

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

生物科学専攻 免疫学

DS-18903 佐藤 健

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、 $\alpha_4\beta_7$ 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。