

令和元年6月22日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15715

研究課題名(和文) CD69-MyI9システムによる新規炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the CD69-MyI9 system in the chronic inflammation

研究代表者

林崎 浩史 (Hayashizaki, Koji)

国立感染症研究所・真菌部・研究員

研究者番号：50779907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性気道炎症は炎症細胞が肺組織に集積することで引き起こされる。我々はこれまでに、T細胞の発現するCD69がそのリガンドであるミオシン軽鎖9/12との会合を介し、組織移行を促すことで気道炎症を誘導する事を報告し、この新規気道炎症制御機構をCD69-MyI9システムと命名した。本システムは気道炎症のみならず様々な疾患にも関与することが推測されるが、その詳細は不明であった。本研究により、CD69-MyI9システムの分子機構の一端を、そして病態形成への関与を明らかにすることができた。今後、より詳細に解析を進めることで、CD69-MyI9システムの治療ターゲットとしての可能性を明らかにしたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性気道炎症を含む慢性炎症性疾患は今日大きな社会的問題となっており、新規治療法の確立が急務となっている。本研究で詳細に解析を進めた新規炎症制御機構のCD69-MyI9システムは、炎症反応による組織障害によって誘導される為、炎症の遷延化を特徴とする慢性炎症性疾患の病態形成やその治療法確立において極めて価値のある研究ターゲットである。本研究成果によりシステムの誘導機構の一端を明らかにすることができ、また、アレルギー性気道炎症以外の疾患への関与と重要性を明らかにすることができ、学術的にも社会的にも有意義な成果を残すことができた。

研究成果の概要(英文)：Asthma is induced by inflammatory cell accumulation into the lung tissues. Our previous reports showed that CD69 regulates allergic airway inflammation via its binding to the specific ligand, Myosin light chain 9/12 (MyI9/12). We named this novel system as "the CD69-MyI9 system". Although this system may contribute to not only allergic inflammation but also other chronic inflammatory diseases such as colitis and tumor, the detailed mechanisms are still unknown. This project uncovered a part of the molecular mechanisms such as the induction of CD69 expression and MyI9 nets formation. Our data also elucidated that CD69-MyI9 system plays a critical role in the colitis. In near future, the CD69-MyI9 system could be a new therapeutic target for various inflammatory diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：CD69-MyI9システム 慢性炎症 アレルギー性気道炎症 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性気道炎症は、T細胞をはじめとする多数の炎症細胞が気道や肺組織に集積することで引き起こされる。炎症組織に集積した炎症細胞は CD69 を高発現することから、CD69 は炎症を制御する機能分子として考えられてきた。しかしながら、これまでに CD69 の機能を規定する生体内リガンドが未知であったため、その詳細な機能解析はなされていなかった。代表者は、CD69 の新規リガンドとしてミオシン軽鎖 9/12 (My19/12) を同定することに成功した。My19/12 に対する抗体を作成し、マウスへ投与したところ、抗 CD69 抗体と同様にアレルギー性気道炎症を顕著に抑制することがわかった。また、My19/12 は炎症に伴い血小板から産生されることを明らかにし、また、産生された My19/12 は炎症血管内腔でネット様構造を形成することがわかった (My19 nets)。これらの結果から、血管内腔に形成された My19 nets は、CD69 を発現する炎症細胞の効率的な組織動員に寄与していると考え、新しい炎症制御機構としてこの制御システムを「CD69-My19 システム」と命名した。

### 2. 研究の目的

新規の炎症制御機構である CD69-My19 システムは未だ不明な点が多く残されている。本研究では、その中でも特に下記の 3 点について研究を進めることで、その詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

#### (1) 炎症性 T 細胞が血管内腔で CD69 を発現する機構について

CD69-My19 システムは、CD69 を発現する炎症細胞が血管内腔に My19 nets を足場として効率的に炎症組織に働いていると考えられるが、これまでの報告でリンパ節から血中に移行した活性化細胞は CD69 を発現していないことが示唆された。しかし、代表者らのこれまでの解析で、全身を循環する抗原特異的 T 細胞上には CD69 発現が認められないものの、炎症組織の血管内腔に局在する抗原特異的 T 細胞は CD69 を発現していることを明らかにしている。このことは、炎症組織の血管内腔において炎症細胞が何らかの刺激を介して再度 CD69 を誘導する機構が存在することが示唆される。その機構を明らかにする。

#### (2) My19 nets 形成メカニズム

炎症に伴って活性化した血小板は My19/12 を産生することがわかっている。また、血管内腔に形成された My19 nets は血栓様構造体であることから、一般的な血液凝固物と同様ないしは類似の物性を持っていることが示唆された。My19 nets の構成要素を調べることで、My19 nets 形成メカニズムを明らかにする。

#### (3) 他の炎症性疾患における CD69-My19 システムの関与

代表者らによる CD69 欠損マウスや抗 CD69 抗体を用いた病態モデル実験により、CD69 はアレルギー性気道炎症のみならず他の慢性炎症性疾患においても重要な機能を果たしていることが示唆されていた。これらの疾患では血小板の関与も指摘されている。このことから各種炎症性疾患における CD69-My19 システムの関与と重要性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では研究の目的に沿って、下記の 3 点について各々の手法にて研究を実施した。

#### (1) 炎症性 T 細胞が血管内腔で CD69 を発現する機構について

抗原特異的 T 細胞上に CD69 を再度発現誘導させる要因の一つとして、血管内腔で抗原提示を受ける可能性を考えた。そこで、血管内腔に局在する細胞と組織局在する細胞を分ける方法である Intravascular staining 法を用い、炎症肺血管に局在する抗原提示細胞の有無についての解析をフローサイトメトリーならびにコンフォーカル顕微鏡を用いて行った。また、蛍光標識抗原を用いて気道炎症を誘導することで、血管内腔に特異的抗原を保有した細胞が局在するか、また、その細胞はどのような細胞であるかの解析を行った。

#### (2) My19 nets 形成メカニズム

マウスより採血し in vitro で誘導した血液凝固物中に My19 nets 形成が認められるか、凍結ブロックならびに凍結切片を作成した後、コンフォーカル顕微鏡にて解析を行った。また、My19 nets 形成がアレルギー性反応に依存するかどうかを他の炎症性疾患ならびにウイルスや細菌感染時の炎症組織の解析を行った。

#### (3) 他の炎症性疾患における CD69-My19 システムの関与

CD69-My19 システムの関与が示唆される疾患の中で本研究中では潰瘍性大腸炎と腫瘍について解析を実施した。潰瘍性大腸炎は過去の CD69 研究で用いられているデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎モデルを用い、また、腫瘍における解析には転移能を有する乳がん細胞株 4T1 の移植を用いた。各々の疾患の炎症組織をコンフォーカル顕微鏡にて解析することで My19 nets 形成の有無を検討した。また、各々の疾患

において抗 Myl9/12 抗体投与による症状の緩和、ないしは生存率の向上を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 炎症性 T 細胞が血管内腔で CD69 を発現する機構について

Intravascular staining 法を用いた、炎症肺血管に局在する抗原提示細胞の有無についての解析により、炎症肺血管内腔には MHC class II を発現する細胞が局在し、またその数が炎症反応誘導後に増加することがわかった。興味深いことに炎症肺の血管内腔に形成された Myl9 nets に MHC class II 陽性の細胞が局在することをコンフォーカル顕微鏡解析により見出した。現在のところ、抗原特異的 T 細胞との共局在の同定には至っていないが、この細胞が血管内腔での CD69 発現誘導に寄与することが示唆された。次に、貪食された際にのみ蛍光を発する試薬で標識された卵白アルブミン (OVA) を用いて気道炎症を誘導し、血管内腔にて OVA 抗原を保有する抗原提示細胞の同定を行った。その結果、数種の細胞が OVA 抗原を保有する細胞として検出されたが、もっとも多くの抗原を保有し且つ血管内腔に局在する細胞は樹状細胞であることがわかった。また、血管内腔の樹状細胞は CX3CR1 を発現していることがわかった。この細胞が炎症誘導時に Myl9 nets 上に局在し、抗原特異的 T 細胞に抗原提示をすることが示唆される。

##### (2) Myl9 nets 形成メカニズム

Myl9 nets がいわゆる一般的な血液凝固物である血栓と同一のものであるか、in vitro で誘導し作成したフィブリン血栓をコンフォーカル顕微鏡で解析したところ、構造体内には血小板やフィブリン網は観察されものの、Myl9 nets の形成は見られなかった。しかしながら、局在する血小板内には Myl9/12 の発現が認められたことから、Myl9 nets の形成誘導には凝固物形成時に必要な因子とは別の誘導因子が必要であることが示唆された。次に、Myl9 nets 形成が炎症のタイプに特異的か明らかにする為、ウイルスや細菌感染を引き起こしたマウス炎症肺の組織を解析した。ウイルス感染にはインフルエンザウイルスを用い、細菌感染には肺炎球菌を用いた。結果、アレルギー性気道炎症と比較するとウイルスや細菌感染では Myl9 nets 形成誘導能が低い傾向にあることがわかった。今後、感染させるウイルス量や細菌量を詳細に検討し、判断する必要があるが、Myl9 nets 形成には炎症反応でも特異的な誘導機構が存在する可能性が考えられた。

##### (3) 他の炎症性疾患における CD69-Myl9 システムの関与

DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて得られた炎症組織をコンフォーカル顕微鏡により解析したところ、大腸血管内腔に Myl9 nets の形成が認められた。Myl9 nets 形成のある血管周囲には多くの炎症細胞が集積しており、CD69-Myl9 システムの関与が示唆された。次いで、抗 CD69 抗体投与と同様に炎症抑制効果ならびに生存率の向上が認められるか抗 Myl9/12 抗体を投与することで検討した。結果、抗 Myl9/12 抗体投与群では DSS 投与により引き起こされる体重減少の緩和と生存率の向上が認められた。本結果は、現在論文投稿に向けて準備中である。

腫瘍における CD69-Myl9 システムの関与を調べるために、乳がん細胞株 4T1 を移植した原発巣と転移先である肺組織における Myl9 nets の解析を行った。結果、転移先の肺組織において血管内腔に Myl9 nets が認められた。抗 CD69 抗体投与による腫瘍抑制効果は認められた一方で、抗 Myl9/12 抗体による有意な腫瘍抑制効果はこれまでに得られていない。今後、投与期間や投与量を修正することで、抗 Myl9/12 抗体による腫瘍抑制効果の検討を予定している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Mita Y, Kimura MY, Hayashizaki K, Koyama-Nasu R, Ito T, Motohashi S, Okamoto Y, Nakayama T. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *International immunology* 30(12) 559-567 2018 年 11 月

木村 元子, 林崎 浩史, 中山 俊憲. 気道炎症を制御する CD69-Myl9 システムとその展望 臨床免疫・アレルギー科 = *Clinical immunology & allergology* 70(4) 393-399 2018 年 10 月

Kimura MY, Igi A, Hayashizaki K, Mita Y, Shinzawa M, Kadakia T, Endo Y, Ogawa S, Yagi R, Motohashi S, Singer A, Nakayama T. CD69 prevents PLZF<sup>hi</sup> innate precursors from prematurely exiting the thymus and aborting NKT2 cell differentiation. *Nature communications* 9(1) 3749 2018 年 9 月

木村 元子, 林崎 浩史, 中山 俊憲. CD69-Myl9 システムによるアレルギー性気道炎症制御とその展望 (第 1 土曜特集 アレルギー研究最前線) -- (基礎研究の最前線 T 細胞, 自然リンパ球) *医学のあゆみ* 265(9) 719-723 2018 年 6 月

Kimura MY, Hayashizaki K, Tokoyoda K, Takamura S, Motohashi S, Nakayama T. Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the

pathogenesis of airway inflammation. Immunological reviews 278(1) 87-100 2017年7月

〔学会発表〕(計5件)

Takatsuka S, Hayashizaki K, Ueno K, Kubo M, Kinjo Y. The critical role of IL-21<sup>+</sup> NKT cells in the formation of germinal center B cells by a protein-based pneumococcal vaccine. The 47<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 福岡国際会議場(福岡). 2018年12月.

Kimura MY, Hayashizaki K, Nakayama T. CD69-My19 system regulates pathogenesis of inflammatory disorders. The 2<sup>nd</sup> Chiba University-UC San Diego Symposium “Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine”. 千葉大学(千葉). 2018年3月.

Hayashizaki K, Kimura MY, Tokoyoda K, Nakayama T. Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. The 2<sup>nd</sup> Chiba University-UC San Diego Symposium “Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine”. 千葉大学(千葉). 2018年3月.

Hayashizaki K, Kimura MY, Mita Y, Yagi R, Nakayama T. Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 仙台国際センター(宮城). 2017年12月.

Kimura MY, Hayashizaki K, Nakayama T. Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. The 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017. 石川音楽堂他(金沢). 2017年10月.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 抗 My19 抗体

発明者: 中山 俊憲, 木村 元子, 林崎 浩史, 平山 俊文, 角太 淳吾, 坂本 佳正, 源島 龍, 時田 大輔, 村本 賢三, 今井 俊夫

権利者: 国立大学法人千葉大学, エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社

種類: 特許

番号: W02017-122666

出願年: 2017年

国内外の別: 国外(国際)

取得状況(計1件)

名称: 抗ミオシン調節軽鎖ポリペプチド抗体を含む炎症疾患治療用組成物

発明者: 中山 俊憲, 細川 裕之, 常世田 好司, 林崎 浩史, 鈴木 茜

権利者: 国立大学法人千葉大学

種類: 特許

番号: W02014-192915

取得年: 2014年

国内外の別: 国内

〔その他〕

国立感染症研究所 真菌部 第三室

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/fungi-3rdlab.html>

千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/>

(1)研究代表者

林崎 浩史 ( Hayashizaki, Koji )

平成 29 年度

千葉大学 大学院医学研究院 免疫発生学・特任助教

平成 30 年度

国立感染症研究所 真菌部・流動研究員

研究者番号：50779907

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。