

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790698

研究課題名 (和文) ケモカイン eotaxin-3/CCL26 の新規受容体同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification of eotaxin-3/CCL26 as a novel functional ligand for CX3CR1

研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA TAKASHI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60319663

研究成果の概要:ケモカイン eotaxin-3/CCL26 は、好酸球に高発現する CCR3 のリガンドであり、炎症局所への好酸球浸潤に重要な役割を果たすことが報告されている。本研究において研究代表者は、CCL26 が細胞傷害性リンパ球に高発現する CX3CL1 受容体/CX3CR1 の新しい機能的リガンドであることを見出した。CCL26 は好酸球だけでなく細胞傷害性リンパ球も同時に炎症巣に誘導することにより、アレルギー性疾患の病態形成においてこれまで理解されていた以上の役割を果たすことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	300,000	2,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：ケモカイン、ケモカイン受容体、細胞傷害性リンパ球、アレルギー、アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

ケモカインは免疫担当細胞の細胞遊走を誘導するサイトカインの一群であり、炎症反応や免疫応答において重要な役割を担っている。我々のグループは、約10年前に世界に先駆けてリンパ球に選択的に作用する初めてのCCケモカインTARC/CCL17を発見した (Imai et al., J. Biol. Chem., 1996)。その後もバイオインフォマティクスの応用

により、リンパ球や樹状細胞に選択的に作用する多数の新規ケモカインを発見し、それらの受容体を同定してきた (Yoshie et al., J. Leukoc. Biol., 1997, Yoshie et al., Adv. Immunol., 2001)。そして、我々のグループや他のグループにより、免疫担当細胞は系統、分化段階、機能的サブセットなどに対応して特定のケモカイン受容体を発現すること、さらにそのリガンドであるケモカインの発現

が空間的・時間的に制御されることが明らかにされ、免疫担当細胞の複雑な体内移動と局在の制御機構が分子レベルで説明できるようになってきた。

これまでにヒトのケモカインは40種以上、また、ケモカイン受容体は19種が同定されている。しかしながら、未だにこれらの既知の分子だけでは説明できない細胞遊走が多数報告されているのも事実である。このように生体内における細胞遊走制御機構の解明については未だ途上であり、全貌が明らかになつたとは言えないのが実状である。

一方、ケモカインとそれらの受容体との間には複雑な共有関係が存在し、複数のケモカインが同じ受容体に作用すること、あるいは1つのケモカインが複数の受容体に作用することが知られている。実際に、近年、CXCR4の唯一のリガンドと考えられていたSDF/CXCL12が新たにオーファン受容体RDC1のリガンドとなることが報告された

(Balabanian et al., J Biol Chem., 2005)。申請者自身も、CCR1,2のリガンドLEC/CCL16がヒスタミン受容体H4の新たなリガンドとなること、またこれらが骨髄からの好酸球放出において重要な役割を果たすことを見出し報告している(Nakayama et al., J Immunol., 2004)。そこで申請者は、既知のケモカインについても新たな受容体が存在する可能性はきわめて高いと推測した。本研究ではケモカイン受容体の安定発現細胞株を作製し、既知のケモカインについてこれら受容体との反応性を精査した。その結果、eotaxin-3/CCL26が細胞傷害性リンパ球に高発現するCX3CL1受容体/CX3CR1の機能的リガンドであることを見出すに至った。

2. 研究の目的

eotaxin-3/CCL26は、好酸球に高発現するCCR3のリガンドとして我々のグループが同定したCCケモカインである(Kitaura et al., J Biol Chem., 1999)。CCR3のリガンドとしてこれまでに複数のケモカインが同定されているが、それらの中でeotaxin-3/CCL26は、IL-4刺激した血管内皮細胞で選択的に誘導される最もドミナントなCCR3リガンドであることが報告されている(Cuvelier et al., J. Exp. Med., 2001)。このことからCCL26は、アレルギー性炎症における好酸球の血管外浸潤において主要な役割を果たすと考えられ、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー性疾患において、炎症局所への好酸球浸潤に重

要な役割を果たすことが明らかとなりつつある。本研究の目的は、CCL26とその新規受容体CX3CR1との相互作用解析を通じて、CCL26のCX3CR1を介した新たな生理的および病理的機能を解明することにある。

3. 研究の方法

(1) CX3CR1発現細胞を用いたCCL26の相互作用解析

CX3CR1安定発現細胞およびCX3CR1を発現するヒト正常細胞を用いて、CCL26による細胞内カルシウム濃度上昇反応と細胞遊走反応について検討を行う。

(2) CCL26とCX3CR1の結合解析

我々は以前、CX3CL1と分泌型アルカリホスファターゼの融合タンパク

(CX3CL1-SEAP)が、CX3CR1に対して特異的な結合能を保持していることを示している。そこでCX3CR1発現細胞を用いて、CX3CL1-SEAPとの競合解析により、CCL26とCX3CR1との結合特性を明らかにする。

(3) ヒト末梢血におけるCCR3とCX3CR1の発現細胞の同定

抗CCR3抗体と抗CX3CR1抗体を用いたFACS解析により、ヒト末梢血におけるCCR3とCX3CR1の発現細胞を同定する。

(4) CCL26産生血管内皮細胞とCX3CR1発現細胞との相互作用解析

CCL26は、IL-4刺激した血管内皮細胞で選択的に誘導されることが報告されている(Cuvelier et al., J. Exp. Med., 2001)。そこでIL-4刺激したHUVEC細胞を用いて、CX3CR1発現細胞の細胞接着反応について検討を行う。

(5) 臨床検体におけるCCL26、CX3CL1およびCX3CR1の発現解析

健常人、アトピー性皮膚炎患者および乾癬患者の皮膚組織からRNAを調整し、CCL26、CX3CL1およびCX3CR1のmRNA発現をreal-time RT-PCR解析により調べる。

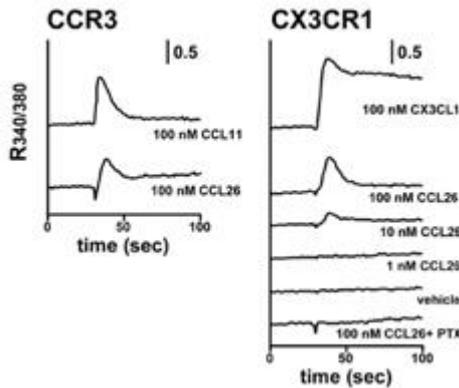
4. 研究成果

(1) CCL26新規受容体の同定

CCL26のレセプター特異性を各種のケモカインレセプターを安定的に発現したマウスL1.2細胞株のパネルを用い、細胞内カルシウム濃度上昇反応を指標に検討した。その結果、CCL26が細胞傷害性リンパ球に高発現するCX3CL1受容体/CX3CR1に対してアゴニスト活性を示すことが明らかとなった。

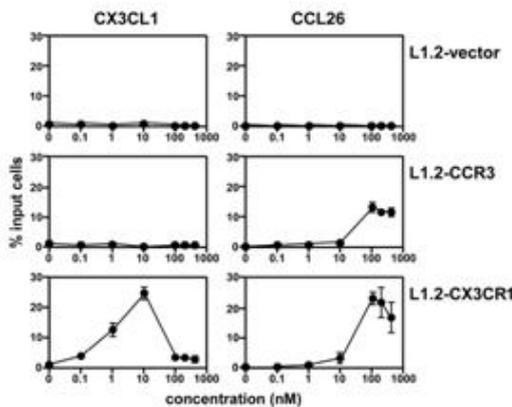
① CCL26はCX3CR1を介して細胞内カルシウム濃度上昇反応を誘導する

CCL26はCCR3と同様にCX3CR1を発現したマウスL1.2細胞株において細胞内カルシウム濃度上昇反応を誘導した。また、この反応は三量体GタンパクのG α iサブユニットの選択的阻害剤である百日咳毒素 (PTX) により完全に抑制された。このことはCCL26はCX3CL1と同様にG α iサブユニットを介してCX3CR1からの情報を伝達することを示す。



② CCL26はCX3CR1を介して細胞遊走反応を誘導する

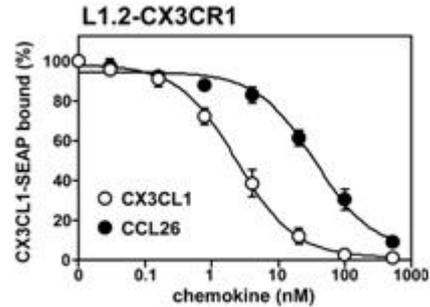
CCL26は、CCR3安定発現細胞 (L1.2-CCR3) と同様にCX3CR1安定発現細胞 (L1.2-CX3CR1) の細胞遊走反応を誘導した。また、比較的高濃度のCCL26は、従来のCX3CR1リガンドであるCX3CL1と同等の細胞遊走活性を示した。



③ CCL26はCX3CR1に特異的に結合する

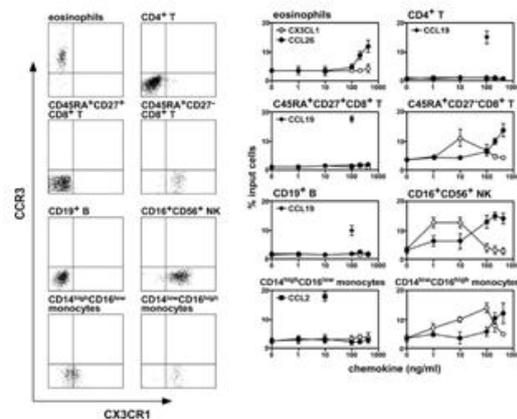
我々は以前、CX3CL1と分泌型アルカリホスファターゼの融合タンパク (CX3CL1-SEAP) が、CX3CR1に対して特異的な結合能を保持していることを示している。そこでL1.2-CX3CR1とCX3CL1-SEAPを用いて、CCL26による競合解析を行った。その結果、1nM

CX3CL1-SEAPのL1.2-CX3CR1に対する結合は、CX3CL1とCCL26によりそれぞれIC₅₀、2.4nMと35nMで特異的に阻害された。これらの結果より、CCL26はCX3CR1の新しい低親和性の機能的リガンドであることが明らかとなった。



(2) CCL26はCX3CR1を発現するヒト正常リンパ球サブセットの細胞遊走を誘導する

まず最初に様々なヒトリンパ球サブセットにおけるCCR3とCX3CR1の細胞表面における発現をFACSにより解析した。従来の報告通りCCR3は好酸球に選択的に、一方、CX3CR1はCD45RA⁺CD27⁻CD8⁺T細胞 (terminally differentiated effector)、CD16⁺CD56⁺NK細胞、およびCD14^{low}CD16^{high}の単球細胞に発現していることが確認された。実際にCCL26は、CCR3を発現する好酸球だけでなく、CX3CR1を発現するCD45RA⁺CD27⁻CD8⁺T細胞、CD16⁺CD56⁺NK細胞、およびCD14^{low}CD16^{high}単球細胞の効率の良い細胞遊走を誘導した。

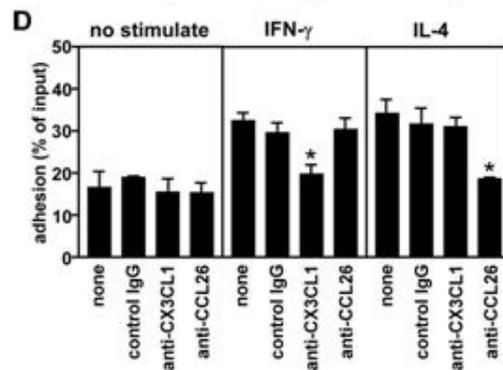
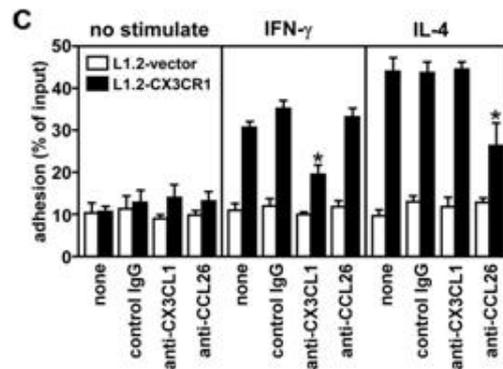
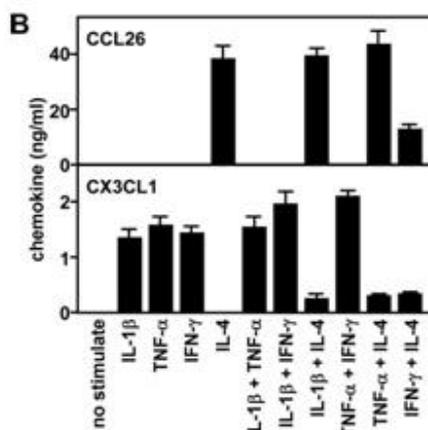
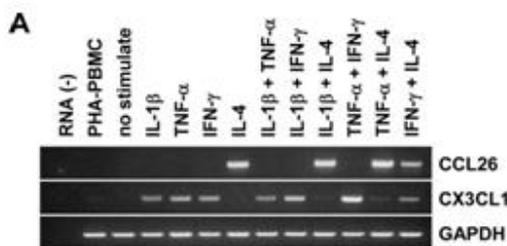


(3) IL-4刺激したヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC)は、CCL26産生を介してCX3CR1発現細胞の細胞接着反応を促進する

CCL26とCX3CL1は共に血管内皮細胞で、IL-4刺激またはIL-1 β 、TNF- α およびIFN-

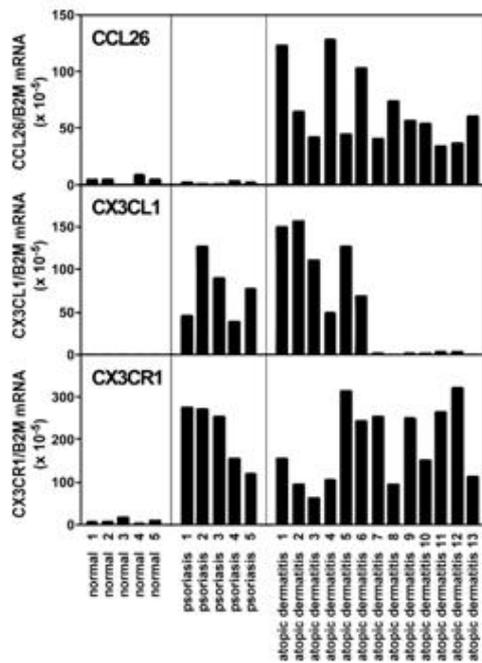
γ刺激により、それぞれ発現誘導されることが報告されている。実際にこれらのサイトカインで刺激した HUVEC において、CCL26 と CX3CL1 の mRNA レベル (A) およびタンパクレベル (B) での発現が確認された。また、CCL26 タンパク (26~48 ng/ml) は CX3CL1 タンパク (0.8~1.9 ng/ml) と比べて極めて大量に血管内皮細胞から産生されることが示された。さらにこの CCL26 と CX3CL1 の発現誘導は、IFN-γ 刺激または IL-4 刺激により、それぞれ抑制されることが明らかとなった。このように IFN-γ と IL-4 は、血管内皮細胞での CCL26 と CX3CL1 発現において、相反する役割を担っていると考えられた。

血管内皮細胞で産生されたケモカインは、白血球の細胞表面に発現する接着分子インテグリンの活性化を介して、血管内皮細胞と白血球との強固な接着を誘導することが知られている。そこで次に、IFN-γ 刺激または IL-4 刺激した HUVEC が、実際に L1.2-CX3CR1 の接着を誘導できるかどうかを調べた。その結果、IFN-γ 刺激または IL-4 刺激した HUVEC は、優位に L1.2-CX3CR1 の接着を促進し、さらにこれらの接着反応はそれぞれ抗 CX3CL1 抗体と抗 CCL26 抗体によって抑制されることが明らかとなった (C)。また、このような接着反応の誘導は、L1.2-vector に対しては認められなかった。同様に、IFN-γ 刺激または IL-4 刺激した HUVEC は、正常ヒト CD16⁺CD56⁺ NK 細胞に対してもそれぞれ CX3CL1 依存的または CCL26 依存的な接着反応の促進を示した (D)。



(4) CCL26 と CX3CR1 はアトピー性皮膚炎患者皮膚組織において共発現する

アトピー性皮膚炎は IL-4 の高発現を特徴とする Th2 優位な皮膚炎であり、これとは対照的に乾癬は IFN-γ の高発現を特徴とする Th1 優位な皮膚炎である。そこで次に、健康人、乾癬患者、アトピー性皮膚炎患者の皮膚組織における CCL26、CX3CL1 および CX3CR1 mRNA の発現を real-time PCR 解析により調べた。従来の報告通り、CCL26 mRNA はアトピー性皮膚炎患者の皮膚組織で、また CX3CL1 mRNA と CX3CR1 mRNA は乾癬患者の皮膚組織で発現増強が認められた。さらに興味深いことに、アトピー性皮膚炎患者の皮膚組織において CX3CL1 mRNA の発現は、13 例中 6 例でのみ増強が認められたが、CX3CR1 mRNA の発現は全ての症例で増強されていた。このようにアトピー性皮膚炎患者の皮膚組織での CX3CR1 mRNA の発現は、CX3CL1 mRNA よりむしろ CCL26 mRNA の発現と良く相関していた。



(5) まとめ

本研究において研究代表者は、CCL26 が細胞傷害性リンパ球に高発現する CX3CR1 の新しい低親和性の機能的リガンドであることを明らかにした。アレルギー炎症の場において炎症血管で産生された CCL26 は、好酸球だけでなく細胞傷害性リンパ球も同時に誘導することによりアレルギー性疾患の病態形成においてこれまで理解されていた以上の役割を果たすことが示唆された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA TAKASHI)
 近畿大学・医学部・講師
 研究者番号：60319663

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者