

「生体防御のメカニズム」  
平成8年度採択研究代表者

松島 綱治

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

## 「炎症反応分子機構の IL8, 接着因子を中心とした解析」

### 1. 研究実施の概要

本研究においては、①IL8をはじめとしたケモカインの様々な炎症・免疫疾患モデルでの病態生理作用の確立とそれに基づく抗炎症・免疫抑制剤開発のための新たな分子標的の提供、②ケモカイン受容体シグナル伝達機構の解析並びにケモカイン・ケモカイン受容体アンタゴニストの開発、③白血病細胞接着因子を介した細胞シグナルの解析、④エンドトキシンショックの分子機序の解析、⑤マクロファージ、樹状細胞の起源、分化、活性化分子機序の解析と新規炎症関連遺伝子のクローニングとそれらの生物活性の確立、ヒト疾患の診断・治療・予防への応用を柱として研究を実施している。

### 2. 研究実施内容

#### (1) ケモカインの病態生理作用の確立

ウサギにおける IL8 に対するマウスハイブリドーマ由来抗体投与による様々な実験モデル（皮膚急性炎症、血清複合体急性腎炎、肺虚血後再灌流傷害、ARDS、脳梗塞など）をとおしてすでに IL8 が急性炎症に伴う好中球の浸潤ならびに活性化に中心的に関与し、IL8 を阻害することにより急性組織損傷が防げることを明らかにしている。中外製薬との共同研究としてヒト型化 anti-human IL8 抗体 (IgG4) を用いて臨床開発のための適応疾患を決定するための動物実験を行った。さらに、MCP-1 に対する抗体により、ラットでの馬杉腎炎による腎硬化症、モノクローリン誘導性肺高血圧症発症、内頸動脈内皮損傷による動脈硬化を軽減できることを明らかにした。MCP-1 を分子標的にした低分子アンタゴニストの開発が世界的に期待されている。

この2～3年、リンパ球遊走活性を有する新規ケモカインが主に EST データベースをもとに数多くクローニングされた。ケモカインにより様々な免疫反応時のサブセット特異的リンパ球の浸潤が制御されている可能性が出てきた。私達は、最近これらの内 TARC, MDC の受容体 CCR4 がヒト末梢血 CD4 陽性、CD45RO 陽性 Th2 細胞に特異的に発現していることを明らかにした。P. acnes によって

他6件

priming されたマウスに少量の LPS を投与すると劇症肝炎を発症するが、このモデルをケモカインを中心として解析した結果 *P. acnes* による肝実質における肉芽形成には Th1 細胞が、しかし全身的に LPS が投与されると肉芽を中心として TATC, MDC が産生され急速に Th2 細胞が浸潤することが判明した。さらに、TARC に対する中和抗体をこのマウス肝炎モデルに投与すると劇的な防止効果を示すことを見いだした。現在、喘息、アトピー性皮膚炎における TAR/MDC-CCR4 の関与を検討しているところである。また、一般的には Th1 モデルと言われるマウス GVHD モデルに於ける肝障害を解析したところ CCR5 陽性 CD8 陽性が障害に決定的役割を有することが判明した。

CXCR4 のノックアウトマウスを作製し、大阪母子センター研究所との共同研究でその phenotype を解析した。HIV とケモカインの仕事において CXCR4 の受容体が naive T lymphocyte に発現され、Th2 polarization に直接関連せず、IL4 や glucocorticoid 処理により著しく upregulate されることを見いだし T-tropic HIV 感染を促進することを明らかにした。SDF-1intrakine 遺伝子導入骨髄幹細胞移植キメラマウスを作製し現在その phenotype を解析中である。

ケモカインの病態生理作用確立のため、抗体の作製、遺伝子欠損マウス (CCR5<sup>-/-</sup>マウスは作製済み)・トランスジェニックマウス、intrakine 遺伝子導入骨髄幹細胞移植キメラマウスをさらに作成中である。

#### (2) ケモカイン受容体シグナル伝達機構の解析

現在 yeast two hybrid system で CCR2 の C-末端を bait に細胞内会合分子の探索を行いすでに数クローン (多くは新規遺伝子) を得ている。現在これらの遺伝子の機能検索を行っているところである。

#### (3) LPS 受容体、シグナル伝達機構の解析

LPS 受容体 signal transducer ならびに細胞内情報伝達分子の同定のため、マウス retrovirus vector を用いた macrophage library のスクリーニングを行い、現在数多く得られている候補遺伝子を解析中である。

#### (4) エンドトキシンショックの分子機構の解析

Natural selectin antagonist, sulfatide によるサイトカイン産生抑制機序について検索するとともに、sulfatide 結合蛋白の同定を行っている。また、IL6<sup>-/-</sup>マウスにおける、エンドトキシンショック抵抗性の原因について詳細に検討中である。

また、エンドトキシンショック時の NO の関与を詳細に調べるために ESR を用いたマウス血液中 NO の定量法を確立し、エンドトキシンショック時の NO 量を従来のグリース法と比較した。

#### (5) Macrophage, DC の分化機構の解析

マウスにおいて myeloidDC の骨髄血球前駆細胞、ならびに胎仔肝血球前駆細胞からの分化システムを世界で初めて確立するとともに、骨髄前駆細胞から DC への分化経路には少なくとも3通りあることを明らかにし、in vitro でのケモカインに対する反応性を検討した。

さらに、ヒト単球から macrophage, DC への分化に関連する遺伝子を serial analysis of gene expression (SAGE)によりそれぞれ 50,000:tags 以上スクリーニングして同定した。今後、これらの遺伝子の細胞生物学的意義の確立を行う予定である。

#### (6) 新規炎症関連遺伝子の機能解析と炎症関連遺伝子欠損マウスの作製

IL 1 receptor antagonist 欠損マウスを作製し、その phenotype を解析中である。予備的な結果では、細菌誘導性肝障害モデルにおいて欠損マウスはより致死的であり、脾臓では Th2 シフトが観られた。

ADAMTS-1 の欠損マウス作製により、ADAMTS-1 がマウスの正常な成長、腎・副腎などの臓器の形態と機能に重要な因子であることが明らかになった。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. Blood 1999 94: 845-852 Hashimoto S, Suzuki T, Dong H, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K.

○Serial analysis of gene expression in human Monocytes and Macrophages. Blood 1999 94: 837-844 Hashimoto S, Suzuki T, Dong H, Yamazaki N, Matsushima K.

○Active participation of CCR5+CD8+ T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in GVHD. J.Clin.Invest. 1999 104: 49-57 Murai M, Yoneyama H, Harada A, Zhang Y, Vestergaard C, Guo B, Suzuki K, Asakura H, Matsushima K.

○Transforming Growth Factor- $\beta$  1, polarizes Murine Hematopoietic Progenitor Cells to Generate Langerhans Cell-Like Dendritic Cells Through a Monocyte/Macrophage Differentiation Pathway. Blood 1999 93:1208-1220 Zhang Yi, Zhang Yan-yun, Ogata M, Chen P, Harada A, Hashimoto S, Matsushima K.

○Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor- $\beta$  1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. Blood 1999 93: 3225-3232 Ogata M, Zhang Yi, Wang Y, Itakura M, Zhang Yan-yun, Harada A, Hashimoto S,

- Kawasaki K, Matsushima K. *Journal of Cellular Biochemistry* 1998;71:1-10
- Alleviation of Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury in Propionibacterium acnes-Primed IFN- $\gamma$ -Deficient Mice by a Concomitant Reduction of TNF- $\alpha$ , IL-12, and IL-18 Production. *J. Immunol.* 1999 162:1049-1055 Tshuji H, Mukaida N, Harada A, Kaneko S, Matsushita E, Nakamura Y, Tshutshui H, Okamura H, Nakanishi K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kobayashi K, Matsushima K. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999;74:1-10
- Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice. *J Clin Invest* 1998 Dec 1;102(11):1933-41 Yoneyama H, Harada A, Imai T, Baba M, Yoshie O, Zhang Y, Higashi H, Murai M, Asakura H, Matsushima K. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999;74:1-10
- IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol* 1998 Nov;64(5):642-9 Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, Nagai Y, Matsushima K. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999;74:1-10
- Bifurcated dendritic cell differentiation in vitro from murine lineage phenotype-negative c-kit<sup>+</sup> bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998 Jul 1;92(1):118-28 Zhang Y, Harada A, Wang JB, Zhang YY, Hashimoto S, Naito M, Matsushima K. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999;74:1-10
- ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem* 1998 May 29;273(22):13912-7 Kuno K, Matsushima K. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999;74:1-10