

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」
平成21年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

木梨達雄

関西医科大学 医学部・教授

接着制御シグナルの破綻と自己免疫疾患

§1. 研究実施体制

(1)「木梨」グループ(研究機関別)

(木梨サブグループ)

① 研究代表者:木梨 達雄 (関西医科大学医学部、教授)

② 研究項目

・Mst1欠損マウスにおこる免疫細胞動態異常と免疫異常、自己寛容破綻の解析

(岡崎サブグループ)

① 主たる共同研究者:岡崎 和一 (関西医科大学医学部、教授)

② 研究項目

・IgG4 関連全身疾患と接着制御分子の関連解析

(2)「片桐」グループ(研究機関別)

① 主たる共同研究者:片桐 晃子 (北里大学理学部生物科学科、教授)

② 研究項目

・Rap1-RAPL-Mst1 シグナルによるリンパ球接着、移動、細胞極性の制御について分子基盤を明らかにし、免疫異常との関連をシグナル伝達制御の観点から解析する。

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

木梨グループ

(木梨サブグループ)

Mst1 欠損マウスは加齢とともに多臓器にわたるリンパ球浸潤、自己抗体が陽性になる。Mst1 欠損によるリンパ球動態異常と自己免疫との関連をあきらかにするため、胸腺細胞選択過程における Mst1 による LFA-1/ICAM-1 接着制御の過程、制御性T細胞の分化、機能を解析をおこなった。その結果、Mst1 欠損によって H-Y TCR tg マウス(雌)の正の選択、および OVA 抗原を用いた負の選択(OT-II/RIP-OVA マウス)過程の障害が認められた。さらに ICAM-1 欠損胸腺細胞を T 細胞欠損マウスに移入によって活性化 T 細胞の増加、肺、肝臓などへの浸潤が引き起こされたことから、Mst1 による LFA-1/ICAM-1 を介する接着制御が免疫寛容に必要であることが明らかになった。胸腺組織では ICAM-1 は髄質内の樹状細胞(DC)、胸腺上皮細胞(mTEC)に発現していることから、これらの抗原提示細胞と胸腺細胞の相互作用を2光子顕微鏡による胸腺組織イメージングを用いて解析した。OT-II/RIP-OVA の系では OT-II CD4+細胞と Aire+ICAM-1+ mTEC との強い接着を形成しながら細胞内カルシウム上昇が起こっており、負の選択環境での抗原依存的接着過程を初めて捉えることができ、さらに Mst1 欠損 CD4+細胞、ICAM-1 欠損胸腺組織ではクラスタ形成が低下したことから CD4+胸腺細胞の髄質内での移動、および抗原認識に Mst1 による LFA-1/ICAM-1 を介した接着が必要であることが判明した。

Mst1 欠損マウスおよび T 細胞特異的 Mst1 欠損では胸腺内制御性T細胞(Treg)が低下しており、Mst1 が Treg の分化に必要であることが明らかになった。末梢リンパ組織では Treg の細胞数は回復していることから、抑制機能について解析した。T 細胞移入による大腸炎モデルにおいて、Mst1 欠損 Foxp3+Treg は抑制機能が著しく低下していた。また、Mst1 欠損 Treg は in vitro において DC との抗原特異的クラスタ形成、および抗原特異的 T 細胞増殖抑制機能が障害されていた。一方、CD3 抗体を用いた場合には異常を認められなかった。また、正常 Treg と比較して DC 上の CD86 の down-regulation も低下していた。リンパ節組織内でナイーブ T 細胞 (OT-II)、Treg(OT-II;Foxp3-GFP)と樹状細胞を可視化し、2 光子イメージングを行った結果、抗原非存在下ではナイーブ T 細胞、Treg いずれも活発に移動しながら、樹状細胞と接触しているが、抗原存在下ではナイーブ T 細胞が樹状細胞とクラスタを形成し、Treg は T 樹状細胞と一過性の接着を繰り返す swarming の様子を示した。Mst1 欠損 Foxp3+Treg は移動速度が低下し、樹状細胞と接着時間、頻度も低下していた。これらのことから Mst1 欠損 Treg は抗原特異的接着障害によって抑制機能が低下していることが予想されるので、免疫シナプス(IS)の形成を planar lipid bilayer を用いて詳細に調べた。その結果、ナイーブ T 細胞は peptide-MHC を ICAM-1 が取り囲む安定した IS 構造を形成し、ほぼ停止状態を示すのに対して、Treg は IS 構造を形成した後、移動する mobile IS を示した。一方、Mst1 欠損 Treg は peptide-MHC のクラスタ形成、ICAM-1 リングいずれも形成できなかった。以上のことから、Mst1 欠損 Treg は抗原特異的接着構造の形成障害によって抑制機能が低下していると考えられる。今後、Mst1 による IS 形成機構

と Foxp3+Treg の発生低下についても解析を行う予定である。

(岡崎サブグループ)

ヒト IgG4 関連疾患患者末梢血 DNA を用いて MST1 プロモーター領域の CpG メチル化を解析した結果、膝外病変もつ患者でメチル化が有意に亢進しており、IgG4 関連疾患の自己免疫症状に Mst1 が関連していることが示唆された。さらに、膝病変、膝外病変ともに IL-10 を産生する ICOS 陽性 CD4+CD25^{high} 制御性T細胞の増加が高 IgG4 血症に関与していることが示唆された。一部の膝癌周辺の閉塞性膝炎部にも IgG4 陽性細胞と制御性 T 細胞浸潤を認めることより膝癌周辺の腫瘍免疫に基づいた類似の免疫反応を呈することが示唆された。

片桐グループ

1) 経血管内皮移動の制御機構

リンパ球がリンパ節を再循環する際に生じる高内皮細静脈(HEV)上での arrest は、ケモカイン刺激によって接着分子 LFA-1 が活性化されることにより生じる。このケモカインによる LFA-1 接着活性の上昇には、Rap1 活性化が重要な役割を果たしている。また、arrest は $\beta 2$ 鎖の細胞内領域にフィラミンが抑制分子として結合しており、フィラミンをノックダウンすると、自発的な arrest および LFA-1 依存性の slow rolling が認められることがわかった。Rap1 活性化による arrest 誘導の機構として、Rap1 とフィラミンの相互作用が予想されたので、両者の会合を検討したところ、Rap1-GTP 型がフィラミンの 3 番目の免疫グロブリン領域に結合することが判明した。また Rap1-GTP がフィラミンに結合することで LFA-1 との結合が解除されることが明らかとなった。今後、Rap1 結合領域をなくしたフィラミン変異体が、ケモカインによって誘導される arrest を阻害するかどうか検討する。

2) Rab13 による LFA-1 クラスター形成とリンパ球動態の制御

免疫細胞の接着・遊走に重要な LFA-1 cluster 形成は Rap1-RAPL-Mst1 シグナルにより、細胞内からの極性輸送によって制御されている。Rab13 が、ケモカイン刺激によって活性化され、LFA-1 の極性輸送に関与することが明らかになった。Rab13-GTP 型は Mst1 と会合してその局在化に重要な役割を果たすこと、また、Mst1 も受動的に Rab13 に会合して前方に運ばれるだけでなく、それ自身も前方膜の形成に必須であることが明らかとなった。Rab13 と Mst1 は協調的に機能して LFA-1 を前方へ輸送していると考えられる。両者の役割を明らかにするために、Mst1 及び Rab13 の下流標的分子を解明し、それらの相互作用を明らかにする必要がある。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Ueda Y., Katagiri K., Tomiyama T., Yasuda K., Habiro K., Katakai T., Ikehara S., Matsumoto M., Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen-recognition in the thymus. *Nat. Commun.* 2012 Oct 2;3:1098. (doi: 10.1038/ncomms2105.)
2. Sekine K., Kawauchi T., Kubo K., Honda T., Herz J., Hattori M., Kinashi T., and Nakajima K. Reelin controls neuronal migration and positioning by promoting neuronal adhesion to extracellular matrix via the inside-out activation of integrin alpha5beta1, *Neuron.* 76:353-369, 2012, (doi: 10.1016/j.neuron.2012.07.020.)
3. Fujii Y., Shiota M., Ohkawa Y., Baba A., Wanibuchi H., Kinashi T., Kurosaki T., Baba Y., Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422:615-20, 2012, (doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.037.)
4. Harada Y., Tanaka Y., Terasawa M., Pieczyk M., Habiro K., Katakai T., Hanawa-Suetsugu K., Kukimoto-Niino M., Nishizaki T., Shirouzu M., Duan X., Uruno T., Nishikimi A., Sanematsu F., Yokoyama S., Stein J.V., Kinashi T., and Fukui Y.. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood.* 119:4451-61. 2012 (doi:10.1182/blood-2012-01-407098)
5. Fukui Y, Uchida K, Sumimoto K, Kusuda T, Miyoshi H, Koyabu M, Ikeura T, Sakaguchi Y, Shimatani M, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Shikata N, Sakaida N, Uemura Y, Satoi S, Kwon AH, Okazaki K. The similarity of Type 1 autoimmune pancreatitis to pancreatic ductal adenocarcinoma with significant IgG4-positive plasma cell infiltration. *J Gastroenterol.* 2012 (doi: 10.1007/s00535-012-0677-x)
6. Uchida K, Masamune A, Shimosegawa T, Okazaki K. Prevalence of IgG4-Related Disease in Japan Based on Nationwide Survey in 2009. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:358371. (doi: 10.1155/2012/358371.)
7. Okazaki K, Umehara H. Are Classification Criteria for IgG4-RD Now Possible? The Concept of IgG4-Related Disease and Proposal of Comprehensive Diagnostic Criteria in Japan. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:357071. (doi: 10.1155/2012/357071.)
8. Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukata N, Sumimoto K, Fukui Y, Sakaguchi Y, Ikeura T, Shimatani M, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio

A, Okazaki K. Regulatory T cells in type 1 autoimmune pancreatitis. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:795026. (doi: 10.1155/2012/795026.)