

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460588

研究課題名(和文)免疫細胞の炎症局所浸潤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 inflamed sites

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症・免疫細胞の炎症局所への浸潤は病原体を排除するのに必須の生体防御機構であるが、同時に自己免疫・アレルギーなどの病態形成に関与する。本研究では、各細胞サブセットがさまざまな炎症組織に浸潤する分子機構やその機能調節について解析を行った。まず、免疫細胞の炎症局所浸潤を媒介する細胞表面L-selectinの機能制御に関与すると考えられる可溶性L-selectinをコードする新規ヒトアイソフォームを同定した。また、T細胞の炎症皮膚への浸潤を司るセレクトインリガンド活性を制御する修飾酵素の発現がサブセットにより異なることを明らかにした。さらに、炎症時のT細胞の鼻粘膜浸潤に関わる候補分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory and immune cell migration to inflamed sites is essential for host defense against pathogens, but it also plays a role in the pathogenesis of autoimmune and allergic diseases. In this research project, we investigated molecular mechanisms underlying the migration of various cell subsets to inflamed tissues, and analyzed how cell migration was regulated. We identified a novel isoform of human L-selectin encoding a soluble molecule, implicated in the functional regulation of cell surface L-selectin, which mediates immune cell migration to inflamed sites. We also clarified that selectin ligand modifying enzymes are differentially expressed in the T cell subsets that migrate to the inflamed skin. We further identified candidate molecules involved in memory T cell migration to the nasal mucosa during nasal immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 アレルギー リンパ球 セレクトイン ケモカイン

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/マクロファージが浸潤する。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。このような炎症・免疫細胞の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。炎症・免疫細胞の組織浸潤は、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、特定のサブセットの浸潤パターンが時空的に決定される。各サブセットの浸潤を媒介する分子の実体については次第に明らかになってきたが、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十分とはいえなかった。

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-セレクチン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 (J Exp Med 190:1769, 1999)。さらに、好中球上の PSGL-1 と CD43 が血管内皮細胞に発現する E-セレクチンのリガンドとしても機能することを報告した (J Immunol 181:3628, 2008)。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出したが (Blood 112:4915, 2008)、L-selectin の機能制御機構の詳細は不明であった。

研究代表者らはまた、エフェクター/メモリーT細胞の炎症皮膚浸潤においても、PSGL-1 が P-selectin と E-selectin のリガンドとして機能することや (J Exp Med 192:1669, 2000; J Immunol 169:4307, 2002)、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 (J Immunol 175:8042, 2005; J Immunol 178:2499, 2007)。制御性T細胞の炎症局所浸潤においてもセレクチンリガンドが重要な役割を担うことを示すデータを得ていたが、これらのT細胞のセレクチンリガンド活性が制御される分子機構についての詳細は不明であった。

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T細胞浸潤機構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、炎症・免疫細胞の局所浸潤の分子機構を明らかにするため、好中球、エフェクター/メモリーT細胞、制御性T細胞などの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。

炎症局所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、各炎症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) 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。すべての研究や手順は滋賀医科大学動物実験委員会により承認された。

接触過敏症モデルでは、4:1 アセトン/オリーブ油溶液に溶解した 3% (w/v) oxazolone (Sigma-Aldrich) を剪毛腹部皮膚に 100 μ l、左右耳介の両面に 12.5 μ l ずつ塗布することによりマウスを感作した。感作 4 日後に所属リンパ節を採取し解析した。

アレルギー性鼻炎モデルは、0、7、14 日目に腹腔内に 25 μ 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 μ 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 μ 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。

(2) 細胞の調整と刺激: ヒト末梢血単核球は Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) を用いた密度勾配法により単離し、T細胞は Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) により精製した。T細胞は 10% FBS を含む RPMI 1640 培地で培養し、固相化抗 CD3 抗体 (UCHT1; BioLegend) と抗 CD28 抗体 (CD28.2; BioLenged) または 10 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) で 3 日間刺激した。

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 で処理した。

その後、ナイロンメッシュに通して鼻粘膜細胞を調整した。一部の実験では、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。

(3) ヒト血清サンプル：全身性エリテマトーデス (SLE) 15 人、関節リウマチ (RA) 15 人、シェーグレン症候群 (SjS) 15 人、多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) 10 人、全身性硬化症 (SSc) 10 人、対照健常人 10 人の血清を使用した。本使用については、京都大学の倫理委員会により承認された。

(4) 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 (BD Biosciences) でデータを取得し、FlowJo (Tree Star) を用いて解析した。ナイーブ CD4⁺ T 細胞 (CD4⁺CD44^{lo}CD45RB^{hi}) とメモリー CD4⁺ T 細胞 (CD4⁺CD44^{hi}CD45RB^{lo})、ナイーブ CD8⁺ T 細胞 (CD8⁺CD44^{lo}CD45RB^{hi}) とメモリー CD8⁺ T 細胞 (CD8⁺CD44^{hi})、および制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺) は FACS Aria (BD Biosciences) でソートした。

(5) 定量 PCR：total RNA は RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて直接精製するか、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 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) およびランダムヘキサマー、あるいは 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 X LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics)、1 X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) を含む最終容量 20 µl の溶液で、95 5 分後、95 10 秒、60 25 秒を 45 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、GAPDH、Cyclophilin B を増幅した。

ヒト L-selectin アイソフォームについては、1 X TaqMan Gene Expression Assay の代わりに 500 nM の各アイソフォーム特異的プライマーと 200 nM の TaqMan probe を用いた。

(6) ELISA：全可溶型 L-selectin は DuoSet ELISA (R&D Systems) で測定した。すなわち、ヒト L-selectin 細胞外ドメインのエピトープを認識する抗 L-selectin モノクローナル抗体 4G8 を 96 ウェルプレートに固相化した。プレートをブロッキング、洗浄した後に標準物質またはサンプルを入れ反応させた。プレートを洗浄後、ビオチン化ヒツジ抗 L-selectin 抗体と反応させ、続いて HRP 標識ストレプトアビジンと反応させた。プレートは 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine で発色させた。hL-selectin-s の測定には、hL-selectin-s の C 末端のペプチド (KKSKRSMNDPY) に対して作製したウサギ抗体の F(ab')₂ フラグメントを捕捉抗体として用いた。

(7) 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 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 で一晩反応させた後、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とおよび 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 で一晩反応させ、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 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。

4. 研究成果

(1) 炎症・免疫細胞の局所浸潤を制御する L-selectin の新規アイソフォームの同定：L-selectin はリンパ球や好中球表面に発現する I 型膜タンパク質で、これらの細胞の血管内皮細胞表面でのローリングを媒介する。L-selectin は、細胞が刺激を受けるとその細胞外ドメインが迅速に切断される。ヒト血清中には、可溶型 L-selectin が高濃度で存在し、L-selectin を介する細胞相互作用に影響を与えることが報告されているが、血清中の可溶型 L-selectin は膜型分子の細胞外ドメインの切断により生じたものと考えられてきた。研究代表者らは、ヒト L-selectin 遺伝子の新たなアイソフォームを同定した。このアイソフォーム (hL-selectin-s と命名) は膜貫通ドメインをコードする第 7 エキソンに対応する部分を欠如することから、選択的スプライシングにより生じると考えられ、通常の L-selectin (h-selectin-c と命名) mRNA が膜型分子をコードするのに対し、可溶型 L-selectin をコードすることが予想された。

hL-selectin-s mRNA は h-selectin-c mRNA が発現するリンパ臓器に発現が認められたが、その発現レベルは h-selectin-c の 0.4~2.4% であった。T 細胞を刺激すると、hL-selectin-s

mRNA の発現が上昇し、h-selectin-c mRNA に対する割合も上昇した。

hL-selectin-s は、膜型分子の切断により生成する可溶性 L-selectin (shed L-selectin) とは C 末端のアミノ酸配列が異なることを利用して、hL-selectin-s に対する特異的抗体を作製し、サンドイッチ ELISA を確立した。この ELISA を用いて血清中の hL-selectin-s を測定したところ、shed L-selectin に比較すると低いレベルではあるものの、hL-selectin-s が存在することがわかった。したがって、血清中の可溶性 L-selectin には、shed L-selectin だけでなく hL-selectin-s が含まれることが示された。

これまでに、リウマチ性疾患では一部の可溶性接着分子の血清濃度が上昇することが報告されている。そこで、さまざまなリウマチ性疾患の患者血清中の全可溶性 L-selectin と hL-selectin-s を測定した。全可溶性 L-selectin は RA で上昇し、SLE、SjS、PM/DM ではコントロールと比較して上昇傾向ではあったが、有意差はなかった。一方、hL-selectin-s は SLE、RA、SjS、PM/DM で顕著に上昇し、SjS においても有意に上昇した。これらの結果から、hL-selectin-s は全可溶性 L-selectin より感度の高い疾患マーカーであることが示唆された。

(2) 接触過敏症モデルにおける T 細胞のセレクトリンリガンドの活性制御：エフェクター \square メモリー T 細胞の炎症局所への浸潤を媒介するセレクトリンリガンドの活性制御機構を明らかにするため、マウスの皮膚へのハプテン塗布による接触過敏症モデルを用いて、感作リンパ節におけるエフェクター \square メモリー T 細胞の動態と、セレクトリンリガンド活性に關与すると考えられるリガンド修飾酵素群の発現について検討した。その結果、エフェクター \square メモリー CD4 および CD8 T 細胞では、それぞれナイーブ CD4 および CD8 T 細胞と比較して、セレクトリンリガンド活性の上昇とともに、糖転移酵素 Fut4、Fut7、Gcnt1 および硫酸転移酵素 Chst2 の発現が上昇することを見いだした。さらに、感作後のエフェクター \square メモリー T 細胞では、非感作時のエフェクター \square メモリー T 細胞と比較して、Fut7 の発現が上昇する一方、Chst2 の発現が低下することを見いだした。したがって、エフェクター \square メモリー T 細胞の炎症局所への浸潤は複数のセレクトリンリガンド修飾酵素により制御されることが示唆された。

制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺) におけるセレクトリンリガンド修飾酵素群の発現について、マウスの接触過敏症モデルを用いて検討した。その結果、制御性 T 細胞では、ナイーブ CD4 T 細胞と比較して、Fut7、Gcnt1、Chst2 の発現が著しく上昇することを見いだした。一方、エフェクター \square メモリー CD4 および CD8 T 細胞で見られた Fut4 の発現上昇はわずかしき見られなかった。さらに、感作後の制御性 T 細胞では、非感作時に比較して Gcnt1 と Fut7 の発現が上昇する一方、Chst2 の発現

が低下することを見いだした。したがって、セレクトリンリガンド修飾酵素群の発現パターンの変化が制御性 T 細胞の炎症局所への浸潤を制御することが示唆された。

(3) アレルギー性鼻炎モデルにおける T 細胞の炎症局所浸潤機構：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鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) では CCR3 および CCR10 mRNA の発現が上昇し、鼻粘膜に浸潤した CD4 T 細胞の一部が CCR3 または CCR10 を発現することを見いだした。そこで、CCR3 と CCR10 のリガンドとして機能する CCL28 の発現を検討した結果、鼻粘膜上皮で亢進を認めたことから、エフェクター/メモリー CD4 T 細胞は CCL28 と CCR3/CCR10 により鼻粘膜に浸潤する可能性が示唆された。

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6件)

Hasegawa, K., Tanaka, S., Fujiki, F., Morimoto, S., Nakano, K., Kinoshita, H., Okumura, A., Fujioka, Y., Urakawa, R., Nakajima, H., Tatsumi, N., Nakata, J., Takashima, S., Nishida, S., Tsuboi, A., Oka, Y., Oji, Y., Miyoshi, E., Hirata, T., Kumanogoh, A., Sugiyama, H., and Hosen, N. (2016). Glycosylation status of CD43 protein is associated with resistance of leukemia cells to CTL-mediated cytolysis. **PLoS One** *11*, e0152326. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0152326.

Nagakubo, D., Yoshie, O., and Hirata, T. (2016). Upregulated CCL28 expression in the nasal mucosa in experimental allergic rhinitis: Implication for CD4⁺ memory T cell recruitment. **Cell Immunol.** *302*, 58-62. (査読有)

DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.02.001.

平田多佳子. (2016). スフィンゴシン 1-リン酸受容体. **医学のあゆみ** *256*, 576-582. (査読無)

Hirata, T., Usui, T., Kobayashi, S., and Mimori, T. (2015). A novel splice variant of human L-selectin encodes a soluble molecule that is elevated in serum of patients with rheumatic diseases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** *462*, 371-377. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.002.

Nomachi, A., Yoshinaga, M., Liu, J., Kanchanawong, P., Tohyama, K., Thumkeo, D., Watanabe, T., Narumiya, S., and Hirata, T. (2013). Moesin controls clathrin-mediated

S1PR1 internalization in T cells. **PLoS One** 8, e82590. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0082590.

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.

〔学会発表〕(計4件)

Hirata, T. Altered humoral immune responses in mice deficient in the ERM protein moesin. 第44回日本免疫学会総会・学術集会, 2015年11月19日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

Nagakubo, D. and Hirata, T. Lymphocyte dynamics in the nasal tract in mouse model of allergic rhinitis. 第44回日本免疫学会総会・学術集会, 2015年11月19日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

Hirata, T. and Yoshida, S. The ERM protein moesin regulates clathrin-mediated internalization of the S1P receptor S1PR1 in lymphocytes. 第43回日本免疫学会総会・学術集会, 2014年12月10日, 国立京都国際会館(京都府・京都市).

タムケオディーン, 野町昭, 通山潔, 平田多佳子, 石崎敏理, 成宮周. Actin nucleator, mDia1 and mDia3, cooperatively function in T cell receptor signaling-dependent T cell development in thymus. 胸腺T細胞の分化におけるアクチン重合因子 mDia1/3 の役割. 第87回日本薬理学会年会. 2014年3月20日. 東北大学(宮城県・仙台市).

〔図書〕(計1件)

Hirata, T. Blood vascular endothelial adhesion molecules. In Encyclopedia of Immunobiology, M. Ratcliffe, ed. (Oxford, UK: Academic Press), 印刷中.

〔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