

モカイン、およびケモカイン受容体の詳細な解析から、特定の免疫細胞の選択的浸潤機構がケモカインを中心として解明されつつある。

特に、キラー細胞は perforin/granzyme や Fas ligand などを介して、実際に組織の細胞を破壊する役割を担っているが、キラー細胞の特異的浸潤機構についてはほとんど明らかになっていない。我々は、正常ヒト末梢血において、ケモカイン受容体である CX3CR1 が NK 細胞、T 細胞のなかでも強いキラー活性を示すエフェクターキラー細胞に選択的に発現し、リガンドである fractalkine がこれらキラーリンパ球を選択的に遊走させることを明らかにしてきた。

進行性腎疾患における浸潤細胞の特性は、CX3CR1-fractalkine 系によって浸潤が制御される細胞の特徴と酷似している。したがって、進行性腎疾患の細胞浸潤における CX3CR1-fractalkine 系の役割を解明し、疾患のメカニズム解明や治療のターゲットとしての評価を行うことを目的として本研究を実施した。

## B. 研究方法

【キラーリンパ球でのケモカイン受容体の発現】ヒト末梢血は、インフォームドコンセントを得た正常人から採取した。末梢血は、正常人静脈から EDTA 採血によって採取し、ACK 溶液と 5 分間混合することで赤血球を溶解した。1,200 rpm で室温 5 分間遠心して、白血球を沈殿させ、FACS 溶液 (1% FCS、2% ヒト AB 型血清入り PBS) に懸濁した。白血球懸濁液に抗ヒト CX3CR1 モノクローナル抗体(2A9-1)を加

えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、FITC 標識抗ラット IgG (H+L)抗体 (セダレーン社製) を加えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、1%ラット血清入り FACS 溶液を加えて、氷上で 30 分間反応させることで、未反応の FITC 標識抗ラット IgG (H+L)抗体をブロッキングした後、さまざまな細胞表面マーカーや他のケモカイン受容体に対する直接蛍光標識抗体を組み合わせる加え、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、FACScalibur (ベクトンディッキンソン社製)を用いて測定した。

【抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体の作製】抗原は、ヒト fractalkine を C 末端に His タグを付加した融合蛋白としてバキュロウイルスを用いて昆虫細胞に発現させ、培養上清からキレートカラムにより精製したものをを用いた。抗原は TiterMax アジュバンドと混合した後、BALB/c マウスに免疫し、以降抗原のみで追加免疫を行った。血清中の抗体価は ELISA を用いて測定した。精製ヒト fractalkine を 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で PBS に溶解し、50  $\mu\text{l}$  ずつ 96-well ELISA プレートに固相化した。PBS/Tween-20 (PBS-T) で洗浄後、1% BSA/PBS でブロッキングを行った。抗血清は PBS-T で段階希釈をおこない、50  $\mu\text{l}$  ずつ加えて、室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PBS-T で 1000 倍希釈した HRP 標識 protein A (Zymed 社製) を 50  $\mu\text{l}$  ずつ加えて、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、TMBZ を用いて発色させ、抗体価を測定した。抗体価が上昇したマウスからリンパ球を分離し、リンパ球 : P3 ミエロー

マ細胞の比率が 5:1 になるように混合し、PEG (ペーリンガー社製) を用いて細胞融合を行った。ハイブリドーマは、RPMI-1640/10% FCS/HAT/10% Origen HCF (ISGN 社製) を用いて、96-well プレートで 1 週間培養した。そして、培養上清を用いて、上記と同様に ELISA を実施し、陽性ウェルを同定した。抗ヒト fractalkine 抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈を 2 回行い、クローニングを行った。モノクローナル抗体は、不完全フロイントアジュバントを投与した BALB/c マウスにハイブリドーマを接種して作製した腹水から、Proein A カラムを用いて精製した。

ヒト fractalkine 発現細胞は、ヒト fractalkine cDNA を pCAGGS ベクターに組み込んだものを、293 EBNA-1 細胞に liforectamine Plus を用いて transfection して作製した。

FACS による解析は、以下のように行った。ヒト fractalkine 発現細胞は PBS/EDTA 溶液で培養皿から回収し、FACS 溶液で洗浄後、抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体を加えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、FITC 標識抗マウス IgG (H+L) 抗体 (セダレーン社製) を加えて、氷上で 30 分間反応させた。FACS 溶液で 2 回洗浄した後、死細胞を識別するために PI を加え、FACScalibur (ベクトンディッキンソン社製) を用いて測定した。

免疫染色による解析は、以下のように行った。ヒト fractalkine 発現細胞は 1%ホルマリン/PBS ホルマリン溶液、あるいはアセトンで固定した。正常ロバ血清でブロッキングした後、抗 fractalkine 抗体を加え、

室温で 1 時間反応させた。洗浄後、Cy3 標識抗マウス IgG (H+L) 抗体 (ジャクソン社製) を加えて、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、50%グリセロール/PBS を用いて包埋し、蛍光顕微鏡で観察した。

【抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体の作製】ヒト CX3CR1 の C 末端のアミノ酸配列に基づいてペプチドを合成し (サワディー社製)、KLH とコンジュゲートを作製したものを抗原として用いた。抗原は完全フロイントアジュバントと混合した後、NZW ウサギに免疫し、以降抗原と不完全フロイントアジュバントを混合したもので追加免疫を行った。血清中の抗体価はペプチドを 1  $\mu$ g/ml になるように PBS に溶解したものを固相化して、ELISA を用いて測定した。抗体価が上昇したウサギから血清を採取し、ペプチドを共有結合させた CNBr カラムを用いて、抗ヒト CX3CR1 特異的抗体をアフィニティー精製した。免疫染色による解析は、ヒト CX3CR1 cDNA を発現させた、マウス L1.2 細胞と、Cy3 標識抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (ジャクソン社製) を用いて行った。

【抗マウス CX3CR1 モノクローナル抗体の作製】マウス CX3CR1 の N 末端のアミノ酸配列に基づいてペプチドを合成し (サワディー社製)、KLH とコンジュゲートを作製したものを抗原として用いた。TiterMax アジュバンドと混合した後、アルメニアハムスターに免疫し、以降抗原のみで追加免疫を行った。血清中の抗体価はペプチドを 1  $\mu$ g/ml になるように PBS に溶解したものを固相化して、ELISA を用いて測定した。ハイブリドーマの作製とクローニングは抗ヒト fractalkine モノクロー

ーナル抗体作製と同様に行った。精製抗体は、ヌードマウスを用いて腹水を作製し、protein A で精製した。FACS による解析は、マウス CX3CR1 cDNA を発現させた、マウス L1.2 細胞と、PE 標識抗ラット IgG (H+L)抗体 (セダレーン社製) を用いて行った。

【allo 脾臓細胞移植による CTL の誘導】  
C57BL/6 マウスの脾臓を無菌的に取りだし、口径 100  $\mu$ m のナイロンメッシュ上で脾臓をすり潰し、脾臓細胞を回収した。PBS で洗浄後、 $5 \times 10^7$  細胞を、BDF1 マウスに静注して、GVHD を誘導した。2~3 週間後に、脾臓・肝臓を取り出し、口径 70  $\mu$ m のナイロンメッシュ上で組織をすり潰し、細胞を回収した。脾臓の場合は、ACK 溶液と 5 分間混合することで赤血球を溶解して、FACS 解析に用いた。肝臓の場合は、Lympholyte-M (Sedarlane 社製) を用いた低速遠心により単核球細胞を分離した後、FACS 解析に用いた。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血は、カン研究所研究倫理委員会規定に従い、インフォームドコンセントを得た正常人から採取した。動物実験は、カン研究所動物実験委員会の指針に従い、承認を得た上で、実験動物に与える苦痛が最小になるように行った。

### C. 研究結果

【キラーリンパ球でのケモカイン受容体の発現】CX3CR1 の発現がキラーリンパ球特異的であることは、他のケモカイン受容体には見られない CX3CR1 に特徴的なことであるか否かを解析した。末梢血を、CX3CR1 と他のケモカイン受容体に対す

る抗体で 2 重染色して、CX3CR1 と他のケモカイン受容体との発現の相関関係を調べた。その結果、NK 細胞においては CX3CR1 の発現が大多数で認められるにも関わらず、CCR2, CCR5, CXCR3 の発現は大多数で認められなかった。 $\gamma \delta$ T 細胞においては、CCR5, CXCR3 は大多数で発現しており、CCR2 は大多数で発現していなかったが、CX3CR1 は一部の細胞のみで認められた。CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞では、CCR5 陽性細胞の一部で CX3CR1 の発現が認められ、CCR5 陰性細胞での CX3CR1 の発現はごく一部であり、また、CX3CR1 陽性細胞は大多数が CCR2 と CXCR3 を発現していなかった。したがって、CX3CR1 の発現は他のケモカイン受容体と異なる特徴を有し、CX3CR1 の発現のみがキラーリンパ球特異的であると明らかとなった。

【抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体の作製】組替えヒト fractalkine を BALB/c マウスに免疫して、ハイブリドーマを作製し、最終的に FACS 可能な 3 クローン (2B02-8, 6D01-1, 7F06-10) について解析を行った。得られた精製抗体を用いて、ヒト fractalkine 発現 293 EBNA-1 細胞の免疫染色を行ったところ、パラフォルムアルデヒド固定とアセトン固定共に、明瞭な染色像を得ることができた。3 クローンの中では、7F06-10 が最も染色強度が強かった。したがって、ヒト検体での組織染色に応用可能な抗体が得られたと考えられる。

【抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体の作製】抗ヒト CX3CR1 モノクローナル抗体は、FACS では特異的に CX3CR1 を検出可能であるが、免疫染色では明瞭な染色

像を得ることができない。そこで、免疫染色可能な抗体の作製を試みた。ヒト CX3CR1 の細胞内領域に存在する C 末端領域に対するペプチド抗体をウサギに免疫して作製し、ペプチドを用いたアフィニティー精製で、精製抗体を得た。得られた精製抗体を用いて、ヒト CX3CR1 発現マウス L1.2 細胞の免疫染色を行ったところ、明瞭な染色像を得ることができた。したがって、ヒト検体での組織染色に応用可能な抗体が得られたと考えられる。

【抗マウス CX3CR1 モノクローナル抗体の作製】進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となる。ところが、CX3CR1 の発現は、ヒトとマウスでは異なり、マウスではリンパ球には CX3CR1 が発現していないとの報告がある。ヒト末梢血の解析結果から、マウスにおいても CX3CR1 はエフェクターキラー細胞で発現していることが推定されるが、SPF 環境下で飼育されたマウスでは、エフェクターキラー細胞の存在が希であるために、マウスでは CX3CR1 の発現がリンパ球に認められないのではないかと考えた。そこで、FACS を用いてマウス CX3CR1 の発現を解析するために、モノクローナル抗体の作製を試みた。マウス CX3CR1 の細胞外領域に存在する N 末端領域のペプチドをアルメニアハムスターに免疫して、ハイブリドーマを作製し、FACS 可能なクローンが 1 クローン(L2D11-7)が得られた。

【マウスリンパ球での CX3CR1 の発現】allo 脾臓細胞移植により *in vivo* で CTL を誘導した場合の、キラーリンパ球上での CX3CR1 の発現の検討を行った。マウス

CX3CR1 に対するモノクローナル抗体を用いて、FACS で解析を行った結果、SPF 環境下の BDF1 マウスでは、脾臓、肝臓のいずれにおいても、CX3CR1 の発現はほとんど認められなかった。ところが、C57BL/6 マウスの脾臓細胞を静注して GVHD を誘導した BDF1 マウスの脾臓、肝臓に存在する T 細胞には CX3CR1 の発現が確認された。これら CX3CR1 発現 T 細胞の多くは、移植した細胞由来の CD8 陽性 T 細胞であった。したがって、マウスにおいても、CX3CR1 はエフェクターキラー細胞に発現していると考えられる。

#### D. 考察

ケモカイン受容体 CX3CR1 は、キラーリンパ球と単球に特異的なケモカイン受容体であり、他のケモカイン受容体 CCR5 などには見られない発現様式を示していることが明らかとなった。したがって、進行性腎疾患における細胞浸潤には、CX3CR1-fractalkine 系の働きが関与している可能性がさらに濃厚となった。

ヒト検体における研究のためには、組織染色可能な抗体が必要である。本研究で得られた抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体と抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体は、生検試料の免疫染色や ELISA を用いた尿中 fractalkine の濃度測定などに応用することが可能である。これらは、進行性腎障害における CX3CR1-fractalkine 系の関与を検索するための有効な手段となり得る。

本研究で得られた成果を臨床検体に応用することで、進行性腎障害の疾患のメカニズム解明に貢献できると考えられる。

一方で、進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となる。本研究により、マウスにおいてもヒトと同様に、CX3CR1は、エフェクターキラーリンパ球に発現していることが示唆された。したがって、CX3CR1-fractalkine系の腎疾患における役割を、マウスをモデル動物として用いて解析・治療実験を実施することは妥当であると考えられる。そこで現在、治療実験を実施するために必要な、マウス fractalkine、マウス CX3CR1 に対する中和抗体の作製を試みている。

#### E. 結論

正常人リンパ球においては、CX3CR1のみがキラー細胞に選択的に発現していることを確認した。組織染色可能な抗ヒト fractalkine モノクローナル抗体、抗ヒト CX3CR1 ポリクローナル抗体を作製した。マウス CX3CR1 に対するモノクローナル抗体を作製して解析し、マウスにおいても CX3CR1 がエフェクターキラー細胞に発現していることが示唆された。

本研究において得られた抗体と新たな知見は、ヒトおよびマウスにおける進行性腎障害の疾患メカニズムの解明と治療のターゲットとしての評価を CX3CR1-fractalkine 系で実施するために有効である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) 今井俊夫 (2001/3/15) “ケモカイン受容体” 別冊・医学のあゆみ 7回膜貫通型受容体研究の新展開, 医歯薬出版: 90-95.
- (2) 今井俊夫, 梅原久範 (2001/2/1) “フラクタルカインによる細胞遊走機構” 免疫・*Immunology Frontier* 11(1): 30-35.
- (3) 今井俊夫 (2000/11/20) “CX3CR1” ケモカインハンドブック, 秀潤社: 215-219.
- (4) 今井俊夫 (2000/11/20) “fractalkine” ケモカインハンドブック, 秀潤社:142-145.
- (5) 今井俊夫 (2000/4/22) “細胞接着、細胞浸潤とケモカイン” *細胞工学* 19(5): 717-722.
- (6) Goda, S., T. Imai, O. Yoshie, O. Yoneda, H. Inoue, Y. Nagano, T. Okazaki, H. Imai, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000/4/15). “CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms.” *J Immunol* 164(8): 4313-4320.
- (7) Yoneda, O., T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000/4/15). “Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells.” *J Immunol* 164(8): 4055-4062.

##### 2. 学会発表

- (1) 第 30 回 日本免疫学会 シンポジウム (仙台): Lymphocyte subsets and chemokine receptors: Toshio Imai,

Osamu Yoshie

(2) 第 30 回 日本免疫学会 (仙台) : エフェクターキラーリンパ球に選択的に発現する Fractalkine レセプター : 西村美由希、米田 修、梅原久範、堂前尚親、今井俊夫、義江 修

(3) 第 30 回 日本免疫学会 (仙台) : 単球と血管内皮細胞との接着における接着性ケモカイン, fractalkine の機能 : 梅原久範、合田征司、米田 修、井上 博、今井俊夫、義江 修、今井久夫、堂前尚親

(4) 第 30 回 日本免疫学会 (仙台) : Fractalkine による NK 細胞の活性化と IFN- $\gamma$  産生能 : 米田 修、合田征司、井上 博、今井俊夫、義江 修、今井久夫、梅原久範、堂前尚親

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 名取泰博

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Z. L. Ou, Yu. Natori, Y. Natori	Transient and sequential expression of chemokine mRNA in glomeruli in puromycin aminonucleoside nephrosis.	Nephron	85(3)	254-257	2000
Z. L. Ou, K. Nakagawa, Yu. Natori, N. Doi, T. Saito, Y. Natori	Effective methylprednisolone dose in experimental crescentic glomerulonephritis.	Am. J. Kidney Dis.	37	411-417	2001

分担研究者 堀田修

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hotta O, Yusa N, Ooyama M, Unno K, Furuta T, Taguma Y	Detection of urinary macrophages expressing the CD16 (Fc $\gamma$ RIII) molecule: a novel marker of acute inflammatory glomerular injury.	Kidney Int.	55	1927-1934	1999
Hotta O, Furuta T, Chiba S, Yusa N, Taguma Y	Immunosuppressive effect of deoxyspergualin in proliferative glomerulonephritis.	Am. J. Kidney Dis.	34	894-901	1999
Hotta O, Yusa N, Kitamura H, Taguma Y	Urinary macrophages as activity markers of renal injury.	Clinical Chemica. Acta.		123-133	2000

分担研究者 齋藤喬雄

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
大高徹也、有馬淳、 佐藤寿伸、佐藤博、 齋藤喬雄	IgA 腎症における糸球体メサンギウム細胞の形質転換について	東北大学 医療短期 大学部紀要	9巻 2号	137-144	2000

Soma J, Ootaka T, Aato H, Ito S, Saito T	Tubulointerstitial change are less important in membranoproliferative Glomerulonephritis than in IgA nephropathy.	Nephron	86(2)	230-231	2000
--	---	---------	-------	---------	------

分担研究者 今井俊夫

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yoneda O, Imai T, Goda H, Inoue A, Yamauchi T, Okazaki T, Imai H, Yoshie O, E. T. Bloom, Domae N, Umehara H	Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells	J. Immunol.	164(8)	4055-4062	2000
Goda H, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, E. T. Bloom, Domae N, Umehara H	CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and independent mechanisms	J. Immunol.	164(8)	4314-4320	2000
今井俊夫	ケモカイン受容体	別冊 医学の あゆみ		90-95	2001
今井俊夫 梅原久範	フラクタルカインによる細胞遊走機構	免疫 Immun. Frontier	11 巻 1 号	30-35	2001
今井俊夫	細胞接着、細胞浸潤とケモカイン	細胞工学	19 巻 5 号	717-722	2000

著者氏名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	ページ	出版年
今井俊夫	CX3CR1	ケモカインハンドブック	秀潤社	215-219	2000
今井俊夫	fractalkine	ケモカインハンドブック	秀潤社	142-145	2000