

免疫動態を制御する分子機構の解明

片桐晃子

北里大学理学部生物科学科 免疫学講座

【研究の背景】

動的監視システムである免疫系は、活発に移動する免疫細胞が創出する生態系に支えられている。すなわち、皮膚や粘膜など外界と接する組織に存在する見張り役の樹状細胞は感染が起きると、外敵を捉え、リンパ管を通してリンパ節へ移動し、リンパ球へその情報を伝える。血流に乗って全身を移動しているリンパ球は、抗原情報を受け取るために、リンパ節内に存在する特殊な血管、高内皮細静脈 (HEV) 上で停止し、血管内皮細胞間を通り抜けてリンパ節内に入る (ホーミング)。リンパ節内では、自分の抗原受容体が認識する、特異抗原を提示する樹状細胞を探索し、特異抗原と出会うと活性化されエフェクター細胞へ分化する。抗原を受け取らなかったリンパ球は輸出リンパ管から出て胸管から血流に戻り、再度リンパ節へ移動するということを繰り返す (リンパ球再循環) が、エフェクター細胞へ分化した細胞は、血流に戻るが、HEV ではなく、炎症血管を特異的に認識して停止し、感染組織へ移動する。このように免疫システムは、免疫細胞の全身移動と適切な場所での停止のダイナミックな調和によって成り立っている。

血流を介して全身を移動しているナイーブリンパ球は、リンパ節内の HEV に到達すると多段階の接着反応を介して血管内皮細胞上で停止する。すなわち、まず、リンパ球は L-selectin を介して、血管内皮細胞上の糖鎖 (Sulfated SialylLewis^x) に接着し、ローリングすることによって減速する。この間に、血管内皮細胞上に提示されたケモカインからの刺激によって、インテグリン (主に LFA-1: $\alpha_L\beta_2$) を介する接着が誘導され停止する。引き続いて、細胞極性形成と活発な細胞移動が起こり、血管内皮細胞を通り抜けてリンパ節内に入る。この一連の反応 (接着カスケード) は連続して順番に生じる必要がある。一方、リンパ節内で特異抗原に出会いエフェクター細胞へ分化すると、L-selectin の発現は低下し、HEV 上ではローリングせず、炎症血管に発現する P-selectin 上をローリングし、LFA-1 或いは VLA-4 を介して停止することが分かっている。また、腸管組織では、粘膜固有層にある後毛細血管内皮上に発現する MadCAM-1 上を、リンパ球は $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを介してローリングし停止することが報告されている。低分子量 G タンパク質 Rap1 がインテグリンの接着上昇に関与することをこれまで報告されているが、これらの接着カスケードを介する経血管内皮移動を生体内でどのように制御しているのか全容は明らかになっていなかった。

【目 的】

免疫システムは、活発な免疫細胞の生体内移動を基盤としており、時空間的に厳密に制御されることで、生体防御機能を発揮できる。Rap1-GTP に結合する下流標的分子の RAPL-Mst1 の欠損マウスは、末梢リンパ節へのホーミングが低下し、リンパ組織が低形成になることを我々は報告してきた。本研究課題では、Rap1 自身を T 細胞のみで欠損したマウスを作製し、T 細胞のダイナミズムにおける Rap1 の役割と、その欠損が免疫システムの恒常性維持に与える影響を検討した。

【方 法】

Rap1a のエクソン 2-3 を flox で挟んだマウス (Rap1a^{flox}) と Rap1b のエクソン 1 を flox で挟んだマウス (Rap1b^{flox}) を、lck-cre 或いは CD4-cre マウスと掛け合わせて、T 細胞でのみ Rap1a 及び b をダブルノックアウトしたマウスを作製した。これらのマウスのリンパ組織の T 細胞数及びサブセットを flowcytometry を用いて解析をした。ナイーブ T 細胞を精製し、in vitro で L-selectin/LFA-1 依存性の接着カスケード (rolling, arrest, firm adhesion) を、Sulfated SialylLewis^x 及びマウス ICAM-1 を発

現する血管内皮細胞上を血流と同じ速度で流し、それをビデオレートで撮影し、メタモルフソフトウェアを用いて自動単一細胞追跡することで、定量解析した。また、生体顕微鏡を用いてマウスの腸管リンパ節の HEV 上での接着カスケードを観察した。*in vitro* でエフェクター細胞へ分化誘導し、P-selectin、MadCAM-1 上での接着カスケードについてもそれらを発現する血管内皮細胞を作製し、同様に解析した。Short homing assay のため、f/fT 細胞と-/-T 細胞を異なる蛍光色素でラベルし、正常マウスへ静脈注射により投与し、ナイーブ T 細胞は末梢リンパ節、エフェクター T 細胞は大腸へのホーミング能力を、flowcytometry を用いて解析した。

【結 果】

1) Rap1 欠損により、T 細胞の末梢リンパ節での細胞数は、10%以下になった。一方、血中における T 細胞数が有意に増加し、ホーミング能力の低下が示唆された。2) f/f 及び -/- T 細胞を精製し、short homing assay で末梢リンパ節への移行能力を比較したところ、Rap1 欠損ナイーブ T 細胞のホーミング活性は正常 T 細胞に比較し 10%以下であることが判明した。3) ナイーブ T 細胞の接着カスケードにおける Rap1 の機能を明らかにするために、*in vitro* システムを用いて検討したところ、Rap1 欠損によって予想通りインテグリン依存性の arrest 及び firm adhesion は顕著に低下したが、L-selectin を介する rolling が有意に上昇することが判明した。また、精製 L-selectin リガンド上でも Rap1 欠損 T 細胞は、正常に比べ、約 10 倍の頻度で rolling することがわかった。4) ナイーブ T 細胞の生きたマウスの腸管リンパ節の HEV 上での接着カスケードを、生体顕微鏡を用いて観察したところ、f/f T 細胞は HEV 上に firm adhesion し蓄積するが、-/- T 細胞は firm adhesion することができないことが確かめられた。5) *in vitro* でナイーブ T 細胞をエフェクター T 細胞へ分化させ、P-selectin 及び MadCAM-1 を発現させた血管内皮細胞上での接着カスケードを解析したところ、Rap1 欠損によっていずれの場合でも rolling が有意に上昇していることがわかった。6) 大腸粘膜固有層へのホーミング能力を比較したところ、正常エフェクター T 細胞に比べ、Rap1 欠損エフェクター T 細胞では、約 4 倍に上昇していることがわかった。7) Rap1-GAP (GTPase activating protein) の Spa1 及び優性抑制型 Rap1N17 の過剰発現でも rolling の上昇は認められなかったことから、Rap1-GDP が rolling を抑制しており、それがないことで rolling が亢進していると考えられた。8) T 細胞でのみ Rap1 欠損させると、homing 低下による末梢リンパ節における lymphopenia と homeostatic proliferation により T 細胞は 8 週令以後、エフェクター化し、Th1 及び Th17 細胞へ分化する。これらのエフェクター T 細胞は、大腸へのホーミングが亢進しているため、粘膜固有層に集積し、激しい大腸炎及び高度異型アデノーマを発症することがわかった。

【考 察】

Rap1 は、GTP 結合型がインテグリンの接着上昇に重要である、一方、GDP 結合型はローリングを抑制していることが判明した。これらの Rap1 のふたつの機能は、末梢リンパ組織の T 細胞恒常性に中心的な役割を果たすとともに、微炎症状態の腸管免疫システムのトレランスを維持する上でも重要であることがわかった。従って、Rap1 の欠損は腸管免疫寛容の破綻により、慢性炎症性疾患を発症することが判明した。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで大腸炎モデルマウスとして、デキストラン硫酸塩 (DSS) などの投与によって強制的に炎症を誘導する T 細胞非依存性のモデルしか存在しなかった。大腸炎を自然発症するモデルマウスは、その制御因子の同定、薬剤の効果評価などに有用であると考えられる。また、慢性炎症から腫瘍形成までの過程を追跡できるので発癌メカニズムの解明にも役立つと期待される。

【参考・引用文献】

Ishihara S, Nishikimi A, Umemoto E, Miyasaka M, Saegusa M, Katagiri K. Dual functions of Rap1 are crucial for T-cell homeostasis and prevention of spontaneous colitis. *Nature Communications*. in press, 2015.