

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790467

研究課題名(和文)好塩基球におけるインターロイキン4産生シグナルとその制御機構の解明

研究課題名(英文)The regulatory mechanism for interleukin-4 induction in murine basophils

研究代表者

小田 朗永(Oda, Akihisa)

東京理科大学・生命医科学研究所・助教

研究者番号：80547703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

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、自身の活性化状態に伴い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 is mediated by ITIM independent manner.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：6913

キーワード：IL-4 好塩基球 PIR-B

1. 研究開始当初の背景

近年、血中にわずかしが存在しない好塩基球が IL-4 の供給源であり、遅延型アレルギー性炎症、IgG 誘導性アナフェラキシー、そして SLE 様自己免疫疾患に関わっているという知見が相次ぎ報告されている。従って好塩基球におけるサイトカイン制御機構の解明は、これら疾患における偏った 2 型ヘルパー(Th2)細胞応答を制御する上で極めて重要であり、アレルギーを初めとする新規治療法へ繋がる可能性が大きい。しかし好塩基球の活性化及び IL-4 産生に関わるシグナル伝達やその制御機構については未だ手つかずの状態である。

PIR-B (Paired immunoglobulin-like receptor) は ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) を自身の細胞内に含有する抑制型受容体である。これまでに PIR-B 欠損マウスにおいて、過剰な Th2 応答が誘導される事が報告されており PIR-B の Th2 免疫応答制御への関与が示されている。

2. 研究の目的

これまでに申請者が所属する研究室において、好塩基球は自身の活性化状態に伴い IL-3 に対する応答性を変化させているという事を見出した。すなわち、休止状態の好塩基球は IL-3 に応答し IL-4 を産生するが、活性化好塩基球は IL-3 に対して IL-4 を産生しなくなる (IL-3 応答性の消失)。様々な細胞表面マーカーを調べた所、活性化好塩基球において PIR-B の発現が上昇している事を見出した。本研究の目的は、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 PIR-B にフォーカスし明らかにする事である。

3. 研究の方法

IL-3 応答性の消失における PIR-B の役割を解明するため、野生型と PIR-B 欠損活性化好塩基球を IL-3 培養法によって獲得し、生化学的解析、好塩基球状態変化における遺伝子発現など各種アッセイ系を用いて比較検討を行う。IL-3 シグナル伝達における PIR-B 標的作用の新規分子を明らかにするため、IL-3 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 γ 、Syk、Src シグナル類をはじめとし網羅的に検証する。並行して、変異型 PIR-B を作製し、PIR-B 欠損好塩基球へ再導入する事によるサイトカイン産生における影響について調べる。そして標的経路、もしくは分子同定に至る事ができたなら、インヒビターや変異体を用いて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により、その機能の確認を行う。

4. 研究成果

好塩基球は成体においてわずか約 0.5%しか

存在していないため、これまで研究を行う上で、非常に困難であった。しかし、インターロイキン 3 (IL-3) を添加する *in vitro* 培養法の開発により多くの好塩基球を得る事が可能となった。申請者は、好塩基球による IL-4 産生シグナルを分子レベルで解明する為、この *in vitro* 培養法を軸とし研究を行った。

A. *In vitro* 培養好塩基球 (IL-3-BMBs) は PIR-B を発現し、それに伴い IL-3 誘導性 IL-4 産生能を消失する

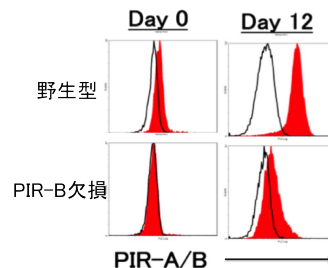
野生型マウスの骨髄から単離したばかりの好塩基球は、IL-3 に応答し IL-4 を産生する事ができるが、一方で、IL-3-BMBs は IL-3 で刺激しても IL-4 を産生しない (IL-3 応答性の消失)。この現象は培養メディウム中に存在する IL-3 によって、IL-3 受容体ダウンレギュレーションが誘導されるためであると考えられた。

しかしながら、IL-3 無添加培地で IL-3-BMBs を再培養すると、培養後 2 時間で IL-3 受容体は細胞表面に再発現するが、この時点で IL-3-BMBs を IL-3 刺激しても IL-4 産生は誘導されなかった。

そして、IL-3 無添加培地でさらに 12 時間以上培養すると、好塩基球は IL-3 刺激により IL-4 を産生した。この IL-3 誘導性 IL-4 産生は IL-3 無添加培地培養により継時的上昇を確認した。したがって、IL-3-BMBs における IL-3 応答性の消失は、遺伝子発現変化を伴う現象であり、何らかの制御機構の存在が示唆された。

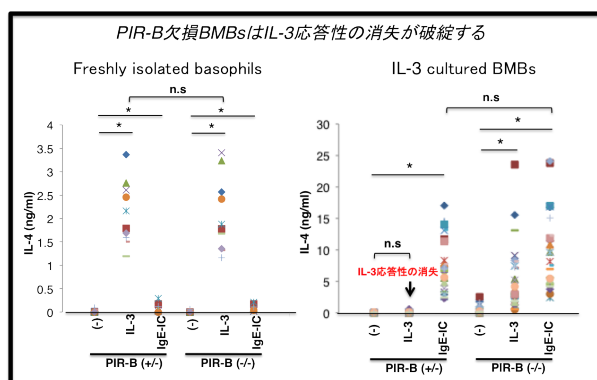
B. IL-3-BMBs は抑制型 PIR-B を高発現し、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は「IL-3 応答性の消失」が破綻する

様々な解析の結果から、我々は IL-3-BMBs は抑制型受容体 PIR-B を高発現する事を見出した。PIR-B は骨髄から単離したばかりの好塩基球では発現しておらず、*in vitro* での培養により PIR-B の発現は上昇した(下図)。



同様に、活性化マーカーである CD69 の発現も、PIR-B の発現と挙動を共にする事から、IL-3-BMBs は活性化状態であると考えられる。IL-3 応答性の消失が PIR-B の発現に係るかを調べる為に、申請者らは野生型マウスと PIR-B 欠損マウスの IL-3-BMBs を用いて比較検討を行った。

骨髄から単離したばかりの野生型と PIR-B 欠損マウスの好塩基球は共に、IL-3 刺激により同程度の IL-4 を産生した(下図-左)。そして既述の様に、in vitro で培養した好塩基球において、野生型 IL-3-BMBs は PIR-B の発現が上昇し、IL-3 刺激による IL-4 産生が誘導されない(IL-3 応答性の消失、下図-右)。一方で、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は IL-3 に対し IL-4 を産生し続け、IL-3 応答性の消失が破綻した(下図-右)。面白い事に、IL-4 産生を誘導する事が知られる IgE 刺激においては、野生型と PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は共に同程度の IL-4 産生が誘導された。従って、PIR-B は IgE による IL-4 産生は制御していないが、IL-3 による IL-4 産生を負に制御している可能性がある。



C. PIR-B 欠損 IL-3-BMBs における IL-3 受容体を介した異常な IL-4 産生は、IL-3 受容体-FcR γ -Syk 経路により誘導される。

IL-4 産生を誘導する IL-3 受容体シグナルは、FcR γ -Syk 経路により特異的に誘導される事が明らかになっている(肥田ら、2009 年、Nature Immunology)。PIR-B 欠損 IL-3-BMBs における異常な IL-3 誘導性 IL-4 産生が、これまで知られている FcR γ -Syk 経路をバイパスしているか否かについて検証した。FcR γ /PIR-B 二重欠損マウス由来の IL-3-BMBs を用いて、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs との比較検討を行った所、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は IL-3 刺激に対し IL-4 を産生するが、FcR γ /PIR-B 二重欠損 IL-3-BMBs は IL-3 誘導性 IL-4 産生が完全に誘導されなくなった。同様の結果として、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs ヘドミナントネガティブ Syk (DN-Syk) をレトロウイルスを用いて導入した結果、empty vector を導入した PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は IL-3 刺激により IL-4 を産生するが、DN-Syk を導入した PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は、IL-3 刺激による IL-4 産生が完全に抑制された。以上の結果により、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs における IL-3 受容体を介した異常 IL-4 産生は、FcR γ -Syk 経路によって誘導されている事が明らかになった。さらに生化学的手法を用いて、IL-3 シグナル

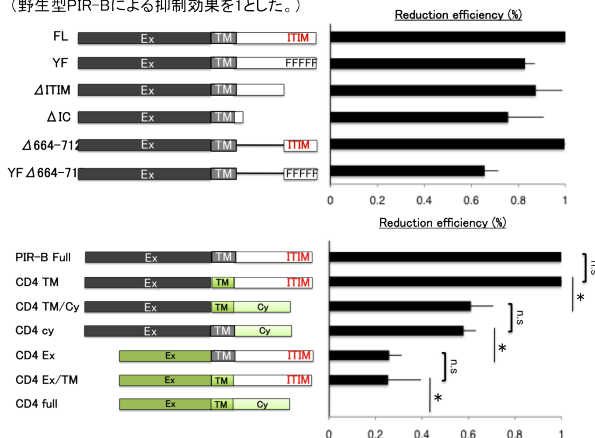
伝達について検証した。すると、野生型 IL-3-BMBs と比較して、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は PLC γ 2 のリン酸化が亢進していた。そして野生型 PIR-B を導入した PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は、亢進していた PLC γ 2 のリン酸化が抑制され、IL-4 産生における IL-3 不応答性を獲得した。同様に、PIR-B 欠損 BMBs は PLC γ インヒビターにより、IL-3 誘導性 IL-4 産生が顕著に抑制された。それらの結果は PLC γ 2 が IL-4 産生を誘導する IL-3 受容体シグナル分子であり、PIR-B が PLC γ 2 のリン酸化を抑制する事により、そのシグナルを負に制御しているという事を提案している。

D. 好塩基球における IL-3 誘導性 IL-4 産生は、PIR-B によって負に制御される

PIR-B 欠損 IL-3-BMBs における IL-3 受容体を介した異常な IL-4 産生は、PIR-B により制御されているかを調べる為に、レトロウイルスを用いて野生型 PIR-B を再導入した。その結果、empty vector を導入した PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は IL-3 刺激により IL-4 をするが、野生型 PIR-B を導入した PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は、IL-3 刺激による IL-4 産生が完全に抑制された。従って、野生型 IL-3-BMBs における IL-3 不応答性の獲得は PIR-B によって担われる事が明らかとなった。これまでに、PIR-B の抑制機序は、自身の細胞内に存在する Immuno-receptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) により担われている事が知られている。従って、PIR-B によって負に制御される好塩基球における IL-3 誘導性 IL-4 産生は、PIR-B の ITIM 依存的であるかどうかを調べるため、様々な PIR-B 変異体を PIR-B 欠損好塩基球に導入し IL-3 に対する応答性を検討した。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 誘導性 IL-4 産生が抑制された。結果として、PIR-B は ITIM 非依存的な抑制経路により、IL-3 誘導性 IL-4 産生を負に制御している事が明らかとなった。さらに PIR-B-ITIM 非依存的な抑制経路を調べる為に、細胞外、膜貫通領域、そして細胞内領域に変異を加えた mutant を作製し、レトロウイルスを用いて PIR-B 欠損 IL-3-BMBs へ導入し、IL-3 誘導性 IL-4 産生について検証した。細胞内を CD4 へ置換した PIR-B は、IL-3 誘導性 IL-4 産生を顕著に抑制した。この結果は、PIR-B-ITIM 非依存的な抑制効果と一致する。次に、PIR-B の膜貫通領域を CD4 に置換した PIR-B 変異体を PIR-B 欠損 IL-3-BMBs へ導入した所、野生型 PIR-B と同等の抑制効果が見られた。従って、PIR-B-ITIM 非依存的な抑制は PIR-B 膜貫通領域は関係ない事がわかった。そして PIR-B の細胞外ドメインを CD4 に置換した PIR-B を作製し、同様の実験を行った所、IL-3 誘導性 IL-4 産生における PIR-B による抑制

効果が消失した。従って PIR-B は細胞外部位を介して、ITIM 非依存的に IL-3 シグナルを抑制する事が明らかになった。

PIR-B欠損好塩基球へ変異体PIR-Bを再導入した時のサイトカイン産生の抑制効果(野生型PIR-Bによる抑制効果を1とした。)

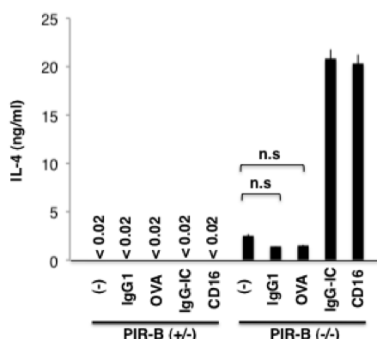


E. PIR-B による IL-4 産生制御は、IL-3 だけでなく IgG シグナルもターゲットとしている

IL-4 産生を誘導する IL-3 受容体シグナルは、FcRγ の Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)を介し、下流へシグナルを伝達する。同様に、IgE シグナルにおいても、FcRγ-ITAM を介しサイトカイン産生は誘導される。今回、我々は PIR-B は IgE シグナルは抑制しないが、IL-3 受容体シグナルを負に制御する事を見出した。一方、FcRγ dependent にシグナルを伝達する IgG1 受容体(CD16)も好塩基球に発現しており、さらに IL-4 産生を誘導する事が知られている。従って、IgG 誘導性 IL-4 産生における PIR-B 抑制の関与について検証した。

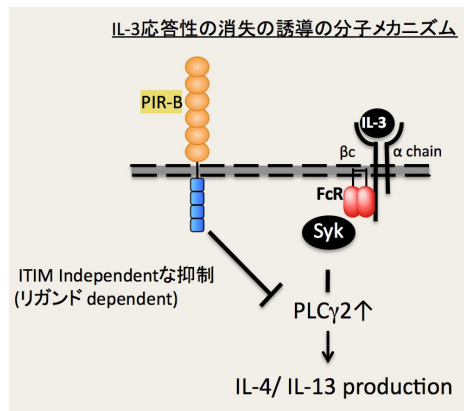
野生型マウスの骨髄から単離したばかりの好塩基球は、IgG に応答し弱いながら IL-4 を産生する事ができるが、一方で、IL-3-BMBs は IgG で刺激しても IL-4 を産生しない。さらに、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs は IgG 刺激に対し IL-4 を産生し続けた(下図)。これらの結果は、IL-3 シグナルと同様に、PIR-B は IgG 誘導性 IL-4 産生も負に制御する事を示唆している。

PIR-B欠損IL-3-BMBsにおけるIgG誘導性IL-4産生



FcRγ/PIR-B 二重欠損 IL-3-BMBs を用いた解析と、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs へ dominant negative の Syk をレトロウイルスを用いて導入した解析から、PIR-B 欠損 IL-3-BMBs の IgG に対する異常なサイトカイン産生もやはり、FcRγ-ITAM-Syk 経路を介して誘導されており、レトロウイルスを用いた野生型 PIR-B の再導入実験から、野生型 IL-3-BMBs における IgG に対する応答性は、PIR-B によって負に制御されている事が明らかとなった。

さらに、PIR-B ITIM 変異体においても、IL-3 と同様な抑制効果が見られ、PIR-B による IgG シグナル制御においても、ITIM 非依存的機序により担われていた。以上をまとめると、活性化好塩基球における IL-3/IgG 誘導性 IL-4 産生は PIR-B によって負に制御されている事。その IL-4 産生シグナルは FcRγ-Syk-PLC 2 経路により誘導されている事。そして、PIR-B による IL-4 産生はこれまでに知られていない ITIM 非依存的な作用機序により担われている事を本研究は明らかにした(下図)。



PIR-B は B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、顆粒球、マスト細胞など様々なリンパ球に発現し、ITAM 含有受容体シグナルを負に制御する事によって、免疫応答を制御している。PIR-B 細胞内ドメインである ITIM のチロシン残基がリン酸化されると、protein tyrosine phosphatase である SHP-1 と SHP-2 がリクルートされ、活性化シグナルが抑制される事が明らかになっている。しかし、今回我々は ITIM 非依存的に好塩基球のサイトカイン産生シグナルを負に制御するというこれまでに知られていない PIR-B の抑制機構の存在を明らかにした。

この抑制機構は同様の in vitro 培養系で誘導したマスト細胞には確認できず、好塩基球特異的な非常に興味深い現象である。さらに面白い現象として、IgG と IgE に対し、好塩基球は共に応答する事は知られているが、活性化状態によって応答性が区別されている事、さらに PIR-B が IgG 応答性を制御している事が今回明らかになった。今後は、この PIR-B による好塩基球の IL-4 産生制御の生理学的意義について研究を進められたら幸いである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C., and Goitsuka, R.: Perivascular mural cells in the postnatal spleen express homeodomain transcription factor Tlx1. 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3-6 日
2. Notsu, C., Oda, A., Nakahara, R. and Goitsuka, R.: Mesenchymal progenitor-like cells in the neonatal spleen identified by homeodomain transcription factor Tlx1. 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3-6 日
3. Oda, A., Notsu, C., Nakahara, R. and Goitsuka, R.: Developmental regulation of the splenic microenvironment by mesenchymal cells expressing homeodomain transcription factor Tlx1. 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3-6 日
4. Nakahara, R., Oda, A. and Notsu, C., and Goitsuka, R.: Homeodomain transcription factor Tlx1 marks a unique population of postnatal spleen mesenchymal cells. 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11-13 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

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

小田 朗永 (Akihisa Oda)
東京理科大学・生命医科学研究所・助教
研究者番号：80547703

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：