

「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IL-8、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) IL-8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

##### ケモカインの病態生理作用の確立

ウサギにおけるIL-8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）を通してIL-8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、IL-8を阻害することにより急性組織損傷を防止できることを明らかにした。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、モノクロタ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。現在ケモカインとそれらの受容体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展開されているが、私達のこれらの実験結果が研究開発の出発点になっている。

##### 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。他家により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-1a/MIP-1b/RANTESが作用することが報告された。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てケモカインによるTh1/Th2優位免疫反応制御を実証した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1 mg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-1a, Mig, IP10などによって遊走されたCCR5ならびにCXCR3発現INF-g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IL-4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を呼ぶ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。
- 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浸潤マクロファージ（樹状細胞）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阻害が観られた。
- c. 急性GVHD C57BL/6, H-2b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-1a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-1a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-1a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-g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MIP1aが関与する可能性を示唆した最初の仕事である。

## 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

胎仔肝ならびに骨髓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CD4CD8 double negative細胞、皮質double positive細胞、髄質CD4もしくはCD8single 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。

## 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。

## Macrophage, DC（樹状細胞）の分化機構の解析

マウスにおいてmyeloid DCの骨髓血球前駆細胞、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、骨髓前駆細胞から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た。また、それぞれのDCサブセットが発現するケモカイン受容体を明らかにし、in vitroでのケモカインに対する反応性を検討した。現在、CD8陽性lymphoid DCの培養系確立と、生体内におけるDC遊走を検討している。

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50,000tags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り、世界的注目を集めている。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。

## エンドトキシンショックの分子機構の解析

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。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

の同定を行った。また、IL-6  $-/-$  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した。さらに、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。

## 2) 生体工学グループ

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。現在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が最初の分子である。

## 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Shi, Q., X. Le, J.L. Abbruzzese, B. Wang, N. Mujaida, K. Matsushima, S. Huang, Q. Xiong, and K. Xie. 1999. Cooperation between transcription factor AP-1 and NF-kappaB in the induction of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma cells by hypoxia. *J Interferon Cytokine Res.* 19:1363-1371.
- Xu, L., K. Xie, N. Mukaida, K. Matsushima, and I.J. Fidler. 1999. Hypoxia-induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 59:5822-5829.
- Inadera, H., K. Egashira, M. Takemoto, Y. Ouchi, and K. Matsushima. 1999. Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging. *J Interferon Cytokine Res.* 19:1179-1182.
- Natsume, M., H. Tsuji, A. Harada, M. Akiyama, T. Yano, H. Ishikura, I. Nakanishi, K. Matsushima, S. Kaneko, and N. Mukaida. 1999. Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 66:601-608.
- Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani, and K. Matsushima. 1999. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest.* 104:1097-1105.
- Verma, M.J., N. Mukaida, U. Vollmer-Conna, K. Matsushima, A. Lloyd, and D. Wakefield. 1999. Endotoxin-induced uveitis is partially inhibited by anti-IL-8 antibody treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:2465-2470.

- Yamada, Y., H. Karasaki, K. Matsushima, G.H. Lee, and K. Ogawa. 1999. Expression of an IL-1 receptor antagonist during mouse hepatocarcinogenesis demonstrated by differential display analysis. *Lab Invest.* 79:1059-1067.
- Wada, T., K. Furuichi, C. Segawa-Takaeda, M. Shimizu, N. Sakai, S.I. Takeda, K. Takasawa, H. Kida, K.I. Kobayashi, N. Mukaida, Y. Ohmoto, K. Matsushima, and H. Yokoyama. 1999. MIP-1alpha and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56:995-1003.
- Asahi, K., H. Mizutani, M. Tanaka, M. Miura, K. Yamanaka, K. Matsushima, K. Nakashima, and M. Shimizu. 1999. Intradermal transfer of caspase-1 (CASP1) DNA into mouse dissects: role of CASP1 in interleukin-1beta associated skin inflammation and apoptotic cell death. *J Dermatol Sci.* 21:49-58.
- Sar, B., K. Oishi, K. Matsushima, and T. Nagatake. 1999. Induction of interleukin 8 (IL-8) production by *Pseudomonas* nitrite reductase in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Microbiol Immunol.* 43:409-417.
- Tadano, T., M. Namioka, O. Nakagawasai, K. Tan-No, K. Matsushima, Y. Endo, and K. Kisara. 1999. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. *Life Sci.* 65:255-261.
- Hashimoto, S., T. Suzuki, H.Y. Dong, S. Nagai, N. Yamazaki, and K. Matsushima. 1999. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 94:845-852.
- Hashimoto, S., T. Suzuki, H.Y. Dong, N. Yamazaki, and K. Matsushima. 1999. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood.* 94:837-844.
- Mori, N., K. Oishi, B. Sar, N. Mukaida, T. Nagatake, K. Matsushima, and N. Yamamoto. 1999. Essential role of transcription factor nuclear factor-kappaB in regulation of interleukin-8 gene expression by nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 67:3872-3878.
- Murai, M., H. Yoneyama, A. Harada, Z. Yi, C. Vestergaard, B. Guo, K. Suzuki, H. Asakura, and K. Matsushima. 1999. Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* 104:49-57.
- Kuno, K., Y. Terashima, and K. Matsushima. 1999. ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 274:18821-18826.
- Horiguchi, H., A. Harada, E. Oguma, M. Sato, Y. Homma, F. Kayama, M. Fukushima, and K. Matsushima. 2000. Cadmium-Induced Acute Hepatic Injury Is Exacerbated in

- Human Interleukin-8 Transgenic Mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 163:231-239.
- Murphy, P.M., M. Baggiolini, I.F. Charo, C.A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L.H. Miller, J.J. Oppenheim, and C.A. Power. 2000. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev.* 52:145-176.
- Yamashita, T., S. Hashimoto, S. Kaneko, S. Nagai, N. Toyoda, T. Suzuki, K. Kobayashi, and K. Matsushima. 2000. Comprehensive Gene Expression Profile of a Normal Human Liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 269:110-116.
- Lee, L.F., R.P. Hellendall, Y. Wang, J.S. Haskill, N. Mukaida, K. Matsushima, and J.P. Ting. 2000. IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer In vivo due to neutrophil infiltration. *J Immunol.* 164:2769-2775.
- Tokuda, A., M. Itakura, N. Onai, H. Kimura, T. Kuriyama, and K. Matsushima. 2000. Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Immunol.* 164:2745-2751.
- Usui, M., K. Egashira, H. Tomita, M. Koyanagi, M. Katoh, H. Shimokawa, M. Takeya, T. Yoshimura, K. Matsushima, and A. Takeshita. 2000. Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation.* 101:305-310.
- Matsugo, S., T. Kitagawa, S. Minami, Y. Esashi, Y. Oomura, S. Tokumaru, S. Kojo, K. Matsushima, and K. Sasaki. 2000. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett.* 278:105-108.
- Sar, B., K. Oishi, A. Wada, T. Hirayama, K. Matsushima, and T. Nagatake. 2000. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production by *Pseudomonas* nitrite reductase in human pulmonary type II epithelial-like cells. *Microb Pathog.* 28:17-23.
- Abe, S., H. Nakamura, S. Inoue, H. Takeda, H. Saito, S. Kato, N. Mukaida, K. Matsushima, and H. Tomoike. 2000. Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22:51-60.
- Inadera, H., T. Sekiya, T. Yoshimura, and K. Matsushima. 2000. Molecular analysis of the inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by estrogens and xenoestrogens in MCF-7 cells. *Endocrinology.* 141:50-59.
- Zhang, Y., Y. Wang, M. Ogata, S. Hashimoto, N. Onai, and K. Matsushima. 2000. Development of dendritic cells in vitro from murine fetal liver-derived lineage

phenotype-negative c-kit(+) hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 95:138-146.