

■2020 年度 研究ブランディング事業年次計画進捗報告書

講座・部門名：分子遺伝学部門

研究代表者：木梨達雄

2020 年度実施項目

1. 研究目標 (提出計画書に基づき記載)

- ・ **Rap1** 活性化および抑制分子によるリンパ球ローリングと停止接着の調節
- ・ 炎症モデル (肺、神経、皮膚、腸管等) を樹立して、**Rap1** シグナル変化による効果を明らかにする。
- ・ 一分子解析による **LFA-1/ICAM-1** 結合を調節する機構について明らかにする。
- ・ インテグリン阻害薬候補を選定する。

2. 2020 年度研究進捗・成果 (論文、学会発表を含む)

(1) **Rap1** シグナルおよび **tal1n1/kindlin3** によるリンパ球接着調節の解析

T 細胞のリンパ節ホーミングの 2 光子イメージングおよび接着カスケードを再現した *in vitro* flow 接着を比較した結果、**Rap1** および **Tln1** は **LFA1/ICAM1**, $\alpha4\beta7$ /**MAdCAM1** の接着に必須であるが、**Kin3** 欠損はリンパ節ホーミング障害が部分的であり、高密度 **ICAM1** への接着の障害は比較的軽度であった。さらに **LFA1/ICAM1** によるローリング接着では *outside-in* シグナルによる **Rap1** 活性化および **Tln1** が必要であるが、**Kin3** は必要でないことが初めて明らかになった。また、**Rap1** の恒常的活性化は非還流下では接着の増強効果があったが、生理的還流下における **LFA1/ICAM1** の接着を増加させ、 $\alpha4\beta7$ /**MAdCAM1** 接着はむしろ阻害したことから、ローリングおよび停止接着制御の相違がインテグリンによって異なることが明らかになった。

(2) ヒト化マウスによる T 細胞発生の解析

ヒト臍帯血由来 **CD133** 陽性細胞を移植したヒト化マウスでは免疫刺激によって **HLA-DR** 陽性ヒト由来樹状細胞の集積により正の選択がおこり、末梢の T 細胞数の増加および機能成熟が亢進した。さらに **HLA-DR** 依存的胸腺細胞の増殖や、アロ抗原依存的増殖が観察され、**HLA-DR** 抗体によって阻害された。**HLA-DR** 陽性細胞は **Sirpa1+HLA-DR+** 樹状細胞であることが判明した。胸腺組織内のヒト胸腺細胞とヒト樹状細胞が接着を誘導する **Rap1** 活性化を伴って接触する様子が観察された。これらのことよりヒト **MHC** を *transgene* として導入しなくても免疫的に成熟したヒト化マウスを作成できることが判明した (論文準備中)

・ 多発性硬化症のマウス実験モデル (**EAE**) を用いて **tal1n1** 欠損マウスを調べた結果、ほとんど発症しないことが分かった。また、 $\beta2$ インテグリン細胞内領域にある **tal1n1** 結合部位を変異したマウス (**$\beta2W747A$**) も **EAE** の低下が認められた。脊髄中の T 細胞を調べた結果、

Th17が低下していた。これらの結果からLFA1を含むインテグリン接着がEAE発症に重要な役割をはたしていることが明らかになった。

・一分子解析によるLFA-1/ICAM-1結合を調節する機構：talín1およびkindlin3とLFA-1を構成する β 2インテグリンの細胞内領域(β 2CT)との結合特性と動態を測定し、talín1の結合動態がLFA-1/ICAM-1の結合動態と一致すること、kindlin3はtalín1結合より短く、さらに膜近傍領域と相互作用すること、さらにフロー下ではtalín1, kindlin3の結合頻度が増加することを明らかにした(論文改訂中)。

・インテグリン阻害薬候補のスクリーニング： β 2CTとtalín1の結合部位の構造的解析データを用いてin silicoスクリーニングの系を確立した。約3万個以上の低分子化合物から候補分子を複数同定した。 β 2CTとtalín1, kindlin3との結合に関して蛋白質間相互作用を迅速に測定できるハイスループット α スクリーニングの系を樹立した(AMED採択)

(発表論文)

1. Kawai K., Tomonou M., Machida Y., Karuo Y., Tarui A. Sato K., Ikeda Y., Kinashi T., Omote M., Effect of Learning Dataset for Identification of Active Molecules: A Case Study of Integrin α IIb β 3 Inhibitors. *Mol Inform.* 2021 Mar 18. doi: 10.1002/minf.202060040. Online ahead of print.
2. Suzuki K., Iwai H., Utsunomiya K., Kono Y., Kobayashi Y., Bui DV., Sawada S., Yun Y., Mitani A., Kondo N., Katano T., Tanigawa N., Takama T., Kanda A., Combination therapy with lenvatinib and radiation significantly inhibits thyroid cancer growth by uptake of tyrosine kinase inhibitor, *Exp Cell Res.* 2021 Jan 1:398(1):112390. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112390. Epub 2020 Nov 21.

(総説)

1. 木梨 達雄【ジーンハンティングによる炎症・免疫研究の発展】IL-4およびIL-5の遺伝子クローニング 炎症と免疫 26(3)175-180 2020/04
2. Ueda Y, Kondo N, Kinashi T. MST1/2 Balance Immune Activation and Tolerance by Orchestrating Adhesion, Transcription, and Organelle Dynamics in Lymphocytes *Frontiers in immunology* 11:733 2020/05
3. 池田幸樹、木梨達雄 インテグリン創薬から考える一回膜貫通型タンパク質における創薬ストラテジー SAR News 39:17-23 2020/10

(学会発表)

1. K. Baba, Y. Nagashima, R. Takeuchi, M. Sakai, Y. Higashiguchi, H. Katsuno-Kambe, Y. Ueda, Y. Kamioka, T. Kinashi, N. Inagaki, Shootin1b as a clutch molecule for dendritic cell chemotaxis, CELL BIO virtual 2020(Web Meeting), December 14, 20
2. 近藤直幸、植田祥啓、木梨達雄 Rap1/Talín-1/Kindlin-3を内包する新規ポジティブフィードバック回路によるインテグリン活性化の離散的制御 第43回日本分子生物学会年会、2P-0195、オンライン学会

3. 2020年度ブランディング目標（提出計画書に基づき記載）

知財課等と連携して、研究成果に関する特許、企業とのコラボレーションを探る。

研究医養成コース学生指導を継続し、学会発表を指導する。さらに学術祭、オープンキャンパスを通して、研究成果について学生、教職員、保護者への周知を図る。

4. 2020年度ブランディング活動進捗・成果（メディア、その他）

学術祭にて研究ブランディング活動の紹介を他の参画講座教員とともに行った。また研究医養成コース学生の指導をおこなった。

インテグリン阻害薬開発について東京大学創薬機構、大阪歯科大学化学教室、愛媛大学プロテオ創薬科学部門、摂南大学薬学部と連携を構築（BINDS 課題番号:1616 採択、AMED 申請）

5. 自己評価（達成度、改善点など）：

研究に関してリンパ球ホーミング制御解析、リンパ球細胞極性の制御、インテグリン制御分子の一分子解析と構造解析に基づいた創薬系の樹立、それを検証するヒト化マウスの免疫増強のメカニズム、炎症モデル系の樹立などについて、ほぼ達成できている。