

「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

H23 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

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、自己寛容破綻の関係を明らかにする。

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

① 主たる共同研究者: 片桐晃子 (関西学院大学 理工学部生命科学科 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、胸腺細胞選択過程を調べるとともに、胸腺組織を用いた胸腺細胞の動態観察系を樹立し、自己抗原認識過程を調べた。TCR トランスジェニックマウスモデル(H-Y, OT-I, OT-II)を用いて、胸腺細胞の正の選択を調べたところ、野生型と比較し、Mst1 欠損マウスでは CD69 陽性、CD4 または CD8 single positive (SP)細胞の減少がみられたことから正の選択異常が起こっていると考えられた。組織特異的抗原による負の選択をしらべるため、RIP-mOVA マウスを用いた。このマウスでは胸腺髄質上皮細胞(mTEC)に OVA 抗原が発現する。OVA 特異的 OT-II マウスと交配すると、CD69 陽性 CD4SP 細胞が負の選択によって減少するが、Mst1 欠損では減少が抑制され、末梢リンパ組織に CD4+SP OT-II T 細胞が増加していたことから、負の選択が障害されていると考えられた。

胸腺組織スライスを作成し、DP, SP 胸腺細胞の組織内動態を調べたところ、SP は主に髄質に移行し、活発に移動し(平均速度  $15 \mu\text{m}/\text{min}$ )、DP 細胞は皮質に局在し、移動を示すが SP 細胞に比較して遅かった( $5\text{-}7 \mu\text{m}/\text{min}$ )。Mst1 欠損では DP 細胞の移動に異常はないが、SP 細胞の移動が低下していた。RIP-mOVA 胸腺スライスを用いて OT-II CD4+SP 細胞の抗原認識を調べたところ、すみやかに抗原特異的に Aire 陽性 mTEC と LFA/ICAM-1 を介する接着が起き、細胞内カルシウムが上昇、5-6 時間後にクラスターを形成した。一方、Mst1 欠損 OT-II 細胞では mTEC との接着やクラスター形成が低下した。以上のことから Mst1 欠損胸腺では組織特異的抗原認識過程に異常があり、その結果、自己寛容が破綻していることが考えられる(投稿中)。

(岡崎サブグループ)

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るトランスレ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 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。そのためにヒト IgG4 関連疾患患者末梢血 DNA(20 名)を用いて RAPL, MST1 遺伝子のメチル化を解析した。RAPL, MST1 遺伝子のプロモーター領域は CpG クラスター 20 から 40 ヲ所存在する。sodium bisulfite 法によるメチル化マッピングを行った。その結果、健常人と比較し、膵外病変もつ患者でメチル化が有意に亢進していた( $p=0.077$ )。一方、RAPL 遺伝子ではメチル化が上昇傾向にあったが、有意差はなかった( $p = 0.27$ ) (投稿準備中)。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、膵病変、膵外病変ともに IL-10 を産生する ICOS 陽性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 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。

片桐グループ

1) LFA-1 による停止接着の解析;接着カスケード制御分子の解明

リンパ球再循環する際に生じる高内皮細静脈(HEV)上での接着カスケードにおける停止接着は Rap1 が関与している。LFA-1 の  $\beta 2$  鎖の細胞内領域に変異解析から、停止接着は  $\beta 2$  鎖の細胞内領域に結合した抑制分子が解除されることで生じること

が予想された。生化学的会合及び knockdown による接着解析から、この抑制分子としてフィラミンの関与が明らかとなった。フィラミンを knockdown すると自発的な arrest および LFA-1 依存性の slow rolling が認められた。従ってフィラミンによって LFA-1 接着活性が抑制されており、Rap1 活性化によってこれが解除され停止が誘導されると予想される。

## 2) LFA-1 クラスター形成と遊走の分子機構

ケモカイン刺激による LFA-1 cluster 形成は遊走に先立って形成され、これは 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ことが示唆されている。LFA-1 の  $\alpha$  鎖細胞外領域に PH 依存性の蛍光色素 PHluorin を、mRFP を細胞内領域融合させた LFA-1 を作製し解析した結果、ケモカイン刺激によって LFA-1 が細胞内から先端膜突起に輸送されていることが明らかになった。また、Mst1 との会合解析から、約 60 種類の Rab family GTPases のうち、Rab13 がこの極性輸送に関与する可能性が示唆された。Rab13 と LFA-1 が先端膜で共局在し、優性抑制型変異体を過剰発現させることにより LFA-1 cluster が形成されず、ICAM-1 への接着・遊走が優位に低下した。今後、Rap1 シグナルと Rab13 の活性化と機能との関連を調べる予定である。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Yosuke Harada, Yoshihiko Tanaka, Masao Terasawa, Markus Pieczyk, Katsuyoshi Habiro, Tomoya Katakai, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Mutsuko Kukimoto-Niino, Tomoko Nishizaki, Mikako Shirouzu, Xuefeng Duan, Takehito Uruno, Akihiko Nishikimi, Fumiyuki Sanematsu, Shigeyuki Yokoyama, Jens V. Stein, Tatsuo Kinashi, and Yoshinori Fukui. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*. In press.(2012) (DOI: 10.1182/blood-2012-01-407098)
2. Kyoko Hnanawa-Suetsugu, Mutsuko Kukimoto-Niino, Chiemi Mishima-Tsumagari, Ryogo Akasaka, Noboru Ohsawa, Shun-ichi Sekine, Takuhiro Ito, Naoya Tochio, Seizo Koshiha, Takanori Kigawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, AkihikoNishikimi, Takehito Uruno, Tomoya Katakai, Tatsuo kinashi, Daisuke Kohda, Yoshinori Tukui, and Shigeyuki Yokoyama. Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms. *Proc Natl Acad Sci USA*.28:109 (9):3305-10(2012)(DOI: 10.1073/pnas.1113512109)
3. Kusuda T, Uchida K, Miyoshi H, Koyabu M, Satoi S, Takaoka M, Shikata N, Uemura Y, Okazaki K. Involvement of Inducible Costimulator- and Interleukin 10-Positive Regulatory T Cells in the Development of IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *Pancreas*.2011;40(7):1120-1130.(DOI: 0.1097/MPA.0b013e31821fc796.)
4. Tomiyama T, Uchida K, Matsushita M, Ikeura T, Fukui T, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. Comparison of steroid pulse therapy and conventional oral steroid therapy as initial treatment for autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2011;46(5):696-704.(DOI: 10.1007/s00535-010-0361-y)
5. Kinashi, T. Overview of integrin signaling in the immune system. *Methods Mol Biol*. 757:261-78 (2012) (DOI: 10.1007/978-1-61779-166-6\_17)