

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890092

研究課題名（和文） 好塩基球におけるインターロイキン4産生を誘導するシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文） Signaling pathway for interleukin-4 induction in basophils

研究代表者

小田 朗永 (ODA AKIHISA)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：80547703

研究成果の概要（和文）：

好塩基球は IL-3 受容体を介し IL-4 を産生するが、自身の状態に伴い IL-3 への応答性を変化させている。それは抑制型受容体 Paired immunoglobulin-like-B (PIR-B) が、IL-3 に対する応答性を負に制御する事によって担われる。さらに PIR-B は、IgG に対する応答性も負に制御している。そして様々な PIR-B 変異体の再導入実験により、PIR-B の抑制作用に PIR-B 細胞内ドメインが必須であり、さらに ITIM チロシン残基に依存しない未知の抑制機構の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Although basophils produce IL-4 in response to IL-3, we discovered that basophils lost IL-3 responsiveness upon activation. PIR-B, the negative regulatory cell surface molecule is involved in the loss of IL-3 responses in activated basophils. In addition, PIR-B also negatively regulates IgG-induced IL-4 production in activated basophils. The inhibitory mechanisms by PIR-B required a cytoplasmic region in an unknown ITIM independent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,990,000	597,000	2,587,000

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：好塩基球、アレルギー、IL-4、PIR-B

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギーによって発症するアレルギー疾患には、2型免疫応答が深く関係している。そして、2型免疫応答に必須な Th2 細胞は、

IL-4 によりその分化が誘導される。近年、好塩基球が初期 IL-4 産生細胞であり、さらに遅延型炎症に関わっているという知見が急速に蓄積されており、多くの研究者がこの好

塩基球細胞に着目するに至った。しかし、好塩基球の活性化およびインターロイキン 4 (IL-4) 産生に関わるシグナル伝達やその制御機構は殆ど研究されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、未だブラックボックスである好塩基球の Th2 サイトカイン産生、特に IL-4 産生に至るシグナル伝達経路の解明、およびそのサイトカイン産生がどのように制御されているのかを明らかにする事である。

## 3. 研究の方法

### (1) IL-3 応答性の消失における PIR-B 作用機序の解明

IL-3 シグナル伝達経路における新規 PIR-B 作用の標的分子を明らかにするため、IL-3 で刺激した野生型好塩基球と PIR-B 欠損好塩基球について、細胞内シグナル分子の活性変化を FcR $\gamma$ 、Syk、Src キナーゼ類を始めとし網羅的に調べる。また機能的 PIR-B と機能欠損型 PIR-B を導入した IL-3 依存性細胞株 Y16 を用いて、抗 PIR-B 抗体により沈降されてくる分子を比較検討し、PIR-B と相互作用する分子の同定を試みる。そして標的経路もしくは分子が同定できたなら、インヒビターやドミナントネガティブ変異体で当該のシグナルを修飾し、もしくは siRNA を用いて標的分子の発現抑制する事で、その機能の確認を行う。

### (2) IL-3 応答性消失の Th2 応答における意義の解明

PIR-B 欠損好塩基球の IL-3 応答性の亢進が、PIR-B 欠損マウスにおける Th2 応答の亢進の原因であるか否かを検討する。まず、PIR-B 欠損 OTII トランスジェニックマウス

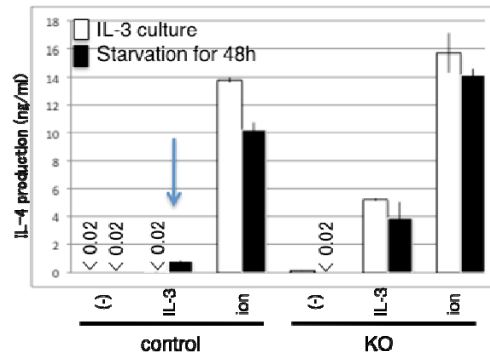
(B57BL/6) を作製し、Th2 を誘導する事が知られているパパイノとオブアルブミンペプチドを用いて免疫操作後、所属リンパ節から CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、その Th2 分化を観察する。Th2 優位な BALB/c の PIR-B 欠損 DO11.10 トランスジェニックマウスを樹立し合わせて解析する。さらにこれらのマウスから好塩基球を CD203R 抗体投与によって除去した場合に、Th2 応答の変化を検討する。

## 4. 研究成果

サイトカイン受容体の脱感作は、過剰なサイトカイン応答を防ぐために重要である。受容体の脱感作機構として、例えばダウンレギュレーション、リサイクリング、ユビキチン化、SOCS のようなフィードバック阻害分子の誘導などが知られている。

今回我々は、マウス骨髄細胞を IL-3 で培養

する事により野生型好塩基球は活性化し、同時に IL-3 応答性を消失する事を見出した。また、Starvation をする事によって IL-3 応答性が回復する事から、IL-3 受容体の脱感作が起きていると考えられる。一方、PIR-B 欠損マウス由来の好塩基球は、活性化状態にあっても、IL-3 に対する応答性を失わない。すなわち、活性化好塩基球における IL-3 誘導性 IL-4 産生は、PIR-B により特異的に負に制御されていた。

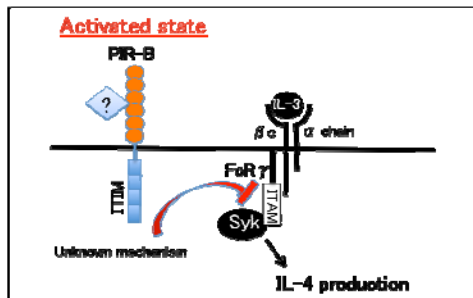


次に、PIR-B 欠損好塩基球における異常な IL-4 産生を誘導する IL-3 受容体シグナルについて解析を行った。IL-3 受容体シグナルとして、Jak の活性化、STAT5 の活性化がよく知られている。IL-3 応答性を消失した野生型好塩基球、PIR-B 欠損好塩基球共に、IL-3 刺激によって STAT5 のリン酸化が誘導される。従って、増殖、生存シグナルには PIR-B は作用していないように考えられた。一方、IL-4 産生を誘導する IL-3 レセプターシグナルは、FcR $\gamma$ -Syk 経路の活性化に依存するが、PIR-B を欠損させた活性化好塩基球では、野生型好塩基球と比べ、Syk の恒常的な活性化が見られた。さらに、PIR-B と FcR $\gamma$  のダブルノックアウトマウス由来の好塩基球では、IL-3 の応答性を消失した。従って、PIR-B 欠損好塩基球で見られる異常な IL-4 産生を誘導するシグナルは、これまで知られている既存の FcR $\gamma$ -Syk 経路を介していると考えられる。従って PIR-B 作用は IL-4 産生経路特異的に Syk の上流で IL-3 シグナルを負に制御している事が明らかになった。

さらに、FcR $\gamma$  経路を同様に介する Fc $\gamma$  受容体シグナルと Fc $\epsilon$  受容体シグナルについても検討を行った。面白い事に、PIR-B は活性化好塩基球において IgE シグナルの制御には殆ど関わっておらず、IgG シグナルに対する応答性を負に制御していた。従って、好塩基球は活性化に伴い、IL-3 と IgG に対する応答性を PIR-B によって消失し、一方で IgE に対する応答性を獲得する事がわかった。逆に、休止状態の好塩基球は、PIR-B の発現が低下

し、サイトカイン産生において IgE に応答せず、IL-3 と IgG に応答する。すなわち、好塩基球は活性化状態に伴い、刺激に対する応答性を変化させている事が明らかになった。

PIR-B を欠損した活性化好塩基球へ PIR-B を導入すると IL-3、IgG 応答が完全に抑制される。これに対して、細胞外ドメインを CD4 に置き換えた PIR-B 変異体を導入した所、抑制作用が欠失した。従って PIR-B はリガンドを介して IL-3、IgG 応答を抑制している事が明らかになった。そのリガンドはこれまで知られているように MHC class1 であるかどうかを、 $\beta 2$  ミクログロブリン欠損マウス由来の好塩基球を用いて調べた所、野生型と同様に IL-3 応答性を消失した事から、MHC class1 はリガンドではない事がわかった。次に PIR-B の作用機序は、Immuno-receptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) 依存的であるかどうかを調べるために、様々な PIR-B 変異体を PIR-B 欠損好塩基球に導入し IL-3 と IgG に対する応答性を検討した。その結果、野生型 PIR-B を導入した時と同様に、PIR-B ITIM 変異体の導入によっても IL-3/IgG-IC 誘導性 IL-4 産生がほぼ抑制された。面白い事に、細胞質部分を完全に消失させた PIR-B 変異体ではその抑制効果がなかった。結果として、PIR-B は ITIM 依存的経路だけでなく、これまでに知られていない ITIM 非依存的な抑制経路も存在する事がわかった。すなわち ITIM 依存的経路と非依存的が重複して IL-3 や IgG 誘導性 IL-4 産生を負に制御している事が明らかになった。



今後の方針として、我々の結果で示唆されたこれまでに知られていない PIR-B の ITIM 非依存的な機能について、更なる解析を行う。さらに、これらの *in vitro* で確認できた好塩基球の活性化状態と刺激に対する応答性の変化が、*in vivo* に適応されるかに焦点を当てたい。さらに、好塩基球における IgG 応答性の PIR-B による負の制御については、アレルギー疾患治療の発展に対する新たな知見であると期待している。アレルギーの発症により血液中の IgG と IgE の抗体価が上昇す

る事は周知の事実である。これまで IgG と IgE に対し、好塩基球は共に応答しサイトカインや炎症性物質を産生する事はわかってきたが、それらの応答性を区別して議論される事は少なかった。今回、好塩基球の状態によってその応答性が区別される事、さらに PIR-B が IgG 応答性を制御している事が明らかになった。すなわち、FcR $\gamma$  経路を同様に介する IgG と IgE に対する応答性の制御を PIR-B がどの様に行っているのかについて、重点的に今後研究して行きたい。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

① Akihisa Oda, Yuzuru Sakamoto, Toshiyuki Takai, Shigeaki Hida, Shinsuke Taki, Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B attenuates IL-3-induced IL-4 production in a novel ITIM-independent manner in murine basophils. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2010, 2010 年 8 月 27 日、神戸国際展示場

② Shigeaki Hida, Akihisa Oda, Ipei Koshi, Shinsuke Taki, Basophils sense various external signals with their FcR $\gamma$ -associated cell surface molecule(s) to produce IL-4 in eliciting Th2 responses, 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2010, 2010 年 8 月 27 日、神戸国際展示場

③ Yuzuru Sakamoto, Akihisa Oda, Toshiyuki Takai, Shigeaki Hida, Shinsuke Taki, 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・学術集会、2009 年 12 月 2 日、大阪国際会議場

[図書] (計 1 件)

① 小田朗永、瀧伸介、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、2010 年、546-552

[その他]

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/graduate/medicine/doctoral/organ-transplant/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田朗永 (ODA AKIHISA)  
信州大学・医学部・研究員  
研究者番号：80547703

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし