

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590579

研究課題名(和文) インテグリン活性化制御の“乱れ”は免疫感受性を高めるか？

研究課題名(英文) Aberrant activation of integrins in the pathogenesis of immune diseases

研究代表者

島岡 要 (SHIMAOKA, Motomu)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40281133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インテグリンは、自己免疫的組織障害を引き起こす炎症細胞の臓器特異的ホーミングに寛容していると考えられる。本研究では、インテグリン活性化制御のバランスの崩れが引き起こす病態と、細胞レベルと個体レベルでの制御メカニズムや他の重要なレセプターとのクロストークの存在について研究し、新たな基礎医学的知見を得ることができた。インテグリンの活性化制御が病気やその治療に対して持つグローバルなインパクトについても俯瞰した視点から解説し、一般の人が理解できるような解説をすることができた。また、国際的な共同研究を行い、新たな抗インテグリン治療薬のシードとなるような物質発見のプラットフォームの妥当性を示した。

研究成果の概要(英文)：The unique feature of integrins is the ability to dynamically enhance affinity to bind ligands in opposing cells under shear stress. This study aimed to investigate how the aberrantly regulated integrin activation would affect leukocyte trafficking to inflamed tissues as well as how integrins cooperate with signaling elicited from other receptors such as connexins. The results obtained in this investigation have provided a framework for better understanding of integrin activation in inflammatory disorders and a potential platform technology to mitigate tissue injury resulting from sustained integrin activation seen in chronic inflammation. A few review papers published here would facilitate better public understanding of translational medicine and the critical importance of biomedical research.

研究分野：免疫学・血管生物学・構造生物学・麻酔集中治療学・血栓止血学

キーワード：免疫 炎症 接着分子 細胞接着・炎症 ケモカイン アレルギー ショック

## 1. 研究開始当初の背景

接着分子インテグリンはリンパ球の標的臓器へのホーミングを制御すると同時に、共刺激シグナルを伝達し、リンパ球の活性化と分化に影響をあたえ免疫病の病態生理において2つの重要な機能を果たす。申請者らはインテグリン親和性がグローバルな構造変化により巧妙に制御され、ダイナミックに細胞接着をコントロールすることを明らかにしてきた。以来インテグリン親和性制御バランスの“乱れ”(Aberrant Regulation)という新しいコンセプトを提唱し(*J Clin Invest* 2007. 117:2391, エディトリアル)、免疫病との関わりを研究してきた。本研究ではインテグリン親和性制御の“要(かなめ)”を、点変異導入により破壊したノックインマウスを用いて、親和性制御の“乱れ”が免疫病の病態生理に与えるインパクトの分子基盤を確立することを目的とした。

申請者らは、インテグリンの最大の特徴であるダイナミックなリガンド親和性の変化が、細胞内からのシグナルがトリガーするグローバルなコンフォメーション変化により制御されていることを一連の論文で明らかにしてきた。この構造変化と連動したダイナミックな親和性制御により、流血中を流れる白血球が血管内皮表面に発現されたケモカイン刺激を受け、目的の血管内皮上に迅速に静止することを可能にしていると考えられる。また、インテグリンの活性化に必要なコンフォメーション変化の“要”となる部位を同定し、インテグリンの活性化シグナルを阻害するさまざまな戦略を開発、さらにインテグリンを標的とした siRNA デリバリーの研究をしてきた。臨床的に使用される低分子物質が、インテグリンの活性化の“要”を標的として、細胞接着を阻害する機序を明らかにした。

インテグリンの制御異常は免疫病の病態と深くつながっており、リンパ球に発現するインテグリンは治療標的として注目されている。米国 FDA は 2003 年にインテグリン LFA-1 に対する抗体 Efalizumab を乾癬(T細胞による皮膚を炎症の場とする自己免疫疾患)に対する治療薬として承認した。さらに 2004 年インテグリン  $\alpha 4$  に対する抗体 Natalizumab が、多発性硬化症(中枢神経系での自己免疫性炎症)に、2008 年に炎症性腸疾患クローン病に対して FDA の承認を受けた。しかし、白血球インテグリンの機能を全面的に阻害することは医原性の免疫不全を誘導し、不顕性 JC ウィルスの再活性化にともなう致死性脳症が一部患者で発症することがわかった。したがって、インテグリン機能

の全面阻害ではなく、むしろ適正化をめざした安全性の高い新規治療法開発が必要であり、インテグリン機能制御異常の病態をより深く理解することが急務であると考えられる。機能制御異常とくに“乱れ”を *in vivo* で研究するため、インテグリン親和性制御の“要”を破壊した新規ノックインマウスを用いて行うという本研究の着想に至った。

LFA-1 は免疫病発症の病態生理において 2 つの重要なインタラクションに関与している。1 つは血管外遊走の際の T 細胞と血管内皮細胞とのインタラクション、もう 1 つは組織内での免疫反応誘導における T 細胞と抗原提示細胞とのインタラクションである。申請者の作成した LFA-1 ノックインマウスは、親和性制御不全により細胞接着と脱着のバランスが崩れ、T 細胞と血管内皮細胞とのインタラクションに異常をきたす。しかし、もう 1 つの重要なプロセスである T 細胞と抗原提示細胞のインタラクションについては未知のままである。本研究では T 細胞と抗原提示細胞のインタラクションに焦点を当て、LFA-1 制御異常のインパクトを以下の具体的な目的に総合的に研究した。

## 2. 研究の目的

具体的な研究の背景と動機は、インテグリンの活性化制御を詳細に検討することであり、我々はインテグリンの活性化を負に制御する分子内制御機構構造を点変異導入により破壊した 3 種類の遺伝子改変マウスを作成してきたことを利用しました。これらのマウスのうちでもすべてのリンパ球に発現し、血管内皮細胞との接着制御を介して免疫細胞の臓器特異的ホーミングと、樹状細胞などの抗原提示細胞との免疫シナプス形成制御を介して抗原特異的免疫反応とリンパ球の活性化に関与しているインテグリン LFA-1 のネガティブレギュレーション機構に焦点を合わせて研究を行うことを目的としました。今回の研究ではこの遺伝子改変マウスを用いることにより、インテグリン LFA-1 の活性化制御のバランスが崩れた時に、その影響が免疫系の恒常性維持にどのようなインパクト及ぼすかということを検討も目的としました。ここで取り組んだ課題が生物学的に意義あるのは、インテグリンファミリー全体に共通する特徴が、生理的状态つまり健康な個体ではインテグリン活動性状態(=リガンド親和性)というものが通常は低く維持されており、たとえ細胞表面もインテグリンが発現されていても、細胞接着は起こりません。他の受容体例えばケモカイン受容体や T 細胞受容体を介した刺激が入ると細胞内シグナル

伝達経路を介して、インテグリンのグローバルなコンフォメーション変化が起こり、それと連動してリガンド結合力（親和性）が秒単位で著しく上昇するという性質を持っていました。つまりインテグリンの接着性は通常は低く抑えられていることにより、必要時にのみ活性化されるというダイナミックな制御が可能になると考えられます。このような問題設定と仮説設定のもと研究を推し進めました。

### 3. 研究の方法

3-1) 免疫細胞と血管内皮細胞を培養し、炎症反応を反映するような実験的刺激を与え、その細胞反応の影響をタンパクレベル（ウェスタン、FACS）、mRNA レベル(Quantitative RT-PCR)を用いて解析した(Okamoto et al. Exp Cell Res. 2014)。

3-2) 遺伝子改変マウスの病像を組織切片を免疫染色法を用いて詳細に解析した(Yamanaka et al. PLOS One 2014)。

3-3) 試験管内でのハイスループットスクリーニングを用いて、目的の抗インテグリン活性を持つ、低分子物質を探索した(Kollmann et al. Bioorg Med Chem 2014)。

3-4) 網羅的な文献的検索と先行研究の調査を行い、俯瞰的な総説を執筆した(Kawamoto et al., Autoimmune Dis 2012) (Tanigami et al., Pain Res Treat 2012) (Okamoto et al. Crit Care Res Pract 2012)。

### 4. 研究成果

まずこのインテグリンの活性化制御機構の乱れが様々な臓器や病態でどのように対応している可能性があるのかを俯瞰するために、我々は自己免疫疾患におけるインテグリンの役割 (Kawamoto et al., Autoimmune Dis 2012) と免疫細胞と神経系との役割 (Tanigami et al., Pain Res Treat 2012) に関する総説論文を発表してきました。具体的には、インテグリンの活性化の乱れが、中枢神経系の炎症部に持続的に自己の神経細胞構成成分であるミエリンに反応性の異常免疫細胞の集積を促している可能性と、4 インテグリンを抗体で長期的に患者で阻害した時に起こる医原性免疫不全状態について解説しました(Kawamoto et al., Autoimmune Dis 2012)。また様々な代謝異常で観察される脳浮腫でも不適切な炎症反応の持続による慢性炎症が関与している可能性についても解説しました(Tanigami et al., Pain Res Treat 2012)。他方、活性化状況が細胞内のシグナル伝達を通じて他のレセプターとのクロストークが存在するという点にも着目

しその中でも特にインテグリンとチャンネル蛋白であるコネクシン分子との相互作用(Okamoto et al. Crit Care Res Pract 2012)についても報告することができました。中枢神経系で脳神経血管関門を形成している細胞成分でのインテグリンやリガンドの発現と、他のレセプターとの細胞内シグナル伝達を介したクロストークの可能性について解説しました。

さらにインテグリンの活性が制御が間接的に直接的にチャンネル蛋白とインタラクションをすることにより、このクロストークが慢性炎症の病態やガン転移や動脈硬化の進展に關与する可能性についても検討し報告してきました(Okamoto et al. Exp Cell Res. 2014)。とくに細胞の接着と遊走には複数の細胞接着分子とインテグリンとの巧妙に制御された活性化のコントロールが必要である可能性を示すと同時に、免疫細胞の移動にコンザープされているマシナリーが、血管内皮細胞の新生や創傷治癒また、病的な創傷治癒に酷似していると考えられているガン進展の過程にも、インテグリンが関与している可能性をサポートする研究結果を示しました。

インテグリンの活性化制御で得た知見をもとに、その病的な制御異常が炎症性サイトカインの過剰分泌と共に様々な臓器例えば皮膚を含めた全身性の炎症に關与する可能性についても共同研究者とともに明らかにしてきました(Yamanaka et al. PLOS One 2014)。皮膚の炎症には臓器特異的な細胞接着因子と、ケモカイン・ケモカインレセプターが必要なことが知られていますが、本研究成果で示されたサイトカイン IL-1 の過剰産生における慢性炎症にも、臓器特異的な細胞接着分子インテグリンの活性化の制御異常が関与している可能性をサポートする知見がえられました。

またインテグリンの活性化をうまく制御ができないために、リンパ球の移動や接着が最適化されない状況を生体内で作り出したマウスを用いて、炎症性腸炎のマウスモデルにおいて臓器での炎症反応がある特定の実験状況においてはむしろ減弱する一方、逆に別の特定の状況においては臓器障害が増悪する可能性について示唆するようなデータを得ています(未発表)。このように皮膚と腸管という2つのことになった微小環境での病的な免疫細胞ホーミングを誘導するメカニズムには、インテグリン活性化制御異常という共通の病因が存在する可能性が示唆されました。

さらには米国の共同研究者との産学連携研究によりインテグリンの活性化状態制御サイト(上記のインテグリン LFA-1 ノックインマウスで点変異を導入されたまさに同じ部分に結合する低分子を探索した)を治療標的とした低分子阻害剤のハイスループットスクリーニングを用いた新規テクノロジーにより同定可能であるというイノベーションのプラットフォームの妥当性についても報告をしてまいりました(Kollmann et al. *Bioorg Med Chem* 2014)。このような新たなテクノロジーを基礎研究の成果とうまくシンクロさせることにより、新たなイノベーションを生み出す可能性を示唆します。

これらの成果は当初予定していたとおりインテグリンの活性化制御異常が免疫系の恒常性破壊をとおして、臓器障害に至る可能性を実験動物レベルで示したと同時に、その制御異常を特異的に巻き戻す低分子阻害剤開発の可能性についても示唆することができ、目標は達成されたと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Okamoto T, Akita N, Hayashi T, Shimaoka M, Suzuki K. Endothelial connexin32 regulates tissue factor expression induced by inflammatory stimulation and direct cell-cell interaction with activated cells. *Atherosclerosis* 2014; 236: 430-437 査読有  
DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2014.07.025
2. Yamanaka K, Nakanishi T, Saito H, Shimaoka M, Mizutani H. (14 人略, 18 番目) Persistent release of IL-1s from skin is associated with systemic cardio-vascular disease, emaciation and systemic amyloidosis: the potential of anti-IL-1 therapy for systemic inflammatory diseases. *PLoS One* 2014; 9: e104479 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone. 0104479
3. Kollmann CS, Bai X, Tsai CH, Shimaoka M, Evindar G. (9 人略, 13 番目) Application of encoded library technology (ELT) to a protein-protein interaction target: discovery of a potent class of integrin lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) antagonists. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 2353-2365 査読有  
DOI:10.1016/j.bmc.2014.01.050
4. Okamoto T, Akita N, Kawamoto E, Hayashi T, Suzuki K, Shimaoka M. Endothelial connexin32 enhances angiogenesis by positively regulating tube formation and cell migration. *Exp Cell Res* 2014; 321: 133-141 査読有  
DOI:10.1016/j.yexcr.2013.12.002
5. Yuki K, Bu W, Xi J, Shimaoka M, Eckenhoff R. Propofol shares the binding site with isoflurane and sevoflurane on leukocyte function-associated antigen-1. *Anesth Analg* 2013; 117: 803-811 査読有  
DOI:10.1213/ANE.0b013e3182a00.ae0
6. Yuki K, Bu W, Xi J, Shimaoka M, Eckenhoff R. Volatile anesthetics, not intravenous anesthetic propofol bind to and attenuate the activation of platelet receptor integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *PLoS One* 2013; 8: e60415 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0060415
7. Maruyama K, Okamoto T, Shimaoka M. Integrins and Nitric Oxide in the Regulation of Glia Cells: Potential Roles in Pathological Pain. *J Clin Anesth Res* 2012; 4: 292 査読有
8. Yuki K, Bu W, Xi J, Sen M, Shimaoka M, Eckenhoff RG. Isoflurane binds and stabilizes a closed conformation of the leukocyte function-associated antigen-1. *FASEB J* 2012; 26: 4408-441712 査読有  
DOI:10.1096/fj.12-212746
9. Srinivasan C, Peer D, Shimaoka M, Integrin-targeted nanoparticles, *Methods Mol Biol* 2012; 820: 105-116 査読有  
DOI:10.1007/978-1-61779-439-1\_7
10. Okamoto T, Tanigami H, Suzuki K, Shimaoka M. Thrombomodulin: a bi-functional modulator of inflammation and coagulation in sepsis. *Critical Care Research and Practice* 2012; 614545 [Epub] 査読有  
DOI:10.1155/2012/614545
11. Banerjee D, Shimaoka M. Lentiviral gene transfer method to study integrin function in T lymphocytes. (review) *Methods Mol Biol* 2012;757: 47-54 査読有  
DOI:10.1007/978-1-61779-166-6\_4

〔図書〕(計 1 件)

1. Shimaoka M. Editor, Integrin and Cell Adhesion Molecules, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Vol: 757, 2012; 529

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 岡本貴行, 秋田展行, 林辰弥, 島岡要, 鈴木宏治 血管内皮細胞間ギャップ結合が血管新生に及ぼす影響の解析. 第36回日本血栓止血学会学術集会, 大阪国際交流センター(大阪市), May 29-31, 2014
2. Shimaoka M. Novel small molecule antagonists that directly bind to and suppress activation-induced conformational conversion of leukocyte integrins. The 3<sup>rd</sup> CSI/ JSI/ KAI Joint Symposium on Immunology, Pohang (Korea), December 1-3, 2013.
3. 島岡要 Structural Basis of Volatile Anesthetic Inhibition of Integrins. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ(千葉市), December 11-13, 2013
4. 島岡要 インテグリン機能と創薬への応用. 第75回日本血液学会学術集会(招待講演), ロイトン札幌(札幌市), October 11-13, 2013
5. 島岡要 Integrin-targeted therapeutics. 第35回日本血栓止血学会学術集会(招待講演), 山形国際ホテル(山形市), May 30-June 1, 2013
6. 島岡要 インテグリン活性化制御の構造的基盤. Structural basis of integrin activation and integrin-targeted therapeutics. 第90回日本生理学会大会, タワーホール船堀(東京), March 27-29, 2013
7. Shimaoka M. Conformational regulation of integrin activation. ISBRA 2012 Satellite Symposium "Recent Progress in Biomedicine on Alcoholism" (招待講演), Buzz Hall (Kyoto), September 14, 2012
8. 島岡要 血管内皮炎症の分子機構: インテグリンにまつわる3つのロードマップ. 第34回日本血栓止血学会学術集会(招待講演), ハイアットリージェンシー東京(東京), June 7-9, 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島岡 要 (SHIMAOKA, Motomu)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 40281133

### (2) 研究分担者

岡本 貴行 (OKAMOTO, Takayuki)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 30378286