

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	6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）</p> <p>木梨達雄・教授（研究統括）</p> <p>植田祥啓・講師（胸腺内動態）</p> <p>上岡裕治・講師（リンパ球動態）</p> <p>近藤直幸・助教（免疫シナプス）</p> <p>池田幸樹・助教（薬剤探索）H30年10月入職</p> <p>福原貴太郎・研究医員（リンパ球動態）</p>			
<p>研究成果の概要（平成29・30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。</p> <p>リンパ節へのホーミングに関しては、Rap1 シグナルの下流因子である Kindlin-3, Talin-1 についても解析を行った。Rap1a/Rap1b ダブル欠損、Kindlin-3 欠損、または Talin-1 欠損 T 細胞を用いてリンパ節スライス内での局在解析および各種リンパ組織における細胞組成解析を行った。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 割である一方、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判明した。さらにホーミングを再構成する <i>in vitro</i> 実験系では、Rap1a/Rap1b ダブル欠損、Kindlin-3 欠損、Talin-1 欠損 T 細胞でローリングは正常であるが、arrest ができないことが判明した。</p> <p>リンパ節内での T 細胞-抗原提示細胞間における抗原認識過程への影響を調べる目的で、抗原提示細胞を模した平面脂質二重膜と、LFA-1 細胞内領域の Talin-1 結合部位変異体ノックイン T 細胞や Kindlin-3 ノックアウト細胞を用いた免疫シナプス解析を行った。その結果 Talin-1, Kindlin-3 の LFA-1 への結合阻害により免疫シナプスの形成は低下することが明らかになった。またこれらの T 細胞を用いて LFA-1-ICAM-1 相互作用の免疫シナプス上での一分子結合時間計測を行ったところ、Talin-1, Kindlin-3 は LFA-1-ICAM-1 の結合時間の長期化と頻度の上昇に寄与していることが解明された。</p> <p>Talin-1 によるインテグリン活性化機序の詳細を調べるために Talin-1/インテグリン間結合を阻害する薬剤の探索を行なった。Talin-1/インテグリン複合体の構造情報に対して、結合部位特異的に結合可能な薬剤分子について <i>in silico</i> 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。それらの薬剤について大阪歯科大学・牧田講師の助力の下、薬剤合成を行い、その効果について LFA-1 を発現させた Ba/F 細胞を用いて ICAM-1 への接着能を検証した。結果、2 種の薬剤において細胞の接着能が減退したことから、これらの薬剤は Talin-1/インテグリン間の結合を阻害する薬剤である可能性が示唆された。今後は、本薬剤が Talin-1/インテグリン間の結合に直接作用していることを示した上で、薬剤による Talin-1/インテグリン結合急性阻害においてインテグリン活性化がどのように変化するかについて解析する。</p>			

優れた成果があがった点

1. Ex vivo の動態観察により、胸腺・末梢ともに Rap1a/Rap1b ダブル欠損 T 細胞の移動の異常が認められ、よって Rap1 が T 細胞の移動に重要な役割があることが直接明らかとなった。
2. Rap1a/Rap1b ダブル欠損 T 細胞、Kindlin-3 欠損 T 細胞、Talin-1 欠損 T 細胞の解析によって、Rap1 シグナルがリンパ球ホーミングでの停止過程に必須であることが明らかになった。また in vivo の解析から Kindlin-3、Talin-1 の機能には違いがあることがわかった。
3. Talin-1 と Kindlin-3 が LFA-1 に直接作用し LFA-1-ICAM-1 相互作用の長さや頻度を直接結合することにより LFA-1 の活性化を行うことが解明された。またこの活性化により免疫シナプスの形成が促進されていることが示された
4. Talin-1/インテグリン間の結合を阻害する可能性の高い薬剤候補群が得られた。