

機関番号：34417

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790482

研究課題名 (和文) Mst1 欠損マウスにおける免疫細胞の接着異常による

自己免疫疾患の発症機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis for the mechanism of inducing the autoimmune-like diseases in the Ste20-like kinase Mst1 deficient mice.

研究代表者

植田 祥啓 (UEDA YOSHIHIRO)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90533208

研究成果の概要 (和文)：

Mst1 欠損マウスの自己免疫症状の発症に相関して、制御性 T 細胞の産生の低下、また TCR 遺伝子導入マウスモデルを用いることにより、胸腺における正の選択の過程の異常が明らかになった。2 光子顕微鏡により胸腺スライス上の胸腺細胞の動態を観察したところ CD69+陽性の DP 細胞の直線性移動の低下、SP 細胞の移動速度の低下が観察され、これらの異常が胸腺細胞の分化に異常をきたして自己寛容が破綻する可能性が提示され、自己寛容機構における Mst1 の新しい役割が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Mst1 deficient mice exhibited autoimmune phenotypes such as leukocyte infiltration in multiple tissues as well as the production of autoantibody. Indeed, Mst1 deficiency caused impaired the thymocyte selection in the TCR transgenic models as well as the generation of Treg in the thymus. Observation of thymocyte dynamics on the thymic slice by 2-photon microscope revealed the defective thymocyte migration in the cortex and medulla. Our observations suggest the novel roles for Mst1 in the regulation of self-tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自己免疫・インテグリン・Mst1・リンパ強雨の分化・リンパ球動態・接着

1. 研究開始当初の背景

本研究室では低分子量 G 蛋白質 Rap1 がインテグリン活性化の過程を調節する鍵となる分子であることを突き止め 2、下流分子である RAPL3 や Mst1 kinase (Mst1)4 をクローニングし、Rap1 シグナルのリンパ組織の形成や T 細胞と抗原提示細胞間の免疫シナプス形成など免疫系の構築や活性化における重

要性を明らかにしてきた。実際、RAPL 遺伝子欠損マウスではケモカインによるリンパ球の接着の誘導や移動が著しく低下し、二次リンパ器官の低形成、辺縁帯(MZ)B 細胞の減少、胸腺細胞の移出低下が起った 5。さらに本研究室では Rap1/RAPL の下流エフェクター分子である Mst1 のノックアウトマウス (Mst1^{-/-}) を作製し、in vivo における Mst1 の

役割を明らかにすることを試みたところ、RAPL-/-マウスと同様な欠陥が観察された。このことから、このような結果から、Mst1-/-マウスにおいては免疫細胞の接着や動態の異常により抗原に対する適応免疫応答の弱体化が予測された。

しかしながら、本研究室ではこの予想に反して Mst1-/-マウスは自己免疫疾患、特に自己免疫性膵炎を呈して、自己免疫性胃炎を発症することを見いだした。実際、生後 2-10 ヶ月の Mst1-/-マウスにおいては、膵臓と胃に白血球の浸潤がみられ、膵臓外分泌細胞、胃壁細胞の壊死がみられた。膵臓の破壊に伴い、血中膵臓アミラーゼの低下がみられ、また、抗胃壁抗体の産生が確認された。以上のことから Mst1 欠損によるインテグリンの機能異常が、外来抗原に対する免疫の活性化だけではなくリンパ球の自己免疫寛容の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、Mst1-/-マウスに発症する自己免疫疾患の原因を明らかにし、それをもとにインテグリンの機能が自己免疫寛容を調節するメカニズムを追求することを目的とし、以下のことを検討した。

(1) Mst1-/-マウスにこの自己免疫疾患の原因を胸腺 T 細胞の負の選択、Treg の発生・機能の異常、B 細胞の負の選択の観点から検討する。

(2) Mst1 欠損によるインテグリンの機能の低下による細胞相互作用の弱体化に注目し、Mst1 欠損胸腺内未熟 T 細胞、Treg の胸腺上皮細胞、DC の相互作用、あるいはリンパ節 Treg と DC との相互作用を標的細胞の蛍光染色と 2 photon 顕微鏡を駆使して in vivo, ex vivo で見る実験系を確立し、Mst1 欠損による接着効率低下と胸腺 T 細胞の負の選択、Treg 細胞の発生・機能との関係性を追跡する。

本研究は抗原「非」特異的なインテグリンのシグナルが自己免疫寛容を調節するという新しい自己寛容の調節機構に挑戦するものであり、また Rap1 を中心としたインテグリンの下流のシグナルが

自己免疫疾患に対する新しい創薬のターゲットとして役立つ可能性を提案するものである。

3. 研究の方法

(1) Mst1^{-/-}マウスにおける自己免疫疾患の病態の詳細な解析。組織における白血球の浸潤は HE 染色および免疫組織化学染色方により検討した。自己抗体の検出は血清希釈液を正

常マウス組織に反応させて蛍光二次抗体により検出するか、自己抗原を用いた ELISA により行った。フローサイトメトリーにより末梢の免疫組織におけるエフェクターメモリー T 細胞の割合を測定した。

(2) TCR 遺伝子導入マウスによる胸腺細胞の分化の検討

Mst1 欠損マウスを HY 特異的 TCR 遺伝子導入マウスまたは OVA 特異的 TCR 遺伝子導入マウス (OTII) と掛け合わせることにより、Mst1 欠損 TCR 遺伝子導入マウスを作製した、蛍光標識得意抗体とフローサイトメトリーにより、胸腺細胞のサブセットを解析した。

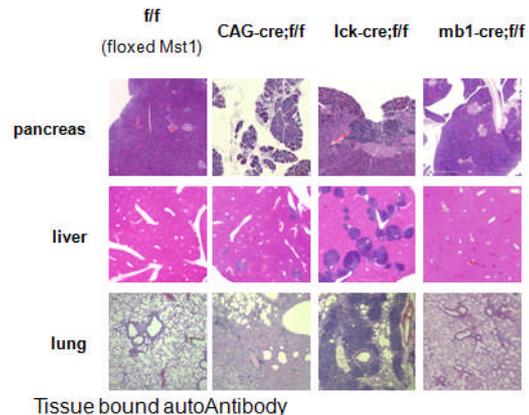
二光子顕微鏡による胸腺細胞動態の観察

胸腺スライスを作製し、セルソーターで単利した胸腺細胞を CFSE または CMTMR で標識後、数時間組織培養し、二光子顕微鏡により皮質・髄質における胸腺の動態を観察した。

4. 研究成果

(1) Mst1 欠損による自己免疫症状

HE staining



Tissue bound autoAntibody

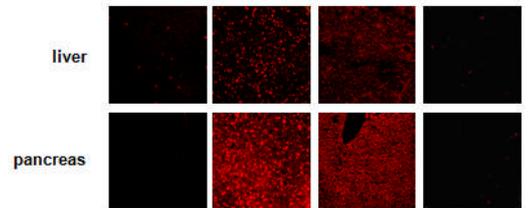


図 1 加齢した Mst1 欠損マウス (CAG-cre;f/f), T 細胞特異的 Mst1 欠損マウス (lck-cre;f/f), B 細胞特異的 (Mb-1-cre;f/f) Mst1 欠損マウスにおける組織像と組織結合性の自己抗体の検出

加齢した Mst1 欠損マウスでは、多臓器に羽炎症性の細胞浸潤が観察され、組織結合性の自己抗体 (図 1)、抗胃壁抗体、抗核、抗細

胞質抗体の産生が確認された。また、末梢の

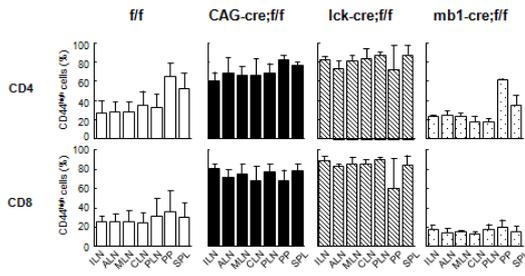


図 2 末梢の免疫組織における CD44 陽性エフェクターメモリー型 T 細胞の割合

免疫組織においては CD44^{high} エフェクター T 細胞の増加が観察された(図 2)。このような自己免疫用の症状は T 細胞特異的に Mst1 を欠損させたマウスでは同様に見られたが B 細胞特異的に Mst1 を欠損させたマウスでは見られなかった(図 1, 2)。したがって、自己免疫症状の誘導に T 細胞による Mst1 欠損で十分であることが示された。

(2) Mst1 欠損における胸腺細胞の正・負の選択に対する影響

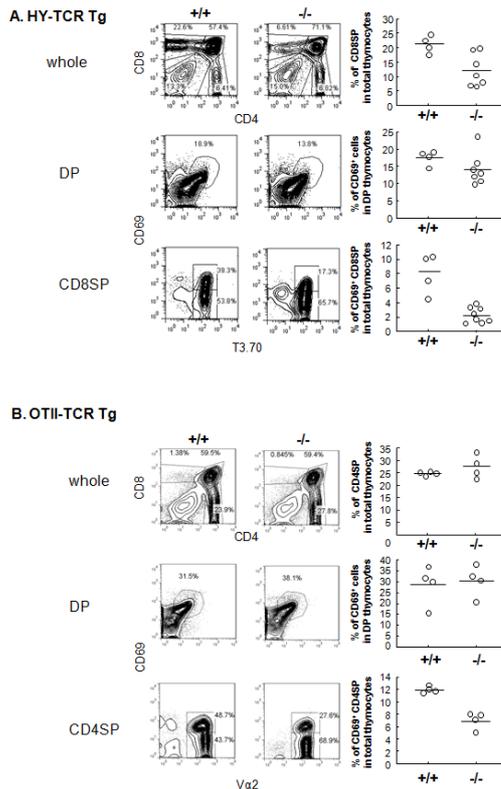


図 3 Mst1 欠損 HY-TCR Tg マウス、OTII マウスにおける胸腺 SP, CD69⁺DP, CD69⁺SP 細胞の割合

この結果から Mst1 欠損により T 細胞の自己免疫寛容の機構が破綻している可能性が考

えられた。T 細胞の自己免疫寛容の成立には胸腺における未熟 T 細胞の正の選択、自己反応性の T 細胞クローンの負の選択が重要である。本研究者は胸腺における胸腺 T 細胞の選択を検討するために、外来抗原である OVA に特異的 TCR トランスジェニック(Tg)Mst1 欠損マウスと雄特異的 HY 抗原に対して特異的な TCR Tg マウスを交配した。正常型に比べて Mst1 欠損した OTII や雌の HY 特異的な TCR Tg では、CD69+CD4SP 又は CD8SP 細胞数が減少しており、正の選択の過程に異常があることが示唆された。また、これら Mst1 欠損マウスでは胸腺における FoxP3 陽性制御性 T 細胞数が減少していた。

以上の結果から、本研究者は、Mst1 欠損マウスでは胸腺細胞のインテグリンを介した動態・接着の異常により自己反応性の T 細胞の選択や制御性 T 細胞の産生が破綻して自己免疫の症状が誘導されると考えた。

(3) Mst1 欠損胸腺細胞の動態観察

そこで、正常型マウスと Mst1 欠損マウスから胸腺細胞から DP 細胞と SP 細胞をフローサイトメトリーにより単離して細胞染色用蛍光染色した。さらにこれらの胸腺細胞をビブラトームにより作製した胸腺スライスの上に加えて組織培養を行い、高酸素条件下で 2 光子励起顕微鏡により胸腺細胞の動態を観察した。その結果、胸腺皮質における DP 細胞の平均移動速度(約 5 $\mu\text{m}/\text{min}$)に変化に差は見られなかったが、髄質における SP 細胞の平均移動速度が 16 $\mu\text{m}/\text{min}$ から 11 $\mu\text{m}/\text{min}$ に低下した(図 4)。

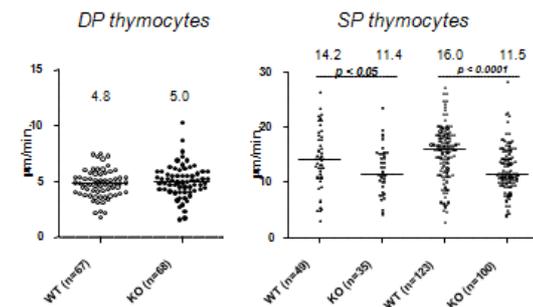


図 4 胸腺スライス上を動く Mst1 欠損マウス(KO)、正常型マウス(WT)における胸腺 DP、SP 細胞の瞬間速度

また、正の選択後を受けた DP 細胞は CD69 を発現するため、正常型マウスと Mst1 欠損マウスから CD69 陽性 DP 細胞を単離して、同様に動態を比較した。すると Mst1 欠損 CD69 陽性 DP 細胞は平均速度(約 7 $\mu\text{m}/\text{min}$)こそ有意な差は見られなかったが、皮質から髄質へ向かう直線的な移動の頻度が低下し

ていた(図 5)。

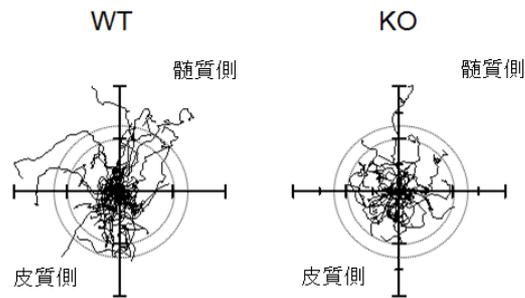


図 5 胸腺スライス上を動く Mst1 欠損マウス (KO)、正常型マウス (WT) における胸腺 CD69+DP、SP 細胞の軌跡

よって Mst1 欠損マウスでは正の選択後の胸腺 DP 細胞の皮質から髄質へのアクセスや髄質内における SP 細胞の移動が異常であると考えられる。髄胸腺の髄質ではインスリンなど末梢の組織特異的抗原に対する自己反応性の T 細胞の負の選択や制御性 T 細胞の産生が行われおり、Mst1 欠損による胸腺細胞の動態異常が、これらの過程の破綻を引き起こす可能性が示された。

以上より、自己寛容機構における Mst1 の新しい役割が示唆された。

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 3 件)

1. Katagiri, K., Ueda, Y., Tomiyama, T., Yasuda, K., Toda, Y., Ikehara, S., Nakayama, K.I., Kinashi, T. RAPL deficiency caused lymphoproliferative disorders through the mislocalization of p27^{kip}. *Immunity* 34(1);24-38. 2011 査読あり
2. Ebisuno, Y., Katagiri, K., Katakai, T., Ueda, Y., Nemoto, T., Inada, H., Nabekura, J., Okada, T., Kannagi, R., Tanaka, T., Miyasaka, M., Hogg, N., Kinashi, T. Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood* 28;115(4) 804-814. 2010 査読あり
3. Katagiri K, Katakai T, Ebisuno Y, Ueda Y, Okada T, Kinashi T. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J.* 6:26(9)1319-31. (2009) 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. Tatsuo Kinashi, Koko Katagiri, Katakai Tomoya, Yoshihiro Ueda, Katsuyoshi Habiro, Department of Molecular Genetics, Kansai Medical University, Osaka, Japan. 「Crucial roles of Mst1 and RAPL (RASSF5b) in lymphocyte adhesion and proliferation」 The second workshop on the HIPPO tumor suppressor pathway, Rome, Italy, Nov 2-5, 2010
 2. Y. Ueda, K. Katagiri, K. Yasuda, T. Tomiyama, K. Habiro, T. Katakai, S. Ikehara, T. Kinashi
「The Ste20-like kinase Mst1 is essential for maintenance of T cell homeostasis and immunological tolerance.」 14th International Congress of Immunology, Kobe August 23-27, 2010 神戸国際会議場
 3. 植田祥啓 Roles for Mst1 kinase in T cell homeostasis and autoimmune diseases, 日本免疫学会, 大阪, 2009 年 12 月 2 日～4 日, 大阪国際会議場
6. 研究組織
(1) 研究代表者
植田 祥啓 (UEDA YOSHIHIRO)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：90533208
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし