

路と PI3 キナーゼ*経路を活性化することが知られている。JAK/STAT 経路においては、レセプターの種類によって異なるが、JAK*ファミリーの中の JAK1, JAK3, Tyk2 を活性化し、それに引き続き STAT 分子ファミリーの中の STAT6 を活性化する。STAT3 を活性化する場合もある。IL-4 の生物活性に STAT6 が必須であることが、STAT6 ノックアウトマウスにおいて IL-4 の生物活性が消失することにより示されている。PI3 キナーゼ経路は IL-4 の増殖作用に重要だと考えられている。

生体内において IL-4 は寄生虫感染に対する生体防御に重要な役割を果たしていると考えられ、IL-4 ノックアウトマウスでは寄生虫感染に対する抵抗性が低下している。寄生虫感染防御は、IL-4 は IL-13 と重複性(redundancy)を示し、IL-4 と IL-13 のダブルノックアウトマウスでは IL-4 ノックアウトマウス以上に寄生虫に対して易感染性を示す。

Th2 細胞あるいは IgE*がアレルギー*反応に関与していることから、IL-4 はアレルギー疾患の発症において重要な役割を果たしている。IL-4 あるいは STAT6 ノックアウトマウスでは気道過敏性の低下がみられる。また、気道粘膜、皮膚、鼻粘膜といったアレルギー疾患の病変部位では IL-4 の発現が増強していることが多い。IL-4 遺伝子の-589 の位置に存在する SNP(スニップ)*(C/T)はアトピー*性喘息と遺伝的に相関することが報告されている。可溶型 IL-4R の吸入により IL-4 のシグナル伝達*経路を阻害して気管支喘息*の症状が改善されることも示されている。

インターロイキン4レセプター

interleukin-4 receptor (IL-4R)

インターロイキン4*のレセプター*(IL-4R)。IL-4 がその生物活性を発揮するためには、標的細胞表面上に存在する IL-4R と結合する必要がある。IL-4 が結合するレセプター

成分として現在の IL-4R α 鎖(IL-4R α)が同定され、当初この分子のみで IL-4R が構成されていると考えられていた。しかし、その後 IL-4R α がコモン γ 鎖(γ_c 鎖)*あるいは IL-13R α 1 鎖(IL-13R α 1)とヘテロダイマー*(二量体)を形成していることが判明した。 γ_c は IL-4 以外に、IL-2*, IL-7*, IL-9*, IL-15* のレセプターの構成成分でもある。IL-4R α と γ_c 鎖のヘテロダイマーは type I IL-4R とよばれ、IL-4R α と IL-13R α 1 のヘテロダイマーは type II IL-4R とよばれている。type II IL-4R は IL-13 R としても機能している。

ヒトとマウスの IL-4R α はそれぞれ 825 個、810 個のアミノ酸からなり(シグナル配列*を含む)、アミノ酸レベルで 50% の相同性を示す。IL-4R α 遺伝子はヒト、マウスそれぞれ 16 番 p11-12, 7 番染色体上に位置する。ヒトとマウスの IL-13R α 1 はそれぞれ 427 個、424 個のアミノ酸からなり(シグナル配列を含む)、アミノ酸レベルで 76% の相同性を示し、遺伝子*は X 染色体上に位置する(γ_c 鎖)。IL-4R α と IL-13R α 1 にはスプライス産物である可溶型が存在する。IL-4R α , IL-13R α 1, γ_c 鎖すべてサイトカイン*レセプターファミリーに属し、細胞外部分には位置的に保存された 4 個のシステイン残基と WSXWS モチーフが存在する。IL-4R α , IL-13R α 1 の細胞内部分には膜貫通部分に近いところに Box1 モチーフがあり、ここに、それぞれ JAK*ファミリーに属する JAK1, Tyk2(チロシンキナーゼ 2)が結合する。

IL-4R α の細胞内部分にはさらに ID-1 部位, IRS (insulin receptor substrate)-1, -2 が結合する IL-4 R モチーフ, STAT*ファミリーに属する STAT6 が結合するチロシン残基, 抑制性シグナルを持つ ITIM*モチーフなどのシグナル伝達*に重要な部位が存在する。IL-13R α 1 の細胞内部分には STAT3 が結合するためのチロシン残基が存在する。

I
あ
重
4R
ウ
よ
上
的
複
疾
い
イ
:
よ
は
N
性
の
ウ
in
を
と
Ig
固
cl
(e
同
お
球
子
虫
マ
ド
ス
は
は
綿
が

IL-4R α はIL-4RとIL-13Rの共通成分であるため、IL-4とIL-13の両方のシグナルに重要であると考えられており、そのためIL-4R α ノックアウトマウスではIL-4ノックアウトマウスに比べて寄生虫感染防御においてより高度な障害を示す。また、IL-4R α 遺伝子上においてアレルギー*疾患の発症と遺伝学的に相関を示す一塩基多型(SNP)*の存在が複数報告されており、IL-4R α はアレルギー*疾患の原因遺伝子の1つであると考えられている。

インターロイキン5 interleukin 5 (IL-5)

抗原*感作されたT細胞*やマスト細胞*により産生されるサイトカイン*の1つ。IL-5は分子量*約12,500のポリペプチドに多量のN型糖鎖が結合し、二量体を形成し初めて活性のある分子となる。したがって活性型IL-5の分子量は約4~5万である。IL-5は、最初マウスにおいてT細胞置換因子(T cell replacing factor: TRF)とよばれ、活性化B細胞*を抗体産生細胞*にまで分化*成熟させる因子として発見、同定された。特にDNA結合性のIgM*抗体を産生するCD5*陽性B細胞亜集団の発生*分化に深くかかわっている。

IL-5はモノクローナル抗体*の作製とcDNAクローニングにより好酸球*分化因子(eosinophil differentiation factor: EDF)と同一分子であることが判明した。特にヒトにおいてはIL-5反応性の細胞は主として好酸球と考えられており、IL-5は好酸球の造血因子と考えられている。さらに、IL-5は、寄生虫や微生物の感染に際してT細胞あるいはマスト細胞から産生される生体防御をつかさどるサイトカインでもある。IL-5産生トランスジェニックマウス*を用いた実験においては、IL-5により骨髄*から誘導される好酸球は骨髄およびリンパ組織以外に筋肉周囲や組織の辺縁部に移動して定着する傾向を持つが、組織に傷害を与えることは少ない。した

がってIL-5はそれ自体では好酸球を活性化しないと考えられる。しかし好酸球増加を伴う心筋炎、筋膜炎、気管支喘息*などではIL-5は病態形成に関与していると考えられる。

IL-3*, GM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子), IFN* γ と部分的に低いレベルの相同性がある。IL-3, IL-4*, GM-CSFなどとともクラスタをなして、ヒトでは5番、マウスでは11番染色体にマップされる。IL-5遺伝子は4つのエキソン*からなり、マウスIL-5遺伝子はヒトIL-5遺伝子より長い3'非翻訳領域*を持つ。その結果、ヒトIL-5 mRNA*は0.9 kbなのに対し、マウスIL-5 mRNAは1.6 kbである。3'非翻訳領域はmRNAの不安定性に関与すると考えられている。IL-5遺伝子はプロモーター*領域によってグルココルチコイド*により転写*が抑制されるよう調節されている。

ヒトとマウスのアミノ酸配列は約70%の相同性があり、IL-5は少なくともヒトとマウス間では種を超えて働く。IL-5の糖鎖は直接活性には影響せず、安定性に関与していると考えられる。X線回析の結果、活性のあるIL-5の二量体は4本の α ヘリックス*の2つの束からなり、4本目のヘリックスは互いに別の分子から由来することがわかっている。1つの分子で4本目のヘリックスを形成するように突然変異を誘導すれば単量体でも活性があることが報告されている。

インターロイキン5 レセプター interleukin-5 receptor (IL-5R)

分子量*約5万のIL-5*結合性を示す α 鎖と、IL-5結合性のない分子量約13万の β 鎖とからなる。 β 鎖は α 鎖とIL-5の結合を安定化させるものと考えられる。マウスの場合、 α 鎖単独では解離定数*(K_d)約2~30 nMの低親和性を示すが、 $\alpha\beta$ 複合体だと10 pM~150 pMの K_d 値を示す。ヒトの場合 α 鎖だけで170 pM~500 pMの K_d 値を示し、 β 鎖

因子(CSIF)とよばれた。分子量*は3.5万~4万のホモダイマー(二量体)である。ヒトではTh0/Th2細胞, 単球*, マクロファージ*, 活性化B細胞など多様な細胞により産生される。エプスタイン-バールウイルス*のORF(→読み枠)であるBCRF1と高い相同性を有している。このBCRF1には弱いながらIL-10活性が認められることから, ウイルスIL-10(vIL-10)ともよばれる。IL-10の生物活性は多彩であり, ①Th1細胞*, NK細胞*などからのサイトカイン産生(IFN* γ , GM-CSF*など)抑制, ②活性化マクロファージからのサイトカイン(IL-1*, TNF* α , IL-6*など)や活性酸素*産生抑制, ③マクロファージ*のMHCクラスII抗原*発現抑制とそれによる抗原提示能抑制, などの抑制活性と, ④B細胞*のMHCクラスII抗原*発現促進, ⑤B細胞の増殖および免疫グロブリン*産生促進, ⑥胸腺*細胞増殖促進, ⑦キラーT細胞*分化促進, などの刺激活性の二面性を有する。IL-10レセプター*は α 鎖, β 鎖2本ずつの四量体であり, JAK*, Tyk1(チロシンキナーゼ1), STAT*3を介してシグナル伝達*が行われる。

インターロイキン11 interleukin 11(IL-11)
 【ストローマ細胞由来造血性サイトカインstroma cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine】

サイトカイン*の一種で, IL-6*依存性に増殖する形質細胞由来細胞株T1165の増殖因子*としてサル骨髄ストローマ細胞由来株PU-34の培養上清中から精製された。アミノ酸199残基, 分子量*2.3万。IL-11の作用は形質細胞のみならず, 骨髄*幹細胞や肝細胞にまで及び, IL-6と類似の多様な作用を示す。IL-11は骨髄腫細胞の増殖刺激活性を持ち, T細胞*存在下に免疫グロブリン*産生B細胞に作用して抗体*産生を促進する。造血幹細胞*に対しIL-4*の存在下に多血球コロニー,

芽球細胞コロニーの形成を促進する。このことは, 幹細胞*のG₀期の短縮に起因し, IL-11がG₀期の造血幹細胞*の細胞周期*を始動するコンピテンス因子(competence factor)として作用することを示している。IL-6と同様, IL-3*に対する相乗効果を示し, IL-3存在下で巨核球コロニー形成を促進する。

一方, 好中球*, マクロファージ*コロニーにおいて, IL-6は両者のコロニー形成を支持するのに対して, IL-11はマクロファージコロニー形成のみを支持する。また, IL-11は肝細胞を刺激してCRPの産生を促進する。

IL-11RはIL-11に特有な α 鎖と, IL-6R, オンコスタチン*Rなどに共通の β 鎖(gp130*)からなり, IL-11シグナルはgp130を介して細胞内に伝達される。

インターロイキン12 interleukin 12(IL-12)

当初はB細胞*株培養上清中に検出される末梢血リンパ球からのIFN* γ 産生を誘導する因子として発見された。また, NK細胞*活性を増強することからNKSFともよばれていた。分子量*約7万の糖タンパク質であり, 分子量4万(p40)と35,000(p35)の2つのサブユニットからなるヘテロダイマー*(二量体)である。産生細胞は単球*, マクロファージ*, B細胞*などである。IL-12はT細胞*やNK細胞からのIFN* γ 産生誘導, NKおよびADCC*活性増強などの作用を有するほか, Th0細胞からTh1細胞*への分化を促進する。また, これらの作用を介して結核菌などの細胞内寄生病原体への生体防御にも深く関与していることが推測されている。IL-12Rは110kDおよび85kDの β 1, β 2鎖のヘテロダイマーであり, T細胞, NK細胞などに発現されている。

インターロイキン13 interleukin 13(IL-13)

Th2細胞*型サイトカイン*の1つで, インターロイキン4(IL-4)*と共通した生物活性

を持っている。CD4⁺細胞(なかでも Th2 細胞^{*})、マスト細胞^{*}、好塩基球などより分泌され、分子量^{*}は約 12 kD である。ヒト IL-13 遺伝子は 5 番 q31, マウス IL-13 遺伝子は 11 番染色体上に位置している。この付近には、IL-4, IL-5^{*}, IL-3^{*}, IL-9^{*}, GM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー因子)などの遺伝子も存在しており、Th2 型サイトカイン遺伝子クラスターを形成している。IL-13 は分子内において 2 つのジスルフィド結合^{*}を有しており、これによりタンパク質の構造が安定化されている。マウスとヒトの IL-13 の相同性はアミノ酸レベルで 58% である。

ヒト IL-13 は、IL-4 と同様に B 細胞^{*}に対して IgE^{*}へのクラススイッチ^{*}、CD23^{*}、MHC クラス II 抗原^{*}の発現増強の誘導を引き起こし、単球^{*}に対しては抗炎症作用を示す。しかし、IL-4 と異なり T 細胞^{*}への増殖作用、Th2 細胞分化といった作用は示さない。マスト細胞に対する活性化作用も IL-4 ほど明らかではない。非免疫系細胞に関しては、気道上皮細胞、線維芽細胞^{*}などに対してケモカイン^{*}の産生、接着分子^{*}の発現増強などを引き起こす。マウス IL-13 は B 細胞に対する作用を持たない。

IL-13 は標的細胞表面上に存在する IL-13 レセプターと結合して生物活性を発揮する。IL-13 レセプターは IL-13 レセプター $\alpha 1$ 鎖 (IL-13R $\alpha 1$) と IL-4 レセプター α 鎖 (IL-4R α) で構成されるヘテロダイマー(二量体)^{*}よりなり、これは IL-4 R としても機能している。IL-13R $\alpha 1$ とは別に IL-13 と結合する分子として IL-13 R $\alpha 2$ 鎖が同定されているが、IL-13R $\alpha 2$ の細胞内ドメインは短いためシグナル伝達^{*}分子の会合は起こらず、デコイ (decoy おとり) レセプターとして働いているのではないかと考えられている。

IL-13 のシグナル伝達経路においては、IL-4 と同じように JAK^{*}/STAT^{*}経路と PI3 キナーゼ^{*}経路が活性化される。JAK/STAT 経

路においては、JAK 分子の中の Tyk2(チロシンキナーゼ 2) と JAK1 が活性化され、引き続き STAT 分子ファミリーの中の STAT6 と STAT3 が活性化される。IL-4 と IL-13 どちらも STAT6 を活性化するために、この両者が共通した生物活性を持っていると考えられている。

生体内において IL-4 と同様に寄生虫感染に対する生体防御に重要な役割を果たしていると考えられており、IL-13 ノックアウトマウス^{*}では寄生虫に対して易感染性を示す。IL-13 はアレルギー^{*}疾患の発症において重要な役割を果たしていることが、患者の解析、モデルマウスの解析より示唆されている。IL-13 遺伝子上に存在する一塩基多型 (SNP^{*}) とアレルギー疾患の間に遺伝学的な相関が認められている。

インターロイキン 14 interleukin 14 (IL-14)

ヒト正常 T 細胞^{*}、T 細胞急性リンパ性白血病細胞や B 細胞^{*}性リンパ腫細胞の PHA 刺激培養上清中に、ヒト活性化 B 細胞の増殖を誘導する物質として見いだされた。この物質は分子量^{*}5 万~6 万の B 細胞増殖因子であることから高分子 B 細胞増殖因子 (high molecular weight-B cell growth factor: HMW-BCGF) と名付けられた。その後、この物質をコードする cDNA (相補的 DNA^{*}) がクローニング^{*}されてその構造が決定され、この分子はインターロイキン 14 (IL-14) と呼称されることとなった。

ヒト IL-14 は 483 個のアミノ酸残基からなる分子量 5 万 3,100 のタンパク質で、3 つの N 型糖鎖結合部位を持つ。ヒト IL-14 は IL-2^{*}、IL-4^{*}、IL-5^{*}、IL-6^{*}、IL-13^{*}などの B 細胞増殖活性を示すサイトカイン^{*}との構造上の相同性はまったく認められない。IL-14 は、天然状態では分子量 5 万~6 万、還元条件下でも分子量が変わらない糖タンパク質である。IL-14 には等電点^{*} (pI) の違いから、

5. IL-13 をめぐって

佐賀医科大学生化学講座教授 出原賢治

key words interleukin-13, interleukin-4, allergy, bronchial asthma, signal transduction

動 向

気管支喘息は遺伝因子と環境因子とが相互に干渉し合うことにより引き起こされる複雑な疾患である¹⁾。引き金となる遺伝因子と環境因子の作用により、喘息の病変部位にはTh2型ヘルパーT細胞、肥満細胞、好酸球などの細胞浸潤を生じ、これらの細胞より種々のサイトカインや化学物質が分泌される。Th2型サイトカインはアトピーに関係なく、気管支喘息の病態を形成する重要な役割をもっていると考えられている¹⁾。Th2型サイトカインの重要性は、気管支喘息患者の病変部位において主にTh2型のCD4⁺T細胞が浸潤している所見や²⁾、T・Bリンパ球が存在しないSCIDマウスにTh2型CD4⁺T細胞を移入すると気道過敏性が回復するモデルマウスでの解析結果^{3,4)}などより確認されている。さらに、最近Th2型サイトカインの中でも特にインターロイキン13(IL-13)の気管支喘息発症における重要性がクローズアップされてきた。IL-13はTh2型細胞、マスト細胞、好塩基球などより分泌される分子量が約12kDaのサイトカインである。本稿ではIL-13をめぐる気管支喘息との関連における最近の知見、あるいは今後の課題について述べてみたい。

A. IL-13レセプターとシグナル伝達(図1)

IL-13が生物活性を発揮するためには標的細胞表面上に存在するレセプターと結合する必要がある。IL-13レセプターはIL-13レセプター α 1鎖(IL-13R α 1)とIL-4レセプター α 鎖(IL-4R α)で構成されるヘテロダイマーよりなる²⁾。IL-13R α 1とは別にIL-13と結合する分子としてIL-13レセプター α 2鎖(IL-13R α 2)が同定されている。しかしIL-13R α 2の細胞内ドメインは短いためシグナル伝達分子の会合は起こらず、IL-13R α 1を発現している細胞においてIL-13シグナルを阻害する“おとり(decoy)レセプター”として働いているか、局所のIL-13を細胞内に取り込む“クリアランス機能”をもっているのではないかと考えられている。

IL-13が細胞表面上のレセプターに結合すると細胞内にシグナルが伝達されていく。さまざまなシグナル伝達分子がその伝達経路に関与しているが、それらはJak/STAT経路とinsulin receptor substrate (IRS)-1/2/phosphatidylinositol (PI) 3-kinase経路とに集約される²⁾。Jak/STAT経路に関しては、IL-13刺激によりTyk2とJak1のJak分子が活性化され、それに引き続きSTAT6とSTAT3⁵⁾のSTAT分子が活性化される。これに

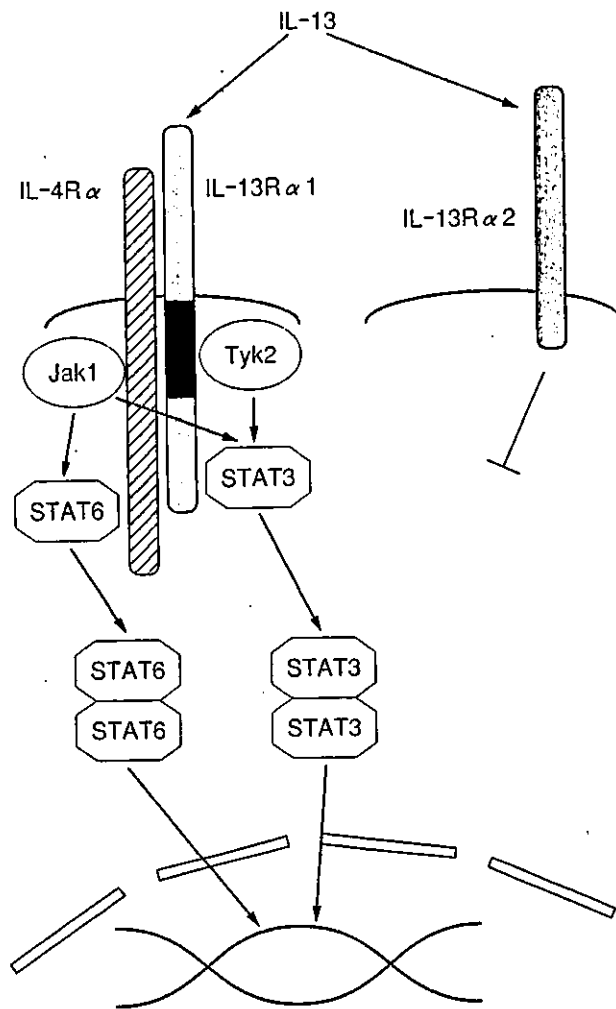


図1 IL-4とIL-13のレセプター構造とシグナル伝達機構

IL-13レセプターはIL-13R α 1とIL-4R α のヘテロ二量体より構成されている。IL-13がレセプターと結合するとJak1, Tyk2といったJak分子が活性化され、それに引き続きSTAT6, STAT3がリン酸化され核内へと移行する。IL-13R α 2にもIL-13は結合するが、シグナルは伝えないと考えられている。

より germline ϵ , CD23, MHC class II, STAT6 遺伝子などの発現が誘導される。IL-4とIL-13が共通した生物活性をもっているのは、ともにSTAT6を活性化するためだと考えられている。STAT3のIL-13の生物活性における役割については現時点では不明である。IRS-1/2はJak1によりチロシンリン酸化され、それに引き続いてPI3-kinaseがIRS-1/2と会合する。この経路はIL-13の増殖作用に関与しているのではないかと考えら

れている。

IL-13R α 1は免疫系細胞においてはB細胞などの一部の細胞に発現していることが確認されている。非活性化B細胞においてはIL-13R α 1の発現はわずかであるが、抗IgM抗体や抗CD40刺激によりB細胞が活性化されるとIL-13R α 1の発現も増強される⁶⁾。一方、気道組織においてはIL-13R α 1は恒常的に気管支上皮細胞、気管支平滑筋細胞に発現していることが組織染色⁷⁾やRT-PCRにより明らかになった。IL-13R α 2の発現に関してはよくわかっておらず、リンパ球など免疫系細胞においてはその発現が認められていない。今後、それぞれの細胞におけるIL-13R α 1とIL-13R α 2の発現調節機構、あるいは各疾患における発現の異常についての解析が必要である。

B. IL-13と気管支喘息との関連

気管支喘息の発症機序においてIL-13が重要な役割を果たしている根拠として、次のような事柄が列挙される。

1. 喘息患者におけるサイトカイン産生の解析

喘息患者の気道組織、あるいは気管支洗浄液(BAL)中細胞においてIL-4, IL-5, IL-13といったTh2型サイトカインの発現が恒常的に増強しているか、アレルゲンチャレンジによりこれらのサイトカイン発現が増強されることが示されている²⁾。特にIL-13はIL-4よりも優位に発現が強くなっている。このことから、喘息の病変部位でIL-13が何らかの作用を示すことにより喘息の発症に関与していると考えられている。

2. モデルマウスの解析

いくつかのIL-13シグナル伝達分子のノックアウトマウスにおける解析により、IL-13と気管支喘息との関連が示されている。まず、リガンドで

あるIL-13のノックアウトマウスにおいては、卵白アルブミン誘導による気道過敏性の誘発において低下は生じていなかったが、抗IL-4抗体を投与してIL-13とIL-4の両方のシグナルを阻害すると気道過敏性の誘発が生じなかった⁸⁾。また、気道過敏性とは別にIL-13ノックアウトマウスでは粘液産生が低下していた。次に、IL-4ノックアウトマウス由来のTh2細胞を野生型のマウスに移入しても粘液産生は生じるのに、IL-4とIL-13の共通なレセプター構成成分であるIL-4R α のノックアウトマウスに移入すると粘液産生が生じなかった⁹⁾。さらに、IL-4とIL-13の共通なシグナル伝達分子であるSTAT6のノックアウトマウスにおいても気道過敏性の誘発が起こらなかった¹⁰⁾。これらの結果はIL-4とともにIL-4R α 、STAT6を共有しているIL-13の重要性を示唆すると同時に、IL-4とIL-13の間にredundancy (冗長性)が存在することを意味していた。つまりIL-4とIL-13の両方が喘息の発症にかかわっており、両方のシグナルが阻害されると喘息の発症が著しく低下することを示している。

これとは別に、IL-13をリンパ球が欠如しているRAG1ノックアウトマウスに投与しても気道過敏性の増強、杯細胞の増加、好酸球浸潤が生じること¹¹⁾、あるいはIL-13を気道上皮細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスにおいて粘液産生亢進、杯細胞過形成、気道粘膜下の線維化、気道過敏性亢進といった喘息病態が観察されることから¹²⁾、気管支喘息の病態形成におけるIL-13の重要性が示されるとともに、IL-13が直接気道組織に作用して気管支喘息の発症を引き起こしていることが示唆された。

3. 遺伝学的解析

ゲノム全体における気管支喘息との遺伝的相関に関する解析がいままでにいくつか試みられ、多様な遺伝子座位との相関が認められている¹³⁾。

これは民族間の相違、あるいは対象者の選別の相違によるものだと考えられている。しかし、これらの中の多くの解析において、5qとは共通して相関が認められている^{14,17)}。5q内の5q31-33領域においてTh2サイトカイン遺伝子がクラスターを形成していることから、これらの遺伝子の中に気管支喘息の原因遺伝子が存在すると考えられてきた¹⁸⁾。いままでにこれらの遺伝子の中で気管支喘息あるいはアトピーとの遺伝的相関が報告されているのは、IL-4遺伝子の-590の位置に存在するC/T置換¹⁹⁾とIL-9遺伝子²⁰⁾である。これに加えて最近我々ならびに他のグループはIL-13遺伝子の110番アミノ酸のアルギニン/グルタミン置換が気管支喘息の発症と遺伝的に相関することを示した^{7,21,22)}。

我々がIL-13の110番目のアミノ酸がアルギニンであるタイプ (R110) とグルタミンであるタイプ (Q110) のそれぞれの気管支喘息患者における出現頻度を解析したところ、Q110は日本人、英国人の両方のグループにおいて健常対照群よりも喘息患者群において有意に頻度が高かった⁷⁾。特記すべき点は、この連鎖がアトピー性か非アトピー性かという喘息の型にかかわらないということである。その後、このアミノ酸置換と血中IgE値あるいはアトピー性皮膚炎が関連するという報告が他のグループによりなされた^{21,22)}。これらの結果より、表現型は異なるけれどIL-13遺伝子上のこのアミノ酸置換が新しくみいだされたアレルギー疾患の遺伝因子であることが示された。このアミノ酸置換による機能的影響を解析したところ、IL-13R α 1との親和性には変化ないものの、IL-13R α 2との親和性が低下するために局所におけるIL-13濃度が増加すると考えられるとともに、IL-13のタンパク質自体の安定性も増強して全身的なIL-13濃度も増加すると考えられた (有馬和彦他、投稿中)。これらのことから、このアミノ酸置換が機能的な面においても気管支喘息の

遺伝因子となることが示された。

C. 気管支喘息発症におけるIL-13の関与

(図2)

いままで考えられていた気管支喘息の発症機序は以下の通りである²³⁾。まず気管支喘息の感作相において、体内に侵入してきたアレルゲンが樹状突起細胞などの抗原提示細胞によりプロセッシングを受け抗原ペプチドが提示される。それをT細胞が認識してTh2型のT細胞が誘導され、IL-4, IL-5, IL-9, IL-13といったTh2型のサイトカインを分泌する。このうちIL-4とIL-13はB細胞に作用してIgE産生を誘導し、IgEがマスト細胞上に結合する。次に活性化相において再び侵入してきたアレルゲンがマスト細胞上のIgEに結合すると、それが引き金となってマスト細胞が脱顆粒しヒスタミンやロイコトリエンなどの化学物質を放出する。これが即時型のアレルギー反応を引き起こす。これとは別に、IL-5, IL-3, GM-CSFは好酸球に作用してPAFなどの化学物質の産生を誘導する。これは遅延型のアレルギー反応を引き起

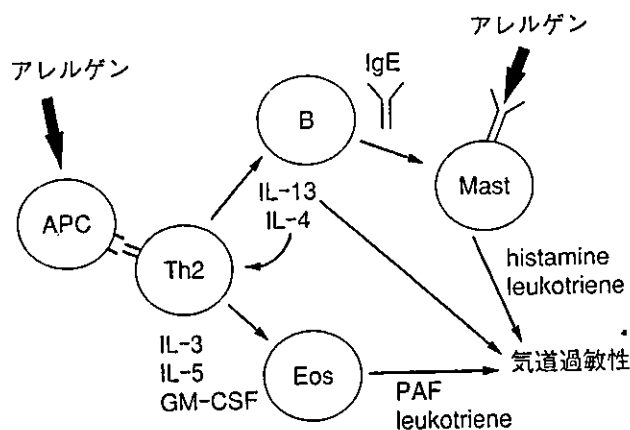


図2 気管支喘息発症におけるIL-13の関与
(文献23より改変)

気管支喘息の発症にかかわる細胞と、その相互作用に関与するサイトカインについて示す。IL-13は、B細胞へのIgE産生誘導だけでなく、気道組織へ直接作用することにより気管支喘息の発症に関与していると考えられている。

こす。つまり、IL-13はIL-4と同じようにB細胞からのIgE産生を引き起こすことによりアレルギー反応に関与していると考えられていた。

しかし、このような作用機序とは別に、IL-13が直接気道組織に作用して喘息の発症に関与している可能性が前述したようにマウスを用いた実験により示唆された^{11,12)}。それではIL-13は非免疫系細胞に作用してどのような機序で気管支喘息などのアレルギー疾患を引き起こしているのだろうか？ 前述したように気道組織においては気管支上皮細胞や気管支平滑筋においてIL-13Rが高発現していることから、これらの細胞にIL-13が作用することにより気管支喘息の病態が形成されると考えられる。いままでIL-13が気道上皮細胞に作用してエオタキシンや15-リポキシゲナーゼの発現を増強するという報告はあるが、あまり解析は進んでいなかった。我々は現在気管支上皮細胞においてIL-13により発現が変動する遺伝子をDNAチップを用いて網羅的に同定している。今後、これら気道組織における非免疫系細胞に対するIL-13の作用機序を解析することが、気管支喘息発症の分子的機序の解明につながると期待される。

むすび

本稿で述べたように、モデルマウスを用いての解析や遺伝学的解析などから、IL-13の気管支喘息発症における重要性が認識されるようになった。今後はIL-13によって引き起こされる細胞内における分子レベルでの作用機序の解明が課題となっている。それにより、IL-13から眺めた一面からに限られるにせよ、気管支喘息発症における分子的機序の一端が明らかになるものと思われる。このことは、気管支喘息の病態の診断、あるいは新規創薬開発への進展につながるものと期待される。

文献

- 1) Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402: B2-4.
- 2) Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M, et al. Recent advances in understanding how interleukin-13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp* 2000; 48: 505-12.
- 3) Cohn L, Homer RJ, Marinov A, et al. Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 1997; 186: 1737-47.
- 4) Cohn L, Tepper JS, Bottomly K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1 cells. *J Immunol* 1998; 161: 3813-6.
- 5) Umeshita-Suyama R, Sugimoto R, Akaiwa M, et al. Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor α chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation. *Int Immunol* 2000; 12: 1499-509.
- 6) Ogata H, Ford D, Kouttab N, et al. Regulation of interleukin-13 receptor constituents on mature human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 9864-71.
- 7) Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 549-59.
- 8) Webb DC, McKenzie AN, Koskinen AM, et al. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol* 2000; 165: 108-13.
- 9) Cohn L, Homer RJ, MacLeod H, et al. Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4R α , but not on eosinophils. *J Immunol* 1999; 162: 6178-83.
- 10) Akimoto T, Numata F, Tamura M, et al. Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT) 6-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187: 1537-42.
- 11) Grünig G, Warnock M, Wakil AE, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998; 282: 2261-3.
- 12) Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103: 779-88.
- 13) Moffatt MF, Cookson WO. Genetics of asthma and inflammation: the status. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 606-9.
- 14) The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat Genet* 1997; 15: 389-92.
- 15) Ober C, Cox NJ, Abney M, et al. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The collaborative study on the genetics of asthma. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1393-8.
- 16) Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, et al. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* 2000; 66: 152-60.
- 17) Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, et al. Variation in the interleukin 4-receptor α gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 517-26.
- 18) Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994; 264: 1152-6.
- 19) Rosenwasser LJ, Borish L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: S152-5.
- 20) Doull IJ, Lawrence S, Watson M, et al. Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1280-4.
- 21) Graves PE, Kabesch M, Halonen M, et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 506-13.
- 22) Liu X, Nickel R, Beyer K, et al. An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90). *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 167-70.
- 23) Drazen JM, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med* 1996; 183: 1-5.

IL-4, IL-13 シグナル伝達分子の遺伝的多型とアレルギーとの関連

杉本理恵 出原賢治

◎アレルギー反応にかかわるサイトカインであるIL-4, IL-13のシグナル伝達経路を最新の知見を含めて述べ、これらの分子の遺伝的多型とアレルギー発症とのかわりを述べる。

*

キーワード: IL-4, IL-13, IL-4R α , アトピー遺伝子, 喘息遺伝子

アレルギー性疾患は他の多くのcommon diseaseと同様に、遺伝因子と環境因子が組み合わさって起こると考えられている。アレルギー性疾患には家族集積性があることから、遺伝因子の存在が推測されており、この遺伝因子のなかにアトピー遺伝子、喘息遺伝子、皮膚炎遺伝子などが存在すると考えられている。アトピーとは、遺伝的に血中総IgE値、あるいはダニやカビといった一般的なアレルゲンに対する特異的IgE値が高くなる傾向として定義されており、喘息、鼻炎、皮膚炎などさまざまなアレルギー疾患の症状を起こすことが知られている。このアトピー遺伝子、喘息遺伝子、皮膚炎遺伝子は単一の遺伝子によって構成されているのではなく、多数の遺伝子によって構成されていると考えられている。アレルギーの原因遺伝子を同定する試みが数多くなされてきたが、人種間の差や環境因子の関与もあり、その同定には多くの困難を伴っている。これまでに、連鎖解析などの手法を用いて同定されたアレルギーと連鎖を示す候補遺伝子は多岐にわたっている¹⁻³⁾。しかし、これまでのアプローチは遺伝学的手法に基づいたものが中心であり、その遺伝的多型が本当のアレルギーの原因となっているかど

うかを確かめるためには機能的解析を組み合わせる必要がある。こうした手法を取り入れることにより、より確実にアレルギーの遺伝的背景に迫ることができるものと期待される。

●IL-4, IL-13とアレルギー発症との関連

アレルゲンは体内に侵入すると、局所においてマクロファージや樹状突起細胞といった抗原提示細胞(APC)によって貪食され、プロセッシングされて抗原ペプチドとなる。APCはこれをクラスII主要組織適合抗原(MHC)を介してT細胞表面のT細胞抗原レセプターに提示し、これを認識することにより、T細胞ではおもにTH₂型細胞が分化されてくる。このTH₂型細胞から産生されるのがIL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13といったサイトカインであり、このうちIL-4, IL-13はB細胞に作用してIgEへのクラススイッチングを誘導する。さらに、IL-4はT細胞そのものに対してもTH₂型への分化、増殖能を有している。また、IL-4はマスト細胞に対する活性化能も有しており、IL-4とIL-13はアレルギー発症に関し

サイドメモ IgEの産生機構

IgEの産生は、まずgermline ϵ transcriptとよばれる非翻訳性の転写産物が発現されることから始まる。これにより、IgEのクラススイッチングが開始されるが、このプロセスにはIL-4あるいはIL-13の刺激が必要かつ十分であることがわかっている。続いて、免疫グロブリン遺伝子上のS μ とS ϵ 間がループアウトされて除去されるswitch recombinationが起こり、その結果できた部分が転写、翻訳されてIgEが産生される。このrecombinationの過程にもIL-4やIL-13が必要だと考えられているが、それだけでは十分でなく、さらにCD40リガンドが必須だと考えられている。

Association between allergy and polymorphisms in IL-4 and IL-13 signal-transducing molecules
Rie SUGIMOTO and Kenji IZUHARA: 九州大学大学院医学系研究科臨床分子医学講座

て中心的な役割を果たしていると考えられている。IL-4とIL-13は共通の生物活性を発揮することが知られているが、T細胞に対するTH₂への分化・増殖作用はIL-4に特異的であり、IL-13には認められない。これは、T細胞においてIL-13R α 1がmRNAレベルでは発現しているにもかかわらず、蛋白質レベルでは発現していないためだと考えられている⁹⁾。

このような免疫担当細胞に対する作用に加え、最近あらたにIL-4、IL-13が非免疫系細胞に対しても直接作用し、これがアレルギー発症機序に深く関与していることが判明した。気管支喘息の発症には、気道粘膜組織の改変が病態形成の大きな一端を占めている。最近、モデルマウスを用いた実験によりIL-4、IL-13が肺の組織に特異的に発現するだけで気管支喘息様の病態が形成されること、IL-13の作用を阻害すると免疫担当細胞に関係なく気管支喘息様の病態は形成されなくなることが示されている⁵⁻⁷⁾。これらはIL-4、IL-13が直接肺組織に作用して気管支喘息の発症に関与していることを示すものである。著者らが行った免疫染色の結果では、肺組織において気管支平滑筋および気道上皮細胞にIL-13R α 1が強く発現していた⁸⁾。著者らは、局所で産生されたIL-13が気道上皮細胞や気管支平滑筋細胞上のIL-13Rに結合して、ケモカインの産生、細胞増殖、気道粘膜の肥厚といった気管支喘息の病態形成に関与しているのではないかと考えている。このように、従来考えられたようにIL-4、IL-13のシグナル伝達分子はアトピー原因遺伝子であると同時に、あらたに喘息遺伝子でもある可能性が示唆された。

■ IL-4、IL-13のシグナル伝達機構^{9,10)} (図1)

IL-4、IL-13は他のサイトカインと同様に細胞膜上に発現したレセプターに結合することにより、細胞内にシグナルを伝達する。IL-4レセプターには2つのタイプが存在し、そのひとつはIL-4R α 鎖とIL-2R γ 鎖よりなるtype I IL-4Rであり、もうひとつはIL-4R α 鎖とIL-13R α 1鎖とのヘテロ二量体よりなるtype II IL-4Rである。IL-4がIL-4R α と結合した後、第2のレセプターコンポーネントと会合することが後述のシグナル伝達に必須である。type II IL-4RはIL-13とも

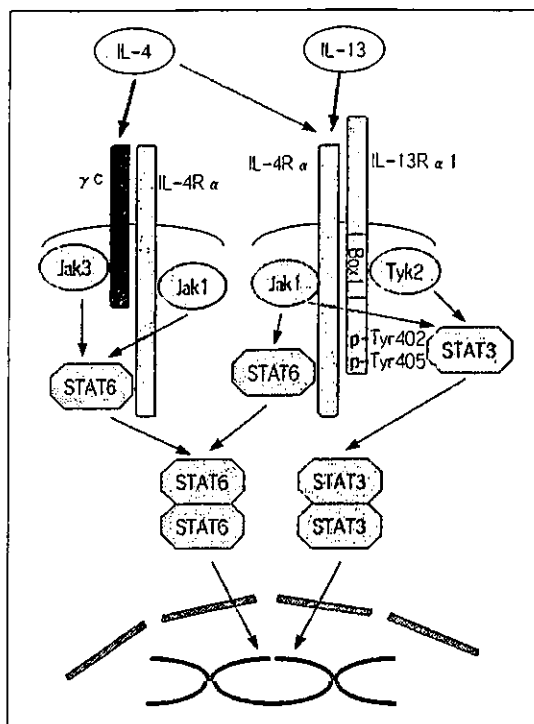


図1 IL-4、IL-13シグナル伝達機構^{9,10)}

IL-4、IL-13シグナル伝達機構のうちJak-STAT経路について示す。

レセプターにリガンドが結合することによって、Jakファミリーの相互リン酸化、STAT分子のリン酸化を起こす。

結合できるため、IL-13Rでもある。そのほかに、IL-13が結合しうる分子としてIL-13R α 2が存在する。IL-13R α 2はIL-13との結合能はIL-13R α 1よりも強いものの細胞内ドメインをほとんど欠いているため、シグナルを伝えないと考えられている。リガンド結合によってヘテロ二量体を形成したレセプターは、多くのシグナル伝達分子を活性化することが知られているが、これらはJak-STAT経路とPI-3キナーゼ経路に大別される。このうちJak-STAT経路の場合、チロシンキナーゼであるJak分子が活性化され、それに引き続き転写因子であるSTAT分子が活性化される。このさいに、IL-2R γ 鎖にはJak3が、IL-13R α 1鎖にはTyk2がそれぞれ恒常的に結合しており、さらにIL-4、IL-13刺激によりJak1がIL-4R α と会合する。レセプターの会合により、たがいが近傍に位置することによってJak分子およびレセプ

ターは相互にリン酸化を起こす。IL-4、IL-13刺激によりIL-4R α がチロシンリン酸化されると、STAT6がSH2ドメインを介してIL-4R α のリン酸化されたチロシン残基に結合した後、それ自身がリン酸化されホモ二量体を形成し核内に移行して、いろいろな遺伝子転写を増強する。STAT6の標的遺伝子としては、B細胞においてはMHC class II 遺伝子のほか germline C ϵ 遺伝子、STAT6 遺伝子そのものなどがあげられる。

最近著者らは、IL-4、IL-13はIL-13R α 1を介してSTAT6に加えてSTAT3を活性化すること、IL-13R α 1のC末端側のチロシン残基がSTAT3の結合部位であることを同定している¹⁰⁾。今後、STAT3がIL-4、IL-13の生物活性においてどのような役割を果たしているかを解明することが課題だと考えている。

■IL-4の遺伝的多型

1994年にMarshらは、アメリカのアーミッシュの家族において血清総IgE値と第5染色体5q31.1領域に連鎖があることを報告した¹⁾。続いて、オランダの家族においても5q31-q33領域とアトピー性喘息、血清IgE値の連鎖が観察された¹¹⁾。この領域には、いわゆるTh2サイトカインとよばれるIL-4、IL-5、IL-9、IL-13などの遺伝子が存在する。このうち、IL-4遺伝子の5'非翻訳領域内の-589(論文中では-590となっている)の位置にCからTへの変異を示す多型が存在し、これがアトピーと連鎖を示した¹²⁾。この-589の変異によってTTCCという転写因子Etsの結合領域ができる。この配列の近傍にはGGAGAAというNFAT-1結合領域が存在し、ここに結合したNFAT-1がこのあらたに生じたEtsの認識領域とも結合することによってその結合の安定性を増し、IL-4に対する転写活性を高めるためではないかと考えられている¹³⁾(図2)。この配列は、小児の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎と関連しているという報告もされている¹⁴⁾。

■IL-4R α 鎖の遺伝的多型

1996年、Danielsらはアトピー性喘息患者の全染色体に対する連鎖解析を行い、血清中のIgE値および気道過敏性と第16染色体短腕に相関があることを報告した¹⁵⁾。この16番短腕上にはIL-

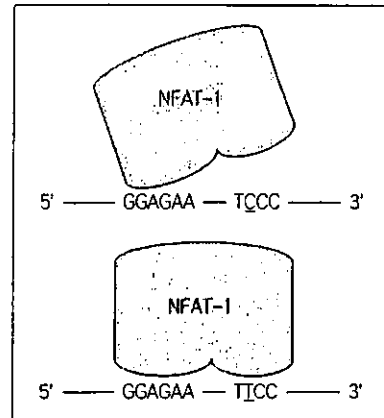


図2 IL-4遺伝子のアトピー型プロモーターの機能的影響(文献¹³⁾より改変)

IL-4遺伝子の-589のC(正常型)がT(アトピー型)に置換するとTTCCというEts結合領域ができ、近傍のGGAGAAというNFAT結合部分に加えてNFAT-1が結合できるようになり、その結合の安定性が増すと考えられている。

4R α 遺伝子が存在する。IL-4R α 遺伝子領域に限定した連鎖解析によっても、アトピーとこの領域とに相関が認められることが示されており¹⁶⁾、IL-4R α はアトピーの原因遺伝子である可能性が示されていた。いままでにIL-4R α の遺伝的多型は7カ所存在することが同定されているが¹⁷⁾、著者らは細胞外領域に存在する50番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換される遺伝的多型がアトピーと関連することを示している^{18,19)}。まず、著者らは50番目のアミノ酸多型の頻度を日本人のアトピー性喘息患者、健康人および非アトピー性喘息患者で比べたところ、アトピー性喘息患者において有意にイソロイシン型のホモ接合型が多かった(表1)。また、血清IgEの値との関連においてもIgEが400IU/mlを超える群において、やはりイソロイシンのホモ接合型の頻度がバリン型より高かった。さらに、この多型が機能的にIL-4シグナルに影響を与えているかを確認するためにイソロイシン型、バリン型のIL-4R α をマウスおよびヒトのB細胞株に発現させた。この細胞にI ϵ 遺伝子のプロモーター領域をつないだレポーター遺伝子を同時に発現させ、IL-4刺激によるI ϵ プロモーター領域の転写活性を比較した(図3)。その結果、イソロイシン型ではバリ

表 1 IL-4R α 遺伝子の遺伝的多型 (Ile 50 Val) と気管支喘息, 血中総 IgE 値, 特異的 IgE 値との関連¹⁸⁾

表現型	total	Ile 50/Ile 50	Ile 50/Val 50	Val 50/Val 50	
正常型	120	20	57	43	
喘息群	アトピー性 (成人)	120	55	37	28
	アトピー性 (小児)	120	67	33	20
	非アトピー性 (成人)	120	20	55	45
血清 IgE 値 (<400 IU/ml)	220	40	100	80	
血清 IgE 値 (>400 IU/ml)	260	122	82	56	
抗ダニ抗体 陰性	240	51	109	80	
抗ダニ抗体 陽性	240	111	73	56	

50 番目のアミノ酸がイソロイシン型のホモ接合型 (50 II), イソロイシン, バリンのヘテロ接合型 (50 IV), バリンのホモ接合型 (50 VV) の出現頻度を, 健常群, 喘息患者群について解析した。さらに, 血中総 IgE 値, 抗ダニ抗体陽性群との関連についても解析した。アトピー性喘息小児患者, アトピー性喘息成人患者では, 健常群, 非アトピー性成人に比べ, 50 II の出現頻度が高くなっていた。また血中 IgE 高値群, 抗ダニ抗体陽性群でも 50 II の頻度が高かった。

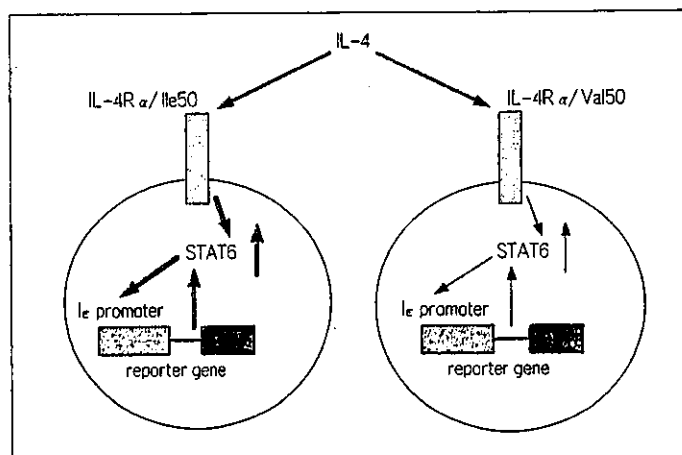


図 3 Ile50Valの機能的解析の模式図¹⁹⁾

50 番目のアミノ酸がイソロイシン型の IL-4R α 鎖を発現させた細胞株では, バリン型の IL-4R α 鎖を発現させた細胞株に比べて IL-4 の刺激による STAT6 の活性化, I ϵ プロモーター領域の転写活性の増強が起こっていた。

ン型に比べて刺激による転写活性が増加していた¹⁹⁾。また, IL-4R のシグナル伝達に必要な転写因子である STAT6 の活性化をゲルシフトアッセイを用いて比較したところ, 同様にイソロイシン型ではバリン型に比べて約 2 倍の活性化の増加を認めた。さらに, 健常人の末梢血単核球を IL-4 で刺激したところ, IL-4R の 50 番目のアミノ酸がイソロイシン型のホモ接合型であるヒトの単核球では, バリン型のホモ接合型のヒトに比べて約 3 倍の IgE 産生増加を認めた¹⁹⁾。これらの結果より, 50 番目のアミノ酸の遺伝的多型が機能的な

面においてもアトピーと関係することが証明された。50 番目のアミノ酸置換により IL-4 反応性に相違が生じるメカニズムとして, IL-4 と IL-4R α の結合親和性にイソロイシン型とバリン型で差があるためではないかと考えて, これらのレセプターと IL-4 との結合実験を行ったが, 両者の親和性に差異は認められなかった¹⁹⁾。このため, 現時点でその詳細な機序は不明である。

50 番目のアミノ酸における遺伝的多型とは別に, IL-4R α の細胞内領域に存在する 551 番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンに変わる多

表2 IL-13 遺伝子の遺伝的多型と気管支喘息との関連²⁾

Gln/Gln と Gln/Arg の Arg/Arg に対するオッズ比		
日本人		
アトピー性喘息	1.85 (1.05~3.24)	$p=0.033$
非アトピー性喘息	1.77 (1.01~3.10)	$p=0.047$
喘息	1.81 (1.11~2.93)	$p=0.013$
イギリス人		
アトピー性喘息	1.83 (1.13~2.99)	$p=0.014$
喘息	2.14 (1.28~3.60)	$p=0.003$
重症喘息	2.31 (1.33~4.00)	$p=0.003$

日本人、イギリス人の両者において、健康群に比べて、アトピー性喘息群、非アトピー性喘息群の両者では110番目のアミノ酸がグルタミン型のホモ接合体、あるいはヘテロ接合体である頻度が有意に高かった。

型が高IgE血症や重症アトピー性皮膚炎と関連していると報告されたが²⁰⁾、著者らや他のグループが検討した限りではこの遺伝的多型の違いによるIL-4シグナルに差を認めず^{19,21)}、この多型のアトピー発症へ関与は不明である。

■IL-13の遺伝的多型

著者らは、日本の学童から採取したDNAを用いてIL-13のプロモーターおよび翻訳領域における遺伝的多型の有無をsingle strand conformation polymorphism (SSCP)法を用いて解析した結果、110番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに変わる遺伝的多型が存在することを同定した。さらに日本人、イギリス人の両方のグループにおいてアトピー、非アトピーにかかわらず健康群に比べ、喘息患者群においてグルタミン型の頻度がアルギニン型に比べて有意に高いことを同定した(表2)²⁾。また、グルタミン型のヒトの血清中のIL-13の値がアルギニン型のヒトのものに比べ高値を示した。これらのことは、この多型が気管支喘息の原因遺伝子であることを示唆している。人種差を超えて喘息発症に寄与していることが示されたのは、この多型がはじめてである。コンピュータモデリングの結果、この多型はIL-13Rとの結合に影響を与えるのではないかと予想され

ている。現在、著者らはこの2つの型のIL-13を発現、精製し、その機能に違いがあるかどうか解析を行っている。

■おわりに

アレルギー疾患における原因遺伝子の検索は、まだ端緒についたばかりである。これまで同定された遺伝病のような単一遺伝子異常によるものと異なり、こうした多因子からなる疾患の場合、分子生物学的手法と遺伝学的手法を合わせた解析が求められている。現在、SNP(一塩基多型)を同定するプロジェクトが世界的に動こうとしており、今後このような解析がますます必要になってくると思われる。

文献

- 1) Marsh, D. G. et al. : *Science*, **264** : 1152-1156, 1994.
- 2) Turki, J. et al. : *J. Clin. Invest.*, **95** : 1635-1641, 1995.
- 3) 出原賢治 : 臨床免疫。(印刷中)
- 4) Graber, P. et al. : *Eur. J. Immunol.*, **28** : 4286-4298, 1998.
- 5) Wills-Karp, M. et al. : *Science*, **282** : 2258-2261, 1998.
- 6) Grüning, G. et al. : *Science*, **282** : 2261-2263, 1998.
- 7) Zhu, Z. et al. : *J. Clin. Invest.*, **103** : 779-788, 1999.
- 8) Heinzmann, A. et al. : *Hum. Mol. Genet.* (in press)
- 9) Izuhara, K. and Shirakawa, T. : *Int. J. Mol.*, **3** : 3-10, 1999.
- 10) Umeshita, R. et al. : (submitted)
- 11) Meyers, D. A. et al. : *Genomics*, **23** : 464-470, 1994.
- 12) Rosenwasser, L. J. et al. : *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156** : S152-S155, 1997.
- 13) 稲村弘明・他 : 喘息, **11** : 51-58, 1998.
- 14) Noguchi, E. et al. : *Clin. Exp. Allergy*, **28** : 449-453, 1998.
- 15) Daniels, S. E. et al. : *Nature*, **83** : 247-250, 1996.
- 16) Deichmann, K. A. et al. : *Clin. Exp. Allergy*, **8** : 151-155, 1998.
- 17) 杉本理想, 出原賢治 : 感染, 炎症, 免疫, **28** : 268-270, 1998.
- 18) Mitsuyasu, H. et al. : *Nature Genet.*, **19** : 119-120, 1998.
- 19) Mitsuyasu, H. et al. : *J. Immunol.*, **162** : 1227-1231, 1999.
- 20) Hershey, G. K. K. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **337** : 1720-1725, 1997.
- 21) Wang, H. Y. et al. : *J. Immunol.*, **162** : 4385-4389, 1999.

* * *

4. IgE 産生の分子調節機構

4.1 はじめに

アトピー性疾患の発症にはアレルゲン特異的な IgE が免疫抗体として重要な役割を果たしている。IgE 免疫応答系が駆動されるためには、まず特定のアレルゲンに対する T 細胞レセプター (TCR) をもつナイーブ CD4⁺T 細胞が樹状細胞から MHC クラス II 分子拘束性の抗原提示を受けて Th2 細胞に分化する必要がある。次いで、Th2 細胞が同一アレルゲンに対する B 細胞レセプター (BCR) をもつ成熟 B 細胞から抗原提示を受けると、TCR/CD3 複合体と CD28 の活性化を介して IL-4 や IL-13 などのサイトカインが産生されると共に、CD40 リガンド (CD40L, CD154) という TNF スーパーファミリーに属する膜タンパク質も発現される (図 3.4.1)。このような T 細胞ヘルプを介して B 細胞上の IL-4 レセプター (IL-4R) または IL-13R と CD40 とが活性化されると、BCR である IgM は IgE ヘクラススイッチされ、最終的には IgE 産生細胞への分化が誘導される。ここでは、IgE 産生の分子調節機構について、ヒト B 細胞における最近の知見を紹介する。

4.2 IL-4/IL-13R シグナリング

機能的な IL-4R 複合体は IL-4R α 鎖 (IL-4R α , CD124) と他のサブユニットから構成されるヘテロダイマーであり (図 3.4.2)、またその会合サブユニットが IL-2R γ (γ c, CD132) であるものはタイプ I IL-4R, IL-13R α 1 であるものはタイプ II IL-4R と呼ばれている¹⁾。IL-13R α には IL-13R α 1 (CD213a1) と IL-13R α 2 (CD213a2) の 2 種類のサブタイプが存在するが、IL-13R α 2 は細胞内領域が極めて短いので、シグナルを伝達しないおとりのレセプターであると考えられている。これに対して、IL-13R α 1 は IL-4R α とヘテロダイマーを形成するので、タイプ II IL-4R は IL-13R としても機能している。B 細胞はタイプ I とタイプ II IL-4R を発現しているが、IL-13R α 2 は発現されていない。

サイトカインの細胞内シグナル伝達には複数の経路が関与しており、このうち JAK - STAT 経路が重要な役割を果たしていることはよく知られている。IL-4R α には JAK1、 γ c には JAK3、IL-13R α 1 には TYK2 がそれぞれ恒常的に結合しているので、IL-4/IL-13 はこ

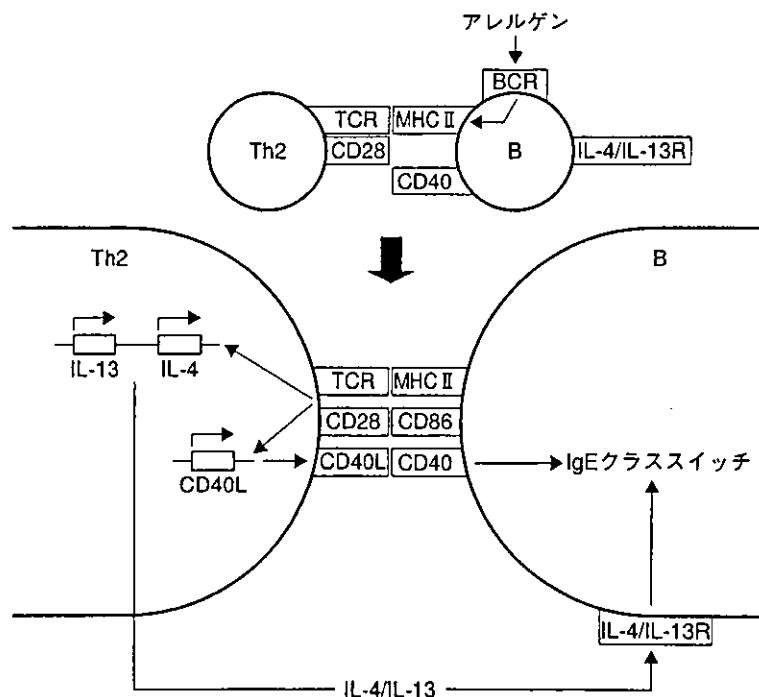


図 3.4.1 IgE 産生の誘導を媒介する Th2-B 細胞間相互作用

これらのJAKを活性化することによって、まずIL-4R α の細胞内領域のチロシン残基をリン酸化する。次いで、細胞質に存在するSTAT6がそのSrc homology 2 (SH2) ドメインを介してIL-4R α のリン酸化部位に結合する。さらに、IL-4R α に結合したSTAT6がチロシンリン酸化を受けると、IL-4R α から解離すると共に、ホモダイマーを形成して核内に移行する。最終的には、IL-4/IL-13応答性遺伝子のプロモーターに存在するSTAT6結合配列に結合し、その結果、各種応答遺伝子の転写が促進される。このように、IL-4R α はSTAT6の活性化に関わるIL-4RとIL-13Rの共有サブユニット

である。

IL-4R α の細胞内部分には、JH (JAK homology) をもつJAK1との結合に必要なBox1領域のみならず、インスリンレセプターと相同性を示すinsulin/IL-4 receptor (I4R) と呼ばれる領域も存在する (図3.4.3)。I4R領域のAsn-Pro-X-Tyr (NPXY) モチーフにはPTB (phosphotyrosine binding) ドメインをもつinsulin receptor substrate (IRS), Src homologous and collagen (Shc) あるいはIL-four receptor interacting protein (FRIP) などのいわゆるアダプター分子が会合するが^{2,3)}、B細胞はFRIPを除いて、IRSとShcを発現し

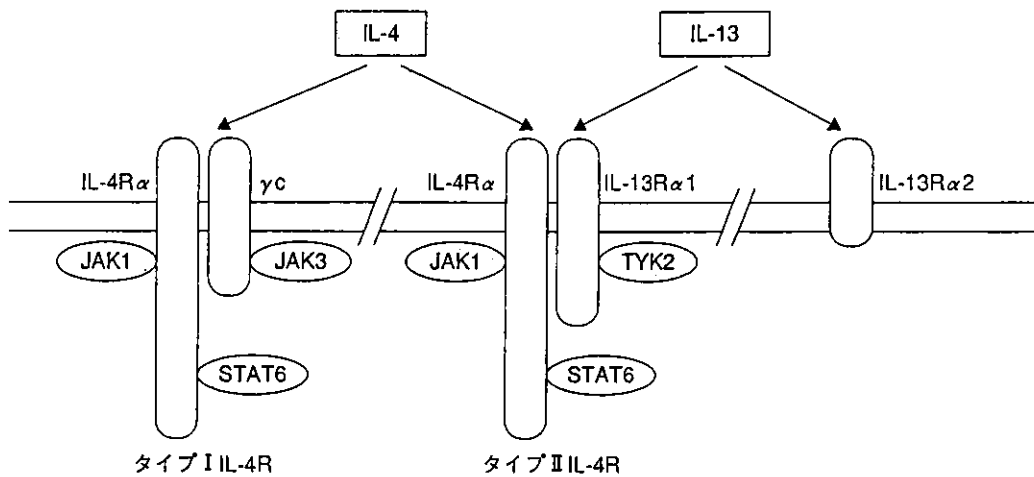


図3.4.2 IL-4/IL-13の結合サブユニットと機能的なIL-4/IL-13R複合体

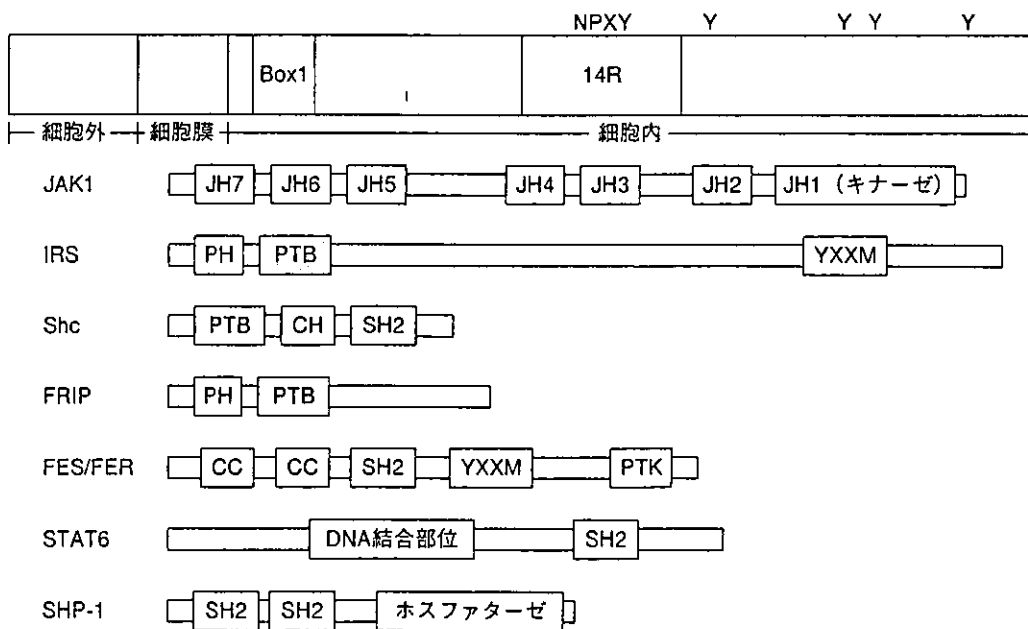


図3.4.3 IL-4R α の細胞内部分に会合する分子群

ている。IRSはFRIPと同様、PH (pleckstrin homology) ドメインも有しており、またこのドメインはイノシトールリン脂質あるいはイノシトールリン酸と結合するので、これらの細胞膜への局在性の調節に関与している。また、IRSにはphosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) が会合し、この酵素の脂質産物であるPI3,4,5-P₃依存性のPKCアイソザイムが活性化される。PI3Kはp85調節サブユニットとp110触媒サブユニットから構成されるヘテロダイマーである。このうち、p85サブユニットはそのSH2ドメインを介してIRSに存在するTyr-X-X-Met (YXXM) モチーフと結合する。また、PI3Kの活性化にはIRSと同様なYXXMモチーフをもつfesプロトオンコジーン産物のFESチロシンキナーゼファミリー (FES/FER) も関与している⁹⁾。FESファミリー分子はCC (coiled coil) ドメインを介してBox1とI4Rの中間領域に会合するアダプター分子である。しかし、PI3Kの活性化にIRSとFESファミリーのいずれが関わっているのかについては、B細胞の分化段階で異なっているようである。例えば、末梢血や扁桃の成熟B細胞ではFESファミリーのFERがPI3Kの活性化に関与しており、またIRSの代わりにShcがアダプター分子として機能している⁹⁾。Shcに関しては、そのCH (collagen homologous) ドメインとphospholipase C γ 1 (PLC γ 1) との会合を介してDAG (1,2-diacylglycerol) 依存性のprotein kinase C (PKC) アイソザイムが活性化される。IL-4R α のNPXYモチーフに結合するIRSとShcとの識別機構の相違について

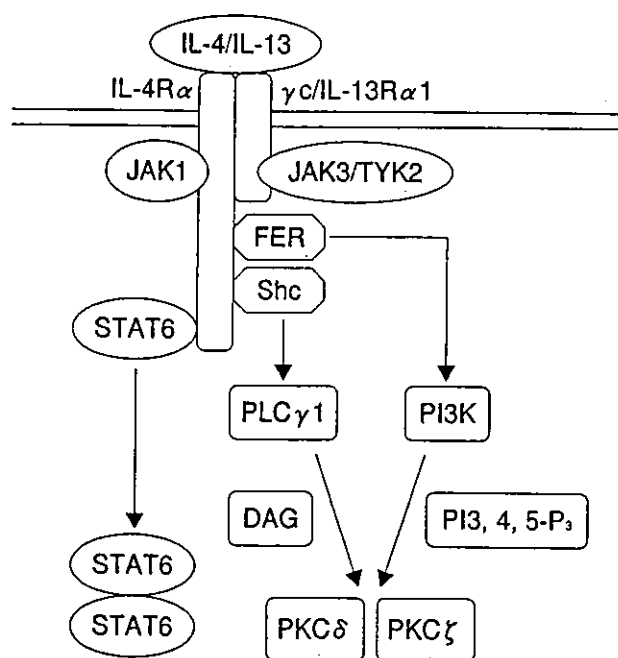


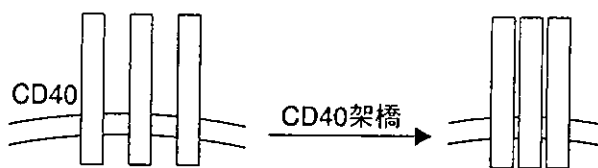
図 3.4.4 IL-4/IL-13 シグナル伝達経路

は、不明な点が多いが、IL-4 や IL-13 による IgE クラススイッチの促進には JAK - STAT 経路に加えて、アダプター分子 - PKC 経路も関与している (図 3.4.4)。また、IL-4 による STAT6 の活性化は IL-4R α の細胞外部分における 50Ile-Val 多型の影響を受け、例えばアトピー喘息患者で頻度が高い Ile 型は正常者で頻度が高い Val 型に比べて数倍強く STAT6 を活性化する⁹⁾。

4.3 CD40 シグナリング

IgE クラススイッチの誘導には、IL-4R や IL-13R の活性化に加えて、CD40L のカウンターレセプターである CD40 の活性化が必要である。このことは、CD40L の遺伝子異常が免疫グロブリンのクラススイッチを障害して X 染色体性高 IgM 症候群を引き起こすことから明らかである。CD40 が可溶性 CD40L や抗 CD40 抗体によって架橋されると、TNF receptor-associated factor (TRAF) ファミリーメンバー (TRAF2, 3, 5, 6)、LYN キナーゼおよび JAK3 などの CD40 会合分子が活性化される (図 3.4.5)⁷⁻⁹⁾。TRAF 分子の下流には MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケード、LYN の下流には PLC γ 2 や PI3K、また JAK3 の下流には STAT3 がそれぞれ位置している。これらのシグナル伝達分子は NF- κ B、AP-1 および c-Jun の活性化を介して細胞増殖や抗アポトーシス作用などに関与しているが、NF- κ B を含めていずれの転写因子もクラススイッチに必須ではないことは、すでに多くの解析結果から示されている。

一方、CD40 には DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) の構成成分である Ku70 と Ku80 も会合しており¹⁰⁾、また例えば IL-4 と抗 CD40 抗体の共刺激により CD40 から解離して核内に移行し、最終的には IgE クラススイッチに際して切断された DNA の修復に関与する。このような共刺激は、またスイッチ組換え酵素



TRAF タンパク質	TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6
キナーゼ	LYN, JAK3, PI3K, PKC, NIK, MEK, ERK, JNK
転写因子	NF- κ B, AP-1, STAT3, Elk-1, c-Jun
核内因子	Ku70, Ku80

図 3.4.5 CD40 の架橋を介して活性化される各種分子

の上位に位置する activation-induced cytidine deaminase (AID) というユニークな RNA 編集酵素の発現も誘導する¹¹⁾。従って、IgE クラススイッチを媒介する DNA の切断と修復には IL-4/IL-13R シグナルと CD40 シグナルとの協調作用が必要である(図 3.4.6)。しかし、AID の発現誘導シグナルと DNA 修復タンパク質の活性化シグナルが共通しているか否かについては、CD40 シグナル伝達系の詳細も含めて、現在まだ明らかではない。

4.4 IgE クラススイッチのメカニズム

免疫グロブリン重鎖 ($\mu, \delta, \gamma, \epsilon, \alpha$) と軽鎖 (κ, λ) の可変部は抗原特異性を規定しているが、各重鎖の定常部 (C_H) はアイソタイプ特異的な生理活性の発現に関わっている。 C_H 遺伝子は重鎖可変部遺伝子断片群 (V_HDJ_H) の下流に $C_\mu - C_\delta - C_\gamma 3 - C_\gamma 1 - C_\alpha 1 - C_\gamma 2 - C_\gamma 4 - C_\epsilon - C_\alpha 2$ の順に配列されており、さらに $C_\gamma 1$ と $C_\alpha 1$ との間には C_ϵ の偽遺伝子 ($C_{\psi\epsilon}$) が、また $C_\alpha 1$ と $C_\gamma 2$ との間には C_γ の偽遺伝子 ($C_{\psi\gamma}$) がそれぞれ挿入されている(図 3.4.7 上段)。各 C_H 遺伝子の上流には、 C_δ と $C_{\psi\gamma}$ を除いて、スイッチ (S) 領域と呼ばれる特徴的な反復配列が存在するが、 $C_{\psi\epsilon}$ の上流に位置する S_ϵ は

エクソンの一部が欠失している。さらに、各 S 領域の上流には、 $C_{\psi\epsilon}$ の S_ϵ を除いて、未熟な germline C_H 転写物の発現に関わる intervening (I) エクソンが位置しており、またこの上流には転写開始活性をもつ I_H プロモーターが存在する。クラススイッチとは、 μ 鎖の可変部配列、すなわち抗原特異性を変えることなく、 $S_\mu - S_\gamma, S_\mu - S_\alpha$ あるいは $S_\mu - S_\epsilon$ 組換えを介して C_δ 以外の C_H 遺伝子が再構成される現象である。このような DNA 組換えによって C_μ が C_γ, C_α あるいは C_ϵ に置換され、アイソタイプ特異性が獲得される。

IgE クラススイッチでは(図 3.4.7 下段)、まず IL-4 や IL-13 刺激による I_ϵ プロモーターの活性化を介して I_ϵ, S_ϵ および C_ϵ をコードしている DNA が RNA に転写され、次いで S_ϵ のスプライシングによって I_ϵ と C_ϵ が連結した germline C_ϵ 転写物が発現される。このような転写物が発現されることによって IgM から IgE へのクラススイッチの方向性が決定される。さらに、CD40L の付加刺激によって AID の発現が誘導され、また AID の下位にはスイッチ組換え酵素が位置している。実際、AID 遺伝子に変異があると、免疫グロブリンのクラススイッチが障害されて常染色体劣性高 IgM 症候群が引き起こされる¹²⁾。スイッチ組換え酵素

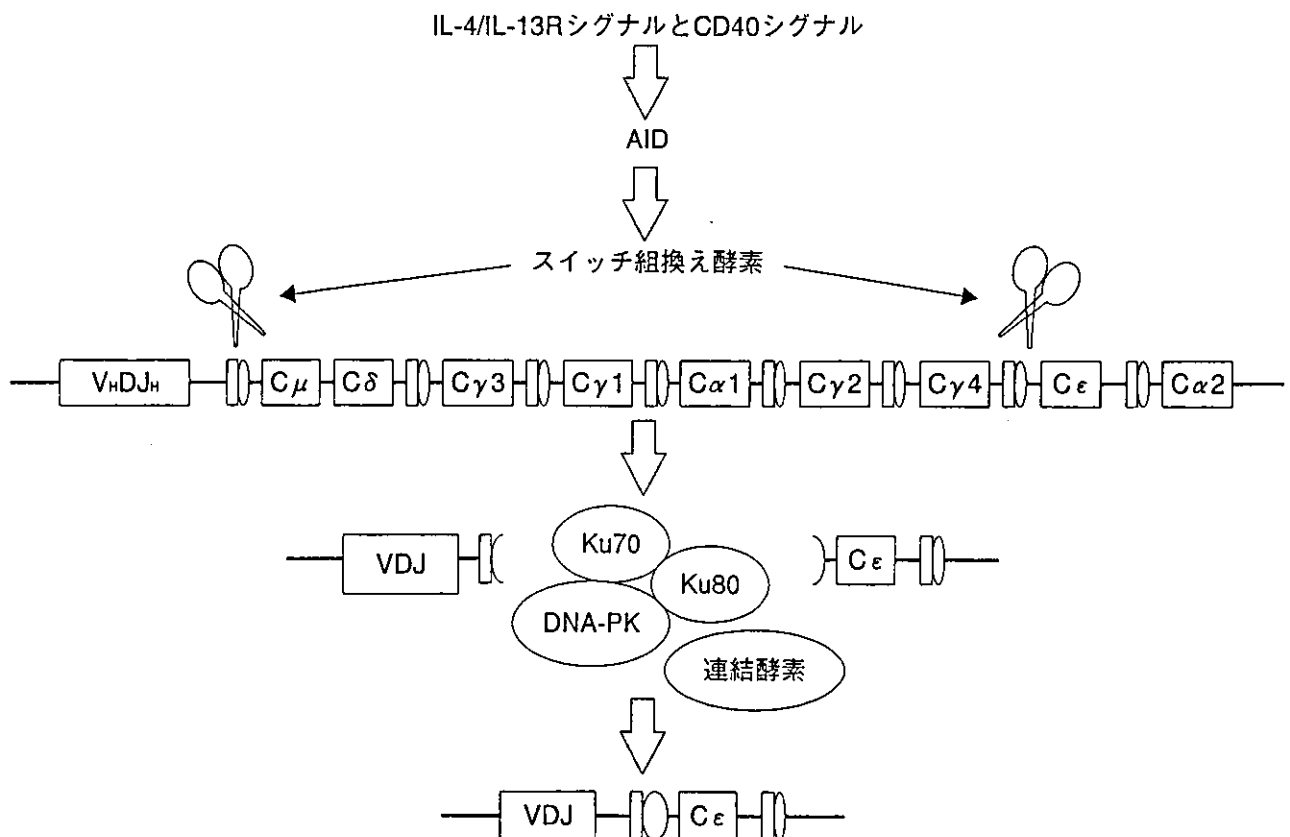


図 3.4.6 IgE クラススイッチを媒介する DNA の切断と修復

はまだ同定されていないが、IgE クラススイッチに関しては、AIDの発現に依存してS μ -S ϵ 組換えが誘導され、また両S領域間に存在するC μ 、C δ およびC γ などの遺伝子群が環状化DNAとして染色体からループアウトされ、その結果可変部をコードしている遺伝子群がC ϵ 遺伝子のすぐ上流に転座する。最終的には、RNA転写とスプライシングにより可変部とC ϵ が連結した成熟C ϵ mRNAが発現され、 ϵ 鎖タンパク質に翻訳される。

4.5 I ϵ プロモーターと転写因子

IgE クラススイッチに先行する germline C ϵ 転写物の発現には、IL-4やIL-13によるI ϵ 転写が必要であり、またI ϵ プロモーターにはC/EBP, STAT6, PU.1, NF- κ BおよびBSAP/Pax5などに対する結合配列が存在

する(図3.4.8)。これらの転写因子のうち、STAT6はC/EBP β , PU.1あるいはNF- κ B1と会合することによってI ϵ の転写活性をさらに増強する^{13,14)}。また、PU.1とNF- κ B1の結合部位はコア配列を共有する形でオーバーラップしている。IL-4やIL-13は細胞内Ca²⁺のレベルを上昇させないので、PI3KやShcの下流に位置するCa²⁺非依存性のPKC δ (novel PKC)とPKC ζ (atypical PKC)がPU.1の活性化に関与している¹⁶⁾。また、IL-4やIL-13によるI ϵ の転写活性はShcの変異体やPI3K, PKC δ およびPKC ζ の各特異的阻害剤のみならず、PKC δ とPKC ζ の各ドミナントネガティブ体によっても抑制される。NF- κ Bに関しては、CD40を介してNIK(NF- κ B-inducing kinase)依存的に活性化されることはよく知られているが、TRAF3依存的に活性化されるERKの下流もI ϵ 転写の増強に関与してい

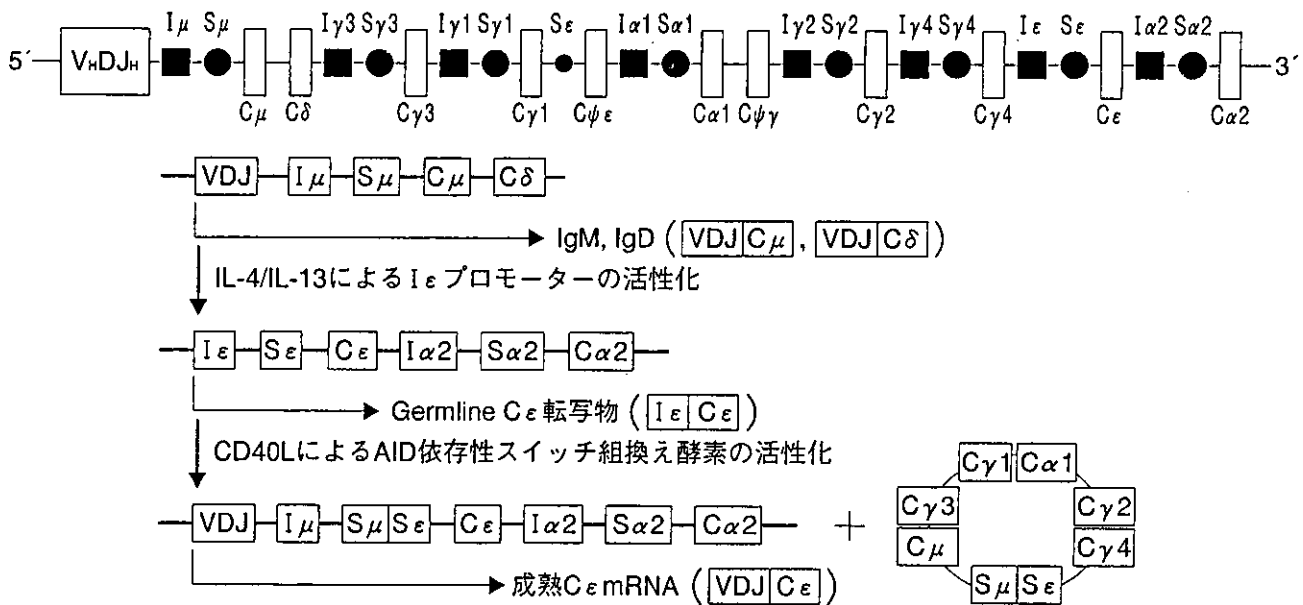


図3.4.7 CH遺伝子の配列(上段)とS μ -S ϵ 組換えによるIgEクラススイッチ(下段)

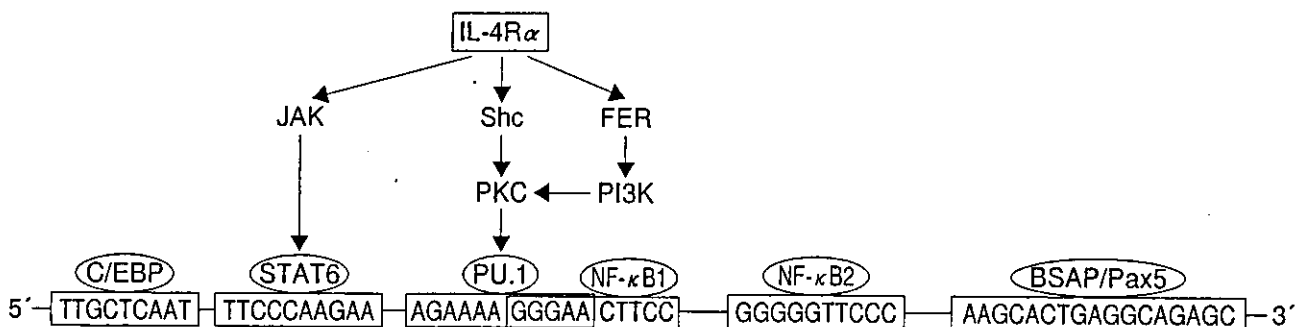


図3.4.8 I ϵ プロモーターに結合する各種転写因子

る¹⁶⁾。C/EBP に関しては、複数のアイソフォームが存在し、このうち C/EBP β には I ϵ プロモーターの活性化作用があり、これは C/EBP β が STAT6 の DNA 結合を安定化するためと考えられている。一方、C/EBP γ は転写活性ドメインを欠失した抑制性のアイソフォームであり、その過剰発現は I ϵ 転写活性を逆に抑制する。B 細胞は C/EBP β と C/EBP γ の両者を発現しているので、これらのアイソフォーム間のバランスが I ϵ 転写の調節に関わっている可能性が示唆されている¹⁶⁾。BSAP/Pax5 は B 細胞系列に特異的に発現される分化調節因子であるが、I ϵ 転写に対する要求性の有無については、用いた細胞株や解析手法の違いによりその結果が異なっている。また、IL-4R α や CD40 を介するシグナルが C/EBP アイソフォームと BSAP/Pax5 の活性調節に関与しているか否かについては、不明な点が多い。いずれにしても、I ϵ プロモーターの各結合配列を単に数回繰り返しただけのレポーター遺伝子では IL-4 や IL-13 に対する応答性は認められないので、I ϵ 転写には STAT6 と他の転写因子との協調作用が重要であることは明らかである。

I ϵ 転写と IgE クラススイッチとの関係については、まだ明確な結論は出されていない。現在、提唱されている有力な仮説によれば¹⁷⁾、まず I ϵ 、S ϵ および C ϵ

の転写産物からスプライシングされた S ϵ を含むイントロン RNA が S ϵ の鋳型 DNA と安定な複合体を形成し、次いでこの複合体中の RNA がリボヌクレアーゼによって切断され、最終的にはスイッチ組換え酵素の標的となり得る DNA 高次構造が形成されるという可能性が示唆されている (図 3.4.9)。したがって、germline C ϵ 転写の際にスプライシングされた S ϵ RNA が IgE クラススイッチの促進に重要な役割を果たしていると推測される。

4.6 germline C ϵ 転写の抑制

チロシンリン酸化を介したシグナル伝達は、一般的にはホスファターゼによる脱リン酸化反応を介して終結する。例えば、IL-4 や IL-13 による STAT6 の活性化は、リン酸化を受けた IL-4R α に会合する SH2 domain-containing phosphatase (SHP)-1 によって負に調節される (図 3.4.3 参照)。また、JAK - STAT 経路を終結させる SHP-1 以外の分子としては、cytokine-inducible SH2-protein (CIS) ファミリーに属する suppressor of cytokine signaling (SOCS) /STAT-induced STAT inhibitor (SSI) 分子が知られている。現在、8 種類の CIS ファミリー分子が同定されており¹⁸⁾、これらのうち SOCS-1/SSI-1 はリン酸化された JAK ファミリーのすべ

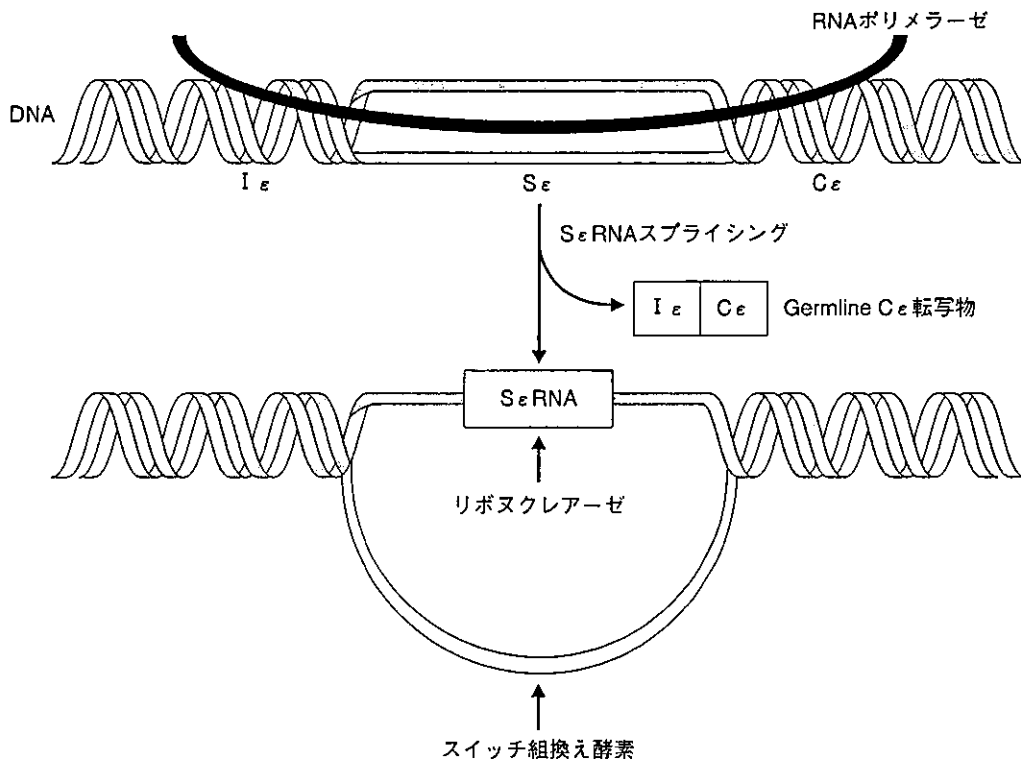


図 3.4.9 germline C ϵ 転写と IgE クラススイッチとの関係