

### 研究成果報告書の概要

講座等名	分子遺伝学部門	事業推進者名	木梨 達雄
所属部門	がん部門		
分担研究課題	リンパ節のホーミングの分子機構に関する研究		
キーワード	ケモカイン、抗原受容体、インテグリン、細胞移動		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	7名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）  木梨達雄・教授（研究統括）  植田祥啓・講師（胸腺内動態）  上岡裕治・講師（リンパ球動態）  近藤直幸・助教（免疫シナプス）  池田幸樹・助教（薬剤探索）  福原貴太郎・研究員（リンパ球動態）  堀谷俊介・研究員（リンパ球動態）2020年9月～</p>			
<p>研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について）</p> <p>Rap1 によって制御される T 細胞動態はその分化・成熟、抗原認識やホーミングに重要な役割を果たしている。Rap1 欠損による胸腺の制御性 T 細胞の産生低下にはインテグリン依存的な接着動態の異常が関与する可能性がある。そこで Rap1 欠損マウスから胸腺 CD4 単陽性 T 細胞を単離して蛍光ラベルし、胸腺スライスに導入して髄質における動態を 2 光子励起レーザー顕微鏡によるライブイメージングにより測定した。その結果、Rap1 欠損マウス由来の CD4 単陽性 T 細胞は野生型に比べ移動速度が低下し、また、移動の直線性が失われていた。末梢の T 細胞の動態をリンパ節スライスの系によって検討したところ、胸腺細胞と同様の結果が得られた。したがって Rap1 欠損胸腺および末梢 T 細胞は動態異常による抗原探索の効率の低下が起こっていると考えられる。Rap1 欠損 T 細胞における動態異常の原因を突き止めるためにケモカイン刺激時の細胞極性の効率をイメージストリームによる F-actin と CD44 の染色像を多量に撮影して解析ところ、野生型に比べ、細胞極性の効率が顕著に低下することが明らかとなった。さらにケモカインに対するケモタキシスを測定したところ、低下していた。以上のことから、Rap1 はインテグリン依存的な接着のみならず、細胞極性の形成を促進することにより T 細胞の動態を制御していることが明らかとなった。Rap1 による細胞極性の制御機構を明らかにするために、細胞極性の制御分子である Rho family GTPase の活性を測定したところ、RhoA の活性化が低下していることが明らかになりつつあり、Rap1 が RhoA を介して細胞極性を促進している可能性が示唆される。</p> <p>リンパ節へのホーミングにおいて、Kindlin-3 欠損 T 細胞はリンパ節 HEV で arrest する割合が野生型の約 3 割程度、Rap1a/Rap1b ダブル欠損および Talin-1 欠損 T 細胞は HEV で arrest（停止）する割合が野生型の約 1 割以下であることがこれまでに判明した。その理由を調べるため、in vitro の Flow assay 系および <sup>125</sup>I を用いたラジオアイソトープ実験で HEV での接着分子リガンドの種類やその濃度を推定した。T 細胞動態を制御する Rap1 シグナルをより詳細に解析するため、Rap1 の上流に位置する活性化因子 GEF（グアニンヌクレオチド交換因子）の C3G、RasGRP2 それぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスの解析し、C3G、RasGRP2 がそれぞれ機能する時空間的な違いを Flow assay 系で調べた。また、Rap1 の不活性化因子にも注目し、RASA3、SIPA1 それぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスの解析を進めた。RASA3、SIPA1 のダブル KO T 細胞においては、ケモカイン刺激なしで接着分子リガンドに結合できるほどに Rap1 が活性化することがわかった。</p> <p>リンパ節内での抗原認識に伴う細胞間接着の詳細な分子制御機構を解明する目的で、LFA-1 を発現するリンパ球に、光安定性の高い蛍光物質と細胞内で共有結合する HaloTag と Talin1/Kindlin-3 を融合させたタンパク質を排他的に発現させ、全反射顕微鏡を用いてビデオレート撮像することにより Talin1 と Kindlin-3 の細胞内一分子動態を世界に先駆けて可視化することに成功した。Talin1 と Kindlin-3 は LFA-1 に対して異なる結合速度を示し、どちらも LFA-1-ICAM-1 相互作用に誘起される強い Rap1 の活性化を伴う outside-in シグナル依存的に LFA-1 との結合が大きく促進</p>			

されることが明らかになった。

インテグリン活性化とそのシグナル伝達機序の詳細を調べるためにインテグリンを阻害する薬剤の探索を行なった。T インテグリン及びその複合体の構造情報に対して結合可能な薬剤分子について、*in silico* ドッキングシミュレーションを行い、複数の候補薬剤分子を選出した。それらの薬効について *in vitro* 試験を行ったところ、インテグリンの活性化を阻害する薬剤の同定に至った。今後は、本薬剤によるインテグリン阻害によって細胞シグナルがどのように変化するかについて解析する。

優れた成果があがった点

1. Rap1 シグナルによる胸腺細胞や T 細胞の細胞動態の調節のメカニズムがライブイメージングや定量的かつ大規模な細胞極性解析により明らかとなった。
2. Rap1a/Rap1b ダブル欠損 T 細胞、Kindlin-3 欠損 T 細胞、Talin-1 欠損 T 細胞の HEV へのホーミングの違いをさらに解析し、接着分子リガンドの種類やその濃度を推定した。
3. Talin 1 と Kindlin-3 の生きたリンパ球内での分子動態が初めて明らかになり、LFA-1 を介した免疫細胞間接着のコアとなる制御原理の一端が解明された。
4. インテグリンの機能を阻害する新規薬剤を取得した。