

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07612

研究課題名(和文) Rap1欠損T細胞による大腸炎・がん発症機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of the development of colitis in T cell-specific Rap1-deficient mice

研究代表者

片桐 晃子 (Koko, Katagiri)

東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：00322157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)を自然発症するT細胞特異的Rap1欠損マウス(大腸炎モデルマウス)を用いて、以下のことを明らかにした。1)大腸炎モデルマウスでは、Rap1欠損によるTCR-mediated distal signalの低下により、大腸粘膜固有層でのRORgammat+制御性T細胞の生成及びCTLA-4を介する抑制機能が低下している。2)Rap1欠損T細胞では、alpha4beta7インテグリンが活性型構造となっているため、腸管へのホーミングが亢進している。3)腸炎惹起性T細胞ではmiR-150の発現が有意に上昇しており、その欠損は病原性T細胞の増大を抑制し、大腸炎の発症を抑制する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rap1シグナルがTCR distal signalに重要な役割を果たすこと及びRap1-GDPがインテグリンalpha4beta7の活性型構造を抑制していることを初めて明らかにした。また、miR-150の阻害は、リンパ節におけるLIP (lymphopenia-induced proliferation)を抑制し、大腸炎の発症を抑制することから、miR-150阻害剤はIBDなどの自己免疫疾患治療薬として有望であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：T-cell-specific Rap1 deletion causes spontaneous colitis in mice. In the large intestinal lamina propria of these mice, RORgammat+Treg cells were scarcely induced by 4 weeks of age. The expression of CTLA-4 on Rap1-deficient Treg cells was impaired. Rap1-deficient T cells exhibited the defective nuclear translocation of NFAT and actin foci in response to TCR engagement, which is critical for Treg-mediated control of colitogenic Th17 responses. Integrin activation is associated with conformational regulation. We generated two kinds of mAbs that recognized Mn2+-dependent epitopes of alpha4beta7. Using these mAbs, we found that the conversion of Rap1-GDP to GTP exerts two distinct effects stepwise on the conformation of alpha4beta7. Colitogenic CD4+ T cells demonstrated the increased expression of miR-150. MiR-150 silencing completely inhibited the expansion of pathogenic Th17 cells and the development of colitis in Rap1KO mice. MiR-150 is a potential therapeutic target of IBD.

研究分野：免疫学

キーワード：colitis Rap1 TCR regulatory T cells microRNA lymphopenia proliferation

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

T細胞特異的 Rap1 を欠損させたマウスは、大腸腫瘍を伴う炎症性腸疾患 (IBD) を自然発症する。Rap1 欠損エフェクター CD4+T 細胞を正常マウスへ養子移植することで、大腸炎が発症することから、Rap1 の欠損が腸炎惹起性 T 細胞の生成につながる事が判明している。しかしながら、Rap1 欠損病原性 T 細胞が生成する機構は明らかになっていなかった。Rap1 欠損エフェクター T 細胞は、過度に大腸粘膜固有層へ浸潤することがわかっている。これは alpha4beta7 の活性型構造が誘導されていることにより、大腸粘膜固有層の後毛細血管内皮細胞に特異的に発現する MadCAM-1 への接着が亢進することが原因であると考えられるが、活性型 alpha4beta7 を特異的に認識するモノクローナル抗体が存在しないため、Rap1 欠損の活性型構造への影響をこれまで検討することができなかった。また、microRNA は様々な細胞機能に関与することから、腸炎惹起性 T 細胞においても重要な役割を果たしている可能性がある。RNA seq 解析により、腸炎惹起性 T 細胞においてその発現が有意に変化しているものが同定されているが、大腸炎発症における microRNA の関与は不明であった。

## 2. 研究の目的

大腸炎モデルマウスは、生後数週間で IBD に類似した大腸炎・がんを発症する。このモデルマウスへ抗生物質を投与すると発症が抑制されることから、ヒト IBD と同様に腸内細菌依存性に生じていることがわかった。本研究課題では、独自に開発した大腸炎・がん自然発症モデルマウスを用いて、IBD の発症原因及び病態形成機構を解明することを目的に、1) 腸炎惹起性 T 細胞 (病原性 T 細胞) への分化が促進される新規メカニズムを明らかにする。2) それらの大腸粘膜固有層への浸潤が亢進する機構を、活性型 alpha4beta7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し検討する。3) 大腸炎は発症に microRNA が関与する可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) 腸炎惹起性 T 細胞の生成機構

- a) 大腸炎モデルマウスでは Rap1 欠損 T 細胞が腸管リンパ節において、腸内細菌の刺激により、Th17 細胞へ分化し、血流を介して大腸粘膜固有層へ過度にホーミングすることがわかっているが、この Th17 細胞が実際に大腸炎発症に関与しているかどうかを、まず IL-17A ノックアウトマウスと大腸炎モデルマウスを掛け合わせるにより検討した。
- b) 大腸炎モデルマウスの大腸粘膜固有層において新生期に生成する Rorgammat 陽性 Foxp3 陽性細胞の割合及び数を生後 2 週間後から Flow cytometry により経時的に解析した。
- c) Foxp3 陽性細胞の抑制機能に重要な CTLA-4 の発現及び、*in vitro* において抗原提示細胞の共刺激分子 CD80 及び CD86 を取り込む能力を検討した。さらに大腸炎モデルマウスにおける樹状

細胞上での共刺激分子の発現を測定した。

d) CD3/CD28 抗体架橋刺激による PLCgamma、ZAP70 及び SLP76 のチロシンリン酸化及びマイクロクラスター形成などの proximal signal、及び、カルシウムの流入及び NFAT の核内移行などの distal signal を測定した。

d) TCR シグナル依存性のアクチン細胞骨格の再構成 (actin foci 形成) について検討した。

## 2) Rap1 による alpha4beta7 インテグリンの活性化構造の制御機構

大腸への Rap1 欠損エフェクター T 細胞のホーミング亢進を解明するために、マウス alpha4beta7 活性型特異的ラットモノクローナル抗体の作成を試みた。Alpha4beta7 の細胞外領域をラットの尾根部へ投与し、ハイブリドーマを作成した。Mn<sup>2+</sup> 存在下で高親和性の alpha4beta7 とのみ結合するハイブリドーマを選別した。

## 3) 大腸炎発症に対する miR-150 の阻害の影響

a) 網羅的な RNA-seq 解析により、大腸炎を引き起こす Rap1 欠損 T 細胞において、有意に上昇している microRNAs を同定した。それらの発現量を qPCR 法及びノーザンブロット法 で確かめた。

b) miR-150 の高発現が大腸炎の発症に関与している可能性を検討するため、miR-150 のノックアウトマウスを導入し、T 細胞特異的 Rap1 欠損マウスと掛け合わせたダブルノックアウトマウスを作製し、病理学的、免疫学的解析を行った。

## **4. 研究成果**

### 1) 大腸炎モデルマウスでは、RORgammat<sup>+</sup>制御性 T 細胞の生成及び機能が低下している。

a) IL-17A 欠損マウスと大腸炎モデルマウスを掛け合わせたマウスにおいて、大腸粘膜固有層において、代償性に IL-17F 産生細胞が増加しているにもかかわらず、大腸炎の発症が抑制されることが明らかとなった。

b) 大腸炎モデルマウスの大腸粘膜固有層において新生期に生成する Rorgammat<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合が低下していることがわかった。モデルマウスでは、Rorgammat<sup>+</sup>制御性 T 細胞の分化及び CTLA-4 及び IL-10 産生を介した抑制機能が低下していた。Rorgammat<sup>+</sup>制御性 T 細胞における欠損が、大腸炎発症に関与する可能性を、正常のナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞をモデルマウスへ養子移植することによって検討した。養子移植された正常 T 細胞はモデルマウスの大腸粘膜固有層において、Rorgammat<sup>+</sup>制御性 T 細胞へと分化し、大腸炎の発症を抑制した。

c) Foxp3 陽性細胞の抑制機能に重要な CTLA-4 の発現が低下し、*in vitro* において抗原提示細胞の共刺激分子 CD80 及び CD86 を取り込む能力も低下していた。このため、大腸炎モデルマウスの樹状細胞上での共刺激分子の発現が上昇していた。

d) Rap1 欠損ナイーブ T 細胞では CD3/CD28 抗体架橋刺激による PLCgamma、ZAP70 及び SLP76 のリン酸化及びマイクロクラスター形成などの proximal signal に異常はなかったが、カルシウムの流入、NFAT の核内移行などの distal signal が低下していた。アクチン細胞骨格を検討したところ、actin foci と呼ばれる構造が形成されていないことがわかった。Actin foci の形成に重要な WASP 及び HS-1 の集積が認められないことから、Rap1 はこれらの分子の局在制御に関与していることが示唆された。

### 2) Rap1-GDP と Rap1-GTP は独立して、alpha4beta7 の活性型構造を制御している。

大腸へのエフェクターT細胞のホーミング亢進の機構として、Rap1によるalpha4beta7インテグリン活性化制御について検討した。2種類のalpha4beta7活性型特異的モノクローナル抗体(G3, H3)を作成し、Rap1-GDPとRap1-GTPがそれぞれ独立してalpha4beta7の活性型構造を制御していることを見いだした。G3が認識するエピトープはPSIドメインに存在し、H3が認識するエピトープはハイブリッドドメインに存在するが、Rap1欠損腸炎惹起性T細胞ではG3エピトープを高発現するが、H3エピトープを発現しておらず、H3エピトープの発現にはRap1-GTPが必要なことを明らかにした。細胞骨格制御タンパク質FilaminがRap1-GDPによる抑制型の維持に関与しており、TalinはRap1-GTPによる活性型構造の安定化に寄与していることがわかった。

3) MiR-150の阻害は、大腸炎の発症を抑制する。

a) miR-150は正常T細胞において、無刺激の状態では他のmicroRNAに比べ50倍以上の高い発現量を示し、抗原刺激によってその発現量が低下することが判明した。腸炎惹起性T細胞においてmiR-150の発現が有意に上昇していることは、qPCR法及びノーザンブロット法で確かめられた。

b) 大腸炎モデルマウスと掛け合わせたダブルノックアウトマウスでは、大腸炎の発症が完全に抑制された(図1)。

c) このダブルノックアウトマウスにおいて、Rap1欠損によるT細胞のインテグリンを介する接着低下は全く改善されておらず、大腸炎モデルマウスと同様に、リンパ節において顕著なリンパ球減少症が引き起こされた。しかしながら、リンパ球減少症で見られるLIP(Lymphopenia-induced proliferation)が、miR-150の欠損により抑制され、腸炎惹起性T細胞が増大しないことがわかった(図2)。

d) 大腸炎モデルマウスで認められるRORgammat+制御性T細胞の低下は改善されておらず、Th17細胞への分化は抑制されていなかった。これらの結果より、miR-150の阻害は、LIPを抑制することによって腸炎惹起性T細胞の増大を抑制し、大腸炎の発症を阻止していることが明らかとなった。miR-150の阻害は炎症性腸疾患の治療として有望であることがわかった。

図 1

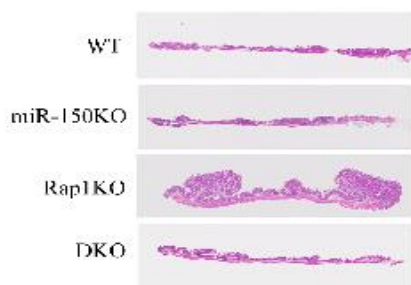
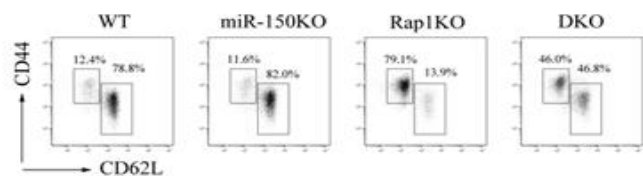


図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ishihara S, Sato T, Fujikado N, Miyazaki H, Yoshimoto T, Yamamoto H, Fukuda S and Katagiri K	4. 巻 5
2. 論文標題 Rap1 prevents colitogenic Th17 cell expansion and facilitates Treg cell differentiation and distal TCR signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 206-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03129-x	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Ishihara S, Sato T, Sugioka R, Miwa R, Saito H, Sato R, Fukuyama H, Nakajima S, Sawai S, Kotani A, Katagiri K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Rap1 Is Essential for B-Cell Locomotion, Germinal Center Formation and Normal B-1a Cell Population.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 624419-524433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.624419., 2021.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Imoto D, Saito N, Nakajima A, Honda G, Ishida M, Sugita T, Ishihara S, Katagiri K, Okimura C, Iwadate Y, Sawai S.	4. 巻 17
2. 論文標題 Comparative mapping of crawling-cell morphodynamics in deep learning-based feature space.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Comput Biol.	6. 最初と最後の頁 1009237-1009267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pcbi.1009237	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ishihara Sayaka, Sato Tsuyoshi, Du Guangwei, Guardavaccaro Daniele, Nakajima Akihiko, Sawai Satoshi, Kataoka Tohru, Katagiri Koko	4. 巻 18
2. 論文標題 Phosphatidic acid-dependent localization and basal de-phosphorylation of RA-GEFs regulate lymphocyte trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-020-00809-0	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Kotaki R., et.al. Kawashima M, Yamaguchi A, Suzuki N, Koyama-Nasu R, Ogiya D, Okuyama K, Yamamoto Y, Takamatsu M, Kurosaki N, Ando K, Murata A, Ohtsuka M, Nakagawa S, Katagiri K, Kotani A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Overexpression of miR-669m inhibits erythroblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70442-y	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sato T, Ishihara S, Marui R, Takagi J, Katagiri K	4. 巻 10
2. 論文標題 Dissection of $\alpha 4 \beta 7$ integrin regulation by Rap1 using novel conformation-specific monoclonal anti- $\alpha 4 \beta 7$ antibodies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70111-0	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Momoi Y, Nishikimi A, Du G, Kataoka T and Katagiri K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Phosphatidic acid regulates subcellular distribution of RA-GEFs critical for chemokine-dependent migration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 30149-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawashima M, Carreras J, Higuchi H, Kotaki R, Hoshina T, Okuyama K, Suzuki N, Kakizaki M, Miyatake Y, Ando K, Nakayama M, Umezumi S, Horie R, Higuchi Y, Katagiri K, Goyama S, Kitamura T, Chamoto K, Yano S, Nakamura N, and A Kotani	4. 巻 -
2. 論文標題 PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	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) 10.1038/s41375-020-0737-9	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Okutomi T, Minakawa S, Hirota R, Katagiri K and Morikawa Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 HIV Reactivation in Latently Infected Cells With Virological Synapse-Like Cell Contact	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	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) 10.3390/v12040417	査読の有無 有
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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Haruka Miyazaki, Sayaka Ishihara, Tsuyoshi Sato, Noriyuki Fujikado, Takayuki Yoshimoto, Shinji Fukuda, Koko Katagiri
2. 発表標題 Role of Rap1 in preventing colitogenic Th17 cell expansion and in Treg cell differentiation.
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kageyama T, Mamiyoda M, Ishihara S, and Katagiri K.
2. 発表標題 Regulation of TCR signaling by Rap1
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto H, Yoshimoto T, Kodera Y, Ishihara S, and Katagiri K.
2. 発表標題 IL-17 plays critical role in the development of spontaneous colitis of T cell-specific Rap1-knockout mice.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 炎症性腸疾患の予防又は治療剤	発明者 片桐 晃子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-048480	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------