

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19123

研究課題名(和文) T細胞補助シグナル伝達の新規制御分子IQGAP1の機能解析

研究課題名(英文) IQGAP1 regulates OX40 costimulatory signaling in CD4+ T cells

研究代表者

奥山 祐子 (Okuyama, Yuko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50624475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IQGAP1はOX40L刺激依存的にOX40と相互作用することを見出した。さらに、IQGAP1のカルボキシル末端領域(IQGAP1-C)がTRAF2を介して相互作用することを突き止めた。IQGAP1欠損マウス由来のCD4陽性T細胞では、OX40L刺激依存的なサイトカイン産生が亢進した。IQGAP1欠損T細胞にIQGAP1-Cを発現させたところ、サイトカイン産生の亢進がレスキューされた。IQGAP1欠損マウス由来のCD4陽性T細胞を養子移入したマウスではEAEの発症が増悪した。以上より、IQGAP1がOX40依存的なT細胞の活性化を抑制し炎症性疾患を負に制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have discovered that OX40 associated with a scaffold protein IQGAP1 after ligation by OX40L expressed on antigen-presenting cells. The C-terminal domain of IQGAP1 (IQGAP1-C) was required for its association with OX40, and TRAF2 augmented the binding between OX40 and IQGAP1-C. Naive CD4+ T cells from Iqgap1^{-/-} mice displayed an enhanced ability to produce effector cytokines in response to antigen and OX40L. Retroviral transduction of IQGAP1-C into Iqgap1^{-/-} T cells rescued these enhanced responses, suggesting that IQGAP1 limits the process of OX40-dependent T cell activation. Sublethally irradiated recipient mice that received adoptively transferred Iqgap1^{-/-} CD4+ T cells and were immunized with MOG peptide had significantly higher EAE clinical scores than those recipient mice with wild-type CD4+ T cells. These results demonstrate that IQGAP1 is a component of the OX40 signalosome and limits cosignaling that promotes T cell activation and autoimmune disease development.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞補助刺激 OX40 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) OX40シグナルの新規制御因子の探索から、OX40発現T細胞株にてOX40刺激依存的にOX40の細胞内領域に結合する分子として、機能不明のscaffold分子IQGAP1を見いだした。TNF受容体スーパーファミリー分子のシグナル伝達におけるIQGAP1の関与は報告がなく、OX40特異的にシグナル制御を担う可能性が想定される。

(2) IQGAP1欠損マウスを用い、CD4⁺T細胞依存的な自己免疫疾患である多発性硬化症のマウスモデルEAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎)の病態解析を行った。その結果、IQGAP1欠損マウスがEAEに易感受性であることを見いだした。OX40シグナルが、EAEや炎症性腸疾患モデルの病態形成に関与することが知られており、IQGAP1がOX40との相互作用を介してT細胞の活性化を制御する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) TNF受容体スーパーファミリーに属するT細胞補助刺激分子OX40の細胞内シグナルは活性化T細胞の増殖・生存を促進し、記憶T細胞の形成を促す。そこで、IQGAP1によるOX40を介したT細胞活性化の新規制御機構を詳細に解明することで、OX40補助刺激の新たなシグナル制御機構を明らかにする。

(2) IQGAP1欠損マウスにおいて、いくつかの炎症性自己免疫疾患の増悪が確認されている。そこで特にOX40シグナル依存的なT細胞の活性化を介する疾患モデルを用いて、炎症性免疫疾患発症におけるIQGAP1によるT細胞補助シグナルの制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) OX40シグナルにおけるIQGAP1の機能：
①IQGAP1は190kDaのマルチドメインタンパク質であることから、種々のIQGAP1変異体を作成し、OX40とIQGAP1の分子相互作用部位を特定する。

②IQGAP1欠損T細胞を用いてOX40刺激依存的なT細胞抗原応答をサイトカイン産生、増殖、各シグナル伝達分子の活性化を指標に評価する。特にNFATの活性化を中心に、IQGAP1による制御機構を解析する。

(2) EAEにおけるOX40-IQGAP1の役割：
CD4⁺T細胞依存的な自己免疫疾患であるEAEを用いて、IQGAP1によるOX40を介したT細胞の活性化制御と疾患発症機構を解明する。
①CD4⁺T細胞に発現するIQGAP1がEAE発症に対し抑制的にはたらくという仮説を検証す

るため、野生型マウスおよびIQGAP1欠損マウス由来のCD4⁺T細胞を養子移入し、EAEを誘導しスコアを比較する。

②OX40シグナル依存的なT細胞の活性化におけるIQGAP1の寄与を検証するため、先のT細胞養子移入に加え抗OX40アゴニスト抗体もしくは抗OX40L中和抗体を投与し、EAEの重症度を比較する。

4. 研究成果

(1) V5-IQGAP1, cMyc-OX40, Flag-TRAF2 および His-OX40L を HEK293T 細胞に強制発現させ、各特異的タグ抗体にて免疫沈降を行った。IQGAP1 は OX40L 刺激依存的に OX40 に結合し、その結合は TRAF2 を介することがわかった。

(2) IQGAP1 の N 末端領域、C 末端領域の各変異体を作成し、免疫沈降を行ったところ、IQGAP1 の C 末端領域(IQGAP1-C)が OX40 と相互作用することがわかった。

さらに TRAF2 についても各ドメイン欠損変異体を用いた免疫沈降を行い、その結果 RING ドメインが IQGAP1 に結合することがわかった。

(3) cMyc-OX40 発現 T 細胞ハイブリドーマ細胞株は抗原刺激依存的な NFAT のリン酸化と核移行、IL-2 産生が OX40L の共刺激により顕著に亢進する。この細胞株を用いて CRISPR-Cas9 システムにより IQGAP1 欠損細胞株を作製したところ、IQGAP1 の欠損により OX40 刺激依存的な細胞応答の増強が認められた。

(4) IQGAP1 欠損 T 細胞株にレトロウイルスを用いて IQGAP1-C を発現させたところ、IQGAP1-C と TRAF2 との相互作用が確認された。

さらに IQGAP1-C 発現細胞において、OX40L 刺激による NFAT の核移行と IL-2 産生の増強がレスキューされた。このことから、IQGAP1-C が OX40 と相互作用し、OX40 シグナルを介した T 細胞活性化を抑制していることが明らかとなった。

(5) 亜放射線照射したレシピエントマウスに野生型マウスおよびIQGAP1欠損マウス由来のCD4⁺T細胞を養子移入した後、MOG抗原とCFAを免疫し、EAEを誘導した。その結果、IQGAP1欠損T細胞移入群でEAEスコアが顕著に亢進した。中枢神経系組織に浸潤する病原性T細胞数とサイトカイン産生も増加した。すなわち、CD4⁺T細胞に発現するIQGAP1がEAE発症を抑制していることが裏付けられた。

(6) T細胞養子移入によるEAE誘導実験系において、抗OX40L中和抗体を投与したところ、EAEスコアが減弱した。IQGAP1欠損T細胞移入群では野生型T細胞移入群と比較してOX40L抗体投与によるEAEの減少率が上昇していた。このことから、IQGAP1の欠損によりOX40シグナルが亢進し、EAEが増悪したことが示唆される。

以上の結果から、IQGAP1はOX40補助刺激シグナルを抑制し、OX40依存的なT細胞の活性化を介した炎症性免疫疾患を負に制御していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

以下全て査読あり

1) Nagashima H, Okuyama Y, Hayashi T, Ishii N, So T. TNFR-Associated Factors 2 and 5 Differentially Regulate the Instructive IL-6 Receptor Signaling Required for Th17 Development. *J Immunol*, 196, 4082-4089, 2016. DOI: 10.4049/jimmunol.1501610

2) Kawabe T, Suzuki N, Yamaki S, Sun SL, Asao A, Okuyama Y, So T, Iwakura Y, Ishii N. Mesenteric lymph nodes contribute to proinflammatory Th17-cell generation during inflammation of the small intestine in mice. *Eur J Immunol*, 46, 1119-1131, 2016. DOI: 10.1002/eji.201545907

3) Meng J, Okuyama Y(⁵/17), Murakami M. Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *J Immunol*, 197, 3111-3119, 2016. DOI:10.4049/jimmunol.1601082

4) So T, Nagashima H, Ishii N. TNF receptor-associated factor (TRAF) signaling in CD4(+) T-lymphocytes. *Tohoku J Exp Med*, 236, 139-154, 2015. DOI: 10.1620/tjem.236.139

[学会発表] (計 9 件)

1) OKUYAMA Yuko, NAGASHIMA Hiroyuki, USHIO-FUKAI Masuko, CROFT Michael, ISHII Naoto, SO Takanori. OX40 binding and regulation of T cell activation by the scaffolding IQGAP1 protein. 2017 Japan-NIH Joint Symposium, 2017年2月16日, 東北大学医学部開設百周年記念ホール・星陵オーデトリ

ウム (宮城県・仙台市)

2) NAGASHIMA Hiroyuki, OKUYAMA Yuko, HAYASHI Takaya, ISHII Naoto, SO Takanori. A novel regulatory role for TRAF2 and TRAF5 in the IL-6-driven Th17 development. 2017 Japan-NIH Joint Symposium, 2017年2月16日, 東北大学医学部開設百周年記念ホール・星陵オーデトリウム (宮城県・仙台市)

3) NAGASHIMA Hiroyuki, OKUYAMA Yuko, HAYASHI Takaya, ISHII Naoto, SO Takanori. TRAF2 and TRAF5 have redundant but unequal inhibitory roles in Th17 differentiation mediated by IL-6. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society of Immunology, 2016年12月7日, 沖縄コンベンションセンター・ラグナガーデンホテル (沖縄県・宜野湾市)

4) OKUYAMA Yuko, NAGASHIMA Hiroyuki, MACHIYAMA Tomoaki, USHIO-FUKAI Masuko, CROFT Michael, ISHII Naoto, SO Takanori. OX40 binding and regulation of T cell activation by the scaffolding IQGAP1 protein. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society of Immunology, 2016年12月7日, 沖縄コンベンションセンター・ラグナガーデンホテル (沖縄県・宜野湾市)

5) OKUYAMA Yuko, ATSUMI Toru, JIANG Jing-Jing, NAKAMURA Akihiro, OGURA Hideki, MENG Jie, KAMIMURA Daisuke, ISHII Naoto, HIRANO Toshio, MURAKAMI Masaaki. A novel regulator of NFκB signaling enhances IκBα ubiquitination and promotes inflammatory disease development. International Congress of Immunology 2016, 2016年8月23日, メルボルン (オーストラリア)

6) NAGASHIMA Hiroyuki, OKUYAMA Yuko, HAYASHI Takaya, ASAO Atsuko, KAWABE Takeshi, YAMAKI Satoshi, NAKANO Hiroyasu, CROFT Michael, ISHII Naoto, SO Takanori. CD4⁺ T cell-intrinsic TRAF5 negatively regulates Th17 cell-dependent experimental autoimmune encephalomyelitis. International Congress of Immunology 2016, 2016年8月25日, メルボルン (オーストラリア)

7) OKUYAMA Yuko, NAGASHIMA Hiroyuki, USHIO-FUKAI Masuko, CROFT Michael, ISHII Naoto, SO Takanori. IQGAP1 regulates OX40 co-signaling in CD4⁺ T cells. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society of Immunology, 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

8) NAGASHIMA Hiroyuki, OKUYAMA Yuko, HAYASHI Takaya, ISHII Naoto, SO Takanori. TRAF2 and TRAF5 limit the differentiation of

Th17 cells mediated by IL-6. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society of Immunology, 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

()

9) SUZUKI Nobu, MURATA Kazuko, OKUYAMA Yuko, ASAO Atuko, SO Takanori, TANAKA Nobuyuki, ISHII Naoto. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate is required for T cell development and survival. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society of Immunology, 2015年11月19日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 祐子 (Yuko OKUYAMA)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50624475

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者