

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590578

研究課題名(和文)好塩基球のサイトカイン応答における正および負のシグナル伝達調節機構

研究課題名(英文)Positive and negative regulation of cytokine signals in basophils

研究代表者

灌 伸介 (TAKI, Shinsuke)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：50262027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：2型免疫応答に重要な好塩基球のIL-3レセプター cサブユニットの構造と細胞内シグナルの関係を検討した。c鎖細胞内構造については、生存/増殖シグナルとの関連でのみ明らかになっていたが、今回新たな実験系を用いて、サイトカイン産生誘導シグナルには重要であるが、細胞の生存/増殖には無関係なc鎖細胞内領域を見いだした。すなわち、Jak2キナーゼが結合するBox1領域を欠いた場合は両方のシグナルが失われたが、一方、Box2と呼ばれる領域やチロシン573を欠くc鎖ではIL-4産生シグナルの伝達のみが低下した。これは、これまで不明であったc鎖構造とエフェクター機能を結びつける重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Structure-function relationship in the beta-c subunit of the IL-3 receptor for the intracellular signals for IL-4 production was investigated. In the past, technical limitations made studies of the beta-c cytoplasmic structure confined to those for survival/growth signals. We here developed a new experimental system that enabled us to examine the roles of beta-c substructures for IL-4 production as well as for survival/growth in primary murine basophils. As previously shown, beta-c lacking the entire cytoplasmic region or the so-called box1 region, to which Jak2 kinase bound, failed to transduce IL-3 signals for survival/growth and IL-4 production. In contrast, beta-c mutants lacking the more distal box2 region or with Phe-to-Tyr substitution at position 573 could support basophil survival/growth normally but were inefficient in triggering IL-4 production. This study is the first to identify unique beta-c subregions important for the IL-3 signals for effector functions.

研究分野：免疫学

キーワード：サイトカイン 好塩基球 サイトカインレセプター 細胞内シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は今日特に先進諸国で、感染症の減少と逆相関の関係で増加の一途をたどり、その社会的な影響が大きな問題となっている。従って、アレルギー発症の機構を理解し、対症的ではない治療法を開発することは現代免疫学に課された一大課題である。様々なアレルギー疾患の発症には Th2 を中心とする 2 型免疫応答が深く関係していること、そして Th2 分化において Interleukin4 (IL-4) が必須の役割を果たすことはよく知られている。好塩基球は、アレルギー反応に深く関わっているエフェクター細胞としてのみならず、IL-4 を産生することによって、感染時などにおいて 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) 応答を制御する細胞として大きな注目を集め、その分化・発生、活性化、そして機能の制御機構に興味が集まっていた。しかしながら、好塩基球の活性化、機能発現に至る細胞内分子メカニズムについては、その末梢リンパ組織での低頻度もあり、十分な情報がなく、好塩基球はこの観点からは長くブラックボックスであり続けてきた。

一方で、好塩基球の増多もしくは応答性の亢進を示す変異マウスは、自発的な Th2 シフトが見られ (Hida 他, *Blood* 106: 2011-2017, 2005)、また全身性エリテマトーデス様自己免疫疾患を呈する (Charles 他, *Nat. Med.* 16: 701-707, 2010) などの重要な知見が蓄積しており、自己抗原を含む常在性の抗原や必ずしも強力な自然免疫応答を引き起こすことのないアレルゲンなどに対しては好塩基球の免疫調整能、おそらくその産生する Th2 誘導性サイトカイン (IL-4 および TSLP) を介した T 細胞分化制御機構の重要性が顕著になるものと考えられる。たとえばプロテアーゼアレルゲンであるパパインに対する Th2 応答では、樹状細胞 (DC) と好塩基球が協調的に働くこと、そして Th2 分化を直接誘導する IL-4 はあくまで好塩基球によって産生されることが示されている (Tang 他 *Nat. Immunol.* 11: 608-617, 2010)。従って、微妙な免疫制御機構のバランスの乱れが原因であり、強力な抗原に対する免疫応答に関する知見からは理解することが難しい自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症機構を理解するためには、好塩基球数のホメオスタシス制御、IL-3 などのサイトカインに対する応答の正および負の制御、アレルゲン応答機構の詳細な解明、中でも好塩基球が IgE の架橋や IL-3 に応答し IL-4 産生に至る細胞内シグナル伝達機構の理解はますますその重要性を増していると考えられていた。

申請者らは、Th1/2 バランスのホメオスタシス調整機構 (免疫応答時の誘導機構ではなく) の理解を目的に IL-3 に対する好塩基球の応答機構の研究を行ってきた。その過程で、マウス初代好塩基球の培養系、お

よびレトロウイルスを用いた培養好塩基球への遺伝子導入法を樹立し、好塩基球の IL-4 産生を誘導する IL-3 シグナルには、これまでいわゆる Immunoreceptor シグナルへの関与のみが知られていたアダプター分子 FcR $\gamma$  が、その Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) を介して Syk キナーゼを活性化することが必須であることなどを明らかにしてきた (Hida 他, *Nat. Immunol.* 10: 214-222, 2009)。特に IL-3 シグナルについては、これまで全く知られていなかった FcR $\gamma$  鎖を介するシグナル経路と IL-3 受容体 (IL-3R) シグナル経路の予想外のクロストークを発見し、シグナル伝達研究に新たな展開をもたらしてきた (Ivashkiv, *Nat. Immunol.* 10: 340-347, 2009)。初代培養好塩基球における遺伝子導入システムを確立し、IL-4 産生というエフェクター機能における新規 IL-3 シグナルを明らかにしたという点で先端的であった。

IL-3 の受容体 (IL-3R) は IL-3 に特異的な  $\alpha$  鎖 (IL-3R $\alpha$ ) と IL-5 受容体 (IL-5R) および GM-CSF 受容体と共通のサブユニット共通  $\beta$  鎖 ( $\beta$ c 鎖) からなる。このためこれら 3 つのサイトカインは  $\beta$ c サイトカインとも呼ばれる。マウス好塩基球の IL-3R は、 $\beta$ c に加えて IL-3 受容体のみ見いだされる  $\beta$ IL-3 鎖と IL-3R $\alpha$  鎖からも構成される。本研究の当初の目的の 1 つは、IL-3 の増殖・生存誘導シグナルとエフェクター機能である IL-4 産生を誘導するシグナルの伝達経路がどこで、どのように分岐するのか、そしてどのように制御されているのかを、IL-3 受容体、特にそのシグナル伝達サブユニットである  $\beta$ c 鎖の構造との関連において明らかにすることであった。しかしながら、初代培養好塩基球はその樹立・維持のために IL-3 を必要とし、そのため IL-3 シグナルに影響を与える受容体の変異は好塩基球の樹立・維持自体にも影響する可能性があり、IL-3 のエフェクター機能 (ここでは IL-4 産生) 誘導シグナルのみを検討する実験系としては不適であった。これまでに行われてきた  $\beta$ c 鎖を介した増殖シグナル伝達機構の研究においては、たとえば IL-2 依存性培養細胞株を IL-2 によってその増殖、生存を維持しつつ、 $\beta$ c サイトカイン  $\alpha$  鎖と  $\beta$ c 鎖 (および各種変異体) を導入し、IL-2 不在下での  $\beta$ c サイトカインの細胞生存・増殖シグナル伝達を検討してきた。しかし、われわれの研究の対象となるのは、好塩基球における IL-4 産生シグナルであり、好塩基球以外の細胞株を用い、さらにその細胞が本来持っていたであろうエフェクター機能を失った長期間維持継代細胞株を用いる方法を採用することは出来ない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、従って、IL-3の好塩基球増殖・生存シグナルに影響を与えることなく、 $\beta c$ 鎖の構造と、好塩基球のエフェクター機能、すなわち IL-4 産生を誘導するシグナル伝達機構の関係を解明することを可能にする実験系の開発であり、それを用いて、 $\beta c$ 鎖のどの細胞内構造が、好塩基球の生存シグナルおよび IL-4 産生シグナルに関与しているのか、果たしてこれら2つのシグナルを伝達する  $\beta c$ 鎖の構造は共通なのか、それぞれのシグナルにユニークな細胞内構造が存在するのか、を明らかにしようとするものであった。

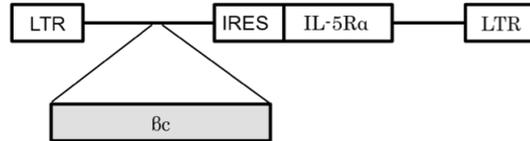
### 3. 研究の方法

予備的検討において行った以下の観察の基づいて好塩基球の IL-4 産生誘導シグナルを検討できる実験系を樹立する。1)マウス好塩基球は IL-5R $\alpha$ 鎖を発現しておらず IL-5 に応答しない、2)マウス好塩基球に IL-5R $\alpha$ 鎖を導入すると、内因性の  $\beta c$ 鎖と会合して機能的な IL-5R が構成され、IL-5 に応答して IL-4 を産生するようになる、3)マウスにおいては IL-3R に特異的な  $\beta$ IL-3 鎖が存在するため機能的な IL-3R が構成される。従って、 $\beta c$ 欠損マウス(熊本大学・西中村教授より恵与された)骨髄からでも IL-3 を用いて培養好塩基球が樹立出来、またこの好塩基球を IL-3 で刺激することによって IL-4 産生が誘導できる、4)IL-3R $\alpha$ と  $\beta$ IL-3 からなる IL-3R による IL-3 シグナルを介して培養した  $\beta c$ 欠損好塩基球に IL-5R $\alpha$ 鎖と野生型  $\beta c$ 鎖を同時に導入することによって IL-5 刺激に応じて IL-4 が産生される。以上のことから、 $\beta c$ 変異体を IL-5R $\alpha$ 鎖と同時に導入することによって、初代培養好塩基球を用いて  $\beta c$ 構造と IL-4 産生に至る下流シグナルの関連を明らかにすることが可能であることが期待された(表参照)。遺伝子導入法はすでに確立したものを用いた(Hida 他 2009 上記)。

培養好塩基球	導入遺伝子	IL-4 産生		生存	
		IL-3 刺激	IL-5 刺激	IL-3 刺激	IL-5 刺激
野生型	(-)	○	×	○	×
	IL-5R $\alpha$	○	○	○	○
$\beta c$ 欠損	(-)	○	×	○	×
	IL-5R $\alpha$	○	×	○	×
	野生型 $\beta c$	○	×	○	×
	IL-5R $\alpha$ +野生型 $\beta c$	○	○	○	○
	IL-5R $\alpha$ +変異 $\beta c$	○	○	○	○

この目的のために、次図のような IL-5R $\alpha$ および  $\beta c$  を bicistronic に発現するレトロ

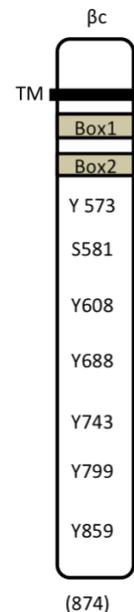
ウイルスベクターを構築し、まず、IL-5R $\alpha$ /野生型  $\beta c$  鎖を導入した好塩基球における IL-4 産生誘導が、野生型好塩基球と同一のシグナル経路 (FcR $\gamma$ -Syk 経路) を介して行われていることを検討した。この検討を行った後に、各種変異  $\beta c$  鎖を IL-5R $\alpha$ とともに  $\beta c$  欠損好塩基球に導入し、IL-5 応答、すなわち IL-5 刺激時の IL-4 産生および好塩基球の生存(細胞のサイズ、細胞数、サイトカイン deprivation 時のアポトーシス、CD69 の発現) を検討した。



### 4. 研究成果

1) 実験系の検討: まず、遺伝子導入した IL-5R $\alpha$  と内因性  $\beta c$  とおよび  $\beta$ IL-3 で構成される IL-5R を介するシグナルが、IL-3R を介するシグナルと同じシグナル伝達経路を通じて伝達されるか否かを検討した。この目的のために、FcR $\gamma$  欠損マウスより好塩基球を培養し、IL-5R $\alpha$  を導入した。既報(Hida 他 2009、上記)通り FcR $\gamma$  欠損好塩基球では IL-3 刺激によって IL-4 は産生されなかった。一方、IL-5 刺激によってはわずかな IL-4 産生が見られたが、その程度は野生型好塩基球に IL-5R $\alpha$  を導入した場合の 50%以下であり、再構成された IL-5R による IL-4 産生誘導にも FcR $\gamma$  が関与している事が明らかである。ただ、減少はしているものの IL-4 産生が観察されたということは、外的に導入された IL-5R $\alpha$  と内因性の  $\beta c$  鎖で再構成された IL-5R は FcR $\gamma$  非依存的な経路を活性化するという可能性を示唆しているのかも知れない。さらに野生型好塩基球に IL-5R $\alpha$  とドミナントネガティブ型 Syk を導入して検討したところ、やはり既報通り IL-3 刺激による IL-4 産生はまったく見られなかった。従って、再構成 IL-5R によるシグナルもまた Syk の活性化に依存していることが確認された。この場合でも IL-5 依存的な生存は DN-Syk の同時導入によっても阻害されず、 $\beta c$  鎖を介した生存シグナル伝達は Syk に非依存的であることが確認出来た。

2) 細胞質内領域変異  $\beta c$  の検討:  $\beta c$  欠損マウス由来好塩基球に IL-5R $\alpha$  とともに各種変異  $\beta c$  を導入して  $\beta c$  構造と IL-4 誘導シグナルの相関を兼用した。右図はマウス  $\beta c$  の模式図である。マウス  $\beta c$  は 874 アミノ酸からなる 1 型の膜タンパク質である。図の



TMの部分で細胞膜を貫通している。まず、細胞質内部分のほとんどすべて(アミノ酸449番以下)を欠損した $\beta$ c鎖( $\beta$ c448)をIL-5R $\alpha$ とともに $\beta$ c欠損好塩基球に導入したところ、IL-5による生存は全く見られず、さらにIL-4もまったく産生されなかった。FcR $\gamma$ は膜貫通領域で $\beta$ c鎖と会合していると考えられているが、FcR $\gamma$ と $\beta$ c膜貫通部分の会合だけではIL-4産生を誘導するには不十分であって、サイトカイン刺激に伴う $\beta$ c鎖細胞内領域をプラットフォームとして起こるイベントが(おそらくFcR $\gamma$ -ITAMのリン酸化に)必要であることを示している。

$\beta$ cを介する生存/増殖シグナルにはJak2が必須であることが明らかとなっているが、その活性化には $\beta$ c鎖のbox1領域に結合することが必須である。実際、box1を含む領域のみを欠く変異 $\beta$ c鎖( $\beta$ c $\Delta$ 455-463)はIL-5によって好塩基球の生存を全く支持できなかつた。従って、Jak2は好塩基球の生存/増殖に必須であるばかりでなく、IL-4産生誘導にも極めて重要であることが分かった。Jak2がどのようにしてIL-4遺伝子発現に至るFcR $\gamma$ -ITAM-Syk経路を活性化するのかに興味を持たれる。

Jak2の活性化はStat5の活性化を誘導し、様々な遺伝子発現へとつながる事が良く知られている。 $\beta$ cを介したStat5の活性化には、細胞質内遠位チロシン(Y608、743、799、859)が重要であり、これらすべてを含む領域を欠く変異 $\beta$ c鎖はStat5を活性化出来ないことが知られている。ところが、586番目のアミノ酸以下を欠損し、従ってこれらすべてのチロシンを欠く $\beta$ c585は野生型 $\beta$ cとほとんど同程度にIL-4産生を誘導できた。すなわち、Stat5はIL-4産生の誘導に関与していないと考えられた。

N末端からbox1までを含み、以下を欠く $\beta$ c477変異体では、IL-4産生が野生型に比べ~10%まで低下する。上記 $\beta$ c585の結果と合わせると、478番目から585番目のアミノ酸配列にIL-4産生誘導に重要なエレメントが存在することが示唆された。この領域には、box2と呼ばれる配列(10アミノ酸、515-524番目)およびチロシン573が含まれている。box2は、多くのサイトカイン受容体で比較的保存されている配列であり、 $\beta$ cを介した生存シグナルへの関与が示唆されている。一方、Y573についてはその欠損によって生存/増殖シグナル伝達が非効率になることが報告されている。最も膜近位の細胞質内チロシン(Y573)を含まない欠失変異体( $\beta$ c541)、Y573をフェニルアラニンに置換した $\beta$ cY573F、そしてbox2のみを欠く $\beta$ c $\Delta$ 515-527変異体ではいずれもIL-4産生が~30%まで低下した。これまでの報告どおり、Y573F変異体では、好塩基球の増殖もまたわずかではあるが低

下していた。これに対して、 $\beta$ c $\Delta$ 515-527変異は好塩基球の増殖にはほとんど影響がなかった。このことは、box2を介したシグナルは、IL-4産生誘導にユニークなものであり、生存/増殖シグナルには無関係であることを示唆する。

以上の様に、今回新たに開発した好塩基球のIL-4産生誘導シグナルを $\beta$ c鎖の構造との関係において検討することを可能にするシステムによって、IL-4産生誘導にもJak2が必須であること、Stat5の活性化は関与しないこと、これまでの生存/増殖を対象にした研究ではその機能が不明であったbox2領域が、IL-4産生誘導シグナルに特異的に関与していること、などを明らかに出来た。本研究の成果を踏まえて、さらにIL-4産生誘導シグナルの本体の解明を続け、最終的には好塩基球の生存/増殖には影響を与えずIL-4産生のみを特異的に抑制できれば、アレルギー疾患の治療への貢献が期待される。

#### 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 4 件)

①Sanjo H, Tokumaru S, Akira S, Taki S, Conditional deletion of TAK1 in T cells reveals a pivotal role of TCR $\alpha$  $\beta$ <sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes in preventing lymphopenia-associated colitis. Plos One、印刷中、査読有  
<http://www.plosone.org/>

②瀧伸介、IL-15 とNK 細胞の発生・分化・ホメオスタシス、臨床免疫・アレルギー科 59巻、140-146、2013、査読無  
<http://www.kahyo.com/brand/b-M201301-591>

③Minamoto K, Takahara K, Adachi T, Nagaoka K, Iyoda T, Taki S, Inaba K. IRF-2 regulates B cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms. Int Immunol. 24:573-581,2012、査読有  
DOI: 10.1093/intimm/dxs060

④Notake T, Horisawa S, Sanjo H, Miyagawa S, Hida S, Taki S, Differential requirements for IFN regulatory factor-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors, J. Immunol. 188:4838-4845, 2012, 査読有  
DOI:10.4049/jimmunol.1200210

[学会発表](計 1 件)

①Sanjo H, Tokumaru S, Akira S, Taki S, Disease control of spontaneous colitis

in LTAC mice, a unique inflammatory disease model、第 41 回日本免疫学会学術集会、2014.12.12、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧 伸介 (TAKI, Shinsuke)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：50262027

(2) 分担研究者

なし

(3) 連携研究者

肥田 重明 (HIDA, Shigeaki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：10345762

山条 秀樹 (SANJO, Hideki)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：50391967