

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590737

研究課題名（和文） CEACAM1による腸管粘膜IL-7ネットワーク調節機構の解明

研究課題名（英文） CEACAM1 regulates the cytokine network in intestinal mucosa

研究代表者

永石 宇司（NAGAIISHI TAKASHI）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60447464

研究成果の概要（和文）：

本研究は申請者が独自に研究を展開してきたCEACAM1分子によるリンパ球の機能調節に注目し、腸管粘膜における免疫学的恒常性の維持におけるその作用意義について着目している。その結果、本研究では当該研究期間に主として以下のような成果が得られた。トランスジェニックマウスやレトロウイルスベクターによって導入されたCD4<sup>+</sup> T細胞におけるCEACAM1の過剰発現系解析では、増殖能およびサイトカイン産生に大きな変化をもたらし、実験腸炎モデルの発症抑制に繋がること明らかになった。またこうしたCEACAM1の過剰発現系においてTNFなど様々な炎症性サイトカイン産生や増殖、分化が阻害されるのは、T細胞受容体(TCR)シグナルの伝達阻害が誘導されるためであることが明らかとなった。こうしたCEACAM1によるTCRシグナルの阻害はSH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP-1)のリン酸化に依存することが確認された。これらの研究結果はCEACAM1が腸管粘膜の免疫調節に深く関与する事実を暗示するものと思われる。そしてこの分子が炎症性腸疾患の病態において治療標的になりうることが示唆された。今後はこの分子によるシグナル調節の分子メカニズム、さらに恒常的な腸管粘膜の細胞間クロストークを介した免疫調節メカニズムを追求することによって、炎症性腸疾患に対する新規治療法開発の基盤に繋げることができると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is characterized by unrestrained lymphocyte activation that results in the production of a variety of pro-inflammatory cytokines and other mediators. Understanding the mechanisms of lymphocyte regulation is therefore of significant importance to dysregulated mucosal inflammation such as IBD. An area that is of significant interest is the cell autonomous mechanisms of T cell regulation through proteins that have natural inhibitory functions when expressed on T lymphocytes. In this regard, we have observed that carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) has the general property of negatively regulating T cell responses that are initiated by antigen/MHC complex-mediated signals. Moreover, we have demonstrated that this is clinically relevant, as CEACAM1 functions in the suppression of an IBD model. Defining the mechanisms of

CEACAM1-mediated T cell regulation will lead to a significant understanding of the manner in which manipulation of this molecule may provide insights into novel therapeutic methods for the treatment of IBD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学（内科系臨床医学）

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：CEACAM1、リンパ球、粘膜免疫、サイトカイン、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細菌菌体成分や食餌抗原など腸管内腔の抗原物質に絶えず暴露される消化管粘膜において、「免疫寛容」の成立は局所ならびに全身の免疫学的恒常性維持に不可欠である。一方、この機構の破綻は種々の抗原への過剰で病的な免疫反応誘導を来し、IBDや食物アレルギーなどの病態に深く関わってくる。

2. 研究の目的

最近、代表申請者はCEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)分子が「T細胞-T細胞間干渉機構」を介してT細胞自身の機能を抑制するという先駆的かつ独創的な知見を見出し、新しい様式の免疫調節機構の存在を明らかにした (*Immunity* 2006)。本申請研究ではこの独自の知見を基盤とし、特に我々がこれまで示してきた「サイトカインを介した上皮-リンパ球間ネットワーク」による局所免疫調節への関与に焦点を当てることによって、CEACAM1分子が腸管粘膜免疫機構に果たす役割についてさらに追求することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1: CEACAM1がT細胞のサイトカインシグナルに及ぼす影響の解明

A) レトロウイルスベクター過剰発現系を用いたT細胞機能の解析

レトロウイルスベクター-GFP-RVには

CEACAM1 cDNA挿入部位の下流にIRESを挟んでGFPが挿入されており、CEACAM1の過剰発現をGFPで確認することができる。野生型 (WT) C57BL6マウスから単離したCD4<sup>+</sup>T細胞もしくはマウスT細胞株4A2にこれらのウイルスを感染させ、GFP<sup>+</sup>細胞のみをソーティングする。これらCEACAM1の各バリエーションを強制発現させたGFP<sup>+</sup>細胞のIL-7R発現などをフローサイトメトリーで確認する。またこれらの細胞を培養し培養上清中のサイトカイン産生を測定する。さらにこれらの細胞のIL-7感受性などを測定する。また [<sup>3</sup>H]-thymidineを用いて細胞増殖試験を行う。

B) CEACAM1-4Lトランスジェニックマウスの表現型解析

研究代表者は既にCD2プロモーター制御によるTリンパ球特異的CEACAM1トランスジェニックマウス (Tg) を作成している。より生理的なこの発現モデルによって、レトロウイルスベクター発現系では確認できないCEACAM1発現によるT細胞への影響を探る。まずこのマウスモデルの全身的な検査を行い各臓器、特に骨髄、胸腺、脾臓、抹消リンパ節など免疫関連臓器に注目してspontaneousな病変がないか病理組織学的評価を行う。次に各免疫関連臓器からリンパ球を単離し、フローサイトメーター (FACS) を用いて各細胞集団、特にTリンパ球の各サブセットの変化、特にIL-7R発現などを評価する。またWTおよびTgのCD4<sup>+</sup>T細胞を磁気ビーズなどで単離し、これらの細胞の培養上清中のサイトカイン産生、IL-7感受性、細胞

増殖能を測定する。またその蛋白試料中のIL-7RやJAK1、JAK3、STAT5、PI3Kなどその下流のシグナル分子の発現やリン酸化をウエスタンブロット法によって確認する。

### 3-2: CEACAM1が細胞間干渉に及ぼす影響の解明

#### A) 腸上皮細胞株を用いたサイトカインネットワーク関連遺伝子発現解析

マウス腸上皮細胞株CT26細胞やMODE-K細胞をOT-マウス、もしくはOT-マウスと交配したCEACAM1トランスジェニックマウス(Tg)から単離したCD4<sup>+</sup>T細胞とOVAの存在下で混合培養し、培養上清中のIFN- $\gamma$ その他のサイトカインを測定する。またこの上皮細胞からmRNAや蛋白質を抽出し、IRF-1やIL-7などの発現をRT-PCR法やウエスタンブロット法によって確認する。

#### B) 実験腸炎組織を用いたサイトカイン遺伝子発現解析

野生型(WT)およびCEACAM1トランスジェニックマウス(Tg)にTNBS、Oxazoloneなどのハプテン誘発性腸炎、もしくはTCR $\alpha^{-/-}$ やRAG $\gamma^{-/-}$ とTgを交配し慢性腸炎を作製する。実験腸炎を発症したマウスの大腸粘膜組織から、CEACAM1による上皮その他の細胞への影響の評価をおこなう。

## 4. 研究成果

本研究は申請者が独自に研究を展開してきたCEACAM1分子によるリンパ球の機能調節に注目し、腸管粘膜における免疫学的恒常性の維持におけるその作用意義について着目している。その結果、本研究では当該研究期間に以下のような成果が得られた。

1) レトロウイルスベクターを用いた過剰発現系では、CEACAM1によって炎症性腸疾患の病態を形成する様々な炎症性サイトカインの産生が阻害されることが示唆された。またそれ以外にも様々なサイトカイン受容体の発現抑制や、それによるシグナル伝達が阻害されることも示唆された。さらにこうしたシグナル阻害によって細胞増殖能や細胞の分化などにも影響を与えることが明らかとなった。こうしたCEACAM1の作用には、何らかのチロシンキナーゼの介在が必要であることが推測された。

2) CEACAM1トランスジェニックマウスの解析では、脾臓など網内系の中核では顕著でないものの、末梢リンパ節や腸管粘膜局所におけるリンパ球集団に大きな変化をもたらすことが明らかになった。

3) CEACAM1トランスジェニックマ

ウスと交配したOT-マウスから単離したCD4<sup>+</sup>T細胞の解析では、OVAの抗原提示を受けたリンパ球の増殖能およびサイトカイン産生に大きな変化をもたらすことが明らかになった。

4) トランスジェニックマウスやレトロウイルスベクターによって導入されたCD4<sup>+</sup>T細胞におけるCEACAM1の過剰発現系解析では、リンパ球の増殖能およびサイトカイン産生に大きな変化をもたらす結果、実験腸炎モデルの発症抑制に繋がることが明らかになった。

5) こうしたCEACAM1の過剰発現系においてTNFなど様々な炎症性サイトカイン産生やリンパ球の増殖や分化が阻害されるのは、T細胞受容体(TCR)シグナルの伝達阻害が誘導されるためであることが明らかとなった。

6) こうしたCEACAM1によるTCRシグナルの阻害はZAP-70を標的とすることによって誘導され、SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1(SHP-1)のリン酸化に依存することが確認された。

これらの研究結果はCEACAM1が腸管粘膜の免疫調節に深く関与する事実を暗示するものと思われる。そしてこの分子が炎症性腸疾患の病態において治療標的になりうることが示唆された。

今後はこの分子によるシグナル調節の分子メカニズム、さらに恒常的な腸管粘膜の細胞間クロストークを介した免疫調節メカニズムを追求することによって、炎症性腸疾患に対する新規治療法開発の基盤に繋げることができると期待される。

## 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10件)

1. 永石宇司、山地統、渡辺守. 腹部症状発現メカニズム解明への臨床的アプローチ: 腸内細菌、炎症と腹部症状. Modern Physician 31: 311-313, 2011 無

2. 永石宇司. CEACAM1によるシグナル伝達. 分子消化器病 6:173-177, 2009 無

3. 永石宇司、渡辺守. ヒスチジン栄養療法はマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制して腸炎モデルを改善させる.

Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology 4(2):42-45, 2009 無

4. 永石宇司. 腸管免疫における免疫寛容機構破綻の病態解明および新規治療

法の開発. アレルギー 37;57-60, 2008 無

5. 永石宇司、ほか. Microsomal triglyceride transfer proteinによるNKT細胞介在性肝炎および腸炎の制御. 消化器と免疫 44;7-10, 2008 無

6. Takamiya R, Nagaishi T, et al. High mobility group box 1 contributes to lethality of endotoxemia in heme oxygenase-1 deficient mice. Am J Respir Cell Mol Biol 41;129-135, 2009 有

7. Kuo T, Nagaishi T, et al. N-glycan moieties in FcRn determine steady-state membrane distribution and directional transport of IgG. J Biol Chem 284;8292-8300, 2009 有

8. Onizawa M, Nagaishi T, et al. Signaling pathway via TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. Am J Physiol Gastro-intest Liver Physiol 296;G850-G859, 2009 有

9. Nagaishi T, et al. CEACAM1 and the regulation of mucosal inflammation. Mucosal Immunology 1; S39-S42, 2008 有

10. Chen Z, Nagaishi T, et al. Carcino embryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits proximal TCR signaling by targeting ZAP-70. J Immunol 180; 6085-6093, 2008 有

[学会発表](計 17 件)

1. Onizawa M, Nagaishi T, et al. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathways in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. The 4<sup>th</sup> Japan and US Collaboration Conference in Gastroenterology. 2010.11.18. 東京

2. Yui S, Nagaishi T, et al. A well-defined culture system for colonic epithelial cells that allows efficient enrichment of LGR5+ stem cells. The 1<sup>st</sup> JSGE International Topic Conference -Stem Cells in Digestive Organs. 2010.9.26. 鎌倉

3. Onizawa M, Nagaishi T, et al. TNF pathway in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. 国際免疫学会議. 2010.8.25. 神戸

4. Onizawa M, Nagaishi T, et al. Myosin light chain kinase is associated with disruption of epithelial tight junction in an animal model of colitis-associated tumor. アメリカ臨床免疫学会. 2010.6.25. ボストン

5. Onizawa M, Nagaishi T, et al. Myosin light chain kinase is associated with disruption of epithelial tight junction in colitis-associated tumor. アメリカ消化器病学会. 2010.5.2. ニューオリンズ

6. Nagaishi T, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in intestinal epithelia may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. Advances in Inflammatory Bowel Diseases. 2009.12.4. マイアミ

7. Onizawa M, Nagaishi T, et al. TNF receptor signaling in intestinal epithelia may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. 国際粘膜免疫学会議. 2009. 7.7. ボストン

8. Onizawa M, Nagaishi T, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. アメリカ臨床免疫学会. 2009.6.11. サンフランシスコ

9. Onizawa M, Nagaishi T, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. アメリカ消化器病学会. 2009.6.1. シカゴ

10. Nagaishi T. CEACAM1 regulates T cell function in IBD. Surface Barrier Immunology Study Group Meeting. 2009.3.7. 東京

11. 鬼沢道夫、永石宇司、ほか. Neutralization of tumor necrosis factor suppresses the development of colitis associated tumor in mice. 日本炎症性腸疾患学会. 2009.2.7. 東京

12. 永石宇司、ほか. CEACAM1による腸管粘膜免疫の調節機構. 浜名湖シンポジウム. 2008.12.20. 浜松

13. 鬼沢道夫、永石宇司、ほか. 動物モデルによる抗TNF抗体療法による炎症性腸疾患合併大腸癌の抑制の検討. 日本癌学会総会. 2008.10.28. 名古屋

14. Nagaishi T. CEACAM1 regulates T cell function in an IBD model. 21st Century Forum. 2008.5.21. San Diego

15. Nagaishi T. Updated for anti-TNF $\alpha$  behavior for Crohn's disease. MCB Club Meeting. 2008.5.20. San Diego

16. Kuo T, Nagaishi T, et al. N-glycan moieties in FcRn determines steady-state membrane distribution and directional trafficking but not cross-species IgG binding. アメリカ消化器病学会. 2008.5.21. San Diego

17. Onizawa M, Nagaishi T, et al.

Neutralization of tumor necrosis factor suppresses the development of colitis associated tumor in mice. アメリカ消化器病学会. 2008.5.21. San Diego

〔図書〕(計2件)

1. 永石宇司、渡辺守. 医学書院. 炎症性腸疾患：腸管粘膜免疫の特殊性. 2010. 267-282
2. 永石宇司、渡辺守. シナジー. 臨床粘膜免疫学：潰瘍性大腸炎. 2010. 218-232

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

永石 宇司 (NAGAIISHI TAKASHI)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60447464

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

中村 哲也 (NAKAMURA TETSUYA)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員  
研究者番号：70265809  
土屋 輝一郎 (TSUCHIYA KIICHIRO)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40376786  
渡辺 守 (WATANABE MAMORU)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：10175127