

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07555

研究課題名(和文) 小胞輸送制御因子Arfを介した免疫調節機構の解明

研究課題名(英文) Immune regulation through vesicle trafficking regulator Arf family proteins

研究代表者

松田 達志 (MATSUDA, Satoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00286444

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)：本研究では、低分子量Gタンパク質Arfファミリーの生理機能解明に取り組んだ。Arf1欠損は、マスト細胞においてmTORC1依存性に細胞増殖能を低下させる一方、B細胞においてはIL-4依存的な胚中心B細胞への分化障害を引き起こした。一方、Arf1の欠損単独ではT細胞機能に何ら影響は認められず、Arf6と二重に欠損させた場合にのみTh17依存的な自己免疫病態の抑制が観察された。興味深いことに、T細胞特異的Arf1/Arf6二重欠損マウスにおいても野生型マウスと比肩するレベルでTh1・Th2応答が誘導されており、Arf経路の抑制により自己免疫病態のみを抑制しうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子量Gタンパク質であるADP-ribosylation factor (Arf)は、細胞の恒常性維持に必須な小胞輸送を制御することが示唆されているが、高次生命現象への関わりについては不明な点が多い。本研究を通じて、Arf1がマスト細胞の増殖過程ならびにB細胞の機能分化過程でそれぞれ必須の役割を担うことが明らかとなり、さらにArf1/Arf6の二重欠損によりTh17依存性の自己免疫病態のみがほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。以上の結果は、Arf経路を標的とした治療法の開発が、これまで困難とされてきた自己免疫病態治療時の日和見感染症の問題の解決に繋がることを強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：ADP-ribosylation factor (Arf) family, consisting of six family members Arf1-Arf6, regulates vesicle trafficking. However, their physiological roles remain elusive. We therefore established mice lacking Arf1 and/or Arf6 in the immune cells, and investigated their physiological roles in the immune system. The lack of Arf1 in mast cells resulted in the defect in cell proliferation due to the impaired activation of mTORC1 while B cells lacking Arf1 failed to differentiate to germinal center B cells upon IL-4 stimulation. Although, unlike mast cells or B cells, loss of Arf1 alone had no impact in T cell function, we found that the lack of both Arf1 and Arf6 alleviates autoimmune diseases like colitis and experimental autoimmune encephalomyelitis which are mediated by Th17, whereas immune responses through Th1 or Th2 are seemingly normal. Our findings reveal an unexpected role for the Arf pathway as a therapeutic target in the autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：ADP-ribosylation factor 自己免疫疾患 小胞輸送制御因子

1. 研究開始当初の背景

ADP-ribosylation factor (Arf)ファミリーは小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質であり、マウスでは Arf1-Arf6 の 6 つのアイソフォームが存在している。Arf 阻害剤である Brefeldin A は *in vitro* で T 細胞からのサイトカイン分泌阻害に用いられるが、個体レベルの免疫応答において Arf 経路が果たす役割は不明であった。研究代表者は、小胞輸送が免疫シグナルの fine-tuning に関わる可能性に思い至り、T 細胞・B 細胞特異的な Arf 欠損マウスの樹立に取り組んだ。驚いたことに、T 細胞で Arf1 を欠損させても、細胞増殖・機能分化の何れにも影響は認められず、Arf1 と Arf6 を二重欠損させた場合にのみ、活性化に伴う細胞死の亢進が認められた。一方で、Arf1/Arf6 二重欠損 T 細胞においてもサイトカイン分泌能に異常は認められなかった。また、並行して樹立した B 細胞特異的な Arf1 欠損マウスにおいては、外来抗原に対する抗体産生能が著しく低下していることが明らかとなった。以上の予備的な知見を踏まえ、本研究では、世界初となる免疫系特異的な Arf 欠損マウスの解析と Arf 経路が免疫系で果たす生理的役割の統合的な解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、先行する T 細胞特異的な Arf 欠損マウス (以下、Arf-TKO) の解析を中心に、B 細胞特異的な Arf1 欠損マウス (以下、Arf1-BKO) ならびに Arf1 欠損マスト細胞の解析に取り組んだ。具体的には、(1) T 細胞生存維持における Arf 経路の機能解明、(2) Arf-TKO マウスにおける生体防御能の検証、(3) Arf1-BKO マウスにおける抗体産生能低下の分子基盤解明、(4) Arf1 欠損マスト細胞の表現型解析の 4 つの課題を設定した。

(1) T 細胞生存維持における Arf 経路の機能解明

ナイーブ CD4⁺ T 細胞は、TCR 刺激による活性化過程で代謝リプログラミングが生じ、酸化的リン酸化から解糖系に依存するようになる [2]。定常状態における Arf-TKO ナーブ CD4⁺ T 細胞の生存能はコントロールと差がない一方で、TCR 刺激に伴いアポトーシスが亢進することから、活性化過程における代謝リプログラミングがアポトーシス亢進の引き金なのではないかと考えた。そこで、T 細胞代謝リプログラミングへの Arf・Arf6 の関与の有無を検証する。

(2) Arf-TKO マウスにおける生体防御能の検証

各種ヘルパー T 細胞への分化は、周りのサイトカイン環境の違いに依存している。Arf-TKO 活性化 T 細胞で誘導されるアポトーシスは IL-21 などのある種のサイトカイン存在下では抑制されることから、Arf1・Arf6 を欠損しても一部の免疫応答は維持されている可能性が考えられた。そこで、Th1 型・Th2 型・Th17 型の免疫応答への Arf 経路の関与と Arf-TKO マウスの生体防御能について解析を行う。

(3) Arf1-BKO マウスにおける抗体産生能低下の分子基盤解明

B 細胞が抗原に应答して抗体産生細胞に分化する過程で、胚中心が中心的な役割を担う。そこで、Arf1-BKO マウスのリンパ節を対象に胚中心形成能に焦点を当てた解析に取り組む。

(4) Arf1 欠損マスト細胞の表現型解析

T 細胞・B 細胞特異的な Arf 欠損マウスを樹立する過程で、タモキシフェン依存性に任意の組織で Arf1 を欠損可能なマウス (以下、Arf1-CreERT2) を樹立した。Arf1-CreERT2 マウス由来の骨髓を出発材料に、*in vitro* マスト細胞分化系を用いることで、マスト細胞における Arf1 の

生理機能解明に取り組む。

3. 研究の方法

(1) T細胞生存維持における Arf 経路の機能解明

細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies 社) を用いて、ナイーブ CD4⁺ T 細胞と活性化 CD4⁺ T 細胞における酸素消費速度 (OCR) と細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定し、Arf1・Arf6 欠損時に代謝リプログラミングが正常に誘導されているかを調べる。Arf-TKO 細胞で代謝異常が認められた場合、代謝リプログラミングの異常がアポトーシスの原因であるかを明らかにするため、ラパマイシンやメトホルミンなどの代謝阻害剤で処理した場合の細胞生存能を比較する。

(2) Arf-TKO マウスにおける生体防御応答の検証

Th17 型の応答を評価するために、MOG ペプチドで免疫することで、野生型マウスならびに Arf-TKO マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を発症させ、両群間で病態に差異が認められるか否かを検証する。

Th1 型の免疫応答を評価する方法として、SAS アジュバントと混合した卵白アルブミン (OVA) をマウスの foot pad に皮下注射し、血清中の抗原特異的抗体価・所属リンパ節における T 細胞の割合・サイトカイン産生能を評価する。加えて、生体防御能を調べるために、*Leishmania major* (*L. major*) の感染実験を行い、寄生虫の排除能や所属リンパ節における T 細胞数・サイトカイン産生能を評価する。

Th2 型の免疫応答として、ダニ抗原と類似的作用を示すことが知られる papain を経鼻投与し、Th1 型の解析と同様、血清中の抗原特異的抗体価や所属リンパ節の解析を行う。また、生体防御能を調べるために、腸管寄生虫 *Heligmosomoides polygyrus* (*Hp*) の感染実験を行う。すなわち、コントロールマウスと Arf-TKO マウスの糞便における寄生虫卵数を比較すると共に、寄生虫特異的抗体価や所属リンパ節における T 細胞の性状を解析する。

(3) Arf1-BKO マウスにおける抗体産生能低下の分子基盤解明

SAS アジュバントと混合した卵白アルブミン (OVA) をマウスの foot pad に皮下注射し、所属リンパ節の構造解析ならびに集積している B 細胞の性状解析を行う。

(4) Arf1 欠損マスト細胞の表現型解析

IL-3 による *in vitro* マスト細胞分化系を用いることで、Arf1 存在下・非存在下でマスト細胞の増殖・分化に差異が認められるか検証する。

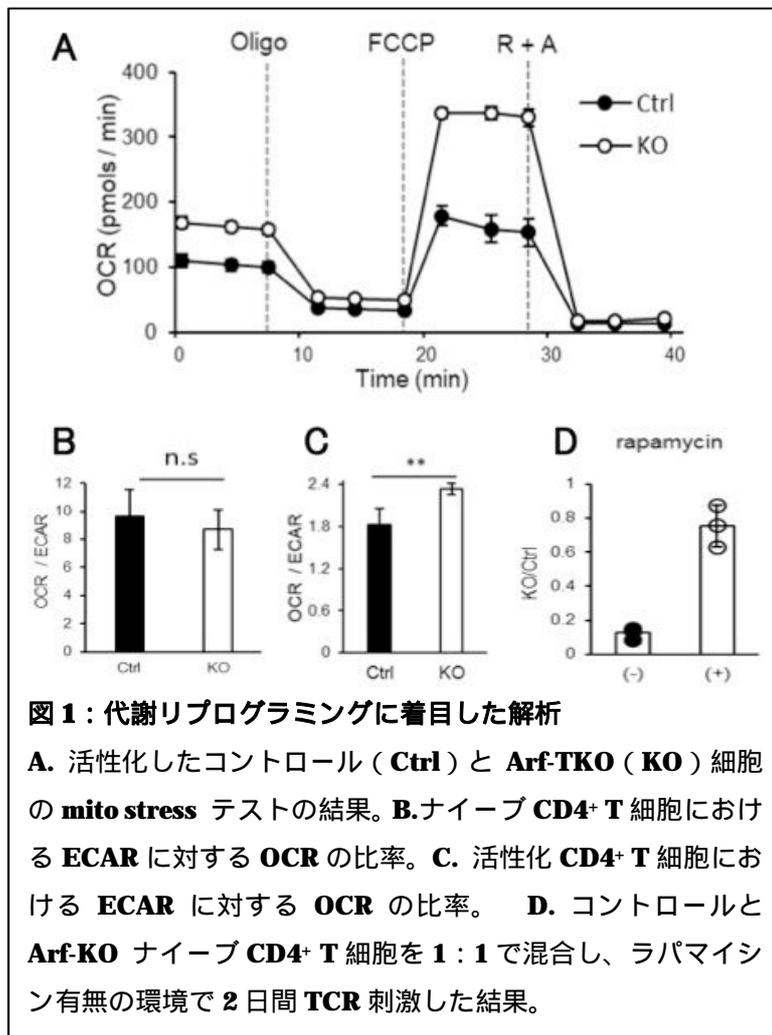
4. 研究成果

(1) T細胞生存維持における Arf 経路の機能解明

細胞外フラックスアナライザーによって T 細胞の代謝パターンを解析した結果、ナイーブ T 細胞では Arf-TKO とコントロールで代謝状態に違いがない一方 (図 1B) 2 日間 TCR 刺激を行った活性化状態では、Arf-TKO T 細胞における basal OCR が上昇し、ECAR に対する OCR の割合がコントロールより高くなっていた (図 1A・C)。さらにミトコンドリアの予備呼吸能 (SRC) も有意に上昇していた (図 1A)。これらの結果から、活性化した Arf-TKO CD4⁺ T 細胞の代謝状態は、コントロール細胞と異なり、酸化的リン酸化に依存していることが明らかとなった。がん細胞を用いた解析から、Arf1 は PI4KIIIβ の局在を制御することにより、ミトコンドリアの分裂に関与することが知られている [3]。Arf-TKO 細胞で、酸化的リン酸化が亢進していた理由として、ミトコンドリアに異常があるのではないかと考え、解析を行った。しかし予想に

反して、ミトコンドリア総体積・DNA量・形態いずれにおいても異常は認められなかった【データ未掲載】。

次に、Arf-TKO細胞で認められた代謝バランスの異常が、アポトーシスを誘導しているのかを調べた。TCR刺激による解糖系の亢進はmTOR/HIF経路の活性化によって誘導されるため、TCR刺激時にラパマイシンまたはメトホルミンを添加し、活性化による代謝リプログラミングを抑制した場合の細胞の生存を比較した。TCR刺激のみの場合と比較して、代謝阻害剤で処理した場合にはArf-TKO細胞における生存が維持されることから(図1D)代謝の異常がアポトーシスの原因であることが強く示唆された。



(2) Arf-TKO マウスにおける生体防御応答の検証

MOG ペプチドの免疫に伴い野生型マウスに EAE に特徴的な麻痺が誘導されたのに対し、Arf-TKO マウスではその症状が著しく減弱していた(図2A)。興味深いことに、同じく Th17 細胞に依存することが知られるナイーブ CD4⁺ T細胞移入大腸炎においても、Arf 欠損 T細胞移入マウスでは大腸炎が観察されず、Arf 欠損により Th17 応答が著しく障害されていることが強く示唆された〔1〕。

Th1 応答を誘導する SAS アジュバントと混合した OVA を foot pad に免疫し、所属リンパ節を解析した。所属リンパ節に集積する CD4⁺ T細胞の割合・数ともに Arf-TKO マウスで減少しており、リンパ節を OVA で再刺激した時の IFN- γ の産生量も低下していたが、興味深いことに、Arf-TKO マウスの所属リンパ節内の Tfh (PD-1^{hi}CXCR5^{hi}) 細胞の割合はコントロールと比較して有意に増加していた(図2B)。また、papain を用いた Th2 応答誘導モデルにおいても同様の結果が得られた。

L. major の感染排除能は Arf-TKO マウスで若干低下していたが、血清中 IgG2c 量はコントロールと同等であり、IgG1 レベルは Arf-KO マウスでむしろ高かった(図2C・データ未掲載)。*Hp* の感染排除能は、コントロールマウスと Arf-TKO マウスで全く差がなく、血清抗体価についても有意な差は認められなかった(図2D)。

以上の結果から、Th17 型の免疫応答と比較すると、Th1 型免疫応答や Th2 型免疫応答は Arf-TKO マウスでコントロールマウスと比肩しうるレベルで維持されていることが明らかとなった。免疫時の Arf-TKO マウスの所属リンパ節で Tfh 細胞の割合がコントロールマウスと比較

して増加していた理由として、Tfhの分化が誘導される環境では IL-21 が存在していることから、Arf1・Arf6 が欠損した状態でも T 細胞の生存が維持されたためと考えられる。

(3) Arf1-BKO マウスにおける抗体産生能低下の分子基盤解明

OVA 免疫後の所属リンパ節のサイズは Arf1-BKO で明らかに小さく、集積した B 細胞を FACS 解析したところ、GL7⁺Fas⁺の胚中心 B 細胞の割合が野生型マウスに比べて著しく低下していることが明らかとなった。実際、リンパ節構造を免疫染色により確認したところ、Arf1-BKO マウスではほとんど胚中心が形成されておらず、このことが外来抗原応答性の抗体産生消失と考えられた（論文投稿中・データ未掲載）

(4) Arf1 欠損マスト細胞の表現型解析

マスト細胞分化過程においてタモキシフェン処理により Arf1 を欠損させたところ、細胞の生存にはほとんど影響が認められなかった一方、細胞増殖能が著しく低下することが明らかとなった。さらにその背景を調べたところ、細胞増殖を司る mTORC1 シグナルの減弱が認められた一方、細胞の生存を司る ERK 経路の活性には差が認められなかった。興味深いことに、この mTORC1 シグナルの低下は SCF 刺激や FcεRI 刺激でも観察され、マスト細胞においては Arf1-mTORC1 軸が細胞応答に密接に関与しているものと考えられた〔4〕。

本研究により、Arf 経路が T 細胞の生存維持やマスト細胞の増殖・B 細胞分化など、多様な免疫応答に関与することが明らかとなった。特に、T 細胞特異的な Arf1・Arf6 二重欠損により Th17 細胞依存性の自己免疫疾患がほぼ完全に抑制される一方、Th1 細胞や Th2 細胞に依存した感染応答は相当程度維持されているとの発見は、Arf1・Arf6 が制御する活性化 T 細胞の生存維持機構を標的とすることで、生体防御の維持と自己免疫疾患の抑制を両立する新たな治療法開発に繋がる可能性を強く示唆する。

<文献>

- [1] Sumiyoshi, M. *et al.*, *J. Immunol* **206**: 366-375. (2021)
- [2] Slack, M. *et al.*, *Mol. Immunol.* **68**: 507-512. (2015)
- [3] Rasmussen, L. *et al.*, *Cell Metab.* **31**: 1047-1049. (2020)
- [4] Kotani, Y. *et al.*, *Sci.Rep.* **12**: 22297. (2022)

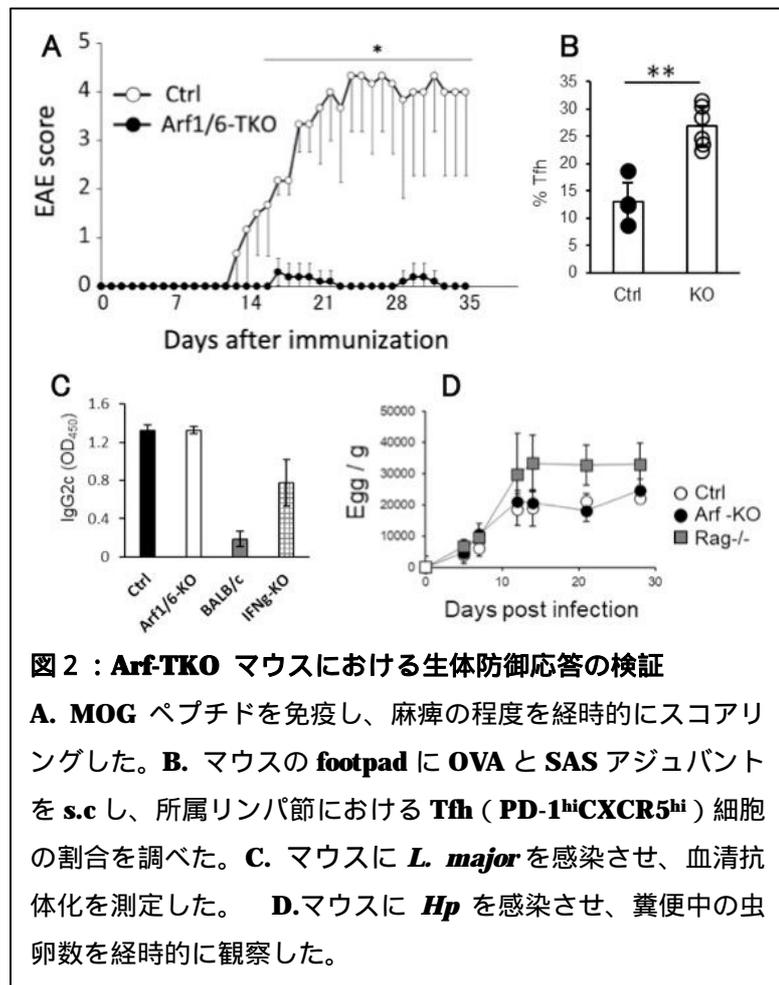


図2 : Arf-TKO マウスにおける生体防御応答の検証

A. MOG ペプチドを免疫し、麻痺の程度を経時的にスコアリングした。**B.** マウスの **footpad** に **OVA** と **SAS** アジュバントを **s.c** し、所属リンパ節における **Tfh (PD-1^{hi}CXCR5^{hi})** 細胞の割合を調べた。**C.** マウスに **L. major** を感染させ、血清抗体量を測定した。**D.** マウスに **Hp** を感染させ、糞便中の虫卵数を経時的に観察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tran Nguyen Truc Linh, Matsuda Satoshi, Takenouchi Akiko, Tran Thuy Huong Quynh, Kotani Yui, Miyazaki Tatsuhiko, Kanda Hiroaki, Yoshizawa Katsuhiko, Tsukaguchi Hiroyasu	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanism of cystogenesis by Cd79a-driven, conditional mTOR activation in developing mouse nephrons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-27766-2	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 Kotani Yui, Sumiyoshi Mami, Sasada Megumi, Watanabe Toshio, Matsuda Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Arf1 facilitates mast cell proliferation via the mTORC1 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26925-1	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 Nakada-Honda Narumi, Cui Dan, Matsuda Satoshi, Ikeda Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Intravenous injection of cyclophilin A realizes the transient and reversible opening of barrier of neural vasculature through basigin in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98163-w	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 Maruyama Masato, Nakano Yousuke, Nishimura Takuya, Iwata Ryoichi, Matsuda Satoshi, Hayashi Mikio, Nakai Yuki, Nonaka Masahiro, Sugimoto Tetsuo	4. 巻 44
2. 論文標題 PC3-secreted microprotein is expressed in glioblastoma stem-like cells and human glioma tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 910-919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00868	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 -

1. 著者名 Sumiyoshi Mami, Kotani Yui, Ikuta Yuki, Suzue Kazutomo, Ozawa Madoka, Katakai Tomoya, Yamada Taketo, Abe Takaya, Bando Kana, Koyasu Shigeo, Kanaho Yasunori, Watanabe Toshio, Matsuda Satoshi	4. 巻 206
2. 論文標題 Arf1 and Arf6 Synergistically Maintain Survival of T Cells during Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 366-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000971	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Mami Sumiyoshi, Yui Kotani, and Satoshi Matsuda
2. 発表標題 Arf pathway plays a critical role in metabolic reprogramming during T cell activation
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 小谷 唯、住吉 麻実、笹田 萌未、小澤 まどか、片貝 智哉、渡邊 利雄、松田 達志
2. 発表標題 Arf1-BKO マウスでは Germinal Center B 細胞が消失する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mami Sumiyoshi, Yui Kotani, Yoichi Maekawa, and Satoshi Matsuda
2. 発表標題 T-lineage specific Arf-deficient mice are susceptible to Leishmania major infection.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住吉 麻実、小谷 唯、笹田 萌未、鈴江 一友、金保 安則、渡邊 利雄、松田 達志
2. 発表標題 Arf欠損T細胞におけるTCR刺激依存的なアポトーシス亢進の分子機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷 唯、住吉 麻実、笹田萌未、渡邊 利雄、松田 達志
2. 発表標題 肥満細胞における低分子量Gタンパク質Arf1の機能解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 液性免疫応答の制御剤、(中略)スクリーニング方法	発明者 松田 達志	権利者 学校法人 関西 医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-004713	出願年 2023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
研究協力者	住吉 麻実 (SUMIYOSHI Mami)		
研究協力者	小谷 唯 (KOTANI Yui)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	渡邊 利雄 (WATANABE Toshio)		
研究協力者	前川 洋一 (MAEKAWA Yoichi)		
研究協力者	鈴江 一友 (SUZUE Kazutomo)		
研究協力者	下川 周子 (SHIMOKAWA Chikako)		

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