

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591238
 研究課題名（和文） 好塩基球におけるシグナル伝達制御機構

研究課題名（英文） FcR γ chain-dependent signaling in basophils

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

近年、好塩基球は2型免疫応答において重要な役割を担っていることがわかってきたが、様々な刺激における細胞内シグナル伝達機構については未だ不明な点が多い。本研究課題では、2型サイトカイン産生に注目し、好塩基球特異的な IL-3 刺激による IL-4 産生機構について、抗体受容体のサブユニット FcR γ を介したシグナル伝達の制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Basophils have recently been recognized as a mediator of type 2 immune responses producing interleukin-4 (IL-4) in response to various stimuli including T cell-derived IL-3. However, little information is available for the signaling pathway of IL-3-induced IL-4 production in basophils. In this study, we showed that FcR γ -dependent signaling in basophils was modulated by a variety of factors such as their activation status and negative regulators.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：サイトカイン、好塩基球、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

喘息やアトピーなどの慢性アレルギー性疾患や寄生蠕虫感染に対する免疫応答の病態解明においてヘルパー T 細胞 (Th) の Th1/Th2/Th17 分化バランスの制御を含めた包括的解析が重要視されている。申請者は、これまで 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、Th1/Th2 免疫応答制御、NK 細胞分化における機能を明らかにしてきた。特に IRF-2 欠損マウスで IFN シグナルの異常亢進が炎症性皮膚炎発症の原因であることを見出し (Hida S. *et al. Immunity* 13:643, 2000, Arakura F. *et al. J. Immunol.* 179:3249, 2007)、樹状細胞分化異常 (Ichikawa E. *et al.*

Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101:3909, 2004)、さらに好塩基球の異常増多に起因する Th2 シフトについて解析した(Hida S. *et al. Blood* 106:2011, 2005)。これらの研究から好塩基球が 2 型免疫応答の IgE 依存的なエフェクター細胞としての役割だけではなく、Th1/Th2 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てきた。(Oh K. *et al. Blood*, 2007, Sokol CL. *et al. Nat. Immunol.*, 2008)。これまで好塩基球や肥満細胞は、高親和性 IgE 受容体 (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研究されてきた。肥満細胞は皮膚や粘膜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た。最近になり、好塩基球の寄生虫感染時の役割が検証され(Voehringer D. *et al. Immunity*, 2004)、IgE 依存的な慢性炎症(Mukai K. *et al. Immunity* 23:191, 2005)や IgG1 依存的なアナフィラキシー反応(Tsujimura Y. *et al. Immunity* 23:191, 2008)での重要性が報告されたことから、生体内における好塩基球の役割に注目が集まっている。我々は好塩基球の 2 型免疫応答に重要なサイトカイン産生に注目し、その研究過程で FcR γ 欠損マウスでは好塩基球が野生型と同程度に存在し、寄生虫感染や IL-3 刺激に対して正常に増殖するにもかかわらず、IL-3 刺激に対して IL-4, IL-6 等のサイトカインを産生しないことを発見した(Hida S. *et al. Nat. Immunol.* 10:214, 2009)。また、IL-5 や IL-13 を大量に産生する Natural helper 細胞などの自然免疫細胞が次々と明らかになり、好塩基球も含め、これまで不明であった 2 型免疫応答に関与する自然免疫系細胞とその生理的役割が注目されている。今後、その活性化機構の解析と制御が様々な慢性アレルギー炎症の解明につながると考えられている。

2. 研究の目的

Th1/Th2/Th17 バランスの制御機構について解析する過程で好塩基球が、IgE を介した免疫応答のみならず免疫応答初期に IL-4 を産生し、Th2 分化を促進する重要な細胞として機能していることを報告した(Hida S. *et al. Blood* 106:2011, 2005)。さらに種々の遺伝子変異マウスの骨髄細胞より誘導した好塩基球にレトロウイルスベクターを用いた遺伝子発現系を樹立し、免疫グロブリン受容体のサブユニットである FcR γ が、IL-3 受容体に結合し IL-4 や IL-6 の産生に必須の分子であることを明らかにした(Hida S. *et al. Nat. Immunol.* 10:214, 2009)。本研究課題で

は、これまでに解明した好塩基球の活性化制御機構を更に詳細に解析し、好塩基球と他の免疫細胞との相互作用にも注目して、2 型免疫応答の制御機構を明らかにしていく。好塩基球では IL-3 受容体シグナルは JAK-STAT5 系を介した増殖・生存シグナルと、それ以外に STAT5 系と独立したサイトカイン産生シグナルが存在することを見出した。免疫グロブリン受容体のサブユニットである FcR γ 分子は、抗体受容体とは全く異なる受容体である IL-3 受容体においても IL-4 等のサイトカイン産生で、同じ FcR γ -Syk シグナル伝達経路を用いている。さらに好塩基球の分化状態や活性化状態に依存して、IL-3 受容体や IgE 受容体 (Fc ϵ RI) のシグナル伝達経路の感受性を変化させているという興味深い観察に基づき、免疫グロブリン (IgG1, IgE) や IL-3 等のサイトカイン受容体とそのシグナル伝達分子群 (Src ファミリー, Syk, Jak など) の発現と活性化を中心に好塩基球のサイトカイン産生制御機構について解析を行う。また、活性化のみならず抑制に重要な制御機構にも注目し、脱リン酸化酵素、immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) ドメインを持った分子やタンパク分解による抑制機構についても検討し、好塩基球を介した 2 型免疫応答を包括的に解析する。

3. 研究の方法

マウス組織内の好塩基球は極めて少数しか存在しないため、骨髄細胞より IL-3 で好塩基球を誘導した細胞 (骨髄由来好塩基球: BMBa) を用いて一連の実験を行った。この BMBa を IL-3 で継続的に維持した状態を活性化好塩基球とし、逆に IL-3 を枯渇させた好塩基球を休止状態として実験に用いている。活性化好塩基球は IgE 刺激によって IL-4, IL-6 を産生するが、増殖は誘導されない。IL-3 刺激では増殖は誘導されるが IL-4, IL-6 を産生しない。一方、休止状態の好塩基球は IgE の刺激には殆ど応答せず、IL-3 刺激によってのみ IL-4, IL-6 を産生ようになる。それぞれの受容体はフローサイトメトリ解析やタンパク質ブロットでは差は認められず、何らかのシグナル伝達分子による制御が示唆された。そこで、活性化細胞と休止細胞で発現しているシグナル伝達分子およびその下流の転写因子群について解析した。

(1) IL-3 受容体は、マウスの場合 α 鎖と IL-3/IL-5/GM-CSF に共通の β_c と IL-3 特異的な β_{IL-3} 鎖によって構成されている。FcR γ 分子の結合様式は不明であることから、 β_c もしくは β_{IL-3} 鎖の遺伝子欠損マウスの好塩基球

を用いて、IL-4 産生に重要な受容体の構成を明らかにした。

(2) 骨髄より IL-3 によって培養した活性化好塩基球と IL-3 枯渇による休止状態の好塩基球から得られた total RNA を用いて、シグナル伝達分子や転写因子など、サイトカイン発現に関連する mRNA の発現量を、マイクロアレイと定量的 RCR を用いて解析し、IL-4 産生に重要な分子の解析を行った。

(3) FcR γ 分子は、細胞質内に ITAM (immunoreceptor tyrosine - based activation motifs) と呼ばれるモチーフを持ち、この領域を介して Syk が結合し、下流へのシグナル伝達が行われると考えられている。これまで IgE-Fc ϵ RI を介した FcR γ (ITAM)-Syk 経路については、マスト細胞において検証されてきたが、好塩基球の IL-3 受容体 (β_c/β_{IL-3})-FcR γ 依存的な IL-4 産生誘導についてはほとんど明らかになっていない。今回、ITIM (immunoreceptor tyrosine - based inhibition motif) を持つ抑制性受容体 PIR-B が IL-3 依存的なサイトカイン産生のみ抑制し、IgE 依存的なサイトカイン産生は抑制しないことを観察した。一般的には、ITIM を持つ PIR-B は脱リン酸化酵素などの抑制的な分子を介して受容体シグナルを抑制すると考えられている。そこで PIR-B を発現させる、もしくは発現抑制することで、リン酸化が抑制される分子についても検証し、その制御が ITIM 依存的か否かについても PIR-B の変異体を発現させることで検証した。

(4) in vivo での好塩基球と FcR γ の生理的な重要性を明らかにするために、FcR γ 遺伝子欠損マウスに、寄生虫 *Trichinella spiralis* を感染させ、Th1/Th2 バランスやサイトカイン産生を調べた。

4. 研究成果

(1) IL-3 受容体は IL-3 特異的な α 鎖と IL-3/IL-5/GM-CSF に共通の β_c と IL-3 特異的な β_{IL-3} 鎖によって構成されている。 β_c と β_{IL-3} 鎖それぞれの遺伝子欠損マウスの骨髄や脾臓、末梢血をフローサイトメトリで調べたところ好塩基球は野生型と同様に存在し、IL-3R α 鎖や Fc ϵ RI 受容体の発現も正常であった。さらに、骨髄細胞から好塩基球を濃縮し、IL-3 で刺激したところ、 β_c と β_{IL-3} 鎖どちらの遺伝子欠損マウスにおいても、野生型と同様に IL-4 や IL-6 の産生が観察された。培養好塩基球に IL-5R α を発現させることで IL-5 に対しても反応し、IL-4 を産生するようになることから、FcR γ 分子は β_c と β_{IL-3}

鎖の両方に結合し、IL-4 産生シグナルに関与していると考えられた。

(2) 活性化好塩基球と休止好塩基球におけるシグナル伝達制御分子、および転写因子の mRNA 発現の変化を明らかにするために、骨髄より IL-3 によって分化・誘導した好塩基球を用いた。また、活性化状態の好塩基球から IL-3 を 6~24 時間枯渇させることによって休止状態の好塩基球になるが、IL-3 の除去によって好塩基球はアポトーシスを誘発する。細胞死による間接的な遺伝子発現の可能性を除くために、抗アポトーシス分子である Bcl-XL をレトロウイルスベクターを用いて発現させることで、IL-3 の枯渇による細胞死が抑制できることをフローサイトメトリによって確認した。Bcl-XL を発現させた好塩基球を用いた場合でも、活性化好塩基球と休止好塩基球の IL-4 産生シグナル制御のパターンは変化しなかった。そこでこれらの Bcl-XL を発現させた活性化好塩基球と休止好塩基球で IL-4 産生に関与する分子のスクリーニングを行った。その結果、IL-3 刺激依存的な GTP 結合タンパクやリン酸化酵素などの発現上昇と転写抑制因子やシグナル抑制分子等の減少が観察された。今後さらに、これらの分子群をレトロウイルスベクターで発現もしくは shRNA による発現抑制を行い IL-4 産生制御機構との関連性について明らかにする。また、in vivo においても、寄生虫感染・アレルギー炎症に関与するか、今回得られた分子群について発現の変化について検証していく。

(3) 骨髄や脾臓より分離した primary 好塩基球と骨髄細胞を IL-3 で培養して得られた培養好塩基球 (BMBa) では、IL-4 産生シグナルが異なることから、FcR γ シグナルを制御する分子群のひとつである ITIM ドメインを持つ抑制性受容体に注目した。PIR-B 分子はマクロファージや樹状細胞に高発現している受容体分子であり、これまでに MHC class I 分子と結合して抑制シグナルを伝えていると考えられている。興味深いことに PIR-B は、BMBa では高発現しているが、primary 好塩基球では、ほとんど発現していなかった。そこで、PIR-B 遺伝子欠損マウスの骨髄から、BMBa を誘導したところ、活性化状態でも IL-3 依存的な IL-4 産生が観察された。また、IgE 依存的な IL-4 産生には全く影響を与えなかったことから、PIR-B は、IL-3 受容体-FcR γ を介した IL-4 産生を特異的に抑えていることが示唆された。さらに PIR-B をレトロウイルスベクターで再構築することで、IL-4 産生を抑制できたことから、PIR-B は IL-3 依存的な IL-4 産生シグナルを抑制していると考えられる。PIR-B は ITIM を 5 か所もち、SHP

などの脱リン酸化酵素を介して様々なシグナル伝達を抑制している。そこで我々は、ITIM 領域を切除した変異体もしくは点変異体を作成し、PIR-B 遺伝子欠損マウス由来の BMBa に再構築した。その結果、ITIM 変異体でも、IL-4 産生を抑制できることから ITIM に非依存的な新規のシグナル制御機構が存在することが示唆された。また、PIR-B の細胞外領域の欠損では抑制機能が働かないこと、さらに MHC class I を発現できない $\beta 2$ ミクログロブリン欠損好塩基球は野生型と同様に IL-4 産生パターンを示すことから、MHC class I 以外の PIR-B のリガンドが存在することが予想された。

(4)FcR γ 遺伝子欠損マウスに、寄生虫 *Trichinella spiralis* を感染させたところ、IL-5 や IL-13 の減少は確認できたが、血清 IgE 量や筋肉シスト内の寄生虫数には変化は認められなかった。この結果から、旋毛虫感染においては FcR γ を介した好塩基球の寄与は低いと考えられた。

一連の好塩基球の増殖・活性化のシグナル伝達系や転写制御の分子機構の解明は、好塩基球の役割を明らかにする研究という位置づけを持つだけでなく、広く行われている Th1/Th2/Th17 分化の制御とエフェクター作用制御の研究を統合することによって、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。これによって新たな免疫活性化制御をターゲットにした免疫制御方法の開発が可能となり、アレルギー、自己免疫疾患、感染防御の新規治療、予防法の開発に対して指針を与えることにつながる可能性がある。

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 3 件)

- ① Yoshizawa K, Nakajima S, Notake S, Miyagawa S, Hida S, Taki S ; IL-15-high-responder developing NK cells bearing Ly49 receptors in IL-15^{-/-} mice. *J. Immunol.* 187: 5162-5169 (2011), 査読有
DOI:10.4049/jimmunol.1101561
- ② Hata T, Takahashi M, Hida S, Kawaguchi M, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Nishiyama A, Izawa A, Koyama J, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. ; Critical role of Th17 cells in inflammation and

neovascularization after ischaemia; *Cardiovasc Res.* 90 (2): 362-372(2011), 査読有

DOI:10.1093/cvr/cvq397

- ③ Hu, T, Takamoto, M, Hida, S, Tagawa, YI, and Sugane, K ; IFN- γ deficiency worsen Pneumocystis pneumonia with Th17 development in nude mice. *Immunol. Lett.* 127(1): 55-59(2009), 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.08.013>

[学会発表] (計 11 件)

- ① ODA A, SAKAMOTO Y, SANJO H, NOTAKE T, TAKAI T, HIDA S, TAKI S, IL-3-induced IL-13 production by Basophils but not mast cells was sensitive to PIR-B mediated inhibitory signals. 第 40 回日本免疫学会学術総会, 2011. 11. 29, 千葉
- ② NOTAKE T, ODA A, SANJO H, HIDA S, TAKI S, IL-15-independent generation of memory-like “innate” CD8⁺T cells in IRF-2 deficient mice, 第 40 回日本免疫学会学術総会, 2011. 11. 28, 千葉
- ③ OKADA N, KITAZAWA M, FUJII C, HIDA S, TANIGUCHI S, The role of apoptosis-associated speck like protein containing a CARD (ASC) in antitumor effect of macrophage, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011. 10. 5, 名古屋
- ④ KITAZAWA M, HIDA S, OKADA N, MATSUMURA T, FUJII C, TAKEOKA M, MIYAGAWA S, TANIGUCHI S, A novel tumor-suppressor functions of ASC in fibrosarcoma, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011. 10. 3, 名古屋
- ⑤ NOTAKE T, HORISAWA S, ARAKURA F, HIDA S, TAKI S; Generation of CD1d-independent T cells bearing various NK receptors requires interferon regulatory factor-2 differentially, 14th International Congress of Immunology, 2010. 8. 25, 兵庫
- ⑥ ODA A, SAKAMOTO Y, TAKAI T, HIDA S, TAKI S; Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B attenuates IL-3-induced IL-4 production in a novel

ITIM-independent manner in murine basophils, 14th International Congress of Immunology, 2010. 8. 24, 兵庫

- ⑦ HIDA S, ODA A, KOSHI I, TAKI S; Basophils sense various external signals with their FcR γ -associated cell surface molecule(s) to produce IL-4 in eliciting Th2 responses, 14th International Congress of Immunology, 2010. 8. 23, 兵庫
- ⑧ TAKAMOTO M, HU T, HIDA S, TAGAYA Y, SUGANE K; The role of IFN- γ and IL-17 on *Pneumocystis pneumonia* in nude mice., 14th International Congress of Immunology, 2010. 8. 23, 兵庫
- ⑨ NOTAKE T, HIDA S, TAKI S; Generation of CD1d-independent T cells bearing various NK receptors requires interferon regulatory factor-2 differentially. 第 39 回日本免疫学会学術総会, 2009. 12. 4, 大阪
- ⑩ HIDA S, ODA A, YAMASAKI S, SAITO T, TAKI S; Basophils “sense” protease allergens with their FcR γ -associated cell surface molecule(s) to produce IL-4. 第 39 回日本免疫学会学術総会, 2009. 12. 2, 大阪
- ⑪ SAKAMOTO Y, ODA A, TAKAI Y, HIDA S, TAKI S; Pired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B attenuates IL-3-induced IL-4 production in a novel ITIM-independent manner in murine basophils. 第 39 回日本免疫学会学術総会, 2009. 12. 2, 大阪

[図書] (計 5 件)

- ① 肥田重明、瀧伸介：羊土社，「Th2 分化と好塩基球。」実験医学 28：2010, 1879-1884
- ② 肥田重明、瀧伸介：先端医学社，「好塩基球からの IL-4 産生誘導機序。」炎症と免疫 18：2010, 9-13

③ 肥田重明、瀧伸介：医薬の門社，「好塩基球の IL-3 受容体に会合する FcR γ 鎖の機能。」感染 炎症 免疫 39：2009, 347-349

④ 瀧伸介、肥田重明：羊土社，「好塩基球の IL-4 産生における細胞内シグナル伝達機構。」実験医学 27：2009, 3271-3278

⑤ 肥田重明、瀧伸介：医歯薬出版，「IL-3 レセプターシグナルによる好塩基球のサイトカイン産生制御の解明。」医学のあゆみ 230：2009, 303-304

[その他]
ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/grdkarei/i-bunshishuyo/index.html>

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・准教授
研究者番号：10345762