

令和元年5月17日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08831

研究課題名(和文) 免疫細胞の皮膚・粘膜浸潤の分子機構の解明とその制御

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and control of immune cell migration to skin and mucosa

研究代表者

平田 多佳子 (Hirata, Takako)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00346199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体の外面を覆う皮膚と内腔を覆う粘膜は感染防御に必須の生体バリアとして機能するが、種々の抗原と接触することでアレルギーが誘発される場でもある。本研究では、生体バリア局所への細胞浸潤について、その分子機構や時空的制御について解析を行った。生体バリアへの細胞浸潤を解析するモデルとして、アレルギー性鼻炎マウスを作製し、鼻腔への抗原投与時に鼻粘膜でケモカインCCL28が誘導され、その受容体であるCCR3およびCCR10を発現するメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞が浸潤することを示した。また、CCL28以外の複数のCCR3リガンドがアレルギー性鼻炎の病態に関与することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫反応時に起こる局所への細胞浸潤は、病原体を排除するのに必須の生体防御反応であるが、同時に自己免疫・アレルギーなど重大な病態の原因でもある。特に、花粉症などのアレルギー疾患は近年増加し、全人口の約2人に1人が罹患する国民病であり、有効な新規治療法の開発が望まれる。本研究成果は、アレルギー性鼻炎マウスモデルを用いて、粘膜への免疫細胞浸潤の分子機序の一端を明らかにするものであり、花粉症などのアレルギー疾患の新規治療につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The skin and mucosa are the principal barriers that play an essential role in host defense against infection, but they are also the sites where allergies are induced in response to contact with various antigens. In this research project, we investigated molecular mechanisms underlying the immune cell migration to barrier tissues. Using a mouse model of allergic rhinitis, we demonstrated that the chemokine CCL28 was upregulated in the nasal mucosa upon nasal challenge with allergen and that memory CD4<sup>+</sup>T cells expressing CCR3 and CCR10, the receptors for CCL28, were present in the nasal mucosa. We further found that additional CCR3 ligands also play a role in the pathogenesis of allergic rhinitis.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 アレルギー リンパ球 好中球 ケモカイン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症・免疫反応時には、さまざまな種類の炎症・免疫細胞がそれぞれ異なる時間経過で局所に浸潤する。このような細胞浸潤は病原体を排除するのに必須の生体防御反応であるが、同時に自己免疫・アレルギーなど重大な病態の原因でもある。なかでも、体の外面を覆う「皮膚」と内腔を覆う「粘膜」は感染防御に必須の生体バリアとして機能するが、種々の抗原と接触することでアレルギーが誘発される場でもある。細胞の局所への浸潤は、血管内皮細胞表面でのローリング・活性化・強固な接着・内皮細胞間隙への潜り込み・組織内での移動といった連続したステップを経て起き、セレクチン・インテグリンなどの細胞接着分子やケモカイン・脂質メディエーターなどの細胞遊走因子が関与する。これらの分子がどのような組み合わせで発現するかによって、特定のサブセットの浸潤パターンが時空的に決定される。しかし、各サブセットの浸潤を媒介する分子の実体、その発現や活性の誘導・維持のメカニズム、浸潤の時空的動態との関連についての理解は未だ十分には進んでいない。

研究代表者らは P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を欠損するマウスを世界に先駆けて作製し、このマウスの解析から、好中球上の PSGL-1 が血管内皮細胞に発現する P-selectin のリガンドとして、また E-selectin のリガンドの 1 つとして機能し、好中球のローリングや浸潤を媒介することを明らかにした (J Exp Med 190:1769, 1999)。さらに、エフェクター/メモリー T 細胞の炎症皮膚浸潤において、T 細胞上の PSGL-1 が P-selectin および E-selectin のリガンドとして機能することや (J Exp Med 192:1669, 2000; J Immunol 169:4307-4313, 2002)、CD43 が E-selectin のリガンドとして機能し PSGL-1 と協同的に T 細胞の皮膚浸潤を媒介することを明らかにしてきた (J Immunol 175:8042, 2005; J Immunol 178, 2499, 2007)。

定常時の T 細胞の組織浸潤においては、組織特異性があり、皮膚と粘膜では異なる分子機構があることが知られている。研究代表者らはこれまでに炎症皮膚への T 細胞浸潤機構について多くの解析を行ってきたが、T 細胞の炎症粘膜浸潤を媒介する分子機構については、不明の点が多く残されていた。特に、アレルギー性鼻炎における鼻粘膜への免疫細胞の浸潤に関わる分子機構については、十分に理解は進んでいなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、免疫細胞の皮膚・粘膜浸潤の分子機構を明らかにするため、さまざまなサブセットについて、その浸潤を媒介する分子の同定を進める。さらに、同定した分子の発現や活性が誘導・維持・制御される分子メカニズムを解析することを目的とする。また、皮膚・粘膜の組織特異性にも着目し、炎症皮膚と炎症粘膜への細胞浸潤機構について、組織による相違についても明らかにする。

最終的には、皮膚・粘膜組織への細胞浸潤を時空的に制御するための標的分子の候補を探索し、各サブセットの浸潤を制御する新たな自己免疫・アレルギー治療法の開発基盤を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 試薬：アフィニティ精製ヤギ抗マウス CCL28 抗体と APC 標識抗マウス CCR10 モノクローナル抗体 (mAb) は R&D Systems より購入した。Alexa Fluor 647 標識抗マウス CCR3 抗体は BioLegend より購入した。Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ラット IgG、Alexa Fluor 555 標識ロバ抗ヤギ IgG、Alexa Fluor 647 標識ストレプトアビジンは Thermo Fischer Scientific から購入した。フローサイトメトリーや免疫組織化学に用いたその他の mAb やコントロール抗体は、BD Biosciences、eBioscience、BioLegend のいずれかから購入した。

(2) マウス：C57BL/6 (B6) マウスは日本 SLC から購入し、滋賀医科大学動物生命科学研究センターにて飼育した。近畿大学との共同研究では B6 遺伝的背景の CCL28 欠損マウスを使用した。すべての研究や手順は滋賀医科大学動物実験委員会の承認を受けた。

アレルギー性鼻炎モデルは、0、7、14 日目に腹腔内に 25  $\mu$ g の卵白アルブミン (OVA; Sigma-Aldrich) と 1 mg の alum (Imject Alum; Thermo Fischer Scientific) を含む 300  $\mu$ l PBS を投与して感作し、21 日目から 7 日間連続で鼻腔内に 500  $\mu$ g OVA/PBS (感作群) または PBS (対照群) を投与することにより作製した。最終投与の 1 日後に組織を採取し解析した。

(3) 細胞の調整：マウスのリンパ節および鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) は、スリ付きスライドグラスを用いて機械的にすり潰し、ナイロンメッシュに通して細胞浮遊液を調整した。鼻粘膜組織は NALT を取り除いた後に骨と軟骨から剥がし、1 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics) を含む RPMI 1640 で 37°C 30 分インキュベートした。洗浄後、ナイロンメッシュに通して鼻粘膜細胞を調整した。さらに 40%/70% Percoll (GE Healthcare) を用いた密度勾配法によって精製した。

(4) フローサイトメトリー：NALT および鼻粘膜から調整した細胞懸濁液を抗 CD16/CD32 抗体と 10 分インキュベートした後、モノクローナル抗体と氷上で 30 分インキュベートした。洗浄後、FACSCalibur または FACSCantoII (BD Biosciences) でデータを取得し、FlowJo (Tree Sar) を用いて解析した。各サブセットは FACS Aria (BD Biosciences) でソートした。

(5) 定量 PCR：total RNA は TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出した後に RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) を用いて精製した。RT は High-capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。PCR は LightCycler 480 を用いて、cDNA、1 $\times$

LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics)、1× TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) を含む最終容量 20 µl の溶液で、95°C 5 分の後、95°C 10 秒、60°C 25 秒を 45 サイクル行った。内在性コントロールとしては GAPDH を増幅した。

(6) 組織学：組織学的解析のためには、組織をパラフィンに包埋し、切片を hematoxylin と eosin で染色した。

免疫組織学的解析では、組織を 20% sucrose を含む PBS で洗浄し、OCT compound (Sakura Finetek Japan) に包埋し、凍結した。切片は 2% BSA/PBS で 15 分ブロックした後、Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories) で 15 分ブロックした。切片はビオチン化抗 CD4 抗体または抗 CD8 抗体、Alexa Fluor 488 標識抗 B220 抗体、Alexa Fluor 647 標識抗 CD31 抗体と 4°C で一晚反応させた後、洗浄し Alexa Fluor 555 標識ストレプトアビジンで 1 時間反応させた。

ケモカイン受容体の染色では、切片はヤギ IgG を含む 2% BSA/PBS でブロックした後、Streptavidin/Biotin Blocking Kit でブロックした。Alexa Fluor 647 標識抗 CCR3 抗体または APC 標識抗 CCR10 抗体と Alexa Fluor 647 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体と反応させた後、ラット IgG を含む 2% BSA/PBS で再度ブロックした。その後、切片はビオチン化抗 CD4 抗体、続いて Alexa Fluor 555 標識ストレプトアビジンおよび DAPI で染色した。

ケモカインの染色では、切片をロバ IgG を含む 2% BSA/PBS でブロックした後、ヤギ抗 CCL28 抗体と 4°C で一晚反応させ、その後 Alexa Fluor 555 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体と反応させた。その後、ラット IgG を含む 2% BSA/PBS で再度ブロックし、Alexa Fluor 647 標識抗 CD31 抗体と反応させ、DAPI で染色した。染色した切片は、ProLong Gold Antifade Reagent でマウントし、共焦点顕微鏡 (C1si; Nikon) を用いて観察した。他のケモカインについても同様に染色した。

(7) 好中球の食食アッセイ：鼻粘膜から調整した好中球を pHrodo Green 標識大腸菌 (Thermo Fischer Scientific) と 37°C または氷上で 30 分インキュベートした後、氷冷したバッファの添加により食食反応を停止させた。その後、細胞表面マーカーを染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

#### 4. 研究成果

(1) アレルギー性鼻炎モデルにおける T 細胞の鼻粘膜浸潤機構：マウスへの OVA 腹腔内投与とその後の鼻腔内投与によりアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製した。アレルギー性鼻炎モデルにおいては、エフェクター/メモリー CD4 T 細胞が鼻炎誘導時に鼻粘膜に顕著に浸潤することを示した。さらに、リンパ球が感作される場と考えられる NALT で、ケモカイン受容体の発現について定量 PCR により解析したところ、CCR3 および CCR10 mRNA の発現が上昇することを見いだした。また、鼻粘膜に浸潤した CD4 T 細胞の一部が CCR3 または CCR10 を発現することをフローサイトメトリーおよび免疫組織染色で見いだした。そこで、CCR3 と CCR10 のリガンドとして機能するケモカインである CCL28 について免疫組織染色により検討した結果、アレルギー性鼻炎マウスでは鼻粘膜上皮で発現が亢進することを認めた。

メモリー T 細胞の鼻粘膜浸潤における CCL28 の機能的役割を明らかにするため、CCL28 欠損マウスにアレルギー性鼻炎を惹起して、症状や病態について解析した。その結果、CCL28 欠損マウスでは、野生型マウスと比較してくしゃみなどの鼻炎症状や鼻粘膜炎症が減弱した。さらに、鼻粘膜に浸潤したエフェクター/メモリー T 細胞数が減少することを見いだした。したがって、鼻粘膜への T 細胞浸潤が CCL28 に依存することが示された。

他のケモカインについても網羅的に検討し、CCL28 以外の CCR3 リガンドの mRNA 発現がアレルギー性鼻炎マウスの鼻粘膜で上昇することを見いだした。さらに、リガンドとなるケモカインタンパク質の鼻粘膜での発現も上昇したことから、複数の CCR3 リガンドがアレルギー性鼻炎の病態に関与することが示された。

(2) アレルギー性鼻炎モデルにおける好中球の鼻粘膜浸潤機構：マウス鼻粘膜に存在する骨髄系細胞の細胞表面マーカーの発現プロファイルの解析を行った。その結果、通常的好中球と比較して活性化した表現型を示すサブセットが、鼻粘膜に特異的に存在することを見いだした。さらに、鼻腔への抗原投与時にこのサブセットが増加し、通常的好中球と比較して高い食食能を示すことを見いだした。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Matsuo, K., Nagakubo, D., Yamamoto, S., Shigeta, A., Tomida, S., Fujita, M., Hirata, T., Tsunoda, I., Nakayama, T., and Yoshie, O. (2018). CCL28-deficient mice have reduced IgA antibody-secreting cells and an altered microbiota in the colon. *J. Immunol.* 200, 800-809. (査読有)  
doi: 10.4049/jimmunol.1700037.
- ② Satooka, H., Nagakubo, D., Sato, T., and Hirata, T. (2017). The ERM protein moesin regulates CD8<sup>+</sup> regulatory T cell homeostasis and self-tolerance. *J. Immunol.* 199, 3418-3426. (査読有)  
doi: 10.4049/jimmunol.1700074.
- ③ Mashud, R., Nomachi, A., Hayakawa, A., Kubouchi, K., Danno, S., Hirata, T., Matsuo, K., Nakayama, T., Satoh, R., Sugiura, R., Abe, M., Sakimura, K., Wakana, S., Ohsaki, H., Kamoshida, S., and Mukai, H. (2017). Impaired lymphocyte trafficking in mice deficient in the kinase activity of

PKN1. *Sci. Rep.* 7, 7663. (査読有)

doi: 10.1038/s41598-017-07936-9.

- ④ Matsumoto, M. and Hirata, T. (2016). Moesin regulates neutrophil rolling velocity in vivo. *Cell. Immunol.* 304-305, 59-62. (査読有)  
doi: 10.1016/j.cellimm.2016.04.007.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Satooka H., Sato T., Nakamura Y., and Hirata T. Redox-mediated regulatory T cell homeostasis and its involvement in autoimmunity. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会. 2018 年 12 月 12 日, 福岡国際会議場 (福岡市).
- ② Sato T., Satooka H., and Hirata T. Characterization of rheumatoid arthritis-associated interstitial pneumonia using collagen-induced arthritis mice. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会. 2018 年 12 月 12 日, 福岡国際会議場 (福岡市).
- ③ Matsui M., Satooka H., Nakamura Y., and Hirata T. The ERM protein moesin regulates natural killer cell distribution in vivo. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会. 2018 年 12 月 10 日, 福岡国際会議場 (福岡市).
- ④ 里岡大樹, 佐藤知実, 平田多佳子. ERM タンパク質 moesin による CD8<sup>+</sup> Treg 細胞の恒常的維持とその自己寛容への関与. 第 28 回 Kyoto T Cell Conference. 2018 年 6 月 16 日, 京都大学芝蘭会館 (京都市).
- ⑤ Satooka H., Nagakubo D., Sato T., and Hirata T. The ERM protein moesin regulates CD8<sup>+</sup> regulatory T cell homeostasis and self-tolerance. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会. 2017 年 12 月 14 日, 仙台国際センター (仙台市).
- ⑥ Nagakubo D., Matsui M., Satooka H., Sato T., Matsuo K., Yamamoto S., Nakayama T., Yoshie O., and Hirata T. Involvement of CCL28 in the pathogenesis of allergic rhinitis in a mouse model. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会. 2017 年 12 月 12 日, 仙台国際センター (仙台市).
- ⑦ Matsui M., Nagakubo D., Satooka H., and Hirata T. Role of neutrophils in the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会. 2017 年 12 月 12 日, 仙台国際センター (仙台市).
- ⑧ Sato T., Satooka H., Nagakubo D., and Hirata T. Characterization of rheumatoid arthritis-associated interstitial pneumonia using collagen-induced arthritis. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会. 2017 年 12 月 12 日, 仙台国際センター (仙台市).
- ⑨ Mashud R., Nomachi A., Hayakawa A., Kubouchi K., Danno S., Hirata T., Matsuo K., Nakayama T., Satoh R., Sugiura R., Abe M., Sakimura K., Wakana S., Ohsaki H., Kamoshida S., and Mukai H. PKN1 はリンパ球の細胞運動・トラフィックを制御する. ConBio2017. 2017 年 12 月 6 日, 神戸国際展示場 (神戸市).
- ⑩ Satooka H., Nagakubo D., Sato T., and Hirata T. Impaired CD8<sup>+</sup> regulatory T cell homeostasis and self-tolerance in moesin-deficient mice. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference. 2017 年 3 月 13-17 日, 京都大学芝蘭会館 (京都市).
- ⑪ Nagakubo D., Satooka H., Sato T., Matsui M., Matsuo K., Nakayama T., Yoshie O., and Hirata T. CCL28 regulates CD4<sup>+</sup> T cell recruitment to the nasal mucosa in a mouse model of allergic rhinitis. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference. 2017 年 3 月 13-17 日, 京都大学芝蘭会館 (京都市).
- ⑫ 長久保大輔, 松尾一彦, 中山隆志, 義江修, 平田多佳子. アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける CD4<sup>+</sup>メモリーT 細胞の鼻粘膜浸潤機構. 第 26 回 Kyoto T Cell Conference. 2016 年 5 月 21 日, 延暦寺会館 (大津市).

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbio/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：長久保大輔、里岡大樹、佐藤知実、松井展、中村優月

ローマ字氏名：Daisuke Nagakubo, Hiroki Satooka, Tomomi Sato, Makoto Matsui, Yuzuki Nakamura

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。