

「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

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. 研究実施の概要

Rap1-RAPL-Mst1 シグナル伝達経路は免疫系において免疫担当細胞の動態制御に重要な役割を果たしている。RAPL, Mst1 の遺伝子欠損リンパ球は、LFA-1, $\alpha 4$ インテグリンを介する接着が低下し、リンパ球ホーミングの低下によるリンパ組織の低形成、辺縁洞 B 細胞減少、胸腺細胞移出低下などをしめすが、加齢とともに自己免疫症状を呈する。本研究では、接着制御分子 RAPL と Mst1 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。

H21 年度研究実施:

木梨グループ: 個体レベルの解析から RAPL 欠損マウス、Mst1 欠損マウスともに自己免疫様症状を呈するが、RAPL 欠損マウスは、主にループス型腎炎と B 細胞リンホーマを特徴とするリンパ球増殖性の病態であり、Mst1 欠損マウスは、RAPL 欠損マウスに比較して全身性の症状が強く、早期から活性化リンパ球が増加し、多臓器にリンパ球、形質細胞の浸潤があり、サイトカイン(IL-4, IL-17, IFN γ) 産生亢進、血清 IgG 量の増加と抗核抗体や胃壁、肺などに対する自己抗体が検出された。さらに共通してリンパ球の増殖亢進、胸腺内制御性 T 細胞の減少、胸腺細胞の選択異常が示めされた。今後、2 光子レーザー顕微鏡等を用いたイメージングの系を用いて自己寛容の破綻の原因を探る。

ヒト疾患との関連として IgG4 高値と多臓器にみられる形質細胞浸潤を特徴とする IgG4 関連疾患等の免疫疾患群における RAPL, Mst1 遺伝子の異常について解析を進めている。IgG4 関連自己免疫性膵炎においては、Naïve 制御性 T 細胞の減少が発症機序に関与する一方で、誘導・メモリー型制御性 T 細胞が増加していた。増加した制御性 T 細胞から分泌される IL-10 を介する B 細胞の IgG4 産生誘導の亢進している可能性が考えられた(岡崎サブグループ)。

片桐グループ: Rap1-RAPL-Mst1 シグナルによる動態制御の分子基盤を明らかにし、自己寛

容における役割を解明し、新たな自己免疫疾患の治療に役立てることを目指している。このため、インテグリンの接着制御に関与する Rab family GTPases のスクリーニングと、リン酸化プロテオミクスによって同定された Mst1 のリン酸化基質の解析を行った。その結果、ケモカインによって誘導される接着および遊走に重要な役割を果たす Rab 分子など複数のターゲット候補分子を突き止めた。

§ 2. 研究実施体制

(1)「木梨」グループ

① 研究分担グループ長:木梨 達雄(関西医科大学、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調べ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 研究分担グループ長:片桐 晃子(関西学院大学、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。

§ 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:接着制御分子 RAPL, Mst1 欠損マウスに生じる自己免疫様症状を解析し、イメージングによる実験系を開発する。

【方法】

マウス解析:RAPL 遺伝子欠損 (*rap1^{-/-}*) (C57BL/6 に 8 代 backcross)、Mst1 遺伝子欠損 (*Mst1^{f/f}*; CAG-Cre、Lck-Cre)マウス (C57BL/6 background) によって発生する自己免疫症状を高 IgG 値、自己抗体産生、サイトカイン産生亢進や、肺、肝臓、膵臓、腎、唾液腺などの組織におこる免疫細胞浸潤の組織学的検討を継時的に行い、臓器特異性や関与する免疫細胞を特定する。Mst1 の B 細胞特異的欠損マウス (*Mst1^{f/f}; mb1-Cre*) し、*Mst1^{f/f}; Lck-Cre* と比較検討する。

制御性 T 細胞の胸腺、末梢での発生、分化、免疫学的異常を継時的に調べる。

シグナル解析: *RAPL*^{-/-}, *Mst1*^{-/-}リンパ球について、ナイーブリンパ球の抗原受容体刺激による早期シグナル伝達、細胞周期解析、アポトーシスについて解析する。

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、過剰発現や、突然変異導入、*siRNA* による *knockdown* から接着、細胞極性、増殖、アポトーシスへの影響を調べる。

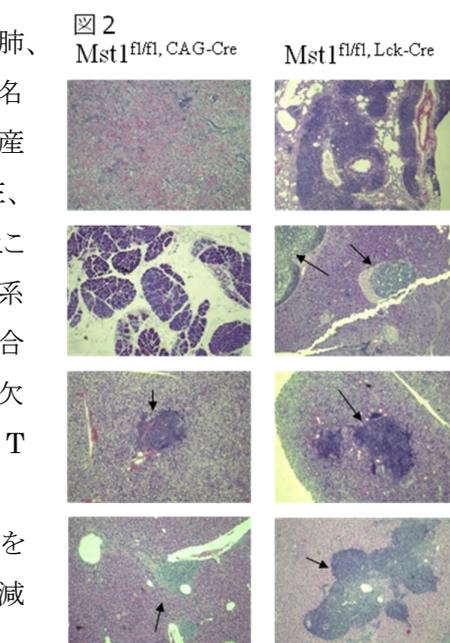
イメージング解析: 抗原認識過程を可視化し、接着制御分子欠損した T リンパ球、あるいは抗原呈示細胞による T 細胞の活性化への影響を調べる。H21 年度に導入した多光子レーザー(MP)顕微鏡を用いた膝下リンパ節の *in vivo* イメージングを用いて *Mst1* 欠損、*RAPL* 欠損によるリンパ球の動態を観察、定量化する。リンパ節初代ストローマ細胞を単層培養後、OT-II、OT-II/*Mst1*^{-/-}由来 T リンパ球と OVA ペプチド提示骨髄由来樹状細胞(APC)とともに培養しながらイメージングする系を用いて、T-APC の相互作用と T 細胞活性化を測定する。

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* のプロモータ領域にある CpG のメチル化を bisulfite 法で解析する。

【結果と結論、今後の予定】

RAPL 欠損マウスは、ループス型腎炎、肺炎、皮膚炎を呈し、抗 DNA 抗体陽性になり、リンパ球増殖性の病変、さらに B 細胞リンホーマが高頻度に発症した(図1)。*Mst1* 欠損マウスは、早期から *CD62L*⁻、*CD44^{hi}* の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、膵臓、腎臓等)にリンパ球、形質細胞の著大な浸潤があり(図2)、サイトカイン(IL-4, IL-17, IFN γ)産生亢進、血清 IgG 量の増加と肺における針状結晶の存在、抗核抗体や胃壁、肺などに対する自己抗体が検出されたことから自己免疫疾患を発症していると考えられる。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。しかし、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ことより、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

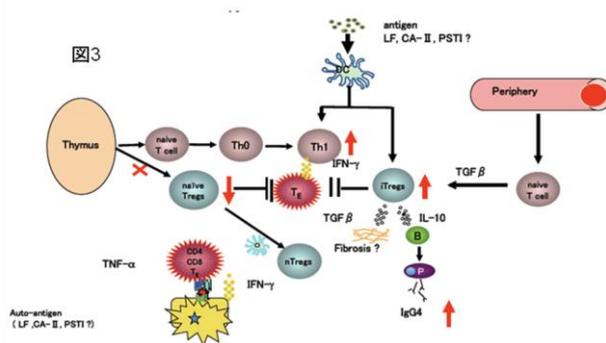


少しており、胸腺細胞の正の選択が障害されていた。それに対して負の選択については *HY male/Mst1^{-/-}* では CD4/CD8 細胞減少レベルがわずかに低下している程度であった。

制御性 T 細胞 (Treg) に関して *RAPL* 欠損、*Mst1* 欠損マウスともに胸腺内 Treg (Foxp3+CD4+CD25+) 数が減少していた。また、*Mst1* 欠損 Treg の抗原特異的抑制機能が低下していた。一方、*Mst1* 欠損 T リンパ球、*RAPL* 欠損ナイーブ T、B リンパ球の抗原受容体刺激による増殖は亢進していることが判明した。細胞周期解析から G1-S 期の亢進がおこっており、アポトーシスには変化がみられなかった。シグナル解析の結果、TCR の PI3 キナーゼ、NFκB、MAP キナーゼは正常であったが、*RAPL* 欠損リンパ球では p27Kip1 の局在が細胞質に偏在していたことからさらに関連を追及する。

2 光子レーザー顕微鏡等によるイメージングでは *RAPL*, *Mst1* のリンパ組織内移動の低下が低下していることが判明した (発表論文 1)。今後、抗原認識過程のイメージングに実験系を発展させる。そのため現在、リンパ節スライス、リンパ節ストローマ細胞と樹状細胞を用いた抗原応答過程のイメージング解析を進めている。また胸腺内の選択過程をイメージングするため、2 光子顕微鏡による胸腺スライス、および thymus organ culture のイメージング解析を進めている。

IgG4 関連疾患における免疫学的異常を制御性 T 細胞との関連を含めて解析を行い、自己免疫性膀胱炎においては、Naïve 制御性 T 細胞の減少が発症機序に関与する一方で、誘導・メモリー型制御性 T 細胞が増加していた。増加した制御性 T 細胞から分泌される IL-10 を介する B 細胞の *IgG4* 産生誘導の亢進している可能性が考えられた (図3)。*IgG4* 関連疾患と *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* 関連自己免疫性膀胱炎の患者検体から DNA を抽出し、プロモーターメチル化を解析中である。



§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

・論文詳細情報

1. Ebisuno Y, Katagiri K, Katakai T, Ueda Y, Nemoto T, Inada H, Nabekura J, Okada T, Kannagi R, Tanaka T, Miyasaka M, Hogg N, Kinashi T Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in *RAPL*-dependent and -independent manners. *Blood* 115(4): 804-814. 2010 DOI 10.1182/blood-2009-03-211979
2. Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T, Shimosegawa T, Tanaka M; Working members

- of Research Committee for Intractable Pancreatic Disease and Japan Pancreas Society. Japanese consensus guidelines for management of autoimmune pancreatitis: I. Concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2010 Jan 20. DOI 10.1007/s00535-009-0184-x
3. Kawa S, Okazaki K, Kamisawa T, Shimosegawa T, Tanaka M; Working members of Research Committee for Intractable Pancreatic Disease and Japan Pancreas Society. Japanese consensus guidelines for management of autoimmune pancreatitis: II. Extrapancreatic lesions, differential diagnosis. *J Gastroenterol*. 2010 Feb 2. DOI 10.1007/s00535-009-0197-5