

Bリンパ球のホメオスターシスと活性化の制御機構の研究

Investigation of regulatory mechanisms for homeostasis and activation of lymphocyte

高津 聖志 (Takatsu Kiyoshi)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授



研究の概要

Bリンパ球のホメオスターシスと活性化の動態を制御する IL-5 と Lnk アダプターファミリー分子に焦点をあて、B-1 細胞の恒常性維持や B-2 細胞の IgH クラススイッチ組み換え、造血幹細胞増殖の制御にどのように関わるか明らかにし、Tリンパ球の分化との関係を分子レベルで明らかにする。

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：自然免疫、IL-5、Lnk、クラススイッチ組み換え、Th1 と Th2

1. 研究開始当初の背景

Bリンパ球の発生と成熟、IgH 遺伝子のクラススイッチ組み換え (CSR) 機構が明らかとなり、B細胞系列への分化の決定に Pax5 が重要であり、AID が CSR と抗体の可変部領域への変異導入に必須であることが示されている。しかし、Bリンパ球のホメオスターシスや活性化の制御と IL-5 や Lnk の関与に焦点をあわせた研究は少ない。Th1 細胞と B細胞の分化に T-bet がいかなる役割を果たすか不明の点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、Bリンパ球のホメオスターシスと活性化の制御機構を多面的に明らかにすることを目的とした。とりわけ、自然免疫に関与する B-1 細胞の前駆細胞と成熟 B-1 細胞の増殖と分化、獲得免疫に重要な B-2 細胞の CSR と分化の制御における IL-5 と Lnk の役割、造血幹細胞の負の制御機構、免疫応答の質の決定に関与する Tリンパ球の分化制御経路を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

マウス Bリンパ球のホメオスターシス制御に関し、IL-5 による Lnk アダプター分子の役割を明らかにするために、試験管内培養を中心とした研究、Ag85B とそのペプチド (P25) を認識する TCR の過剰発現マウスや Lnk ファミリー分子に対する遺伝子改変マウスを作成し利用した。研究を迅速かつ効率よく推進するため、炭酸ガス細胞培養装置、遺伝子を増幅するサーマルサイクラー、超純水製造装置を購入した。

4. 研究の主な成果

(1) IL-5 による Bリンパ球ホメオスターシス制御：1) マウス胎児肝の細胞系列陰性細胞を濃縮し、培養系により胎児リンパ球前駆細胞の B細胞への分化に必須のサイトカインを同定した。Btk の下流でマウス前 B細胞から前駆 B細胞への分化を促進する遺伝子を単離しその役割を明らかにした。2) マウス骨髄中の B-1 前駆細胞 (CD19⁺ B220⁻ 細胞) が IL-5 受容体α鎖を発現し IL-5 に応答し増殖すること、IL-5 は成熟 B-1 細胞の生存やホメオスターシス、粘膜リンパ固有層での IgA 産生に必須であることを初めて示した。3) IL-5 は CD38 刺激 B-2 細胞に作用し AID の発現亢進と IgG1 への CSR を惹起し、Blimp-1 の発現亢進と IgG1 産生を促進することを見出した。

4) 8-メルカプトグアノシン (8-SGuo) は BCR や CD38 で活性化された B-2 細胞に作用し AID の発現と DNA の二重鎖切断を惹起し、IL-4 共刺激により μ鎖から γ1鎖への CSR と IgG1 産生を惹起した。8-SGuo による AID の発現誘導は TLR7 および MyD88 に依存することを示した。

(2) Lnk ファミリー分子による Bリンパ球ホメオスターシスと活性化制御：1) Lnk 遺伝子欠損マウスを解析し、Lnk が B細胞の初期分化を抑制すること、Lnk 欠損によって造血幹細胞が著増するのみならず、個々の幹細胞の造血能が亢進することを明らかにした。2) Lnk の SH2 領域の点変異、PH ドメイン欠損、C末端領域欠損を組み合わせた変異体は野生型 Lnk の作用を阻害するドミナントネガティブ変異体 (DN-Lnk) として機能することを示した。3) Lnk は c-Kit シグナルを制御するのみならず、トロンボポイエチン受容体

c-Mpl のシグナル系、アクチン細胞骨格を制御することを示した。4) Lnk 欠損巨核球系細胞は c-Mpl 依存性反応の亢進と重合アクチン量の低下を示し、Lnk 欠損血小板はフィブリノーゲン上で野生型血小板のようなラミリポディア優位な形態を示さず、フィロポディア優位な形態を示すことが分かった。

(3) T リンパ球のホメオスターシス制御:

1) 結核菌が分泌する Ag85B やそのポリペプチド (P25) は I-A^b 拘束性に TCRVβ11⁺ Th1 細胞の応答を選択的に惹起した。2) P25 特異的な TCR を過剰発現させたマウス (P25 TCR-Tg) の未熟 CD4⁺ T 細胞を副刺激やサイトカインを提供しない I-A^b 発現細胞 (I-A^b-CHO) と P25 で共刺激しても、Th1 細胞が選択的に誘導されることを見出した。P25 刺激で Th1 特異的転写因子 T-bet の発現が二相性に亢進し、Th2 特異的 GATA-3 の発現低下を認めた。3) Th1 細胞への分化誘導に必須である T-bet を欠損した P25 TCR-Tg マウスを作成し、その CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞と P25 で刺激しても有意な Th1 細胞が誘導されること、そのレベルは野生型細胞のそれよりも低いことを見出した。Th1 の誘導に T-bet に依存する経路と依存しない経路が存在することが初めて示された。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

B 細胞のホメオスターシスに関して IL-5 による制御、アダプター分子による制御の両面から解析し、IL-5 が B 細胞のホメオスターシスの維持および IgH クラススイッチ組み換えにユニークかつきわめて重要であること、Lnk が B 細胞分化や造血幹細胞増殖に抑制的に作用することを初めて見出した。また、結核菌由来の TCR ペプチド (P25) と MHC class II の相互作用により Th1 や Th2 細胞への分化が決定されることを明らかにした。ここで得られた成果は、独創性と質の高い論文として国内のみならず世界をリードするものと考え、免疫学、血液学、炎症学を一つに融合させるような大きなインパクトを持つものと高く発表されている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

Takatsu K, Kouuro T, Nagai Y. Role of IL-5 in the Immune response to inflammation. *Adv. Immunol.*, 101: 191-236, 2009.

Tsukamoto Y, Nagai Y, Kariyone A, Shibata T, Kaisho T, Akira S, Miyake K, **Takatsu K**. Toll-like receptor 7 cooperates with IL-4 in activated B cells through antigen receptor or CD38 and induces class switch

recombination and IgG1 production. *Mol. Immunol.*, 46: 1278-1288, 2009

Wolf, AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, ***Takatsu K**, *Ernst JD. Initiation of the adaptive immune response to *M. tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.*, 205: 105-115, 2008.

Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr. Opin. Immunol.*, 20: 288-295, 2008.

Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Tanaka R, T. Kouuro T, Kano MR, Miyazono K, Miyazaki J, **Takatsu K**, Yamamoto K. IL-5-induced eosinophils can suppress the antigen-induced immune response via a TGF-β-dependent mechanism. *J. Immunol.* 179: 284-294, 2007.

Ariga H, Shimohakamada Y, Tokunaga T, Kikuchi T, Nakada M, Kariyone A, Tamura T, **Takatsu K**. Instruction of CD4⁺ T cell fate to T-bet expression and Th1 development by Th1-inducing peptide: roles of T cell receptor-mediated signals. *Immunology*, 122: 210-221, 2007.

Horikawa K, **Takatsu K**. Interleukin-5 regulates genes involved in B cell terminal maturation. *Immunology*, 118: 497-508, 2006.

Takizawa H, Kubo-Akashi C, Nobuhisa I, Kwon S-M, Iseki M, Taga T, **Takatsu K**, Takaki S. Enhanced engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells by the transient inhibition of an adaptor protein, Lnk. *Blood*, 107: 2968-2975, 2006.

Tamura T, Ariga H, Kinashi T, Uehara S, Kikuchi T, Nakada M, Tokunaga T, Kariyone A, Saito T, Kitamura T, Maxwell G, Takaki S, **Takatsu K**. The role of antigenic peptide in CD4⁺ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int. Immunol.*, 15: 1691-1699, 2004.

Moon B. -G., Takaki S, Miyake K, **Takatsu K**. J. Immunol., The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J. Immunol.*, 172: 6020-6029, 2004.