

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

インターロイキン-5による好酸球分化誘導機構の解明と好酸球分化抑制剤の開発のための方法論の構築

所属 東北大学 大学院薬学研究科
研究者 石原 研治

要旨

IL-5、IL-3、あるいは GM-CSF に対するラットの成熟好酸球と好酸球前駆細胞の応答性の違いを明確にする目的で、それぞれのサイトカインによる成熟好酸球の生存延長誘導作用と好酸球分化誘導能を解析した。その結果、IL-5、IL-3、および GM-CSF は同程度の効力で成熟好酸球の生存延長活性を示した。しかし、好酸球分化能は、IL-5、IL-3、GM-CSF によって活性の違いが見られた。

1. 研究目的

気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性炎症は、その難治性と近年の環境の変化に伴う患者数の増加によって社会的な問題となっている。インターロイキン-5 (IL-5) は、白血球の一つである好酸球に対して分化誘導活性や生存延長活性を示すため、IL-5 が産生されるような疾患、すなわち、アレルギー性炎症などの疾患においては、骨髄、末梢血中および炎症部位で好酸球数の増加が認められる。このように増加した好酸球は炎症部位の慢性化・病態悪化に深く関与していると考えられているため、好酸球数を制御することはアレルギー性炎症を改善するための方法論の一つと考えられている。しかし、現在、IL-5 が骨髄幹細胞を成熟好酸球へ分化・成熟させる機序は不明であり、この点を明らかにすることによって、好酸球の分化を抑制する薬物を開発することが可能になる。このように好酸球分化の抑制剤が開発されれば、炎症部位での炎症反応の治癒を目的として開発された治療薬にあわせて、アレルギー性炎症の予防薬として好酸球分化抑制薬を併用することにより気管支喘息など好酸球によって誘発されるアレルギー性炎症の病態悪化、慢性化、あるいは喘息死の軽減、減少につながると考えられる。そこで、IL-5 がどのような機序によって好酸球の分化を誘導するのかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

(1) ラット骨髄細胞の採取

ラット (200-250 g) をエーテル麻酔下で頸動脈を切断することにより脱血死させた後、頸骨および大腿骨から骨髄細胞を採取した。細胞は minimum essential medium alpha (α MEM, Gibco-BRL) で 3 回洗浄した後、実験に使用した。細胞の生存率は Trypan blue 色素排除法で調べた結果 98% 以上であった。

(2) ラット好酸球の採取

ラット好酸球は、以下の方法で好酸球増多モデルラットを作製し、その腹腔から採取・精製した。Cyclophosphamide (Sigma) を 0.5 % (w/v) カルボキシメチルセルロースナトリウム (Wako) に懸濁し、ラット (500-550 g) に 100 mg/kg となるように経口投与した。2 日後、8 mg protein 相当量のアスカリス抗原エキス (Greer Laboratories) を生理食塩水 1 ml に溶解し、アジュバントとして 10 mg の水酸化アルミニウム (Wako) を加えて懸濁し、ラットの頸部 2ヶ所、腰部 3ヶ所に各 0.1 ml ずつ皮内注射し、残りの 0.5 ml を腹腔内注射して感作した。感作して 10 日後に、5 mg protein 相当量のアスカリス抗原エキスを生理食塩水 0.5 ml に溶解し、5 mg の水酸化アルミニウムを加えて懸

濁し、全量を腹腔内注射して 2 度目の感作を行った。2 回目の感作を行って 7 日後に、8 mg protein 相当量のアスカリス抗原エキスを生理食塩水 30 ml に溶解し、全量を腹腔内注射して抗原刺激を行った。抗原刺激をして 48 時間後にラットをエーテル麻酔下で頸動脈切断により脱血死させた後、20 ml の phosphate-buffered saline (PBS) を腹腔内に注射し、腹腔浸潤細胞を採取した。細胞を PBS で洗浄した後、4 ml の PBS に懸濁し、あらかじめ 50 ml の遠心管内に重層した Percoll (Sigma) 溶液 (比重 1.080; 5 ml, 1.100; 10 ml) の上に重層し、1000 x g, 30 分, 4 °C で遠心した後、比重 1.080 と 1.100 の Percoll 溶液の間の細胞を回収して PBS で洗浄することにより好酸球を精製した。好酸球の精製率は May-Grunwald-Giemsa 染色で調べた結果 95% 以上であり、好酸球の生存率は Trypan blue 色素排除法で調べた結果 98% 以上であった。精製した好酸球は RPMI-1640 培地 (Sigma) で 3 回洗浄した後、実験に使用した。

(3) ラット骨髓細胞の培養

4×10^5 個のラット骨髓細胞を 30% (w/v) FBS, 1% (w/v) BSA および各種サイトカインを含む 1 ml の α MEM 培地に懸濁し、6-well マイクロレートの各 well に 5 ml ずつ播種して 5% CO₂ 存在下 37 °C で一定時間培養した。培養終了後、Trypan blue 色素排除法を用いて総細胞数を算定し、一部の細胞で塗抹標本を作製し、hematoxylin および Luxol-fast-blue で染色して好酸球を同定した。好酸球の割合および好酸球数は以下の式により求めた。

$$\begin{aligned} \text{好酸球 (\%)} &= [\text{Luxol-fast-blue で染色された細胞}] / [\text{hematoxylin で染色された細胞}] \times 100 \\ \text{好酸球数} &= [\text{総細胞数}] \times [\text{好酸球 (\%)}] \times 0.01 \end{aligned}$$

(4) 好酸球生存延長活性の測定

好酸球生存延長活性は以下の方法で測定した。すなわち、 1×10^6 個のラット好酸球を 10% (w/v) FBS および各種サイトカインを含む 1 ml の RPMI-1640 培地に懸濁し、96-well マイクロプレートの各 well に 0.1 ml ずつ播種して 5% CO₂ 存在下 37 °C で一定時間培養した。好酸球の生存率は、Trypan blue 色素排除法により測定した。生存率は、以下の式により求めた。

$$\text{生存率 (\%)} = [\text{生細胞数} / \text{総細胞数}] \times 100$$

(5) RT-PCR

ラット骨髓細胞あるいは好酸球から acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法を用いて total RNA を抽出した。1 μ g 相当量の total RNA を逆転写酵素 (M-MLV, Gibco-BRL) を含む反応液 20 μ l 中で 37°C、1 時間インキュベートして cDNA を調製した。5 μ l の cDNA をテンプレートとして Taq ポリメラーゼ (Takara) およびプライマー (Greiner) を含む反応液 50 μ l 中で PCR を行った。プライマーは、当教室で明らかにしたラット MBP, EAR-1, EAR-2 および IL-5 receptor α chain の cDNA 配列をもとに以下のものを合成して使用した。

ラット MBP

(sense) 5'-GGATCCATGAAATTCCTCTACTTCT-3'

(antisense) 5'-GGATCCCAGCTGGGACCAGCTTA-3'

ラット EAR-1

(sense) 5'-GGATCCATGGGTCTGAAGCTGCTC-3'

(antisense) 5'-GTCGACTACAAAGTGCTGGCACCG-3'

ラット EAR-2

(sense) 5'-GGATCCATGGGTGTGAAGCCGCTT-3'

(antisense) 5'-GTCGACGTACAAAGTGCTGGCATT-3'

ラット IL-5 receptor α chain

(sense) 5'-GCATGCGACTTACTTTCTCCTGAA-3'

(antisense) 5'-AAGCTTTCAAAACAGGGAARRTTCCATGAC-3'

ラット GAPDH

(sense) 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3'

(antisense) 5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'

反応条件は、denaturation 94°C 1分、annealing 54°C 1分、extension 72°C 2分を1サイクルとして28サイクル行った。PCR産物はアガロース電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色してトランスイルミネーターで可視化した。

(6) 統計処理

各データは平均値±標準誤差で表し、有意差検定はDunnett's testにより解析した。

3. 研究成果

(1) IL-5、IL-3 および GM-CSF による好酸球生存延長活性の解析

IL-5、IL-3 および GM-CSF が、ラット成熟好酸球に対して好酸球生存延長活性を持つかどうかを明らかにする目的で、ラット腹腔から採取して精製した好酸球を各種濃度の IL-5、IL-3 および GM-CSF 存在下で培養した。その結果、サイトカイン非存在下で好酸球を培養すると、好酸球の生存率は96時間まで経時的に低下した (Fig. 1A) が、100 pM の IL-5 存在下で培養すると、好酸球の経時的な生存率の低下は96時間まで抑制された (Fig. 1A)。IL-5 による好酸球の生存延長作用は、IL-5 非存在下で培養した場合と比較して24、48、72、および96時間後で認められた (Fig. 1A)。また、100 pM の IL-3 および GM-CSF による好酸球の生存延長誘導作用は IL-5 と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 1A)。各種濃度の IL-5、IL-3 あるいは GM-CSF 存在下で好酸球を96時間培養した結果、好酸球の生存率の低下は全てのサイトカインによって濃度依存的に抑制された (Fig. 1B)。以上の結果から、ラットにおいて、IL-5、IL-3 および GM-CSF は成熟好酸球の生存を延長する作用を持つことが明らかになった。また、IL-5、IL-3 および GM-CSF の好酸球生存延長活性に大きな差はなかった。

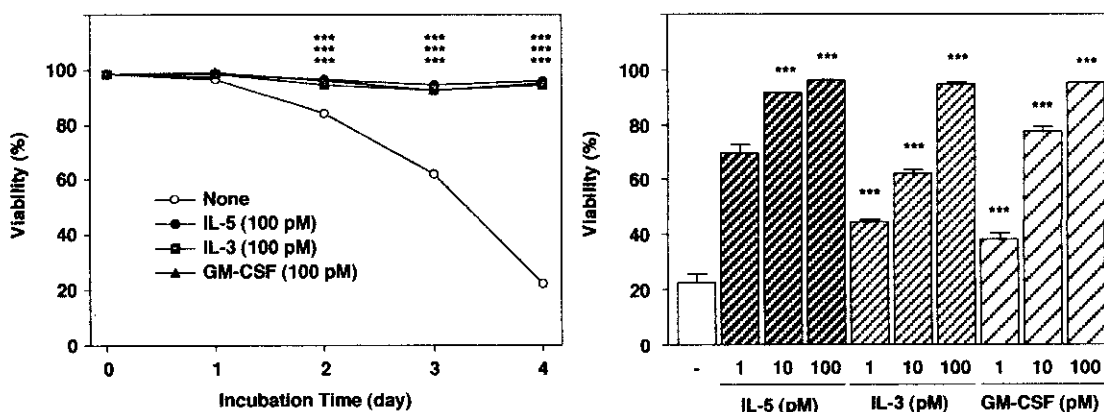


Fig. 1 Effects of IL-5, IL-3 and GM-CSF on the viability of rat eosinophils

(A) Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 0.1 ml of medium containing 100 pM rat IL-5 (closed circles), 100 pM rat IL-3 (closed squares), 100 pM murine GM-CSF (closed triangles) or vehicle (open circles). (B) Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 96 h in 0.1 ml of medium containing the indicated concentrations of rat IL-5, IL-3, murine GM-CSF. The viability of eosinophils was determined by the ability to exclude Trypan blue dye. Values are the means from 5 samples. Statistical significance: (A) $***P < 0.001$ vs. corresponding control; (B) $***P < 0.001$ vs. vehicle control.

(2) IL-5、IL-3 および GM-CSF による好酸球分化誘導活性の解析

ラット骨髄細胞の培養系において、骨髄細胞中の好酸球数が IL-5、IL-3 および GM-CSF によって増加するかどうか解析した。培養開始前、 2×10^6 個の骨髄細胞中には $(10.6 \pm 1.1) \times 10^4$ 個の好酸球が存在していた (data not shown)。骨髄細胞をサイトカイン非存在下で 6 日間培養し、浮遊細胞を回収して、総浮遊細胞数、好酸球数の割合および好酸球数を算定した結果、それぞれ $(9.8 \pm 1.0) \times 10^4$ 個、 $(2.9 \pm 0.9) \%$ および $(0.3 \pm 0.1) \times 10^4$ 個であった (Fig. 2, Table 1)。一方、各種濃度のサイトカイン存在下で骨髄細胞を培養すると、総浮遊細胞数、好酸球数の割合および好酸球数は IL-5、IL-3 および GM-CSF によって濃度依存的に増加した (Fig. 2)。また、Table 1 に示したように、100 pM の IL-3 で培養すると、総浮遊細胞数が顕著に増加するが、その中に占める好酸球は $(22.3 \pm 1.2) \%$ であり、好酸球数は $(21.3 \pm 2.3) \times 10^4$ 個であった。また、GM-CSF で培養すると接着細胞の数が増加し (data not shown)、総浮遊細胞数、好酸球数の割合および好酸球数はそれぞれ $(29.8 \pm 2.2) \times 10^4$ 個、 $(28.8 \pm 0.1) \%$ および $(8.8 \pm 0.7) \times 10^4$ 個であった (Table 1)。IL-5 で培養した場合、IL-3 や GM-CSF と比較して総浮遊細胞数に占める好酸球数の割合が高く $(76.6 \pm 0.9) \%$ であった。総浮遊細胞数は IL-3 より少ないものの、好酸球数は $(46.4 \pm 4.2) \times 10^4$ 個で IL-3 で培養した場合より増加した。従って、IL-5 は好酸球数を増加させる作用が IL-3 や GM-CSF より強く、IL-5 は IL-3 や GM-CSF より選択的に好酸球の分化を誘導することが明らかになった。以上の結果から、ラットにおいて、IL-5、IL-3 および GM-CSF は骨髄幹細胞から成熟好酸球作用への分化誘導能には差があることが明らかになった。

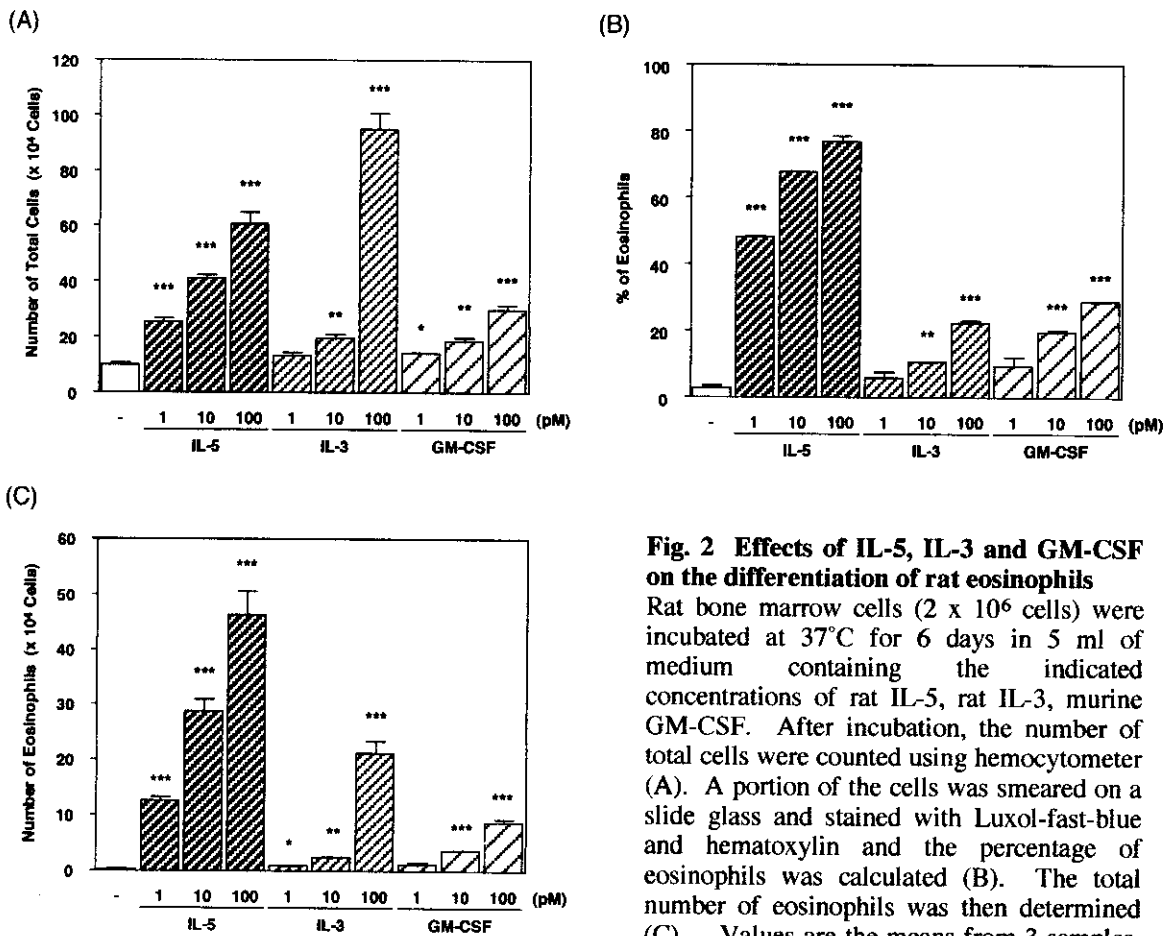


Fig. 2 Effects of IL-5, IL-3 and GM-CSF on the differentiation of rat eosinophils

Rat bone marrow cells (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for 6 days in 5 ml of medium containing the indicated concentrations of rat IL-5, rat IL-3, murine GM-CSF. After incubation, the number of total cells were counted using hemocytometer (A). A portion of the cells was smeared on a slide glass and stained with Luxol-fast-blue and hematoxylin and the percentage of eosinophils was calculated (B). The total number of eosinophils was then determined (C). Values are the means from 3 samples. Statistical significance: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle control.

Table 1. Effects of IL-5, IL-3 and GM-CSF on differentiation of rat eosinophils

Number of total cells (x 10 ⁵ cells)		
None	9.8 ± 1.0	###
IL-5 (100 pM)	60.5 ± 4.6	***
IL-3 (100 pM)	95.2 ± 5.5	*** ##
GM-CSF (100 pM)	29.8 ± 2.2	**
% of eosinophils		
None	2.9 ± 0.9	###
IL-5 (100 pM)	76.6 ± 2.3	***
IL-3 (100 pM)	22.3 ± 1.2	*** ###
GM-CSF (100 pM)	28.8 ± 0.1	*** ###
Number of eosinophils (x 10 ⁵ cells)		
None	0.3 ± 0.1	###
IL-5 (100 pM)	46.4 ± 4.2	***
IL-3 (100 pM)	21.3 ± 2.3	*** ###
GM-CSF (100 pM)	8.8 ± 0.7	*** ###

Values are the means from 3 samples. Statistical significance: **P* < 0.01, ***P* < 0.05, ****P* < 0.001 vs. corresponding control, ##*P* < 0.05, ###*P* < 0.001 vs. corresponding 100 pM IL-5.

(3) 成熟好酸球および骨髄細胞における各種 mRNA の発現解析

骨髄幹細胞から成熟好酸球への分化には様々な遺伝子/蛋白質の発現が IL-5 のようなサイトカインを trigger として誘導され、好酸球には好酸球顆粒蛋白質が顆粒内に貯蔵される。そこで、骨髄細胞を IL-5、IL-3 あるいは GM-CSF で刺激したときに好酸球顆粒蛋白質 mRNA の発現量が増加するかどうかを RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、MBP mRNA は従来の報告通り成熟好酸球に発現しておらず、骨髄細胞では発現が認められた。しかし、骨髄細胞を IL-5、IL-3 あるいは GM-CSF で 4 時間培養した場合でも MBP mRNA の発現レベルは刺激前および無刺激群と比較して変化しなかった (Fig. 3)。一方、ヒト ECP および EDN のホモログであるラット EAR-1 および EAR-2 は成熟好酸球でも発現が認められた (Fig. 3)。しかし、骨髄細胞では MBP の場

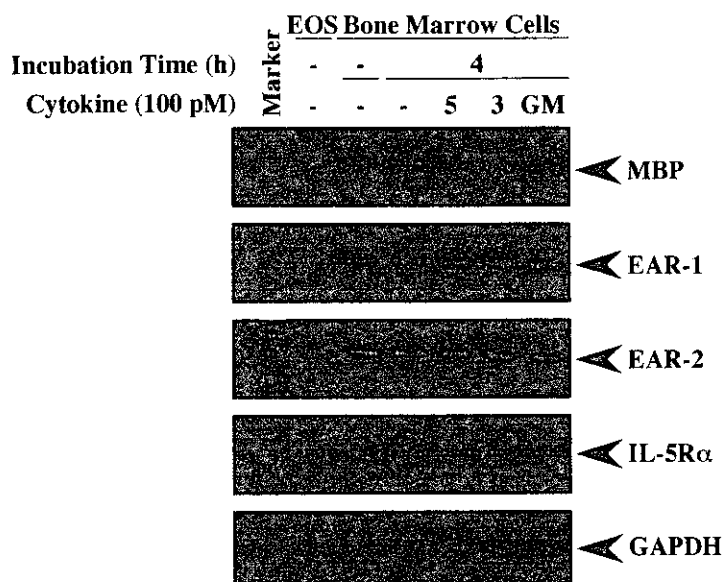


Fig. 3 Effects of IL-5, IL-3 and GM-CSF on eosinophil granule protein and IL-5Rα mRNA levels in eosinophils or bone marrow cells

Total RNA was prepared from untreated rat peritoneal eosinophil (EOS), or rat bone marrow cells prior to and 4 h after incubation with 100 pM IL-5 (5), 100 pM IL-3 (3), 100 pM GM-CSF (GM) and the vehicle (-). mRNA levels of MBP, EAR-1, EAR-2, IL-5Rα and GAPDH were determined by RT-PCR.

合と同様に各種サイトカインで刺激しても発現は変動しなかった (Fig. 3)。さらに、IL-5 receptor α chain の発現について、2種類の primer を用いて解析したが、それぞれ成熟好酸球および骨髄細胞で発現が認められ、サイトカインで刺激しても発現量は変化しなかった。従って、IL-5 などのサイトカインによって誘導される骨髄幹細胞から成熟好酸球への分化では、好酸球顆粒蛋白質や IL-5 receptor α chain のような蛋白質は、サイトカインによって即時的に誘導される蛋白質ではなく、分化の過程で発現する蛋白質であることが示唆された。

4. 考察

成熟好酸球は IL-5、IL-3、あるいは GM-CSF で刺激すると、JAK/STAT pathway や MAP kinase pathway などの共通のシグナル伝達経路が活性化され、その結果、生存延長誘導など同一の生物活性が発現される。しかし、骨髄中の CD34⁺CD33⁺ 細胞は IL-5 により選択的に成熟好酸球に分化するのに対して、IL-3 や GM-CSF により好中球やマクロファージなど種々の白血球に分化する。これら 3 つのサイトカインが CD34⁺CD33⁺ 細胞に対して成熟好酸球のように同一のシグナルを伝達したのでは、このような異種細胞の分化は誘導されないはずである。また、好酸球顆粒蛋白質 MBP mRNA は、IL-5 で刺激したときに誘導される好酸球の分化の段階で発現し、成熟した好酸球では MBP mRNA は発現しない。従って、IL-5 によるシグナル伝達経路は CD34⁺CD33⁺ 細胞と成熟好酸球でも異なるはずである。そこで、CD34⁺CD33⁺ 細胞が、成熟好酸球には無いような分化段階に特異的に発現しているシグナル伝達分子、すなわち、IL-5 レセプターと associate して活性化されるような蛋白質を発現しており、この蛋白質の活性化によるシグナル伝達経路が CD34⁺CD33⁺ 細胞から成熟好酸球への分化、あるいは好酸球顆粒蛋白質の発現誘導を規定しているのではないかと考えた。

これまで、recombinant ラット IL-5 を大量に作製することに成功し、また、今までクローニングされていなかったラット IL-5 receptor α chain をクローニングした (Accession No. AB056101) ため、本研究では IL-5 が好酸球の分化を誘導するために必要な分子やシグナル伝達経路を解明するためにラットの系を用いた。また、最近、血球系細胞の分化には stromal 細胞が大きく関与していると報告されているため、分化誘導はコロニー形成能を指標とする解析ではなく、骨髄細胞全体を用いた培養系で解析する必要があると考えた。そのような観点から、IL-5、IL-3、あるいは GM-CSF に対する成熟好酸球と好酸球前駆細胞の応答性の違いを明確にする目的で、それぞれのサイトカインによる成熟好酸球の生存延長誘導作用と好酸球分化誘導能を解析した。その結果、IL-5、IL-3、および GM-CSF は同程度の効力でラット成熟好酸球の生存延長誘導活性を示した。しかし、好酸球分化能は、IL-5、IL-3、GM-CSF によって活性の違いが見られた。また、Fig. 3 で示すように、MBP、EAR-1 および EAR-2 は IL-5、IL-3 あるいは GM-CSF で骨髄細胞を 4 時間培養しても培養開始前やサイトカイン非存在下の群と比較して顕著な発現誘導はされなかった。従って、好酸球の分化誘導を行うために最初に伝達されるシグナルは MBP や EAR のような顆粒蛋白質合成に関与しておらず、これらの顆粒蛋白質は分化初期ではなく分化の過程で産生される蛋白質であることが示唆された。また、成熟好酸球と骨髄細胞中の IL-5 receptor α chain の発現を RT-PCR で解析した結果、IL-5 receptor α chain バンドは成熟好酸球および骨髄細胞において同じ位置に検出された。従って、好酸球の分化の過程で IL-5 receptor α chain mRNA のスプライシングなどによる蛋白質の 1 次構造は無いのではないかと考えられた。

5. まとめ

ラットの系において、IL-5、IL-3 および GM-CSF は成熟好酸球に対して生存延長活性を示すが、好酸球の分化に対しては IL-5 が選択的に作用することが明らかになった。また、IL-5 は顆粒蛋白質や IL-5 receptor α chain の発現を介して成熟好酸球の分化を誘導するのではなく、これらの蛋白質は IL-5 による分化誘導の過程で産生すると考えられる。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社