

木梨 達雄
関西医科大学医学部・教授

接着制御分子破綻による自己免疫発症機構 IgG4 関連全身疾患との関連解析

§ 1. 研究実施の概要

目的: 接着制御分子 R_{APL} と M_{st1} 遺伝子を欠損したマウスに発症する免疫異常の病態と原因を解明し、接着制御分子の自己寛容における役割とその調節について明らかにし、ヒト免疫疾患との関連を追及する。

H22 年度研究実施:

木梨グループ: R_{APL} 欠損マウスに発症するループス腎炎、Bリンホーマが CDK インヒビター p27Kip1 の異常によっておこることを片桐グループと共同で解明した(木梨グループは主に個体レベルの解析を担当)。一方、M_{st1} 欠損マウスは、R_{APL} 欠損マウスに比較して全身性の症状が強く、多臓器にリンパ球、形質細胞の浸潤があり、自己抗体陽性となるが、B 細胞でなく T 細胞が原因であり、胸腺細胞の選択に異常があった。2 光子顕微鏡による胸腺組織内イメージングによって、M_{st1} 欠損胸腺細胞の組織内移動速度の低下、皮質から髄質への移動効率の低下、胸腺 SP の活性化の低下がみられた。現在、M_{st1} 欠損胸腺細胞と胸腺上皮細胞との相互作用、抗原認識を 2 光子顕微鏡を用いて解析している。(木梨サブグループ)

ヒト疾患との関連として IgG4 関連疾患の免疫疾患群における R_{APL}, M_{st1} 遺伝子プロモーター領域のメチル化マッピング解析を行い、IgG4 関連疾患患者で有意にメチル化が亢進している部位が存在していることが示唆された。IgG4 産生に関して ICOS 陽性制御性 T 細胞の増殖と分泌される IL-10 が産生亢進をもたらす一方、グルココルチコイドが産生抑制に極めて有効であることが明らかになった。さらに、IL-10 産生細胞として制御性 B 細胞と自然免疫系の関与を検索中である。(岡崎サブグループ)

片桐グループ: R_{APL} が p27Kip1 の核内移行を促進することによって G1-S 期移行を負に調節していること、その結果、R_{APL} 欠損リンパ球では G1-S 期移行が促進し、リンパ球増殖が亢進すること、およびこの破綻がループス腎炎、Bリンホーマ発症につながることを明らかにし、R_{APL} は接着と増殖を協調的に制御する分子であることが示唆された。また、M_{st1} リン酸化プロテオミクス解析によって同定された蛋白質で R_{APL}・M_{st1} と会合または共局在する、タンパク質キナー

ぜ、アダプター分子、Rab GTPases の解析を進めている。

§ 2. 研究実施体制

(1) 木梨グループ

①研究分担グループ:木梨達雄(関西医科大学医学部 教授)(研究代表)

:岡崎和一(関西医科大学医学部 教授)

②研究項目

RAPL 欠損、Mst1欠損マウスを対象とした免疫学的解析、組織病理解析、イメージング技術の樹立と解析を行い、接着制御分子欠損によっておこる免疫細胞動態異常と免疫異常、自己寛容破綻の関係を明らかにする。マウスモデルに基づく RAPL, Mst1 異常による自己免疫疾患とヒト疾患との関連を探索するトランスレーショナルリサーチとして、自己免疫性膵炎を含む IgG4 関連全身疾患における接着制御分子 Mst1, RAPL 遺伝子の遺伝子異常を調べ、ヒト疾患における機能異常との関連を明らかにする。

(2) 片桐グループ

①研究分担グループ:片桐晃子(関西学院大学 理工学部生命科学科 教授)(主たる共同研究者)

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。

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

【目的】1. RAPL による p27Kip1 の制御を明らかにし、RAPL 欠損マウスに発生するループス腎炎、Bリンホーマと p27Kip1 の破綻の関係を調べる。2. Mst1 欠損マウスに生じる自己免疫様症状の細胞レベルでの原因を明らかにし、自己寛容の破綻をイメージングによる実験系を開発しながら解明する。3. RAPL, Mst1 遺伝子プロモーター領域のメチル化マッピングを行い、IgG4 関連疾患との相関を調べる。また、IgG4 産生に関して ICOS 陽性制御性T細胞の増殖と分泌される IL-10 の役割を明らかにする。

【方法】

マウス解析: RAPL 遺伝子欠損 (*rap1^{-/-}*) (C57BL/6 に 8 代 backcross)と p27Kip1S10A knock-in マウスを交配し、抗体値、ループス腎炎、リンホーマの発症率を調べる。T 細胞、B 細胞系列特異的 Mst1 遺伝子欠損(Mst1^{ff}; Lck-Cre, mb1-Cre)マウス (C57BL/6 background) を用いて、全身性の欠損 (Mst1^{ff}; CAG-Cre) で生じる高 IgG 値、自己抗体産生、サイトカイン

産生亢進、多臓器の免疫細胞浸潤の検討を行う。

シグナル解析: RAPL 欠損マウス由来 T 細胞、B 細胞を用いて抗体による抗原受容体架橋刺激による細胞周期解析や増殖応答、およびシグナル分子のリン酸化、cyclin-CDK の発現、Cdk4、Cdk2 のキナーゼ活性、p27Kip1 の発現、分解、細胞内局在を調べる。p27Kip1 の 10 番目のセリンのリン酸化は核外移行シグナルであるが、S10 を alanine に置換した p27Kip1S10A マウス由来のリンパ球について同様に解析を進める。

Mst1 下流シグナル分子について、リン酸化ペプチド解析を行い、同定した複数のターゲット分子候補の解析を行う。 Mst1 の *in vitro* キナーゼアッセイによって直接リン酸化基質かどうか調べ、過剰発現や、突然変異導入による接着、細胞極性への影響を調べる。

イメージング解析: GFP マウス胸腺組織を用いて胸腺 DP, SP 細胞の組織内移動を可視化し、2 光子顕微鏡を用いて Mst1 欠損胸腺細胞の動態異常を調べる。また同時にカルシウムシグナルを調べ、自己抗原による活性化を調べる。リンパ節初代ストローマ細胞を単層培養後、OT-II、OT-II/Mst1^{-/-}由来 T リンパ球と OVA ペプチド提示骨髄由来樹状細胞(APC)とともに培養しながらイメージングする系を用いて、T 細胞の動態、T-APC の相互作用の頻度・持続時間、Ca²⁺ influx,を測定する。また、2 光子顕微鏡を用いた膝下リンパ節の *in vivo* イメージングを用いて Mst1 欠損によるリンパ球の動態を同様に調べる。

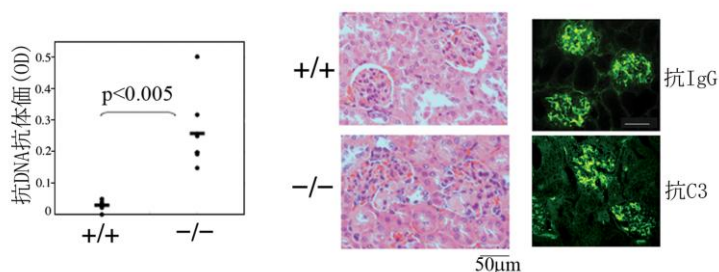
遺伝子解析: 健常人、および IgG4 関連自己免疫性膵炎患者の免疫異常の解析、及び RAPL, MST1 のプロモーター領域にある CpG のメチル化を bisulfite 法で解析し、メチル化マッピングを行う。IgG4 産生に関して ICOS 陽性制御性T細胞の増殖と分泌される IL-10 の役割を調べる。

【結果と結論、今後の予定】

1. RAPL による p27Kip1 の制御

RAPL 欠損マウスは加齢とともにループス腎炎(図 1)、B 細胞リンホーマが生じる。

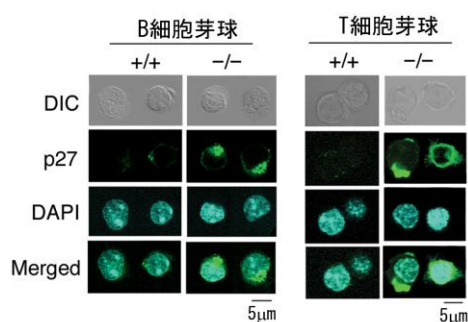
図 1 RAPL 欠損マウスは加齢するとループス腎炎を発症する。(左)10 ヶ月令 RAPL 欠損マウス (-/-) は正常マウス (+/+) に比べ、SLE などの自己免疫疾患で陽性になる抗 dsDNA 抗体価が上昇した。(右)腎臓切片の HE 染色像、抗 IgG、C3 抗体による蛍光染色像。RAPL 欠損マウス(-/-)の糸球体は肥大し、免疫複合体の沈着が認められた。



RAPL 欠損マウス由来 T および B リンパ球は刺激後、G1-S 期の移行が増強し、細胞増殖が亢進していた。抗原受容体の早期シグナルに異常は見られなかった。cyclin-CDKs の発現も正常であったが、Cdk2 のキナーゼ活性が 2-3 倍増加していた。一方、正常では G1-S 期で p27Kip1 が

分解され発現が消失するが、RAPL欠損ではp27Kip1の発現レベルは維持され、細胞質に蓄積していた(図2)。T187リン酸化、Skp2の発現は正常であった。RAPLは細胞周期の進行に関与するp27Kip1の核と細胞質間の移行を制御しており、RAPL欠損リンパ球ではp27Kip1は核に移行できないため機能しなくなり、細胞増殖を抑制できなくなっていることがわかった。そのためRAPLが欠損すると、抗原刺激に対するT細胞とB細胞が過剰な増殖応答を示すようになり、同時にp27Kip1は細胞質に異常に蓄積するようになった。

図2 抗原刺激したRAPL欠損リンパ芽球では、p27Kip1が細胞質に蓄積している。(左)正常B細胞芽球(+/+)ではp27Kip1は分解されてなくなっているが、RAPL欠損B細胞芽球(-/-)ではp27Kip1は細胞質に蓄積している。(右)正常T細胞芽球(+/+)ではp27Kip1は分解されてなくなっているが、RAPL欠損T細胞芽球(-/-)ではp27Kip1は細胞質に蓄積している。



再構成実験によって、p27Kip1の核外移行にはS10のリン酸化が関与しており、RAPLはS10のリン酸化を抑制することによって核外移行を阻害し、細胞増殖を抑制していることが明らかになった。p27S10Aのknock-inマウスとRAPL欠損マウスを交配してRAPL^{-/-}:S10A/S10Aにするとp27Kip1分解、リンパ球の細胞増殖の亢進が正常化し、ループス腎炎、リンホーマの発症を阻害できた。以上のことから接着制御分子RAPLがp27Kip1の核内移行を促進し、リンパ球の増殖を抑制するシグナルとして、リンパ球増殖性疾患の発症抑制に重要な機能を果たしていることが明らかとなった。これはリンパ球において接着と増殖が協調して調節されていることを示唆しており、今後その協調的調節機構を解明する。

2. Mst1欠損マウスに生じる自己免疫について

Mst1欠損マウスは、早期から活性化リンパ球が増加しており、全身の臓器(肺、唾液腺、肝臓、脾臓、腎臓等)にリンパ球、形質細胞の著名な浸潤、サイトカイン(IL-4, IL-17, IFN γ)産生亢進、血清IgG量の増加、抗核抗体や胃壁、肺などに対する自己抗体が検出されるが、T細胞系列でMst1を欠損させた場合でも、全身で欠損させた場合同様に自己免疫様症状を呈するが、B細胞系列で欠損させた場合、自己免疫様症状は起こらなかった。したがってT細胞が原因であることが判明した。H-Y TCR transgenic miceを用いて胸腺細胞の選択を解析したところ、HY female/Mst1^{-/-}でCD8陽性細胞が減少しており、胸腺細胞の正の選択が障害されていた。負の選択についてもHY male/Mst1^{-/-}ではCD4/CD8細胞減少レベルが若干であるが有意に低下していた。HY male/Mst1^{-/-}マウスは6-8週齢でeffector/memory細胞集団が末梢リンパ組織で著名に増加し、皮膚炎による脱毛が生じた。これらのことからMst1欠損によって胸腺細胞の選択

に異常があることが考えられた。

胸腺組織を用いて2光子顕微鏡によるイメージングを行ったところ、Mst1欠損胸腺細胞の移動速度が低下しており、皮質から髄質への移行過程に障害がみられた。また、髄質でのCD69の発現が低下していた。胸腺細胞が皮質から髄質への移行は選択過程に重要と考えられていることから、この過程をRip-OVA tg マウス胸腺組織を用いてCa²⁺を可視化しながら動態と抗原認識を解析している。

ナイーブT細胞の抗原認識についてリンパ節ストローマと樹状細胞を用いたin vitro系を用いて解析した。Mst1欠損末梢ナイーブT細胞は野生型と比較し、抗原提示細胞との接触の頻度・安定性が低下し、Ca²⁺流入にいたる時間の延長がみられ、T細胞増殖に至る頻度が低下した。また、intravital imagingによりMst1欠損OT-IIリンパ球はDCとの接触が安定していない傾向にあった。Mst1欠損マウスではTregは胸腺内での発生は低下しているが、末梢リンパ組織ではほぼ正常であった。抗原特異的Tregの抑制機能をOT-II tg マウス由来Tリンパ球を用いて調べたところ、野生型OT-IIに比べ抑制機能が低下していた。しかし、anti-CD3抗体刺激下によるTregの抑制機能には差が見られなかったことから、Mst1欠損によってTregの抗原認識が低下している可能性がある。現在、Foxp3-GFPマウスを導入し可視化によるイメージングを進めている。今後、以上の解析を発展させ中枢性寛容、末梢性寛容のいずれの破綻が自己免疫発症につながるのか明らかにする予定である。

3. IgG4関連疾患とRAPL, Mst1の関連について

倫理審査委員会の許可を得たことから、健常人およびIgG4関連自己免疫性膵炎の患者検体からDNAを抽出し、プロモーター領域のメチル化を解析した。現在、患者16検体、正常6検体を用いてbisulfite法でメチル化マッピングを行ったところ、メチル化に差がある部位が複数同定された。この領域をターゲットにしてメチル化特異的PCRを確立し、さらにSLEなどの他の自己免疫疾患を含めて解析を進める予定である。また、IgG4関連疾患患者において、ICOS陽性制御性T細胞の増殖を認め、分泌されるIL-10の産生亢進をもたらし、IgG4の増加をもたらすことが示唆され、グルココルチコイドがその産生抑制に極めて有効であることが明らかになった。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kusuda T, Uchida K, Satoi S, Koyabu M, Fukata N, Miyoshi H, Ikeura T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Fukui T, Shimatani M, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Uemura Y, Kwon AH, Okazaki K. Idiopathic Duct-Centric Pancreatitis (IDCP) with Immunological Studies. *Internal Medicine*. 2010; 49(23):2569-2575

(DOI:10.2169/internalmedicine.49.3657)

2. Okazaki K, Uchida K, Fukui T, Takaoka M, Nishio A. Autoimmune pancreatitis-a new evolving pancreatic disease? *Langenbeck's archives of surgery*. 2010;395(8): 989-1000 (DOI: 10.1007/s00423-010-0714-2)
3. Katagiri, K., Ueda, Y., Tomiyama, T., Yasuda, K., Toda, Y., Ikehara, S., Nakayama, K.I, Kinashi, T. RAPL deficiency caused lymphoproliferative disorders through the mislocalization of p27^{kip}. *Immunity*. 34 1-15. 2011 (DOI:10.1016/j.immuni.2010.12.010)