

〔総説〕

アトピー性喘息病態への細胞内サイトカインシグナル抑制因子の関与

九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

井上博雅

アトピー性喘息の病態には Th2 サイトカインが関与している。このサイトカインシグナルを抑制的に制御する機構の中に SOCS (suppressor of cytokine signaling) ファミリー分子と SPRED (sprouty-related protein with EVH-1 domain) ファミリー分子がある。SOCS3 は IL-12 依存性の STAT4 活性化に抑制的に働くことにより Th2 分化を亢進することにより、SPRED-1 は IL-5 依存性の ERK 活性化を抑制して、アレルギー性喘息反応の制御に重要な役割を担っている。

Key words : allergy — asthma — cytokine — SOCS — SPRED — Th2

はじめに

有病率が年々増加している気管支喘息の病態には、好酸球・肥満細胞・Tリンパ球などの種々の細胞浸潤を伴う気道炎症が関与している。CD4⁺T細胞は、主にIFN γ を産生するTh1細胞と、IL-4やIL-5等を産生するTh2細胞のサブセットに分けられる。アレルギー疾患の発症機序として、このTh1細胞とTh2細胞のバランスが崩れ、生体内でTh2細胞優位の状態が引き起こされる可能性が提唱されている。近年、免疫反応におけるCD25⁺CD4⁺T細胞やTr1、Th3などの調節性T細胞の重要性、CD8⁺T細胞の関与なども注目されているが、アレルギー性炎症が概ねTh2タイプであることは多くの基礎的、臨床的知見が積み重ねられ疑問

の余地はないものと考えられる。実際、喘息患者の気道に浸潤しているリンパ球の多くは、活性化しIL-4、IL-5、IL-13を産生するTh2細胞である¹⁾。すなわち、IL-4/IL-5/IL-9/IL-13などのTh2サイトカインはアレルギー疾患の発症に大きな役割を担っている。

これらのサイトカインは細胞膜上の受容体に結合し、受容体が活性化すると、JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) 系、Ras-Raf/ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 系、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt系などのシグナルが働くことにより応答遺伝子発現が亢進し、サイトカインの作用が発現する。これまで、細胞内サイトカインシグナルはこのような促進性シグナルについての解析が進められてきた。しかし、生体には反応を沈静化するさらに複雑なシグナルの制御機構が存在し、正と負の制御機構間でのクロストークがバランスを巧妙に制御している。このような内因性抑制性分子として、SOCS (suppressor of cytokine signaling) や SPRED (sprouty-related protein with EVH-1 domain) 分子の存在が報告されている。本稿では、アレルギー性喘息の病態に注目してSOCS²⁾やSPREDの役割を解説し、アレルギー疾患発症の人為的コントロールの可能性について考える。

ALLERGIC ASTHMA AND INTRINSIC INHIBITORS OF CYTOKINE SIGNALING

Hiromasa Inoue

Research Institute for Disease of the Chest, Graduate School of Sciences, Kyushu University

Abbreviations : **ERK** extracellular signal-regulated protein kinase ; **EVH-1** Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology-1 ; **JAK** Janus kinase ; **MEK** MAPKK/ERK kinase ; **MKP** MAPK phosphatase ; **PI3K** phosphatidylinositol 3-kinase ; **PIAS** protein inhibitors of activated STATs ; **SHP** SH2-containing phosphatases ; **SO** son of sevenless ; **SOCS** suppressor of cytokine signaling ; **SPRED** sprouty-related protein with EVH-1 domain ; **STAT** signal transducer and activator of transcription
井上博雅：九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設〔〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1〕
E-mail : inoue@kokyu.med.kyushu-u.ac.jp

SOCSとアレルギー性喘息

JAK/STATシグナルの抑制には、SH2-containing phosphatases (SHP), protein inhibitors of activated STATs (PIAS), suppressors of cytokine signaling (SOCS) などが知られている³⁾。SOCSファミリー⁴⁾⁻⁶⁾

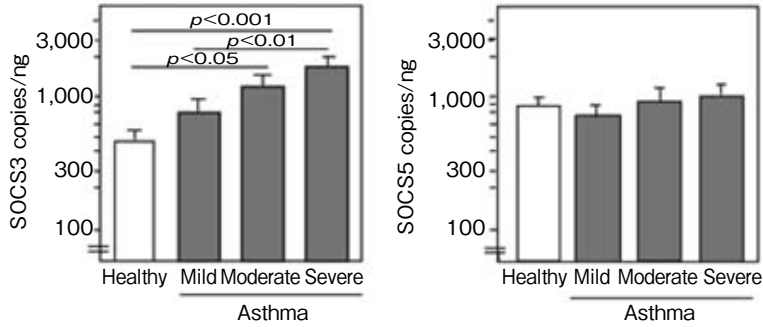


Fig. 1. Expression of SOCS3 in T cells from asthmatics.¹⁸⁾

Peripheral CD3⁺T cells were isolated from asthmatics and healthy controls, and the expression of SOCS3 were measured by real time quantitative RT-PCR.

に関しては、分子中央のSH2ドメインとC末端側のSOCS-boxという構造の類似性から8個のSOCS分子(CIS, SOCS1~SOCS7)が明らかとなっている。これらのSOCS分子は、サイトカインによって誘導され、分子中央にあるSH2ドメインを介して、リン酸化したサイトカイン受容体に結合することにより、あるいはJAKのチロシンキナーゼに結合することによって、サイトカインシグナルを抑制することが明らかにされている⁷⁾。これまでの研究で、各SOCSは種々のサイトカインによりその発現誘導がコントロールされ、様々なサイトカインシグナルを抑制することが報告されている⁸⁾。

上述のように、アレルギー性喘息の病態には、このTh2細胞の選択的活性化が深く関与していると考えられる⁹⁾¹⁰⁾。すなわち、IL-4はTh2細胞の分化増殖に必須であり、さらにB細胞のIgE産生、肥満細胞の増殖及び活性化を引き起こす。IL-5は好酸球の分化、成熟及び活性化、それによる気道好酸球炎症を惹起する。IL-9は気道上皮の杯細胞化生などの気道過分泌に、IL-13は内皮細胞のVCAM-1発現や気道上皮細胞でのCCケモカインであるeotaxin発現による好酸球やT細胞の気道への浸潤を惹起し、気道過敏性亢進、気道過分泌に関与することにより喘息病態を成立させている^{11)~13)}。

naïve T細胞からTh2細胞への分化にはIL-4によるSTAT6の活性化が関与し、一方Th1細胞への分化にはIL-12によるSTAT4及びIFN- γ によるSTAT1の活性化が関与している。さらに下流では、T boxタイプの転写因子T-betは、Th1細胞特異的に発現し、Th1細胞としての性質の維持にきわめて重要な役割を果た

し、zinc-finger型の転写因子GATA-3は、Th2細胞に特異的に発現し、Th2サイトカインの産生とTh1細胞分化抑制を介してTh2細胞分化を誘導していると考えられる¹⁴⁾¹⁵⁾。

Th1/Th2細胞への分化にはサイトカイン環境が影響していることから、サイトカインシグナル抑制因子であるSOCSがこの分化機構に作用している可能性が考えられる。Th1細胞およびTh2細胞におけるSOCSファミリー分子の発現を解析した報告では、T細胞分化過程において非常に特徴的で、それぞれ異なったパターンを呈することが示されている。すなわち、SOCS3がTh2細胞選択的に、SOCS5がTh1細胞に選択的に発現している¹⁶⁾。一方、SOCS1がTh1細胞に、SOCS3がTh2細胞に高発現しているとの報告もある¹⁷⁾。

我々は、アトピー性喘息患者の末梢血T細胞での各SOCSの発現を解析した。SOCS1やSOCS5などは健康者と認められなかったが、SOCS3は喘息患者で高値であり、重症度が増すにつれSOCS3発現が亢進していた(Fig.1)¹⁸⁾。さらに、末梢血T細胞でのSOCS3発現は、Th2型反応のマーカーでもある血中IgEレベルと相関していた。

そこで、T細胞特異的にSOCS3を過剰発現する(Lck-SOCS3 Tg)マウスのT細胞を用いてTh1/2分化や喘息モデルを解析した。Lck-SOCS3 Tg由来T細胞では非特異的刺激によりIL-4発現が増強しIFN- γ 発現が减弱していた。アレルギー性喘息反応を解析すると、抗原感作曝露したコントロールマウスでは気道過敏性亢進が認められたが、OVA感作曝露SOCS3 Tgマウスの気道過敏性はさらに顕著に亢進していた。ま

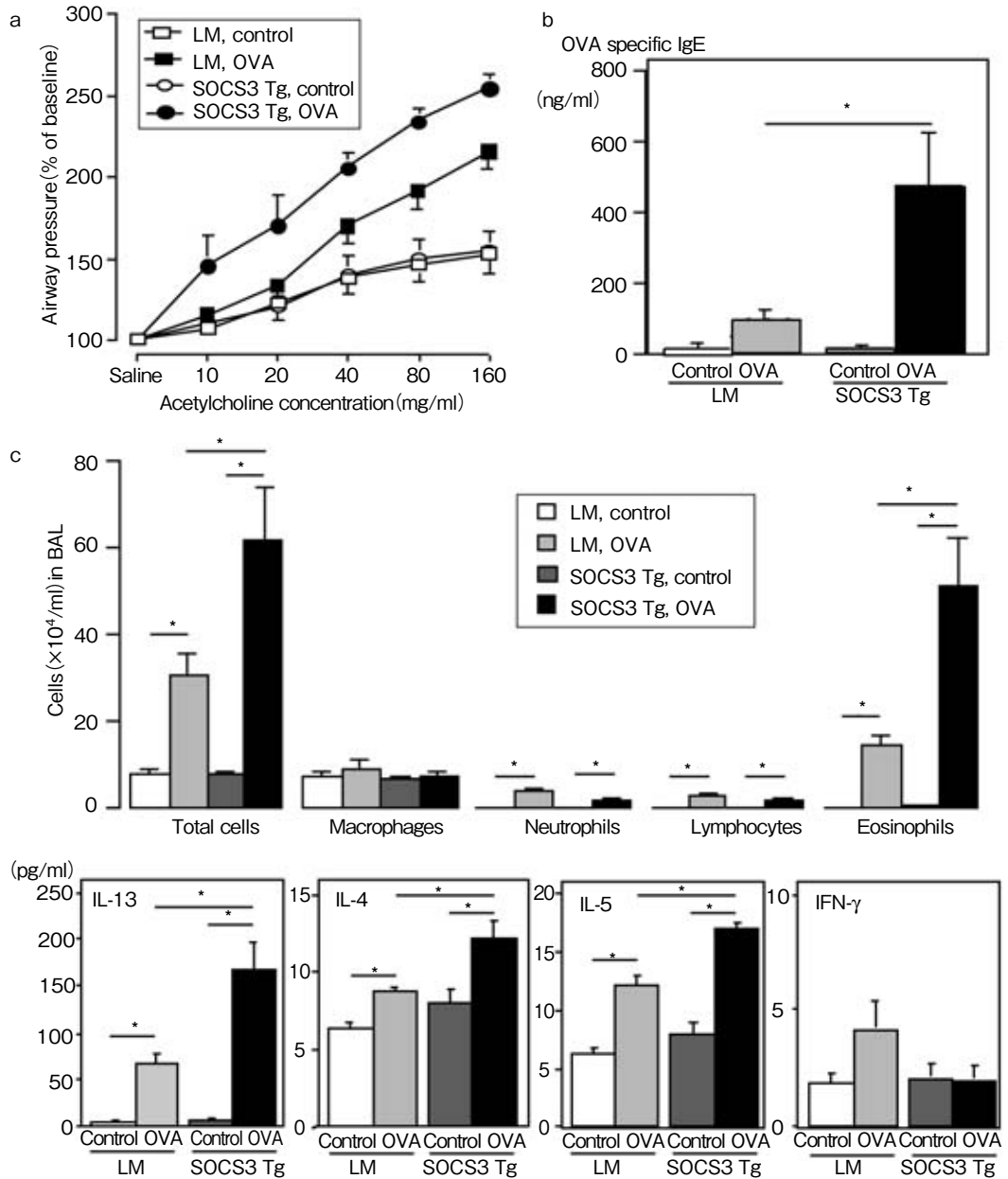


Fig. 2. Effects of constitutive expression of SOCS3 in T cells on asthma in an OVA-induced asthma model.¹⁸⁾

- a : Airway hyperresponsiveness to inhaled acetylcholine.
 b : Serum concentration of total IgE and OVA-specific IgE
 c : Cell counts and cytokine concentrations in BAL fluid.

た、コントロールマウスに比べて、気道好酸球数とIL-4、IL-5、IL-13などのTh2サイトカインレベルが

有意に上昇していた(Fig.2)¹⁸⁾。以上より、T細胞でのSOCS3高発現は、Th2サイトカインの増加を介して、

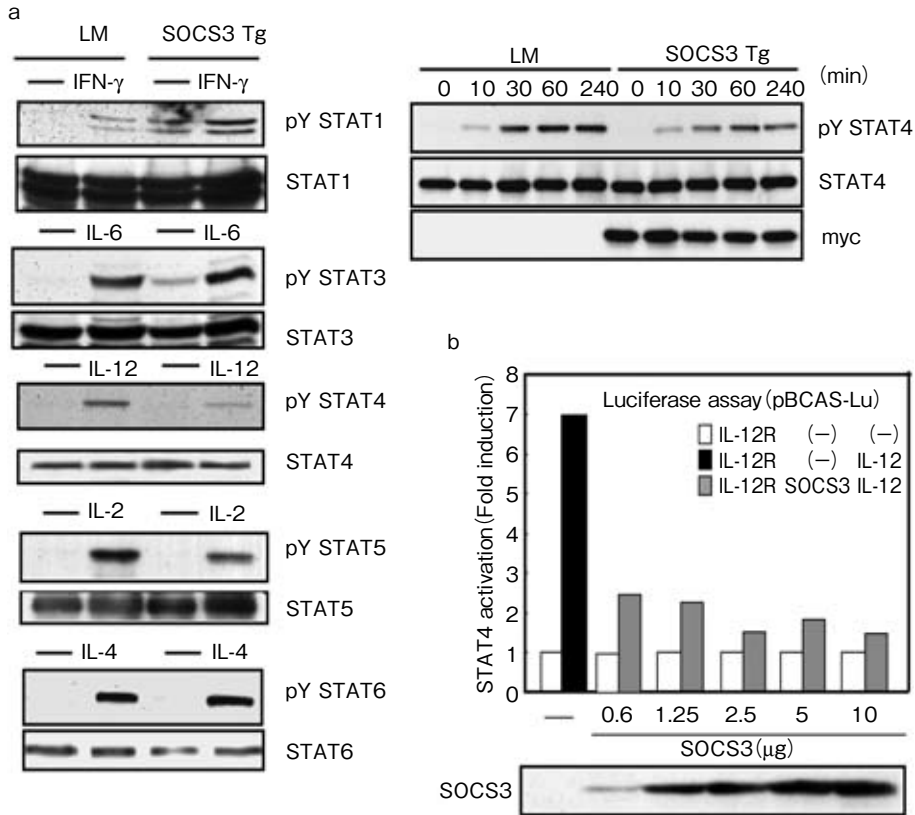


Fig. 3. STAT activation in SOCS3 Tg mice.¹⁸⁾

a: T cells from control and SOCS3 Tg mice were stimulated with each cytokine, and tyrosine phosphorylation was analyzed in each STAT.

b: STAT reporter construct pBCAS-Lu was transiently transfected with various concentrations of Myc-SOCS3 into the cells expressing the IL-12R. Following IL-12 5u/ml stimulation, luciferase activity was measured IL-12-dependent STAT4 activation.

アレルギー性喘息反応の発症進展に関与していると考えられる。抗IL-4抗体やIL-4受容体欠損マウスを用いた実験から、Th2細胞分化を規定するIL-4はSOCS3発現を誘導していると考えられる。

この機序を解明するため、コントロールマウスとSOCS3 TgマウスのT細胞を用いて様々なサイトカインによる各種STATリン酸化を解析した。SOCS3 Tgマウス由来T細胞では、IL-12によるSTAT4の活性化が減弱していた (Fig. 3)¹⁸⁾。SOCS3とIL-12受容体への影響をみると、IL-12受容体 β_2 がリン酸化したときのみSOCS3が結合していた。SOCS3 Tgマウス由来T細胞ではIL-12用量依存性にIL-12受容体 β_2 発現とT-bet発現が上昇したが、SOCS3 Tgマウ

スではこのような変化は認められなかった。すなわち、SOCS3はIL-12受容体 β_2 に結合することでSTAT4活性化を抑制しTh1分化誘導を抑制する結果、Th2分化と喘息反応を亢進していると考えられる (Fig. 4)。

一方SOCS5は、Th1細胞で発現が亢進しており、SOCS5を強制発現させるとTh2分化が抑制されること、SOCS5はIL-4依存性STAT6活性化を抑制することが報告されている。SOCS5はTh2依存性アレルギー反応の抑制的調節因子の一つと考えられるが、SOCS5欠損T細胞は正常のTh1/Th2分化を呈することが示され、内因性のSOCS5はTh1細胞分化に不要である可能性もある。

近年、免疫反応におけるCD25⁺CD4⁺T細胞、Tr1

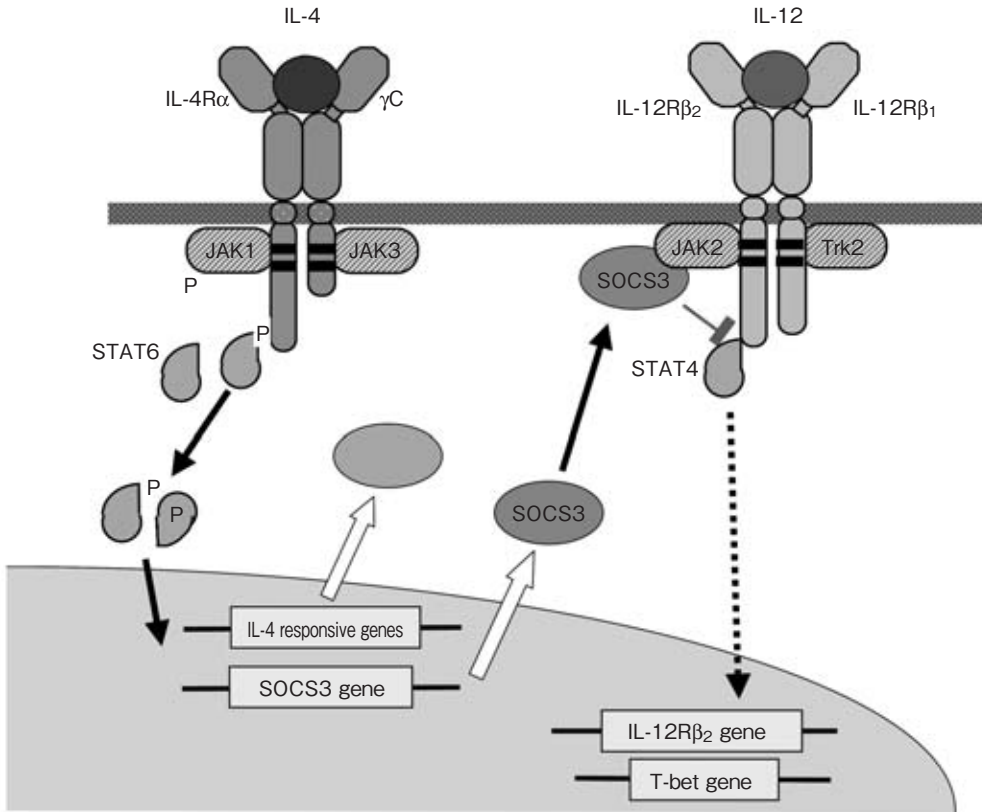


Fig. 4. Regulation of T helper cell differentiation by SOCS3.

IL-4 induces expression of SOCS3 in Th2 cells. These SOCS proteins reciprocally inhibit the counterpart Th differentiation process. SOCS3 specifically binds to the cytoplasmic region of IL-12Rβ₂ in SH2-tyrosine based interaction and subsequently inhibits STAT4 activation and Th1 differentiation.

(T regulatory cell 1), Th3 などの調節性 T 細胞の役割が注目されている。CD25⁺CD4⁺T 細胞は胸腺で分化・成熟し、自己抗原に対する末梢レベルでの免疫寛容に重要な役割を担っていると考えられる。CD25⁺CD4⁺T 細胞に関しては、転写因子 Foxp3 がそのマーカーとして¹⁹⁾、臨床サンプルでの解析が進んでいる。マウス喘息モデルでは、CD25⁺CD4⁺T 細胞が喘息反応を抑制するという報告²⁰⁾と逆に促進するという報告²¹⁾がある。CD25⁺CD4⁺T 細胞に幾つかのサブセットが存在し、実験結果の相違をもたらしているのかもしれない。最近、SOCS1 発現が不十分の場合、CD25⁺CD4⁺T 細胞機能が抑制されると報告されており²²⁾、SOCS ファミリーと CD25⁺CD4⁺T 細胞との関連についても今後の研究の展開が注目される。

SPRED とアレルギー性喘息

Ras-Raf-ERK/MAP キナーゼ系は、種々の細胞外刺激により活性化される。増殖因子の受容体は細胞内ドメインがチロシンキナーゼであり、アダプター分子を介して Shc-Grb2-SOS (son of sevenless)-Ras 経路により Raf が活性化される²³⁾。活性化された Ras は Raf を細胞膜にリクルートしそこで Raf はリン酸化され活性化される。活性化された Raf は MEK (MAPK/ERK kinase) を、MEK は MAP キナーゼ ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) を活性化するカスケードを形成する。サイトカイン受容体も JAK 型チロシンキナーゼが会合している場合、同様に Ras が活性化される。G-CSF や IL-3 は JAK/STAT 系よりも Ras/ERK 系のシグナルを介すると考えられている。

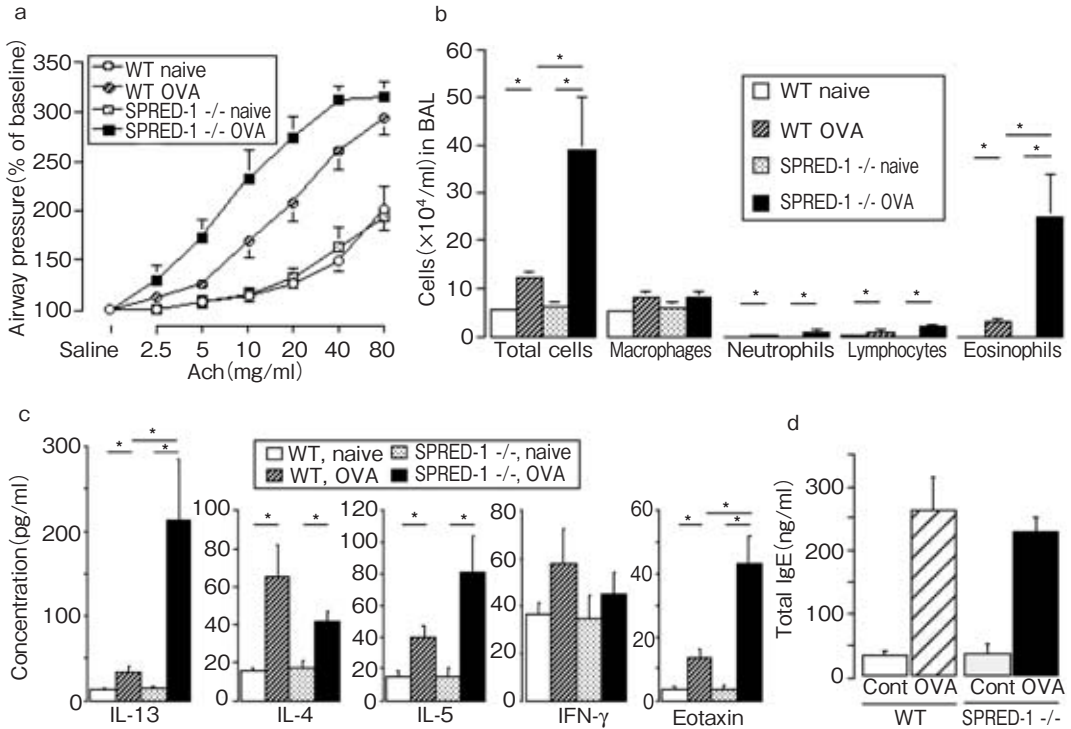


Fig. 5. Effects of SPRED-1 inactivation on asthmatic responses in an OVA-induced asthma model.²⁷⁾

a: Airway responsiveness was determined by the acetylcholine-dependent change in airway pressure.

b & c: Effects of SPRED-1 depletion on cell counts and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid.

d: Serum concentration of OVA-specific IgE.

Ras-ERK/MAP キナーゼ経路には数多くの抑制系が知られている。EGF 受容体などのチロシン酸化蛋白質と会合しユビキチン分解する Cbl, Ras の直接的な抑制因子 RasGAP の他, アダプター分子である Dok ファミリーや Lnk も RasGAP を介して Ras の活性化を抑制し, MKP (MAPK phosphatase) は MAPK の抑制系である。さらに, Sprouty, SPRED, SEF (similar expression to fgf genes)²⁴⁾ も重要な抑制系である。

これまで, アレルギー性喘息反応に及ぼす Ras-ERK 経路の関与については, T 細胞からの IL-4 産生や Th2 分化解析を中心に行われてきた。ERK 活性阻害により, T 細胞受容体刺激による IL-4 産生が抑制されるという報告がある一方, IL-4 産生が亢進するという報告や変化しないというものもあり, 一定の見解が得られ

ていない。このほか, アレルギー疾患にみられる好球増多に重要な IL-5 刺激も, JAK2/STAT5 のほか Ras/ERK 系を介することが知られている。これまで, アレルギー疾患における内因性の Ras/ERK 抑制系に関する役割は明らかではなかった。

これまで3つのファミリー分子 (SPRED-1, -2, -3)²⁵⁾²⁶⁾ が同定されている SPRED は, N 末端の EVH-1 (Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology-1) ドメインを介して何らかの分子をリクルートし, Ras/SPRED/Raf-1 複合体上での Raf-1 のリン酸化を抑制しているものと考えられている。我々は, SPRED-1 KO マウスの解析により, アレルギー性喘息反応における SPRED-1 の役割を検討した²⁷⁾。SPRED-1 は神経系や血液系細胞で高発現しているが, SPRED-1 KO マウスの T 細胞の Th1/Th2 分化は正常

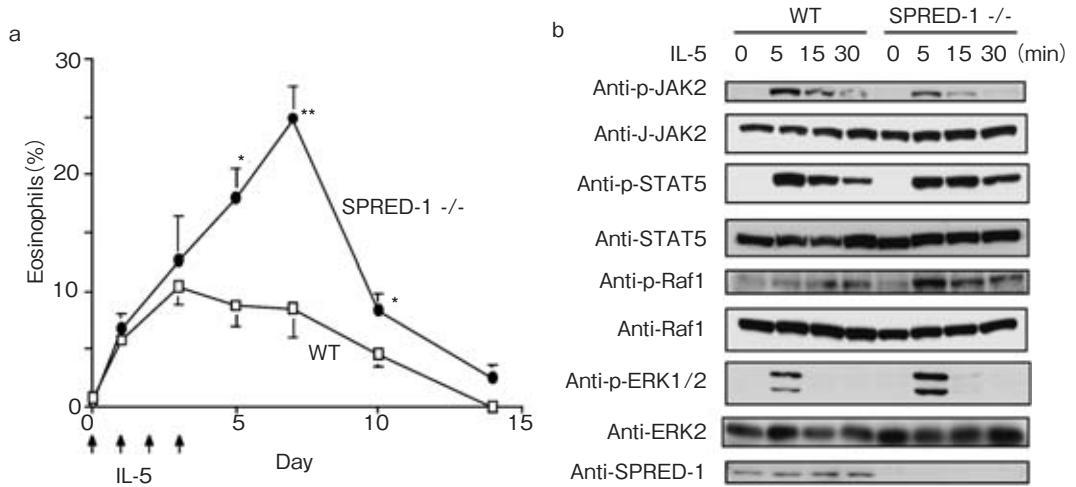


Fig. 6. Eosinophil response to IL-5 in SPRED-1-KO mice.²⁷⁾

a : Recombinant mouse IL-5 was injected into WT or SPRED-1-KO mic, and differential counts were carried out.

b : The activation of Raf-1, ERK2, and JAK2 in IL-5-stimulated eosinophils from SPRED-1-KO and WT mice. Eosinophils were stimulated with IL-5 and cell extracts were immunoblotted with the indicated antibodies.

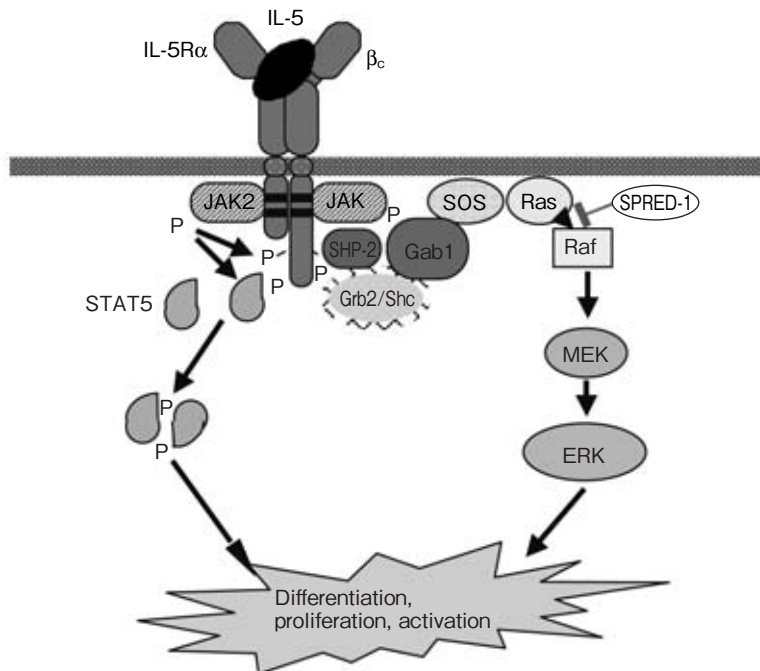


Fig. 7. IL-5 signaling and SPRED-1.

SPRED-1, localized in the lipid raft/caveola fraction, suppresses IL-5-induced Raf activation and negatively controls eosinophil numbers and functions.

に保たれている。OVA 喘息モデルを解析してみると、SPRED-1 KO マウスの気道では好酸球数が著増し、気道での IL-13, eotaxin 発現の亢進がみられるが、IL-4, IL-5 発現や血中 IgE はコントロールマウスと差がなかった (Fig. 5)²⁷⁾。IL-13 による局所好酸球反応には差がないが、IL-5 により好酸球増多反応が著明で、好酸球からの IL-13 産生も亢進している。SPRED-1 KO マウス由来の好酸球に IL-5 を投与すると、コントロールマウスに比べて Raf-1 や ERK の活性化が亢進していた。一方、IL-5 の主なシグナル経路として知られる JAK2/STAT5 の活性化には差がなかった (Fig. 6²⁷⁾)。すなわち、SPRED-1 は、IL-5 シグナルの中でこれまであまり注目されていなかった Ras/ERK 系を調節することにより好酸球数/機能をコントロールし、アレルギー性喘息反応を制御しているものと考えられた (Fig. 7)。

おわりに

内因性サイトカインシグナル抑制因子 SOCS3/SOCS5 や SPRED-1 はアレルギー性喘息反応の発症・進展において重要な役割を担っている。これらの分子のコントロールにより、生体でのアレルギー反応の制御やアレルギー疾患の治療に繋がるものと期待される。

共同協力者の理化学研究所横浜研究所・免疫アレルギー科学総合研究センター 久保允人先生、九州大学生体防御医学研究所 吉村昭彦先生、国立成育医療センター研究所 斎藤博久先生、東京大学医学研究所 高津聖志先生、及び、ご指導いただいた九州大学胸部疾患研究施設 原 信之先生、中西洋一先生、久留米大学第 1 内科 相澤久道先生に感謝致します。

文 献

- 1) Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992 ; 326 : 298-304.
- 2) Inoue H, Kubo M. SOCS proteins in T helper cell differentiation : implications for allergic disorders? *Expert Rev Mol Med* 2004 ; 6 : 1-11.
- 3) Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 821-4.
- 4) Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997 ; 387 : 921-4.
- 5) Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997 ; 387 : 924-9.
- 6) Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997 ; 387 : 917-21.
- 7) Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 2000 ; 18 : 143-64.
- 8) Fujimoto M, Naka T. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol* 2003 ; 24 : 659-66.
- 9) Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999 ; 17 : 255-81.
- 10) Elias JA, Lee CG, Zheng T, et al. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 111 : 291-7, 2003.
- 11) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13 : central mediator of allergic asthma. *Science* 1998 ; 282 : 2258-61.
- 12) Grunig G, Warnock M, Wakil AE, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998 ; 282 : 2261-3.
- 13) Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, et al. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 167 : 50-6.
- 14) Pernis AB, Rothman PB. JAK-STAT signaling in asthma. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 1279-83.
- 15) Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development : roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 431-5.
- 16) Seki Y, Hayashi K, Matsumoto A, et al. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 13003-8.
- 17) Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, et al. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells : implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 2002 ; 168 : 3181-7.
- 18) Seki Y, Inoue H, Nagata N, et al. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T (H) 2-mediated allergic responses. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1047-54.
- 19) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regula-

- tory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003 ; 299 : 1057–61.
- 20) Hadeiba H, Locksley RM. Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J Immunol* 2003 ; 170 : 5502–10.
- 21) Suto A, Nakajima H, Kagami SI, et al. Role of CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 ; 164 : 680–7.
- 22) Fujimoto M, Tsutsui H, Xinshou O, et al. Inadequate induction of suppressor of cytokine signaling-1 causes systemic autoimmune diseases. *Int Immunol* 2004 ; 16 : 303–14.
- 23) Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway : paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 2001 ; 13 : 777–85.
- 24) Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, et al. Regulatory Mechanisms and Function of ERK MAP Kinases. *J Biochem (Tokyo)* 2004 ; 136 : 557–61.
- 25) Kato R, Nonami A, Taketomi T, et al. Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 302 : 767–72.
- 26) Wakioka T, Sasaki A, Kato R, et al. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 2001 ; 412 : 647–51.
- 27) Inoue H, Kato R, Fukuyama S, et al. Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. *J Exp Med* 2005 ; 201 : 73–82.

ALLERGIC ASTHMA AND INTRINSIC INHIBITORS OF CYTOKINE SIGNALING

Hiromasa Inoue

Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

T helper 2 cytokines, including interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-13, play an important role in allergic asthma. These cytokines transmit signals through the JAK/STAT and the Ras/ERK signaling pathways, and SOCS family proteins and SPRED family proteins regulate these pathways. SOCS3 controls IL-12-dependent STAT4 activation and Th2 differentiation process. SPRED-1 modulates IL-5-dependent ERK activation and eosinophilia. SOCS3 and SPRED-1 may be targets for therapeutic strategies in allergic asthma.
