

論文の内容の要旨

論文課題 IL-5/IL-5R system for proliferation, differentiation and maintenance of B cells

和訳 IL-5/IL-5R 系による B 細胞の増殖・分化・維持機構について

指導教官 高津聖志 教授

東京大学大学院医学系研究科

1998 年 4 月 入(進)学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 文 炳坤

【目的】主に Th2 細胞や肥満細胞により分泌されるインターロイキン 5 (IL-5) は、好酸球の増殖、生存、分化を促進するとともに B 細胞の増殖や IgM、IgA などの自然抗体の産生を促進する。また、IL-5 は好塩基球に作用し、炎症性メディエーターの放出を促進する。

B 細胞は B-1 と B-2、2つの亜集団に分類できる。表面に IgM を高レベルに発現し、B-2 細胞には見られない Mac-1 や CD5 を発現する B-1 細胞は、主に腹腔や腸管にて種々の細菌やウイルス抗原との反応を通じて自然抗体を産生し、原始免疫による生体防御機構の一翼を担っている。B-1 細胞の増殖および活性化は様々なサイトカインにより制御される。IL-5 トランスジェニック (TG) マウスで B-1 細胞が増加していること、IL-5 受容体 (IL-5R) α 鎖欠損 (5R $\alpha^{-/-}$) マウスにおいて、腹腔内 B-1 細胞数の減少と細胞径の縮小、腸管粘膜リンパ固有層での粘膜局所の IgA 産生細胞数の減少が顕著であることなどから、IL-5 が B-1 細胞の増殖や抗体産生を促進し、原始免疫、粘膜免疫における重要な制御因子の一つであることが示唆されている。しかし、IL-5 による B-1 細胞の生存維持、活性化の機構、生体内とりわけ粘膜免疫活性化における意義についてはまだ不明な点が多い。

IL-5R は、IL-5 に特有な α 鎖と IL-3R や GM-CSFR に共通な βc 鎖より構成され、シグナル伝達には α 鎖、 βc 鎖、両鎖の細胞内領域が必須である。 βc 鎖の細胞内機能部位に関する解析は幅広く進んできたが、IL-5R α 鎖の細胞内機能部位については不明な点が多い。

共同研究者の Takaki、Takatsu らは、様々な変異型マウス IL-5R α 鎖を FDC-P1 に移入した *in vitro* 実験系で IL-5R α 鎖の細胞膜直下に存在するプロリン残基に富む領域 (ppvp motif) が、IL-5 による増殖シグナルの伝達に必須であることを明らかにした。これに対し IL-5R α 鎖に特有な C 末端領域は、増殖シグナルの伝達には必須ではないものの、分化シグナルの伝達に重要な働きを持つ可能性が示された。Shiiba らは IL-5R α 鎖の細胞内領域を IL-3 受容体 α 鎖の細胞外領域と連結したキメラ受容体をマウス慢性 B 白血病細胞株 BCL1-P20 に発現させ、IL-3 反応性を調べた。このトランスフェクタントは、IL-3 刺激により IgM 産生細胞へと分化するようになる。このキメラ受容体より、C 末端側の領域を欠失させると抗体産生細胞への分化が誘導されなくなった。これらの研究は株化細胞を用いた研究なので、IL-5R α 鎖の C 末端領域の B 細胞分化における生体内での役割は不明である。

本研究は、キメラ受容体を用いて示唆された、IL-5 依存性の細胞増殖と分化のシグナル伝達系が IL-5R α 鎖の異なる細胞内領域に依存している可能性について、より生理的な条件下に検討することを目的とした。また、腹腔内 B-1 細胞の恒常性維持における IL-5/IL-5R 系の役割、腹腔や腸管において IL-5 を産生供給する細胞群を同定することも研究目的とした。

【方法と結果】野生型 IL-5R α 鎖 (WT)、細胞内 C 末端領域の 6 アミノ酸を欠失した α 鎖 (DC3)、およびプロリンに富む領域に変異を持つ α 鎖 (ApvA) を B 細胞で発現する TG マウスを作製し、これらの TG マウスを 5R $\alpha^{-/-}$ マウスと交配して全ての B 細胞が導入遺伝子由来の α 鎖のみを発現するマウス (TG-5R $\alpha^{-/-}$) を得て脾臓および腹腔内 B 細胞を解析した。Takatsu らはマウス脾臓 B 細胞の増殖反応および IgM 産生反応にて、IL-5 は抗 CD38 抗体 (CS/2) と相乗的に作用し、さらに各々の単独刺激では誘導されない IgG1 が産生されることを報告している。この実験系を用いて脾臓 B 細胞の IL-5 依存性の細胞増殖、分化反応を解析した。DC3-5R $\alpha^{-/-}$ の脾臓 B 細胞は WT-5R $\alpha^{-/-}$ の B 細胞と同じように CS/2 と IL-5 の供刺激に反応して増殖し、IgM 産生細胞へと分化した。しかし DC3-5R $\alpha^{-/-}$ B 細胞の IL-5 依存性の IgG1 の産生および μ - γ 1 クラス変換の組み換え頻度は、WT-5R $\alpha^{-/-}$ B 細胞の 1/3 程度しか起らなかった。ApvA-5R $\alpha^{-/-}$ B 細胞は 5R

$\alpha^{-/-}$ B細胞と同様 IL-5 に全く反応しなかった。

5R $\alpha^{-/-}$ マウスで見られた腹腔内 B-1 細胞の減少や細胞径の縮小が、DC3-5R $\alpha^{-/-}$ マウスではやや回復したが、ApvA-5R $\alpha^{-/-}$ マウスでは全く回復しなかった。

これらの結果から、B 細胞の増殖および分化シグナル伝達に IL-5R α 鎖細胞内領域のプロリンに富む領域が必須であること、これに対し IL-5R α 鎖に特有な C-末端領域は増殖および IgM 産生細胞への分化誘導には重要ではないが、IgG1 産生細胞へのクラス変換組み換えや B-1 細胞の生存維持に重要であることを明らかにした。

正常マウスにて、IL-5 が B-1 細胞の生存維持に関与するか調べるため、7 週齢の野生マウスに抗 IL-5 抗体を腹腔内投与し解析した。投与後 6 日目に細胞数、細胞径ともに 5R $\alpha^{-/-}$ マウスと同程度に減少し、正常に分化した B-1 細胞の維持に IL-5 /IL-5R 系が重要であることが示唆された。そこで、正常細胞数存在下の B-1 細胞生存における IL-5 の役割を調べるため、野生あるいは 5R $\alpha^{-/-}$ マウスより得た腹腔内細胞を野生マウスに移入する実験を行った。5R $\alpha^{-/-}$ B-1 細胞は移入 20 日後の生存率が野生 B-1 細胞に比べ 50%に減少した。次に B-1 細胞が減少した環境下での恒常性維持のための増殖における IL-5 の役割を調べるため、CFSE 染色した腹腔内細胞を全リンパ球を欠損している RAG2 $^{-/-}$ マウスに移入した。野生 B-1 細胞数は移入 20 日後 2 倍に増加し、活発な増殖を反映して CFSE 輝度の低下が顕著であった。しかし、5R $\alpha^{-/-}$ B-1 細胞を移入した場合、その細胞数は 1/2 に減少し、CFSE 輝度も保たれていた。腹腔内で IL-5 を B-1 細胞に供給する細胞を探すため、 $\alpha\beta$ T 細胞を欠失する nu/nu マウス、 $\gamma\delta$ T 細胞を欠失する TCR $\delta^{-/-}$ マウス、T 細胞を欠失する TCR $\beta^{-/-}\delta^{-/-}$ マウス、肥満細胞を欠失する W/Wv マウスの B-1 細胞の数、細胞径を解析した。nu/nu および TCR $\delta^{-/-}$ マウスでは B-1 細胞数が減少していたが、細胞径は正常であった。W/Wv マウスでは細胞数、細胞径ともに正常であった。これらのマウスおよび TCR $\beta^{-/-}\delta^{-/-}$ マウスに抗 IL-5 抗体を腹腔内投与すると全てのマウスの B-1 細胞径の縮小が見られた。T 細胞あるいは肥満細胞のいずれかを欠損させても B-1 細胞の維持に必要な IL-5 の供給は障害されないことから、IL-5 がこれらの複数の細胞群から産生されることが示唆された。

これらの結果から、T 細胞および肥満細胞など複数の細胞群から産生される IL-5 は、成熟な B-1 細胞が正常数存在する定常状態における生存、B-1 細胞が減少した環境下での恒常性維持のための増殖を制御するなど、B-1 細胞の恒常性維持に重要であることが初めて明らかになった。

【考察】 IL-5 依存性細胞株化 B 細胞を IL-5 で刺激すると JAK2/STAT5 の活性化と Btk の活性化が惹起される。IL-5R は、IL-5 に特異的に結合する α 鎖とシグナ

ル伝達分子である βc 鎖より構成されることが知られてきた。しかし Takatsu らは、 α 鎖の細胞内領域を欠いた変異型 IL-5R α 鎖を FDC-P1 に移入した *in vitro* 実験系で IL-5 依存性の増殖が見られないことから α 鎖もシグナル伝達分子であることを証明した。IL-3、IL-5、GM-CSF は好酸球の産生や分化を促進するという共通の生物活性を持ち、各々固有の活性も示す。これらのサイトカインは共通の βc 鎖を利用するため、各々 α 鎖のシグナル伝達により固有の活性を持つことも考えられる。

私は、変異型 IL-5R α 鎖のみを B 細胞に発現するマウスの解析により、B 細胞の増殖および分化シグナル伝達に IL-5R α 鎖細胞内領域のプロリンに富む領域が必須であること、IL-5R α 鎖に特有な C-末端領域は IgG1 産生細胞へのクラス変換組み換えや B-1 細胞の生存維持に重要であることを明らかにした。IL-5 の刺激により、 α 鎖のプロリンに富む領域には JAK2 が結合することを Ogata らは報告しているが C-末端領域に結合するシグナル伝達分子はまだわかっていない。Geijsen らは *in vitro* 実験系を用いて Sox4 との結合能を持つ syntenin が IL-5R α 鎖 C-末端の Phe 残基と結合することを報告している。C-末端領域に結合する分子によって IgG1 へのクラス変換が制御されることが考えられ、*in vivo* で C-末端領域に結合する分子およびその機能に関する研究が今後必要であると思われる。

B-1 細胞は IL-2、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-12、IFN γ など様々なサイトカインによりその活性化や分化は制御されていることが知られている。共同研究者の Yoshida、Takatsu らは 5R $\alpha^{-/-}$ マウスの作成、解析を含む様々な実験系により、IL-5 が B-1 細胞の発生、増殖、分化を制御し、原始免疫に深く関与することを示唆した。しかし、生体内での成熟 B-1 細胞における IL-5 の役割、原始免疫における IL-5 の作用機構など生体内 B-1 細胞における IL-5/IL-5R 系についてはまだ不明な点が多く残っている。

私は、成熟な B-1 細胞における IL-5 の役割を調べるため、抗 IL-5 抗体投与実験および細胞移入実験を行なった。この実験系により、成熟な B-1 細胞の維持機構にも IL-5 が重要な役割をしていることが明かとなった。その分子機構はまだわからないが、IL-5/IL-5R シグナル伝達系に含まれている Btk の欠損マウスで B-1 細胞が減少していることを考えると Btk が成熟な B-1 細胞の維持機構に深く関与する可能性もあり検討が必要であると思われる。また、5R $\alpha^{-/-}$ マウスでは B-1 細胞数の減少だけではなく細胞径の縮小も見られる。活性化された細胞径は大きくなることを考えると 5R $\alpha^{-/-}$ B-1 細胞は活性化が障害されている可能性があり、生体内での IL-5 依存性 B-1 細胞の活性化およびそれによるの原始免疫で役割について興味深い課題として残っている。