

好塩基球のアレルゲン刺激受容と 2型ヘルパーT細胞誘導機構の分子的基礎

信州大学大学院 医学系研究科
移植免疫感染症学講座 免疫制御学分野
瀧 伸介

1. はじめに

本研究の目的は、アレルギー疾患の発症と密接に関係する2型ヘルパーT (Th2) 細胞応答の初期過程に重要な役割を果たす細胞として最近その再認識が進んでいる好塩基球に焦点を絞り、その機能発現、特に Th2誘導に至るメカニズムを解明し、さらにその人為的制御法のための標的分子を見いだすことによって、アレルギー疾患の理解を深化させるとともに、同疾患の初期過程を制御することによる斬新な治療法へ向けた指針を得ることにある。具体的には、1) これまで完全にブラックボックスであった好塩基球の細胞内シグナル伝達経路、特に Th2サイトカイン、インターロイキン (IL) -4の産生に至る細胞内シグナル伝達経路およびその制御機構の理解、2) 好塩基球がアレルゲンを感知する未知の「センサー」分子の同定およびそのシグナル伝達機構の解明、を目指した。

アレルゲンは、通常の抗原と同様に抗原提示細胞に取り込まれ CD4⁺T 細胞に提示されることによって、2型ヘルパーT (Th) 細胞を誘導しアレルギー反応を開始すると一般に考えられてきた。しかしながら、このようなとらえ方ではアレルゲンがなぜ Th1や Th17ではなく Th2を誘導するのか、という疑問には答えられなかった。特に重要なのは Sokol ら (Nat Immunol, 9:310, 2008) の報告であり、彼女らはモデル・アレルゲンとして食物アレルゲンであるパパインを用いて、このアレルゲンがプロテアーゼ活性依存的に好塩基球を直接刺激し、IL-4を産生させるだけでなく抗原提示能をも活性化することを明らかにした。すなわちマウス好塩基球がアレルゲン「センサー」を発現しており、これが Th1応答における樹状細胞の pathogen receptors (Toll 様受容体や NOD 様受容体など) に相当するものであり、サイトカイン産生と抗原提示機構の両方を活性化するという極めて興味深いモデルを提唱している。にもかかわらず、マウス好塩基球の活性化、機能発現に至る細胞内分子メカニズムについては、申請者らの研究 (Hida ら、2009、参考文献参照) を除いては十分な情報がなく、好塩基球はシグナル伝達の観点からは未だにブラックボックスであると言わざるを得なかった。

2. 方法

骨髓もしくは脾臓より単離した直後の好塩基球は非活性化状態 (CD69⁻) であり、非感染状態では好塩基球はIgEの架橋には反応しないように制御されている。一方、骨髓細胞をIL-3存在下で培養した好塩基球は活性化状態にあり (CD69⁺)、FcεRI架橋には反応してIL-4を産生する。ところが、引き続きIL-3不在下で12時間以上培養した“starved”好塩基球は休止状態に戻っており (CD69⁻)、FcεRI架橋に対する反応性を失っていることが明らかになっている (未発表)。そこで、休止期および活性化好塩基球からmRNAを調製し、マイクロアレイ解析を行い遺伝子発現パターンの包括的な解

析を行い、いずれかの状態の好塩基球に特異的に発現している遺伝子、および発現量が活性化状態に応じて変化する遺伝子を同定した。IL-3 starvationによって、当然培養好塩基球にはapoptosisが誘導されるため、apoptosis関連遺伝子の発現変化が起きることが予想される。これらの遺伝子の影響を排除するために、抗apoptosis因子であるBcl-X_Lをレトロウイルスを用いて強制発現させた好塩基球を準備し、同様な網羅的解析を行った。同定された遺伝子からいくつかを選択し、RT-PCR法によって発現の変化を確認し、さらに好塩基球に強制発現させることでstarvationに伴うFcεRI架橋シグナルへの応答性の低下が補償できるか否かを指標に機能的な検討を行った。

パパインセンサーのIL-4産生シグナル伝達には、ITAM含有アダプターであるFcRγが必要であることが分かっている（未発表）。そこで、他のFcRγの関与が知られているIL-4産生誘導シグナル伝多雨経路と同様に、パパイン刺激の際にもFcRγ分子のITAMが機能しているか、その下流シグナル分子であるキナーゼSykが関与しているかをITAMを欠くFcRγをFcRγ欠損好塩基球に導入すること、ならびに野生型好塩基球にドミナントネガティブSykを強制発現させることで検討した。また、

3. 結果 研究成果

starvationに伴うFcεRI架橋刺激応答性は、数時間の半減期で減弱する。このキネティクスは、IL-3存在下でシクロヘキシミドを加えた時の半減期とほぼ同等であった。このことは、何らかの遺伝子の発現の低下がFcεRI架橋に対する反応性の低下の原因であることを示唆している。一方、Bcl-XLの強制発現は、確かに培養好塩基球のstarvationに伴うapoptosisを阻害した。このことは、生細胞数の減少の抑制およびAnnexin-Vで染色される好塩基球数の低下(コントロールベクター:60%、Bcl-XL発現ベクター:10%)によって明らかである。しかしながら、Bcl-XLを導入した好塩基球においても、starvationによるFcεRI架橋に対する反応の低下が非導入好塩基球におけると同様に見られた。従って、starvationに伴うFcεRI架橋に対する反応性の低下はアポトーシスとは無関係であることが明らかとなった。Bcl-XLを導入した好塩基球をIL-3存在下で培養したもの、およびstarvationしたもからそれぞれRNAを調製し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、40弱の遺伝子の発現の上昇(>4倍)、200以上の遺伝子の発現の低下(<1/4倍)が見られた。発現上昇の見られた遺伝子の中には、予想通りBcl-6、Bimなどアポトーシスに関係した遺伝子が含まれていた。一方、低下が見られる遺伝子には、細胞内シグナル伝達に関係する受容体、酵素、転写因子が含まれ、現在、そのいくつかについて発現変化の確認(RT-PCRによる)、強制発現によるFcεRI架橋に対する反応性のmodulationについて検討を加えているが、現在の所、反応性を制御する分子の同定には至っていない。

一方、パパインセンサーのシグナル伝達について、FcRγ欠損マウス由来好塩基球にITAMを欠く変異FcRγを導入した場合には、野生型FcRγを導入した場合のようなパパイン反応性の回復が見られず、また野生型好塩基球にドミナントネガティブ型変異Sykを導入した場合にはパパイン反応性が低下したことから、確かにパパインセンサーのシグナル伝達にはITAM-Syk経路が関与していることが明らかとなった。好塩基球の発現するFcRγ-associated receptorには様々なものがあると考えられるが、そのうちFcεRIのパパインセンサーとしての機能を検討した。FcεRIβ鎖を欠損するマウス(日本大学・羅教授との共同研究)由来の好塩基球はFcεRIを細胞表面に発現できない。この好塩基球のパパイン応答性は、野生型好塩基球と比較して約50%に低下していることが見いだされた。従って、FcεRIはパパインセンサーとしての機能を持つが、FcεRI以外の分子もまたパパインセンサーとして機能していること、すなわち好塩基球

は複数のセンサーを用いてプロテアーゼアレルゲンの情報を感知していることが明らかとなった。

4. 考察 まとめ

以上の結果から、以下のことが示唆された。

好塩基球は、resting 状態ではFcεRI架橋に反応しないが、同じくFcRγをアダプターとして用いるIL-3受容体を介する刺激には応答する。このことは、ナイーブなマウスがIgE+抗原で誘導されるアナフィラキシーに反応しないこと、好塩基球は、寄生虫の感染やメモリーB細胞応答などの2次応答の際に重要であり、primary responsesにはそれほど関与していないこと、などすでに知られている現象のメカニスティックな基礎が、好塩基球の活性化状態による応答性の制御機構によって説明できるのではないかと考えられる。またLynキナーゼを欠損して、FcεRI反応性が亢進した好塩基球は全身性ループス様の疾患を発症することが報告されている。この研究で検討している活性化状態に応じたFcεRI反応性の制御機構が明らかになれば、好塩基球の関与する免疫応答、免疫疾患の理解が進むものと期待される。この研究の結果、いくつかのFcεRIシグナル制御の候補分子が見出され、その機能的な検討を進めているが、それらの分子が、やはりFcRγを介するにもかかわらずFcεRIシグナルとは異なる制御下にあるIL-3シグナルに対して何らかの作用を持っているのかどうかにも興味を持たれる。また、プロテアーゼアレルゲンであるパピインの刺激受容機構に関して、ITAM-Syk経路が重要であること、FcεRIがパピインセンサーとして機能しうるが、唯一のセンサーではないことが明らかになった。やはりTh2応答を誘導するSchistosoma卵成分IPSE-alphaはFcεRIを介して好塩基球にIL-4産生を誘導することが知られているが、この場合IPSE-alphaはFcεRI自体ではなく、そこに結合したIgEに抗原非特異的に作用している。これに対して、培養好塩基球ではおそらくFcεRIに結合したIgEは失われているものと考えられるため、パピインの好塩基球刺激機構はIgEではなくFcεRI自体に向けられたものであり、IPSE-alpha のそれとは異なると予想される。

5. 発表論文、参考文献

Hida, S., Yamasaki, S., Sakamoto, Y., Takamoto, M., Obata, K., Takai, T., Karasuyama, H., Sugane, K., Saito, T. and Taki, S., Fc receptor γ-chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils. *Nature Immunol.*10:214-222, 2009.

肥田重明、瀧伸介:Th2 分化と好塩基球. 実験医学、28:1879-1884, 2010