

## ■2019年度 研究ブランディング事業年次計画進捗報告書

講座・部門名：分子遺伝学部門

研究代表者：木梨達雄

### 2019年度実施項目

#### 1. 研究目標 (提出計画書に基づき記載)

- ・ヒト化マウスを用いて免疫による T 細胞発生促進の機序を明らかにする。
- ・ T 細胞における Rap1 シグナル改変による接着および分化・増殖を明らかにする。
- ・炎症モデル (肺、神経、皮膚、腸管等) を樹立して、Rap1 シグナル改変による効果を明らかにする。
- ・一分子解析による LFA-1/ICAM-1 結合を調節する機構について明らかにする。
- ・インテグリン阻害薬候補を選定する。

#### 2. 2019年度研究進捗・成果 (論文、学会発表を含む)

- (1) ヒト化マウス：免疫による T 細胞発生促進の機序を明らかにする。

ヒト臍帯血由来 CD133 陽性細胞を移植したヒト化マウスでは免疫刺激によって HLA-DR 陽性ヒト由来樹状細胞の集積により正の選択がおり、末梢の T 細胞数の増加および機能成熟が亢進した。さらに HLA-DR 依存的胸腺細胞の増殖や、アロ抗原依存的増殖が観察され、HLA-DR 抗体によって阻害された。HLA-DR 陽性細胞は Sirpa1+HLA-DR+樹状細胞であることが判明した。胸腺組織内のヒト胸腺細胞とヒト樹状細胞が接着を誘導する Rap1 活性化を伴って接触する様子が観察された。これらのことよりヒト MHC を transgene として導入しなくても免疫的に成熟したヒト化マウスを作成できることが判明した (論文準備中)

・皮膚炎症モデルとしてイミキモド (IMQ) 誘発乾癬モデルマウスを樹立した。IMQ クリームを耳介に塗布し、回数・用量をかえ耳介の厚さを測定し、適切な量を決定した。多発性硬化症のマウス実験モデルとしてミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 抗原により誘導される実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を C57BL/6 マウスを用いて適切な抗原量とアジュバントを決定した。さらに免疫抑制剤 (シクロスポリン等) や LFA-1 阻害剤 (Lifetegraft) の効果を検定を行っている。腸炎モデルとして DDS による大腸炎誘導系を用い、粘膜固有層の細静脈血管内皮への接着をイメージングする系を確立した。

・一分子解析による LFA-1/ICAM-1 結合を調節する機構： talin1 および kindlin3 と LFA-1 を構成する  $\beta 2$  インテグリンの細胞内領域 ( $\beta 2CT$ ) との結合特性と動態を測定し、 talin1 の結合動態が LFA-1/ICAM-1 の結合動態と一致すること、 kindlin3 は talin1 結合より短く、さらに膜近傍領域と相互作用すること、このプロセスが高親和性 LFA-1/ICAM-1 結合を誘導していることが判明した。また高親和性 LFA-1/ICAM-1 を介して Rap1 が局所的に活性化し、ICAM-1 結合頻度が増加すること、およびそれに関与する Rap1 活性化因子を同定した。

(論文準備中)

・インテグリン阻害薬候補のスクリーニング:  $\beta$ 2CT と talin1 の結合部位の構造的解析データを用いて in silico スクリーニングの系を確立した。約3万個以上の低分子化合物から候補分子を複数同定した。 $\beta$ 2CT と talin1、kindlin3 との結合に関して蛋白質間相互作用を迅速に測定できるハイスループット $\alpha$ スクリーニングの系を樹立した (AMED に申請中)

(発表論文)

1. Konishi Y, Terai K, Furuta Y, Kiyonari H, Abe T, Ueda Y, Kinashi T, Hamazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda M. iScience. 2018 Dec 21;10:98-113.
2. Bogdanova D, Takeuchi A, Ozawa M, Kanda Y, Rahman MA, Ludewig B, Kinashi T, Katakai T. J Immunol. 2018 Dec 15;201(12):3580-3586.
3. Kanda Y, Takeuchi A, Ozawa M, Kurosawa Y, Kawamura T, Bogdanova D, Iioka H, Kondo E, Kitazawa Y, Ueta H, Matsuno K, Kinashi T, Katakai T. J Immunol. 2018 ;201(3):1062-1072.

(学会発表)

1. 木梨達雄 白血球インテグリン接着のメカニズムと炎症性腸疾患への応用 第56回日本消化器免疫学会総会 2019/8/2 Kyoto 招待講演
2. Y Kamioka, Y Ueda, N Kondo, T Kinashi, Roles of Rap1 signaling in lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes, The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2019. (第48回 日本免疫学会学術集会 2019) 2019/12/12 Hamamatsu
3. Y Ueda, K Higasa, Y Kamioka, N Kondo, T kinashi, Rap1 accelerates T cell polarity formation via the enhancement of Rho-Rock pathways, The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2019. (第48回 日本免疫学会学術集会 2019) 2019/12/12 Hamamatsu

3. 2019年度ブランディング目標 (提出計画書に基づき記載)

知財課等と連携して、研究成果に関する特許、企業とのコラボレーションを探る。

研究医養成コース学生指導を継続し、学会発表を指導する。さらに学術祭、オープンキャンパスを通して、研究成果について学生、教職員、保護者への周知を図る。

4. 2019年度ブランディング活動進捗・成果 (メディア、その他)

キック保父シンポジウム、学術祭にて研究ブランディング活動の紹介を他の参画講座教員とともに行った。また研究医養成コース学生の指導をおこなった。

インテグリン阻害薬開発について AMED に申請している。

5. 自己評価 (達成度、改善点など) :

研究に関してほぼ計画通りに進行しており、ヒト化マウスの免疫増強のメカニズム、一分子解析と構造解析に基づいた創薬系の樹立、それを検証する炎症モデル系の樹立など、全体的な戦略に基づいた進行はほぼ達成できている。