

「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、1) IL8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のための基礎実験 2) ケモカイン受容体シグナル伝達機構の解析 3) 白血球細胞接着因子の生物学的意義の確立と接着因子を介した細胞内シグナルの解析 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ならびにそれらの生物活性の確立を柱として研究を実施している。

2. 研究実施内容

1) 炎症反応分子機構解析グループ

ケモカインによるTh1/Th2優位免疫反応制御

この間、Th1/Th2特異的免疫反応時に何故免疫反応局所にTh1/Th2細胞特異的浸潤が起こるのか全く不明であった。ところが、最近発見された新規ケモカインがリンパ球サブセット特異的に作用することが判明し、また、これらのケモカインに対する受容体が明らかになることによりこの謎が解明された。CD4陽性Th1細胞表面上にはCXCR3, CCR5が発現しIP-10/MigならびにMIP-1 α /MIP-1 β /RANTESが作用することが報告される一方、近畿大学義江らとの共同研究によりTh2細胞表面上にはCCR4が発現しTARC/MDCが作用することを明らかにした。以下、マウス疾患モデルにおけるケモカインによるTh1/Th2優位免疫反応、炎症/免疫疾患制御に関する私達の実験結果を記す。

a. 細菌性劇症肝炎モデル

サルコイドーシスの原因菌として注目されている*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)の加熱死菌をC57BL/6マウスに尾静脈より1mg注射し、一週間後に低用量のLPSを再度尾静脈より投与すると、肝実質に多数形成された肉芽を中心として激しい肝実質細胞の破壊が生じる。ケモカインを中心とした解析から、*P. acnes*により肝実質に肉芽が形成されるまではMIP-1 α , Mig, IP-10などによって遊走されたCCR5ならびにCXCR3発現INF- γ 産生性Th1細胞が主に関

与し、LPS刺激後肉芽構成細胞はTARC, MDCを産生しCCR4発現IL4産生性Th2細胞を肝臓に動員しTNFとFasを介した肝障害を引き起こすことが判明した。この実験モデルにおいて抗TARC抗体は肝障害の発症を有意に抑制した。ケモカインにより、Th1, Th2細胞の浸潤が非常に精密に制御されTh1をベースにしたTh2反応の混合が強い組織傷害を引き起こすことが明らかになった。さらに、Th2を誘導するTARC, MDCが肉芽を構成する活性化樹状細胞により産生されることが判った。今年度は、*P. acnes*投与後数時間内に多数のCCR1/5⁺CD11c⁺樹状細胞前駆体が血中に出現し、肝臓sinusoidのDisse腔に移動し、肉芽形成に関与することを見出した。肉芽組織にはCCR1/5⁺CCR7⁻のCD11c⁺DEC205⁻未熟樹状細胞が集積し、活性化/成熟とともにCCR7⁺DEC205⁺樹状細胞になり門脈領域にリンパ向性に移動することを実証した。樹状細胞の前駆体のDisse腔への移動にはKupffer細胞や肉芽構成細胞によって産生されるMIP-1 α 、成熟樹状細胞の門脈領域への移動にはリンパ管内皮によって産生されるSLCによることが判明した。naive Tリンパ球の*P. acnes*抗原特異的な最初の増殖は門脈領域で起こり、ここに新たな二次リンパ組織の形成があることが判り、portal tract associated lymphoid tissue (PALT)と命名した。肉芽部位でのTリンパ球の増殖はPALT、所属リンパ節 (hepatic lymph node)でTh1 polarized memoryとなったTリンパ球が肝臓にホーミングして初めて起こることを明らかにした。

b. 気管支喘息モデル

C57BL/6マウスを第1日目と第8日目に卵白アルブミンを腹腔内投与することにより免疫し、第15日目から一週間連日20分間卵白アルブミンを気道感作し気道過敏症を誘発した。CCR4のリガンドであるTARCの産生誘導が気道上皮細胞と血管内皮に経時的に起こるとともに好酸球を主とした著明な白血球浸潤が観られた。抗TARC抗体を気道曝露時に繰り返し投与することにより劇的な好酸球浸潤、Th2サイトカイン産生の抑制とアセチルコリン誘導気道抵抗増加の障害が認められた。

c. 急性GVHD

C57BL/6 (B6, H-2b)由来脾細胞をB6XDBA/2F1マウスに移入し、急性GVHDを惹起した。1週間後にはCCR1, CCR4ならびにCXCR3発現CD4陽性T細胞、2週間後にはCCR5発現CD8陽性Tリンパ球が主に胆管周囲に浸潤した。胆管・肝障害を引き起こす2週間後においてCCR5に結合するケモカインとしてMIP-1 α が選択的に胆管上皮、血管内皮ならびに浸潤白血球により産生されていた。抗CCR5抗体ならびに抗MIP-1 α 抗体が有意にT細胞浸潤を抑制し肝傷害を軽減したことにより、MIP-1 α によって、胆管上皮傷害性CCR5陽性CD8

細胞が浸潤することが判明した。このモデルは一般的にはTh1モデルとされるが、CD8陽性細胞は必ずしもINF- γ 産生性Tc1細胞ではなかった。しかし、キラー T細胞の浸潤にケモカイン受容体CCR5とそのリガンドMIP-1 α が関与する可能性を示唆した最初の仕事である。現在、donor cellの移入後のtrafficking fate、感作、増殖がどこで起こるかをGFP- transgenic mouse由来Tリンパ球を用いて検索中である。

発生・成人期生理的条件下の免疫組織形成に於けるケモカイン

胎仔肝ならびに骨髄より血液前駆細胞が胸腺に移動し、胸腺内でT細胞に分化する。被膜下CD4 CD8 double negative細胞、皮質double positive細胞、髄質CD4もしくはCD8 single positive細胞に分化するとともに、positive/negative clonal selectionを受ける。この時のT細胞の胸腺内移動にもケモカインの関与が示唆されている。SDF-1は主に皮質部で産生され、TECK, TARC, ELCは髄質樹状細胞で恒常的に産生されている。最近私達は、SDF-1の受容体CXCR4をendoplasmic reticulumにトラップするように人工的にデザインしたintrakineを発現した血球細胞で置き換えたマウスを作製し、それらにおける造血、免疫システムの構築を検索したところBリンパ球、顆粒球の再構築のみならず胸腺の再構築にも異常があることが判明した。この方法をTECK-CCR9のシステムにも応用し、腸管上皮間リンパ球の起源、trafficking機構について検索中である。

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を用いてCCR2のC-末端をbaitに細胞内会合分子の探索を行い、既に数クローン（多くは新規遺伝子）を得ている。現在これらの遺伝子産物のうち、clathrin motifを有するFROUNTと命名した分子はMCP-1のCCR2介在性internalizationを制御し、マクロファージ浸潤を正に制御する分子であることがin vitroのみならずin vivo実験でも明らかになっている。

Macrophage, DC(樹状細胞)の分化機構の解析

ヒト単球からmacrophage, DCへの分化、LPS活性化に関連する遺伝子をserial analysis of gene expression (SAGE)法によりそれぞれ50,000 tags以上スクリーニングして同定した。この仕事はヒト血球系細胞に於ける包括的な遺伝子発現検索としての最初の仕事である。論文発表とともにホームページを開設し詳細な最新情報を開示している。現在、この仕事で明らかになった多数の新規遺伝子のクローニングと機能確立の仕事を展開している。また、癌・微生物ワクチンのシャトル細胞として注目されているDCの多様性を遺伝子発現プロファイルにて明らかにしようとしている。

2) 生体工学グループ

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を解析した結果、SDF-1/PBSFとCXCR4が一对一の関係にあり胎生期の造血、B細胞分化・増殖のみならず胃・上部腸管への血管形成に重要な役割を有することが判明した。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^{-/-}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製中である。

IL 1 receptor antagonist欠損マウスを作製し、そのphenotypeを解析した。細菌誘導性肝障害モデルにおいて欠損マウスは野生型と比べ、より致死的であり、脾臓ではTh2シフトが観られた。

炎症関連遺伝子としてクローニングした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。ADAMTS分子群はメタロプロテアーゼ研究分野で最も注目を浴びている分子群であり私達が発見したADAMTS-1が最初の分子ある。現在ADAMTS-4欠損マウスを作成中である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Ato, M., Iwabuchi, K., Matsuki, N., Mukaida, N., Iwabuchi, C., Takahashi, A., Takayanagi, T., Dondog, E. A., Hatakeyama, S., Ishikura, H., Kato, M., Negishi, Nishihori, H., Watano, K., Ogasawara, K., Matsushima, K., and Onoe, K. Delayed clearance of zymosan-induced granuloma and depressed phagocytosis of macrophages with concomitant up-regulated kinase activities of Src-family in a human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse, *Immunobiology*. 201 : 432-49, 2000.

Osawa, Y., Hachiya, M., Araki, S., Kusama, T., Matsushima, K., Aoki, Y., and Akashi, M. IL- 1 induces expression of p21(WAF1) independently of p53 in high-passage human embryonic fibroblasts WI38, *J Biochem (Tokyo)* 127 : 883-93, 2000.

Furuichi, K., Wada, T., Sakai, N., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Shimizu, M., Kobayashi, K., Takasawa, K., Kida, H., Takeda, S., Mukaida, N., Matsushima, K., and Yokoyama, H. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases, *Am J Nephrol*. 20 : 291-9, 2000.

Iguchi, A., Kitajima, I., Yamakuchi, M., Ueno, S., Aikou, T., Kubo, T., Matsushima, K., Mukaida, N., and Maruyama, I. PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*. 279 : 166-

71, 2000.

Iguchi, H., Ono, M., Matsushima, K., and Kuwano, M. Overproduction of IL-8 results in suppression of bone metastasis by lung cancer cells in vivo, *Int J Oncol.* 17 : 329-33, 2000.

Ishii, M., Hashimoto, S., Tsutsumi, S., Wada, Y., Matsushima, K., Kodama, T., and Aburatani, H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis, *Genomics.* 68 : 136-43, 2000.

Hirao, M., Onai, N., Hiroishi, K., Watkins, S. C., Matsushima, K., Robbins, P. D., Lotze, M. T., and Tahara, H. CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes, *Cancer Res.* 60 : 2209-17, 2000.

Kakio, T., Matsumori, A., Ono, K., Ito, H., Matsushima, K., and Sasayama, S. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart, *Lab Invest.* 80 : 1127-36, 2000.

Ellingsen, T., Elling, P., Olson, A., Elling, H., Baandrup, U., Matsushima, K., Deleuran, B., and Stengaard-Pedersen, K. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in temporal arteritis and polymyalgia rheumatica, *Ann Rheum Dis.* 59 : 775-80, 2000.

Kuno, K., Okada, Y., Kawashima, H., Nakamura, H., Miyasaka, M., Ohno, H., and Matsushima, K. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan, *FEBS Lett.* 478 : 241-5, 2000.

Matsushima, K. Chemokines. Introduction., *Springer Semin Immunopathol.* 22 : 321-8, 2000.

Miyamasu, M., Misaki, Y., Yamaguchi, M., Yamamoto, K., Morita, Y., Matsushima, K., Nakajima, T., and Hirai, K. Regulation of human eotaxin generation by Th1-/Th2-derived cytokines, *Int Arch Allergy Immunol.* 122 : 54-8, 2000.

Murayama, T., Mukaida, N., Sadanari, H., Yamaguchi, N., Khabar, K. S., Tanaka, J., Matsushima, K., Mori, S., and Eizuru, Y. The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for Up-regulation of interleukin-8 gene expression , *Biochem Biophys Res Commun.* 279 : 298-304, 2000.

Nagata, K., Tsuji, T., Matsushima, K., Hanai, N., and Irimura, T. Redistribution of selectin counter-ligands induced by cytokines, *Int Immunol.* 12 : 487-92, 2000.

Narumi, S., Yoneyama, H., Inadera, H., Nishioji, K., Itoh, Y., Okanoue, T., and Matsushima, K. TNF-alpha is a potent inducer for IFN-inducible protein-10 in

hepatocytes and unaffected by GM-CSF in vivo, in contrast to IL-1beta and IFN-gamma, Cytokine. 12 : 1007-16, 2000.

Nishihori, H., Tsuji, H., Wang, H., Tahara, H., Akiyama, M., Ogawa, Y., Matsushima, K., Iwakura, Y., and Mukaida, N. Participation of endogenously produced interferon gamma in interleukin 4-mediated tumor rejection, Hum Gene Ther. 11 : 659-68, 2000.

Nokihara, H., Yanagawa, H., Nishioka, Y., Yano, S., Mukaida, N., Matsushima, K., and Sone, S. Natural killer cell-dependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein-1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice., Cancer Res. 60 : 7002-7, 2000.

Oishi, K., Hayano, M., Yoshimine, H., Tugume, S. B., Kebba, A., Mugerwa, R., Mugenyi, P., Kumatori, A., Matsushima, K., and Nagatake, T. Expression of chemokine receptors on CD4+ T cells in peripheral blood from HIV-infected individuals in Uganda, J Interferon Cytokine Res. 20 : 597-602, 2000.

Onai, N., Zhang, Y., Yoneyama, H., Kitamura, T., Ishikawa, S., and Matsushima, K. Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakine, Blood. 96 : 2074-80, 2000.

Amano, H., Yamamoto, H., Senba, M., Oishi, K., Suzuki, S., Fukushima, K., Mukaida, N., Matsushima, K., Eguchi, K., and Nagatake, T. Impairment of endotoxin-induced macrophage inflammatory protein 2 gene expression in alveolar macrophages in streptozotocin-induced diabetes in mice, Infect Immun. 68 : 2925-9, 2000.

Ostergaard, C., Yieng-Kow, R. V., Larsen, C. G., Mukaida, N., Matsushima, K., Benfield, T., Frimodt-Moller, N., Espersen, F., Kharazmi, A., and Lundgren, J. D. Treatment with a monoclonal antibody to IL-8 attenuates the pleocytosis in experimental pneumococcal meningitis in rabbits when given intravenously, but not intracisternally, Clin Exp Immunol. 122 : 207-11, 2000.

Sekiya, T., Miyamasu, M., Imanishi, M., Yamada, H., Nakajima, T., Yamaguchi, M., Fujisawa, T., Pawankar, R., Sano, Y., Ohta, K., Ishii, A., Morita, Y., Yamamoto, K., Matsushima, K., Yoshie, O., and Hirai, K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells, J Immunol. 165 : 2205-13, 2000.

Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T.,

Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Oh-hashii, Y., Morita, H., Ishikawa, T., Nagai, R., Yazaki, Y., and Matsushima, K. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function, *J Clin Invest.* 105 : 1345-52, 2000.

Suzuki, T., Hashimoto, S., Toyoda, N., Nagai, S., Yamazaki, N., Dong, H. Y., Sakai, J., Yamashita, T., Nukiwa, T., and Matsushima, K. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE, *Blood.* 96 : 2584-91, 2000.

Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Abe, S., Sugawara, I., Nakahara, K., Matsushima, K., and Kudoh, S. Diesel exhaust particles activate human bronchial epithelial cells to express inflammatory mediators in the airways : a review, *Respirology.* 5 : 197-203, 2000.

Tamaru, M., Nishioji, K., Kobayashi, Y., Watanabe, Y., Itoh, Y., Okanoue, T., Murai, M., Matsushima, K., and Narumi, S. Liver-infiltrating T lymphocytes are attracted selectively by IFN-inducible protein-10, *Cytokine.* 12 : 299-308, 2000.

Tokuda, A., Itakura, M., Onai, N., Kimura, H., Kuriyama, T., and Matsushima, K. Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice, *J Immunol.* 164 : 2745-51, 2000.

Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., Koike, M., Inadera, H., and Matsushima, K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer [In Process Citation] *Clin Cancer Res.* 6 : 3282-9, 2000.

Vestergaard, C., Bang, K., Gesser, B., Yoneyama, H., Matsushima, K., and Larsen, C. G. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA + CCR4 + lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin, *J Invest Dermatol.* 115 : 640-6, 2000.

Vestergaard, C., Yoneyama, H., and Matsushima, K. The NC/Nga mouse : a model for atopic dermatitis, *Mol Med Today.* 6 : 209-10, 2000.

Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Shimizu, M., Takeda, S. I., Takasawa, K., Yoshimura, M., Kida, H., Kobayashi, K. I., Mukaida, N., Naito, T., Matsushima, K., and Yokoyama, H. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy, *Kidney Int.* 58 : 1492-9, 2000.

Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Shimizu, M., Kobayashi, K., Mukaida, N., Matsushima, K., and Yokoyama, H. A new anti-inflammatory

compound, FR167653, ameliorates crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats, *J Am Soc Nephrol.* 11 : 1534-41, 2000.

Yokoyama, A., Kohno, N., Ito, M., Abe, M., Hiwada, K., Yamada, H., Matsushima, K., and Hirai, K. Eotaxin levels in pleural effusions : comparison with monocyte chemoattractant protein-1 and IL-8 , *Intern Med.* 39 : 547-52, 2000.

Yoneyama, H., Kawasaki, S., and Matsushima, K. Regulation of Th 1 and Th2 immune responses by chemokines., *Springer Semin Immunopathol.* 22 : 329-44, 2000.

Nagai, S. Hashimoto, S.-i., Yamashita, T., Toyada, N., Satoh, T., Suzuki, T., and Matsushima, K. Comprehensive gene expression profile of human activated Th1- and Th2-polarized cells. *Int. Immunol.* 13 : 367-376, 2001

Itakura M, Tokuda A, Kimura H, Nagai S, Yoneyama H, Onai N, Ishikawa S, Kuriyama T, Matsushima K, Blockade of Secondary Lymphoid Tissue Chemokine Exacerbates Propionibacterium acnes-Induced Acute Lung Inflammation. *J Immunol.* 166 : 2071-2079, 2001

Kawasaki S, Takizawa H, Yoneyama H, Nakayama T, Fujisawa R, Izumizaki M, Imai T, Yoshie O, Homma I, Yamamoto K, Matsushima K, Intervention of Thymus and Activation-Regulated Chemokine Attenuates the Development of Allergic Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in Mice. *J Immunol* 166 : 2055-2062, 2001

Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H, Matsushima K, Regulation by Chemokines of Circulating Dendritic Cell Precursors, and the Formation of Portal Tract-associated Lymphoid Tissue, in a Granulomatous Liver Disease. *J Exp Med* 193 : 35-50, 2001