

ンの役割について解明されることが期待される。さらに、がんや自己免疫疾患において、セマフォリンを標的とした治療開発への発展が期待される。

- 1) Suzuki, K., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 17–23.
- 2) Luo, Y., Raible, D., & Raper, J.A. (1993) *Cell*, **75**, 217–227.
- 3) Pasterkamp, R.J. & Kolodkin, A.L. (2003) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 79–89.
- 4) Nogi, T. et al. (2010) *Nature*, **467**, 1123–1127.
- 5) Gu, C. et al. (2005) *Science*, **307**, 265–268.
- 6) Suzuki, K. et al. (2007) *Nature*, **446**, 680–684.
- 7) Kumanogoh, A. et al. (2000) *Immunity*, **13**, 621–631.
- 8) Kumanogoh, A. et al. (2002) *Nature*, **419**, 629–633.
- 9) Kruger, R.P., Aurandt, J., & Guan, K.L. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 789–800.
- 10) Toyofuku, T. et al. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 435–447.
- 11) Takegahara, N. et al. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 615–622.
- 12) Wang, X. et al. (2001) *Blood*, **97**, 3498–3504.
- 13) Besliu, A. et al. (2011) *Autoimmunity*, **44**, 427–436.
- 14) Shi, W. et al. (2000) *Immunity*, **13**, 633–642.
- 15) Kumanogoh, A. et al. (2005) *Immunity*, **22**, 305–316.
- 16) Nakagawa, Y. et al. (2011) *J. Immunol.*, **186**, 2881–2888.
- 17) Karasuyama, H. et al. (2011) *Annu. Rev. Immunol.*, **29**, 45–69.
- 18) Watarai, H. et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **105**, 2993–2998.
- 19) Kaifu, T. et al. (2003) *J. Clin. Invest.*, **111**, 323–332.
- 20) Sarris, M. et al. (2008) *Immunity*, **28**, 402–413.
- 21) Catalano, A. (2010) *J. Immunol.*, **185**, 6373–6383.
- 22) Yamamoto, M. et al. (2008) *Int. Immunol.*, **20**, 413–420.
- 23) Serini, G. et al. (2009) *Angiogenesis*, **12**, 187–193.
- 24) Takahama, Y. (2006) *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 127–135.
- 25) Choi, Y.I. et al. (2008) *Immunity*, **29**, 888–898.
- 26) Takamatsu, H. et al. (2010) *Nat. Immunol.*, **11**, 594–600.
- 27) Lammermann, T. et al. (2008) *Nature*, **453**, 51–55.
- 28) Stoitzner, P. et al. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 117–125.

高松 漂太¹, 熊ノ郷 淳²

(¹ 大阪大学医学部呼吸器・免疫アレルギー内科,
大阪大学免疫学フロンティア研究センター
感染病態分野,

² 大阪大学医学部呼吸器・免疫アレルギー内科,
大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

Involvement of semaphorins in immune regulations
Hyota Takamatsu¹ and Atsushi Kumanogoh² (¹Department of Respiratory Medicine, Allergy and Rheumatic Disease, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan; ²Department of Immunopathology, World Premium International Research Center, Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

アレルギー発症における thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の作用

1. アレルギー疾患は Th2 型免疫応答により生じる

われわれの免疫系は生体へ侵入した抗原の種類によって適切な免疫応答を選択することができる。外来抗原を認識して免疫応答の誘導を担っているのが樹状細胞 (dendritic cell, DC) である。DC には機能的可塑性があり、認識する病原体や組織からの環境シグナルに応じて異なる免疫応答を誘導する¹⁾。例えばウイルスや細胞内寄生細菌が侵入してきた場合は細胞傷害性応答を高めるためのインターフェロン (IFN)- γ を分泌する Th1 型細胞を誘導し、寄生虫の侵入に対しては虫体排除に有用な IgE と好酸球動員に必要なインターロイキン (IL)-4, 5, 13 を分泌する Th2 型細胞を誘導する。アレルギーとは本来無害な外来抗原 (= アレルゲン) に対し生体が過敏に反応する状態である。気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患はアレルゲンに対して免疫系が Th2 型免疫応答をすることによって引き起こされるが、アレルゲンを認識した DC による Th2 型免疫応答誘導機構は完全には解明されていない²⁾。

DC に Th2 型免疫応答を誘導させるような組織からの環境シグナルとして上皮細胞が産生するサイトカイン thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が注目されている。TSLP はアレルギー疾患患者の病変組織で高発現しており、また遺伝子改変マウスを用いた解析により TSLP の作用が抗原特異的アレルギー疾患モデルに必要なことが明らかにされてきた^{3,4)}。しかしながら、TSLP の細胞内シグナル伝達の解析はこれまで十分ではなく、実際にどのような分子基盤が Th2 型免疫応答誘導を担っているのかは不明であった。

2. TSLP とその受容体

TSLP は IL-2 ファミリーに属するサイトカインであり、IL-7 に最も相同性が高い。主な産生細胞は胸腺、扁桃、気管、皮膚、消化管上皮細胞などの上皮細胞である。産生は炎症性サイトカインと Th2 サイトカインとの協調作用や Toll 様受容体 (TLR) リガンド刺激、物理的ストレスなどで広く誘導される⁵⁾。また、タンパク質アレルゲンの一種としても知られるパパインによるプロテアーゼ受容体 (protease activated receptor-2, PAR-2) の活性化によって好

塩基球からも産生される⁶⁾。

TSLPの受容体はTSLP受容体鎖(TSLPR)とIL-7受容体 α 鎖(IL-7 α)とのヘテロ二量体であり、TSLPの結合によりSTAT3やSTAT5の活性化が生じることが知られてきた³⁾。

3. アレルギー疾患におけるTSLPの役割

ヒトでは機能的TSLP受容体はCD11c⁺骨髄系樹状細胞(mDC)に高発現しており、TSLPはmDCを強力に活性化することができる^{7,8)}。典型的なmDC活性化因子である微生物由来TLRリガンドやCD40リガンドと同様に主要組織適合抗原(MHC) class IIや共刺激分子のCD80, CD86, 活性化マーカーのCD83, DC-lysosomal associated membrane protein (LAMP)などの発現を誘導し、強力なT細胞増殖能を付与する。しかし、TLR/CD40リガンドがTh1分化誘導因子であるIL-12やI型IFNを誘導するのに対して、TSLPはこれらを誘導しない⁹⁾。その代わりにTh2分化因子のOX40リガンド(OX40L)を細胞膜上に誘導し、またTh2-遊走ケモカインであるthymus- and activation-regulated chemokine (TARC, CCL17)やmacrophage-derived chemokine (MDC, CCL22)を大量に産生させる^{9,10)}。TSLP

で刺激したmDCはTh2分化、Th2メモリー細胞の維持とともにIFN- γ , IL-5, IL-13を分泌するCD8⁺T細胞の誘導も行う³⁾。ヒト肥満細胞や好酸球もTSLP受容体を発現することが示されており、TSLPは単独あるいは炎症性サイトカインとの共刺激によりサイトカインIL-5, IL-6, IL-13, GM-CSFやケモカインIL-8, I-309 (CCL1)などの産生を誘導する^{5,11)}。また、喘息モデルマウスにおいてTSLPはNKT細胞に作用してIL-13の産生を誘導する¹²⁾。このように、アレルゲンや微生物感染刺激によって上皮細胞や好塩基球から産生されたTSLPはまずDC、肥満細胞、好酸球、NKT細胞などの自然免疫細胞に作用して、さまざまな液性因子を誘導し初期の炎症反応を形成した後、DCを介したTh2型獲得免疫応答を誘導する(図1a)。

4. プライマリーDCを用いたTSLPシグナルの解析

TSLPによる細胞内シグナル伝達の解析は従来、主にマウス細胞やTSLP受容体の過剰発現細胞株にて行われ、転写因子STAT3とSTAT5の活性化が知られてきた³⁾。しかしこれだけでは、ヒトDCで観察されるTSLPのユニークな生物作用を合理的に説明することができなかった。そこで、実際にヒトDCにおけるTSLPシグナル伝達を明らか

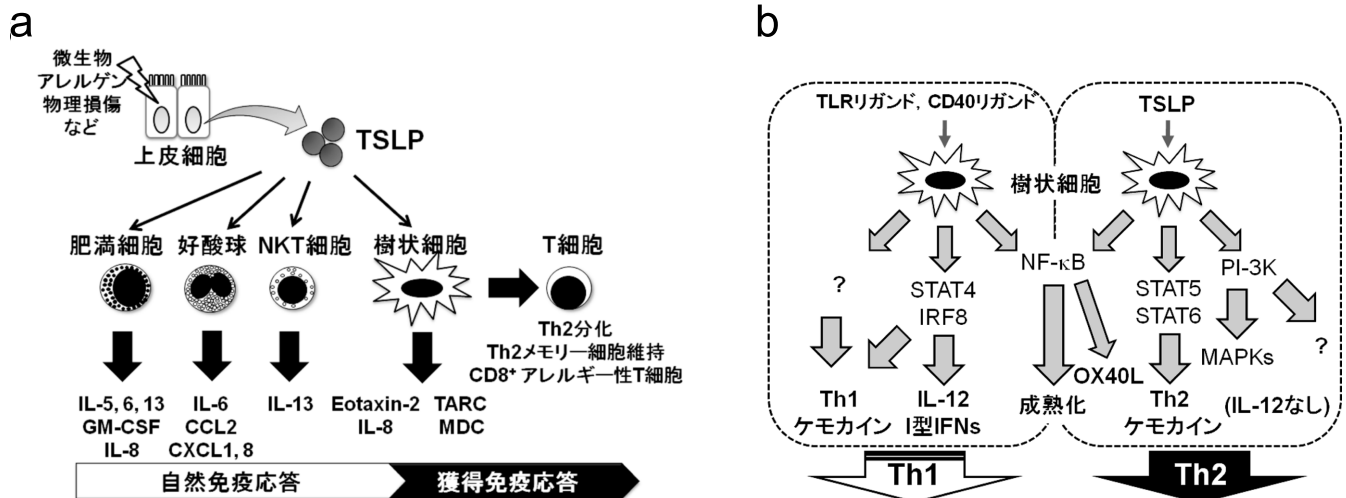


図1 TSLPによるTh2型免疫応答誘導の機序

a. 微生物感染やアレルゲンなどで傷害された上皮細胞から産生されたTSLPは肥満細胞、好酸球、NKT細胞、樹状細胞(DC)に作用してさまざまなサイトカイン、ケモカインを産生し、顆粒球系細胞の動員を促す。DCは二次リンパ組織に遊走し、T細胞に対してTh2分化などの作用を惹起する。

b. 典型的なDC活性化刺激であるTLRリガンドやCD40リガンドはNF- κ B活性化によるDC成熟化とともにSTAT4, IRF8の同時発現を介したIL-12やI型IFNの産生を誘導することでTh1型免疫応答を誘導する。一方、TSLPもNF- κ B活性化によるDC成熟化を誘導するものの、p50優勢の活性化によってTh2分化因子OX40Lの発現を誘導する。STAT4, IRF8の発現は誘導されないためIL-12産生は生じない。さらにSTAT6の直接活性化によるTh2ケモカイン(TARCなど)の産生を通してTh2型免疫応答を誘導・増強する。

にするため、われわれはヒトの末梢血単核球中におよそ 0.5% 以下の頻度でしか存在しない mDC における細胞内シグナル伝達の解析を行った¹³⁾。技術的には磁気ビーズとセルソーティングを組み合わせることで 99% 以上の純度で mDC を分離できるが、最大の関門はその収量の低さであった。白血球除去を行っていない輸血用献血血液 1 パックから $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ 個程度の mDC しか分離できないため、複数ドナー由来の mDC をプールして解析に用いた。

4.1. TSLP は広汎な STAT を活性化する

TSLP がヒトプライマリー DC において活性化する STAT を調べたところ、全く予想しなかったことに、STAT2 を除くすべての STAT (1, 3, 4, 5, 6) が TSLP によってチロシンリン酸化を受けることが分かった (図 2a)。これらは刺激後 5 分以内に誘導され、2 時間後でも引き続き観察された。一方、IL-7, GM-CSF, IFN- β などで刺激した場合は刺激後 30 分程度で STAT5 のチロシンリン酸化は消失した (図 2b)。すなわち、TSLP は他のサイトカインに比べて、mDC を長時間刺激し続けることが可能であった。活性化される STAT のうち、STAT6 は一般的には IL-4 受容体 α 鎖 (IL-4R α) に結合する IL-4, IL-13 のみが活性化できると考えられてきた。実際に mDC において抗 IL-4R α 阻害抗体を加えておくと IL-4 による STAT6 リン酸化は完全に抑えられたが、TSLP による STAT6 活性化は全く影響を受けなかった。チロシンリン酸化の迅速なカイネティクスからも TSLP は STAT6 およびその他の STAT を受容体直下で直接活性化していると考えられた。

Th2-遊走性ケモカインの一つである TARC の産生は STAT6 依存的であることが上皮細胞、マクロファージ、T 細胞などで知られている¹⁴⁾。そこで TSLP 刺激を行った mDC においてクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を行ったところ、STAT6 と TARC プロモーターの結合が確認できた。このことより、TSLP で刺激した DC の特徴の一つである TARC 産生は STAT6 の直接的な活性化によって制御されていると考えられた。

4.2. TSLP は JAK1, JAK2 キナーゼを活性化する

一般に、STAT のチロシンリン酸化は JAK ファミリーキナーゼにより生じる。しかし、先行するマウス TSLP のシグナル解析においてはいずれの JAK も関与が否定されていた³⁾。ところがヒト mDC では、TSLP 刺激により JAK1, JAK2 の迅速かつ持続するチロシンリン酸化が検出できた (図 2b)。機能的にも JAK 阻害剤により STAT の活性化は完全に抑制されることから、少なくともヒト mDC ではこれら JAK 分子が TSLP による STAT 活性化の

責任キナーゼであると思われる (図 2c)。

さらに、DC の機能に影響を与え得るシグナル経路として PI-3K 経路により活性化される AKT や MAPK 経路の ERK, JNK の活性化も誘導されることが分かった。各種キナーゼ阻害剤を用いてこれらシグナル経路の相互依存関係を調べたところ、JAK キナーゼ阻害が STAT 活性化のみならず、広汎に AKT, ERK 活性化も抑制した (図 2c)。すなわち、TSLP 刺激によって生じる JAK1, JAK2 の活性化は STAT のみならず多彩な細胞内シグナル伝達経路の活性化に寄与していると考えられた。

4.3. TSLP で活性化した DC は IL-12 を産生しない

典型的 DC 活性化刺激である TLR リガンドや CD40 リガンドは DC の成熟化を誘導すると同時に DC から Th1 分化因子である IL-12 の産生を誘導する (図 1b)¹⁾。DC の成熟化と IL-12 産生はいずれも NF- κ B に依存しており、両者は共役していると考えられていたので、TSLP が mDC を強力に成熟化させるにも関わらず IL-12 産生を“脱”共役していることは TSLP による DC 活性化シグナルがユニークであることを示していた。しかし、TSLP は TLR リガンド刺激による IL-12 産生を抑制できないことから (図 2d)、TSLP シグナルが積極的に IL-12 産生を抑制しているのではなく、TLR/CD40 リガンド刺激から IL-12 産生へと至る経路が TSLP 刺激では活性化されていないと考えられた。DC において IL-12 産生をポジティブに制御することが知られているいくつかの分子の発現を mDC にて調べたところ、interferon regulatory factor (IRF)-8 と STAT4 の同時発現は IL-12 産生を誘導する TLR リガンド刺激にて誘導されるものの、TSLP 刺激では弱い STAT4 発現が見られるのみであった (図 2e)。実際に、ヒト mDC において RNA 干渉実験を行い、IRF8 や STAT4 の同時発現を抑えると TLR リガンドによる IL-12 産生誘導は抑制されるものの、DC 成熟化の指標である CD80 の発現誘導には影響がなかった (図 2f)。すなわち、典型的 DC 活性化における DC 成熟化と IL-12 産生の共役は IRF8 や STAT4 の同時発現によって担保されていたのである。TSLP 刺激は両者の発現を強力に誘導できないため IL-12 産生は脱共役していると考えられた。

4.4. TSLP による NF- κ B 経路の活性化と OX40L の発現誘導

DC の成熟化には NF- κ B 経路が中心的な役割を果たすと考えられている¹⁵⁾。実際にヒト mDC の培養に TSLP を加えると 3 時間以内に IkB α の発現量の低下が認められ、9 時間以降 NF- κ B 分子 (RelB, p52, p50) の核移行が観察

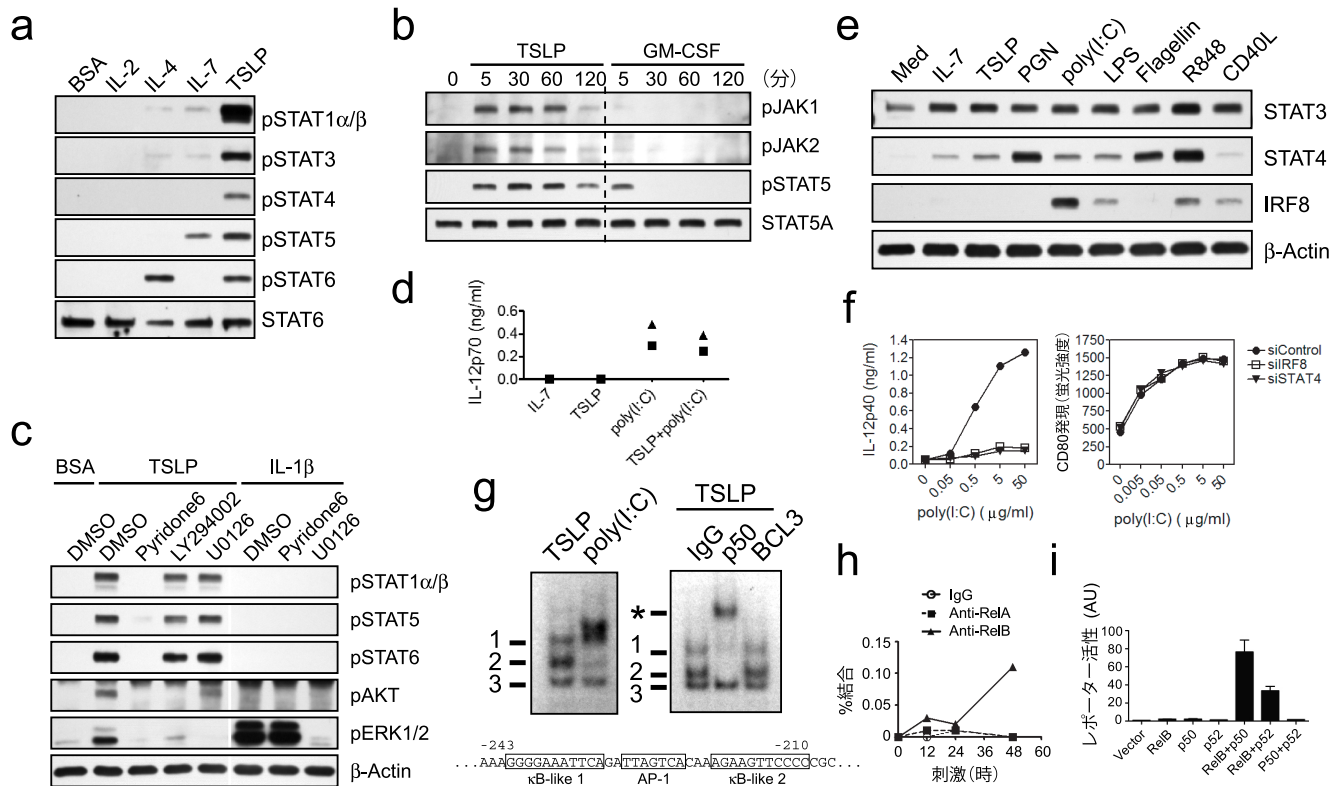


図2 プライマリー DC を用いた TSLP シグナルの解析

- a. 各種サイトカインによる mDC における STAT 活性化能の比較. IL-4 は STAT6, IL-7 は STAT5 を優先的に活性化するが, TSLP は STAT1, 3, 4, 5, 6 を強力に活性化する.
- b. mDC に作用する代表的サイトカイン GM-CSF では刺激後 5 分のみ弱い JAK1, JAK2, STAT5 のチロシンリン酸化が認められ, 30 分以降は検出できなかった. 一方, TSLP では刺激後 5 分から 120 分まで, JAK1, JAK2, STAT5 の強力なチロシンリン酸化が検出できた.
- c. TSLP は STAT 以外に AKT, ERK の活性化も誘導した. JAK 阻害剤 Pyridone6 は TSLP による STAT, AKT, ERK の活性化をほぼ完全に抑制した. PI-3K 阻害剤 LY294002 は STAT 活性化には影響せず, AKT, ERK の活性化を阻害した. MEK 阻害剤 U0126 は STAT, AKT の活性化は阻害せず, ERK の活性化を阻害した. JAK 非依存的サイトカインである IL-1 β による ERK 活性化は Pyridone6 では阻害できなかった.
- d. mDC からの IL-12 産生は TLR3 リガンドである poly(I:C) によって誘導されるが, TSLP では誘導できない. poly(I:C) 依存的 IL-12 産生は TSLP によって抑制されない.
- e. mDC における STAT4 や IRF8 の発現は主に TLR リガンド (PGN (TLR2), poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), Flagellin (TLR5), R848 (TLR8)), CD40 リガンドによって誘導されるが, TSLP は低レベルの STAT4 しか誘導できない.
- f. RNA 干渉により mDC において STAT4, IRF8 の発現を抑制したところ poly(I:C) による IL-12 産生は抑制されたが, DC 成熟化の指標である CD80 の細胞表面上の発現は全く影響を受けなかった.
- g. OX40L 遺伝子の開始コドンから -243 から -210 塩基上流に潜在的 NF- κ B 結合サイトがあり, この配列をプローブとしてゲルシフトアッセイを行うと, TSLP で刺激した mDC の核抽出物は poly(I:C) で刺激した場合とは異なる結合パターンを示した(左). 複合体 1 と 3 は両刺激に共通であったが, 複合体 2 は TSLP 刺激に特徴的であった. この複合体 2 には p50 が含まれていることがスーパーシフトアッセイ (*, 右) により示された.
- h. 同領域には TSLP 刺激 48 時間後 RelB が結合することがクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により示された.
- i. OX40L 遺伝子の開始コドンより上流 400 塩基を結合したルシフェラーゼレポーター遺伝子と, 各種 NF- κ B 分子を HEK293T 細胞に一過性共発現させてルシフェラーゼ活性を測定した. 同レポーターは RelB と p50 により強力に活性化された. 縦軸は Arbitrary Unit (A.U.).

される。さらに既知の NF- κ B 標的遺伝子 (IkB α , RelB など) の発現誘導も TLR/CD40 リガンド刺激と同様に TSLP 刺激により認められる。興味深いことに TSLP による p50 の核移行は TLR/CD40 リガンド刺激に比して遷延する傾向にあった。これらより、TSLP は NF- κ B 経路を活性化し得ると考えられるが、これが TSLP 受容体から直接生じるのか、あるいは何らかのタンパク質新生を介して生じているのかは明らかでない。TSLP で刺激した mDC は 48 時間以内に Th2 分化因子の OX40L を発現する¹⁰⁾。一方、TLR/CD40 リガンド刺激では OX40L が発現しない。OX40L 遺伝子のプロモーター領域に NF- κ B の結合配列があり、この領域には TSLP 刺激特異的な p50 を中心とする NF- κ B 複合体が結合することがゲルシフトアッセイにより明らかになった (図 2g)。また刺激 48 時間以降に RelB が結合することが ChIP 法で明らかになった (図 2h)。実際にこの領域を含む OX40L プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の上流に結合させたレポーターコンストラクトは RelB と p50 の共発現により強力に活性化されたこと (図 2i) から、TSLP による特異的 OX40L の誘導には RelB と p50 の活性化が寄与していると考えられた。

5. 今後の展望

プライマリー DC を用いてシグナル解析を行うことで、従来説明がつかなかった TSLP の生物作用に一応の分子基盤が与えられた (図 1b)。しかしなぜ単一のサイトカインがこのように幅広い細胞内シグナル伝達経路を活性化するのは今後の生化学的課題である。とはいえ、TSLP はアレルゲン侵入などによる上皮ダメージを免疫系に伝える役割をしており、ヒト TSLP 受容体の発現は mDC、肥満細胞、好酸球といった細胞に限られている (図 1a)。よって、TSLP の機能障害はアレルゲン侵入による免疫応答の最上流を選択的に阻害することになるので、新たなアレルギー治療戦略として非常に有望であると思われる。

謝辞

一連の研究は著者が Yong-Jun Liu 博士 (米国 MD アンダーソン癌センター) の研究室にて行ったものであり、博士のご指導に感謝する。

- 1) Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000) *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 767–811.
- 2) Pulendran, B., Tang, H., & Manicassamy, S. (2010) *Nat. Immunol.*, 11, 647–655.

- 3) Liu, Y.J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.H., de Waal Malefyt, R., Omori, M., Zhou, B., & Ziegler, S.F. (2007) *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 193–219.
- 4) Ziegler, S.F. & Artis, D. (2010) *Nat. Immunol.*, 11, 289–293.
- 5) Allakhverdi, Z., Comeau, M.R., Jessup, H.K., Yoon, B.R., Brewer, A., Chartier, S., Paquette, N., Ziegler, S.F., Sarfati, M., & Delespesse, G. (2007) *J. Exp. Med.*, 204, 253–258.
- 6) Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., & Medzhitov, R. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 310–318.
- 7) Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu, M., Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., & Bazan, J.F. (2001) *J. Immunol.*, 167, 336–343.
- 8) Lu, N., Wang, Y.H., Wang, Y.H., Arima, K., Hanabuchi, S., & Liu, Y.J. (2009) *J. Exp. Med.*, 206, 2111–2119.
- 9) Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., de Waal-Malefyt, R., Bazan, F., Kastelein, R. A., & Liu, Y.J. (2002) *Nat. Immunol.*, 3, 673–680.
- 10) Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X., Yao, Z., Cao, W., & Liu, Y.J. (2005) *J. Exp. Med.*, 202, 1213–1223.
- 11) Wong, C.K., Hu, S., Cheung, P.F., & Lam, C.W. (2010) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 43, 305–315.
- 12) Nagata, Y., Kamijuku, H., Taniguchi, M., Ziegler, S., & Seino, K. (2007) *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 144, 305–314.
- 13) Arima, K., Watanabe, N., Hanabuchi, S., Chang, M., Sun, S.C., & Liu, Y.J. (2010) *Sci. Signal.*, 3, ra4.
- 14) Fulkerson, P.C., Zimmermann, N., Hassman, L.M., Finkelman, F.D., & Rothenberg, M.E. (2004) *J. Immunol.*, 173, 7565–7574.
- 15) Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B.M., Brennan, F.M., & Feldmann, M. (2001) *Int. Immunol.*, 13, 675–683.

有馬 和彦

(佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野)

The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic response

Kazuhiko Arima (Division of Medical Biochemistry, Department of Biomolecular Sciences, Saga Medical School, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan)

精神遅滞における樹状突起スパイン形態異常とそのシグナル伝達機構

1. はじめに

脳神経細胞は互いの結合部位であるシナプスによって接触し、伝達を行い、様々な刺激条件の下でシナプス数は増