

## 学位論文題名

# $\alpha 9$ インテグリンのリガンド認識機構と リンパ節外移出調節に関する研究

## 学位論文内容の要旨

[背景] インテグリンは細胞外マトリックスの受容体として働き、細胞の接着や遊走、生存などを誘導することが報告されている。 $\alpha 9$  インテグリン(以下 $\alpha 9$ )は $\alpha 4$  インテグリン(以下 $\alpha 4$ )と種々のリガンドを共有していることや、一次構造の相同性から独立したサブファミリーに分類されている。 $\alpha 9$  と  $\alpha 4$  の共通のリガンドの一つであるオステオポンチン(OPN)は分子中央部に  $^{159}\text{RGD}^{161}$  配列を有し、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$  インテグリンなどの RGD 受容体と結合する。またその下流の  $\text{R}^{168}$  と  $\text{S}^{169}$  の間にトロンビン切断部位が存在し、露出した  $^{162}\text{SVVYGLR}^{168}$  配列を介して  $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$  と結合する。特に  $\alpha 9$  はトロンビン切断型 OPN とのみ接着する。OPN はマクロファージの IL-12 産生を介した T 細胞の Th1 への分化、腫瘍の浸潤、転移など多彩な機能を有していることが報告されており、当研究室では OPN に対する中和抗体や遺伝子欠損マウスを用いた検討から、関節炎や肝炎において OPN が病態形成に重要な役割を持つことを報告してきた。OPN の機能はトロンビン等プロテアーゼ切断による構造変化と、それにより結合する受容体の変化、更には、リン酸化等の翻訳後修飾などによって変化する。プロテアーゼは炎症において局所で活性化することが報告されていることから、炎症状態では OPN とインテグリンの結合様式が変化することが予測される。更に  $\alpha 4$  と  $\alpha 9$  は共に OPN 上の SVVYGLR 配列を結合領域としているが、その結合機構の違いについては不明であった。また、OPN は  $\text{G}^{166}$  と  $\text{L}^{167}$  の間で MMP-3/-7 により切断を受けるが、これに対する  $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$  の接着についての研究も断片的である。そこで、初めに  $\alpha 4$  と  $\alpha 9$  の細胞接着と遊走における OPN 機能部位の同定を行った。

次に、炎症における  $\alpha 9$  の機能を解析するために、リンパ管内皮細胞(LEC)上の  $\alpha 9$  に着目した。 $\alpha 9$  遺伝子欠損マウスはリンパ管の弁の形成不全による乳び胸症を示し、出生後早期に死亡することから、LEC 上で発現する  $\alpha 9$  の重要性が示唆された。更に、リンパ管新生因子である VEGF-A、-C、-D は  $\alpha 9$  に接着することが報告されているが、成体における LEC 上の  $\alpha 9$  の機能は不明であった。そこで、マウスに完全フロイントアジュバント(CFA)を投与することにより炎症を誘導し、当研究室で樹立した抗  $\alpha 9$  インテグリン抗体(55A2C)を用いて LEC における  $\alpha 9$  の機能を解析した。

[方法と結果] OPN 機能部位の解析のために OPN N 末断片(RAA N half)の SVVYGLR 配列を一つずつ A に置換したリコンビナントタンパク質を作製した。同様に MMP 切断型 N half (MMP RAA N half)を作製した。また CHO-K1 細胞に、 $\alpha 4$  と  $\alpha 9$  をそれぞれ遺伝子導入し安定発現細胞株( $\alpha 4$ /CHO-K1、 $\alpha 9$ /CHO-K1 細胞)を樹立した。これらを用いて細胞接着試験と細胞遊走試験を行い、各変異体と RAA N half に対する接着性、遊走性との比較を行った。細胞接着試験の結果、SVVYGLR 上で  $\alpha 4$  との接着に重要なアミノ酸は  $\text{V}^{164}$ 、 $\text{Y}^{165}$ 、 $\text{L}^{167}$  であり、 $\alpha 9$  では  $\text{V}^{164}$ 、 $\text{Y}^{165}$ 、 $\text{L}^{167}$ 、 $\text{R}^{168}$  であること、MMP RAA N half は  $\alpha 4$ /CHO-K1 細胞に対して有意な接着性を示したが、 $\alpha 9$ /CHO-K1 細胞に対しては接着性を示さないことが分かった。

この結果と一致して、V164A、Y165A、L167A 変異体は  $\alpha 4$  と  $\alpha 9$ /CHO-K1 細胞いずれに対しても遊走性が低下した。 $\alpha 4$ /CHO-K1 細胞はさらに V163A に対しても細胞遊走の低下を示した。

LEC 上の  $\alpha 9$  の機能を解析するために、CFA を投与する前日に 55A2C あるいは対照抗体を投与し、CFA 投与 6 日後にリンパ節(LN)を採取し、LEC マーカーである LYVE-1 で免疫染色することによりリンパ管新生を評価したが、両群に差は認められなかった。しかしながら、55A2C 投与群において髄洞の空洞化と  $CD4^+$  T 細胞数の増加が認められた。そこで、CFSE ラベルした MOG<sub>35-55</sub> 特異的 TCR トランスジェニックマウス(2D2) $CD4^+$  T 細胞を予め 55A2C あるいは対照抗体を投与しておいたマウスに移入し、MOG<sub>35-55</sub>/CFA を免疫し、3 日目の鼠径リンパ節(iLN)における CFSE<sup>+</sup>細胞を共焦点顕微鏡により計数した。その結果、55A2C 投与群において iLN における CFSE<sup>+</sup>細胞数の顕著な増加が認められた。一方、MOG<sub>35-55</sub> を免疫しなかった場合両群に差は認められなかった。更に、抗  $\alpha 4$ 、 $\alpha L$  抗体の投与により LN へのリンパ球の移入を遮断する実験を行い、LN からのリンパ球の移出について検討した。その結果、対照群では抗  $\alpha 4$ 、 $\alpha L$  抗体の投与により iLN における細胞数の減少が見られたが、55A2C 投与群ではその細胞数の減少が抑制された。一方、腸間膜LNや、MOG<sub>35-55</sub> 非免疫群の iLN では 55A2C 投与による影響は認められなかった。この結果は、 $\alpha 9$  が炎症の所属 LN に限局して細胞移出に関与していることを示唆している。これをさらに検証するため、LEC を単離し、 $\alpha 9$  リガンドである OPN や Tenascin-C で刺激し、細胞移出に重要と考えられる S1P の産生を薄層クロマトグラフィーによって解析した。その結果、 $\alpha 9$  リガンドで刺激することにより、培養上清中の S1P が増加した。さらに、LEC における S1P の特異的輸送体である Spns2 の遺伝子発現が  $\alpha 9$  リガンド刺激で亢進することが分かった。最後に、55A2C あるいは対照抗体を投与した SJL/J マウスに PLP<sub>139-151</sub>/CFA を免疫し、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導し、臨床スコアを比較した。その結果、55A2C 投与群において臨床スコアの抑制、発症の遅延、脊髄の炎症細胞浸潤及び脱髄斑の形成の抑制が認められた。一方、iLN 細胞を用いた抗原再刺激による細胞増殖及びサイトカイン産生には両群間で差は認められなかった。

[考察] OPN 変異体を用いた細胞接着試験の結果から、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$  の OPN に対する細胞接着は R<sup>168</sup> に違いがあることが分かった。R<sup>168</sup> はトロンビン切断部位であることから、この部位に対する接着性の差によって、 $\alpha 4$  は OPN との接着においてトロンビン切断を必要とせず、 $\alpha 9$  はトロンビン切断が必須であるという相違が現れることが示唆された。さらに  $\alpha 9$  は MMPN half に対しては接着性がみられなかった。炎症においては MMP やトロンビンなど種々のプロテアーゼが活性化することから、様々な型に切断された OPN が存在すると考えられ、 $\alpha 9$  はより限局した状況で機能が発揮されると考えられる。また、この仮説と一致して、55A2C 投与による細胞移出の抑制は、CFA 投与により炎症を誘導した所属 LN においてのみ観察された。さらに、55A2C 投与によって EAE 臨床スコアの抑制が認められた。リンパ節における T 細胞の抗原認識は炎症性疾患に共通した現象であることから、抗  $\alpha 9$  抗体の投与は EAE のみならず他の炎症性疾患においてもその治療効果が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	西村孝司
副査	教授	笠原正典
副査	教授	守内哲也
副査	教授	瀬谷司
副査	教授	上出利光

学位論文題名

## $\alpha 9$ インテグリンのリガンド認識機構と リンパ節外移出調節に関する研究

学位論文において、申請者は第1章では、オステオポンチン(OPN)とその受容体である $\alpha 9$ インテグリンの接着様式を解析し、第2章では、リンパ管内皮細胞上の $\alpha 9$ インテグリンの機能について詳細な報告を行った。

前半(第1章)では、インテグリンファミリーの中で共通の亜群に属する $\alpha 4$ 及び $\alpha 9$ インテグリンが、OPN内のSVVYGLRを共通の認識部位とするにも関わらず、何故、 $\alpha 4$ は全長型及びトロンビン切断型の両方に結合するのに対し、 $\alpha 9$ インテグリンは切断型にしか結合しないという結合様式の差異があるのかについて検討した。このために $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ インテグリンをそれぞれ遺伝子導入したCHO細胞を作製し、SVVYGLRのアミノ酸を1つずつAに置換したトロンビン切断型OPN N末断片タンパク質に対する接着試験、遊走試験を行った。この結果から、 $\alpha 4$ 及び $\alpha 9$ インテグリンがSVVYGLRを共通認識配列としているのは、共に接着にV<sup>164</sup>, Y<sup>165</sup>, L<sup>167</sup>を要求しているからであり、 $\alpha 4$ と $\alpha 9$ インテグリンの全長型及びトロンビン切断型OPNにおける接着性の差は、 $\alpha 9$ インテグリンのみがR<sup>168</sup>を必須としているからであることを見出した。また細胞遊走試験においてR<sup>168</sup>が細胞遊走の抑制においても機能していることを発見した。

後半(第2章)では、*in vitro*のみならず、*in vivo*における所属リンパ節内リンパ管内皮細胞上の $\alpha 9$ インテグリンの機能解析を行った。*in vitro*の検討からリンパ管内皮細胞の $\alpha 9$ インテグリンと、そのリガンドであるテナーシンC(TN-C)の結合がsphingosine 1 phosphate(S1P)トランスポーターのSpns2の発現上昇を惹起し、S1Pの分泌を促進することを発見した。さらに抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体により、所属リンパ節からのリンパ球移出が抑制されることを発見した。実際、*in vivo*において抗 $\alpha 9$ インテグリン抗体投与により多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)が抑制されることを示した。

このリンパ節に蓄積した CD4<sup>+</sup> 細胞を正常マウスに移入することで、重篤な EAE 症状を誘導することを示した。これは所属リンパ節においてエフェクター細胞が蓄積している可能性を示すものである。

前半第 1 章の OPN の受容体による認識に関する研究については、副査の笠原教授より OPN の立体構造と、トロンピン切断についての報告に関する質問があった。後半の第 2 章については、副査の瀬谷教授よりリンパ節における  $\alpha 9$  インテグリンと今回着目した TN-C 以外のリガンドについて、笠原教授より抗  $\alpha 9$  インテグリン抗体投与群からの CD4<sup>+</sup> 細胞の養子移入により EAE が増悪化する理由、また、正常と炎症状態における抗  $\alpha 9$  インテグリン抗体の効果について、また主査の西村教授より抗  $\alpha 9$  インテグリン抗体投与後の EAE 症状の経過と、リンパ節内に貯留した T 細胞亜群について質問を受けた。副査の守内教授からは、特に 1 章と 2 章の論文の展開について、表現方法を工夫するように求められた。申請者は、何れの質問に対しても、自己の実験データや過去の報告を引用しながら概ね適切な回答をなし得た。

この論文は  $\alpha 4$  及び  $\alpha 9$  インテグリンと OPN の結合様式の分子機序を *in vitro* の実験で明らかにした。 $\alpha 4$  インテグリンの機能に関しては多くの報告がなされており、抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体は抗体医薬としても自己免疫疾患等に使用されている。一方で、申請者は、本研究において、これまで不明であった  $\alpha 9$  インテグリンの機能を詳細に検討している。 $\alpha 9$  インテグリンとリガンドの結合が、*in vivo* でのリンパ節からの細胞移出に S1P トランスポーターの誘導を介して関与している事を初めて証明した。これらの成果は、抗  $\alpha 9$  インテグリン抗体が、他の難治性炎症性疾患の治療にも応用可能であることを示唆するものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。