JAM-Bノックアウトマウスにおける白血球浸潤

坂口 武久

Leukocyte Transmigration in JAM-B Disrupted Mice

Takehisa Sakaguchi (Division of Developmental Biology, Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical School, 1397-1, Yamane, Hidaka, Saitama 350-1241, Japan)

Junctional Adhesion Molecule (JAM)-B is known as one of the members of the immunoglobulin super family and is involved in formation of tight junction of many types of cells including epithelial and endothelial cells. It has recently been demonstrated that, in response to inflammation, JAM-B present on the surface of endothelial cell forms heterophilic interactions with JAM-C on the leukocyte during transmigration from blood vessels into affected tissues. The formation of JAM-B – JAM-C complex strongly suggests that this heterophilic interaction plays an important role in the transmigration of the leukocytes. To address this question, I generated mice lacking JAM-B. Subsequently, I examined leukocyte transmigration in JAM-B–/– mice by Contact Hyper Sensitivity (CHS) model using oxazolone as sensitizing agent and thioglycollate-induced peritonitis model. From these analyses, I found that levels of leukocyte transmigration in JAM-B–/– mice were similar to those of wild-type mice. Thus, our results established that the gene is dispensable for this event.

Keywords: JAM-B, Transmigration, Gene Targeting, Leukocyte, Endothelial Cell

J Saitama Med School 2006;33:1-10

(Received November 11, 2005)

緒言

血管中を流れる白血球が炎症性の刺激に直面したと き, 白血球は炎症部位に浸潤していく. 炎症部位への 白血球の浸潤は、強固に結合した内皮細胞間の結合に 打ち勝って起こるが、このとき白血球および血管内皮 細胞の膜表面に発現している複数の分子間の相互作用 が関与している¹⁾.炎症が生じるとその刺激が血管内 皮細胞を活性化し、内皮細胞の膜上に接着分子を発現 する.血液中を流れる白血球が炎症部位に到達するま でのステップは以下のようである.最初に、血液中を 流れる白血球は炎症による刺激に応答して膜上にセ レクチンを発現し、炎症部位近接の血管壁上に沿って 転回 (rolling)する²⁻⁵⁾.次に,ケモカインにより白血球 上のインテグリンファミリーの1つである lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1が多く作られ, LFA-1と血管内皮細胞上に発現している接着分子 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1との相互作用 を介して, 白血球は血管壁上に強固に結合 (Triggering and Tight Adhesion) する⁶⁻⁹. 最後に,結合した白血球 は血管内皮細胞の間を通過(Transmigration)し浸潤

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター発生・分化・再生部門 〔平成 17 年 11 月 11 日 受付〕 が完了する.上述のごとく,rollingおよびtriggering and tight adhesionに関しては多くの研究がなされて おり,様々な膜タンパクおよびケモカインが関与して いることが明らかとなっている.このように,Transmigrationにおいては,白血球が内皮細胞間を押し分け るようにして通過するというのが一般的な概念となっ ているが,白血球と内皮細胞との分子レベルでの相互 作用に関しては解明されていない点が多い.

これまでの研究で、白血球のTransmigrationにおい て、イムノグロブリンスーパーファミリー (IgSF)の 1つである Platelet-Endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 が重要な働きを示すことが明らかにさ れている¹⁰⁻¹⁵. PECAM-1は白血球および血管内皮細 胞表面に発現しており、*in vitro*の系においてTransmigrationの際に、ホモフィリックに結合することが 示されている. 実際に、抗体によるPECAM-1のブロッ キングの実験では、白血球の浸潤が最大で90%近く 減少した. しかしながら、ノックアウトマウスを用い た解析から、PECAM-1が無くても炎症部位への白血 球の浸潤が観察され、野生型マウスと比較しても大 きな差異が無いことが示された¹³⁾. すなわち、これら の結果はPECAM-1が白血球浸潤の過程にかかわる唯 一の分子ではないことを示している. このため、白血 球の浸潤に関与する血管内皮細胞および白血球上に 発現しているPECAM-1以外の分子を同定するための 研究が精力的になされた. その結果, CD99, Vascular Endothelial (VE)-カドヘリン¹⁶⁻¹⁸⁾,そしてIgSFである Junctional Adhesion Molecule (JAM) - A, - B, - Cがクロー ニングされ¹⁹⁻²³⁾,それぞれが白血球と血管内皮細胞間 で相互作用し, 浸潤の過程において重要な役割を担う ことが明らかとなった. CD99は白血球および血管内 皮細胞上の両方に発現し、ホモフィリックな結合をし ていることが明らかになっている. CD99を抗体でブ ロッキングすると、モノサイトの浸潤が10%にまで減 少することが知られている¹⁶⁾. さらに, CD99に対す る抗体のみならず、PECAM-1間のホモフィリックな 相互作用も抗体でブロッキングすると、モノサイトの 浸潤が完全に抑制されることが明らかとなった¹⁶. ま た, VE-カドヘリンは内皮細胞の側面に局在し, 内皮 細胞同士でホモフィリックな結合をしている. しかし ながら、白血球浸潤の過程においてはその発現量は減 少することが知られている¹⁸⁾. このことは,内皮細胞 の強固な結合を緩くすることで、白血球が浸潤するこ とをサポートしているものと考えられる.

一方で、JAM-Aは血管内皮細胞、上皮細胞および 血球系細胞の一部を除くほとんどの細胞の表面に発 現しており、炎症性の刺激によって発現量が変化する LFA-1やPECAM-1とは異なり、その発現は血管内皮細 胞上の側面に恒常的に見られる. さらに, TNF-αまた はIFN-yのような炎症起因性のサイトカインが分泌さ れると、JAM-Aは内皮細胞の側面から頂上側に移動す る. そして白血球,特にモノサイト上に発現している LFA-1とヘテロフィリックに結合してモノサイトの浸 潤が行われることが示されている^{24,25)}.しかしながら, JAM-Aはその他の細胞間での接着ではホモフィリッ クにも結合することが明らかにされているので¹⁹,こ のJAM-A-LFA-1の結合が浸潤過程に特異的なもの なのか、あるいは内皮細胞と白血球細胞との結合以外 でも見られるのかは、現在までの時点ではわかってい ない. JAM-Aとは対照的に, JAM-BおよびJAM-Cの 発現に関しては特定の細胞に限局している. JAM-Bの 発現は、血管内皮細胞およびリンパ節に見られるHigh Endothelial Venule (HEV)²³⁾に限局されており,白血 球の浸潤およびリンパ球のホーミングに関与している ことが示唆されている. JAM-Cは、血管内皮細胞お よび活性型白血球上、特に活性型T細胞上に発現して いる. そして白血球の浸潤の際に, JAM-BとJAM-C とのヘテロフィリックな結合が関与していることが 実験的に示されている²¹⁾. さらに他の研究において, JAM-Bは炎症部位にある血管周辺に高く発現している ことが示され、CD56⁺CD3⁺NKT細胞、CD56⁺CD3⁺CD8⁺ 溶解性T細胞, CD56⁺NK細胞と結合することが明ら かにされている²⁷⁾. これらの細胞表面上では、JAM-C

は発現しているが、JAM-Bは発現していない.また *in vitro*の系において、JAM-Bがこれらの細胞の表面 にあるJAM-Cを介して結合することが示されている. 従って、これらの結果から、炎症部位においてJAM-B の発現量が増加することで、白血球をリクルートしや すい環境を整えていると考えられている.

上述のように、白血球のTransmigrationにおける過 程は、非常に多くの分子が関与し、未だ解明されてい ない点が多い.本稿においては、白血球の浸潤過程に おけるJAM-Bの機能を調べるために、JAM-Bノック アウトマウスを作製し解析した. そして, まずContact Hyper Sensitivityによる炎症誘導モデル実験を行い,浸 潤したT細胞を解析した²⁸⁾. すなわちoxazolonを塗布 した耳介の腫れの程度を野生型並びにJAM-Bノック アウトマウスの間で比較した.かつ耳介の切片を作製 し、H&E染色による浸潤細胞の検出および抗体によ る免疫染色を行った. さらに, thioglycollateによる顆 粒球およびモノサイトなどの滲出細胞をFACSを用い て解析した.本稿で得られた研究結果は、JAM-B遺伝 子が炎症刺激に応答した白血球浸潤に関与しているこ とを否定しないまでも、このタンパク質が無くともこ の現象に大きな支障を与えないことを明らかにした.

方法および材料

JAM-B ノックアウトマウス作製

ターゲティングベクター構築のため、まずJAM-B 遺伝子座をカバーする2種類の重複したゲノムクロー ンを³²PラベルしたJAM-B cDNAをプローブとした C57BL/6ラムダファージゲノムDNAライブラリーの スクリーニングによりクローン化した. それぞれのゲ ノムクローンを制限酵素HindIIIとEcoRIで消化する と, 9.2 kbと5.6 kbのDNA断片が得られるので, それ ぞれを5'側と3'側の相同領域とした. さらにJAM-B遺 伝子座のエキソン3からエキソン5をIRES β-geoを用 いて置換することにより, ポジティブ選択マーカー として用いた³⁰⁾. また, ネガティブ選択としては, ジ フテリアトキシン (DT)-Aを用いた³¹⁾. これらのDNA 断片は5'相同領域, IRES β-geo, 3'相同領域, DT-A の順番でpBR322ヘクローニングした(Fig. 1参照). 100 µgのターゲティングベクターを制限酵素NotIで 消化することにより直鎖状にし、TT2 ES細胞にエ レクトロポレーションにより導入した. そしてこの ES細胞はLeukemia Inhibitory Factor (LIF)を含む標 準的なES細胞用培養液にG418 (300 µg/ml)を添加し て培養した.1週間後に顕微鏡下で薬剤耐性コロニー をピックアップし、それらのコロニーを24ウェルプ レートに移し、それらの細胞がコンフルエントにな るまで培養した.それぞれのクローンに関して、半分 を細胞ストック用に,残り半分を,相同組換えをサザ ンハイブリダイゼーションおよびPCRでジェノタイ

プを確認するためのゲノムDNA調製用とした. 組換 えを確認後、得られた相同組換え体ES細胞を桑実胚 に注入し、偽妊娠ICRマウスの子宮へ戻すことにより キメラマウスを得た.キメラマウスとC57BL/6野生 型マウスとを交配しヘテロを得た後、ヘテロマウス 同士を交配することによりホモ体を得た. 産まれたマ ウスの遺伝子型は、尾部よりゲノムDNAを調製しサ ザンハイブリダイゼーションおよびPCRにより決定 した. 10 µgのゲノムDNAをEcoRI, SphI, EcoRVの それぞれの制限酵素で消化し、1%アガロースゲル電 気泳動で展開した後,ナイロン膜に転写し,³²Pでラ ベルしたJAM-B遺伝子の5'領域,3'領域,並びにNeo プローブとハイブリダイズすることにより、本来の JAM-B遺伝子座並びに相同組換えを起こした遺伝子 座の制限酵素地図から期待されるDNA断片を検出し た. PCRによるジェノタイプは、マーカー遺伝子で置 換する領域に相当するJAM-Bゲノム上とIRES β-geo 内にプライマーを設計した. その配列は以下のとおり である. JAM-Bゲノム領域のプライマー; 5'-CAGG TGCCTGAATTGATAGCTGCTGCAGAACCC-3'および 5'-CAGCCAGAGCAGAAAGCTTGCTGATCAC-3', IRES β-geo内のプライマー; 5'-GAACTGCAGGAC GAGGCAGCGCGGC-3'および5'-TATGAATTCCGA AGCCCAACCTTTCATAG-3'である. それぞれのプラ イマーペアはPCRにおいてそれぞれ550 bpおよび700 bpのサイズを増幅する. これら4種類のプライマーを 同時に混合し、1µgのゲノムDNAをテンプレートと してPCRを行った. 反応は94℃で2分間変成後, 94℃ 30秒, 55℃ 30秒, 72℃ 30秒を1サイクルとし, 合計30 サイクル反応させた. 最後に72℃ 10分間の伸長反応を 付加した.

Contact Hyper Sensitivity

最終濃度が2%になるように4-ethoxymethylene-2oxazolin-5-one(oxazolon)をアセトン:オリーブオイル= 4:1の溶液に溶かした.野生型マウスおよびJAM-B-/-マ ウスの腹部を剃毛し, 100 µlの2% oxazolon溶液を腹 部に塗布した (day 0).また,アセトン:オリーブオイ ル溶液のみを塗布したマウスをコントロールとした. day6にマウスの左耳の両面に10 µlずつ0.5% oxazolon 溶液を塗布した.右耳はコントロールとして溶媒のみ を塗布した.oxazolonを耳に塗布してから24時間後, 耳介の腫れをダイアルシックネスゲージ (Mitsutoyo) を用いて測定した³².

免疫染色

マウスを安楽死させた後,耳介を切除し4%パラフォルムアルデヒドで1昼夜かけて固定した.その後, 30%スクロース/PBS溶液で1昼夜浸し,OCTコンパウンドに包埋した.その後,クリオスタット(Leica)により,20 µmの厚さで耳介の切片を作製した.免疫染色は1次抗体としてCD3,Gr-1,2次抗体として,抗 マウスIgG-Alexa594 (Invitrogen)を使用した.

Thioglycollateによる腹膜炎誘導

8-12週齢の野生型およびJAM-B-/-マウスの腹腔 へ1 mlの4% thioglycollateメディウムを注射した.24 時間後,マウスを安楽死させてから腹腔内に10 mlの RPMI1640メディウムを注入し軽くマッサージしてか ら細胞(白血球)懸濁液を回収した.得られた白血球懸 濁液をFACSキャリバー(Becton Dickinson)を用いて 解析した.

FACS

Thioglycollateによる炎症誘導で腹腔内に浸潤した 白血球の懸濁液300 µlを500 x gで1分間遠心後,50 µl のStaining Medium (SM;3% FCS,0.05% NaN₃)に懸 濁し,氷上で30分間インキュベートした.次に,希釈 したFc blockerを50 µl加え,さらに氷上で30分間イン キュベートした.続いて適当な濃度に希釈したFITC で標識されたGr-1および F4/80 抗体溶液(50 µl)のい ずれかを加え氷上で30分間遮光して静置した.最後に SMで細胞を洗った後,500 µlのシース液/0.5%フォ ルムアルデヒド溶液に懸濁しFACSキャリバー(Becton Dickinson)を用いて解析した.

末梢血の解析のため、マウスの尾静脈より約200 µl の血液を採取した. そのうちの50 µlにFc blockerを1 µl加え,室温で10分間静置した.次に,蛍光標識され たCD45.2, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1の抗体を1 µl加え 室温で30分間遮光して静置した. その後,1 x FACS Lysing solution (Becton Dickinson)を500 µl加え10分 間室温静置することで溶血した. 最後に500 x gで5分 間遠心後, PBSで細胞を洗浄してから500 µlのシース 液に懸濁しFACSで解析した.

結 果

JAM-B ノックアウトマウス作製

白血球の浸潤過程におけるJAM-B遺伝子の機能を 調べるためJAM-Bノックアウトマウスを作製した. JAM-B遺伝子はエキソン1-10からなり、オープンリー ディングフレームは299個のアミノ酸をコードする²⁰⁾. Fig. 1Aに示すようにJAM-B遺伝子を破壊するための ターゲティングベクターは、JAM-Bタンパク質がタイ トジャンクションのコンポーネントとして機能する上 で必須な2つのイムノグロブリン様構造をコードして いる領域であるエキソン3-5をIRES β-geoで置換する 形で設計した.また、ネガティブ選択として、ジフテ リアトキシンAをターゲティングベクターの3'側末端 にクローニングした. 5'側, 3'側の相同領域外および ネオマイシン耐性遺伝子内にプローブを設計し、得ら れた組換え体をサザンハイブリダイゼーションで確認 した. Fig. 1Bに示すように、マウスのゲノムDNAを EcoRIまたはSphIで切断し、それぞれに5'側、3'側の プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うと,



Fig. 1. Targeting disruption of JAM-B gene. A, Top, genomic locus of JAM-B gene. Middle, targeting vector designed to insert an IRES- β -geo cassette into the JAM-B gene. Bottom, targeted locus. The 5' and 3' probes were located at the outside of the homologous regions present in the targeting vector, while the NEO probe was recovered from a portion of neomycin resistant gene. Restriction enzymes indicated were as follows: RI; EcoRI, Hd; HindIII, Sh; SphI, Sp; SpeI, RV; EcoRV. B, Southern blot hybridization analyses for genotyping of mice. Genomic DNA isolated from tail tips of mice were subjected to Southern blot analyses to determine genotype of mice. EcoRI, EcoRV, and SphI digested DNAs were hybridized to 5', 3', and Neo probes, respectively. Expected size of the genomic DNA fragments were as follows. 5' probe: 20 kb for wild-type and 11.6 kb for targeted locus; 3' probe: 14 kb for wild-type and 9.3 kb for targeted locus; Neo probe: none for wild-type and 8.6 kb for targeted locus. C, PCR for genotyping. PCR was performed for genotyping to obviate Southern blot analyses. Two sets of primers, which amplify the deleted region of JAM-B genomic locus (primers a and b) and a portion of neomycin gene (primer c and d), were added together in each reaction. Primer sets, a/b and c/d give 550 bp and 700 bp DNA fragments in reaction, respectively.

野生型マウスでは20 kbおよび14.6 kbの断片が検出さ れるのに対し, ヘテロおよびホモ接合体では11.6 kbお よび9.3 kbの断片が検出される.また, ゲノムDNAを EcoRVで切断しネオマイシン耐性遺伝子のプローブを 用いて解析すると野生型マウスのゲノムでは検出さ れず, ヘテロおよびホモ接合体のみで8.6 kbのDNA断 片が検出される.これらの解析から同定されたJAM-B ノックアウトマウスは, 健康で外見上は野生型マウス とは区別ができない.さらに,様々な器官に関しても 野生型マウスとは大きな差異は見出せなかった.また, 生殖能力に関しても, ヘテロ接合体同士の交配におい てホモ接合体がメンデルの法則から期待される頻度で 得られたことから,問題ないことがわかった(Table 1).

Table 1. Analysis of JAM-B Heterozygous Intercross Progeny

Wild-type	Heterozygous	Homozygous	Total
51 (26.4%)	93 (48.2%)	49 (25.4%)	193 (100%)

JAM-Bノックアウトマウスにおける正常な末梢血細胞 の構成

まず,白血球浸潤のレベルを検証する前に,野生型 とJAM-Bノックアウトマウス間での血球成分の構成 に差が無いことを確認するため,それぞれのマウスか ら末梢血を採取し,各種抗体を用いたFACS解析によ り調べた.T細胞のマーカーとしてCD4,CD8,そし てB細胞のマーカーとしてB220を用いた.また顆粒球 のマーカーとしてGr-1,モノサイトのマーカーとし てMac-1の抗体を用いて血球細胞を染色し解析した. Fig.2に示すように野生型およびノックアウトマウス において,T細胞,B細胞,顆粒球,モノサイトのい ずれの成分を比較してみても顕著な差異がないことが 確認された.また,赤血球,白血球ならびにヘマトク リット等の血液学的検査に関しても調べた(Table 2). その結果,どの成分の数値を見ても差がないことが確 認できた.



Fig. 2. Normal distribution of cell population of peripheral white blood cells in JAM-B-/- mice. After preparation of mononuclear cells from peripheral bloods of wild-type and JAM-B-null mutant mice, cell populations were determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Representative FACS profiles were shown which were obtained from CD45.2 positive/propidium iodide negative population of the samples. Cells analyzed were as follows. Top panels, CD4/CD8 double-positive and CD4 or CD8 single positive T cells. Middle panels, Gr-1 positive granulocytes. Bottom panels, Mac-1 positive monocytes.

Table 2. Hematopoietic Indices in Wild-type and JAM-B-/-

Blood contents	Wild-type	JAM-B-/-
White blood cells $(10^2/\mu I)$	52.3±21	42.0±3.6
Red blood cells $(10^4\!/\mu l)$	699±139	683±4
Hemoglobin (g/dl)	9.4±1.7	9.57±0.1
HCT (%)	38.1±6	38.7±0.9
MCV (fl)	54.7±2.3	56.7±1.7
MCH (pg)	13.3±0.3	14±0.3
MCHC (g/dl)	24.6±0.5	24.7±0.3
Platelets (10 ⁴ /µl)	74.0±14.3	65.2±5.4

Contact Hyper Sensitivity

T細胞の浸潤において、内皮細胞のJAM-BとT細胞 のJAM-Cとの相互作用が提唱されている²¹⁾. したがっ て, Contact Hyper Sensitivity (CHS) のモデルを適用 することにより³²⁾、この分子間の相互作用の重要性を 検討した.この実験系では、皮膚上に存在するランゲ ルハンス細胞が塗布したoxazolonを捕食し、リンパ節 に戻りT細胞にその抗原を提示する.そしてそれに伴 いT細胞が活性化される. この実験系を用いて,野生 型マウスおよびJAM-Bノックアウトマウスの間での 免疫応答性の違いを調べた. 野生型およびJAM-B-/-マウスにおいて、腹部にoxazolonを塗布してから6日 後, 左耳に再びoxazolonを塗布した. 右耳は溶媒のみ を塗布してコントロールとし、その24時間後に耳の 腫れを測定した. しかしながら, Fig. 3Aに示すように 野生型とJAM-B-/-では同程度の腫れ具合であり、大 きな差異は見出せなかった.次に, oxazolonを塗布し た耳介の切片を作製し、H&E染色をおこなった(Fig. 3B). その結果, 双方のマウスで同じレベルの白血球 浸潤が検出された. さらに作製した耳介の切片を用い て免疫染色による解析を行い、浸潤細胞の種類の割 合を比較した(Fig. 3C). T細胞ならびに顆粒球を検 出するためのマーカーとして、それぞれCD3、Gr-1に 対する抗体を用いた. その結果として, 野生型および JAM-B-/-マウスいずれにおいても,炎症部位に対す る浸潤細胞の割合に大差は無かった.従って, CHSの 実験からJAM-Bの欠落は免疫応答性にも細胞浸潤に も影響を与えないことが解った.

Peritoneal Exudation Cells

近年の報告によると、JAM-Cが好中球の浸潤に関 与していることが示されている33. それによると好 中球の細胞表面で発現しているインテグリンファミ リーであるMac-1と内皮細胞にあるJAM-Cがヘテロ フィリックに結合し、この結合を介して好中球が浸潤 するということが, in vitroおよび in vivoでの JAM-C の抗体によるブロッキング反応実験により明らかと なった.また、JAM-Aはモノサイト表面に発現して いるLFA-1との相互作用ならびにJAM-A同士のホモ フィリックな結合を介してモノサイトの浸潤をサポー トしていることも示されている^{19,25)}. 従って,構造, 並びに発現部位の両方においてJAM-Cと酷似してい るJAM-Bが、JAM-Cタンパク質と同様に顆粒球ある いはモノサイトの浸潤に関与している可能性が考えら れる. 従って, その可能性を検討することにした. 野 生型およびJAM-B-/-マウスにチオグリコレートを腹 腔内注射することで腹膜炎を誘導させ、腹腔内に浸潤 してくる顆粒球およびモノサイトを回収しその数を 抗体で染色しFACSで調べた.しかしながら, Fig. 4に 示すように、JAM-B-/-マウスにおいて浸潤した総白 血球数ならびに顆粒球、モノサイトの割合は、野生型 マウスと比較してほぼ同じレベルであった.従って, JAM-Bの欠失は白血球の炎症部位への浸潤には大き な影響を与えないことが明らかになった.

考察

JAM-B-/-マウスは,発生過程およびその生殖能力 において,顕著な影響を与えないことが本稿の解析で 明らかとなった.これまでの報告からJAM-Bが炎症 に伴った白血球浸潤に関与することが考えられたの で、その可能性を検討することにした.その前に、野 生型とJAM-Bノックアウトマウスの間で末梢血の構 成成分に差が無いことを確認することにした.その 結果、リンパ球系及び顆粒球系の血球の構成成分は、 野生型並びにノックアウトマウス間ではほぼ同じで あることが確認できたかつ生化学的検査においても、 HGB, HCT, MCV, MCH等、血液成分に差異は見られ



Fig. 3. Normal response of JAM-B-/- mice to oxazolon-induced inflammation. A, Measurement of ear thickness of mice subjected to oxazolon-mediated inflammation. Wild-type and JAM-B-/- mice were applied to contact hypersensitivity model using oxazolon as an inducing reagent of inflammation. Thickness of control (right) and inflammation-induced (left) ears was measured using a dial gage. B, Histological analyses of inflammation-induced and non-induced ears of mice. Normal and inflammation-induced ears of wild-type and JAM-B-null mutant mice were used for histological analyses of hematoxylineosin staining. Left two panels represent control ears, while right two panels represent inflammation-induced ears. C, Immunohistochemical analyses of T cells and granulocytes. Sections of inflammation-induced and non-induced ears of wild-type and JAM-B-/- mice were subjected to immunohistochemistry using FITC-conjugated antibodies against CD3 and Gr-1 to monitor the levels of infiltrated T cells and granulocytes, respectively.

なかった.そこで,次にJAM-B-/-マウスの炎症性刺激に対する,免疫応答性について野生型マウスと比較した.しかしながら,リンパ球系の細胞浸潤を検出するためのoxazolonを用いた炎症誘導実験,並びにチオグリコレートによる腹膜炎誘導実験から得られた解析結果から,JAM-B分子は白血球の炎症部位への浸潤

Α

Concentrations of Leukocytes Exuded in Peritoneum	Cavity
during Thioglycollate-Induced Inflammation	



Fig. 4. Normal response of JAM-B-/- mice to thioglycollateinduced peritonitis. A, Comparison of amounts of leukocytes exuded into peritoneum cavity in response to thioglycollateinduced inflammation. Numbers of cells were counted under the microscope. B, Cell populations of transmigrated leukocytes in peritoneum cavity. Cell populations of exuded granulocytes and monocytes were compared between wildtype and JAM-B-null mutant mice by means of FACS. Cells analyzed were as follows. Top panel, no antibody control. Middle panels, Gr-1 positive granulocytes. Bottom panels, F4/80 positive monocytes.

には必須ではないと示唆された.

これまでに発表された研究から、JAM-Aのホモ フィリックな結合がモノサイトの浸潤に関与し¹⁹,ま た血管内皮細胞のJAM-Bと白血球,特に活性型T細 胞の表面に発現しているJAM-Cとのヘテロフィリッ クな結合がその浸潤にとって重要であると考えられ ていた²¹⁾. 一方で, Liang TW.らは, 気管支肺炎, 気 管支炎、間質性腎炎等の組織において、炎症部位近 接の血管でのみJAM-Bの発現量が増加していること をin situハイブリダイゼーションで示した²⁷⁾. さら に、彼らは炎症部位に浸潤するCD56⁺CD3⁺NKT細胞、 CD56⁺CD3⁺CD8⁺溶解性T細胞, CD56⁺NK細胞上に発 現しているJAM-Cがディッシュ上に固定化された JAM-Bタンパク質と結合することを示すことにより、 JAM-B-JAM-Cの結合が白血球浸潤にとって重要で あることを提唱した27).しかし、それらの研究成果は 全てin vitroの系でなされたものであって, in vivoに おいてJAM-B-JAM-Cの相互作用についての厳密な 検討は現在までのところなされてはいなかった.本稿 に記載したJAM-B-/-マウスのoxazolonによる炎症誘 導実験は, JAM-B-JAM-C間の相互作用をin vivoで 検証した初めての報告になるが、ここではJAM-Bが 欠落していても白血球は野生型マウスと同じ割合で浸 潤することを示しており, Liangらが報告した結果と は相反するものであった. これらの結果は血管内皮細 胞と白血球がJAM-B-JAM-Cとは全く異なる分子を 介しても相互作用できる可能性、もしくはin vivoでは JAM-Bがなくてもそれに代わる他の分子がJAM-Cを 介して白血球を炎症部位にリクルートしている可能性 が考えられる.いずれにせよ,現在までのところ血管 内皮細胞側のJAM-Bと白血球側のJAM-Cとの相互作 用が起こることは示されてはいるが, in vivoにおける その事象に関するその相互作用の重要性に関する概念 はさらなる検証が必要である.一方で、JAM-Cが血管 内皮細胞でも発現していることが示されており、かつ 好中球の細胞浸潤の際の,その内皮細胞側のJAM-Cと 好中球側のMac-1との相互作用がin vitroおよびin vivo の実験で明らかとなった33).従って本稿で示したチオ グリコレートによる炎症誘導実験の結果,すなわち, 野生型並びにJAM-B-/-マウス間において、顆粒球の 浸潤に差異が見られなかった事実は、JAM-Bがなく ともJAM-C-Mac-1あるいはJAM-C-JAM-C間の 結合を介して浸潤がなされた可能性を示唆する. さら にPECAM-1が血管内皮細胞および好中球の間でホモ フィリックに結合することが示され、またPECAM-1 ノックアウトマウスの解析では、好中球の浸潤が著 しく阻害されることが示された¹³⁾. 従って,好中球は 内皮細胞側のJAM-BよりもむしろJAM-C-Mac-1あ るいはPECAM-1同士の結合を介して浸潤がなされて おり、JAM-Bはこの事象には全くとは言い切れない ものの,それほど大きな貢献は果たしていない可能性 が考えられる.

近年, JAM-A並びにJAM-Cのノックアウトマウス に関する論文が発表された^{34, 35)}. Dejana E.らの研究 グループが報告したJAM-Aノックアウトマウスは外 見上野生型マウスと区別が出来ず、ヘテロ接合体同 士の交配でも産仔数はメンデルの法則に従う. さらに 末梢血成分(血小板,リンパ球,好中球,単球)の数 に関しても、野生型マウスと大きな差異は無かった. また、リンパ節に存在する種々の細胞の構成を調べ ても野生型マウスとは大きな区別はできない. しかし ながら, 彼らはJAM-A-/-の樹状細胞 (DC) は野生型 のDCと比較してランダムな移動能が上昇するという ことをin vitro (Transmigration Assay)ならびに in vivo (Contact Hyper Sensitivity)による実験系により示し た. そしてその移動能の上昇は、DC表面上に発現し ている他のトラフィッキングに関与している膜タンパ クの発現量に変化が無いことから、JAM-Aが欠落し ていることに依存するものであることを証明した.し かしながら、何故JAM-Aが欠落しているDCにおいて、 移動能が上昇するのかは明らかにされてはいない. 一 方で、JAM-A-/-マウスの白血球の浸潤に関しては、 oxazolonによる炎症誘導実験で調べられている³⁴.野 生型マウスと比較して、JAM-A-/-マウスの方が耳介 の腫れが大きくなり、炎症部位に浸潤する白血球の数 が多くなることが示された.しかし、どのような分子 の相互作用で白血球が浸潤しているのかは述べられて おらず,今後解析される必要がある.

また,Adams RH.らのグループはJAM-Cのノック アウトマウスに関して,それらのうち60%が出生直後 に死亡するが,残りは健常であることを示した³⁵.こ のJAM-Cノックアウトマウスでの炎症に伴う白血球 浸潤の程度に関しては解析されていないが,少なくと も健常なマウスが得られることから,白血球の浸潤が 全く起こっていないとは考えにくい.

以上をまとめると, JAM-A, -B, -Cはいずれもが生 体でユニークな働きをしていないとは言わないまでも, それぞれのタンパク質の役割は*in vivo*においてかなり 余剰的である可能性が考えられる.従って,今後は現 存するJAM-A, -B, -Cの3種類のノックアウトマウス の掛け合わせにより, JAMタンパク質の重要性を総合 的に検証する必要があると考えられる.

結論

- 1) JAM-B-/-マウスは健常で,外見上は野生型マウス と大差なかった.
- 2) JAM-B-/-の末梢血における血球細胞の構成成分 は野生型マウスのそれとほぼ同じであった.
- JAM-Bノックアウトマウスにおけるoxazolon誘 導による白血球の浸潤能は正常レベルであり、

JAM-Bの欠落は免疫応答性ならびに細胞浸潤を阻害するものではなかった.

 チオグリコレートによる炎症誘導により,腹腔へ浸 潤した総白血球数,ならびに顆粒球とモノサイトの 割合は,野生型マウスと比較して大きな差異は見ら れなかった.

謝 辞

本稿を作成するにあたり,ご指導を賜りました埼玉 医科大学ゲノム医学研究センター発生・分化・再生 部門 部門長 奥田晶彦 教授に心から感謝いたします. また,本実験を行うにあたり,直接のご指導・ご鞭撻 を賜りました埼玉医科大学ゲノム医学研究センター RI実験施設 施設長 西本正純 講師に心より感謝いた します.最後に埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 発生・分化・再生部門の皆様のご厚意に心から御礼申 し上げます.

引用文献

- 1) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 1994;76:301-14.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol 1995;57:827-72.
- Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. Annu Rev Biochem 1995;64:113-39.
- 4) Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. Blood 1996;88:3259-87.
- 5) Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. Physiol Rev 1999;79:181-213.
- 6) Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils *in vitro*. J Clin Invest 1989;83:2008-17.
- Weber C, Lu CF, Casasnovas JM, Springer TA. Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells. J Immunol 1997; 159:3968-75.
- Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. J Immunol 1986;137:1270-4.
- Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Cell 1987;51:813-9.

- 10)Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C, et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. Science 1990; 247:1219-22.
- 11)Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. J Exp Med 1993;178:449-60.
- 12) Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. J Exp Med 1995;182:1337-43.
- 13) Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, et al. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial celladhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1independent functions. J Immunol 1999;162:3022-30.
- 14) Dangerfield J, Larbi KY, Huang MT, Dewar A, Nourshargh S. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils *in vivo* and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. J Exp Med 2002;196:1201-11.
- 15) Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, Albelda SM, Larkin SW, Boughton-Smith N, et al. An anti-plateletendothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels *in vivo* by blocking the passage through the basement membrane. J Exp Med 1996 Jul 1;184(1):229-39.
- 16) Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. Nat Immunol 2002;3:143-50.
- 17)Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, et al. A novel endothelial specific mem-brane protein is a marker of cell-cell contacts. J Cell Biol 1992;118:1511-22.
- 18)Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Luscinskas FW. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. J Immunol 2001;167:2323-30.
- 19) Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. J

Cell Biol 1998;142:117-27.

- 20)Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. J Biol Chem 2001;276:2733-41.
- 21)Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA. Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. J Biol Chem 2001 Dec 7;276(49):45826-32.
- 22)Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, et al. Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. J Biol Chem 2000;275:30970-6.
- 23) Cunningham SA, Arrate MP, Rodriguez JM, Bjercke RJ, Vanderslice P, Morris AP, et al. A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule. Characterization of leukocyte interactions. J Biol Chem 2000 Nov 3;275(44):34750-6.
- 24) Ozaki H, Ishii K, Horiuchi H, Arai H, Kawamoto T, Okawa K, et al. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. J Immunol 1999;163:553-7.
- 25) Ostermann G, Weber KS, Zernecke A, Schroder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. Nat Immunol 2002;3:151-8.
- 26)Cunningham SA, Rodriguez JM, Arrate MP, Tran TM, Brock TA. JAM2 interacts with alpha-4beta1. Facilitation by JAM3. J Biol Chem 2002;277: 27589-92.
- 27) Liang TW, Chiu HH, Gurney A, Sidle A, Tumas DB, Schow P, et al. Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM 2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3. J Immunol 2002;168:1618-26.
- 28) Gaspari AA, Katz SI. Current Protocols in Immunology. Contact Hypersensitivity. 1991;4.2.1-5. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- 29) Luo Y, Dorf ME. Current Protocols in Immunology. Isolation of mouse neutrophils. 1997;3.20.1-6. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- 30) Mountford P, Zevnik B, Duwel A, Nichols J, Li M, Dani C, et al. Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:4303-7.
- 31) Yagi T, Ikawa Y, Yoshida K, Shigetani Y, Takeda N, Mabuchi I, et al. Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with

use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:9918-22.

- 32) Hirata T, Merrill-Skoloff G, Aab M, Yang J, Furie BC, Furie B. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. J Exp Med 2000; 192:1669-76.
- 33) Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, Hersemeyer K, Sachs UJ, Nawroth PP, et al. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration *in vitro* and *in vivo*. J Biol

© 2006 The Medical Society of Saitama Medical School

Chem 2004;279:55602-8.

- 34) Cera MR, Del Prete A, Vecchi A, Corada M, Martin-Padura I, Motoike T, et al. Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-Adeficient mice. J Clin Invest 2004;114:729-38.
- 35) Gliki G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. Nature 2004;431: 320-4.

http://www.saitama-med.ac.jp/jsms/