

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590496

研究課題名（和文）リンパ球の皮膚浸潤の分子機構の解明とその制御

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of lymphocyte migration to the skin and its regulation

研究代表者

平田 多佳子（HIRATRA TAKAKO）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：00346199

研究成果の概要：体の外面を覆う皮膚に浸潤する T 細胞は感染防御において中心的役割を担うだけでなく、アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患の病因・病態にも関与する。その浸潤は血管内皮細胞上のセレクトインと T 細胞上のセレクトインリガンドとの相互作用により開始されるが、その分子レベルでの詳細は不明であった。本研究では、T 細胞上のセレクトインリガンドとして PSGL-1、CD43、ESL-1 を同定し、これらの分子が協同的に T 細胞の皮膚浸潤を媒介することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(1)T 細胞 (2)接着分子 (3)セレクトイン (4)シアロムチン (5)CD43 (6)PSGL-1 (7)皮膚 (8)白血球ローリング

1. 研究開始当初の背景

体外から侵入しようとする感染性病原体に対して最初のバリアーとして機能するのが、体の外面を覆う「皮膚」である。感染防御の最前線である皮膚には定常時にもメモリーT細胞が存在するが、感染時にはエフェクターT細胞が速やかに動員され、感染防御において中心的役割を担う。また、皮膚に浸潤する T 細胞はアトピー性皮膚炎、乾癬、アレルギー性接触性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患の病因・病態に関与する。した

がって、T 細胞の皮膚浸潤の分子機構の解明は、T 細胞の浸潤制御の観点から皮膚の感染・炎症を制御しようとする治療戦略の根幹を築くものと考えられる。

皮膚に浸潤するエフェクター/メモリーT細胞は、皮膚の後毛細管静脈から、血管内皮細胞表面でのローリング・活性化・強固な接着・血管外遊走といった連続したステップを経て組織内に移行する。この最初のステップであるローリングは血管内皮細胞に発現する P-セレクトインおよび E-セレクト

チンと T 細胞上に発現するセレクトインリガンドが相互作用することにより媒介されると考えられている。しかし、T 細胞上に発現するセレクトインリガンドの分子レベルでの実体やその活性の制御機構の詳細は不明であった。

研究代表者らは世界に先駆けて P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を欠損するマウスを作製し、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 が皮膚血管内皮細胞に発現する P-セレクトインおよび E-セレクトインのリガンドとして機能することを明らかにしてきた。同時に、PSGL-1 以外に生理的に重要な E-セレクトインリガンドが存在することを見いだしたが、新規 E-セレクトインリガンド分子の実体についてはほとんど理解がすすんでいなかった。そこで、マウス Th1 細胞から E-セレクトイン-IgG キメラタンパク質を用いてアフィニティ精製を行った結果、約 130 kDa の分子を見だし、生化学的解析からこの分子が CD43 であることを明らかにした。研究代表者らの報告より数ヶ月遅れてアメリカのグループからも、ヒトの皮膚浸潤性 T 細胞上の CD43 が E-セレクトインリガンドであるという報告がなされた。今まで CD43 は主に接着を阻害する分子として機能すると考えられていたが、適切な糖鎖修飾によりセレクトインリガンドとして機能するという事は、CD43 の抗接着分子から接着分子へのスイッチを説明するものと考えられる。しかし、これらは主に *in vitro* のデータであるため、CD43 が生体内で E-セレクトインリガンドとして機能するか明らかにすることは急務であると考えられた。さらに、PSGL-1、CD43 以外にも新たな E-セレクトインリガンド分子が T 細胞上に存在することが示唆され、これらの新規 E-セレクトインリガンド分子の実体を明らかにすることは、T 細胞の皮膚浸潤の分子基盤を解明する上で必須であると考えられた。また、ナイーブ T 細胞が抗原刺激によりセレクトイン結合活性を獲得するメカニズムについては不明の点が多く、その分子機構の解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究は、第一に、エフェクター/メモリー T 細胞上のセレクトインリガンド分子の実体とその生体内での機能を解明することを目的とする。まず、研究代表者らが E-セレクトインリガンドとして *in vitro* で同定した CD43 が生体内で E-セレクトインリガンドとして機能するか明らかにする。さらに、PSGL-1 や CD43 以外の新規 E-セレクトインリガンド分子の同定を試みる。これらの複数の E-セレクトインリガンド分子の相対的役割や機能の相違について検討し、各分子が生体内で

どのように T 細胞の皮膚浸潤を媒介するか明らかにする。

第二に、セレクトインリガンドの発現やセレクトイン結合活性が生体内でどのように誘導・維持されるのか解析し、元来皮膚浸潤活性を有しないナイーブ T 細胞が、抗原刺激により皮膚浸潤能を獲得する分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス：C57BL/6 (B6) マウスは日本クレーラから購入した。B6 遺伝的背景 PSGL-1 欠損マウスは Furie 博士 (Harvard 大学医学部) より供与を受けた。CD43 欠損マウス (B6 X 129S4/SvJae 背景) は Jackson 研究所より購入した。PSGL-1 欠損マウスと CD43 欠損マウスを交配してダブルヘテロ接合型マウスを得た。これらの交配により、野生型、PSGL-1 欠損、CD43 欠損、PSGL-1/CD43 欠損 (DKO) マウスを得た。すべてのマウスは 6-10 週齢で実験に使用した。これらのマウスは大阪大学医学部附属動物実験施設にて飼育した。すべての研究や手順は大阪大学大学院医学系研究科動物実験委員会および大阪大学微生物病研究所動物実験委員会により承認された。

(2) キメラタンパク質：ESL-1 とヒト IgG のキメラコンストラクトを作製するために、ESL-1 の細胞外ドメインを PCR により増幅し、CD5 leader-IgG1 ベクター (Massachusetts General Hospital の Seed 博士より供与) の *NheI* と *BamHI* 部位に挿入した。PSGL-1-IgG キメラコンストラクトも同様に作製した。これらのキメラコンストラクトを α -1, 3-フコース転移酵素 VII (FucT-VII) とコア 2 β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (C2GlcNAcT) を発現する CHO 細胞 (CD7II 細胞) に ESCORT V (Sigma-Aldrich) を用いて導入し、プロテイン A-セファロース (GE Healthcare) を用いて培養上清からキメラタンパク質を精製した。

E-セレクトイン-IgM キメラタンパク質のプラスミドは Lowe 博士 (Michigan 大学医学部) より供与された。COS-7 細胞にプラスミドを DEAE-dextran 法により導入し、培養上清を回収した。E-セレクトイン-IgG キメラタンパク質は CHO 安定発現株の培養上清からプロテイン A-セファロースを用いて精製した。

(3) マウス Th1 細胞の作製：脾臓の CD4 T 細胞は BD IMag CD4 T Lymphocyte Enrichment Set (BD Biosciences) を用いて精製した。精製した細胞は 90%以上 CD4 陽性であった。精製した CD4 T 細胞を 10 μ g/ml の抗 CD3e (145-2C11; BD Biosciences) および 10 μ g/ml の抗 CD28 (37.51; BD Biosciences) でコートした 6 cm 組織培養ディッシュで 4 ng/ml の IL-2 (R&D Systems)、8 ng/ml の IL-12 (R&D

Systems)、0.2 $\mu\text{g/ml}$ の抗 IL-4 (11B11; BD Biosciences) の存在下 2 日間培養した。その後、細胞をコートしていないディッシュに移し、さらに 4 日間培養した。

(4) 接触過敏症の誘導：マウスの剪毛腹部皮膚に 4:1 アセトン/オリーブ油溶液に溶解した 2% (w/v) oxazolone (Sigma-Aldrich) を 100 μl 塗布し、6 日後に 0.5% (w/v) oxazolone 20 μl を左耳介に塗布した。

(5) in vivo での細胞移動アッセイ：Th1 細胞は 6 日間の培養後に回収し、Ficoll-PaquePLUS (GE Healthcare) 上で遠心して死細胞を除去した。T 細胞は oxazolone で感作したマウスの所属リンパ節から単離した。これらの細胞を 50 $\mu\text{Ci/ml}$ の [^{51}Cr] クロム酸ナトリウム (MP Biomedicals) で 37°C 1 時間標識し、二度洗浄後、PBS に懸濁した。これらの細胞を、7 日前に感作し 24 時間前に左耳にチャレンジしたマウスの尾静脈に注射した。3 時間後 (Th1 細胞) あるいは 24 時間後 (リンパ節 T 細胞) に耳介と脾臓の放射活性を Packard Instruments gamma scintillation counter で測定した。

(6) E-セレクトリン-IgG によるアフィニティ精製：野生型および DKO マウスより作製した Th1 細胞を PBS で 3 回洗浄し、細胞表面を sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce) を用いてビオチン標識した。標識した細胞を 3 X 10⁷ cells/ml の濃度で lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM PMSF) で 30 分溶解した。不溶物は 15,000 X g で 20 分遠心して沈降させた。上清をプロテイン A-セファロースでプレクリアし、E-セレクトリン-IgG キメラタンパク質を結合させたプロテイン A-セファロースとインキュベートした。4 時間後、セファロースビーズを wash buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) で 5 回洗浄し、溶出液 (5 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.05% Triton X-100) で溶出した。溶出物を SDS-PAGE で分離し、イモビロン-P 膜 (Millipore) に転写した。膜は HRP 標識ストレプトアビジン (SA-HRP; Zymed Laboratories) でプロットした。膜はまた、ウサギ抗 ESL-1 抗体 (Furie 博士より供与) および HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (American Qualex) を用いてプロットした。

(7) フロー条件下での細胞接着実験：ESL-1-IgG, PSGL-1-IgG またはヒト IgG (1 $\mu\text{g/ml}$) をガラスキャピラリーに 4°C でオーバーナイト固相化し、その後、3% BSA で 1 時間室温にてブロックした。キャピラリーを顕微鏡のステージにのせ、X 4 対物レンズを用いて観察した。マウス E-セレクトリンを発現する CHO 細胞 (CHO-E 細胞) あるいは対照 CHO 細胞を HBSS に 1 X 10⁶ cells/ml で懸濁し、1

dyn/cm² でキャピラリーに流した。3 分後から録画を開始した。キャピラリーの一定平面を通過するローリング細胞数を計測し、1 分間当たりのローリング細胞数を算出した。

(8) フローサイトメトリー：感作の 2、4、6 日後に所属リンパ節を摘出し、単細胞懸濁液を調整した。細胞を GolgiPlug (BD Biosciences) 存在下 PMA (200 ng/ml) および ionomycin (500 nM) で 4 時間刺激した。E-セレクトリン-IgM と 4°C で 30 分インキュベートした後、洗浄し、FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgM、抗 CD4-PE-Cy5、抗 CD8-APC と 4°C で 30 分インキュベートした。洗浄後、Fixation/Permeabilization solution (BD Biosciences) を加え 4°C で 20 分インキュベートし、抗 IFN- γ -PE または抗 IL-17-PE で染色した。あるいは、Foxp3 Fixation/Permeabilization buffer (eBioscience) を加え 4°C で 30 分インキュベートし、抗 Foxp3-PE で染色した。

(9) 定量 RT-PCR：感作 4 日後に所属リンパ節を摘出し、単細胞懸濁液を調整した。BD IMag CD4 T Lymphocyte Enrichment Set および BD IMag CD8 T Lymphocyte Enrichment Set を用いて CD4 T 細胞、CD8 T 細胞を精製した。これらの細胞から TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を精製し、Superscript III (Invitrogen) および random hexamers (Invitrogen) を用いて RT を行った。PCR は 7500 Real Time PCR System を用いて、cDNA、1 X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)、1 X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) を含む最終容量 25 μl の溶液で、50°C 2 分、95°C 10 分の後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 40 サイクル行った。内在性コントロールとしては真核生物 18S rRNA を増幅した。

4. 研究成果

(1) 新規 E-セレクトリンリガンド CD43 の生体内での機能：これまでに、マウス Th1 細胞から E-セレクトリン-IgG キメラタンパク質を用いてアフィニティ精製を行った結果、約 130 kDa の分子を見だし、生化学的解析からこの分子が CD43 であることを明らかにした。このように同定した CD43 が生体内で E-セレクトリンリガンドとして機能するか、また PSGL-1 と CD43 がどのように機能分担するか明らかにするため、両分子を欠損するマウスを作製した。PSGL-1 または CD43 を欠損するマウスから in vitro で作製した Th1 細胞では E-セレクトリン結合活性が低下したが、PSGL-1 と CD43 の両者を欠損する Th1 細胞では結合活性がさらに低下した。また、接触過敏症モデルにおける Th1 細胞の炎症皮膚への集積は、両分子を欠損する場合に

最も低下した。同様に、生体内で感作された T 細胞の E-セレクトリン結合活性や炎症皮膚への集積も、PSGL-1 および CD43 の両者を欠損する場合に最も低下した。このように、CD43 が PSGL-1 と共に E-セレクトリンリガンドとして機能し、T 細胞の皮膚への動員を媒介することが明らかになった。

(2) PSGL-1、CD43 以外の新規 E-セレクトリンリガンドの同定：PSGL-1 と CD43 の両分子を欠損しても T 細胞の炎症皮膚への集積が残存したことから、これらの分子以外にも新規 E-セレクトリンリガンドが存在することが示された。そこで、両分子を欠損する T 細胞の生化学的解析を行った結果、新規 E-セレクトリンリガンドとして ESL-1 を同定した。さらに、特定の糖鎖修飾を受けた ESL-1 が生理的なフロー条件下で E-セレクトリン依存的なローリングを媒介することを明らかにした。

(3) セレクトリンリガンドの生体内での発現・活性の動態：セレクトリンリガンドは抗原刺激による分化・増殖の過程でリガンド活性を獲得する。本研究では、マウスの接触過敏症モデルを用いて、抗原刺激後の T 細胞のセレクトリンリガンド活性の動態を解析した。その結果、セレクトリンリガンド活性は、IFN- γ 産生 CD8 T 細胞、IFN- γ 産生 CD4 T 細胞、IL-17 産生 CD8 T 細胞、IL-17 産生 CD4 T 細胞、Foxp3 陽性 CD4 T 細胞などの複数の T 細胞サブセットに誘導され、抗原刺激後 4 日目にピークに達した。また、セレクトリンリガンド活性の発現には糖鎖修飾を媒介する酵素群の発現が必要であることから、その発現動態をリアルタイム PCR により解析したところ、特定のフコース転移酵素、硫酸転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素の発現の亢進が認められた。以上から、抗原刺激によるセレクトリンリガンド活性の発現は、複数の糖鎖修飾酵素の発現の誘導により付与されることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Shigeta, A., Matsumoto, M., Tedder, T.F., Lowe, L.B., Miyasaka, M., and Hirata, T. (2008). An L-selectin ligand distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and promotes neutrophil rolling in inflammation. **Blood** 112, 4915-4923. (査読有)
- ② 松本真典, 平田多佳子. (2008). T 細胞の炎症局所への動員における CD43 の生理的役割. **臨床免疫・アレルギー科** 50, 437-442. (査読無)

- ③ Jin, S., Umemoto, E., Tanaka, T., Shimomura, Y., Tohya, K., Kunizawa, K., Yang, B.G., Jang, M.H., Hirata, T., and Miyasaka, M. (2008). Nepmucin/CLM-9, an Ig domain-containing sialomucin in vascular endothelial cells, promotes lymphocyte transendothelial migration in vitro. **FEBS Lett.** 582, 3018-3024. (査読有)
- ④ Matsumoto, M., Shigeta, A., Miyasaka, M., and Hirata, T. (2008). CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil trafficking in a context-dependent manner. **J. Immunol.** 181, 3628-3635. (査読有)
- ⑤ Sugahara, K.N., Hirata, T., Tanaka, T., Ogino, S., Takeda, M., Terasawa H., Shimada, I., Tamura, J., ten Dam, G.B., van Kuppevelt, T.H., and Miyasaka, M. (2008). Chondroitin sulfate E fragments enhance CD44 cleavage and CD44-dependent motility in tumor cells. **Cancer Res.** 68, 7191-7199. (査読有)
- ⑥ Furukawa, Y., Umemoto, E., Jang, M.H., Tohya, K., Miyasaka, M., and Hirata, T. (2008). Identification of novel isoforms of mouse L-selectin with different carboxy-terminal tails. **J. Biol. Chem.** 283, 12112-12119. (査読有)
- ⑦ Guo, Z., Jang, M.H., Otani, K., Bai, Z., Umemoto, E., Matsumoto, M., Nishiyama, M., Yamasaki, M., Ueha, S., Matsushima, K., Hirata, T., and Miyasaka, M. (2008). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. **Int. Immunol.** 20, 307-315. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Matsumoto, M. PSGL-1 negatively regulates T cell immune responses in vivo. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 1 日, 京都.
- ② Serigano, N. Phiperal lymphopenia in moesin-deficient mice. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 1 日, 京都.
- ③ Matsumoto, M. An anti-adhesive role of PSGL-1 in T cells. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 2007 年 11 月 20 日, 東京.
- ④ Shigeta, A. An endothelial L-selectin is important for E-selectin-mediated neutrophil rolling in inflammation. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 2007 年 11 月 20 日, 東京.
- ⑤ Guo, Z. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 2007 年 11 月 20

日, 東京.

[その他]

ホームページ

http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_hirata.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 多佳子 (HIRATA TAKAKO)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：00346199

(2) 研究分担者

重田 暁子 (SHIGETA AKIKO)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：50420435

(3) 連携研究者

なし