

北里大学大学院理学研究科

2020 年度博士論文

Rap1 によるインテグリン $\alpha_4\beta_7$ の活性制御

佐藤 健 (DS-18903)

指導教授 免疫学 片桐 晃子

目 次

1	論文要旨	1
2	導入	2
3	結果	4
4	考察	7
5	実験手法	9
6	図	14
7	参考文献	28
8	謝辞	32

1 論文要旨

T細胞特異的 Rap1 欠損マウス（大腸炎マウス）では病原性の CD4⁺エフェクター/メモリーT (T_{EM})細胞が生成され、大腸粘膜固有層 (LP) に過剰に浸潤することによって、大腸炎を自然発症する。リンパ球は、インテグリン $\alpha_4\beta_7$ を介して、腸管組織の後毛細血管細静脈に特異的に発現する MAdCAM-1との結合によって血管壁へ接着し、腸管粘膜固有層へ移動する。Rap1 欠損によって、病原性 T_{EM}細胞の LP へのホーミングが亢進していることが先行研究で明らかとなっている。また、大腸炎マウスに $\alpha_4\beta_7$ -MAdCAM-1の結合を阻害する抗 MAdCAM-1抗体を投与すると、LPの CD4⁺T細胞数が減少し、大腸炎の症状が抑制されることを確認した。そこで、Rap1 欠損が、T_{EM}細胞上の $\alpha_4\beta_7$ の接着活性を上昇させることで、LPへのホーミングを促進している可能性を検討するとともに、それを新たな治療法の開発に結びつけることが目的である。

インテグリンのリガンド親和性は立体構造と関連があり、インテグリンが折りたたまれた構造 (Bent form) から起き上がった構造 (Extended form) に変化することでリガンドへの親和性が高い状態になる。しかしながら、 $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を評価するシステムが存在しないため、まず、PA タグと抗 PA タグ抗体 (NZ-1) を用いて、 $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を検出するシステムを確立した。 β_7 鎖の複数の場所に PA タグを挿入したところ、PSI ドメインに PA タグを挿入した変異体 (PAins2) では、インテグリンの高親和性状態を誘導する Mn²⁺存在下において、NZ-1の結合が促進されることがわかった。このシステムを用いて、Rap1 欠損による $\alpha_4\beta_7$ への影響を検討したところ、ケモカイン刺激や活性型 Rap1 (Rap1V12) の導入と同様に、NZ-1の結合が増大し、 $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造が誘導されることが明らかとなった。実際に、Rap1 欠損細胞において、可溶性 MAdCAM-1との結合活性の増加も確認され、 $\alpha_4\beta_7$ と MAdCAM-1の親和性が上昇していることが確かめられた。次に、 β_7 の Mn²⁺依存性に露出するエピトープを認識する活性型特異的モノクローナル抗体 (mAb) を産生する2種類のハイブリドーマを作製した。エピトープマッピングにより、G3 mAb は β_7 の PSI ドメインを認識し、H3 mAb は Hybrid ドメインを認識することがわかった。両方のエピトープは、Rap1V12の導入により露出された。しかし、Rap1 欠損によって、PSI ドメイン内の G3 エピトープは露出が促進されたが、Hybrid ドメイン内の H3 エピトープの露出には Rap1-GTP が必須であることがわかった。すなわち、Rap1-GDP は $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を抑制し、低親和性の構造を維持しており、Rap1-GTP への変換によって、抑制が解除されるとともに、高親和性の構造が誘導されることが示唆された。実際、G3 および H3 mAb を用いて、病原性 Rap1 欠損 T_{EM}細胞における $\alpha_4\beta_7$ の立体構造について調べたところ、Rap1 欠損 T_{EM}細胞では、野生型 T_{EM}細胞に比べ、G3 mAb に対する結合が増強されたが、H3 mAb に対する結合活性は顕著に低下していた。

以上の結果より、Rap1-GDP は $\alpha_4\beta_7$ を低親和性構造に維持することが明らかとなり、Rap1 欠損によって病原性 T_{EM}細胞上の $\alpha_4\beta_7$ の低親和性構造が解除され、活性型構造が促進されることでホーミングが亢進し、大腸炎を引き起こすことが示唆された。また、このシステムを用いて $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を阻害する低分子化合物をスクリーニングすることが可能となり、特許を出願した。今後は、このシステムを用いて、大腸炎の治療薬の探索を進める予定である。

2 導入

リンパ球のインテグリンを介した接着や遊走は、リンパ組織の恒常性の維持において重要である。インテグリンは、細胞膜上で双方向にシグナルを伝達する α/β のサブユニットからなるヘテロ二量体の細胞接着分子である¹⁻³。多段階のリンパ球の接着カスケードでは、一般的にセレクトインがローリングを媒介し、引き続いてインテグリンが停止（アレスト）を媒介する。対照的に、腸管へのホーミングでは、 $\alpha_4\beta_7$ がローリングとアレストの両方を媒介する⁴。 $\alpha_4\beta_7$ のリガンドである MAdCAM-1 は恒常的に腸管粘膜固有層の後毛細血管細静脈に発現し、リンパ球は $\alpha_4\beta_7$ と MAdCAM-1 の相互作用によって腸管へのホーミングが可能となる⁵。それゆえ、 $\alpha_4\beta_7$ の接着活性はリンパ球の腸管粘膜組織への移動する能力を直接的に反映する。

Rap1-GTP と -GDP の両方による T 細胞の動態制御は、リンパ球の接着カスケードの重要な制御メカニズムである⁶。Rap1-GTP はインテグリン α 鎖に結合する RAPL やインテグリン β 鎖に結合する RIAM (Rap1-interacting molecule) や talin などの下流のエフェクター分子を動員する⁷⁻⁹。Rap1-GDP は LOK の活性化や ERM のリン酸化を介してローリングを抑制する¹⁰。

腸間膜リンパ節の T 細胞数は粘膜免疫寛容において重要である。Rap1-GTP によるインテグリンの活性化はナイーブ T (T_N) 細胞の循環に大切な役割を果たすが、一方休止状態の T_N および T_{EM} 細胞の Rap1-GDP は血管内皮上のローリングを制限し、リンパ球のホーミングを遅らせる¹⁰。したがって、Rap1 の欠損は、リンパ球減少症とリンパ節での病原性 T_{EM} 細胞の生成に繋がる。さらに T_{EM} 細胞の結腸へのホーミングを促進し、T 細胞依存性大腸炎を自然発症させ、管状腺腫を悪化させる¹⁰。このことから Rap1 欠損による T_{EM} 細胞の過剰な浸潤は、 $\alpha_4\beta_7$ の活性化の制御における Rap1-GDP の関与が考えられる。

$\alpha_4\beta_7$ の MAdCAM-1 への高親和性の結合は、リンパ球のアレストに重要なステップである。インテグリンのリガンドとの結合親和性の調節は、インテグリン分子の立体構造に関連がある¹¹。以前の研究では、インテグリンの細胞外ドメインは、リガンドに対する親和性が異なるグローバルなコンフォメーション状態で存在することが示されていた。つまり、閉じたヘッドピースと共に低親和性の曲がった構造 (Bent form) と、開いたヘッドピースと共に高親和性の起き上がった構造 (Extended form) がある¹²⁻¹⁴。これらの異なる状態間の平衡は、インテグリンの inside-out シグナルや二価カチオンなどの細胞外刺激によって調節されている。Ca²⁺/Mg²⁺の低親和性状態と比較して、Ca²⁺の除去または Mn²⁺の添加は、ほとんどすべてのインテグリンでリガンド結活性の著しい増強が見られる¹⁵。しかしながら、活性化された $\alpha_4\beta_7$ のみを認識する従来の活性化特異的抗体はほとんどない^{16,17}。

この研究では、Rap1 の欠損が $\alpha_4\beta_7$ の立体構造に及ぼす影響を調べるために、PA タグを β_7 鎖の PSI ドメインに挿入することによって、 $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を検出するエピトープグラフトシステムを開発した。PA タグは、NZ-1 によって認識されるヒトポドプラニンに由来する 12 残基のペプチド (GVAMPGARDDVV) である¹⁸。また、PA タグのグラフト部位と同様に、エピトープが PSI ドメインに位置するラットモノクローナル抗体 (G3 mAb) を作製した。NZ-1 または G3 mAb を使用して、ケモカイン刺激と同様に Rap1 の欠損が $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を誘導することを明らかにし、Rap1-GDP が $\alpha_4\beta_7$ の構造を不活性型に制限することを示唆した。エピトープが β_7 鎖の Hybrid ドメインに位置するもう一つのラットモノクローナル抗体 (H3 mAb) は、Rap1V12 発現細胞の $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を認識し

たが、Rap1 欠損細胞では認識しなかった。これらのデータは、Rap1-GTP が $\alpha_4\beta_7$ の構造変化をさらに促進し、高親和性 $\alpha_4\beta_7$ を導くことを示唆した。これらのデータと一致して、 $\alpha_4\beta_7$ -MAdCAM-1 依存的に結腸 LP にホーミングし、大腸炎を誘発する Rap1 欠損 CD4⁺T_{EM}細胞（病原性 T 細胞）は、H3 mAb ではなく G3 mAb によって認識されるエピトープの発現増加を示した。したがって、 $\alpha_4\beta_7$ に対する Rap1-GDP による抑制効果は、結腸 LP への病原性 T 細胞の過剰な浸潤を抑制し、大腸炎の発症を防ぐことに寄与する可能性が考えられた。

3 結果

PA タグ挿入による $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を測定するシステムの開発

これまでの報告と一致して、 $\alpha_4\beta_7$ は $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下において MAdCAM-1 に対して低親和性状態を示し、 Mn^{2+} の添加は MAdCAM-1 への $\alpha_4\beta_7$ の結合親和性を増加させた (図 1a)。 $\alpha_4\beta_7$ の立体構造を調べるために、CRISPR/Cas9 システムによってマウスプロ B 細胞株 (BAF 細胞) の β_7 をノックアウトし、挿入箇所異なる 4 種類の PA タグ挿入 β_7 (PAins1-4) をそれぞれ発現させた (図 1b、c)。これらの PAins 発現細胞を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ または Mn^{2+} の存在下で NZ-1 または FIB504 (マウス/ヒト β_7 に対する従来のモノクローナル抗体) で染色し、フローサイトメトリーで解析した。それぞれの細胞は細胞表面にほぼ等しく PAins が発現していた (図 1c)。PAins2 発現細胞 (PAins2 細胞) の PA の発現は、 $\alpha_4\beta_7$ が低親和性の Bent form をとる $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下に比べ、高親和性の Extended form をとる Mn^{2+} 存在下では 8 倍の増加を示した (図 1d)。他の PAins 発現細胞の PA は、Bent form の β_7 でも Extended form と同程度に NZ-1 によって認識されるように露出されていた (図 1d)。これらのデータは、 β_7 の PSI ドメインの PAins2 の位置が、適切な PA タグ挿入位置であることを示した。

Extended form に優先的に結合する抗体の外因性の添加は、平衡をインテグリンの高親和性状態にシフトさせる可能性があるため、それらはしばしば細胞外からインテグリンを活性化する。したがって、NZ-1 の Fv-clasp を用いて、 Mn^{2+} 存在下での $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を確認した。人工的に設計された 37kDa の小さな抗体フラグメントである NZ-1 の Fv-clasp は、高親和性状態と低親和性状態の間の平衡に影響を与えなかったため、構造変化のレポーターとして使用した¹⁹。NZ-1 の Fv-clasp を使用すると、PA タグの表面発現は $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ の存在下と比較して Mn^{2+} の存在下で 12 倍の増加を示したことから (図 2)、PA の表面発現は $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を正確に反映していることが示された。

Rap1 欠損は $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を誘発する

インテグリンの Bent (低親和性) と Extended の状態 (高親和性) の平衡は、Rap1 などの inside-out シグナルによって調節される。そこで PAins2 細胞を用いて、Rap1 が $\alpha_4\beta_7$ の立体構造に与える影響を調べた。そのために、GTP 結合型 Rap1 (Rap1V12) および Rap1-GTP アーゼ活性化タンパク質 (Spa-1) 発現 PAins2 細胞、および PAins2 細胞の Rap1 ノックダウン細胞を作製した (図 3a)。Spa-1 発現 PAins2 細胞において CXCL12 誘導性の Rap1 の活性化が阻害されていることを確認した (図 3b)。

次に、CXCL12 の存在下または非存在下における各トランスフェクタントの $\alpha_4\beta_7$ の可溶性 MAdCAM-1 への結合活性を調べた。図 3c に示すように、CXCL12 刺激はコントロール細胞上の $\alpha_4\beta_7$ の MAdCAM-1 への結合を上昇させたことから、ケモカイン刺激が $\alpha_4\beta_7$ の平衡を高親和性状態にシフトさせることが示された。想定通り、Rap1V12 の過剰発現は CXCL12 刺激なしで $\alpha_4\beta_7$ の MAdCAM-1 への結合を増加させた (図 3c)。Spa-1 の過剰発現による Rap1 活性化の阻害は、 $\alpha_4\beta_7$ の MAdCAM-1 への結合における CXCL12 依存性の増加を抑制した (図 3c)。Rap1 のノックダウンにおいても結合活性を有意に増加させたが、その効果は Rap1V12 発現細胞の効果と比較して弱かった (図 3c)。これらのデータは、Rap1-GDP が $\alpha_4\beta_7$ を低親和性状態にロックし、さらに Rap1-GTP が $\alpha_4\beta_7$ の平衡を高親和性状態へ促進することを示唆している。

続いて、各トランスフェクタントにおける PA の表面発現を調べた。CXCL12 刺激は PA の表面発現の 1.3 倍の増加を示し、Spa-1 の過剰発現は CXCL12 刺激によって誘導される PA の表面発現を完全に阻害し (図 3d)、Rap1-GDP から GTP への変換が PA の表面発現に必要であることを示した。Rap1V12 の過剰発現は、PA の表面発現を有意に促進した (図 3d)。PA の表面発現は Rap1V12 発現細胞と比較して Rap1 欠損細胞でより高かったことより (図 3d)、Rap1-GDP の喪失は $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を誘発し、この構造変化は Rap1V12 誘導性の構造変化と異なることが示された。これらの結果は、Rap1-GDP が $\alpha_4\beta_7$ の活性型への構造変化を抑制することを示唆している。

さらに、talin は Rap1-GTP とインテグリンに結合し、インテグリンの活性化を引き起こすことが報告されているため、talin のノックダウンによる $\alpha_4\beta_7$ の構造への効果を調べた²⁰。talin ノックダウン細胞における talin タンパク質の存在量は、コントロール細胞の 5% に減少した (補足図 1a)。補足図 1b に示すように、talin のサイレンシングは無刺激時に PA の表面発現を減少させたが、CXCL12 はコントロール細胞と同じ割合で talin ノックダウン細胞における PA の表面発現を増加させた。この結果は、talin が、ケモカインを介したシグナル伝達の下流エフェクター分子ではなく、 $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造に必要な基本的な細胞骨格成分であることを示唆している。

$\alpha_4\beta_7$ の Rap1 依存性の構造変化を検出するためのラットモノクローナル抗体の同定と特性評価

Mn^{2+} 依存性的に $\alpha_4\beta_7$ に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを確立するために、 β_7 の N 末端のアミノ酸 (1~458) とマルトース結合タンパク質 (MBP) の融合タンパク質をラットに注射した。ラットリンパ節細胞とミエローマ細胞を融合し、得られたハイブリドーマをフローサイトメトリーでスクリーニングして、 $\alpha_4\beta_7$ の Mn^{2+} 依存性の構造に結合するモノクローナル抗体 G3 (G3 mAb) を産生するハイブリドーマを確立した。図 4a に示すように、G3 エピトープは、 Ca^{2+}/Mg^{2+} の存在下における Bent form の低親和性 $\alpha_4\beta_7$ ではほとんど検出されなかったが、 Mn^{2+} の存在下における Extended form の高親和性 $\alpha_4\beta_7$ では 4.8 倍に増加した。

次に、ヒト β_7 を導入した Jurkat 細胞を使用して、G3 mAb とヒト $\alpha_4\beta_7$ との交差反応性をテストした。 β_7 の表面発現レベルは、FIB504 を用いて測定した (図 4a)。Jurkat 細胞における G3 エピトープの発現は、 Ca^{2+}/Mg^{2+} の存在下では非常に低く、 Mn^{2+} の存在下では 6 倍に増加した (図 4a)。G3 のエピトープを同定するために、マウス β_1/β_7 キメラと β_7 の欠損変異体 (Δ 1-19) を構築した。これらの変異体は β_7 ノックアウト BAF 細胞で内因性 α_4 と共発現し、FIB504 によって表面発現レベルを確認された (図 4b)。図 4b に示すように、 β_1 には存在しない β_7 の N 末端 1~19 アミノ酸を欠損させると、G3 mAb はマウス β_7 に対する反応性を失った (図 4b)。したがって、これらのトランスフェクタントのフローサイトメトリー分析は、 β_7 の PSI ドメインにある 1-19 アミノ酸セグメントが G3 mAb の結合に必要であり、 β_7 への PA グラフト部位に近いことを示した (図 1c)。予想通り、G3 エピトープの発現は CXCL12 刺激で 1.2 倍に増加した (図 4c)。Rap1V12 の過剰発現は、G3 エピトープの発現を 1.9 倍に増強した (図 4c)。Rap1 の欠損もまた、G3 エピトープの発現を 2.8 倍に増加させた (図 4c)。PA タグ-NZ-1 システムを使用した結果と一致して、これらのデータは、Rap1-GDP が $\alpha_4\beta_7$ の構造を不活性状態にロックすることを示している。

また、 $\alpha_4\beta_7$ の Mn^{2+} 依存性の構造を検出するために、もう一つのラットモノクローナル抗体 (H3 mAb) を産生するハイブリドーマを確立した。図 5a に示すように、H3 エピトープは、 Ca^{2+}/Mg^{2+} の存在下における Bent form の低親和性 $\alpha_4\beta_7$ ではほとんど検出されなかったが、 Mn^{2+} の存在下における Extended form の高親和性 $\alpha_4\beta_7$ では 33 倍に増加した。続いて、ヒト β_7 をトランスフェクトした Jurkat 細胞を使

用して、H3 mAb とヒト $\alpha_4\beta_7$ との交差反応性を調べた。Jurkat 細胞上の H3 エピトープは、 Mn^{2+} の存在下では発現されなかった (図 5a)。これは、H3 mAb はヒト β_7 の活性型構造を認識しなかったことを示している。H3 のエピトープを同定するために、マウス/ヒト β_7 キメラを構築した。これらのキメラは、 β_7 ノックアウト BAF 細胞で内因性 α_4 と共発現し、FIB504 を用いて表面発現レベルを確認された (図 5b)。これらのトランスフェクタントのフローサイトメトリー分析は、 β_7 の Hybrid ドメインに位置する 373-393 アミノ酸の β_7 セグメントが H3 mAb の結合に必要であった (図 5b)。予想通り、H3 エピトープの発現も CXCL12 刺激で 1.4 倍に増加した (図 5c)。Rap1V12 の過剰発現は、H3 エピトープの発現を 3.7 倍に増強した (図 5c)。しかし、Rap1 欠損は、CXCL12 刺激の有無にかかわらず H3 エピトープの発現を増加させなかった (図 5c)。これらのデータは、H3 エピトープの発現には Rap1-GTP が必要であることを示している。

以前の論文では、T 細胞特異的 Rap1 欠損マウスが $CD4^+T_{EM}$ 細胞の結腸 LP への浸潤を伴う重度の大腸炎を発症し、これらの細胞の正常マウスへの移植が大腸炎を誘発することを示した¹⁰。また以前の研究で、 $\alpha_4\beta_7$ -MAdCAM-1 依存性のローリングが Rap1 欠損 $CD4^+T_{EM}$ 細胞で有意に促進されることも示された¹⁰。本研究では、MAdCAM-1 阻害抗体を T 細胞特異的 Rap1 欠損マウスに注射することで、大腸炎の発症が予防された (図 6a)。これらのことから、 $\alpha_4\beta_7$ -MAdCAM-1 相互作用が T 細胞特異的 Rap1 ノックアウトマウスの大腸炎の発症に重要であることが確認された。したがって、 $\alpha_4\beta_7$ の構造変化が病原性 T 細胞で観察されるか調査した。CCR9 とそのリガンド CCL25 は、 T_{EM} 細胞の腸内ホーミングに重要な役割を果たすことがわかっているため²¹、 $CD4^+T_{EM}$ 細胞の刺激には CCL25 を使用した。図 6b に示すように、病原性 T 細胞では $\alpha_4\beta_7$ の表面発現が上昇したが、G3 エピトープは野生型 T_{EM} 細胞と比較して病原性 T 細胞で有意に増加した。CCL25 は、コントロール細胞では G3 エピトープの発現を増加させたが、病原性 T 細胞では増加させなかった (図 6b)。予想通り、H3 mAb によって認識されるエピトープの発現は減少し、病原性 T 細胞では CCL25 刺激によって誘導されなかったが、 Mn^{2+} の添加により、これらの細胞では野生型 T_{EM} 細胞と同様のレベルで H3 エピトープが誘導された (図 6c)。これらのデータは、Rap1 欠損によって誘導される $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造が、MAdCAM-1 発現内皮細胞でのローリングおよびアレストを介した病原性 T 細胞の結腸 LP への浸潤に十分であることを示唆している。

さらに、以前の研究では、CCL25 と CXCL10 が $\alpha_4\beta_7$ の異なる活性型構造を誘導することが報告されているが²²、 $CD4^+T_{EM}$ 細胞での G3 および H3 エピトープの発現における CCL25 と CXCL10 の効果に違いはなかった (補足図 2)。

4 考察

この研究では、 β_7 鎖の PSI ドメインへの PA タグの挿入によって、 $\alpha_4\beta_7$ の構造状態を調べる高感度のシステムを開発した。このシステムを用いて、 $\alpha_4\beta_7$ の構造が Rap1 によって調節されていることを発見した。初代リンパ球における β_7 の構造変化を調べるために、活性型 $\alpha_4\beta_7$ に対する2つのラットモノクローナル (G3 および H3) を単離した。G3 mAb は β_7 の PSI ドメインのエピトープを認識し、H3 mAb は β_7 の Hybrid ドメインのエピトープを認識した (図 7a)。両方のエピトープは、Bent form の低親和性 $\alpha_4\beta_7$ では隠され、 Mn^{2+} の添加によって誘導された Extended form の高親和性 $\alpha_4\beta_7$ では露出した。Rap1V12 の導入により、G3 および H3 エピトープの露出が誘導された。しかし、G3 エピトープの発現は Rap1-GDP の欠損によって増加したが、Rap1-GTP への変換は H3 エピトープの露出に不可欠であった。したがって、Rap1-GDP と GTP は独立して $\alpha_4\beta_7$ の構造を調節していると考えられる (図 7)。 β_7 の PSI ドメインへの NZ-1 または G3 mAb の結合は、Rap1-GDP によって抑制され、Rap1-GDP の欠損は、これらのエピトープの最大の発現であった (図 7)。一方、 β_7 の Hybrid ドメインにおける H3 エピトープは、Rap-GDP の欠損だけでは露出しなかった。Rap1-GDP の欠損は $\alpha_4\beta_7$ の可溶性 MAdCAM-1 への結合にあまり影響を与えなかった。Rap1V12 の過剰発現と Mn^{2+} の添加により、 $\alpha_4\beta_7$ の可溶性 MAdCAM-1 への結合が増加し、H3 エピトープの露出が誘導された (図 3c、5c)。したがって、H3 エピトープの表面発現は、可溶性 MAdCAM-1 への $\alpha_4\beta_7$ の結合活性と強く相関していた。これらの発見は、H3 mAb が β_7 鎖の高親和性の構造を安定化すると予測されている Hybrid ドメインの swing-out を検出していることを示している²³ (図 7)。これらのデータは、Rap1-GDP が $\alpha_4\beta_7$ の Bent form を保持することで MAdCAM-1 への結合を低親和性に維持し、Rap1-GTP への変換が $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造をさらに促進し、 $\alpha_4\beta_7$ の MAdCAM-1 への高親和性の結合をもたらすことを示唆している。以前に報告されたように^{24,25}、構造特異的抗体はインテグリンの構造の機能と制御機構の解明に有用である。G3 と H3 mAb の組み合わせは、Extended closed と Extended open を区別できる可能性があり、 $\alpha_4\beta_7$ の構造制御の様々な研究に貢献することが期待される。

PA タグの挿入部位はアミノ酸配列の N 末端の 29 番目と 30 番目の間であり、G3 エピトープは N 末端の最初の 19 アミノ酸であった。以前の研究は^{26,27}、AP5 は Extended form でのみ β_3 インテグリンを認識する抗体であることを報告している。これらの発見は、活性型構造を認識する抗体を得るために N 末端エピトープは多くの β インテグリンで利用できることを示唆している²⁸。 β 鎖の N 末端アミノ酸を含む多くの種類の抗体が存在するため、これらの抗体がインテグリンの活性型構造を特異的に認識するかどうかを明らかにする必要がある。

以前の研究では、Rap1-GDP が LOK を活性化し、ERM リン酸化を促進することを示し、活性型の LOK または擬似リン酸化 Ezrin の導入は、 $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を妨げなかったことを示した。RIAM と talin は Rap1-GTP とは関連してインテグリンの活性型構造を誘導することが知られているが、Rap1-GDP とは関連していない^{8,9,29}。この研究では、talin が $\alpha_4\beta_7$ の活性化に参与する基本的な細胞骨格成分であることを示唆している。Rap1-GDP/GTP の下流エフェクター分子と、 $\alpha_4\beta_7$ の構造制御における RIAM や talin などの細胞骨格タンパク質の役割を解明する研究が必要である。

以前の論文では、CCL25 と CXCL10 がそれぞれ MAdCAM-1 または VCAM-1 の結合に有利な $\alpha_4\beta_7$ の異なる構造を誘導することを示している。その論文によると、CCL25 と CXCL10 は異なるシグナル伝達

経路を活性化し、 β_7 の異なるリン酸化状態と異なる talin と kindlin-3 の結合パターンをもたらす²²。一方、CCL25 と CXCL10 で刺激された T 細胞間で G3 および H3 エピトープの表面発現に差はなかった（補足図 2）。したがって、G3 および H3 mAb は、 $\alpha_4\beta_7$ の MAdCAM-1 または VCAM-1 結合構造を区別していなさそうであった。この研究では、G3 mAb によって認識される $\alpha_4\beta_7$ の構造が T_{EM} 細胞の腸へのホーミングに重要であることが示唆されたが、H3 mAb によって認識される Rap1-GTP 依存性の活性型構造の生理学的重要性はまだ解決されていない。構造制御の生物学的意味を明らかにすることは重要である。

Rap1 は、ケモカイン依存性のインテグリン活性化とナイーブリンパ球の再循環に不可欠であり、その欠乏は二次リンパ節のリンパ球減少症につながる^{10,30}。一方、Rap1 欠損 T_{EM} 細胞は、血管内皮での $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1 依存性のローリングとアレストの増強、および結腸 LP へのホーミングの亢進を示す¹⁰。この研究では、T_{EM} 細胞の Rap1 欠損が $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を引き起こし、 $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1 依存性の血管内皮上でのトランスマイグレーションと結腸 LP へのホーミングを促進することを発見した。さらに、H3 mAb によって認識された $\alpha_4\beta_7$ の Rap1-GTP 依存性の高親和性構造は、病原性 T 細胞の結腸 LP へのホーミングには不要であった。

G3 mAb は、マウスおよびヒトの活性型 $\alpha_4\beta_7$ を認識し、G3 エピトープの発現は、結腸 LP への病原性 T_{EM} 細胞の浸潤と相関していた。したがって、このモノクローナル抗体は、病原性 T_{EM} 細胞に薬物を送達するための有用なツールとなる可能性がある。また、 $\alpha_4\beta_7$ の構造変化の抑制は T_{EM} 細胞の結腸 LP への浸潤を防ぐ効果があると思われるため、本発明のシステムを用いて大腸炎治療薬のスクリーニングを行うことができる。 $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を認識することにより、このシステムは、 $\alpha_4\beta_7$ の活性化メカニズムの研究および大腸炎とその後の大腸癌の新しい治療法の開発のための有用なツールとして役立つ。

5 実験手法

T細胞特異的 Rap1 ノックアウトマウス

Rap1a のエクソン 2-3、および Rap1b のエクソン 1 をそれぞれ loxP 配列で挟んだ Rap1a/b conditional ターゲティングマウスと、CD4-Cre マウスを交配させることによって、T細胞特異的に Rap1 を欠損したマウスを作製した¹⁰。

細胞培養

Ba/F3(BAF)細胞は 10% ウシ胎児血清、50 mM β-メルカプトエタノール、1% WEHI-3 培養液を含む RPMI1640 培地を用いて培養した³¹。また、Jurkat 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地を用いて培養した。

抗体と試薬

蛍光標識された抗マウス CD4、CD44、抗β₇ (FIB504) (BioLegend)、抗 Rap1(BD Biosciences)、β-actin (Sigma)、T7 (MBL)、Flag (Wako)、talin (Abcam)、APC 標識された抗ラットまたはヒト IgG、HRP 標識された抗ウサギまたはマウス IgG (Cell Signaling)は、フローサイトメトリーまたは免疫ブロッティングに使用した。抗 MAdCAM-1 (MECA367)、G3、H3 を産生するハイブリドーマはハイブリドーマ用無血清培地 (wako) で培養し、培養液を HiTrap Protein G HP (GE healthcare)を使用して抗体を精製した。マウス CXCL12、CCL25、CXCL10 は R&D Systems から購入した。NZ-1 の一本鎖 Fv (Fv-clasp) はヒト Mst1 に由来する SARAH ドメインと NZ-1 の V_Hおよび V_Lのフラグメントに融合することで作製した。NZ-1 の V_H-SARAH と V_L-SARAH は、大腸菌株 BL21 にそれぞれ発現させ、LB 培地で培養した。超音波処理による細胞溶解後、変性および可溶化された V_H-SARAH 鎖と V_L-SARAH 鎖を混合し、変性試薬を希釈してタンパク質の折り畳みを促進し、正しく折りたたまれた Fv-clasp を以前に報告されたように精製した¹⁹。Fv-clasp は AlexaFluor 647 (Thermo Fisher Scientific) で蛍光標識した。

MAdCAM-1 結合アッセイ

BAF 細胞と MAdCAM-1-Fc タンパク質を用いて、α₄β₇ と MAdCAM-1 の親和性を評価した¹⁰。50μl の結合バッファー (0.1% BSA, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ または 0.1% BSA, 0.5 mM MnCl₂ を含む HBSS) に 2×10⁵細胞を懸濁し、MAdCAM-1-Fc(30 μg/ml)と 37°C で 20 分間インキュベートした³⁴。続けて、最終濃度 0.5μM となるように CXCL12 を加え、さらに 10 分間インキュベートした。2 回洗浄後、anti-human IgG Fc-APC(1 μg/ml)と氷上で 20 分間反応させた。平均蛍光強度は、Gallios flow cytometry を用いて測定した。

β₇ノックアウトおよび PAins β₇発現 BAF 細胞の作製

マウスβ₇をターゲットとした gRNA の配列は、ウェブツール CRISPOR を用いて設計した。pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 ベクターに 6 種類の gRNA を挿入し、それぞれのエクソンを挿入した pCAG-EGFP ベクターと HEK293T 細胞に遺伝子導入して EGFP の蛍光強度を測定することで、Cas9 の DNA 切断効率を評価した³⁷。最も良好な切断効率を示した gRNA 配列を pSpCas9(BB)-2A-GFP

(PX458)に挿入し、BAF 細胞に遺伝子導入し、GFP の蛍光が高い細胞をソーティング後、限界希釈法により β_7 ノックアウト BAF 細胞を得た³⁸。

PAins 変異体は、インバース PCR 法を用いて、pcDNA3.1-マウス β_7 コンストラクトに PA タグを挿入した。PAins 変異体を CSII-EF-MCS レンチウイルスベクターにサブクローニングし、レンチウイルスを用いて細胞に遺伝子導入した。インバース PCR には以下のオリゴヌクレオチドおよびそれらの対応する相補鎖を使用した。

PAins 1: 5' -CCTGACCTGTCTCTGCAGGGCGTTGCCATGCCAGGTGCCGAAGATGATGTGGTGGGATCCTGCCAGCCAGTT- 3'

PAins 2: 5' -GGATCCTGCCAGCCAGTTGGCGTTGCCATGCCAGGTGCCGAAGATGATGTGGTGCCTTCTGCCAGAAGTGT- 3'

PAins 3: 5' -TGGGTCACCTCTCAAGCTACTGGCGTTGCCATGCCAGGTGCCGAAGATGATGTGGTGCCTGCCAGCCAGCCAGCCAC- 3'

PAins 4: 5' -CAAGCTACTCACTGCCTCCAGGGCGTTGCCATGCCAGGTGCCGAAGATGATGTGGTGGGAAGCCACGTCCTACGA- 3'

モノクローナル抗体によるインテグリンの活性評価

NZ-1、G3、H3 モノクローナル抗体を用いて、 $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造の評価を行った³¹。細胞を結合バッファーに懸濁し、抗体(5 μ g/ml) と 37°Cで 20 分間インキュベートした。続けて、最終濃度 0.5 μ M となるように CXCL12、CCL25 または CXCL10 を加え、さらに 10 分間インキュベートした。洗浄後、anti-Rat IgG Fc-APC(1 μ g/ml)と氷上で 20 分間反応させた。平均蛍光強度は、Gallios flow cytometry を用いて測定した。

イムノブロッティング

BAF 細胞は、溶解バッファー (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10% glycerol, 2 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM leupeptin, and 0.1 mM aprotinin) に溶解した。ライセートは等量のサンプルバッファーを混合後、9%または 12%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE でタンパクを分離し、セミドライ式転写機を用いて PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは、5% ブロックエースを用いて室温で 1 時間ブロッキングし、一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。洗浄後、HRP 標識された二次抗体と室温で 1 時間反応させた。ECL Plus Western Blotting Detection System (GEヘルスケア) を用いてシグナルを検出した³²。

Rap1V12、Spa-1 発現細胞および Rap1、talin ノックダウン細胞の作製

T7-Rap1V12 と Flag-Spa-1 遺伝子は以前の報告にあったものを使用し³²、レンチウイルスを用いて、BAF 細胞に遺伝子導入した。ノックダウン細胞は、特異的な配列を含む shRNA をレンチウイルスベクター(CS-RfA-EG)に挿入し、レンチウイルスを用いて BAF 細胞に遺伝子導入した^{34,35}。標的配列は以下の通りである (Rap1a: '-GAATGGCCAAGGGTTTGCA-3'、Rap1b:5'-AGACACTGATGATGTTCCA-3'、talin: '-CGGTGAAGACTATCATGGT-3')。それぞれの遺伝子の発現はイムノブロットにより確認した。

プルダウンアッセイ

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と RalGDS の RBD の融合タンパクで Rap1-GTP のプルダウンを行なった³⁶。10⁷の細胞を溶解バッファー(1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl[pH7.5], 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM leupeptin, and 0.5 mM aprotinin)で溶解し、グルタチオンアガロースビーズに結合した GST 融合タンパクと 4°Cで 1 時間反応させた。ビーズを溶解バッファーで 3 回洗浄後、抗 Rap1 抗体を使用してイムノブロッティングで解析した。

G3 および H3 モノクローナル抗体の作製

抗原を作製のために、マウス β_7 の1~458のアミノ酸をコードするDNA配列をpMALc2xベクターにサブクローニングし、大腸菌BL21に形質転換した。BL21を37°CでOD600が0.4-0.6になるまで培養後、イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を0.2 mMの濃度で加え、30°Cで3時間培養した。細胞を溶解バッファー(0.1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, and 1 mM EDTA)で溶解し、MBP- β_7 をpMAL Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs)を用いて精製した。

MBP- β_7 と Freund's complete adjuvant のエマルジョンを8週齢のWKYラットの尾根部に筋肉注射し、2週間飼育した。腸骨リンパ節から回収したリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞株 SP2/0 を GenomeONE (石原産業) を用いて融合させた³³。ハイブリドーマは HAT 培地を用いてセレクションを行なった。培養上清を用いて Mn^{2+} 存在下、あるいは非存在下におけるフローサイトメトリーを行い、 Mn^{2+} 存在下でのみ結合する抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングを行った。

G3 および H3 のエピトープマッピング

G3 は Δ 1-19 マウス β_7 変異体およびマウス β_1/β_7 キメラ、H3 はヒト/マウス β_7 キメラを用いて、エピトープを探索した。それぞれのコンストラクトは、In-Fusion HD cloning kit (TaKaRa)を用いて作製した。In fusion Enzyme Premix はオーバーラップした末端 20 塩基を正確に融合させることができるため、PCR によって合成された複数の DNA 断片と直鎖状にしたベクターを用いることで、効率的にクローニングを行える。したがって、目的の配列の両端の 20 塩基が隣接する DNA 断片あるいはベクターとオーバーラップするようにプライマーを設計し、ヒト β_7 またはマウス β_1 、 β_7 を PCR によって増幅した。それぞれの DNA 断片は、直鎖状にした CSII-EF-MCS-IRES2-venus ベクターにクローニングした。コンストラクトは、レンチウイルスを用いて BAF/ β_7 ノックアウト細胞に発現させた。0.5 mM Mn^{2+} 存在下でフローサイトメトリーを行い、BAF 細胞における G3 または H3 の結合を測定した。

大腸炎マウスへの抗 MAdCAM-1 抗体投与

4 または 5 週齢の T 細胞特異的 Rap1 ノックアウトマウスの腹腔に、Rat IgG または抗 MAdCAM-1 抗体 1 mg を含む PBS を実験開始から 0、7、21 日目に投与した³⁹。それぞれのマウスの体重は 2 日毎に測定し、28 日目に安楽死させ、病理切片または凍結切片は作製した。

病理切片の作製

摘出したマウスの結腸を 10%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。切片は 3 μ m の厚さで薄切し、ヘマトキシリンとエオジンで染色後、CCD カメラ付き Olympus IX51 光学顕微鏡を用いて、撮影を行った。組織学的なスコアは以下のように割り当てた^{10,40}。グレード 0: 変化は観察されない、グレード 1: 微小な上皮の過形成の有無にかかわらず、わずかに炎症細胞の浸潤がみられる、グレード 2: 軽度の炎症性細胞の拡散が見られ、軽度から中等度の上皮過形成、および軽度から中等度の杯細胞からのムチンの枯渇を伴う、グレード 3: 中等度から重度の上皮過形成およびムチン枯渇、さらに貫壁性の中程度の炎症細胞の浸潤が見られることもある、グレード 4: 陰窩膿瘍または腫瘍形成を伴うしばしば貫壁性の顕著な炎症細胞の浸潤、顕著な上皮過形成、ムチンの枯渇が見られる、グレード 5: 重度の腫瘍または腸陰窩の喪失を伴う全層性の炎症が見られる。

免疫染色

摘出したマウスの結腸は PBS /4%パラホルムアルデヒドで固定し、OCT コンパウンド[®] (サクラファインテック)で包埋し、-80°Cで凍結させた。凍結ブロックは、凍結マイクローム (Leica) を用いて、10µmの厚さで薄切した。切片をブロッキングバッファー (10%ヤギ血清、0.1% Triton X-100 を含む PBS) を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、APC 標識された抗 CD4 抗体と 4°Cで一晩反応させた。核は DAPI を含む SlowFade Gold antifade reagent(invitrogen)を用いて染色した。染色したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica) を用いて観察した。

統計解析

統計解析は、スチューデントの T 検定を用いて両側検定を行った。P 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

エピトープマッピングに使用したプライマー

m β ₇/ m β ₁ (20-77)

m β ₁ (20-77) -s 5'-TCGAGAATTCTGCAGCGGCCCGCCACCATGGACAGCAAAGGTTTCGTC-3'

m β ₁ (20-77) -as 5'-TCGGCTCCTCTATGTCACTTGGCTGGCAAC-3'

m β ₇ (78-787) -s 5'-AAGTGACATAGAGGAGCCGAGAGGCCGCCA-3'

m β ₇ (78-787) -as 5'-AGGGGCGGATCCGCGGCCGCTCAGTCTGCTTCCCTGGTCA-3'

m β ₇/ m β ₁ (20-34)

m β ₁ (20-34) -s 5'-TCGAGAATTCTGCAGCGGCCCGCCACCATGGACAGCAAAGGTTTCGTC-3'

m β ₁ (20-34) -as 5'-AGAGAATACATTCTCCGCAAGATTTGGCAT-3'

m β ₇ (35-787) -s 5'-TTGCGGAGAATGTATTCTCTCACATCCCAG-3'

m β ₇ (35-787) -as 5'-AGGGGCGGATCCGCGGCCGCTCAGTCTGCTTCCCTGGTCA-3'

Δ 1-19 m β ₇

signal-s 5'-TCGAGAATTCTGCAGCGGCCCGCCACCATGGACAGCAAAGGTTTCGTC-3'

signal -as 5'-TCCCTGCAGAGACAGGGATCCGTCGACATCATCAT-3'

m β ₇ (20-787) -s 5'-GATCCCTGTCTCTGCAGGGATCCTGCCAG-3'

m β ₇ (20-787) -as 5'-AGGGGCGGATCCGCGGCCGCTCAGTCTGCTTCCCTGGTCA-3'

m β ₇/ h β ₇ (1-372)

h β ₇ (1-372) -s 5'-TCGAGAATTCTGCAGCGGCCCGCCACCATGGACAGCAAAGGTTTCGTC-3'

h β ₇ (1-372) -as 5'-CAAGAGTCACAGTGGAAGACAGGCTATTATAAGCATCC-3'

m β ₇ (373-787) -s 5'-ATAGCCTGTCTTCCACTGTGACTCTTGAGCACTC-3'

m β ₇ (373-787) -as 5'-AGGGGCGGATCCGCGGCCGCTCAGTCTGCTTCCCTGGTCA-3'

m β ₇/ h β ₇ (1-404)

h β ₇ (1-404) -s 5'-TCGAGAATTCTGCAGCGGCCCGCCACCATGGACAGCAAAGGTTTCGTC-3'

h β ₇ (1-404) -as 5'-GTCCCCGGTCCTCAGCCTTACCCTCCCTCTTCTC-3'

m β ₇ (405-787) -s 5'-TAAGGCTGAGGACCGGGACAGTGCAATGATGTCC-3'

m β ₇ (405-787) -as 5'-AGGGGCGGATCCGCGGCCGCTCAGTCTGCTTCCCTGGTCA-3'

m β ₇/ h β ₇ (1-393)

h β ₇ (1-393) -s 5'-TCGAGAATTCTGCAGCGGCCCGCCACCATGGACAGCAAAGGTTTCGTC-3'

h β ₇ (1-393) -as 5'-CAGGACCCTTACTGTTGGATTTCGTAAGAAATGTG-3'

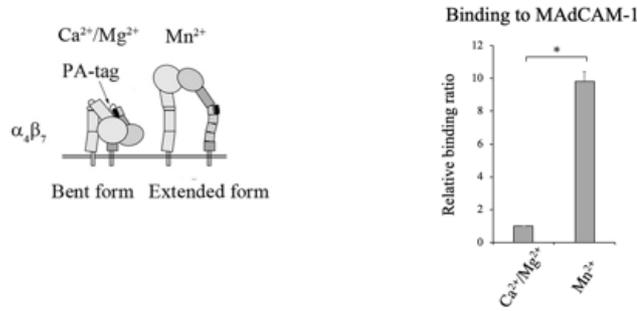
m β ₇ (394-787) -s 5'-ATCCCAGTGTAAGGGTCTGAGAAGACGGA-3'

m β ₇ (394-787) -as 5'-AGGGGCGGATCCGCGGCCGCTCAGTCTGCTTCCCTGGTCA-3'

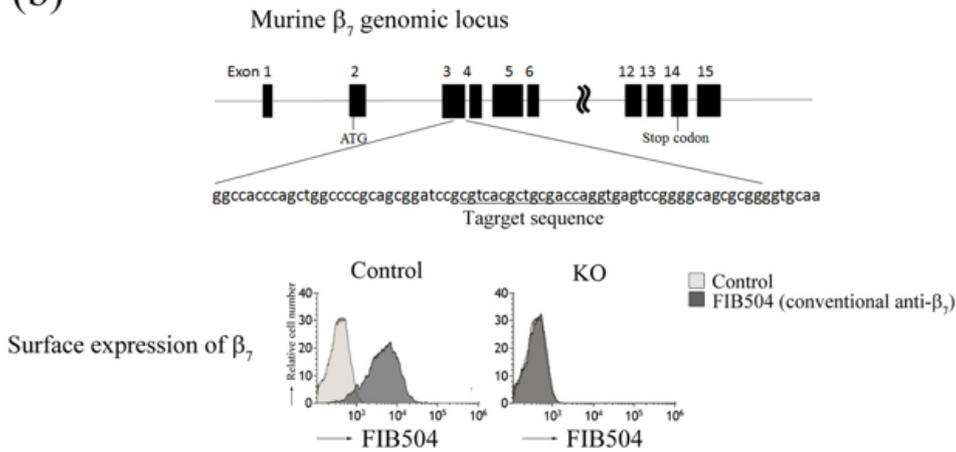
6 ☒

☒ 1

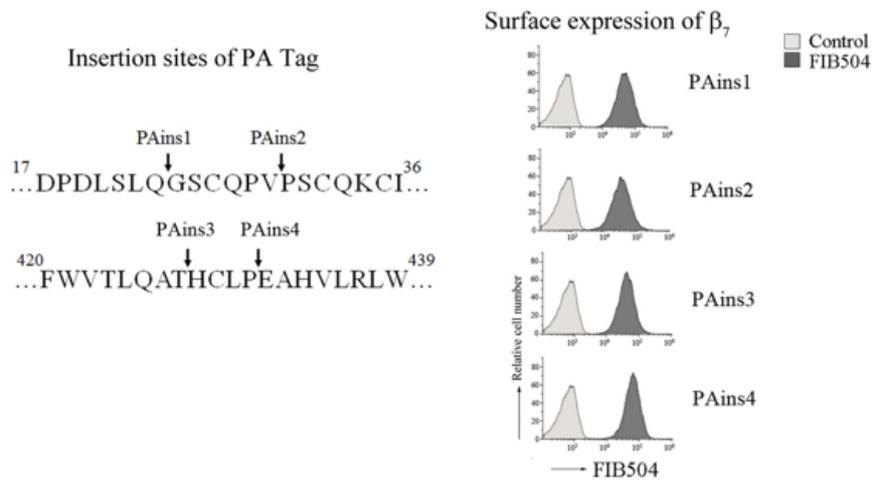
(a)



(b)



(c)



(d)

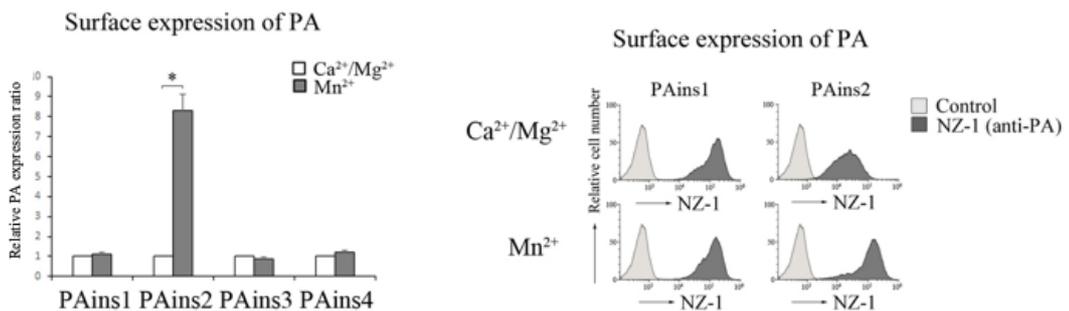


図1 PA タグを用いた $\alpha_4\beta_7$ の構造変化の検出。

(a) (左) $\alpha_4\beta_7$ の細胞外ドメインの立体構造モデル:頭部が閉じた低親和性の Bent form と頭部が開いた高親和性の Extended form (右) 1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ または 0.5 mM Mn^{2+} の存在下での野生型 (wt) BAF 細胞の MAdCAM-1 への結合。MAdCAM-1-Fc への結合の平均蛍光強度 (MFI)は、抗 β_7 (FIB504) の MFI に対して正規化された。MFI は、wt 細胞の 1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ の存在下の値を 1 とした増加倍率を表した。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した(* $P < 0.005$)。

(b) (上) マウスインテグリン β_7 遺伝子と標的配列。エキソン 3 のシングルガイド RNA の標的部位の位置は下線で示されている。(下) CRISPR / Cas9 を介したゲノム編集を用いたコントロールまたはノックアウト細胞の抗 β_7 のフローサイトメトリープロファイル。

(c) (左) PA タグの挿入部位 (PAins 1- 4)。(右) 設計された変異体でトランスフェクトされた BAF 細胞の抗 β_7 のフローサイトメトリープロファイル。

(d) (左) 1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ または 0.5 mM Mn^{2+} 存在下での各トランスフェクタントへの NZ-1 の結合。各トランスフェクタントの NZ-1 への結合の MFI は、抗 β_7 の MFI に対して正規化され、MFI は、各トランスフェクタントの 1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ の存在下の値を 1 とした増加倍率を表した。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した(* $P < 0.001$)。(右) 1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ または 0.5 mM Mn^{2+} の存在下での PAins1 および PAins2 の NZ-1 のフローサイトメトリープロファイル。

図 2

Surface expression of PA detected by Fv-clasp of NZ-1

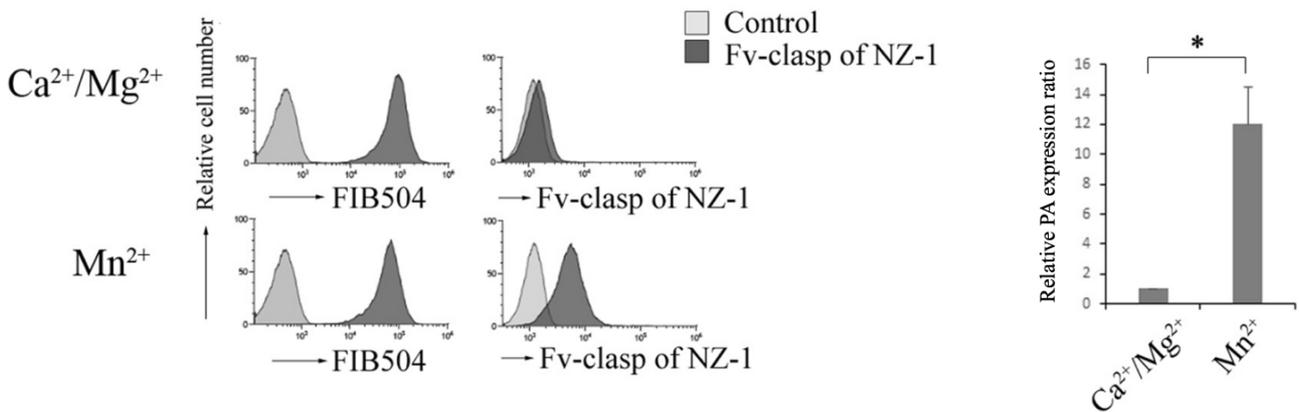


図 2 NZ-1 の Fv-clasp は $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を認識した。

(左) 1mM $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ または 0.5mM Mn^{2+} の存在下での PAins2 発現細胞の FIB504 または NZ-1 の Fv-clasp のフローサイトメトリープロファイル。(右) 1mM $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ または 0.5mM Mn^{2+} 存在下における PAins2 発現細胞への NZ-1 Fv clasp の結合。PAins2 への NZ-1 Fv-clasp の結合の MFI は、抗 β_7 の MFI に対して正規化され、MFI は、1 mM $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ の存在下の値を 1 とした増加倍率を表した。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した(* $P < 0.003$)。

図 3 $\alpha_4\beta_7$ の構造は Rap1 によって制御されていた。

a) コントロール、T7-Rap1V12、flag-Spa-1 発現または Rap1a/b ノックダウン細胞の抗 T7、flag、または Rap1 抗体を用いたイムノブロット。

(b) GTP 結合 Rap1 は、GST-Ral-GDS-RBD を用いたプルダウンアッセイにより解析された。コントロールまたは SPA-1 発現細胞を 100nM の CXCL12 で刺激し、溶解し、プルダウンアッセイを行った。結合した Rap1 とトータル Rap1 は、抗 Rap1 抗体を使用したイムノブロッティングによって検出した。

(c) 可溶性 MAdCAM-1-Fc へのリガンド結合親和性。CXCL12 の存在下または非存在下での可溶性 MAdCAM-1-Fc への各トランスフェクタントの結合。可溶性 MAdCAM-1 結合の MFI は、抗 β_7 (FIB504) の MFI に対して正規化され、無刺激のコントロール細胞の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した(* $^1P < 0.001$ 、* $^2P < 0.001$ 、* $^3P < 0.006$ 、* $^4P < 0.05$)。

(d) CXCL12 の存在下または非存在下での各トランスフェクタントへの NZ-1 の結合。NZ-1 の MFI は、抗 β_7 の MFI に対して正規化され、無刺激のコントロール細胞の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した(* $^1P < 0.001$ 、* $^2P < 0.001$ 、* $^3P < 0.001$ 、* $^4P < 0.001$)。

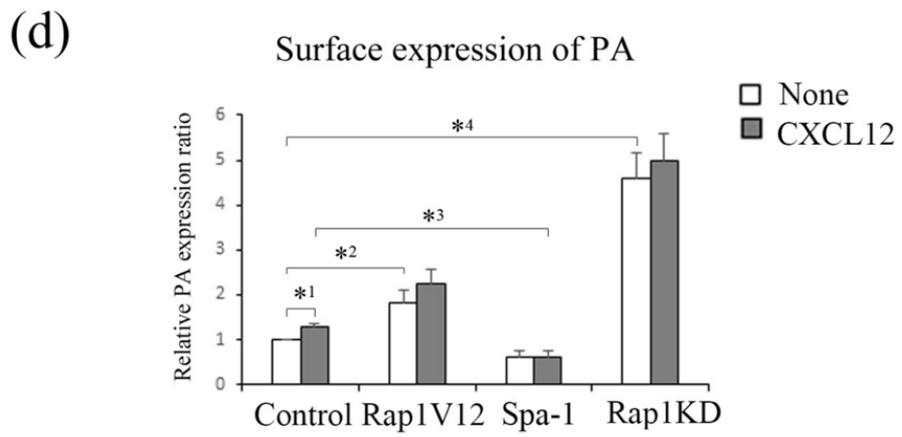
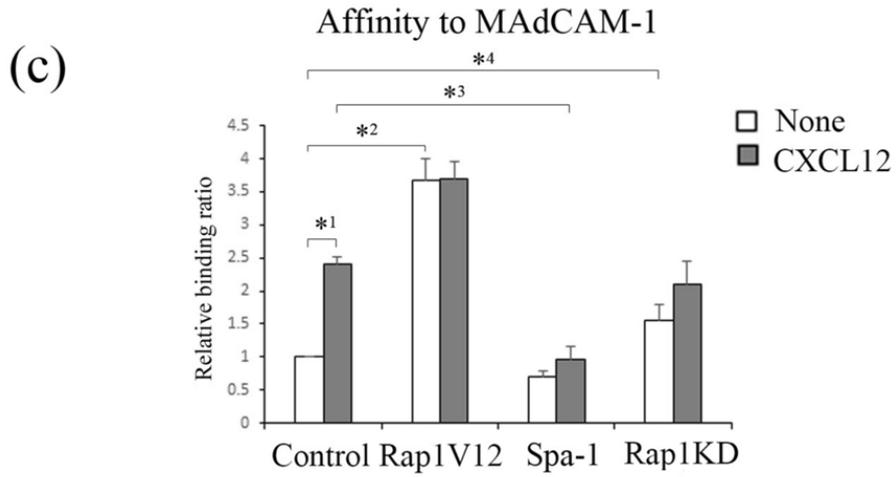
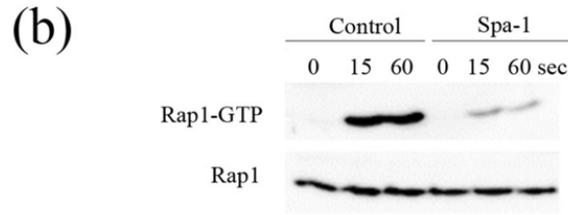
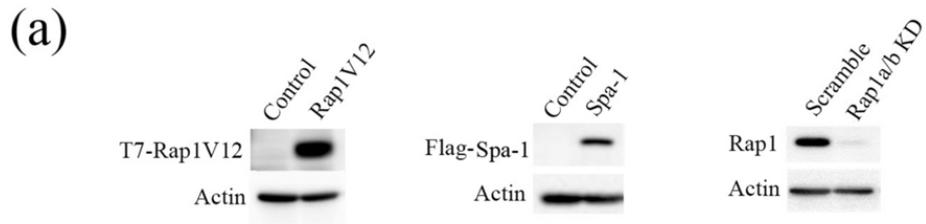


图 4

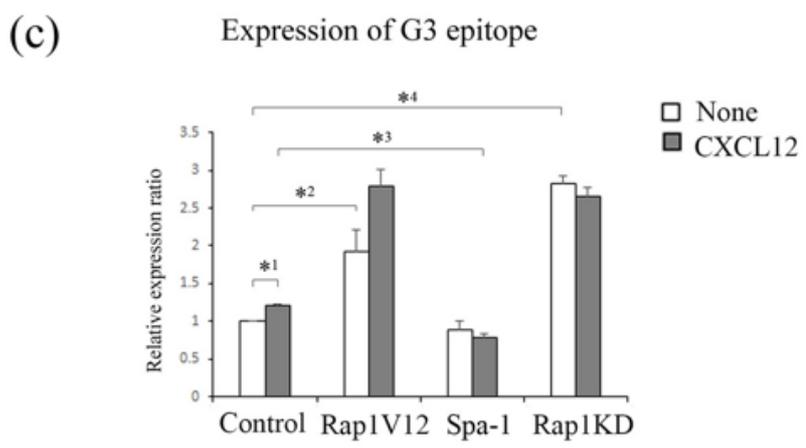
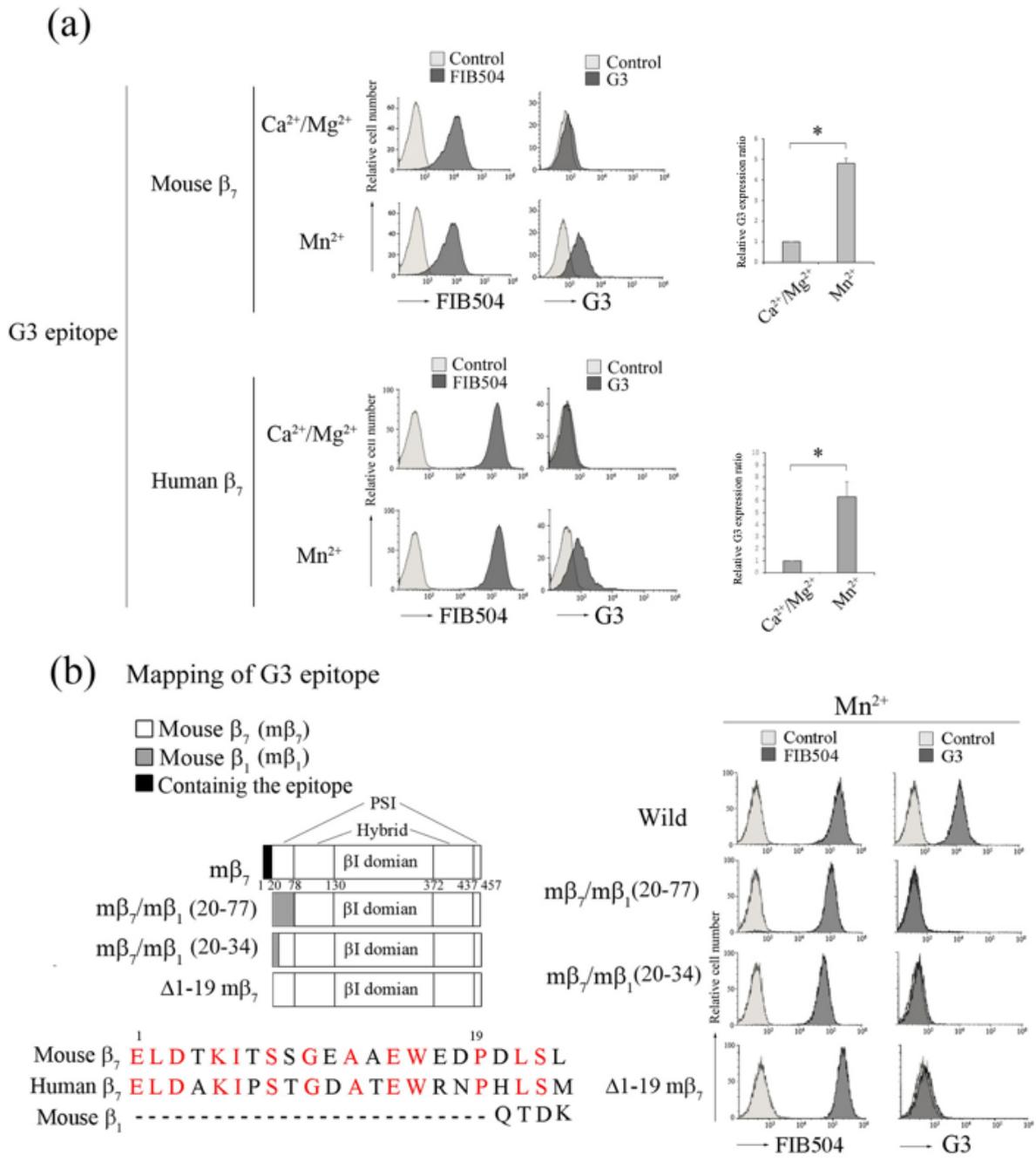


図4 G3 mAb は、 $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を認識した。

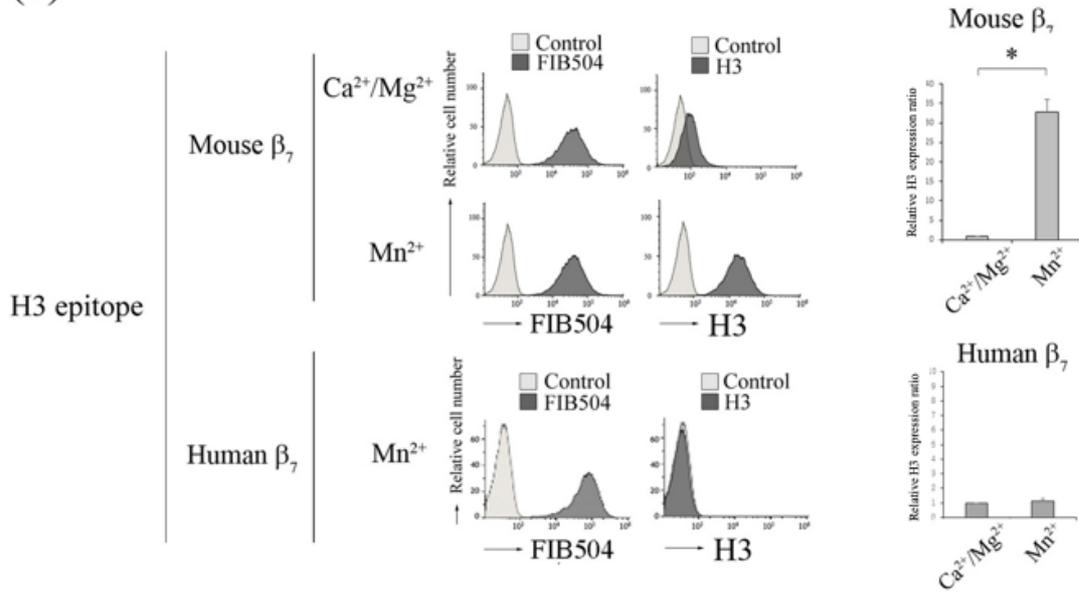
(a) (上) (左) 1mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ または 0.5mM Mn^{2+} の存在下での wt BAF 細胞の G3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。(右) G3 mAb の結合の MFI は、抗 β_7 (FIB504) の MFI に対して正規化され、1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下での値を 1 とした増加倍率を表した。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した (* P < 0.001)。(下) (左) 1mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ または 0.5mM Mn^{2+} の存在下でのヒト β_7 を発現する Jurkat 細胞の G3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。(右) G3 mAb の結合の MFI は、抗 β_7 (FIB504) の MFI に対して正規化され、1 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下での値を 1 とした増加倍率を表した。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した (* P < 0.001)。

(b) (左) (上) G エピトープのマッピング。 G3 mAb の反応性は、フローサイトメトリーを使用して、0.5 mM Mn^{2+} の存在下で β_7 ノックアウト BAF 細胞にマウス β_1/β_7 キメラサブユニットまたは $\Delta 1-19$ マウス β_7 を内因性 α_4 と共発現させることにより決定した。(下) マウス、ヒト β_7 およびマウス β_1 のアミノ酸配列。赤字は、G3 mAb によって認識される候補を示した。(右) 0.5 mM Mn^{2+} の存在下における各トランスフェクタントの抗 β_7 または G3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。

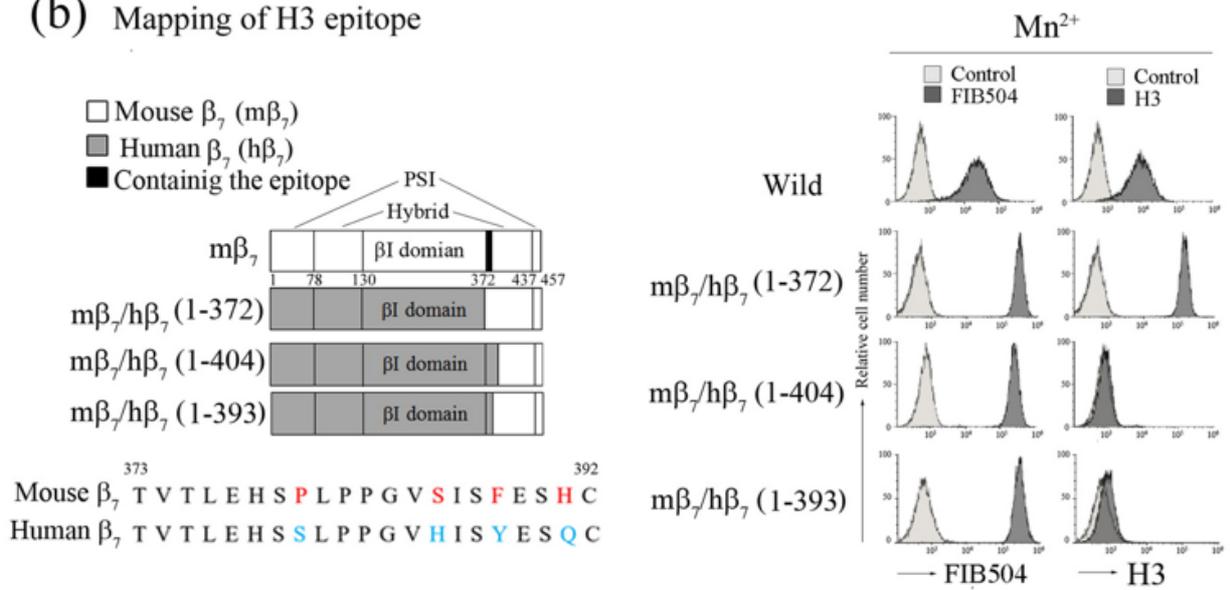
(c) CXCL12 の存在下または非存在下における、コントロール、Rap1V12、Spa-1 発現、または Rap1a/b ノックダウン細胞上の $\alpha_4\beta_7$ への G3 mAb の結合。G3 mAb の結合の MFI は、抗 β_7 の MFI に対して正規化され、無刺激のコントロール細胞の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した (*¹P < 0.001、*²P < 0.03、*³P < 0.002、*⁴P < 0.001)。

Figure 5

(a)



(b) Mapping of H3 epitope



(c)

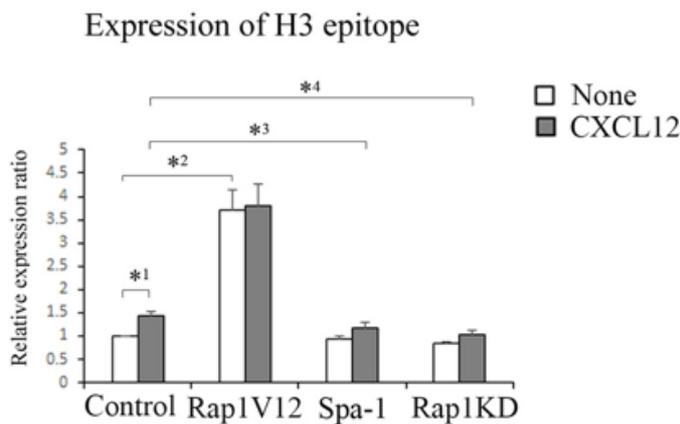


図5 H3 mAb は、 $\alpha_4\beta_7$ の活性型構造を認識した。

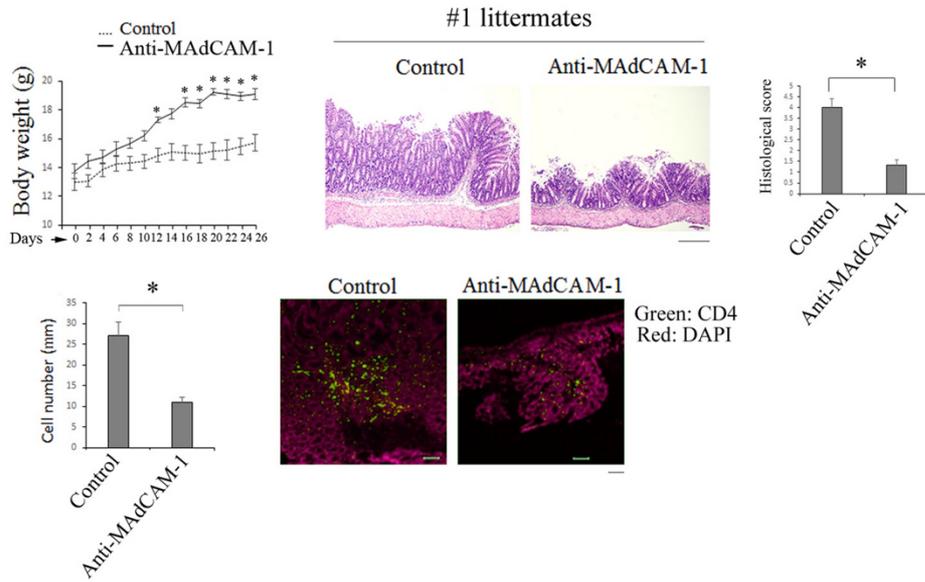
(a) (左) 1mM Ca^{2+} / Mg^{2+} または 0.5mM Mn^{2+} の存在下での wt BAF 細胞の H3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。H3 mAb の結合の MFI は、抗 β_7 (FIB504) の MFI に対して正規化され、1 mM Ca^{2+} / Mg^{2+} 存在下での値を 1 とした増加倍率を表した。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した (* $P < 0.001$)。 (下) (左) 0.5 mM Mn^{2+} の存在下でヒト β_7 を発現する Jurkat 細胞の H3 のフローサイトメトリープロファイル。 (右) H3 mAb の結合の MFI は、抗 β_7 (FIB504) の MFI に対して正規化され、1 mM Ca^{2+} / Mg^{2+} 存在下での値を 1 とした増加倍率を表した。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した。

(b) (左) (上) H3 エピトープのマッピング。 H3 mAb の反応性は、フローサイトメトリーを使用して、0.5 mM Mn^{2+} の存在下で β_7 ノックアウト BAF 細胞内の内因性 α_4 とキメラマウス/ヒト β_7 サブユニットを共発現させることによって決定した。 (下) マウスおよびヒト β_7 のアミノ酸配列。赤字は、H3 mAb によって認識される候補を示した。青字は、対応するヒトアミノ酸配列を示した。 (右) 0.5 mM Mn^{2+} の存在下における各トランスフェクタントの抗 β_7 または H3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。

(c) CXCL12 の存在下または非存在下における、コントロール、Rap1V12、Spa-1 発現、または Rap1a / b ノックダウン細胞上の $\alpha_4\beta_7$ への H3 mAb の結合。 H3 mAb の結合の MFI は、抗 β_7 の MFI に対して正規化され、無刺激のコントロール細胞の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した (*¹ $P < 0.02$ 、*² $P < 0.005$ 、*³ $P < 0.05$ 、*⁴ $P < 0.05$)。

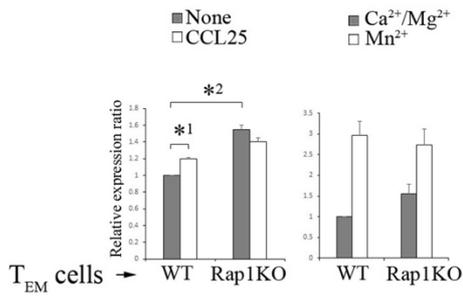
Figure 6

(a)



(b)

G3 epitope



(c)

H3 epitope

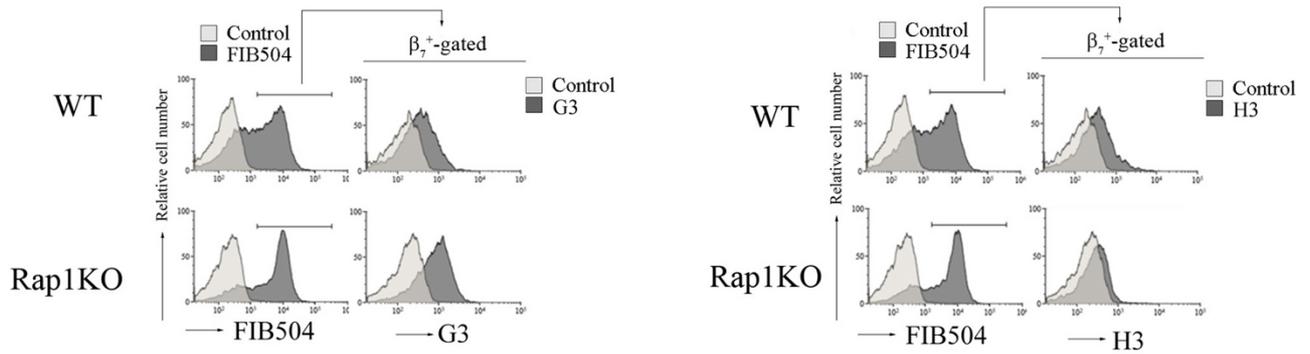
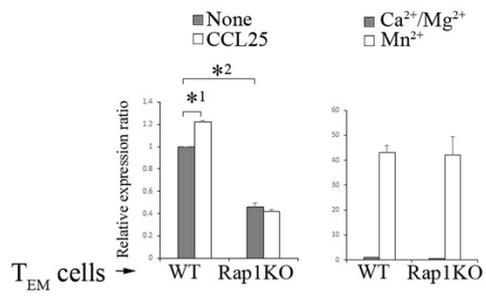
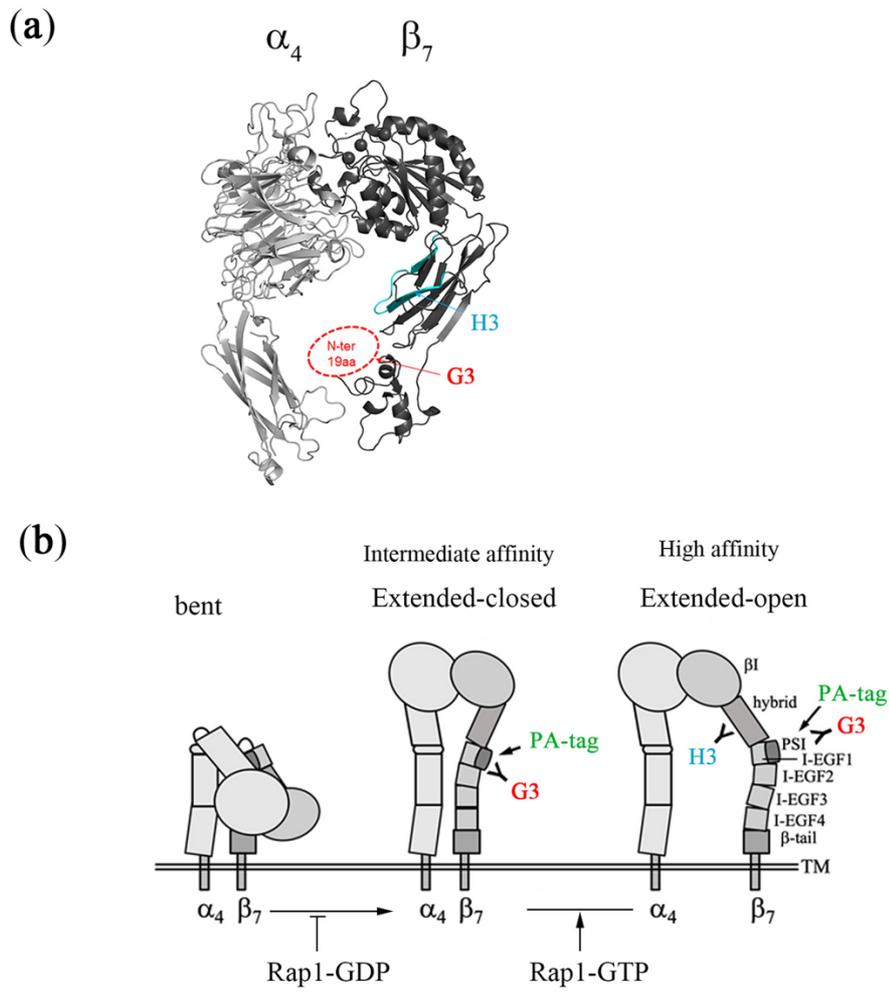


図6 大腸炎の原因となる CD4⁺T_{EM}細胞における G3 エピトープの発現。

(a) 抗 MAdCAM-1 の投与は、T 細胞特異的 Rap1a/b ノックアウトマウス（大腸炎マウス）における自然発症大腸炎の発症を抑制した。（左）コントロールまたは抗 MAdCAM-1 抗体を注射した大腸炎マウスの体重は、元の体重に対するパーセンテージで表した。（n=3、* P<0.05）。（中央）コントロールまたは抗 MAdCAM-1 Ab を投与された大腸炎マウスの同腹仔のセット（#1）における腸炎の組織像（×40、スケールバー：500μm）。（右）大腸炎の損傷の病理学的評価。（下）（左）大腸炎マウスの結腸に浸潤した CD4⁺T 細胞の密度は、免疫組織学な調査で評価した（* P<0.02）。（右）コントロールまたは抗 MAdCAM-1 抗体を投与された大腸炎マウスの結腸の凍結切片を抗 CD4（緑）および DAPI（赤）で染色した（×100、スケールバー：100μm）。

(b) CD4⁺T_{EM}細胞における G3 エピトープの発現。（上）CCL25 の存在下または非存在下（左）および 1 mM Ca²⁺/Mg²⁺、または 0.5 mM Mn²⁺（右）での WT および Rap1 欠損（Rap1KO）CD4⁺（CD44⁺）T_{EM}細胞への G3 mAb の結合。G3 mAb の結合の MFI は、抗β₇ の MFI に対して正規化され、無刺激のコントロール細胞の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した(*¹P<0.005、*²P<0.001)。（下）無刺激時における WT および Rap1KO T_{EM}細胞上の抗β₇ およびβ₇⁺ゲート内の G3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。

(c) CD4⁺T_{EM}細胞における H3 エピトープの発現。（上）CCL25 の存在下または非存在下（左）および 1 mM Ca²⁺/Mg²⁺、または 0.5 mM Mn²⁺（右）での WT および Rap1 欠損（Rap1KO）CD4⁺（CD44⁺）T_{EM}細胞への H3 mAb の結合。H3 mAb の結合の MFI は、抗β₇ の MFI に対して正規化され、無刺激のコントロール細胞の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した(*¹P<0.001、*²P<0.001)。（下）無刺激時における WT および Rap1KO T_{EM}細胞上の抗β₇ およびβ₇⁺ゲート内の H3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。



(c)

		Cells		Control	Rap1V12	Spa-1	Rap1KD
		Stimulation					
Rap1-binding guanine nucleotide	No Stim			GDP	GTP	GDP	None
	CXCL12			GTP	GTP	GDP	None
Antibody-binding activity	NZ-1	No Stim		-	+	-	+
		CXCL12		+	+	-	+
	G3	No Stim		-	+	-	+
		CXCL12		+	+	-	+
	H3	No Stim		-	+	-	-
		CXCL12		+	+	-	-

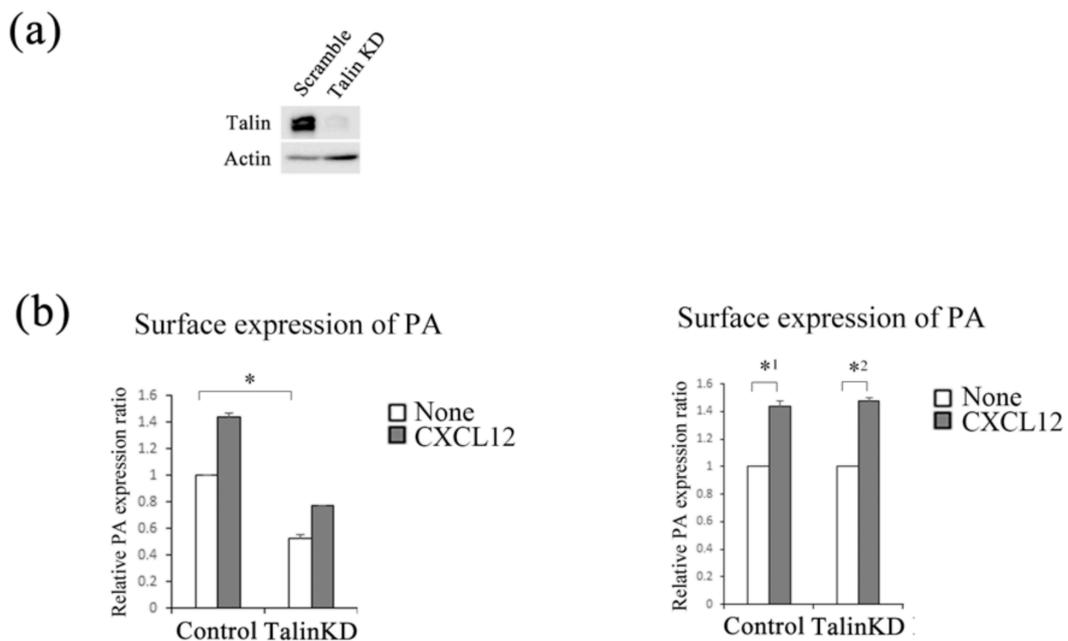
図7 Rap1による $\alpha_4\beta_7$ の構造制御モデル。

(a) $\alpha_4\beta_7$ ヘッドピースの構造。 $\alpha_4\beta_7$ ヘッドピースの結晶構造は、PDBデータベース(3V4P4)より取得し、PyMOL分子可視化システムを使用して作成した。 β_7 のPSIドメインの代わりに β_1 ヘッドピース構造のPSIドメインを用い、N末端から19アミノ酸残基までの構造は不明である(点線)。G3 mAbは β_7 のPSIドメインのエピトープを認識し(赤)、H3 mAbは β_7 のHybridドメインのエピトープを認識した(青)。

(b) $\alpha_4\beta_7$ の構造変化モデル。G3(赤)とPSIドメインにあるPA-タグ(緑)、およびH3(青)エピトープはすべて、曲がった配座を持つ低親和性 $\alpha_4\beta_7$ に隠されていた。G3エピトープとPAタグの表面発現はRap1欠損により増加した。これは $\alpha_4\beta_7$ の「Extended-closed form」を誘発した可能性がある。Rap1-GDPは $\alpha_4\beta_7$ の構造変化を抑制し、 $\alpha_4\beta_7$ のMAdCAM-1への結合を低親和性($\alpha_4\beta_7$ がBent formの状態)に維持した。H3エピトープの露出はRap1-GTPに依存しており、これは可溶性MAdCAM-1への $\alpha_4\beta_7$ の結合活性と強く相関していた。Rap1-GTPは、Hybridドメインのスイングアウトを誘導した可能性があり、これは $\alpha_4\beta_7$ の「extended-open form」に対応し、高親和性でMAdCAM-1に $\alpha_4\beta_7$ が結合する。

(c) CXCL12の存在下または非存在下(無刺激時)のコントロール、Rap1V12またはSpa-1発現細胞、およびRap1KD細胞におけるRap1結合グアニンヌクレオチド(GTPまたはGDP)および各抗体(NZ-1、G3、H3)結合活性(+または-)をまとめた表。抗体の無刺激のコントロール細胞への結合は(-)で表示され、有意に増加した場合は(+)で表示した。

補足図 1

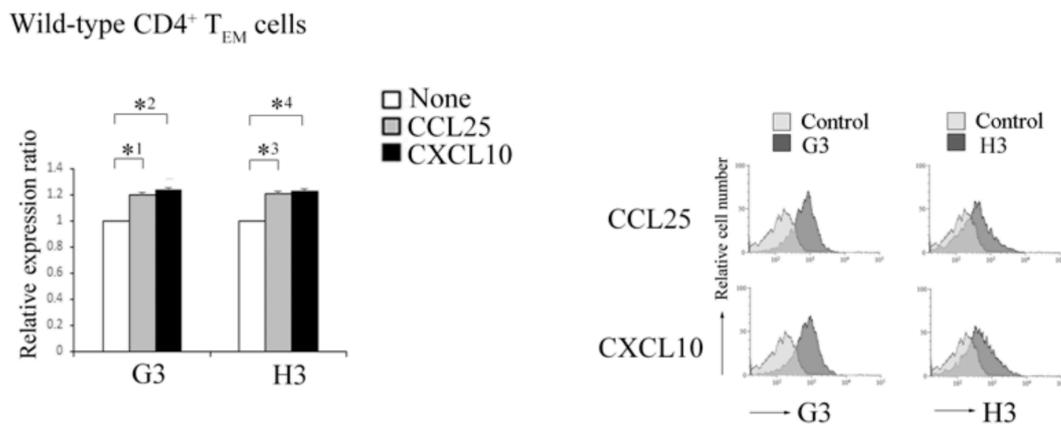


補足図 1 talin ノックダウンによる PA タグの細胞表面発現の効果

(a) コントロールおよび talin ノックダウン PAins2 発現細胞のウエスタンブロッティング。

(b) (左) CXCL12 非存在下および存在下におけるコントロールおよび talin ノックダウン細胞への NZ-1 の結合。NZ-1 の結合の MFI は、抗β₇ の MFI に対して正規化され、無刺激のコントロール細胞の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した (P < 0.005)。 (右) 無刺激のコントロールまたは talin ノックダウン細胞をそれぞれ 1 とした増加倍率を表している (*¹P < 0.001、*²P < 0.001)。

補足図 2



補足図 2 CCL25、CXCL10 刺激時の CD4⁺T_{EM} 細胞における G3 および H3 エピトープの発現。

(左) CCL25、CXCL10 刺激時の WT CD4⁺T_{EM} 細胞における G3 および H3 の結合。G3 および H3 の結合の MFI は、抗β₇の MFI に対して正規化され、無刺激時の値を 1 とした増加倍率を表している。データは 3 回の独立した実験の平均と標準誤差を表した (*¹P < 0.005、*²P < 0.001、*³P < 0.001、*⁴P < 0.001)。

(右) CCL25、CXCL10 刺激的時における WT CD4⁺T_{EM} 細胞上のβ₇⁺ゲート内の G3 または H3 mAb のフローサイトメトリープロファイル。

7 参考文献

1. Hogg, N., Patzak, I. & Willenbrock, F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol* **11**, 416-426 (2011).
2. Humphries, J.D., Chastney, M.R., Askari, J.A. & Humphries, M.J. Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* **56**, 14-21 (2019).
3. Lock, J.G. *et al.* Clathrin-containing adhesion complexes. *J Cell Biol* **218**, 2086-2095 (2019).
4. Yu, Y. *et al.* Structural specializations of alpha(4)beta(7), an integrin that mediates rolling adhesion. *J Cell Biol* **196**, 131-146 (2012).
5. Firrell, J.C. & Lipowsky, H.H. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *Am J Physiol* **256**, H1667-1674 (1989).
6. Kinashi, T. & Katagiri, K. Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL. *Immunol Lett* **93**, 1-5 (2004).
7. Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. & Kinashi, T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol* **4**, 741-748 (2003).
8. Lafuente, E. & Boussiotis, V.A. Rap1 regulation of RIAM and cell adhesion. *Methods Enzymol* **407**, 345-358 (2006).
9. Gingras, A.R. *et al.* Rap1 binding and a lipid-dependent helix in talin F1 domain promote integrin activation in tandem. *J Cell Biol* **218**, 1799-1809 (2019).
10. Ishihara, S. *et al.* Dual functions of Rap1 are crucial for T-cell homeostasis and prevention of spontaneous colitis. *Nat Commun* **6**, 8982 (2015).
11. Bachmann, M., Kukkurainen, S., Hytonen, V.P. & Wehrle-Haller, B. Cell Adhesion by Integrins. *Physiol Rev* **99**, 1655-1699 (2019).
12. Schurpf, T. & Springer, T.A. Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *EMBO J* **30**, 4712-4727 (2011).

13. Kim, M., Carman, C.V. & Springer, T.A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**, 1720-1725 (2003).
14. Xiao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J.H. & Springer, T.A. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* **432**, 59-67 (2004).
15. Zhang, K. & Chen, J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr* **6**, 20-29 (2012).
16. Qi, J. *et al.* Identification, characterization, and epitope mapping of human monoclonal antibody J19 that specifically recognizes activated integrin alpha4beta7. *J Biol Chem* **287**, 15749-15759 (2012).
17. Hosen, N. *et al.* The activated conformation of integrin beta7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat Med* **23**, 1436-1443 (2017).
18. Fujii, Y. *et al.* Tailored placement of a turn-forming PA tag into the structured domain of a protein to probe its conformational state. *J Cell Sci* **129**, 1512-1522 (2016).
19. Arimori, T. *et al.* Fv-clasp: An Artificially Designed Small Antibody Fragment with Improved Production Compatibility, Stability, and Crystallizability. *Structure* **25**, 1611-1622. e4 (2017).
20. Zhu, L. *et al.* Structure of Rap1b bound to talin reveals a pathway for triggering integrin activation. *Nat Commun* **8**, 1744 (2017).
21. Mora, J.R. *et al.* Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* **424**, 88-93 (2003).
22. Sun, H. *et al.* Distinct chemokine signaling regulates integrin ligand specificity to dictate tissue-specific lymphocyte homing. *Dev Cell* **30**, 61-70 (2014).
23. Wang, S. *et al.* Integrin alpha4beta7 switches its ligand specificity via distinct conformer-specific activation. *J Cell Biol* **217**, 2799-2812 (2018).
24. Li, J. *et al.* Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation. *EMBO J* **36**, 629-645 (2017).
25. Nordenfelt, P., Elliott, H.L. & Springer, T.A. Coordinated integrin activation by

- actin-dependent force during T-cell migration. *Nat Commun* **7**, 13119 (2016).
26. Honda, S. *et al.* Topography of ligand-induced binding sites, including a novel cation-sensitive epitope (AP5) at the amino terminus, of the human integrin beta 3 subunit. *J Biol Chem* **270**, 11947-11954 (1995).
 27. Pokharel, S.M. *et al.* Integrin activation by the lipid molecule 25-hydroxycholesterol induces a proinflammatory response. *Nat Commun* **10**, 1482 (2019).
 28. Byron, A. *et al.* Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci* **122**, 4009-4011 (2009).
 29. Wynne, J.P. *et al.* Rap1-interacting adapter molecule (RIAM) associates with the plasma membrane via a proximity detector. *J Cell Biol* **199**, 317-330 (2012).
 30. Katagiri, K. *et al.* Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* **5**, 1045-1051 (2004).
 31. Katagiri, K. *et al.* Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol* **20**, 1956-1969 (2000).
 32. Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N. & Kinashi, T. Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. *Mol Cell Biol* **22**, 1001-1015 (2002).
 33. Sado, Y., Inoue, S., Tomono, Y. & Omori, H. Lymphocytes from enlarged iliac lymph nodes as fusion partners for the production of monoclonal antibodies after a single tail base immunization attempt. *Acta Histochem Cytochem* **39**, 89-94 (2006).
 34. Ebisuno, Y. *et al.* Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood* **115**, 804-814 (2009).
 35. Katagiri, K., Imamura, M. & Kinashi, T. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol* **7**, 919-928 (2006).
 36. Katagiri, K., Shimonaka, M. & Kinashi, T. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem* **279**, 11875-11881 (2004).

37. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823 (2013).
38. Ran, F.A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281-2308 (2013).
39. Picarella, D. *et al.* Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells. *J Immunol* **158**, 2099-2106 (1997).
40. Chen, H. *et al.* Extracellular Vesicles from Apoptotic Cells Promote TGFbeta Production in Macrophages and Suppress Experimental Colitis. *Sci Rep* **9**, 5875 (2019).

8 謝辞

本研究にあたり、多大なご指導を賜りました北里大学理学部免疫学講座 片桐晃子教授、石原沙耶花助教に心より感謝申し上げます。

インテグリンの構造について貴重なご助言を賜り、実験の実施に際しご協力頂きました大阪大学蛋白質研究所附属蛋白質解析先端研究センター分子創製学研究室 高木淳一教授心より感謝申し上げます。

また、本研究を実施するにあたりご協力いただきました修士課程2年 丸井僚也君、佐保菜々子さんに感謝いたします。

佐藤 健