

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460582

研究課題名(和文) 粘膜免疫における CCL28 の役割の解明

研究課題名(英文) Role of CCL28 for mucosal immunity

研究代表者

義江 修 (YOSHIE, Osamu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10166910

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)：CCL28遺伝子欠損マウスでは、大腸粘膜でのIgA産生細胞の減少と分布異常、糞便中のIgA量の著明な減少、および個々のIgA産生細胞のIgA産生量の低下が見いだされ、CCL28は大腸粘膜でのIgA産生に重要な役割を担っていることが確認された。さらにCCL28遺伝子欠損マウスの糞便ではバシラス綱が相対的に増加していた。大腸でのIgA産生量の低下と細菌叢の変化と関連して、CCL28遺伝子欠損マウスではデキストラン硫酸誘発腸炎の増悪が見られ、それは抗菌薬投与で軽減された。

研究成果の概要(英文)：CCL28 is expressed in the mucosal tissues and to attract IgA-antibody secreting cells (IgA-ASCs) via CCR10. CCL28 has an antimicrobial activity against microbes in vitro. However, in vivo evidence for the role of CCL28 in the mucosal immunity remains scanty. We generated CCL28-deficient mice and demonstrated that CCL28-deficient mice showed reduced numbers and altered distribution of IgA-ASCs in the colon. The IgA contents in the fecal extracts were low. The average amounts of IgA secreted by a single IgA-ASC isolated from the lamina propria of the colon was reduced. Furthermore, the 16S rRNA sequencing analysis of feces revealed an increase of the Class Bacilli. Consistent with the low IgA production and altered microbiota in the colon, CCL28-deficient mice had aggravated colitis upon treatment with dextran sulfate, which was ameliorated by oral antibiotics. Therefore, CCL28 has a role in the mucosal immunity of the colon as a chemoattractant with a direct antimicrobial activity.

研究分野：免疫学

キーワード：ケモカイン CCL28 腸管免疫 IgA 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

ケモカインは細胞遊走を誘導するサイトカインの一群で、ヒトでは 50 種に及びリガンドと 18 種のシグナル伝達型レセプターが知られている (Zlotnik & Yoshie, *Immunity* 2012, 36:705)。免疫系に属する様々な細胞は特定のケモカインレセプターを発現し、各レセプターに対応するケモカイン (しばしば複数存在する) を発現する臓器/組織にホーミングすることで機能を発揮することができる。CCL28 は多くの粘膜組織で構成的に発現しており、さらにそのレセプター CCR10 はおもに IgA 産生細胞 (IgA-ASCs) で発現している。そのことから CCL28 は IgA により粘膜組織を防御する Common Mucosal Immune System (CMIS) の基盤となるケモカインであろうと推測されている (Kunkel et al. *J Clin Invest* 2003, 111:1001)。しかしながら、CCR10 遺伝子欠損 (CCR10-KO) マウスでは授乳中の乳腺での IgA-ASCs の減少は認められたが、消化管粘膜での分布や頻度には変化がないという意外な結果が報告された (Morteau et al. *J Immunol* 2008, 181:6309)。その後、CCR10-KO マウスでは腸管の孤立リンパ濾胞で T 細胞非依存性に IgA-ASCs の増産が起こり、腸管組織での本来の IgA-ASCs の減少を補っていること、ただし孤立リンパ濾胞由来の IgA-ASCs の産生する抗体は低親和性であり (本来の IgA 産生細胞と比べて hypermutation の頻度が低い)、また CCR10-KO マウスの腸管では IgA メモリー細胞の維持や二次応答も障害されていることが報告された (Hu et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:E1035)。

我々も CCL28-CCR10 系の研究で独自の貢献をしてきた。CCL28 が IgA 産生細胞の大腸へのホーミングに必須であることを明らかにした (Hieshima et al. *J Immunol* 2004, 173:3668)。またプラズマ細胞における CCR10 の発現 (Nakayama et al., *J Immunol* 2003, 170:1136) やそのビタミン D₃ による転写誘導を明らかにした (Shirakawa et al. *J Immunol* 2008, 180:2786)。さらに CCL28 は様々な細菌や真菌に対して直接的な抗菌作用を発揮することも報告した (Hieshima et al. *J Immunol* 2003, 170:1452)。

CCL28-CCR10 系の IgA-ASCs の粘膜組織への分布や粘膜免疫応答における役割は、これまで CCR10-KO マウスや CCL28 に対する中和抗体を用いて研究されてきた。ただし、CCR10 は皮膚に発現するケモカイン CCL27 のレセプターでもある。一方 CCL28 は CCR10 以外に好酸球に発現する CCR3 にも作用する。また CCL28 には直接的な抗菌作用も存在する。さらに最近の研究では、CCL28 がヒト CD34+ 血液幹細胞/前駆細胞

に対する増殖因子であること (Karlsson et al. *Blood* 2013, 121:3838)、妊娠中の脱落膜ストローマ細胞にアポトーシスを誘導し自然流産に関与していること (Sun et al. *Mol Hum Reprod* 2013, 19:676)、なども報告されている。このように CCL28 は CMIS のみならずそれ以外にも多彩な生理作用を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

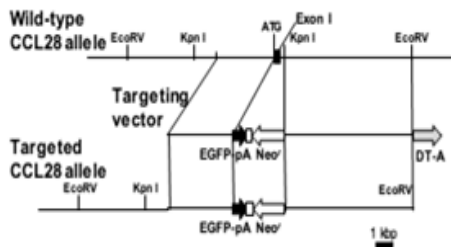
Common Mucosal Immune System (CMIS) とは、局所で誘導された IgA-ASCs が全身の粘膜組織に再分布して粘膜防御するシステムである。このような IgA-ASCs の再分布には特定のケモカインが密接に関係すると推測される。そして CCL28 は全身の粘膜組織で強く発現し、またそのレセプター CCR10 は IgA-ASCs で選択的に発現されることから、CCL28-CCR10 系こそが CMIS の基盤的ケモカイン系であろうと推測される。また CCL28 は好酸球に発現する CCR3 にも作用し、さらに直接的に真菌や細菌に対して抗菌作用を発揮する。そこで本研究では CCL28 遺伝子欠損 (CCL28-KO) マウスを作製し、粘膜組織での IgA-ASCs の分布や機能変化を検討し、さらに糞便中のマイクロビーム解析を行い、粘膜免疫における CCL28 の役割を総合的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

CCL28 遺伝子欠損マウス (以下、CCL28-KO マウス) は CCL28 遺伝子のエクソン 1 を EGFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子をコードする遺伝子カセットで置き換えることにより作製した。CCL28-KO マウスは C57BL/6J マウスと 12 代以上バッククロスしたものを実験に使った。PCR、RT-PCR、免疫抗体染色、ELISA、ELISPOT などすべてキットを用いて、型通りの方法で行った。OVA による経鼻免疫は 100 µg OVA に 10 µg poly(I:C) をアジュバンドとして加えて 5 回行い、最後の免疫の 2 週間後に血液および糞便を採取した。腸管固有粘膜層からの単細胞の分離はすでに報告した方法を用いて行った (Hieshima et al. *J Immunol* 2004, 173:3668)。腸内細菌の 16S rRNA 配列解析は次世代シーケンサーを用いて行った。CCL28 の抗菌活性測定も以前に報告した方法で行った (Hieshima et al. *J Immunol* 2003, 170:1452)。デキストラン硫酸 (DSS) 誘発腸炎の発症は 2% DSS を含む飲水を 7 日間飲ませることによって行った。

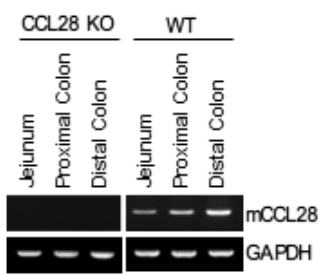
4. 研究成果

CCL28 遺伝子のエクソン 1 を EGFP と Neo 耐性遺伝子をコードする遺伝子カセットで置き換えることにより CCL28 遺伝子欠損マウス (以下 CCL28-KO マウス) を作製した (図 1)。CCL28-KO マウスは SPF 条件下ではメンデルの法則に従って生まれ、正常に発育し、特に異常な形質は示さなかった。



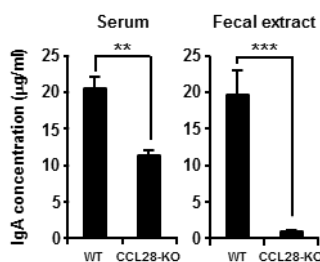
(図 1)

また CCL28-KO マウスの腸管組織では CCL28 の発現が見られないことを RT-PCR で確認した(図 2)。



(図 2)

抗 IgA 免疫染色による解析から CCL28-KO マウスの大腸組織では IgA-ASCs の数が約 50%に減少していた。さらに IgA-ASCs の粘膜組織での分布も野生型マウス(WT マウス)とは異なっていた。そこで血清中および糞便中の総 IgA 量を定量したところ、CCL28-KO マウスでは前者で約 50%、また後者は約 10%にまで減少していた(図 3)。OVA 免疫マウスでも糞便中の OVA 特異的 IgA 量は著明に減少していた。また我々は、大腸の腸管粘膜固有層から分離した個々の IgA-ASCs の IgA 産生量を定量し、WT マウスの IgA-ASCs より有意に減少していることも見出した。

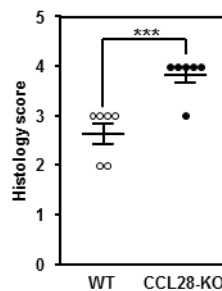
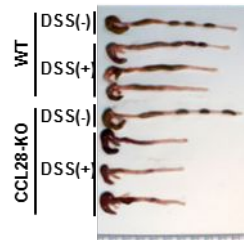


(図 3)

CCL28-KO マウスの腸管細菌叢の変化を糞便中の 16S rRNA の次世代シーケンサーによる配列解析で検討した。その結果、CCL28-KO マウスではバチラス綱に属する細菌の比率が有意に増加していた。さらにバチラス綱に属する細菌種である腸球菌とバチラスセレウスに対する CCL28 の強い抗菌活性を確認した。

腸管での IgA 産生量や腸内細菌叢はデキストラン硫酸誘発腸炎(以下、DSS 腸炎)の発

症に影響を与えることが報告されている。そこで WT マウスと CCL28-KO マウスで DSS 腸炎を起こして比較した。その結果、CCL28-KO マウスでは DSS 腸炎が増悪することが見いだした(図 4)。さらに増悪した DSS 腸炎は抗生物質投与によって有意に軽減した。



(図 4)

これらの結果から、CCL28 は大腸組織における IgA-ASCs のホーミングと組織内分布および IgA 産生量に密接に関わっており、また IgA 産生量や直接的な抗菌作用により大腸での腸管細菌叢の構成にも大きな影響を与えていることが示唆された。

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 4 件、全て査読有り)

1. Kanai K, Park AM, Yoshida H, Tsunoda I, Yoshie O. IL-35 suppresses lipopolysaccharide-induced airway eosinophilia in EBI3-deficient mice. *Journal of Immunology* 198(1):119-127, 2017. doi: 10.4049/jimmunol.1600506
2. Nagakubo D, Yoshie O, Hirata T. Upregulated CCL28 expression in the nasal mucosa in experimental allergic rhinitis: Implication for CD4(+) memory T cell recruitment. *Cellular Immunology* 302:58-62, 2016. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.02.001
3. Nomiyama H, Yoshie O. Functional roles of evolutionary conserved motifs and residues in vertebrate chemokine receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 97(1):39-47, 2015. doi: 10.1189/jlb.2RU0614-290R
4. Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta J, Gotoh K, Motooka D, Sato S, Higuchi T, Baba

Y, Kurosaki T, Kinoshita M, Shimada Y, Kimura T, Okumura R, Takeda A, Tajima M, Yoshie O, Fukuzawa M, Kiyono H, Fagarasan S, Iida T, Ishii M, Takeda K. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. Nature Communications. 5:3704-3717, 2014. doi: 10.1038/ncomms4704

(学会発表)(計 6 件)

1. 神原弘和、松尾一彦、山本真也、長久保大輔、義江修、中山隆志

ケモカイン CCL28 の欠損は DSS 腸炎モデルマウスにおける病態を増悪させる

日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 26 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

2. 山本真也、松尾一彦、藤田貢、義江修、中山隆志

腸管免疫におけるケモカイン MEC/CCL28 の役割

日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3. MATSUO Kazuhiko, FUJITA Mitsugu, NAKAYAMA Takashi, YOSHIE Osamu

The impact of CCL28-deficiency in mucosal immunity

第 44 回日本免疫学会学術集会、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

4. 伊藤茉奈、松尾一彦、藤田貢、義江修、中山隆志

DSS 誘発性大腸炎におけるケモカイン MEC/CCL28 の役割

第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日、大阪薬科大学(大阪府富田林市)

5. 松尾一彦、北田卓也、重田暁子、藤田貢、義江修、中山隆志

ケモカイン MEC/CCL28 の腸管組織における生物学的役割

日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、神戸学院大学(兵庫県神戸市)

6. 北田卓也、松尾一彦、重田暁子、藤田貢、義江修、中山隆志

ケモカイン MEC/CCL28 は IgA 抗体産生細胞の腸管組織への遊走を制御することで DSS 誘発性大腸炎の劇症化抑制に寄与する

生体機能と創薬シンポジウム 2014、2014 年 8 月 28 日、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市)

(図書)(計 1 件)

1. 義江修(分担執筆)、羊土社、ケモカインファミリー、サイトカイン・増殖因子キーワード事典(編集、宮園浩平ほか)、2015 年、54 ページ(総 420 ページ)

(産業財産権)

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

(その他)
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

義江修 (YOSHIE, Osamu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 10166910

(2)研究分担者

樋口智紀 (HIGUCHI, Tomonori)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 00448771

金井亨輔 (KANAI, Kyosuke)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 20596621

藤田貢 (FUJITA, Mitsugu)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号: 40609997

(3)連携研究者

中山隆志 (NAKAYAMA, Takashi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号: 60319663

(4)研究協力者

角田郁生 (TSUNODA, Ikuo)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 00261529