

機関番号：31303
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790945
 研究課題名（和文） 免疫グロブリン様受容体 PIR-B による好塩基球のサイトカイン
 産生制御機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of cytokine production regulatory mechanism in basophils
 by immunoglobulin-like receptor PIR-B.
 研究代表者
 坂本 譲 (SAKAMOTO YUZURU)
 東北工業大学・共通教育センター・准教授
 研究者番号：30316434

研究成果の概要（和文）：好塩基球の Th2 免疫応答サイトカイン産生における抑制型免疫グロブリン様受容体 PIR-B の関与について検討するため、PIR-B 欠損マウス由来骨髄細胞より誘導した PIR-B 欠損好塩基球を用いて解析を行った。その結果レトロウィルスベクターによる遺伝子再構成の実験系から PIR-B が IL-3 誘導性 IL-4 産生を制御していることを見いだした。また、種々の変異型 PIR-B を用いた解析から好塩基球の IL-3 誘導性 IL-4 産生機構にはこれまでに報告されていない PIR-B の新たな免疫制御機構の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To examine the potential involvement of PIR-B, the inhibitory type murine paired immunoglobulin-like receptor, in the regulation of Th2-type cytokine production in basophils, we used retroviral gene transfer system and analyzed PIR-B-deficient mice bone marrow-derived basophils. As a result, we found that PIR-B regulates IL-3-induced IL-4 production in murine basophils. Moreover, from the result of analysis that used various PIR-B mutants, PIR-B expressed on basophils negatively regulates IL-3-induced IL-4 production in an ITIM-independent manner, pointing to previously unrecognized regulatory mechanisms by PIR-B.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：好塩基球, PIR-B, IL-3, ITIM, Th2 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

PIR (Paired immunoglobulin-like receptor) は B 細胞や骨髄系細胞に発現しているペア型の免疫グロブリン様受容体であり活性化型の PIR-A と抑制型の PIR-B の 2 種類のサブタイプが同定されている。これまでに PIR-B 欠損マウスでは免疫応答の Th1/Th2

バランスが Th2 に偏向することが報告されており PIR-B の Th2 免疫応答制御への関与が示されている。一方、好塩基球はアレルギー反応や寄生虫感染に対するエフェクター細胞としての役割だけでなく、近年になり好塩基球の IgE 依存的な慢性炎症における主要な役割、寄生虫感染時の生物学的・生理的な役割、

さらに好塩基球の IgE 非依存的 IL-4 産生経路, すなわち IL-3 依存的に IL-4 を産生することにより免疫応答初期において Th2 免疫応答の誘導に重要な役割が詳細に報告された. これらの結果は, 好塩基球が IgE 依存的また非依存的に IL-4 を産生することにより Th2 免疫応答の誘導において重要な役割を果たすという好塩基球の新たな機能を示しており注目されていた. しかし好塩基球は生体内にごく少数しか存在せず, また好塩基球特異的に異常をもつモデルマウスも存在していなかったことなどから他の免疫担当細胞に比べてその機能解析は遅れていた. 最近になり好塩基球の IL-3 依存的な IL-4 産生経路において IL-3 受容体への FcRγ鎖の恒常的な会合と FcRγ鎖へのチロシンキナーゼ Syk の動員を介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていることが報告され, 好塩基球の IL-3 依存的なサイトカイン産生経路における新たな制御機構の解明が期待されている.

2. 研究の目的

好塩基球は休止期には IL-3 刺激にのみ応答し IL-4 を産生するが, 活性化時には IL-3 刺激には応答せず IgE クロスリンク刺激にのみ応答して IL-4 を産生すること, 好塩基球の活性化により PIR-B の細胞表面発現が上昇すること. PIR-B 発現欠損好塩基球は野生型とは異なり活性化時にも IL-3 刺激に反応して IL-4 を産生することがこれまでの予備検討の結果から明らかになっている. これらの結果は, 好塩基球において PIR-B が IL-3 刺激に依存的な IL-4 産生経路の制御に関与する可能性を示唆している. そこで本研究では好塩基球の IL-3 誘導性 IL-4 産生における抑制型免疫グロブリン様受容体 PIR-B の産生制御機構について検討することを目的とした.

3. 研究の方法

本研究では, PIR-B 欠損マウス, H-2 欠損マウス由来骨髓細胞から誘導した好塩基球を用いての種々の刺激による IL-4 産生について野生型由来の好塩基球と比較検討すると共に, レトロウィルスベクターによる遺伝子再構成の実験系を用いて, PIR-B 欠損マウス由来骨髓細胞から誘導した PIR-B 欠損好塩基球に対して野生型 PIR-B および種々の変異型 PIR-B を発現させ, 発現回復による IL-3 刺激に対する IL-4 産生の変化と IL-3 刺激による IL-4 産生に関与するシグナル伝達分子の解析を行った.

4. 研究成果

①好塩基球は, 休止期には IL-3 刺激にのみ応答し IL-4 を産生するが, 活性化時には IL-3 刺激には応答せず IgE クロスリンク刺激にのみ

応答して IL-4 を産生する. しかしながら PIR-B 発現欠損好塩基球は野生型とは異なり活性化時にも IL-3 刺激に反応して IL-4 を産生する. そこで活性化好塩基球の IL-3 刺激による IL-4 産生への PIR-B 分子の関与を確認するためにレトロウィルスベクターによる遺伝子再構成の実験系を用い, PIR-B 欠損好塩基球において PIR-B の発現を回復させたところ PIR-B 欠損好塩基球は PIR-B の発現回復により IL-3 刺激による IL-4 産生が野生型好塩基球と同様のパターンに回復することを確認した. よって, この活性化好塩基球における IL-3 誘導性 IL-4 産生は PIR-B により制御されていることが明らかとなった.

また, 最近の報告から好塩基球における IL-3 誘導性 IL-4 産生機構のシグナル伝達経路としては FcRγ鎖-Syk 経路が必須であることが示されていることから, 活性化好塩基球の IL-3 刺激に対するシグナル解析を行い PIR-B 欠損好塩基球では野生型と比較して IL-3 刺激により Syk のリン酸化が亢進することが明らかになった. よって, IL-3 刺激により IL-3 レセプターに動員される Syk の活性化を PIR-B が抑制することで IL-3 誘導性の IL-4 産生シグナルを制御している可能性が示唆された.

②PIR-B による免疫細胞の活性化制御機構は, PIR-B の細胞内領域に存在する ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) のチロシンリン酸化部位へ動員される抑制性フォスファターゼ SHP-1 により活性化シグナルを抑制すると考えられている. そこでレトロウィルスベクターによる遺伝子再構成の実験系を用い, この ITIM のチロシン残基を欠失させた変異型 PIR-B を PIR-B 欠損好塩基球に発現させ IL-3 刺激による IL-4 産生を検討したところ, 野生型 PIR-B を発現させた好塩基球と同様の IL-4 産生パターンを示した. しかし PIR-B の細胞内領域を完全に欠失させた変異型 PIR-B では PIR-B 欠損好塩基球と同様に IL-3 刺激による IL-4 産生抑制作用が消失した. また PIR-B の細胞外領域を CD4 に置換した変異型 PIR-B を発現させると IL-3 刺激による IL-4 産生抑制作用は減弱した. 一方, PIR-B のリガンドの 1 つであるマウス MHC class I を欠損する H-2 欠損好塩基球では野生型と同様の IL-4 産生パターンであることから, 好塩基球の IL-3 刺激による IL-4 産生機構にはこれまでに報告されていない PIR-B の新たな免疫制御機構が関与するものと考えられる.

③これまでに好塩基球における IL-3 誘導性 IL-4 産生のシグナル伝達経路については IL-3 レセプターに会合する FcRγ鎖への Syk の動員と活性化が重要な役割を果たしてい

ること、また PIR-B 欠損好塩基球では IL-3 刺激により Syk のリン酸化が野生型と比較して亢進することから PIR-B が Syk の活性化を制御することで IL-4 産生を制御していることが明らかになっている。しかし PIR-B は IL-3 刺激に対して Syk のみを標的として抑制作用を発揮するのか、またそのほかの IL-3 刺激下流のシグナル分子に対しても抑制作用を発揮するのかについては明らかにされていない。そこでこれらのことについて検討するために STAT5, ERK, JNK, P38 など他の IL-3 刺激の下流シグナル分子のリン酸化について野生型との比較検討を行った。その結果、STAT5, ERK, JNK, P38 など他の IL-3 刺激の下流シグナル分子のリン酸化は野生型と同様の状態であった。よって PIR-B は IL-3 誘導性 IL-4 産生特異的に作用していることが示唆された。

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 1 件)

① Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T: Differential but competitive binding of Nogo and MHC I to PIR-B provides an inhibition of cells. *J Biol Chem* (in press). 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

① Hida S, Sakamoto Y, Yamasaki S, Saito T, Taki S (2009. 7. 6-10): Fc receptor γ -chain is a subunit of the IL-3 receptor, required for IL-4 production by murine basophils. 9th World Congress on Inflammation (Tokyo)

② Endo S, Sakamoto Y, Nakamura A, Takai T (2009. 12. 2-4): Competitive binding of MHC class I between PIR-B and CD8 regulates CTL activity. 第 39 回日本免疫学会総会 (大阪)・学術集会記録第 39 巻, 128, 2009

③ Sakamoto Y, Oda A, Hida S, Taki S (2009. 12. 2-4): Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B attenuates IL-3-induced IL-4 production in a novel ITIM-independent manner in murine basophils. 第 39 回日本免疫学会総会 (大阪)・学術集会記録第 39 巻, 95, 2009

④ 坂本 譲 (2010. 3. 14-15) 抑制型レセプターによる好塩基球の Th2 免疫応答制御について, JSEI-1st Spring Seminar 2010 (宮城)

2010

⑤ Endo S, Sakamoto Y, Kobayashi E, Nakamura A, Takai T (2010. 6. 24-25) Regulation of cytotoxic T lymphocyte activity by CD8 and PIR-B. The 5th International Symposium of Institute Network (Kanazawa)

⑥ Sakamoto Y, Watanabe Y, Nakamura A, Takai T (2010. 8. 22-27): Kinetic analysis of the association between PIR-B and its related molecules in B cells. 14th International Congress of Immunology (Kobe)

⑦ Oda A, Sakamoto Y, Koshi I, Takai T, Hida S, Taki S (2010. 8. 22-27): Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B regulates IL-3-induced IL-4 production in a novel ITIM-independent manner in murine basophils. 14th International Congress of Immunology (Kobe)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 譲 (SAKAMOTO YUZURU)

東北工業大学・共通教育センター・准教授
研究者番号: 30316434