

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 2日現在

機関番号：14202
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590433
 研究課題名（和文） 炎症局所への白血球浸潤の制御による難治性炎症性疾患への治療への展開
 研究課題名（英文） Control of leukocyte migration to inflamed sites and its application to the treatment of refractory inflammatory diseases
 研究代表者
 平田 多佳子（TAKAKO HIRATA）
 滋賀医科大学・医学部・教授
 研究者番号：00346199

研究成果の概要（和文）：炎症・免疫反応時に生体に不可避に起こる事象は炎症局所への白血球の浸潤であり、白血球浸潤を制御する方法を提供できれば、細胞機能を標的にした従来の薬剤とは異なる方法で、自己免疫・アレルギーなど多くの難治性炎症性疾患の治療が可能になる。本研究では、白血球浸潤を制御する分子として ERM タンパク質メンバーの moesin を同定し、本分子が生体内で好中球やリンパ球の動態を制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Leukocyte migration to inflamed sites is an essential process that occurs during inflammation and immune responses. Control of this process provides a new approach to the treatment of a variety of refractory, inflammatory diseases. In this research project, we identified moesin, an ERM family member, as a molecule that regulates leukocyte migration. We clarified that moesin regulates neutrophil and lymphocyte trafficking in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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) 炎症 (2) アレルギー (3) 好中球 (4) リンパ球 (5) セレクチン (6) ケモカイン (7) ERM タンパク質 (8) モエシン

1. 研究開始当初の背景

炎症反応の急性期には好中球が浸潤し、慢性化するにしたがって単球が浸潤する。抗原特異的免疫応答が誘導されればリンパ球が浸潤する。このような白血球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。また、炎症局所には、炎症

を誘発するサブセットだけではなく、制御性 T 細胞のように免疫抑制機能に特化したサブセットも浸潤し、局所での反応はその総和として理解される。白血球の組織浸潤は、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る。これらのステップを媒介するセレク

チン・インテグリンなどの細胞接着分子やケモカインなどの細胞遊走因子がどのような組み合わせで発現するかによって、特定の白血球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の詳細は不明であった。

研究代表者らは、シアロムチンである 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、PSGL-1 が血管内皮細胞に発現する P-selectin のリガンドとして機能し、好中球の炎症局所血管でのローリングや浸潤を媒介することを明らかにした。さらに、好中球上のシアロムチン CD43 が、PSGL-1 とともに、血管内皮細胞に発現する E-selectin のリガンドとして機能することを報告した。一方、好中球に発現する L-selectin は内皮細胞側のリガンドと相互作用して好中球のローリングや浸潤を促進することを見いだしたが、そのリガンドの実体は不明であった。

また、研究代表者らはエフェクター/メモリー T 細胞の炎症局所浸潤においても、PSGL-1 が P-selectin と E-selectin のリガンドとして機能することや、CD43 が E-selectin 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、CD43 以外に新たな E-selectin のリガンド分子が T 細胞上に存在することを示唆するデータを得ていたが、その実体は不明であった。

比較的研究のすすんでいる上記サブセットに対し、制御性 T 細胞の炎症局所浸潤を媒介する分子についての理解は、すすんでいなかった。研究代表者らは炎症・免疫反応時に所属リンパ節で制御性 T 細胞が誘導され炎症局所に動員されること、誘導された制御性 T 細胞の多くは非常にセレクトインリガンド活性が高いことを見いだしていたが、その実体も不明であった。

これまでの研究から、このようにセレクトインリガンドには複数の分子が存在し、多くの場合、それらが協同して機能すると考えられた。しかし、その発現や活性を制御する機構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、好中球やエフェクター/メモリー T 細胞、制御性 T 細胞などのリンパ球の生体内動態と炎症局所浸潤の分子基盤の全容を解明し、各サブセットの浸潤の人為的制御による自己免疫・アレルギー治療へと展開するための基盤研究を行うことを目的とする。

まず、好中球の炎症局所浸潤の分子基盤を明らかにするため、血管内皮細胞および好中球に発現するセレクトインリガンドの実体お

よびその機能を制御する分子機構を明らかにする。

第二に、エフェクター/メモリー T 細胞や制御性 T 細胞などのリンパ球の生体内動態や炎症局所浸潤を媒介する分子を明らかにする。さらに、これらの分子の発現や活性が誘導・維持される分子メカニズムを解析し、浸潤を時空的に制御するための標的分子の同定をすすめる。

3. 研究の方法

(1) マウス : C57BL/6 (B6) マウスは日本 SLC から購入した。B6 遺伝的背景の CD45.1 コンジュニックマウスは Jackson Laboratory から購入した。moesin 欠損マウスは月田早智子博士 (大阪大学) より供与を受け、B6 マウスに 10 世代以上戻し交配した。オスの moesin 欠損マウス ($Msn^{-/-}$) と野生型同腹仔 ($Msn^{+/+}$) を実験に使用した。

骨髄キメラマウスを作製するためには、CD45.1 レシピエントマウスを放射線照射し、 $Msn^{+/+}$ または $Msn^{-/-}$ 骨髄細胞を静注した。またその逆として、 $Msn^{-/-}$ または $Msn^{+/+}$ マウスを放射線照射して、CD45.1 マウスの骨髄細胞を静注した。これらの骨髄キメラマウスは移植後 12 週以上経過してから解析した。

マウスは、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設にて飼育した。すべての研究や手順は京都大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された。

(2) 細胞の調整と刺激 : リンパ臓器をスリ付きスライドガ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リンパ球を調整した。細胞数は血球計算盤で計測した。一部の実験では、さらに Lympholyte-M (Cedarlane) を用いた密度勾配法によってリンパ球を精製した。CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、B 細胞は、CD4⁺ T Cell Isolation Kit、CD8⁺ T Cell Isolation Kit、B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて精製した。

リン酸化 ERM (pERM) の染色のためには、細胞を 2 時間血清飢餓処理し、10 nM のスフィンゴシン-1 リン酸 (S1P; Sigma) または 100 nM の CXCL12 (R&D Systems) で刺激した。

(3) 定量 PCR : RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて total RNA を精製し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) およびランダムヘキサマーを用いて RT を行った。PCR は LightCycler 480 を用いて、cDNA、1 X LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics)、1 X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) を含む最終容量 20 μ l 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 Cyclophilin B を増幅した。

(4) ウェスタンブロット解析：脾臓の CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞および B 細胞を SDS サンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGE で分離し、Clearblot-P 膜 (Atto) に転写した。膜はウサギ抗 moesin 抗体 (Cell Signaling Technology) および HRP 標識抗ウサギ IgG (American Qualex) と反応させた。あるいは、ラット抗 ezrin モノクローナル抗体 (M11; Sanko-Junyaku) および HRP 標識抗ラット IgG (American Qualex) と反応させた。

(5) フローサイトメトリー：細胞懸濁液を抗 CD16/CD32 抗体と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 LSRFortessa でデータを取得し、FlowJo を用いて解析した。

pERM の染色のためには、S1P または CXCL12 で刺激した細胞を BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit で固定、透過処理した後、ウサギ抗 pERM 抗体 (Cell Signaling Technology) および PE 標識ヤギ (Fab')₂ 抗ウサギ IgG (Beckman Coulter) とインキュベートした。

(6) 生体内顕微鏡観察：マウスを麻酔し、精巣挙筋を露出する手術を行い、細静脈における白血球ローリングを顕微鏡下で観察した。この炎症モデルでは、ローリングする白血球のほとんどが好中球であることがこれまでの研究で示されている。水浸対物レンズ (40X/0.8 NA) をつけた顕微鏡 (BX50; Olympus) に CCD カメラ (ICD-878; Ikegami) を装着し、ビデオレコーダー (DMR-E250V; Panasonic) に録画した。手術開始後 50 分間データを取得した。一部の実験では、精巣挙筋を露出する 2.5 時間前に、1 μg のマウス TNF-α (R&D Systems) を陰嚢内に注射した。血流速度は分割フォトダイオードと相互相関プログラム (Microvessel Velocity OD-RT; CircuSoft Instrumentation) により測定した。白血球のローリング速度は、100 μm の距離を移動するのに必要な時間を測定することにより計算した。

(7) 腹膜炎モデル：マウスの腹腔内に 4% チオグリコレート (Difco) を 1 ml 投与した。4 時間後にマウスを安楽死させ、腹腔洗浄液を回収し、細胞数を計測した。洗浄液中の好中球の割合はフローサイトメトリーで計測した。一部のマウスには、チオグリコレートを注射する 2 時間前に 4 μg の百日咳毒素 (Sigma) を静注した。

(8) BrdU 標識：1 mg/ml の BrdU (Sigma) を飲

料水に加えた。BrdU の取り込みは BrdU Flow Kit (BD Biosciences) を用いて測定した。

(9) 骨髄類洞細胞の標識：骨髄類洞細胞は 1 μg の PE 標識抗マウス CD45.2 抗体を静注することにより標識した。2 分後にマウスを安楽死させ、組織を回収してフローサイトメトリーで解析した。

(10) 養子移入：Msn^{+Y} または Msn^{-Y} マウスから脾臓およびリンパ節のリンパ球を調整し、0.5 μM の CFSE で標識した。B6 マウスのリンパ球を 1 μM の TRITC で標識し、内在性コントロールとした。Msn^{+Y} または Msn^{-Y} リンパ球とコントロールリンパ球を混合し、B6 レシピエントマウスに静注した。1 時間後、リンパ臓器を回収し、抗体で染色してフローサイトメトリーで解析した。

移出の実験では、CFSE で標識した Msn^{+Y} または Msn^{-Y} リンパ球と TRITC で標識したコントロールリンパ球を混合して B6 レシピエントマウスに静注した。20 時間後、一部のマウスでは、リンパ臓器を回収して解析した。別のグループのマウスでは、インテグリンの中和抗体である抗 α4 抗体と抗 αL 抗体を腹腔内投与してリンパ球のリンパ臓器への移入を阻害し、その 24 時間後にリンパ臓器を回収して解析した。

(11) 走査型電子顕微鏡観察：ナイーブ CD4⁺ T 細胞を FACS Aria でソートし、3 時間血清飢餓処理を行った後、CXCL12 または S1P で 10 分刺激し、固定した。ガラスに貼付けた後、固定、脱水、乾燥を行った。標本を 250 Å の金でコーティングした後、走査型電子顕微鏡 (S-3000H; Hitachi) を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 好中球の炎症局所浸潤を制御する分子の解析：好中球のローリングや浸潤はセレクトリンやセレクトリンリガンドファミリーに属する L-selectin, PSGL-1, CD43, CD44 などの分子が関与する。これらの細胞表面分子を細胞骨格のアクチンフィラメントにクロスリンクする ERM タンパク質メンバーの moesin の役割について検討した。moesin 欠損マウスでは、moesin の発現が消失することを定量 PCR およびウェスタンブロットにより確認した。また、白血球に発現するもう一つの ERM タンパク質である ezrin の発現は、野生型マウスと同じレベルであることを確認した。moesin 欠損マウスでは、TNF-α で刺激した精巣挙筋の細静脈において、好中球ローリングの低速化が特異的に障害されていることを見いだした。ローリングの低速化は、好中球の炎症局所浸潤に必須であることがこれまでに示されている。さらにチオグリコレ

ートで誘導した腹膜炎モデルにおいて炎症局所への好中球浸潤を検討したところ、ケモカインシグナルを百日咳毒素により阻害すると、*moesin* 欠損マウスでは野生型マウスと比較して好中球浸潤が減少することを見いだした。したがって、*moesin* が好中球のローリングの低速化に重要な役割を果たし、炎症局所への好中球浸潤を制御することが示された。

(2) リンパ球の生体内動態と炎症局所浸潤を制御する分子の解析：リンパ球浸潤の分子機構を解明するため、*moesin* の役割について、*moesin* 欠損マウスを用いて検討した。本マウスでは、末梢血中のリンパ球はT細胞、B細胞ともに減少したが、脾臓ではむしろ増加した。同様の表現型は、造血系細胞で *moesin* を欠損する骨髄キメラマウスにおいても観察された。*moesin* 欠損マウスでは、T細胞、B細胞の産生や分化はほぼ正常であったが、成熟T細胞の胸腺からの移出に障害が認められた。また、骨髄で産生された未熟B細胞は骨髄実質から類洞を経て全身循環系に入り、脾臓で成熟B細胞に分化するが、本マウスでは実質から類洞への移出に障害が認められた。末梢では、脾臓やリンパ節などの二次リンパ臓器からの移出に障害が認められたが、*moesin* 欠損リンパ球は特に脾臓内に保持されやすい傾向を示した。

(3) *moesin* によるリンパ球動態制御の分子機構の解析：*moesin* によるリンパ球動態制御の分子機構を明らかにするため、*moesin* 欠損T細胞を用いて、種々のケモカインや脂質メディエーターに対する細胞応答を検討した。リンパ球は主に *ezrin* と *moesin* の2つのERMタンパク質を発現しており、ERMのリン酸化状態の変化が細胞の形態変化や移動に重要であることが示唆されてきた。リンパ球のリンパ臓器からの移出は、S1Pにより制御されることがこれまでに報告されているが、野生型リンパ球をS1Pで刺激するとERMの一過性脱リン酸化と著明な細胞膜ラフリングを認めた。一方、*moesin* 欠損リンパ球ではリン酸化ERMのレベルが低く、S1P刺激による脱リン酸化や、細胞や膜の形態変化がほぼ欠如していた。このことから、リンパ球では *moesin* が主要なリン酸化ERMであり、*moesin* を介するシグナルがリンパ球のリンパ臓器からの移出に重要な役割をもつことが示唆された。

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8件)

- ① Yao, C., Hirata, T., Soontrapa K., Ma, X., Takemori, H., and Narumiya, S. (2013). Prostaglandin E₂ promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signaling by cAMP and PI3-kinase. **Nat. Commun.** 4, 1685. (査読有)
doi: 10.1038/ncomms2684.
- ② Hirata, T. and Narumiya, S. (2012). Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. **Adv. Immunol.** 116, 143-174. (査読無)
doi: 10.1016/B978-0-12-394300-2.00005-3.
- ③ Hirata, T., Nomachi, A., Tohya, K., Miyasaka, M., Tsukita, S., Watanabe, T., and Narumiya, S. (2012). Moesin-deficient mice reveal a nonredundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. **Int. Immunol.** 24, 705-717. (査読有)
doi: 10.1093/intimm/dxs077.
- ④ Hirata, T. and Narumiya, S. (2011). Prostanoid receptors. **Chem. Rev.** 111, 6209-6230. (査読有)
doi: 10.1021/cr200010h.
- ⑤ Fujita, T., Matsuoka, T., Honda, T., Kabashima, K., Hirata, T., and Narumiya, S. (2011). A GPR40 agonist GW9508 suppresses CCL5, CCL17 and CXCL10 induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation. **J. Invest. Dermatol.** 131, 1660-1667. (査読有)
doi: 10.1038/jid.2011.123.
- ⑥ Soontrapa K., Honda, T., Sakata, D., Yao, C., Hirata, T., Hori, S., Matsuoka, T., Kabashima, K., and Narumiya, S. (2011). Prostaglandin E₂-prostaglandin E receptor subtype 4 (EP4) signaling mediates UV irradiation-induced systemic immunosuppression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 108, 6668-6673. (査読有)
doi: 10.1073/pnas.1018625108.
- ⑦ 平田 多佳子, 古屋敷 智之. (2010). プロスタノイドによる免疫系・神経系調節. **実験医学** 28, 3386-3394. (査読無)
- ⑧ 平田 多佳子. (2010). シアロムチンファミリー. 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査 [第7版], (日本臨床社), pp. 176-179. (査読無)

[学会発表] (計2件)

- ① Hirata, T. The ERM protein moesin regulates lymphocyte homeostasis by controlling lymphocyte egress from lymphoid organs. 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月29日, 千葉.
- ② Nomachi, A. Regulation of S1P responsiveness by the ERM protein moesin. 第40回日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月29日, 千葉.

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/subject/department/departments10.html>

http://www.shiga-med.ac.jp/e_new/department/e-kouza/html/012.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 多佳子 (Takako Hirata)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00346199

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし