

Thesis

健常人末梢血単核球における $\alpha E\beta 7$ (CD103)分子の発現に関する研究

臨床医学研究系 内科学 リウマチ・膠原病内科学

飯塚 篤

背景と目的: $\alpha E\beta 7$ (CD103)は、E-カドヘリンとの接着を介して上皮組織障害に深く関与する可能性が指摘されている。CD103は、末梢血単核球細胞(PBMCs)においては数%しか発現されないが、*in vitro*ではphytohaemagglutinin(PHA)とTransforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)の共刺激下で高発現する。しかし、ヒトPBMCsのCD103発現におけるPHA並びにTGF- β_1 の役割に関しては不明な部分が多い。本研究では、健常人のPBMCsを用いて、CD103発現条件を検討し、PHA並びにTGF- β_1 の役割に関する解析を行った。

方法: 健常人PBMCsと、磁気ビーズ添加抗体を用いて分離した各サブセットを各刺激条件で6日間培養し、CD103の発現をフローサイトメーターで解析した。CD103発現誘導に関するシグナル伝達経路の解析は、Smad2/3, Smad4, Smad7, TGF- β 受容体I, TGF- α 受容体II, P-Smad2の各抗体を用いて、免疫プロットによる蛋白発現で検討した。CD103⁺細胞の機能的分子の変化は、CD178, パーフォリン, グランザイムB, FOXP3, CD95, CTLA-4の各抗体で多重染色し、フローサイトメーターで解析した。

結果: CD103の発現誘導の刺激条件と細胞サブセット: CD103はPHAとTGF- β_1 の共刺激で $45.92 \pm 3.83\%$ に発現誘導され、そのサブセットはCD8⁺T細胞で $44.16 \pm 8.50\%$ と高発現を認めた。またCD45RO⁺細胞とCD45RA⁺細胞の各サブセットでの検討では、CD45RA⁺細胞で $54.57 \pm 7.88\%$ と高発現を認めた。CD14⁺単球添加条件での検討では、CD45RA⁺CD8⁺T細胞ではCD14⁺単球の添加により $43.61 \pm 2.94\%$ と高発現を示した。また、トランスウェルプレートによるCD14⁺単球との分離培養条件における検討では、CD45RA⁺CD4⁺T細胞, CD45RA⁺CD8⁺T細胞ともにCD103の発現は低下した。

CD103発現誘導に関与するシグナル伝達経路: PHA添加でTGF- β 受容体およびSmad2/3の蛋白発現が増加し、さらにTGF- β_1 との共刺激では、Smad2のリン酸化が認められた。また、PHAとTGF- β_1 の共刺激条件に加えて、TGF- β RIキナーゼ阻害剤であるSD208を添加した結果、CD103発現は有意に抑制され($3.78 \pm 0.88\%$) ($p < 0.05$)、Smad2のリン酸化は阻害された。

CD103発現誘導に伴う各種機能的分子の変化: CD178, パーフォリン, グランザイムB, FOXP3の発現はほとんど認めなかった。一方、CD95, CTLA-4は発現を認めた。

結論: CD103はPHAとTGF- β_1 の共刺激により増強され、CD14⁺単球の存在のもと主としてCD45RA⁺CD8⁺T細胞との直接的細胞接触によってCD8⁺T細胞に発現されていた。その作用はTGF- β_1 /Smad依存性シグナル伝達経路を介しており、PHAはTGF- β 受容体の発現を介してCD103の発現を増強させることが示唆された。

緒言

インテグリンファミリーである $\alpha E\beta 7$ (CD103)は αE と $\beta 7$ のヘテロダイマーであり、腸管上皮間リンパ球(IEL)の90-95%と腸粘膜固有層リンパ球(LPL)の40%以上に発現される。一方、末梢血単核球細胞(PBMCs)や胸腺内の成熟過程のTリンパ球においては数%しか

発現されない¹⁾。また最近では、樹状細胞(Dendritic Cell: DC)においてもCD103の発現が認められ、腸管における炎症性T細胞と制御性T細胞の間のバランスに影響を及ぼし、さらにはCD103の発現が制御性T細胞の一部に発現していると報告され、その発現誘導機構や機能発現に注目が集まっている²⁻⁴⁾。CD103は上皮細胞に存在するE-カドヘリンを唯一のリガンドとし、その接着を介して上皮組織障害に深く関与している可

能性が指摘されている^{1,5)}。実際、シェーグレン症候群や炎症性腸疾患、炎症性気道疾患、尋常性乾癬皮膚、慢性GVHDモデルマウスの肺病変などでCD103陽性Tリンパ球の発現が報告されている⁶⁻¹⁰⁾。このためCD103は上皮障害を伴う免疫疾患において重要な役割を担っていると考えられる。CD103の発現については、研究の蓄積によりマイトジェンもしくはアロ抗原刺激条件に加えて、サイトカインであるTransforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) 刺激により著明な発現を認めることが明らかとなった¹¹⁾。TGF- β は多面的特徴を有するが、とりわけ、強力な抗炎症作用を示すサイトカインで、TGF- β_1 機能欠損マウスでは生後から高度の炎症性病変を全身性に生じる¹²⁾。TGF- β_1 はリンパ球を含む多くの細胞から分泌され、免疫系細胞の分化、増殖の調節にも関与している¹³⁾。TGF- β 受容体I (TGF- β RI)とTGF- β 受容体II (TGF- β RII)のヘテロ複合体に結合すると受容体はリン酸化され、そのシグナルは、リン酸化受容体と会合するSmad(R-Smad), Smad2, Smad3を介し、Smad4と複合体を形成したのち、核内に移行し標的遺伝子に作用する¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし、ヒト単核球のCD103発現におけるphytohaemagglutinin (PHA)ならびにTGF- β の役割に関しては、不明な部分が多かった。本研究では、健康人のCD103の発現誘導の分子メカニズムを明らかにするために、PBMCsを用いて、より詳細な細胞レベルでのCD103発現条件を検討し、PHAならびにTGF- β_1 の役割に関する解析を行った。

方法

末梢血単核球とその細胞サブセットの分離:

埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会にて承認された同意説明文書にて同意を得た健康人のへパリン添加末梢血をphosphate buffered saline(PBS)で1:1の比率で希釈した後、Ficoll-paque PLUS(GE Healthcare, USA)の上層に充填、400 gで20分間遠心しPBMCsを回収した。回収後にIO TEST3(Beckman coulter, USA)にて溶血したのちPBSで3回洗浄した。PBMCsは磁気マイクロビーズを用いたMagnetic cell sorting (MACS: Miltenyl Biotec, USA)の手順にそって、各サブセットに分離した。MACS buffer(PBS base 0.5% BSA+2 mM EDTA)で調整された各細胞サンプルに、磁気マイクロビーズが添加された anti-human CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CD14 monoclonal antibodies (mAbs)(Miltenyl Biotec)の各抗体を加え、混和したのち4℃で15分間暗所にインキュベート、その後MACS LDカラム(Miltenyl Biotec)を用いて分離した。

CD45RA⁺CD4⁺T細胞とCD45RA⁺CD8⁺T細胞の各T細胞サブセットは其々のIsolation Kit(Miltenyl Biotec)を用いて分離した。すべてのサブセットはフローサイトメーターでの解析により、90%以上の純度であるこ

とを確認した。

細胞培養:

PBMCsと各サブセットは培養液中(RPMI 1640+10%非働化FBS+2 mM L-glutamine)で 5×10^5 cells/mlの濃度に調整したのち、24-well flat bottom tissue culture trays(Corning Life Sciences, USA)に各1 ml/ウェルの容量で37℃, 5%CO₂濃度のインキュベーターで各刺激条件下に培養した。

CD45RA⁺CD4⁺T細胞もしくはCD45RA⁺CD8⁺T細胞とCD14⁺単核球のサブセットには24-well transplate (Corning Life Sciences Inc)を使用し、細胞分離下での培養も行った。CD103誘導実験では、TGF- β_1 とPHA (M form;GIBCO, USA)を添加して培養した。

シグナル伝達経路の検討のためTGF- α リキナーゼ阻害剤であるSD208 (2-(5-Chloro-2-fluorophenyl)-4-[(4-pyridyl) amino]pteridine:TOCRIS bioscience, USA)をdimethyl sulfoxide(DMS)にて溶解し使用した(1 μ g/ml)。また、CD103の発現に対するサイトカインの影響を検討するため、anti-human interleukin 13(IL-13) mAb(clone 32116, R&D systems, USA)とアイソタイプコントロールとしてMouse IgG₁ mAb(R&D systems)を使用した。

フローサイトメーターを用いた解析:

細胞表面、細胞内多重染色のためfluorescein isothiocyanate (FITC), Red-phycoerythrin (R-PE), phycoerythrin-cyanin 5.1(PC5), ECDの蛍光色素を使用した。細胞表面抗原の染色にはanti-human CD4 mAb (clone 13B8.2), CD8 mAb (clone B9.11), CD103 mAb (clone 2G5), CD45RA mAb (clone ALB11), CD45RO mAb (clone UCHL1), (Beckman Coulter, USA), CD95 mAb (Fas, clone DX 2, Becton Dickinson, USA), CD178 mAb (Fas Ligand, clone NOK-1), Perforin mAb (clone δ G9) (BD Pharmingen, USA)の各抗体を、サンプルに10 μ lずつ混和し暗所にて4℃で30分間インキュベートした。細胞内染色については表面抗原の染色後にintracellular staining buffer set (eBioscience, USA)を用いて細胞の固定と細胞膜透過処理を行ったのち anti-human FOXP3 mAb (forkhead box P3) (clone PCH101, eBioscience), CD152 mAb (cytolytic T-lymphocyte-associated antigen 4:CTLA4, clone BN13, Beckman Coulter), Granzyme B mAb (clone GB 11, BD Pharmingen)の各抗体をサンプルに10 μ lずつ混和し、暗所にて4℃で30分間インキュベートした。最後にPBSで洗浄した後、FACS Calibur system (BD Biosciences, USA)を用いて測定し、CELLQUEST software (BD Biosciences)を用いて解析を行った。

免疫プロットによる解析:

1%TXN (25 mM Tris-HCl+100 mM NaCl+1% TX-100)に対して1/100 volのphosphatase inhibitor cocktail 2 (PhIC2, Sigma, USA), 1/200 volのprotease

inhibitor cocktail(PIC, Sigma) を混合した溶液で溶解した各条件培養後の細胞を, Micro BCA protein assay reagent kit(Pierce, USA) を用いて蛋白定量を測定, 調整を行った。

細胞溶解液は $4 \times$ SDS-loading buffer と 2-Mercaptoethanol(2-ME, Sigma) と混合した後 95°C で 5 分間加熱処理し, 5%~15% の 12 well real gel plate に充填し電気泳動後 Immobilon-P メンブレン(Millipore, USA) にトランスファーした。

メンブレンは BlockAce Powder 4 g(DS Biomedical, Japan) で 4°C 12 時間ブロッキングした後, 以下の各一次抗体にて室温で 60 分間インキュベートした。primary Abs: smad2/3(clone 18/smad2/3; BD Biosciences), phospho-smad2(P-smad2, clone Ser465/467, 138D4, Cell signaling Technology, USA), Smad4(clone B-8), TGF- β RI (clone H-100), TGF- β RII (clone MM16), (Santa cruz Biotech, USA)。

メンブレンを洗浄したのちに HRP 結合二次抗体を加え, 室温で 60 分間インキュベートし, 最終的に ECL system (Amersham Biosciences, USA) を用いて発色, LAS-1000(Fuji film, Japan) を用いて解析した。

サイトカインの測定:

IL-4, IL-6, IL-13, TGF- β_1 は ELISA を用いて測定した。実際には, 96 well plate(Corning Life Sciences) に anti-human capture mAbs として purified mouse anti-human IL-4 mAb(clone 8D4-8), purified rat anti-human IL-6 mAb(clone MQ2-13A5), purified Rat anti-human IL-13 mAb(clone JES10-5A2), purified rat anti-human TGF- β_1 mAb(clone A75-2) (BD pharmingen) を添加し, 4°C で 12 時間もしくは 37°C で 2 時間インキュベートした。block Ace にて 37°C で 2 時間ブロッ

キングの後, wash buffer(0.5% Tween 20/PBS) で 3 回洗浄した。陽性コントロールとして希釈したサイトカインと, 培養上清を各ウェルに加え 37°C で 2 時間インキュベートした。wash buffer で 3 回洗浄した後, biotinated detection mAbs を乗せて室温で 1 時間インキュベートし, wash buffer で 3 回洗浄, Streptavidin-HRP(BD pharmingen) で室温 30 分間インキュベートした後 wash buffer で 4 回洗浄, TMB-ONE solution (Promega, USA) を加え室温で 10 分間インキュベートした。最後に 1 mol/L HCL で反応停止, 吸光度 450 nm で Multiskan EX(Thermo scientific, USA) plate reader にて測定し, Ascent Software(Thermo scientific) にて解析した。結果は中央値 $\pm$ SD で表記した。

統計解析:

統計的有意差は paired two-tailed Student t test にて検討し, $p < 0.05$ で有意差ありとした。

結果

PBMCs における CD103 の発現誘導の条件:

PBMCs における CD103 の発現誘導の条件を検討するため, 無刺激, TGF- β_1 (2.5 ng/ml) 単独, PHA(1/100 vol) 単独, PHA(1/100 vol) と TGF- β_1 (2.5 ng/ml) の共刺激の四つの条件にて 6 日間培養した。その結果, CD103 は PHA 刺激後 $11.25 \pm 4.44\%$ に, PHA と TGF- β_1 共刺激で $45.92 \pm 3.83\%$ に発現誘導された(図 1)。また図には示していないが, CD103 は刺激後 3 日目から発現が誘導され, 4 日目にはプラトーに達し, 7 日目まで維持された。さらに TGF- β_1 の濃度条件を検討するため PHA(1/100 vol) と, 0 ng/ml, 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml の各濃度の TGF- β_1 にて刺激培養した結果, 0.01 ng/ml の TGF- β_1 で CD103 の発

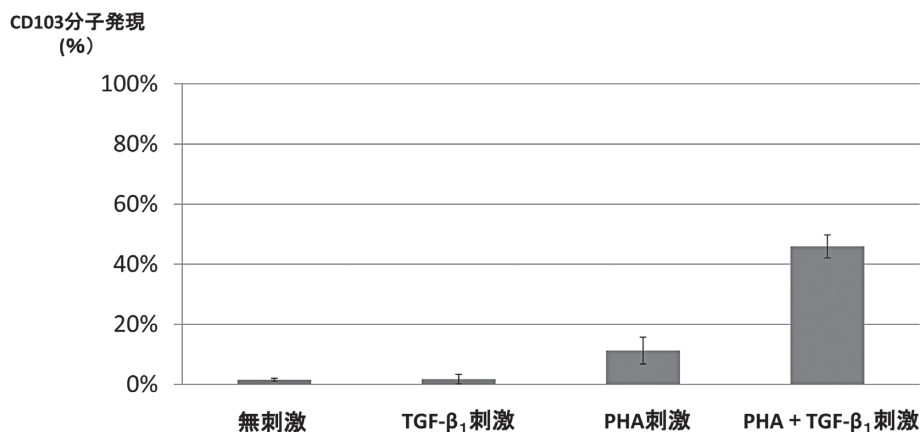


図 1. CD103 発現条件の検討。末梢血から分離した PBMCs は 24-well plate を用いて 5×10^5 個/ml/ウェルに調整したのち, 無刺激, TGF- β_1 (2.5 ng/ml) 刺激, PHA (1/100 vol) 刺激, PHA (1/100 vol) + TGF- β_1 (2.5 ng/ml) 共刺激に分け培養した。(培養液: RPMI 1640 + 10% 非働化 FBS + 2 mM L-glutamine) 37°C , 5% CO_2 濃度のインキュベーターにて 6 日間刺激培養後, 回収した細胞を抗 CD103 抗体にて染色し, フローサイトメーターで発現の解析を行った。解析の結果, CD103 は PHA 刺激で $11.25 \pm 4.44\%$ に, PHA と TGF- β_1 共刺激で $45.92 \pm 3.83\%$ に発現誘導を認めた。

現増強を認め($24.10 \pm 1.13\%$), さらには 0.1 ng/ml 以上でプラトーに達した($45.78 \pm 3.52\%$).

CD103が発現される細胞サブセット:

上記の結果からPHA($1/100 \text{ vol}$)とTGF- β_1 (2.5 ng/ml)の共刺激下にてCD103が発現される細胞サブセットについて検討した. PBMCsの中で, CD103が発現される細胞サブセットは, CD8⁺T細胞で $44.16 \pm 8.50\%$, CD4⁺T細胞で $19.98 \pm 4.47\%$ と, CD8⁺T細胞により多い発現を認めた(図2). 次に, 各細胞サブセットを分離後, 同様の条件でCD103の発現誘導を行ったところ, CD45RO⁺細胞では $2.71 \pm 3.83\%$ であったのに対し,

CD45RA⁺細胞では $54.57 \pm 7.88\%$ と高値で, CD103はCD45RA⁺細胞に選択的に発現誘導された(図3). さらにCD45RA⁺CD4⁺T細胞あるいはCD45RA⁺CD8⁺T細胞を分離後, CD14⁺単球を添加してCD103の発現を検討したところ, いずれも単球の非存在化ではCD103の発現誘導は僅かで, CD14⁺単球を添加することにより発現が増加した. CD45RA⁺CD4⁺T細胞ではCD14⁺単球の添加によってCD103の発現は $11.92 \pm 0.76\%$ に留まったのに対して, CD45RA⁺CD8⁺T細胞では $43.61 \pm 2.94\%$ と高発現を示した(図4a, b). また, 単球添加によるCD103発現効果が, 単球との直接接触が必要か否

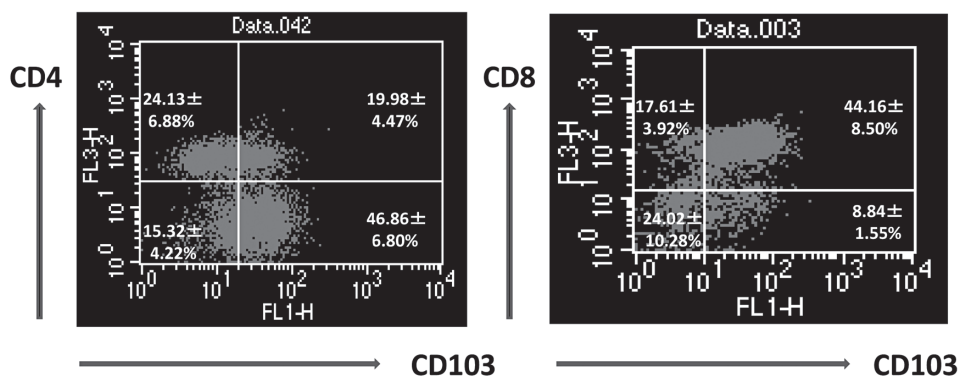


図2. フローサイトメーターを用いたCD103発現時のCD4/CD8細胞サブセット解析. 末梢血から分離したPBMCsは24-well plateを用いて 5×10^5 個/ml/wellに調整したのち, PHA($1/100 \text{ vol}$)とTGF- β_1 (2.5 ng/ml)で共刺激し, 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 濃度のインキュベーターにて培養した(培養液: RPMI 1640+ 10% 非働化FBS+ 2 mM L-glutamine). 6日間の刺激培養後に回収した細胞を, 抗CD103抗体と抗CD4抗体, 抗CD103抗体と抗CD8抗体で其々二重染色し, フローサイトメーターにて発現の解析を行った. 解析の結果ではPBMCsの中で, CD103が発現される細胞サブセットは, CD8⁺T細胞で $44.16 \pm 8.50\%$, CD4⁺T細胞で $19.98 \pm 4.47\%$ とCD8⁺T細胞により多い発現を認めた.

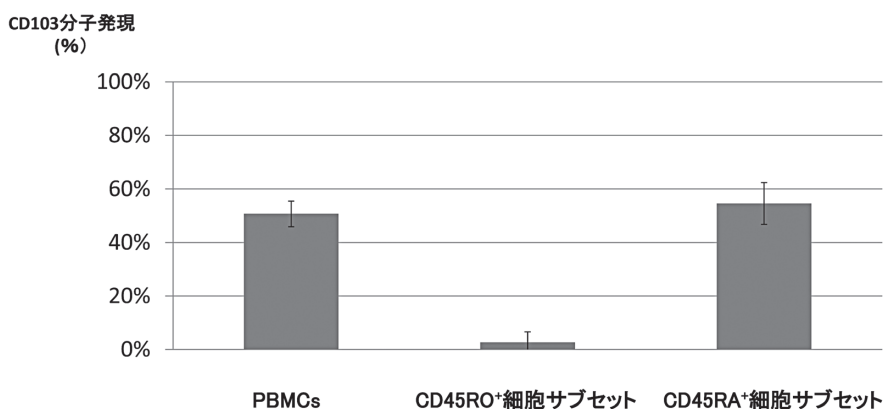


図3. CD45RO⁺細胞サブセットとCD45RA⁺細胞サブセットの各培養におけるCD103発現の検討. 末梢血から分離したPBMCsを, 磁気マイクロビーズでCD45RO⁺細胞とCD45RA⁺細胞の各サブセットに分離した後, 24-well plateを用いて 5×10^5 個/ml/ウェルに調整した. PHA($1/100 \text{ vol}$)+TGF- β_1 (2.5 ng/ml)共刺激下で 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 濃度のインキュベーターにて6日間刺激培養した(培養液: RPMI 1640+ 10% 非働化FBS+ 2 mM L-glutamine). 回収した細胞を抗CD103抗体にて染色し, フローサイトメーターで発現の解析を行った. 解析の結果, CD103発現はCD45RO⁺細胞サブセットでは $2.71 \pm 3.83\%$, CD45RA⁺細胞サブセットでは $54.57 \pm 7.88\%$ であった.

かを検討するため、トランスウェルプレートを用いて分離培養を行ってCD103の発現を検討した。図5に示すように、トランスプレートによってCD14⁺単球を分離培養することによって、CD45RA⁺CD4⁺T細胞、CD45RA⁺CD8⁺T細胞ともに、CD103発現は有意に低下し、CD103誘導には単球の直接的細胞—細胞接触が必要と考えられた。

CD103発現誘導に関与するシグナル伝達経路:

CD103発現誘導に必要なPHAおよびTGF- β_1 の役割を検討した。TGF- β_1 シグナル伝達が必須と考え、PHAによってその受容体発現が誘導される可能性に

ついて検討したところ、図6に示すように、PHA添加でTGF- β RおよびSmad2/3の蛋白発現が増加し、これにTGF- β を加える事によってSmad2のリン酸化が惹起されることが明らかとなった。つぎに、TGF- β RIキナーゼ阻害剤であるSD208(1 μ g/ml)を添加しCD103の発現誘導について検討した結果(図7)、CD103発現はSD208によって有意に抑制された($3.78 \pm 0.88\%$) ($p < 0.05$)。免疫ブロット解析によって、Smad2/3、TGF- β RI、TGF- β RIIの蛋白発現は変化しないものの、Smad2のリン酸化は完全に阻害され、SD208の作用は、チロシンキナーゼ活性阻害作用を介したもので

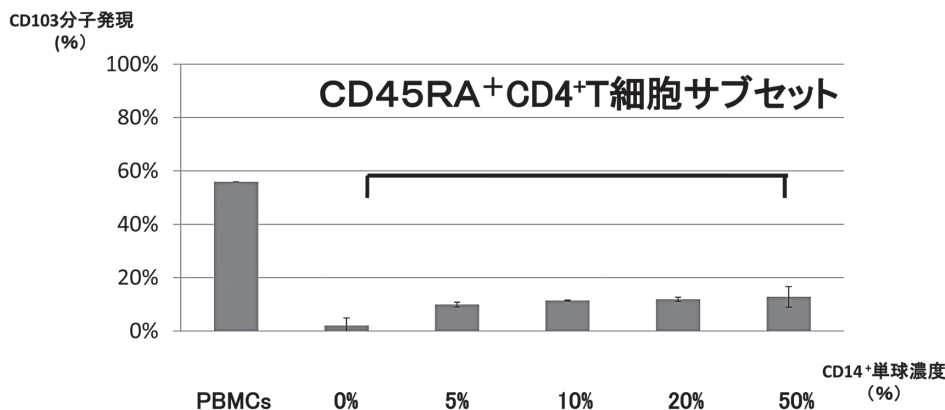


図4 a. CD45RA⁺CD4⁺T細胞サブセットとCD45RA⁺CD4⁺T細胞+CD14⁺細胞サブセットの各培養におけるCD103発現の検討。末梢血から分離したPBMCsを、磁気マイクロビーズでCD45RA⁺CD4⁺T細胞単独とCD45RA⁺CD4⁺T細胞+CD14⁺単球の各サブセットに分離した後、24-well plateを用いて 5×10^5 個/ml/ウェルに調整した。PHA (1/100 vol)+TGF- β_1 (2.5 ng/ml)共刺激下で37℃, 5%CO₂濃度のインキュベーターにて6日間刺激培養した。(培養液:RPMI 1640+10%非働化FBS+2 mM L-glutamine)CD14⁺単球は各設定濃度で添加した。回収した細胞を抗CD103抗体にて染色し、フローサイトメーターで発現の解析を行った。CD45RA⁺CD4⁺T細胞サブセットは、CD14⁺単球(20%)の添加によりCD103発現は $11.92 \pm 0.76\%$ であった。

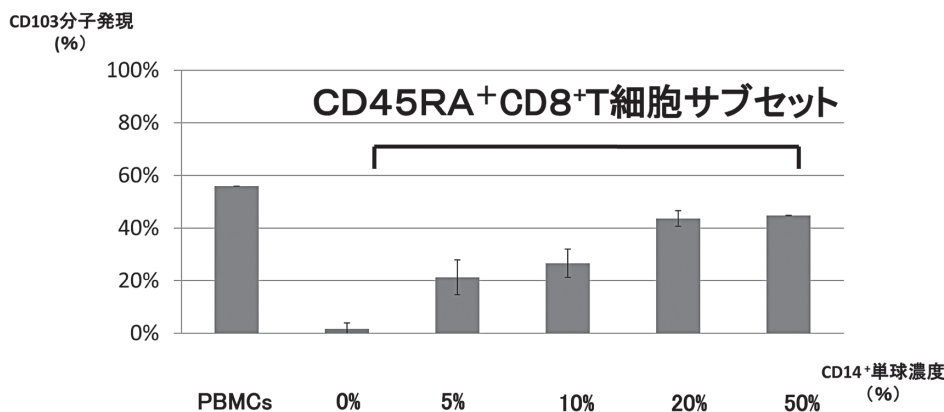


図4 b. CD45RA⁺CD8⁺T細胞サブセットとCD45RA⁺CD8⁺T細胞+CD14⁺細胞サブセットの各培養におけるCD103発現の検討。末梢血から分離したPBMCsを、磁気マイクロビーズを用いてCD45RA⁺CD8⁺T細胞単独とCD45RA⁺CD8⁺T細胞+CD14⁺単球の各サブセットに分離した後、24-well plateを用いて 5×10^5 個/ml/ウェルに調整した。PHA (1/100 vol)+TGF- β_1 (2.5 ng/ml)共刺激下で37℃, 5%CO₂濃度のインキュベーターにて6日間刺激培養した。(培養液:RPMI 1640+10%非働化FBS+2 mM L-glutamine)CD14⁺単球は各設定濃度で添加した。回収した細胞を抗CD103抗体にて染色し、フローサイトメーターで発現の解析を行った。CD45RA⁺CD8⁺T細胞サブセットは、CD14⁺単球(20%)の添加によりCD103発現は $43.61 \pm 2.94\%$ と高発現を示した。

あることが示された(図8).

CD103発現誘導に伴う各種機能的分子の変化:

CD4⁺CD103⁺細胞とCD8⁺CD103⁺細胞の各種機能的分子の変化を検討するために、フローサイトメーターで解析を行った. 図には示していないがCD178, パーフォリン, グランザイムBの発現および制御性細胞機能のマーカーであるFOXP3の発現はほとんど認められなかった. 一方, CD95は, CD4⁺CD103⁺細胞で19.53±7.87%, CD8⁺CD103⁺細胞では26.69±8.87%, CTLA-4はCD4⁺CD103⁺細胞で48.41±15.47%, CD8⁺

CD103⁺細胞では64.65±8.40%に陽性となった.

考察

本研究では健康人末梢血単核球におけるCD103発現条件の検討を行った. 最近の研究では, CD103の発現誘導にマイトジェンや, 特異的抗原刺激, さらにTGF- β_1 が必要であると報告されている^{1,11)}.

CD103発現はPHAの刺激により増加し, TGF- β_1 との共刺激によりさらに著明に増強された. CD103は, 主としてCD8⁺T細胞に選択的に発現されていたが, そ

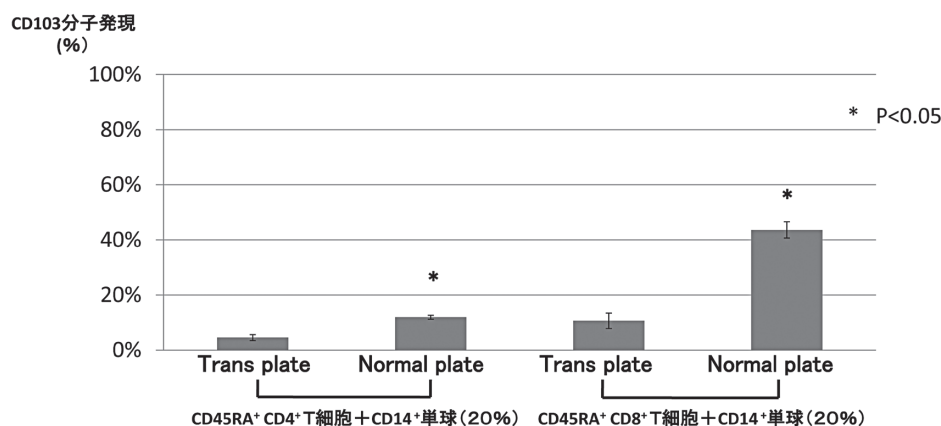


図5. Trans plateを用いたCD45RA⁺CD8⁺T細胞, CD45RA⁺CD4⁺T細胞と, CD14⁺単球の同ウェル内分離培養でのCD103発現の検討. 末梢血から分離したPBMCsを, 磁気マイクロビーズでCD45RA⁺CD8⁺T細胞, CD45RA⁺CD4⁺T細胞の各サブセット, CD14⁺単球サブセットに分離後, トランスプレートを用いて同ウェル内でCD14⁺単球を分離し, PHA(1/100 vol)+TGF- β_1 (2.5 ng/ml)共刺激下で37°C, 5%CO₂インキュベーターにて6日間刺激培養した(培養液: RPMI 1640+10%非働化FBS+2 mM L-glutamine). 回収した細胞を抗CD103抗体にて染色し, フローサイトメーターにて発現の解析を行った. CD4⁺T細胞, CD8⁺T細胞ともに, CD103発現は有意な低下を認めた.

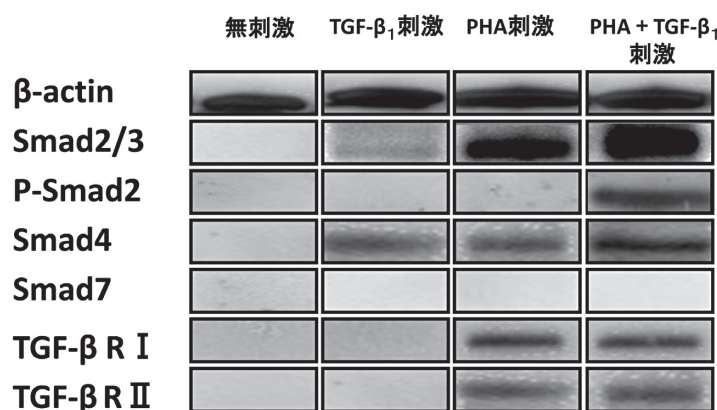


図6. ウェスタンブロッティング法によるTGF- β /Smad依存性シグナル伝達解析. 末梢血から分離したPBMCsを, 5x10⁵個/ml/ウェルに調整した後, 24-well plateで無刺激, TGF- β_1 (2.5 ng/ml)刺激, PHA(1/100 vol)刺激, PHA(1/100 vol)+TGF- β_1 (2.5 ng/ml)共刺激に分け37°C, 5%CO₂インキュベーターにて6日間刺激培養した. (培養液: RPMI 1640+10%非働化FBS+2 mM L-glutamine) 回収した細胞を溶解し, 蛋白定量測定, 調整した後ウェスタンブロッティング法を用いて蛋白発現の解析を行った. 解析の結果, TGF- β_1 の有無にかかわらずPHA刺激の添加でSmad2/3, TGF- β RI, TGF- β RIIとも蛋白発現が認められた. 一方, リン酸化Smad2はPHA+TGF- β_1 共刺激でのみ発現が認められた.

の誘導に必要な細胞成分を検討したところ、 $CD14^+$ 単球が必須で、 $CD45RA^+CD4^+$ T細胞に比して $CD45RA^+CD8^+$ T細胞により多くCD103が発現されていた。 $CD14^+$ 単球と $CD45RA^+$ T細胞の間に細胞—細胞接着が必要か否かトランスウェルプレートを用いて検討したところ、トランスウェルプレートによってCD103発現が有意に低下したことから、 $CD14^+$ 単球が直接的に $CD45RA^+$ T細胞と接着しCD103の発現を誘導するものと考えられた。この成績は、図には示していないが、PHA刺激によって培養上清中にはIL-13、IL-6が増加す

るものの、これらの中和抗体の添加ではCD103の発現は抑制されず、トランスウェルを通過するこれらサイトカイン以外の要因が関与するという結果も上記仮説を支持する。

一方CD103発現増強因子である $TGF-\beta_1$ は、 $TGF-\beta$ スーパーファミリーのポリペプチドメンバーであり細胞の成長、分化、増殖、アポトーシスの調節を含む多くの細胞機能に関与する分泌蛋白でCD103の発現を増強させる¹²⁾。

そのメカニズムとして、ある報告では、 $TGF-\beta_1$ が

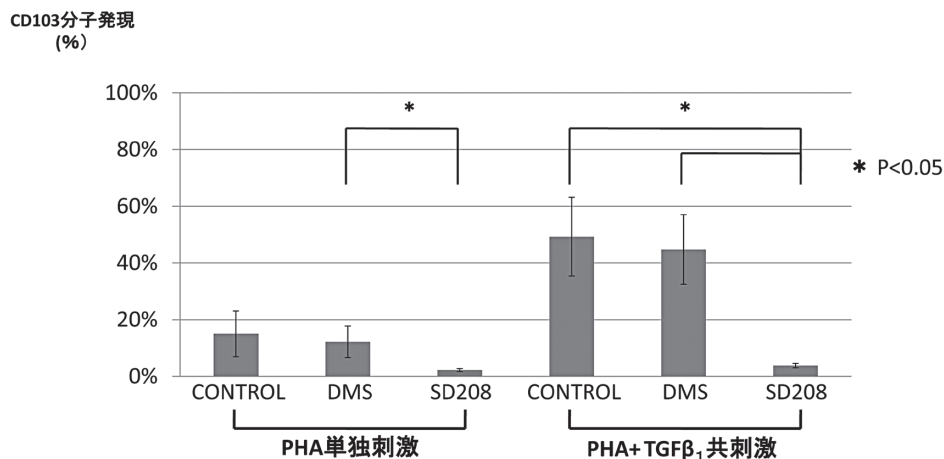


図 7. PHA 単独刺激, PHA+ $TGF-\beta_1$ 共刺激下における DMS, SD208 添加条件での CD103 発現条件の検討. 末梢血から分離した PBMCs を, PHA (1/100 vol) 単独, PHA (1/100 vol) + $TGF-\beta_1$ (2.5 ng/ml) 共刺激条件に加えて, DMS (1/100 vol), SD208 (1 μ g/ml) をそれぞれ添加し 37°C, 5% CO_2 インキュベーターにて 6 日間刺激培養した (培養液: RPMI 1640 + 10% 非働化 FBS + 2 mM L-glutamine). 回収した細胞を抗 CD103 抗体にて染色し, フローサイトメーターにて発現の解析を行った. 解析の結果, PHA + $TGF-\beta_1$ 共刺激下では SD208 の添加により有意に CD103 の発現が抑制された ($3.78 \pm 0.88\%$).

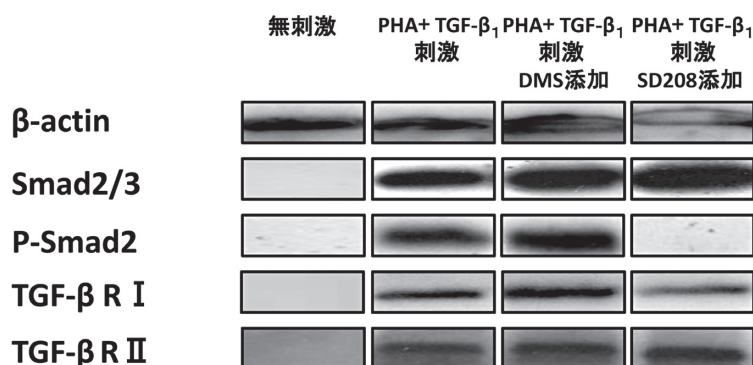


図 8. ウェスタンブロッティング法による SD208 ($TGF-\beta$ R I キナーゼ阻害剤) 添加条件での $TGF-\beta$ /Smad 依存性シグナル伝達解析. 末梢血から分離した PBMCs を, 5×10^5 個/ml/ウェルに調整した後, 24-well plate を用いて PHA (1/100 vol) + $TGF-\beta_1$ (2.5 ng/ml) 共刺激に加え, DMS と SD208 (1 μ g/ml) をそれぞれ添加した条件下で 37°C, 5% CO_2 インキュベーターにて 6 日間刺激培養した. (培養液: RPMI 1640 + 10% 非働化 FBS + 2 mM L-glutamine) 回収した細胞を溶解し, 蛋白定量測定, 調整した後ウェスタンブロッティング法を用いて蛋白発現の解析を行った. 解析の結果, DMS と SD208 のいずれの添加条件でも $TGF-\beta$ R I, $TGF-\beta$ R II の蛋白発現が認められた. 一方, リン酸化 Smad2 は SD208 添加条件では認められなかった.

直接 α E遺伝子の転写に影響している可能性をrun-on法とノーザンブロット法で解析し、TGF- β_1 は30分以内に α Eの転写を誘導すること、 β 7インテグリン遺伝子のプロモーター領域はTGF- β 反応エレメントを有している事が報告されている¹⁷⁾。またTGF- β シグナル伝達経路において協調作用する転写因子Runx3はCD103の発現に関与している¹⁸⁾。これらのことから、TGF- β_1 は転写レベルでCD103の発現誘導に関与しているものと考えられる。TGF- β のシグナル伝達経路にはSmad依存性とSmad非依存性の二つが存在する^{19,20)}。Smad依存性の経路においては、細胞表面上のTGF- β RIとRIIの二つのレセプターのヘテロの複合体に作用してSmad2やSmad3のリン酸化を引き起こしSmad4と複合体を形成した後細胞核内に移行し、標的遺伝子に作用する^{15,16,20)}。一方のSmad非依存性経路においても、TGF- β はextracellular signal-regulated kinases(ERKs), c-Jun N-terminal kinases(JNKs), P38-MAPKなどを含めた様々なmitogen activated protein kinases(MAPK)を介して、Smadの転写活性に促進的あるいは抑制的に作用する²¹⁾。

この研究において、Smad複合体はPHA単独によっても蛋白発現を認めたが、Smadのリン酸化には、PHAとTGF- β_1 の両者が必要であった。PHAはTGF- β R発現を誘導したことから、添加したTGF- β_1 がPHAによって発現誘導された受容体に結合しSmadをリン酸化し、CD103の発現に至ったと考えられた。実際、TGF- β RIキナーゼ阻害剤のSD208^{21,22)}添加によってCD103の発現が抑制されたことから、Smad依存性の経路を介してCD103が誘導されることが確認された。一方、PHAは内因性のTGF- β_1 を分泌促進し、それにより部分的にCD103の発現を増強させた可能性も否定できない。実際に、SLEの上皮障害合併例ではPHAのみでCD103の高発現が認められていることから、TGF- β_1 の産生能が高い病態においては、受容体発現のみの刺激によってCD103発現が誘導されうると考えられる²³⁾。

興味深い事に、肺線維症や慢性気管支喘息、強皮症などの上皮組織障害に対しSD208による治療効果が報告されている^{24,25)}。この効果が、単に線維化に対する直接的な効果のみならず、T細胞のCD103誘導による上皮障害を介した可能性についても今後検討する必要がある。

CD103は単量体E-カドヘリン上にある末梢(EC1)領域ドメインに対するヘテロな接着を介して、リンパ球を上皮組織に結合させる^{26,27)}。CD103の接着機能については、これまでの多くの報告で、リンパ球の組織への極在と維持における重要な役割を担っていると考えられている。実際に、CD103の α Eノックアウトマウスでは、IELの減少を認めることや、また脳腫瘍への細胞障害性T細胞の接着の低下を認めるなど、いずれも

リンパ球の組織への極在と維持の働きを示唆している^{28,29)}。一方で、 α Eノックアウトマウスでは皮膚の炎症性疾患を自然発症する報告もある³⁰⁾。さらにCD103⁺T細胞の機能に関しては、これまでに制御性と細胞障害性のそれぞれについて報告されている^{2,6,8-10,31)}。

CD103発現誘導に伴う各種機能的分子の変化について、CD178, パーフォリン, グランザイムB, FOXP3の発現はほとんど認められなかった。一方でCD95, CTLA-4は発現を認めた。今後正常と疾患でこれらの機能的分子の発現にどのような違いがあるか、その違いはどのようなメカニズムを介しているのかを、検討する必要がある。

結論

今回我々は健常人末梢血単核球におけるCD103の発現誘導の条件について検討した。CD103はPHAとTGF- β_1 の共刺激により増強され、CD14⁺単球の存在のもと主としてCD45RA⁺CD8⁺T細胞との直接的細胞接触によってCD8⁺T細胞に発現されていた。

同時に、発現細胞数は少ないものの一部のCD45RA⁺CD4⁺T細胞にも発現誘導された。その作用はTGF- β_1 /Smad依存性シグナル伝達経路を介しており、PHAはSmad2/3とTGF- β Rの発現を介してCD103の発現を増強させることが示唆された。今後これらの健常人の解析を基に、CD103の関与が示唆される上皮細胞性組織障害の病態解明の手掛かりとし、さらなる研究を進めていきたい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました埼玉医科大学総合医療センター客員教授 竹内勤先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Kilshaw PJ. Alpha E beta 7. *Mol. Pathol.* 1999;52(4):203-7.
- 2) Annacker O, Coombs JL, Maimstorm V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med.* 2005;202(8):1051-61.
- 3) Allakhverdi Z, Fitzpatrick D, Boisvert A, Baba N, Bouguermouh S, Sarfati M, et al. Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(6):1342-9.
- 4) del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Förster R. Development and functional specialization of CD103⁺ dendritic cells. *Immunological Reviews* 2010;234:268-81.
- 5) Agace WW, Higgins JM, Sadasivan B, Brenner MB, Parker CM. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions:

- integrin α (E)(CD103) β (7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(5):563-8.
- 6) Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, Saito K, Tsuzaka K, Abe T, et al. Preferential localization of CD8⁺ α E β 7⁺ T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 1999;163(4):2226-35.
 - 7) Teraki Y, Shiohara T. Preferential expression of α E β 7 integrin (CD103) on CD8⁺T cells in the psoriatic epidermis: regulation by interleukins 4 and 12 and transforming growth factor- β . *Br J Dermatol.* 2002;147(6):1118-26.
 - 8) Ho J, Kurtz CC, Naganuma M, Ernst PB, Cominelli F, Rivera-Nieves J. A CD8⁺/CD103^{high} T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol.* 2008;180(4):2573-80.
 - 9) Al-Hamidi A, Pekalski M, Robertson H, Ali S, Kirby JA. Renal allograft rejection: the contribution of chemokines to the adhesion and retention of α E(CD103) β 7 integrin-expressing intratubular T cells. *Mol Immunol.* 2008;45(15):4000-7.
 - 10) Zhou S, Ueta H, Xu XD, Shi C, Matsuno K. Predominant donor CD103⁺CD8⁺T cell infiltration into the gut epithelium during acute GVHD: a role of gut lymph nodes. *Int Immunol.* 2008;20(3):385-94.
 - 11) Brew R, West DC, Burthem J, Christmas SE. Expression of the human mucosal lymphocyte antigen, HML-1, by T cells activated with mitogen or specific antigen in vitro. *Scand J Immunol.* 1995;41(6):553-62.
 - 12) Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(1):46-53.
 - 13) Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- γ . *Nat Immunol.* 2005;6(6):600-7.
 - 14) Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000;103(2):295-309.
 - 15) Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf- β signaling through smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:659-93.
 - 16) Savage-Dunn C. TGF- β signaling. *WormBook.* 2005;9:1-12.
 - 17) Robinson PW, Green SJ, Carter C, Coadwell J, Kilshaw PJ. Studies on transcriptional regulation of the mucosal T-cell integrin α E β 7 (CD103). *Immunology.* 2001;103(2):146-54.
 - 18) Woolf E, Brenner O, Goldenberg D, Levanon D, Groner Y. Runx3 regulates dendritic epidermal T cell development. *Developmental Biology.* 2007;303:703-14.
 - 19) Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature.* 2003;425(6958):577-84.
 - 20) Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. TGF β signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):329-37.
 - 21) Leung SY, Niimi A, Noble A, Oates T, Williams AS, Medicherla S, et al. Effect of transforming growth factor- β receptor type I kinase inhibitor 2,4-disubstituted pteridine (SD-208) in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *JPET* 2006;319:586-94.
 - 22) Kapoun AM, Gaspar NJ, Wang Y, Damm D, Liu YW, O'young G, et al. Transforming growth factor- β receptor type I (TGF β RI) kinase activity but not p38 activation is required for TGF β RI-induced myofibroblast differentiation and profibrotic gene expression. *Mol Pharmacol.* 2006;70(2):518-31.
 - 23) Pang M, Abe T, Fujihara T, Mori S, Tsuzaka K, Amano K, et al. α E β 7, a novel integrin adhesion molecule is upregulated on T cells from SLE patients with specific epithelial involvement. *Arthritis Rheum* 1998;41:1456-63.
 - 24) Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, Weiler M, Ma JY, Almirez R, et al. SD-208, a novel transforming growth factor β receptor I kinase inhibitor, inhibit growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vivo. *Cancer Research* 2004;64:7954-61.
 - 25) Chen Y, Shi-wen X, Eastwood M, Black CM, Denton CP, Leask A, et al. Contribution of activin receptor-like kinase 5 (transforming growth factor β receptor type I) signaling to the fibrotic phenotype of scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1309-16.
 - 26) Corps EM, Robertson A, Dauncey MJ, Kilshaw PJ. Role of the α domain in ligand binding by integrin α E β 7. *Eur J Immunol.* 2003;33(9):2599-608.
 - 27) Shiraishi K, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Kumazawa C, Nozaki K, Abe T, et al. Critical role of the fifth domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with α E β 7, but not for homophilic adhesion. *J Immunol.* 2005;175(2):1014-21.
 - 28) Schön MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, et al. Mucosal T

- lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin α_E (CD103)-deficient mice. *J Immunol.* 1999;162:6641-9.
- 29) Masson F, Calzascia T, Di Berardino-Besson W, de Tribolet N, Dietrich PY, Walker PR. Brain microenvironment promotes the final functional maturation of tumor-specific effector CD8⁺T cells. *J.Immunol.* 2007;179:845-53.
- 30) Schön MP, Schön M, Warren HB, Donohue JP, Parker CM. Cutaneous inflammatory disorder in integrin α_E (CD103)-deficient mice. *J.Immunol.* 2000;165:6583-9.
- 31) Rodrigues OR, Marques C, Soares-Clemente M, Ferronha MH, Santos-Gomes GM. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology.* 2009;214(2):101-11.