抗原誘発気道好酸球浸潤における Jak 2 と Stat 5 の役割

中島裕史・岩本逸夫*

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

The role of Jak 2 and Stat 5 in antigen-induced eosinophil recruitment into the airways

We studied the role of Jak 2 and Stat 5 in antigen-induced eosinophil recruitment into the airways of sensitized mice. The *in vivo* administration of a Jak 2 inhibitor AG-490 prevented antigen-induced eosinophil recruitment into the airways of sensitized mice in a dose-dependent manner, whereas the administration of AG-490 did not affect antigen-induced IL-5 production in the airways. On the other hand, both antigen-induced IL-5 production and antigen-induced airway eosinophilia was diminished in Stat 5 a-deficient (Stat 5 a^{-/-}) mice and Stat 5 b-deficient (Stat 5 b^{-/-}) mice. In addition, eosinophilopoiesis induced by the administration of recombinant IL-5 was diminished in Stat 5 a^{-/-} mice and Stat 5 b^{-/-} mice. Interestingly, antigen-induced Th 2 cell differentiation was decreased but antigen-induced Th 1 cell differentiation was increased in Stat 5 a^{-/-} mice. Together, these results indicate that Jak 2 and Stat 5 activation are essential for the induction of IL-5-dependent, antigen-induced eosinophil recruitment into the airways and that the defects in antigen-induced eosinophil recruitment in Stat 5 a^{-/-} mice and Stat 5 b^{-/-} mice result from both impaired IL-5 production in the airways and diminished IL-5 responsiveness of eosinophils.

Rec. 8/23/2000, Acc. 10/11/2000, pp 55~62

Hiroshi Nakajima・Itsuo Iwamoto*

key words : Jak2, Stat5, eosinophils, IL-5, Th1/Th2 cells

気管支喘息をはじめアレルギー性炎症において CD 4 陽性 T 細胞は、その発症および炎症の強さを規定する司令塔として機能する。CD 4 陽性 T 細胞には、IFN- γ , lymphotoxin を産生し遅延型過敏反応に関与する Th 1 細胞と IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 を産生し抗体産生を制御する Th 2 細胞が存在する^{1,2)}。そして IL-4 は、Th 2 細胞の分化増殖、B 細胞の IgE 産生、肥満細胞の増殖および活性化、血管内皮細胞上の VCAM-1 発現誘導な

どを介してアレルギー性炎症の惹起に重要な役割を果たす。また IL-5 は、アレルギー性炎症の重要なエフェクター細胞である好酸球の分化成熟および活性化を誘導する。一方 Th 1 細胞は、IFN- γ を産生し Th 2 細胞の分化およびサイトカイン産生を抑制することによりアレルギー性炎症を制御する。つまりアレルギー性炎症は、ある抗原に対して Th 1 細胞と Th 2 細胞のどちらが強く活性化されるかにより制御されている。

このようにアレルギー性炎症制御におけるサイトカインの役割が明らかになってきた一方で、そのシグナルを伝える細胞内分子の役割は不明であった。今回筆者らは、IL-5 をはじめ多くのサイ

* Department of Medicine II, Chiba University School of Medicine 千葉大学医学部第二内科学教室
Offprint requests to : Hiroshi Nakajima, Department of Medicine II, Chiba University School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-0856, Japan

図 1 抗原誘発気道好酸球浸潤および IL-5 産生に対する AG 490 の効果

BALB/c マウスを卵白アルブミン(OVA)と水酸化アルミニウムで2回腹腔内感作し、感作2週間後にOVAを吸入投与した。OVA吸入24時間後に肺胞洗浄を行い、肺胞洗浄液中の好酸球数(A)およびIL-5濃度(B)を測定した。AG 490は、抗原吸入前後に4回に分けて腹腔内投与した。AG 490の投与は、IL-5産生を抑制することなく、用量依存的に気道好酸球浸潤を抑制した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ 。文献⁵⁾より引用。実験方法に関しては文献³⁾も参照。

トカインにより活性化される Janus Kinase 2(Jak 2)およびその下流分子である signal transducers and activators of transcription 5(Stat 5)がアレルギー性炎症の惹起に重要な役割を果たしていることを見出したので概説する。

アレルギー性気道炎症における Jak 2 の役割

筆者らは、マウスアレルギー性気道炎症モデル

図 2 抗原誘発気道好酸球浸潤における Stat 5 a と Stat 5 b の役割

Stat 5 a 欠損マウス, Stat 5 b 欠損マウス, および野生型マウスをOVAと水酸化アルミニウムで2回腹腔内感作した。感作2週間後にOVAを吸入投与し、その24時間後に気管粘膜下組織に浸潤した好酸球数を算定した。Stat 5 a 欠損マウスおよびStat 5 b 欠損マウスでは、抗原誘発気道好酸球浸潤の低下が認められた。* $p < 0.005$ 。文献⁸⁾より引用。

を用いて、抗原誘発気道好酸球浸潤は、Th 2 細胞により産生される IL-5 により惹起されることを示した³⁾。IL-5 は、IL-5 に固有の IL-5 R α 鎖と IL-3, GM-CSF と共通な共通 β 鎖のヘテロダイマーからなるレセプターに結合し、Jak 2 を活性化する⁴⁾。そこで筆者らは、Jak 2 の活性化がアレルギー性炎症の惹起に必須であるか否かを Jak 2 の特異的阻害物質である AG 490 を用いて検討した⁵⁾。AG 490 は、卵白アルブミン(OVA)で腹腔内感作した BALB/c マウスにOVAを吸入投与する際に腹腔内投与した。その結果、AG 490 を投与すると抗原誘発気道好酸球浸潤は、用量依存的に抑制されることがわかった(図 1 A)。

つぎに AG 490 が気道での Th 2 細胞の活性化を抑制するか否かを明らかにするため気道での IL-5 産生に対する AG 490 の効果を検討した⁵⁾。その結果、本実験で用いた量の AG 490 の投与は、気道での IL-5 産生を抑制しないことがわかった(図 1 B)。すなわち AG 490 の投与は、Th 2 細胞レベルではなく、好酸球レベルで作用することにより抗原誘発気道好酸球浸潤を抑制していることが

図3 抗原誘発気道T細胞浸潤におけるStat5aとStat5bの役割
図2と同様にOVAで感作したStat5a欠損マウス、Stat5b欠損マウス、および野生型マウスにOVAを吸入投与した。OVA吸入36時間後に肺胞洗浄液を採取し、浸潤細胞を抗CD4抗体と抗CD8抗体でFACS解析した。Stat5a欠損マウスおよびStat5b欠損マウスでは、抗原吸入後のCD4陽性T細胞浸潤の低下が認められた。文献⁸⁾より引用。

示唆された。

アレルギー性気道炎症におけるStat5aおよびStat5bの役割

IL-5は、Jak2の活性化を介してStat5aとStat5bを活性化する⁶⁾。Stat5aとStat5bは、95%以上の相同性がありともにIL-5以外にもIL-2、IL-3、IL-7など、多くのサイトカインにより活性化される⁷⁾。そしてStat5aとStat5bは、それぞれ独立した機能とStat5aとStat5bで重複した機能をもつことがStat5a欠損マウス、Stat5b欠損マウス、そしてStat5a/Stat5bダブル欠損マウスを用いた研究により明らかとなっ

た⁷⁾。しかしながらアレルギー性炎症の惹起にStat5aおよびStat5bが必須であるか否かは不明であった。

そこで筆者らは、Stat5a欠損マウスとStat5b欠損マウスを用いアレルギー性炎症におけるStat5aとStat5bの役割について解析した⁸⁾。Stat5a欠損マウス、Stat5b欠損マウス、あるいは野生型マウスを卵白アルブミン(OVA)で腹腔内感作し、OVAを吸入投与して気道アレルギー性炎症を惹起した。その結果、野生型マウスと比較してStat5a欠損マウスとStat5b欠損マウスでは、アレルギー性炎症における抗原誘発気道好酸球浸潤は著しく低下していた(野生型 $17.2 \pm$

図4 抗原誘発気道IL-5産生におけるStat5aとStat5bの役割

図3と同様にOVA感作後、OVAを吸入したStat5a欠損マウス、Stat5b欠損マウス、および野生型マウスの肺胞洗浄液中のIL-5濃度をELISA法にて測定した。Stat5a欠損マウスおよびStat5b欠損マウスでは、抗原誘発後IL-5産生の低下が認められた。* $p < 0.005$ 。文献⁸⁾より引用。

5.2, Stat5a欠損 2.5 ± 1.4 , Stat5b欠損 2.8 ± 1.0) (図2)。つまり抗原誘発気道好酸球浸潤の惹起には、Stat5aとStat5bの両方が必要であることがわかった。

つぎにこれらのマウスにおける抗原誘発気道好酸球浸潤の低下がT細胞の障害によるのかそれとも好酸球の障害によるのかを明らかにするため抗原吸入前後における気道へのT細胞浸潤をフローサイトメーターにて解析した。その結果、抗原吸入後の気道へのCD4陽性T細胞浸潤は、Stat5a欠損マウスとStat5b欠損マウスで著しく低下していた(野生型20.4%(図3d), Stat5a欠損6.4%(図3e), Stat5b欠損8.8%(図3f))。さらに気道でのIL-5産生もStat5a欠損マウスとStat5b欠損マウスで著明に低下していた(図4)。すなわちStat5a欠損マウスおよびStat5b欠損マウスにおける抗原誘発気道好酸球浸潤低下の一因は、気道におけるTh2細胞活性化の障害によることが示唆された。

図5 IL-5依存性好酸球造血におけるStat5aとStat5bの役割

Stat5a欠損マウス、Stat5b欠損マウス、および野生型マウスにリコンビナントマウスIL-5(20000 U)を4日間連続で腹腔内投与し、その2日後に骨髓内(A)および腹腔内(B)の好酸球の比率を算定した。Stat5a欠損マウスおよびStat5b欠損マウスでは、IL-5投与後の好酸球造血の低下が認められた。* $p < 0.005$ 。文献⁸⁾より引用。

IL-5依存性好酸球造血におけるStat5aとStat5bの役割

IL-5は、好酸球前駆細胞から好酸球への分化そして成熟した好酸球の活性化に重要な役割を果たす⁴⁾。前述したようにStat5a欠損マウスとStat5b欠損マウスにおける抗原誘発気道好酸球浸潤低下の一因は、T細胞からのIL-5産生障害(図4)であることが示唆された。しかしIL-5による好酸球分化増殖にStat5aとStat5bが必須であるか否かは不明であった。そこで筆者らは、Stat5a欠損マウスとStat5b欠損マウスにおけるIL-5投与に対する好酸球造血能を野生型マウスと比較した⁸⁾。その結果、リコンビナントIL-5

図 6 T 細胞増殖における Stat 5 a と Stat 5 b の役割

A. 抗原特異的 T 細胞増殖における Stat 5 a と Stat 5 b の役割 :

Stat 5 a 欠損マウス, Stat 5 b 欠損マウス, および野生型マウスを OVA と水酸化アルミニウムで 2 回腹腔内感作し, 感作 2 週間後に脾細胞を調整し OVA に対する増殖反応を測定した。Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスでは, 抗原特異的な T 細胞増殖反応が低下していた。* $p < 0.005$, 文献⁸⁾より引用。

B. 抗原非特異的 T 細胞増殖における Stat 5 a と Stat 5 b の役割 :

A と同様な方法で調整した脾細胞を固相化した抗 CD 3 抗体で刺激し増殖反応を測定した。Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスにおいても抗原非特異的な T 細胞増殖反応は, ほぼ正常に保たれていた。文献⁸⁾より引用。

図 7 T 細胞サイトカイン産生における Stat 5 a と Stat 5 b の役割

図 6 と同様な方法で調整した脾細胞を固相化した抗 CD 3 抗体で刺激し, 培養上清中への IL-4(A), IL-5(B), IFN- γ (C) の産生を ELISA 法にて測定した。Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスでは, IL-4 と IL-5 の産生は低下していたが, IFN- γ の産生はほぼ正常であった。* $p < 0.01$, 文献⁸⁾より引用。

腹腔内投与による骨髓中での好酸球造血は, Stat 5 a 欠損マウスと Stat 5 b 欠損マウスで野生型マウスの約 50% に低下していた(図 5 A)。さらに腹腔内への好酸球浸潤も Stat 5 a 欠損マウスと Stat 5 b 欠損マウスで野生型マウスに比して

著明に低下していた(図 5 B)。

このことより IL-5 依存性好酸球造血には, Stat 5 a と Stat 5 b の両方が重要であること, さらに Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マ

図 8 Th 1 細胞・Th 2 細胞分化における Stat 5 a の役割

野生型マウスおよび Stat 5 a 欠損マウスを OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現する DO 10⁺トランスジェニックマウスと交配し、DO 10⁺マウスと DO 10⁺Stat 5 a 欠損マウスを作製した。これらのマウスから脾細胞を調整し抗原ペプチド (OVA 323-339) で刺激した。この際、Th 1 細胞誘導条件 (c と d) では IL-12 を培養上清中に加え、一方 Th 2 細胞誘導条件 (e と f) では IL-4 を培養上清中に加えた。抗原刺激 5 日後に CD 4 陽性 T 細胞における IL-4 と IFN- γ の産生を細胞内サイトカイン染色法にて解析した。DO 10⁺Stat 5 a 欠損マウスでは、DO 10⁺マウスに比して IL-4⁺IFN- γ ⁺細胞 (Th 2 細胞) が減少し、逆に IL-4⁻IFN- γ ⁺細胞 (Th 1 細胞) が増加していた。論文投稿中。

ウスにおける抗原誘発気道好酸球浸潤低下の一因は、好酸球の IL-5 に対する反応性の低下によることが示唆された。

抗原特異的 T 細胞分化における Stat 5 a と Stat 5 b の役割

前述したように Stat 5 a 欠損マウスと Stat 5 b 欠損マウスでは、抗原吸入後の気道での IL-5 産生が低下している (図 4)⁸⁾。しかしながらこの IL-5 産生低下が Th 1 細胞・Th 2 細胞バランスの異

常によるのか、それとも抗原特異的 T 細胞数の減少によるのかは不明であった。そこで筆者らは、抗原特異的 T 細胞増殖における Stat 5 a および Stat 5 b の役割を検討した。OVA で感作した Stat 5 a 欠損マウス、Stat 5 b 欠損マウスおよび野生型マウスより脾細胞を調整し OVA に対する T 細胞増殖を検討したところ、Stat 5 a 欠損マウスと Stat 5 b 欠損マウスで抗原特異的 T 細胞増殖は著明に低下していた (図 6 A)。一方、抗 CD 3 抗体刺激による抗原非特異的 T 細胞増殖は、

図9 アレルギー性炎症における Jak 2 と Stat 5 の役割

今回の実験結果より推測される Jak 2 と Stat 5 のアレルギー性炎症における役割を示した。アレルギー性炎症において Stat 5 は、抗原特異的な T 細胞の増殖と Th 2 サイトカインの産生、および好酸球の分化増殖に必須である。これに対し Jak 2 は、好酸球の組織浸潤には必須であるが、T 細胞からの Th 2 サイトカインの産生には必須でない。

Stat 5 a 欠損マウスと Stat 5 b 欠損マウスにおいてほぼ正常であった(図 6 B)。これらの結果より、Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスでは、抗原特異的な T 細胞プールが減少していることが示唆された。

さらにこれらマウスにおける抗 CD 3 抗体刺激による T 細胞からのサイトカイン産生を検討したところ、Stat 5 a 欠損マウスと Stat 5 b 欠損マウスで IL-4(図 7 A)と IL-5(図 7 B)の産生が著明に低下していた⁸⁾。一方抗 CD 3 抗体刺激による IFN- γ 産生は、Stat 5 b 欠損マウスで軽度減少していたが、Stat 5 a 欠損マウスでは正常であった(図 7 C)。すなわち少なくとも Stat 5 a 欠損マウスでは、Th 1 細胞に比して Th 2 細胞の機能が強く障害されており、Stat 5 a が Th 1 細胞・Th 2 細胞バランスの制御に関与していることが示唆された。

Th 1 細胞・Th 2 細胞分化における Stat 5 a の役割

つぎに Stat 5 a 欠損マウスにおける Th 1 細胞と Th 2 細胞の分化を単細胞レベルで検討するため、Stat 5 a 欠損マウスを OVA 特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウスである DO 11.10(DO 10⁺)マウスと交配し DO 10⁺ Stat 5 a 欠損マウスを作製し、抗原特異的制刺激による T 細胞分化を IL-4 と IFN- γ に対する細胞内サイトカイン染色法を用いて検討した。その結果、DO 10⁺ Stat 5 a 欠損マウスでは、コントロールの DO 10⁺マウスと比較して、Th 2 細胞(IL-4⁺ IFN- γ ⁻)への分化が著明に障害されていた(DO 10⁺マウス 26.1%(図 8 a)vs DO 10⁺ Stat 5 a 欠損マウス 5.8%(図 8 b)) (投稿中)。

一方、Th 1 細胞(IL-4⁻ IFN- γ ⁺)の分化は DO 10⁺ Stat 5 a 欠損マウスでは逆に亢進していた(DO 10⁺マウス 12.4%(図 8 a)vs DO 10⁺ Stat 5 a 欠損マウス 32.5%(図 8 b))。さらにこれらの細

胞を Th 1 細胞を誘導するように IL-12 存在下で刺激しても (Th 1 条件) やはり DO 10⁺ Stat 5 a 欠損マウスにおいて Th 1 細胞の分化は亢進していた (図 8 c vs 図 8 d)。また Th 2 細胞を誘導するように IL-4 存在下で培養すると (Th 2 条件), DO 10⁺ Stat 5 a 欠損マウスにおいても Th 2 細胞の増加が認められるが, DO 10⁺ マウスに比較すると Th 2 細胞数が低下していた (図 8 e vs 図 8 f)。これらの結果は, Stat 5 a 欠損マウスでは, Th 1 細胞・Th 2 細胞バランスが Th 1 側にシフトしていることを示唆している。

考 察

今回の実験結果から推測されるモデルを図 9 にまとめた。抗原を捕食した抗原提示細胞は, T 細胞に抗原提示し T 細胞は活性化される。活性化 T 細胞は, IL-2 を産生し自己あるいは近傍の T 細胞を刺激し抗原特異的 T 細胞プールをつくる。Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスでは, この抗原特異的 T 細胞プールが減少していることより, IL-2 から Stat 5 活性化を介した経路が抗原特異的 T 細胞プールの作製に必須であることが示唆される。そして Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスでは, 抗原特異的 T 細胞プールの減少および Th 2 細胞の分化障害により抗原刺激に対する IL-5 の産生が低下していると考えられる。さらに Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスでは, IL-5 による骨髓での好酸球前駆細胞の増殖および好酸球への分化が障害されている。すなわち Stat 5 a 欠損マウスおよび Stat 5 b 欠損マウスにおける抗原誘発気道好酸球浸潤の低下は, T 細胞からの IL-5 産生低下と好酸球の IL-5 に対する反応性低下の少なくとも二つのメカニズムにより引き起こされていると考えられる。一方, Jak 2 の抑制は, T 細胞からの IL-

5 産生を抑制することなく好酸球の炎症局所への浸潤を抑制する。

今後は, これらの知見をいかに臨床の場に還元するかが重要な課題である。Jak 2 も Stat 5 もエリスロポエチンをはじめとする多くの, そして生体にとって必須なサイトカインシグナルを伝達するため疾病治療のターゲットとはなりにくい, 経気道的にこれらの抑制が可能となれば気管支喘息治療への応用が可能と思われる。さらに Stat 5 活性化の下流に位置する Th 2 細胞分化誘導因子が単離されれば, アレルギー疾患特異的な治療が可能になると思われる。

文 献

- 1) Paul WE, Seder RA : Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76 : 241-251, 1994.
- 2) Abbas AK, Murphy KM, Sher A : Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383 : 787-793, 1996.
- 3) Nakajima H, Iwamoto I, Tomoe S, Matsumura R, Tomioka H, Takatsu K, Yoshida S : CD 4⁺ T lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *Am Rev Respir Dis* 146 : 374-377, 1992.
- 4) Roboz GJ, Rafii S : Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. *Curr Opin Hematol* 6 : 164-168, 1999.
- 5) Kumano K, Nakao A, Nakajima H, Miike S, Kurasawa K, Saito Y, Iwamoto I : Blockade of JAK 2 by tyrphostin AG-490 inhibits antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Biochem Biophys Res Commun* 270 : 209-214, 2000.
- 6) Leonard WJ, O'Shea JJ : Jaks and STATs : biological implications. *Annu Rev Immunol* 16 : 293-322, 1998.
- 7) Lin J-X, Leonard WJ : The role of Stat 5 a and stat 5 b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 19 : 2566-2576, 2000.
- 8) Kagami S, Nakajima H, Kumano K, Suzuki K, Sudo A, Imada K, Saito Y, Takatsu K, Leonard WJ, Iwamoto I : Both Stat 5 a and Stat 5 b are required for antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *Blood* 95 : 1370-1377, 2000.