshi, Expression of IL-5Ralpha on B-1 cell progenitors in mouse fetal liver and involvement of Bruton's tyrosine kinase in their development, Immunology Letters, 査読有、123巻、2009、169-178

② 高津 聖志、生谷 尚士、板倉 敦子、アレルギーをめぐるトレンド；B-1細胞、皮膚アレルギーフロンティア、査読無、7巻、2009、120-122

[学会発表] (計 2 件)

① 生谷 尚士、Characterization of IL-5-Producing Cells in the Peritoneal Cavity、日本免疫学会総会・学術総会記録、2009年12月2日、大阪国際会議場

② 生谷 尚士、Characterization of IL-5-Producing Cells and Analysis of Their Activity、日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜

[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

出願年月日：2009年7月30日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生谷 尚士 (IKUTANI MASASHI)

富山大学・学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：40513718

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：