

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291047

研究課題名(和文) Rap1シグナルと哺乳類Hippoによる細胞接着と増殖の統合的制御

研究課題名(英文) Coordinated regulation of cell adhesion and growth through Rap1 signaling and mammalian Hippo pathway.

研究代表者

木梨 達雄 (KINASHI, Tatsuo)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30202039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路は形態形成や細胞増殖の調節に重要な役割を果たしている。今回の研究で免疫系における新たな役割がみいだされた。マウスおよびヒトについて調べた結果、Rap1-RAPL-Mst1/Mst2(哺乳類Hippo)のシグナル経路は、1.自己反応性の未熟リンパ球を排除する過程、2.末梢のリンパ球における異物(抗原)の認識に必要な細胞接着過程、3.制御性T細胞では抗原に特異的抑制過程、4.細胞障害性T細胞においては抗腫瘍効果を負に制御する働きがあること、などが明らかになった。これらの成果は炎症・自己免疫・腫瘍免疫の病態理解や創薬開発などの疾患克服に向けて重要な知見を与えられられる。

研究成果の概要(英文)：The Hippo pathway plays an important role in morphogenesis and cell proliferation. In this study, we investigated roles of the mammalian Hippo pathway in mice and humans, and revealed its novel roles in the immune system. The signal transduction through Rap1-RAPL-Mst1/Mst2 (mammalian Hippo) were requisitely involved in the following processes; 1. thymic selections to eliminate self-reactive thymocytes, 2. antigen-specific adhesion of peripheral T cells to recognize foreign antigen, 3. antigen-specific suppressor functions of regulatory T cells, 4. the negative regulation of anti-tumor effects of cytotoxic T cells. These findings provide useful information to our understanding of inflammation, autoimmune, anti-tumor immunology and thereby development of therapeutics.

研究分野：免疫学

キーワード：Rap1 Hippoシグナル Mst1 インテグリン リンパ球

1. 研究開始当初の背景

細胞接着と増殖の制御は器官形成、創傷治癒、生体防御などの過程で密接に関連しながら機能している。細胞内シグナルによる接着性調節 (inside-out シグナル) を受け、細胞接着の強さをダイナミックに変化させる機能と、接着によって細胞外環境の情報を感知し、細胞内へと伝える機能 (outside-in シグナル) があり、これらの双方向性のシグナル伝達が、細胞形態変化や細胞移動、さらに細胞機能、増殖、生存に影響を与える。このような接着現象を背景に 2 つの異なる研究の流れが Mst1/Mst2 の同定に至った。1 つは哺乳類の免疫担当細胞のインテグリン調節機構の研究において、低分子量 G タンパク質 Rap1 による接着調節のシグナル伝達から、もう一つはショウジョウバエの Hippo と呼ばれる接触阻害と器官サイズの調節シグナルからである。Rap1 による RAPL、Mst1 へのシグナル伝達がケモカインによる LFA-1/ICAM-1 を介するリンパ球ホーミング過程に必要な血管内皮との安定した接着に必要である。一方、ショウジョウバエ Hippo (Mst1/2) 経路に関与する分子は哺乳類にいたるまで保存され、形態形成や臓器サイズを調節している。Hippo の上流のシグナルとして、細胞骨格分子 Merlin, Expanded などの細胞接着分子が存在することがショウジョウバエで知られている。ヒトで遺伝性 Mst1 欠損症が報告され、自己免疫病態を伴う T 細胞性免疫不全が特徴であった。また、我々はマウスモデルにおいて胸腺細胞の選択異常による自己免疫疾患がおこることを報告した。哺乳類 Mst1/2 の役割は免疫系において特に重要な役割を果たしていることが予想され、その調節機構について不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの Rap1 シグナルによる LFA-1 活性化と接着の研究成果から、さらに接着構造のダイナミクスによる増殖・アポトーシスへの効果に焦点をあて、Hippo 経路とのクロストークの分子的基盤と in vivo での生理的役割を解明する。そのため、以下の項目について重点的に研究を進める。

(1) 抗原刺激による LFA-1 を介した接着構造とリンパ球の活性化・増殖、細胞死のダイナミクスを可視化し、分子レベルから組織レベルにわたる追跡を行い、Rap1 シグナルと Hippo 経路による増殖・アポトーシスへの関与を明らかにする。

(2) Rap1 シグナルを改変し、個体レベルでリンパ球の抗原による増殖分化、アポトーシス過程を追跡し、Hippo 経路とのクロストークを明らかにする。

(3) ヒト免疫疾患における Mst1 の発現、機能を明らかにするため、自己免疫性脾炎を主徴とする IgG4 関連疾患を解析する。

(4) 末梢自己寛容に重要な働きをする制御性 T 細胞 (Treg) および細胞障害性 T 細胞 (CTL) における Mst1 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 接着構造の可視化と追跡法の樹立と解析

細胞接着から増殖・アポトーシスを可視化・追跡するため、Rap1 活性化可視化する Rap affinity プローブを発現したマウスを作製し、invitro による細胞接着、免疫シナプス形成 (平面脂質二重膜系、樹状細胞共培養系)、組織イメージング (リンパ組織、胸腺組織) in vivo イメージング (リンパ節) を用いて、リンパ球の抗原応答時の接着動態から増殖やアポトーシス (SCAT3 プローブによる可視化) における Rap1 シグナル、Hippo 経路の関与を解析する。

セマフォリン 3e (Sema3e) 受容体である PlexinD1 の細胞内領域は Rap1 不活化ドメイン (RapGAP ドメイン) を持つ。胸腺細胞での発現を調べ、TCR、ケモカイン刺激による Rap1 活性化阻害、免疫シナプスへの効果、plexinD1 欠損の効果を調べる。

(2) 末梢自己寛容に重要な働きをする制御性 T 細胞 (Treg) における Mst1 の機能解析のため、MHC class II 拘束 OVA 抗原特異的 OT-II TCR と Treg の機能因子である foxp3 を可視化した foxp3-GFP をもつマウスから Treg を単離し、抗原特異的抑制機能、免疫シナプス形成、リンパ組織内における樹状細胞との相互作用を計測する。

(3) 細胞障害性 T 細胞 (CTL) による腫瘍細胞に対する障害における Mst1 の機能を明らかにする。そのため MHC class I 拘束 OVA 抗原特異的 OT-I TCR をもつ OT-I マウスと Mst1 欠損マウスを交配し、OT-I; Mst1^{-/-} マウスから CD8T 細胞を単離し、CD3+IL-2 存在下の培養により CTL を樹立する。γ-interferon (IFN_γ), perforin 等を測定するとともに、OVA 抗原を発現する細胞株を用いて in vitro および in vivo の抗腫瘍活性を測定する。

(4) IgG4 関連疾患における Mst1 遺伝子のメチル化による発現調節を調べる。患者末梢血より単核球を単離し、bisulfate 法によって MST1 プロモーター領域 CpG クラスターのメチル化を調べる。また、制御性 T 細胞を単離し MST1 発現を調べメチル化との相関を調べる。

4. 研究成果

OT-II および Rap1 シグナル欠損マウス、OT-II; Rap1b KO, OT-II; Rap1a/Rap1b KO (Rap1DKO), OT-II; Mst1KO, Mst1/2 DKO を用いて免疫シナプス形成を調べた。CD4 陽性ナイーブ T 細胞および培養 T blast を平面脂質二重膜 (OVA ペプチド・MHC class II 複合体 100 分子/μm²) および ICAM-1 (200 分子/μm²) 上で免疫シナプスすなわち、中央に TCR/pMHC クラスターを LFA-1/ICAM-1 がリング状に取り囲む (pSMAC) を形成する。それに対して Rap1bKO, Mst1KO, Mst1/2DKO では接着面積および接着細胞数が減少し、pSMAC 構造が障害されるとともに cSMAC の形成も著しく低下した。Rap1 結合蛋白質 RAPL は Mst1

キナーゼの活性を亢進させる。RAPL 特異的 shRNA による knockdown すると同様に免疫シナプスが障害された。LFA-1 欠損 T 細胞は pSMAC とともに cSMAC も形成されないことから cSMAC 構造の形成に Rap1/RAPL/Mst1 シグナルが必要であることが明らかになった。

末梢リンパ節における Mst1/Mst2 の機能を調べるため、樹状細胞に OVA 抗原を提示させ、リンパ節に移入した後、リンパ節のスライス組織に OT-II;Mst1/2 DKO と OT-II マウス由来の CD4 T 細胞を導入して 2 光子顕微鏡イメージングをおこなった。その結果、Mst1/Mst2 DKO T 細胞では抗原特異的接着時間が 1/3 から 1/4 に低下していることが判明した。これらのことから Rap1 シグナル破綻による免疫シナプスの形成障害は抗原提示細胞との接着障害になることが判明した。これらの結果はこれまでに我々が報告した胸腺細胞の自己抗原認識不全と共通な障害と考えられる。

胸腺での自己抗原認識による負の選択過程を OT-II 胸腺細胞 (CD69+) とインスリンプロモーターによる OVA 抗原を発現する RIP-OVA マウス胸腺組織の共培養を 2 光子イメージングし、アポトーシス誘導 (SCAT3 プロープ) または制御性 T 細胞分化誘導 (Foxp3-GFP レポーター) が効率よく起こることが分かった。OT-II;Mst1KO 胸腺細胞 (CD69 陽性) を同様に調べた結果、アポトーシスの低下と Treg 誘導低下が明らかになった。これは Aire 陽性胸腺上皮細胞との接着障害と考えられる。Rap1 活性化の抑制は胸腺細胞の動態と抗原認識に重要な役割を果たすと考えられるが、抑制する経路は明らかではない。Rap1GAP 活性をもつと報告された plexinD1 の発現を解析すると未熟胸腺細胞 (DP) から成熟胸腺細胞 (CD69+SP) に分化する段階で発現することが分かった。Sema3e/PlexinD1 は Rap1GAP としての活性をもち、ケモカイン、TCR 刺激による Rap1 活性化を抑制し免疫シナプス形成も抑制した。plexinD1 欠損マウスを解析した結果、髄質内 SP 細胞が低下しており、分化に伴う皮質から髄質への移行が低下していることが予想される。これは Rap1 活性の抑制障害による接着の亢進を反映しているのではなかと推察された。

野生型および Mst1 欠損制御性 T 細胞の in vitro 抑制機能を調べた結果、抗原非特異的 (anti-CD3 抗体刺激) 抑制機能は正常であったが、抗原特異的抑制機能が低下していた。また、大腸炎モデルを用いて Treg の抑制機能を調べた結果、抑制機能の著しい低下が認められた。さらに Mst1 欠損 Treg は樹状細胞との抗原特異的接着低下および CD80/86 の発現抑制が障害されていた。免疫シナプスを調べたところ、野生型は移動性の免疫シナプスを形成したが、Mst1 欠損では免疫シナプスの形成が阻害され、組織イメージング解析の結果、樹状細胞との接着時間が低下していた。これらの結果から Mst1 は Treg の機能に重要な役割を果たしていることが判明した。

IgG4 関連疾患患者の末梢単核球を用いて Mst1, RAPL のプロモーター領域に存在する CpG クラスターのメチル化を調べて結果、脾臓以外の病変 (涙腺、唾液腺等) を持つ患者群は脾炎の実の患者群にくらべて有意に Mst1 のメチル化が亢進していた。一方、RAPL では変化はなく、また慢性関節リウマチ患者においても有意な差がなかった。脾外病変をもつ患者の末梢血 Treg では MST1 の発現が有意に低下していた。これらの事から脾外病変をもつ IgG4 関連疾患患者では MST1 遺伝子のメチル化による発現低下がおこり、Treg の抑制機能が低下につながって複数の臓器が障害される病態にいたったのではないかと推察された。

CTL の腫瘍殺傷能力を OT-I, OT-I;Mst1KO から樹立した CTL で比較した結果、 γ -interferon、granzyme の発現亢進が OT-I;Mst1KO CTL に認められた。また in vitro の抗腫瘍活性を OVA 抗原を発現させた前立腺癌細胞で測定したところ、抗腫瘍活性が亢進していた。また、OVA を発現した EL4 を移植し腫瘍を形成させたのち、正常 OT-I CTL, および OT-I;Mst1KO CTL を投与したところ、Mst1KO CTL 投与によって腫瘍サイズが著しく低下した。Mst1KO CD8+T 細胞では FoxO3a の発現が低下し、そのため T-bet の亢進および γ -interferon、granzyme の発現亢進に至ったと考えられた。

以上の結果より、マウスモデルおよびヒト疾患を用いた解析から、Rap1-RAPL-Mst1/Mst2 の経路は胸腺細胞、ナイーブリンパ球および制御性 T 細胞においては抗原認識特異的接着動態を制御していること、そして細胞障害性 T 細胞においては抗腫瘍効果を亢進させる働きがあることが明らかになった。この成果は Mst1/Mst2 をターゲットにした創薬に重要な知見を与え、炎症・アレルギー・自己免疫の病態において特異的に制御することによって疾患克服する戦略につながると期待される。

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 11件)

1. Ueda Y., Kondo N., Ozawa M., Tomiyama T., Yasuda K., Kinashi T., Sema3e/plexin D1 modulates immunological synapse and migration of thymocytes by Rap1 inhibition *J Immunol.* 2016 Apr 1;196(7):3019-31. doi: 10.4049/jimmunol.1502121. Epub 2016 Feb 26. 査読有
2. Yasuda K., Ueda Y., Ozawa M., Matsuda T., Kinashi T., Enhanced cytotoxic T cell function and inhibition of tumor progression

- by Mst1 deficiency. *FEBS Letter*. 590(1):68-75. (2016) doi: 10.1002/1873-3468.12045. 査読有
3. Fukuhara T, Tomiyama T, Yasuda K, Ueda Y., Ozaki Y, Son Y, Nomura S, Uchida K, Okazaki K, Kinashi T. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 7;463(4):968-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.043. Epub 2015 Jun 6. 査読有
 4. Ishibashi M, Miyanaga Y, Matsuoka S, Kozuka J, Togashi Y, Kinashi T., Ueda M. Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 21;464(2):459-66. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.155. Epub 2015 Jul 2. 査読有
 5. Katakai T., Kondo N., Ueda Y., and Kinashi T., Autotaxin Produced by Stromal Cells Promotes LFA-1-Independent and Rho-Dependent Interstitial T Cell Motility. 2014; *J Immunol* 2014; 193:617-626; Prepublished online 16 June, (doi: 10.4049/jimmunol.1400565) 査読有
 6. Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Etoh K, Fukuda M, Kinashi T., Katagiri K. Rab13 acts downstream of the kinase Mst1 to deliver the integrin LFA-1 to the cell surface for lymphocyte trafficking. *Sci. Signal*. 7:ra72 (2014) DOI: 10.1126/scisignal.2005199 査読有
 7. Nakamura T, Yasuda S, Nagai H, Koinuma S, Morishita S, Goto A, Kinashi T., Wada N. Longest neurite-specific activation of Rap1B in hippocampal neurons contributes to polarity formation through RalA and Nore1A in addition to PI3-kinase. *Genes Cells*. 2013 Nov;18(11):1020-31. doi: 10.1111/gtc.12097. Epub 2013 Oct 6. 査読有
 8. Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, Ohshima K, Nakagawa M, Katagiri K, Kinashi T., Matsuoka M., HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. Epub 2013 Sep 19. *PLoS Pathog*. 2013 Sep;9(9):e1003630. doi: 10.1371/journal.ppat.1003630. 査読有
 9. Tomiyama T, Ueda Y., Katakai T, Kondo N, Okazaki K, Kinashi T., Antigen-specific suppression and immunological synapse formation by regulatory T cells require the mst1 kinase. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73874. doi: 10.1371/journal.pone.0073874. 査読有
 10. Katakai T, Habiro K, Kinashi T., Dendritic Cells Regulate High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node via LFA-1/ICAM-1. *J Immunol* 191(3):1188-99. 2013 doi: 10.4049/jimmunol.1300739 査読有
 11. Chung C., Kim T., Kim M., Kim M., Song H., Kim TS., Seo E., Lee S.H., Kim H., Kim SK., Yoo G., Lee DH., Hwang DS., Kinashi T., Kim JM., Lim DS., Hippo-Foxa2 signaling pathway plays a role in peripheral lung maturation and surfactant homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:19:7732-37. 2013 doi: 10.1073/pnas.1220603110 査読有
- 〔学会発表〕(計 11件)
1. Kinashi T. Roles of Rap1 signaling in immune synapse formation and self-tolerance. The 6th Xiamen Winter Symposium, Xiamen China 2015 Dec.5-7,
 2. 木梨達雄, Imaging of thymocyte trafficking and antigen recognition: roles of Rap1 signaling in self tolerance 第3回御茶ノ水動脈硬化学会 2015年2月28日 庭のホテル、東京
 3. Kinashi T., Ueda Y., Kondo N., Visualization of thymocyte trafficking and selection processes: the importance of Rap1 signaling and integrins, International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities, Jan 26th - 28th 2015, Kyoto International Conference Center, Kyoto.
 4. Ueda Y., Kondo N., Ozawa M. and Kinashi T., Visualization of Rap1 activation during thymocyte development within the thymic tissues by 2-photon microscopy, International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities, Jan 26th - 28th 2015, Kyoto International Conference Center, Kyoto.
 5. Ueda Y., Kondo N., Ozawa M., Katakai T. and Kinashi T., SEMA3E/Plexin D1 axis controls thymocyte adhesion and polarization by modulating the Rap1 signaling pathway 第43回免疫学会 学術集会 2014年12月10日~12日 国立京都国際会館、京都
 6. 木梨達雄, Rap1シグナルによる胸腺細胞の動態制御機構「酵素学研究拠点シンポジウム」 2014年2月7日 徳島大学藤井節郎記念医学センター、徳島
 7. Kinashi T., Kondo N., Single-Molecule

Analysis of LFA-1/ICAM-1 Binding in Lymphocyte. Biophysical Society 58th Annual Meeting. 15th - 19th Feb, 2014. The Moscone Center, San Francisco USA.

8. Katakai T., Kinashi T., Environmental control of high-speed T cell migration in the lymph node 日本免疫学会総会第42回学術集会 12月11~13 2013 幕張メッセ、千葉、幕張
9. Kondo N., Ueda Y., Katakai T., Kinashi T., Live-imaging analysis of LFA-1/ICAM-1 and roles of Mst1 in immunological synapse formation using primary T lymphocytes 日本免疫学会総会第42回学術集会 12月11~13 2013 幕張メッセ、千葉、幕張
10. Ozawa M., Katakai T., Ueda Y., Lee S.I., Kinashi T., Crucial roles of Mst1 for antigen recognition during T cell-APC interactions. 日本免疫学会総会第42回学術集会 12月11~13 2013 幕張メッセ、千葉、幕張
11. Kinashi T., Katakai T., Ueda Y., Kondo N., Regulation of Lymphocyte "Stop and Go" via LFA-1 and ICAM-1: Lymphocyte Trafficking Analysis using Live Imaging Techniques 第51回日本生物物理学会シンポジウム 2013年10月29日-30日 国立京都国際会館、京都

〔図書〕(計 5件)

1. 石井 優 編 生体イメージング研究 Update 光が描く 免疫・がん・神経系の時空間動態 PP.50-62 2014 年 南山出版
2. 片貝智哉, 木梨達雄 リンパ球の高速移動を制御するリンパ節組織支持細胞ネットワーク 細胞工学 33:6(602-608) 2014
3. 木梨達雄 免疫細胞と Hippo Pathway 医学のあゆみ Vol.251, No.5 455-461 2014
4. 植田祥啓, 木梨達雄 Mst1による胸腺細胞のインテグリン接着制御と選択機構 医学のあゆみ Vol.247, No6, 565-566 2013
5. 片貝智哉, 木梨達雄 免疫細胞の動態制御とストローマ細胞リンパ節における高速 T 細胞遊走と組織環境 リンパ学 Vol.36, No.2, 107-111 2013

〔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

木梨 達雄 (KINASHI, Tatsuo)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：30202039

(2) 連携研究者

植田 祥啓 (UEDA, Yoshihiro)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：90533208

(3) 連携研究者

近藤 直幸 (KONDO, Naoyuki)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：30570840