

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16011

研究課題名(和文) Rap1不活化制御による制御性T細胞の動態調節とその破綻による腸炎病態への影響

研究課題名(英文) Regulation of regulatory T cell dynamics by Rap1 inactivation regulators and its effect on the pathogenesis of colitis

研究代表者

堀谷 俊介(Horitani, Shunsuke)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90701649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量G蛋白質Rap1は、インテグリンを介したリンパ球の接着・輸送に必須であるが、Rap1不活性化の生理的役割は不明である。Rasa3, Sipa1二重欠損(DKO)T細胞は自発的なRap1の活性化と接着を誘導し、強固な接着により肺毛細血管に捕捉されたが、中和抗体によるLFA1の阻害、talin1やRap1の欠損で肺への捕捉は阻害された。さらに、DKO T細胞はリンパ節で高い運動性を維持し、リンパ節実質に頻りに戻りリンパ節からの移出が破綻していることがわかった。本研究により、Rap1不活化制御がT細胞の接着・輸送を調節し、T細胞の再循環に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、円滑なT細胞の再循環にはRap1を抑制して不必要なインテグリンの活性化を防ぐ必要があることが明らかとなった。

Rasa3とSipa1によるRap1の不活性化制御が生体内でのT細胞の接着・移出過程を調節し、T細胞の再循環に重要な役割を果たしていることを明らかとなり、これらの分子を標的とした免疫調節薬の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Rap1-GTPase is essential for integrin activation and lymphocyte trafficking. We showed that Rasa3 and Sipa1 are crucial lymphocyte trafficking regulators that inactivate Rap1 by using T-cell-specific Rasa3 and Sipa1 double knockout mice (DKO). DKO T cells induced spontaneous Rap1 activation and adhesion. Due to firm adhesion to capillary beds, DKO T cells were consequently trapped in the lung, however lung sequestration was rescued by inhibition of LFA1 with neutralizing antibodies or loss of talin1 or Rap1. DKO T cells exhibited normal extravasation into lymph nodes, rapid interstitial migration, increased chemotactic responses to CCL21 and sphingosine-1-phosphate, and entry into lymphatic sinuses. However, DKO T cells severely delayed exit. DKO T cells retained high motility in lymphatic sinuses and frequently returned to the lymph node parenchyma, resulting in defective egress. These results reveal the critical trafficking processes that require Rap1 inactivation.

研究分野：消化器内科

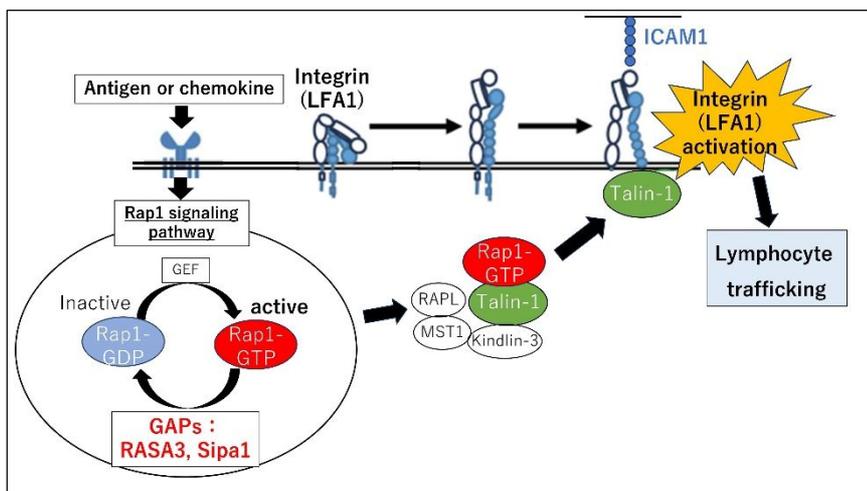
キーワード：Rap-GAP T cell trafficking integrin lung Rap1 LFA1 T-cell recirculation egress

1. 研究開始当初の背景

Tリンパ球は獲得免疫の中心で、抗原を認識すると活性化して免疫系を誘導・調節します。Tリンパ球は、全身の血管系とリンパ系の間を再循環しながらリンパ節を移動し、外部から侵入してくる抗原を絶えず監視しています。リンパ球がリンパ節などの二次リンパ組織や炎症組織へ移動することをホーミングと呼び、出ていくことを移出と言います。これらの過程で接着分子インテグリンは重要な役割を果たしています。リンパ節には高内皮細静脈(HEV)とよばれるリンパ球の入り口となる特殊な血管があり、T細胞はこの血管からリンパ節内に入り、ホーミングします。HEV表面にはTリンパ球を捕捉するためのシアリルルイスXと呼ばれる糖鎖およびインテグリンのリガンド接着分子ICAM-1などがでています。HEVに到達したTリンパ球はLセレクトリンと呼ばれる表面タンパクにより糖鎖と弱く結合して血管上を転がり、ケモカインからシグナルが入るとインテグリンが活性化してHEV上のICAM-1と結合して停止します。停止したリンパ球は、HEVを構成する血管内皮の間を通過してリンパ節の実質内に移動します。実質に到達したTリンパ球は実質内を移動して、自分が持つ抗原受容体に一致する抗原を提示する樹状細胞を探索します。その抗原が見つければ活性化してエフェクター細胞に分化します。リンパ節実質のTリンパ球はスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)に対する走化性反応によりリンパ節内のリンパ洞へ移動し、リンパ液に乗ってリンパ節から脱出し、リンパ系を通過して胸管から血液循環に戻ります。

低分子量G蛋白質 Rap1 は、抗原刺激やケモカイン刺激によるインテグリンを介したリンパ球の接着や極性形成に重要な役割を果たします。ケモカインによって活性化された Rap1 はインテグリン活性化因子 talin1 と kindlin3 をインテグリンの細胞内領域に結合させてインテグリンを活性化し、細胞間接着を誘導します。この過程は、HEV上でのTリンパ球の停止に不可欠であり、Rap1 や talin1 の欠損はリンパ球のホーミングに深刻な障害を引き起こします。Rap1 は、GTP 交換因子(GEF)によって活性化され、GTPase 活性化タンパク(GAP)により不活性化されます。リンパ球にはこの Rap への GAP 活性をもつ Signal-Induced Proliferation-Associated 1 (Sipa1) Ras GTPase-activating protein 3 (Rasa3) が発現しており、それぞれ、Sipa1 は癌の転移や自己免疫を促進し、Rasa3 は接着増強を原因とする血小板減少が生じることが報告されています。近年、

Tリンパ球で Rasa3 を欠損させると、ICAM-1 への結合が増加し、生体内のT細胞の移動に障害が出るということが報告されましたが、その調節メカニズムは明らかになっていません。我々は、生体内の Rap1 不活性化の重要性を調べるためにT細胞特異的な Rasa3 と Sipa1 二重欠損マウス(DKO)を作製しました。



2. 研究の目的

生体内の Rap1 不活性化因子(Rasa3, Sipa1)の重要性を調べるために以下の実験を計画しました。まず、作成した Rasa3, Sipa1 二重欠損マウス(DKO mouse)の性質・特徴を調べるために表現型解析を行いました。続いて、DKO T細胞のリンパ組織、非リンパ組織、末梢血へのホーミング効率を調べるため、DKO T細胞のマウスへの静脈投与による移入実験を行いました。その結果をふまえ、DKO T細胞の非リンパ組織へのホーミングにおける LFA1、Rap1、tal in1 の重要性・役割を調べることを目的とし、さらに、DKO T細胞のリンパ節(LN)からの移出能を調べることにしました。

3. 研究の方法

表現型解析のため、6-24 週齢の DKO mouse の表在リンパ節、脾臓、末梢血を採取し、Flow cytometry および Immunohistochemistry にて野生型(WT)との比較を行いました。続いて、DKO T細胞の表在リンパ節、脾臓、末梢血および非リンパ組織へのホーミング効率を調べるため、精製した DKO T細胞をマウスに静脈投与し、それぞれの組織への移行を調べた。結果、肺の毛細血管に接着して滞留し、リンパ組織に到達しづらくなることがわかりました。肺の毛細血管にはインテグリン LFA 1 のリガンドである ICAM-1 が高発現しており、中和抗体による LFA1 の阻害や

tal in1 や Rap1 の欠損により、DKO T細胞の肺への捕捉を阻害できるかどうか調べました。さらに、DKO T細胞のリンパ節から移出する過程を調べるため、リンパ節の髄質領域の二光子励起レーザー顕微鏡を用いたリンパ洞内ライブ組織イメージングを行い、リンパ節内におけるDKO T細胞の動きを観察しました。

4. 研究成果

DKO mouse の表現型解析にて、胸腺のT細胞の分化・産生に影響がないものの、末梢血やリン

パ組織でT細胞数が著しく低下することが明らかとなりました(図1)。このマウスのT細胞では抗原刺激やケモカインの活性化がなくても、Rap1が自発的に活性化し、インテグリンを介した接着が起こりました(図2, 3)。このT細胞のリンパ節への移動を

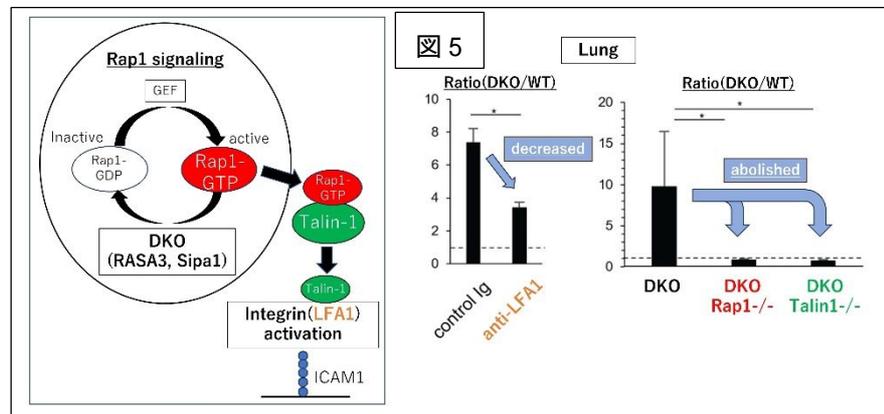
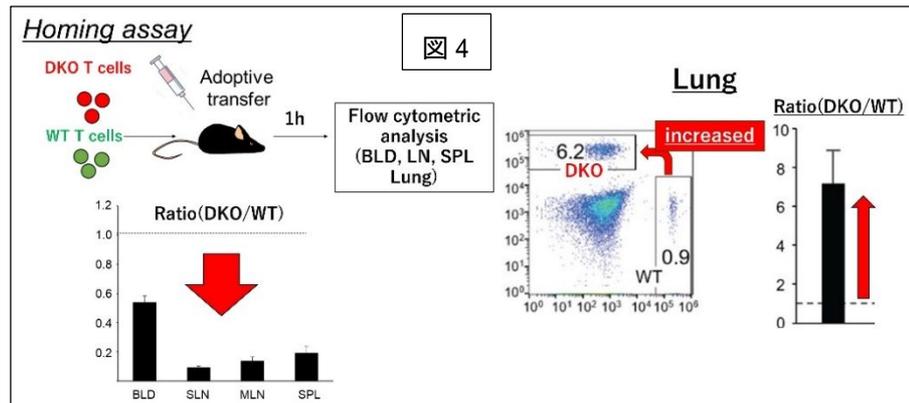
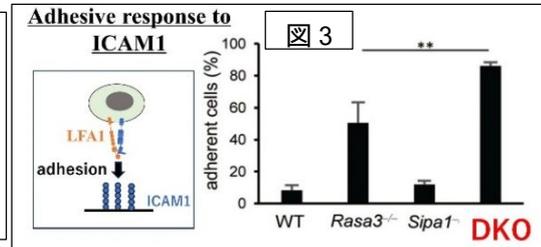
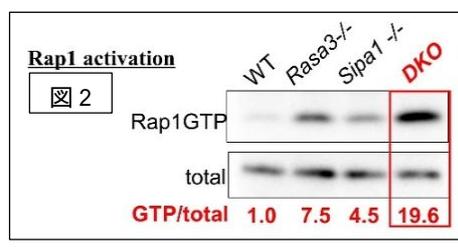
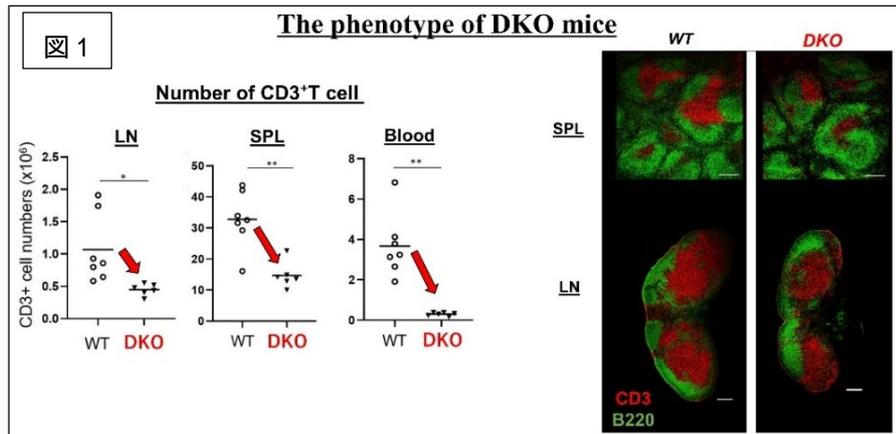
検討するために蛍光標識してマウスに静脈投与したところ、肺の毛細血管

に接着して滞留し、リンパ組織に到達しづらくな

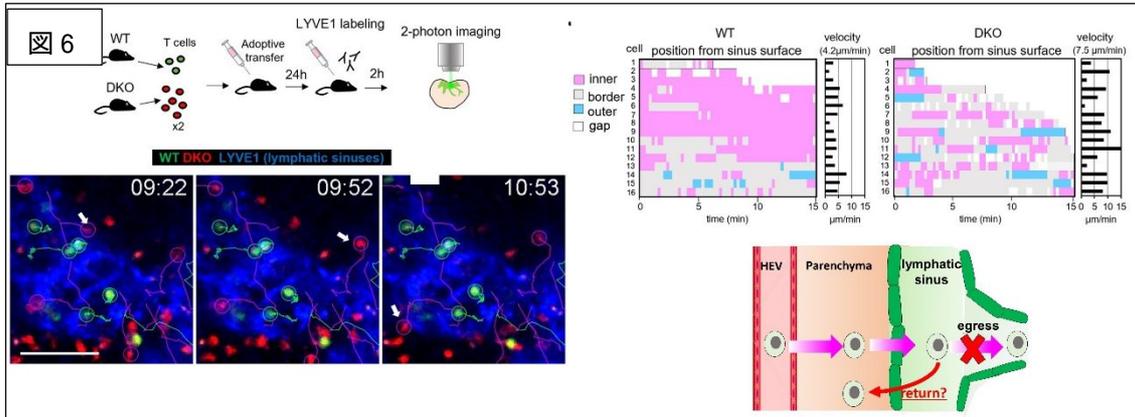
ることがわかりました(図4)。肺の毛細血管にはインテグリンLFA1のリガンドであるICAM-1が高発現しており、中和抗体によるLFA1の阻害やtal in1 や Rap1 の欠損により、DKO T細胞の肺への捕捉を阻害できることから、DKO T細胞はRap1の活性化によりインテグリンが活

性化されて肺の毛細血管に接着してしまうことが明らかとなりました(図5)。さらに、DKO T細胞ではリンパ節から移出する過程が破綻していることが明らかとなりました。リンパ節の髄質領域の二光子励起レーザー顕微鏡を用いたリンパ洞内ライブ組織イメージング

から野生型のT細胞ではリンパ洞で動きが低下するのに対して、DKO T細胞はリンパ洞で高い運動性を維持し、リンパ洞内からリンパ節実質に頻繁に戻ることが観察されました。よって正常のT細胞ではリンパ洞内で動きを止め、リンパ液に乗ってリンパ節から出ていくのに対し、DKO T細胞はリンパ洞内でも動きが保たれるため、リンパ洞から実質へ戻ってしまうことによりリンパ節から移出しにくくなっていると考えられます(図6)。これらの結果から、円滑なT細胞の



再循環には Rap1 を抑制して不必要なインテグリンの活性化を防ぐ必要があることが明らかになりました。



本研究により、Rasa3 と Sipa1 による Rap1 の不活性化制御が生体内での T 細胞の接着・移出過程を調節し、T リンパ球の再循環に重要な役割を果たしていることを明らかとなりました。これらの分子を標的とした免疫調節薬の開発に寄与することが期待されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horitani Shunsuke, Ueda Yoshihiro, Kamioka Yuji, Kondo Naoyuki, Ikeda Yoshiki, Naganuma Makoto, Kinashi Tatsuo	4. 巻 14
2. 論文標題 The critical role of Rap1-GAPs Rasa3 and Sipa1 in T cells for pulmonary transit and egress from the lymph nodes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1234747	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀谷俊介
2. 発表標題 The critical role of RapGAPs in T cell recirculation and egress from lymph node.
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀谷俊介
2. 発表標題 Rap1-GAPs Rasa3 and Sipa1 are required for pulmonary transit and egress from the lymph nodes in T cells.
3. 学会等名 第52回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------