

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590491

研究課題名（和文）炎症反応の場の形成におけるCD69とリガンドの役割

研究課題名（英文）Crucial role for CD69 in the development of inflammation.

研究代表者

長谷川 明洋（HASEGAWA AKIHIRO）

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80376376

研究成果の概要：CD69分子は早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられているが、機能の詳細は明らかにされていない。本研究では、アレルギー性喘息および腸炎モデルを用いてCD69分子の役割とその発現様式に関する解析を行った。その結果、炎症部位に浸潤しているほとんどの炎症細胞でCD69の発現が見られ、CD69ノックアウトマウスではアレルギー性喘息や腸炎が起こらないことが明らかとなった。さらにこれらの炎症モデルにおいては、T細胞上のCD69分子が炎症の誘導に重要であることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：接着分子、CD69、喘息、炎症、コレセプター、腸炎

1. 研究開始当初の背景

CD69分子はc-type lectinファミリーに属するII型の膜分子で、T細胞やB細胞を刺激すると数時間以内に発現が上昇し、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。機能としては、コレセプター分子としてT細胞の細胞応答に関与するという報告やCD69を阻害することによりTGF- β の産生が抑制されるという報告があり、コレセプターとして抗原レセプターから

のシグナル伝達を増強する役割が推測されているが、詳細は不明である。一方、血小板には恒常的に発現しており、活性化好中球や好酸球などにも発現がみられることから、局所の炎症反応における役割が推測されている。リガンド分子は現在までのところ同定されていないが、近年T細胞上のCD69分子が同じ細胞膜上のS1P1分子と結合してその機能を抑制することにより、リンパ組織からの移動に関与することが明らかになってきた。

これまでに研究代表者らは CD69 ノックアウトマウスを作製し、その機能を解析して好中球上に発現している CD69 分子が関節炎の発症に重要であることを明らかにしてきた (Murata et al., *Int. Imm.* 15:987, 2003)。

CD69 分子の機能の詳細はこれまであまり明らかにされていないが、炎症局所に浸潤する炎症細胞に CD69 分子の発現がみられることから、さまざまな炎症反応の誘導・維持に重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、CD69 分子は難治性の免疫炎症疾患を人為的に制御するためのターゲット分子になり得ると考えられた。また CD69 分子が抗原やサイトカイン刺激により浸潤する炎症細胞上に発現が誘導されることから、組織側にリガンドが存在し、その CD69 リガンドの発現誘導が炎症巣の場を決めていると予想される。

2. 研究の目的

自己免疫病やアレルギー疾患は難治性のものが多く、効果的な治療薬の開発が望まれている。これまで喘息をはじめとするアレルギー疾患の研究は、炎症性サイトカイン、ケモカインなどの液性因子や Th2 細胞の分化の解析を中心に研究がすすめられてきたが、炎症細胞の浸潤や集積に関与する分子の機能はあまりわかっていなかった。

そこで本研究では炎症巣に浸潤する細胞で発現が上昇するユニークな性質を持つ CD69 に焦点をあてた研究を行った。CD69 はコレセプター分子としての機能の他、細胞間接着分子として細胞の集積・浸潤に関与していると考えられる。炎症巣の形成は、臓器・組織が備える細胞外環境と免疫細胞が相互に連携することにより形成されると考えられるが、特に本研究では CD69 とそのリガンド分子に着目し、炎症細胞の浸潤や集積といった挙動を制御する生理的細胞外環境の時間的変化を解析することにより、炎症巣の形成のメカニズムを明らかにすることを目的とした。またアレルギー性喘息や腸炎の治療薬としての開発の可能性を探る目的で、抗 CD69 抗体を用いて抑制効果を検討した。本研究により

CD69 分子の働きを抑制する薬剤の開発ができれば、有用な治療薬になると考えられ、CD69 分子の重要性やターゲット分子としての有用性が明らかになることによって、今後新規のアレルギー疾患治療薬を開発する上で、コレセプター分子や細胞間接着分子がターゲット分子となる可能性が広がると考えられた。

これまでに研究代表者らは世界に先駆けて CD69 ノックアウトマウスを樹立して解析を行ってきた。ノックアウトマウスを用いることにより正常マウスからの細胞移入実験が可能になり、どの細胞上の CD69 分子がアレルギーや炎症の発症に関与するかを明確に調べることができる。

これらのことをふまえ、本研究では(1)腸管炎症部位での CD69 分子の発現細胞の解析、(2)アレルギー性喘息肺における CD69 分子の発現様式に関する解析、(3)CD69 リガンド分子のクローニング、(4)抗 CD69 抗体を用いた抑制効果の検討に関する研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 腸管炎症部位での CD69 分子の発現細胞の解析

マウスでの腸炎モデルとして、デキストラン硫酸 (DSS) を飲水に混ぜて飲ませ、急性腸炎を誘導する系を用いた。炎症の程度を野生型マウスと CD69 ノックアウトマウスで比較した。また RT-PCR 法により炎症巣における炎症性サイトカインやケモカインの発現レベルを比較した。正常マウスで腸炎誘導後、腸管の組織切片を作製し、抗 CD69 抗体を用いて免疫染色を行うことによって、腸管炎症部位に浸潤している細胞群のうち、実際に CD69 分子を発現する細胞を調べた。また新規の腸炎の治療に向けた試みとして、抗 CD69 抗体を用いて腸炎抑制効果を検討した。

(2) 腸炎モデルにおける正常マウスからの細胞移入実験

腸管炎症部位に浸潤する細胞群のうち、どのような細胞上に発現する CD69 分子が腸炎の発症に重要であるか調べるために、正常マウスからの細胞を CD69 ノックアウトマウスに移入し腸炎を誘導

して症状を比較した。まず Ly5 のアレルの異なる正常マウスから T 細胞や B 細胞などを個別に単離した。T 細胞や B 細胞は脾臓細胞からそれぞれ Thy-1、B220 陽性の細胞を精製した。好中球とマクロファージは 4% チオグリコレート液を腹腔内に注射して数時間後に生理食塩水で腹腔内洗浄することにより得られた細胞をそれぞれ Gr-1、Mac-3 抗体で染色し、各陽性細胞を精製した。各細胞群をそれぞれ CD69 ノックアウトマウスに静注した後、腸炎を誘導した。評価は体重減少や下痢・下血の症状を比較するとともに、組織染色を行って炎症細胞浸潤を比較することにより行った。

(3) アレルギー性喘息モデルを用いた CD69 分子の発現様式に関する解析

卵白アルブミン (OVA) で免疫後、OVA を吸入させて気道炎症を誘導するマウス喘息モデル系を用いた。このモデルでは、OVA 特異的 Th2 細胞の分化、誘導が必須で、細気管支周囲や血管周囲における好酸球性の浸潤が特徴である。気道炎症誘導後、経時的に気管支および肺の組織切片や脾臓、リンパ節などの組織切片を作製し、抗 CD69 抗体や抗 ICAM-1 抗体、抗 VCAM-1 抗体など接着分子に対する抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。肺組織特異的に CD69 を発現した炎症細胞が浸潤、集積していく過程を経時的に解析し、CD69 陽性細胞の浸潤から炎症巣の形成に至る各細胞の挙動を観察した。Th2 細胞は、CFSE でラベルしたり、GFP を恒常的に発現している GFP Tg マウスの Th2 細胞を用いて移入実験を行った。

また新規のアレルギー性喘息の治療に向けた試みとして、抗 CD69 抗体を用いて喘息抑制効果を検討した。抗 CD69 抗体を OVA 吸入前に投与した場合と OVA 吸入後に投与した場合とに分け、効果的な投与時期についても検討した。

(4) CD69 リガンド分子のクローニング

マウス CD69 の細胞外領域と IgGFc を結合させた soluble CD69 分子を作製した。これを用いて培養細胞を染色した。陽性細胞より mRNA を精製して cDNA ライ

ブラリーを作製し、ウイルス発現ベクターへの組み込み、培養細胞に感染させ、soluble CD69 分子で染色して陽性となる細胞を sorting により回収した。

4. 研究成果

(1) 腸管炎症部位での CD69 分子の発現細胞の解析

マウスでの腸炎モデルとして、デキストラン硫酸 (DSS) を飲水に混ぜて飲ませ、急性腸炎を誘導する系を用いた。CD69 ノックアウトマウスでは炎症が起こらないことが明らかになった。正常マウスで腸炎誘導後、腸管の組織切片を作製し、抗 CD69 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、腸管炎症部位に浸潤しているほとんどの炎症細胞で CD69 が発現していた。また炎症巣における炎症性サイトカインやケモカインの発現レベルを比較したところ、CD69 ノックアウトマウスでは IL-1b、IL-6、CCL2 などの発現レベルが野生型マウスに比べ有意に低かった。また抗 CD69 抗体の投与により腸炎の発症を抑制できることが明らかとなった。

(2) 腸炎モデルにおける正常マウスからの細胞移入実験

腸管炎症部位に浸潤する細胞群のうち、どのような細胞上に発現する CD69 分子が腸炎の発症に重要であるか調べるために、正常マウスから T 細胞や B 細胞、好中球、マクロファージを精製し、CD69 ノックアウトマウスに移入し腸炎を誘導して症状を比較した。その結果、正常マウスの T 細胞を移入した場合に腸炎が誘導され、T 細胞上の CD69 分子が腸炎の発症に重要であることが明らかとなった。

(3) アレルギー性喘息モデルを用いた CD69 分子の発現様式に関する解析

アレルギー性喘息モデルを用いて気道炎症誘導後、経時的に組織切片を作製し、抗 CD69 抗体を用いて免疫染色した。Th2 細胞は、GFP を恒常的に発現している GFP Tg マウスの Th2 細胞を用いた。抗原吸入後の肺への Th2 細胞浸潤を調べたところ、好酸球など他の炎症細胞の浸

潤に先んじて 24 時間以内に起こることが明らかとなった。また肺に浸潤した Th2 細胞は focus を形成し、好酸球浸潤にともなう炎症巣の形成を制御していることが明らかとなった。さらに肺に浸潤した Th2 細胞で特異的に CD69 の発現がみられた。

新規のアレルギー性喘息の治療に向けた試みとして、抗 CD69 抗体を用いて喘息抑制効果を検討したところ、抗 CD69 抗体の投与により喘息の誘導が抑制できることが明らかとなった。さらに抗 CD69 抗体を抗原吸入後に投与した場合にも抑制できることが明らかとなった。

(4) CD69 リガンド分子のクローニング

soluble CD69 分子を用いた培養細胞の染色で陽性の細胞より cDNA ライブラリーを作製し、ウイルス発現ベクターに組み込んで培養細胞に感染させ soluble CD69 分子で染色する方法で陽性クローンを同定した。

(5) 結論

本研究によりアレルギー性喘息および腸炎モデルを用いて CD69 分子の役割とその発現様式に関する解析を行った結果、炎症部位に浸潤しているほとんどの炎症細胞で CD69 の発現が見られ、炎症巣の形成における CD69 分子の役割が明らかとなった。CD69 ノックアウトマウスではアレルギー性喘息や腸炎が起こらず、特に T 細胞上の CD69 分子が炎症の誘導に重要であることが明らかとなった。またアレルギー性喘息モデルにおける解析から Th2 細胞の集積が好酸球の浸潤に先んじて起こり、Th2 細胞が炎症巣の形成を制御していることが明らかとなった。今後 CD69 リガンド分子のクローニングやその発現様式の解析が進むことにより、さらに炎症反応の場の形成メカニズムが明らかになると考えられる。またアレルギー性喘息、腸炎とも抗 CD69 抗体投与による抑制効果が認められ、CD69 分子の働きを抑制する薬剤の開発ができれば有用な治療薬になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- ① Yamashita, M., Kuwahara, M., Suzuki, A., Hirahara, K., Shinnakasu, R.,

Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Iwama, A. and Nakayama, T. Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. *J. Exp. Med.* 205: 1109-20 (2008). 査読有

- ② Ito, T., Hasegawa, A., Hosokawa, H., Yamashita, M., Motohashi, S., Naka, T., Okamoto, Y., Fujita, Y., Ishii, Y., Taniguchi, M., Yano, I. and Nakayama, T. Human Th1 cell differentiation induced by Lipoarabinomannan/Lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. *Int. Immunol.* 20: 849-860 (2008). 査読有

- ③ Hossain, M. B., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Watarai, H., Taniguchi, M., Yamashita, M. and Nakayama, T. Lymphoid enhancer factor interacts with GATA-3 and controls its function in T helper type2 cells. *Immunology.* 125: 377-386 (2008). 査読有

- ④ Hirahara, K., Yamashita, M., Iwamura, C., Shinoda, K., Hasegawa, A., Yoshizawa, H., Koseki, H., Gejyo, F., and Nakayama, T.: ROG, repressor of GATA, regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 512-520 (2008). 査読有

- ⑤ Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S. and Nakayama, T.: Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 283: 28216-28225 (2008). 査読有

- ⑥ Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C., Hasegawa, A., Kimura, Y. M., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M. and Nakayama, T. Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells. *Mol. Immunol.* 44: 2249-2256 (2007). 査読有

- ⑦ Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Miki, T., Hasegawa, A., Sugaya, K., Yamashita, M., Ishii, S. and Nakayama, T. Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers in vivo. *J. Immunol.* 178: 4926-4936 (2007). 査読有

- ⑧ Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Kitajima, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Yamashita, M., and Nakayama, T. Schnurri-2 controls the generation of memory Th1 and Th2 cells. *13th International congress of Immunology* 475-479 (2007). 査読無

- ⑨ Iwamura, C., Kimura, Y. M., Shinoda, K., Endo, Y., **Hasegawa, A.**, Yamashita, M. and Nakayama, T. Schnurii-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Int. Immunol.* 19: 755-762 (2007). 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① **長谷川明洋**、白井睦訓 腸炎の発症における CD69 分子の役割 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 12-14 日、名古屋
- ② Ito, T., Hirasaki, Y., **Hasegawa, A.**, Hosokawa, H., Motohashi, S., Yamashita, M., Ishii, Y., Taniguchi, M., Yano, I. and Nakayama, T. BCG Tokyo-172 から分離精製した LAM/LM 分子による Human Th1 分化誘導機構 / Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from Mycobacterium bovis BCG Tokyo-172. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 1-3 日、京都
- ③ **Hasegawa, A.**, Shirai, M. and Nakayama, T. Crucial role for CD69 in the pathogenesis of colitis induced by dextran sulphate sodium. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 1-3 日、京都
- ④ **長谷川明洋** : アレルギー・喘息のバイオイメージング、第 17 回日本バイオイメージング学会学術集会公開シンポジウム 2008 年 10 月 30-11 月 1 日、千葉
- ⑤ **Hasegawa, A.** : In vivo imaging in the asthmatic lung. 第 17 回日本バイオイメージング学会学術集会シンポジウム 2008 年 10 月 30-11 月 1 日、千葉
- ⑥ **Hasegawa, A.** : Visualization of lymphocyte migration in the asthmatic lung. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会シンポジウム 2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑦ 中山俊憲、**長谷川明洋**、Robert M. Hoffman 喘息の発症にともなう肺への T 細胞浸潤のイメージング 第 16 回日本バイオイメージング学会学術集会 2007 年 10 月 31 日-11 月 2 日、千葉
- ⑧ Nakayama, T., Kimura, M. Y., Iwamura, C., **Hasegawa, A.** and Yamashita, M. Schnurii-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers in vivo. 94th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Inc. 2007 年 5 月 18-22 日、Miami Beach, Florida, USA
- ⑨ **Hasegawa, A.** and Nakayama, T. GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading

to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. 94th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Inc. 2007 年 5 月 18-22 日、Miami Beach, Florida, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

<http://mb.med.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 明洋 (HASEGAWA AKIHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 80376376

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし