

シューティンを介した免疫細胞の走化性および免疫応答機構の解明

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 神経システム生物学研究室
馬場 健太郎

1. 諸言

免疫細胞の一種である樹状細胞は、皮膚や肺、腸などの様々な組織に分布し、体内に侵入した細菌やウイルスなどの病原体を取り込んだ後、リンパ管を通過してリンパ節へ移動し、T細胞へ病原体の抗原を提示する。これによりT細胞による病原体排除のための免疫応答が誘導される¹⁾。樹状細胞の移動の様式として走化性があり、その例として樹状細胞はリンパ節で分泌される拡散性の誘引物質 CCL19 の濃度の高い方向へと移動する（走化性移動）²⁾。しかしながら、樹状細胞の走化性移動のための推進力がどのように生み出されるか、その分子機構はよく解っていない。

免疫応答を誘導するためには樹状細胞の走化性が重要であり、樹状細胞の走化性の破綻は、病原体感染の抵抗力減少といった免疫応答の障害を引き起こすことが報告されている^{3,4)}。従って、樹状細胞の走化性の分子機構の解明は、われわれの体を病原体から守る免疫系の仕組みの理解や免疫系の障害による難病の病態の理解へと繋がる。

樹状細胞や神経細胞の軸索の先端領域では、細胞骨格分子のアクチン線維が重合・脱重合を繰り返しながら逆行性に動く。また、樹状細胞や軸索先端は細胞接着分子を介して細胞外基質と接着する。申請者の研究室において、shootin1（シューティン）がアクチン結合分子 cortactin を介してアクチン線維と相互作用することにより、shootin1 がアクチン線維と細胞接着分子 L1 の間を連結し、アクチン線維の動きを細胞外基質に伝えて軸索伸長のための推進力を生み出すことが示された^{5,6,7)}。そして、shootin1 が樹状細胞に発現することを見出した（未発表）。樹状細胞の先端領域で shootin1 が走化性移動のための推進力を生み出す可能性がある。そこでわれわれは、shootin1 に注目し、これまで不明であった樹状細胞の走化性の分子機構の解明を目指した。さらに、shootin1 の欠損が免疫応答の障害を引き起こす要因になるかを明らかにすることを目指した。

2. 方法

樹状細胞の破碎液を用いた免疫共沈降法では、われわれの研究室により作製された shootin1 抗体により破碎液中の shootin1 を沈降させ、shootin1 と相互作用する cortactin と細

細胞接着分子 L1 の検出を行った。樹状細胞は拡散性の誘引物質 CCL19 の濃度の高い方向へと移動する（走化性移動）。そこで、CCL19 の濃度勾配を形成するデバイスに樹状細胞を培養し、CCL19 に向かう樹状細胞の移動速度を測定した（図 1）。次に、樹状細胞の走化性移動の際に発生する推進力を測定するために、蛍光ナノビーズを包埋したゲル上で樹状細胞を培養し、細胞の先端領域直下のビーズの動きを解析した。ビーズの移動度とゲルの硬さから推進力を算出した^{7,8)}。また、樹状細胞はリンパ管を通りリンパ節へ移動する。そこで、リンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動を解析した。蛍光色素でラベルした樹状細胞の懸濁液を注射針でマウスの足の裏のリンパ管に注入した。24 時間後にリンパ節を採取し、リンパ節内の樹状細胞の数を測定した。

3. 結果

3.1 樹状細胞において shootin1 はアクチン線維結合分子 cortactin と細胞接着分子 L1 と相互作用する

Shootin1 がアクチン線維と細胞接着分子 L1 の間を連結し走化性移動のための推進力を生み出すならば、樹状細胞において shootin1 はアクチン線維結合分子 cortactin と細胞接着分子 L1 と相互作用する可能性がある。これを検証するために、樹状細胞の破碎液を用いて免疫共沈降法を行った。その結果、shootin1 と共に沈降した cortactin と L1 が検出された。この結果から、樹状細胞において shootin1 は cortactin および L1 と相互作用することが示された。shootin1 は cortactin を介してアクチン線維と相互作用することにより、shootin1 がアクチン線維と L1 の間を連結し、走化性移動のための推進力を生み出す可能性が示唆された。

3.2 Shootin1 は樹状細胞の走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与する

Shootin1 がアクチン線維と L1 の間を連結し走化性移動のための推進力を生み出す可能性が示唆された。そこで、shootin1 が走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与するか否かを検証する。具体的には、CCL19 の濃度勾配を形成するデバイスに、野生型樹状細胞と shootin1 遺伝子欠損樹状細胞（ノックアウト細胞）を培養し CCL19 の濃度の高い方に向かう樹状細胞の移動を観察し移動速度を測定した（図 1）。その結果、野生型細胞と比べてノックアウト細胞の移動速度が減少することが解った。また、走化性移動のための推進力を測定するため

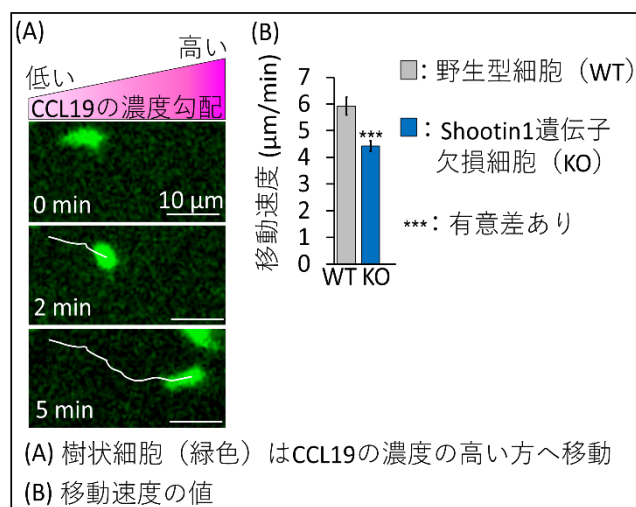


図 1. CCL19 の濃度勾配下における樹状細胞の移動速度の解析

に、蛍光ナノビーズを包埋したゲル上で野生型細胞とノックアウト細胞を培養し、移動のための推進力を算出した。その結果、野生型細胞と比べてノックアウト細胞の推進力が減少することが解った。以上の結果から、*shootin1* が走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与することが示された。

3.3 *Shootin1* は組織内でリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動に関与する

Shootin1 が走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与することが示された。しかしながら、*shootin1* が生体組織内の走化性移動に関与するかは解っていない。樹状細胞はリンパ管を通り、誘引物質 CCL19 が分泌されるリンパ節へと移動する。そこで、*shootin1* がリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動に関与するか否かを検証した。具体的には、野生型樹状細胞とノックアウト樹状細胞を培養し、それぞれの細胞を異なる蛍光色素でラベルした。その後、野生型細胞とノックアウト細胞の数を同じ割合で混和した懸濁液をマウス足裏のリンパ管へ注入した。24 時間後にリンパ節を回収し、リンパ節のマーカ分子であるラミニンの抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、リンパ節内の野生型細胞とノックアウト細胞の数の割合を算出した。その結果、野生型細胞と比べてノックアウト細胞の数の割合が減少した。すなわち、*shootin1* の欠損によりリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動が阻害されることが解った (図 2)。この結果から、*shootin1* がリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動に関与することが示された。また、免疫応答を誘導するためには樹状細胞の走化性移動が重要であり、樹状細胞の走化性の破綻は免疫応答の障害を引き起こすことが報告されている。従って、*shootin1* の欠損による走化性移動の阻害が免疫応答の障害を引き起こす要因となる可能性がある。

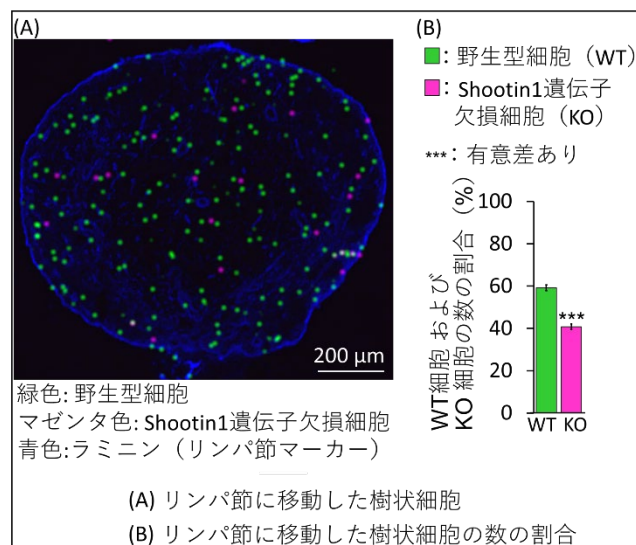


図 2. リンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動の解析

4. 考察

これまで樹状細胞が誘引物質 CCL19 の方向に向かって走化性移動することが知られていたが、どのようにして樹状細胞が走化性移動のための推進力を生み出すのか、その分子機構はよく解っていなかった。今回の一連の研究成果から、*shootin1* が L1 および *cortactin* と相互作用することや、*shootin1* が走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与すること、*shootin1* がリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動に関与することが明らかとなり、*shootin1* を介した走化性の分子機構の可能性が示された。すなわち、*shootin1* がアクチ

ン線維と細胞接着分子 L1 の間を連結し、アクチン線維の動きを細胞外基質に伝え走化性移動のための推進力を生み出す可能性が示唆された。さらに、リンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動の解析により、shootin1 の欠損による走化性移動の障害が免疫応答の障害を引き起こす要因となる可能性が示された。今後は、shootin1 ノックアウトマウスを免疫障害のモデルマウスとして用いて、免疫応答の障害の原因解明や治療法の開発研究に貢献する。

5.結語

本研究の成果は樹状細胞の走化性の分子機構や免疫応答の理解を深めるだけでなく、免疫応答の障害の原因解明や、その難病の診断法および治療法の確立にも貢献すると考えられる。これは、難病治療の水準を向上させるとともに大阪府民の疾病予防と健康づくりにも寄与することが期待できる。また、細胞の走化性は脳内の神経回路形成や上皮組織の修復、がん細胞の浸潤、個体発生など様々な生命機能に関わる。われわれの研究により shootin1・cortactin・L1 から成る分子集合体が細胞の走化性移動のための推進力を引き起こすという機構を発見した。この発見は樹状細胞の走化性を研究する分野だけでなく、細胞生物学、神経科学、発生生物学の分野において学術的な波及効果が期待できる。

6.文献

- 1) Worbs T, Hammerschmidt S, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17(1); 30-48
- 2) Tiberio L, Del Prete A, Schioppa T, Sozio F, Bosisio D, Sozzani S. Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cell. Mol. Immunol.* 2018; 15(4): 346-352
- 3) Ato M, Maroof A, Zubairi S, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye P. Loss of Dendritic Cell Migration and Impaired Resistance to *Leishmania donovani* Infection in Mice Deficient in CCL19 and CCL21. *J. Immunol.* 2006; 176(9): 5486-5493
- 4) Gutiérrez-Kobeh L, Rodríguez-González J, Argueta-Donohué J, Vázquez-López R, Wilkins-Rodríguez A. Role of Dendritic Cells in Parasitic Infections. *IntechOpen.* 2018; 79491: 47-78
- 5) Shimada T, Toriyama M, Uemura K, Kamiguchi H, Sugiura T, Watanabe N et al. Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J. Cell Biol.* 2008; 181(5): 817-829.
- 6) Kubo Y, Baba K, Toriyama M, Minegishi T, Sugiura T, Kozawa S et al. Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *J. Cell Biol.* 2015; 210(4): 663-676.
- 7) Baba K, Yoshida W, Toriyama M, Shimada T, Manning CF, Saito M et al. Gradient-reading and mechano-effector machinery for netrin-1-induced axon guidance. *eLife.* 2018; 7(e34593): 1-35

- 8) Toriyama M, Kozawa S, Sakumura Y, Inagaki N. Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through pak1-mediated shootin1 phosphorylation. *Current Biology*. 2013; 23(6): 529-534.

7.成果発表

雑誌論文

- Kastian R, Minegishi T, Baba K, Saneyoshi T, Katsuno-Kambe H, Saranpal S et al. Shootin1a-Mediated Actin-Adhesion Coupling Generates Force to Trigger Structural Plasticity of Dendritic Spines. *Cell Reports*. In Press. 2021.

学会発表

- Baba K, Nagashima Y, Sakai M, Takeuchi R, Higashiguchi Y, Katsuno-Kambe H et al. Shootin1b as a clutch molecule for dendritic cell chemotaxis. The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会) オンライン. 2020 年.
- 稲垣直之, 馬場健太郎, 前野貴則, 鳥山道則, 勝野弘子, 山田 達也ほか. モータータンパク質を介した神経細胞内輸送の極成化. 第 72 回日本細胞生物学会シンポジウム「細胞内物質輸送システム ; 温故知新」(招待講演) . オンライン. 2020 年.
- Kastian R, Minegishi T, Baba K, Saneyoshi T, Katsuno-kambe H, Saranpal S et al. Shootin1A-mediated-actin-adhesion coupling triggers formation and plasticity of dendritic spines. Philippine Society for Developmental Biology (PSDB) National Annual Convention (招待講演) (国際学会) オンライン. 2020
- Yamada S, Baba K, Inagaki N, Hosokawa Y. Adhesion Strength of Axonal Growth Cone and Its Contribution in Axon Outgrowth Evaluated by Femtosecond Laser. The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会) オンライン. 2020 年.
- Kastian R, Minegishi T, Baba K, Saneyoshi T, Katsuno-kambe H, Saranpal S, Hayashi Y, Inagaki N. Shootin1a-mediated Actin-adhesion Coupling Generates Force To Trigger Structural Plasticity of Dendritic Spines. The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会) オンライン. 2020 年.
- Kaewkascholkul N, Sasaki H, Baba K, Toriyama M, Inagaki N. Shootin1a dephosphorylation by protein phosphatase-1 for netrin-1-induced axon guidance. The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会) オンライン. 2020 年.