

獲得免疫システムを支える白血球動態の制御機構

福井 宣規

免疫応答は、リンパ器官での細胞間相互作用の結果もたらされる四次元的時空間事象であり、例えば、末梢組織に存在する樹状細胞は、抗原に暴露されると輸入リンパ管を介してリンパ節に移動し、血行性にリンパ節に侵入してくるT細胞に抗原を提示することで免疫応答を惹起する。抗原特異的T細胞の頻度が極めて低いことを考えると、免疫系はリンパ節という「場」を利用して、樹状細胞とT細胞の出会いを最大限に高めていると推察される。リンパ球や樹状細胞はケモカインの濃度勾配を感知して移動するが、このためにはRac, Rap1, Cdc42, Rhoといった低分子量Gタンパク質が協調して機能することが不可欠である。本稿では、これら低分子量Gタンパク質の制御分子やエフェクター分子を中心に、獲得免疫応答に重要なリンパ球および樹状細胞の動態制御機構に関して概説する。

1. はじめに

免疫応答とその記憶を担うリンパ球は、骨髄・胸腺で分化・成熟した後、血行性にリンパ節などの2次リンパ組織へ移動する。一方、末梢組織に存在する樹状細胞は、抗原に暴露されると輸入リンパ管を介してリンパ節に移動し、T細胞に抗原を提示することで免疫応答を惹起する。抗原特異的T細胞の頻度が極めて低いことを考えると、免疫系はリンパ節という「場」を利用して、樹状細胞とT細胞の出会いを最大限に高めていると推察される。細胞が動くには細胞骨格の再構築が必要で、それはRac, Rap1, Cdc42, Rhoといった低分子量Gタンパク質の活性化を必要とする。本稿では、これら低分子量Gタンパク質の制御分子やエフェクター分子を中心に、獲得免疫応答に重要なリンパ球および樹状細胞の動態制御機構に関して、最近の知見も含めて概説する。

2. 免疫細胞の遊走を制御するケモカインとその受容体

リンパ球や樹状細胞の遊走は、ケモカインと総称される分子によって惹起される。特に、リンパ節で発現しているCXCL13, CCL19およびCCL21は獲得免疫系において中心的な役割を演じるケモカインであり、CXCL13はCXCR5, CCL19とCCL21はCCR7といった受容体に作用することで、その機能を発揮する^{1,2)}。これらのケモカインはリンパ球において以下の二つの重要な機能を担っていることが知られている。

第1はリンパ節への侵入過程における機能である。リンパ節の傍皮質には高内皮細静脈 *high endothelial venule* (HEV) と呼ばれる特殊な細静脈が分布しており、その内皮細胞で産生されたCCL21が、リンパ球表面に発現しているCCR7と結合すると、インテグリンが活性化され、接着応答が誘導される。その結果リンパ球は形を変え、HEVを構成する細胞間隙を通して、リンパ節内に侵入することができる。

第2の機能は、リンパ節内で特異的な微小環境を構築することである。リンパ節実質において、T細胞とB細胞の局在は傍皮質 (T細胞領域) と皮質 (B細胞領域) に明確に分離されており、T細胞領域ではストローマ細胞がCCL19, CCL21を分泌することで、CCR7を強く発現するT

九州大学生体防御医学研究所免疫遺伝学分野 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

The mechanism controlling leukocyte trafficking for acquired immune responses

Yoshinori Fukui (Division of Immunogenetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

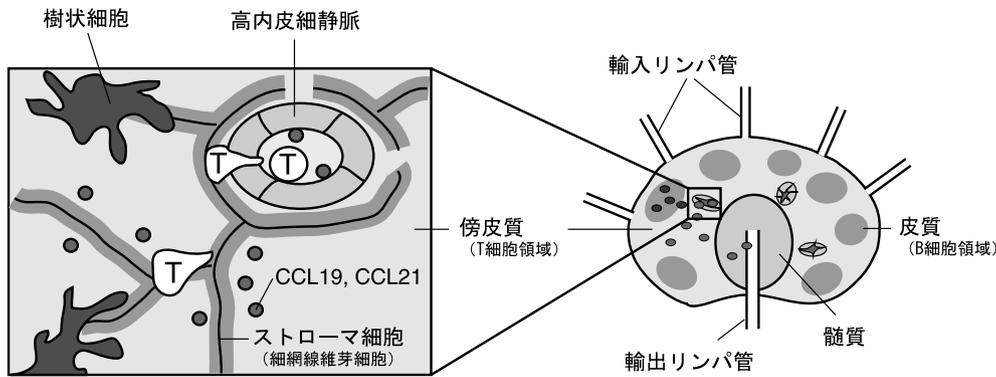


図1 リンパ節の構造とそこにおけるリンパ球および樹状細胞の動きの概略を示す。

細胞の集積を促す¹⁾。これに対して、B細胞領域ではCXCL13が発現しており、CXCR5を発現するB細胞を引き寄せ²⁾。最近の2光子レーザー生体顕微鏡の技術により、T細胞やB細胞が、リンパ節内の3次元微小環境を構築するストローマ細胞（例えば、B細胞濾胞の濾胞樹状細胞やT細胞領域の細網線維芽細胞）により形作られたネットワークに沿って移動することが明らかとなっている（図1）。

一方、皮膚といった末梢組織に存在する樹状細胞は、抗原に暴露されると、それを貪食し、リンパ管を經由して、所属リンパ節へと移動する。その際樹状細胞は、形態を変化させると共に、やはりCCR7の発現を上昇させることで、遊走応答を開始する¹⁾。CCR7のリガンドであるCCL19とCCL21は、リンパ管内皮やリンパ節のT細胞領域に発現しており、樹状細胞は、これらケモカインに導かれるように、リンパ管内皮を通過した後、リンパ節のT細胞領域に移動し、T細胞と接触することで、免疫応答を惹起する。リンパ球が自身の認識する抗原と遭遇しなかった場合には、平均8~12時間リンパ組織にとどまった後、輸出リンパ管を通過して出て行き、最終的に血液循環系へと排出され、再び新たなホーミングサイクルを繰り返すことになる。

3. ケモカイン受容体の下流で機能する低分子量Gタンパク質

ケモカイン受容体はGタンパク質共役型受容体(GPCR)であり、ケモカインが受容体に結合すると、3量体Gタンパク質はG α とG $\beta\gamma$ のサブユニットに解離し、その下流でさまざまなシグナル伝達分子が活性化される。その一つが、Rac, Rap1, Cdc42, Rho Aといった低分子量Gタンパク質群である。低分子量Gタンパク質は細胞内分子スイッチとして機能し、GDPを結合した不活性型からGTPを結合した活性型へと変換されると、種々のエフェクター分子と会合することで、細胞骨格の再構築を始め、様々な細胞高次機能を制御する。この不活性型から活性型への変換を担う分子をグアニンヌクレオチド交換因子 guanine nucleotide exchange factor (GEF)、逆に活性型から不活性

型への変換を担う分子をGTPase活性化因子 GTPase activating protein (GAP)と呼ぶ。遊走している細胞において、RacやCdc42は先端端 leading edge で選択的に活性化されるが、これは少なくとも一部にはGEFの局在によって規定されていると考えられる。従来GEFはDblホモロジー(DH)ドメインとPHドメインをタンデムにコードする分子として特徴づけられてきた。しかしながら、近年このような構造をとらない、新しいタイプのGEFが、線虫(CED-5)、哺乳類(DOCK180)、ショウジョバエ(Myoblast City)において同定され、これら分子は現在その頭文字をとってCDMファミリー分子と呼ばれている。哺乳類には全部で11種類のCDMファミリー分子が発現しており(図2)、RacやCdc42のGEFとして機能することが実証されている³⁾。

4. 運動性を規定するRacシグナル経路

RacはRac1, Rac2, Rac3という三つのアイソフォームからなり、Rac1がユビキタスに発現し、Rac3が脳神経系に強く発現するのに対して、Rac2の発現は造血細胞に限局している。Racが活性化すると葉状仮足(ラメリポディア)と呼ばれるアクチンに富んだ突起が形成され、これは細胞が動くための駆動力となる。これまでに、Rac1とRac2のダブルノックアウト(KO)マウスを用いた解析から、リンパ球や樹状細胞の遊走にRacが重要な役割を演じる事が実証されており^{4,5)}、その上流および下流で機能する分子の探索が進められてきた。

筆者らは、マウス胸腺cDNAライブラリーよりCDMファミリーに属する遺伝子としてDock2を単離した⁶⁾。Dock180が種々の組織で発現するのに対して、Dock2の発現はリンパ節、胸腺、脾臓に限局していた。このことから、DOCK2は免疫系特異的に発現するCDMファミリー分子であると考えられた。DOCK2はDHドメインやPHドメインを有していないが、DHR-1と呼ばれる領域を介してホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP₃)と会合し、DHR-2とよばれる領域を介してRacに対するGTP-

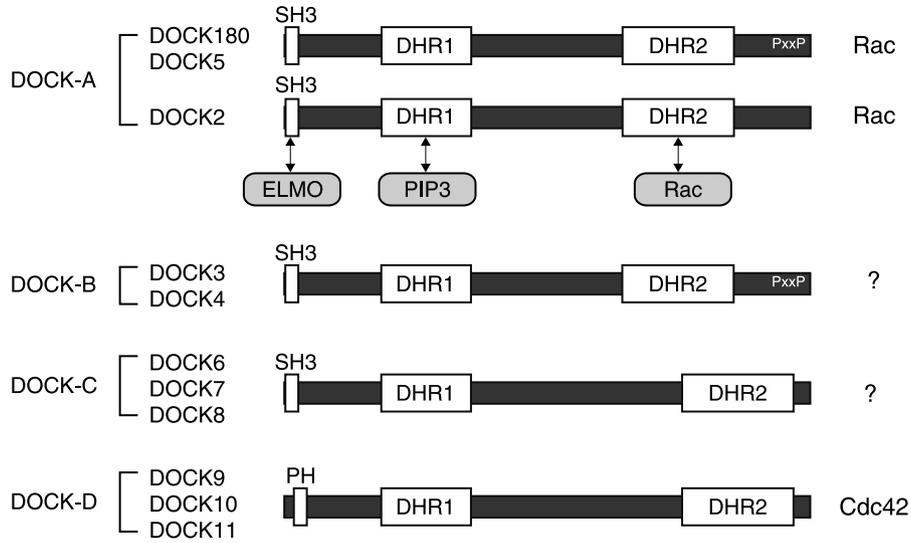


図2 CDMファミリー分子の構造とそれが制御する低分子量Gタンパク質を模式的に示す。

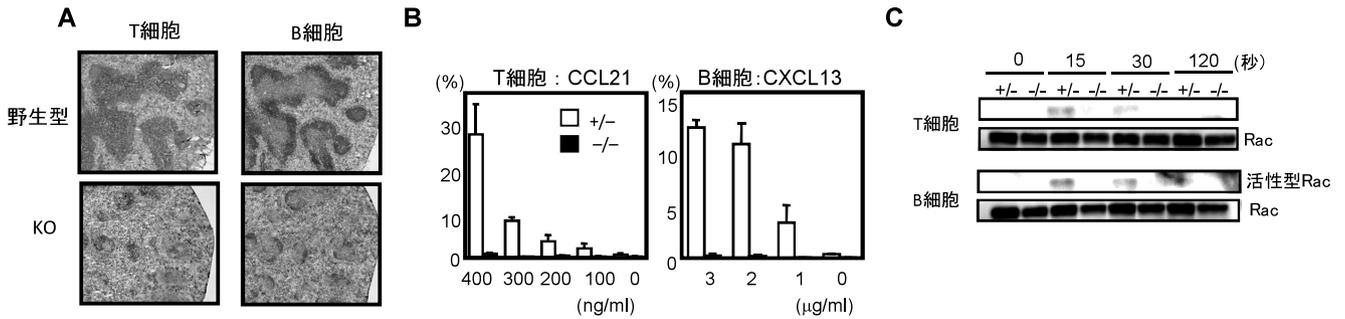


図3 DOCK2はリンパ球の遊走に不可欠な Rac GEFである。

A DOCK2 KO マウスの脾臓における構築異常。

B ケモカインによる T 細胞および B 細胞の遊走活性を、野生型 (+/-) および DOCK2 KO マウス (-/-) 間で比較した結果を示す。

C ケモカイン刺激による Rac 活性化を、野生型 (+/-) および DOCK2 ノックアウトマウス (-/-) 間で比較した結果を示す。

GDP 交換反応を触媒する^{3,7)}(図 2)。また、DOCK2 は SH3 ドメインを含む N 末端領域を介して ELMO という分子と会合しており、この会合は DOCK2 の機能発現に重要である⁸⁾。

DOCK2 KO マウスはメンデルの法則に従って出生し、外見上の異常は認められなかったが、脾臓、リンパ節、パイエル板といった 2 次リンパ組織において T 細胞/B 細胞領域の萎縮やリンパ球の迷入といった異常が観察された^{6,9)}(図 3A)。野生型マウスの T 細胞や B 細胞を CCL21, CXCL13 で刺激すると用量依存性に活発に遊走する。しかしながら、KO マウス由来のリンパ球はいずれのケモカインに対してもほとんど遊走応答を示さなかった⁶⁾(図 3B)。野生型マウスのリンパ球をケモカインで刺激すると、15 秒をピークとして Rac の活性化およびアクチンの重合が観察されたが、KO マウスのリンパ球においてこれらの反応がほぼ完全に消失していた⁶⁾(図 3C)。さらに、多光子共

焦点レーザー顕微鏡を用いて生きたマウスのリンパ節内でのリンパ球の動きを観察してみると、DOCK2 の発現を欠く T 細胞および B 細胞の移動面積は、野生型マウスのそれと比較して、1/14~1/15 に低下していた¹⁰⁾。このことから、DOCK2 はリンパ球が動くために不可欠な Rac GEF であることが明らかとなった。

T 細胞は血行性にリンパ節にホーミングし、そこで抗原を探索した後、リンパ管を通してリンパ節から移出する。この移出のプロセスはスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) というリン脂質によって制御されており¹¹⁾、この受容体もやはり GPCR である。DOCK2 欠損 T 細胞では S1P に対する反応性が著しく低下しており、その結果リンパ節からの移出も障害されていた¹⁰⁾。S1P は胸腺細胞の胸腺からの移出にも重要な役割を演じている¹¹⁾。DOCK2 KO マウスでは 2 次リンパ組織へのリンパ球ホーミングが障害されているにも関わらず、末梢血中の T 細胞数が著減するが⁶⁾、これは

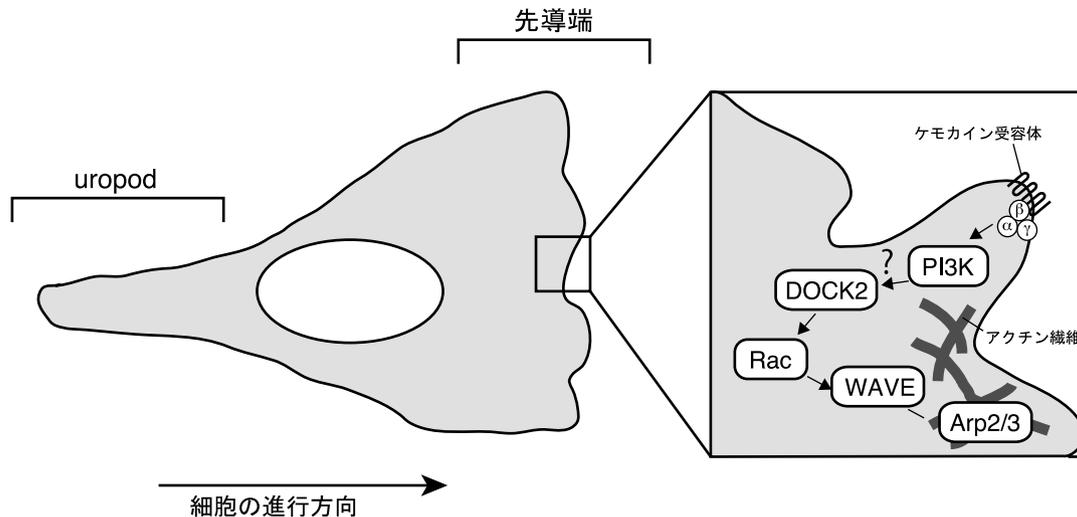


図4 リンパ球の運動性を規定する Rac シグナル伝達経路.

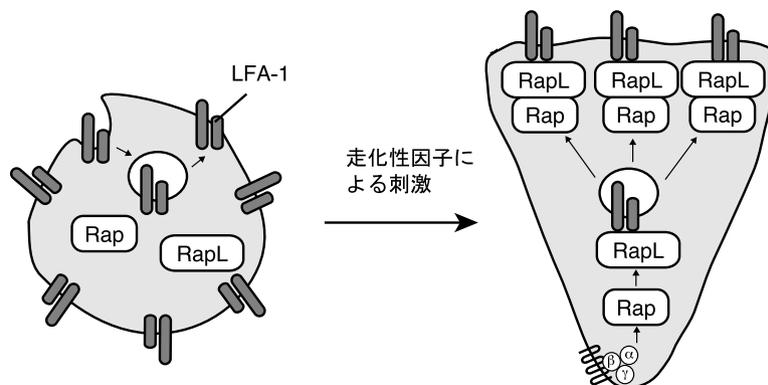


図5 リンパ球の接着応答を制御する Rap1 シグナル伝達経路.

恐らく S1P による成熟 T 細胞の胸腺からの移出障害に起因すると考えられる。

このように、DOCK2 はリンパ節への移入やリンパ節内での運動、リンパ節や胸腺からの移出といったリンパ球トラフィッキングのすべてのプロセスを制御する Rac 活性化分子である (図 4)。一方、DOCK2 の欠損は樹状細胞の遊走には全く影響を与えなかった¹²⁾。樹状細胞では、DOCK2 に加えて、DOCK180 も発現していることから、DOCK2 欠損の影響は、DOCK180 を含む他の Rac GEF によって機能的に代償されている可能性が考えられる。

5. 接着応答を制御する Rap1 シグナル経路

前述したように、リンパ球をケモカインで刺激するとインテグリンの活性化を介して血管内皮細胞への接着性が亢進する。この過程で重要な役割を演じているのが Rap1 である¹³⁾。ケモカイン刺激により活性化した Rap1 は、RapL と呼ばれるエフェクター分子と会合し、RapL はさらにリンパ球の主要なインテグリンである LFA-1 の αL 鎖に結合する¹⁴⁾。その結果 LFA-1 は先導端にリクルートされ、親和

性の亢進と細胞表面での凝集 clustering を介して、接着応答を惹起すると考えられている。RapL を欠損したリンパ球では、LFA-1 を介した ICAM-1 に対する接着性が顕著に低下しており、その結果末梢リンパ節へのホーミング活性も野生型リンパ球の 1/4~1/6 に低下する¹⁴⁾。RapL を欠損した樹状細胞でも末梢リンパ節へのホーミングが障害されていることが報告されており¹⁴⁾、樹状細胞においても同様のメカニズムが作動していると推察される。

このように、Rac が運動性そのものを制御するシグナル系であるのに対して、Rap1 シグナル伝達系は接着応答を介して、リンパ球や樹状細胞の末梢リンパ節へのホーミングを制御している (図 5)。

6. 間質組織での運動に重要な Cdc42 シグナル経路

樹状細胞は末梢組織に存在しており、リンパ管を通過してリンパ節に到達する前に、真皮といった繊維成分に富んだ細胞外マトリックス extracellular matrix (ECM) の中を通り抜ける必要がある。このため、樹状細胞は絶えず ECM の構造に合わせて形を変え、より抵抗の少ない方向へ進ん

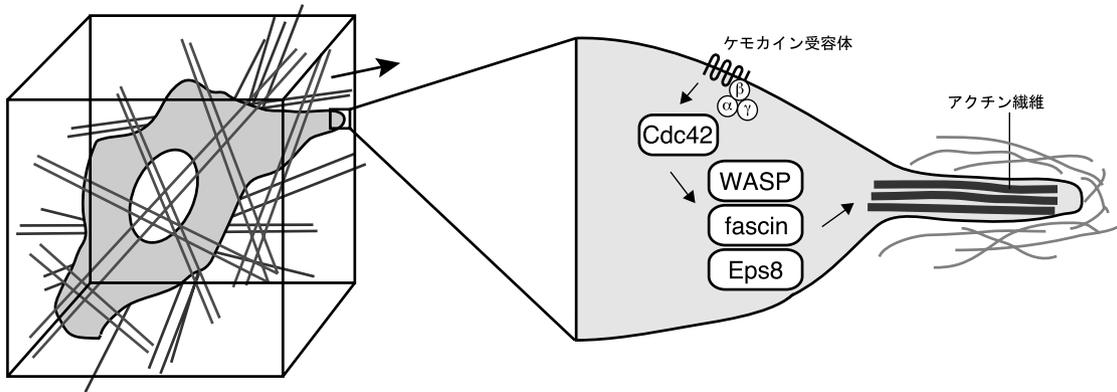


図6 樹状細胞の間質組織での遊走を制御する Cdc42 シグナル伝達経路.

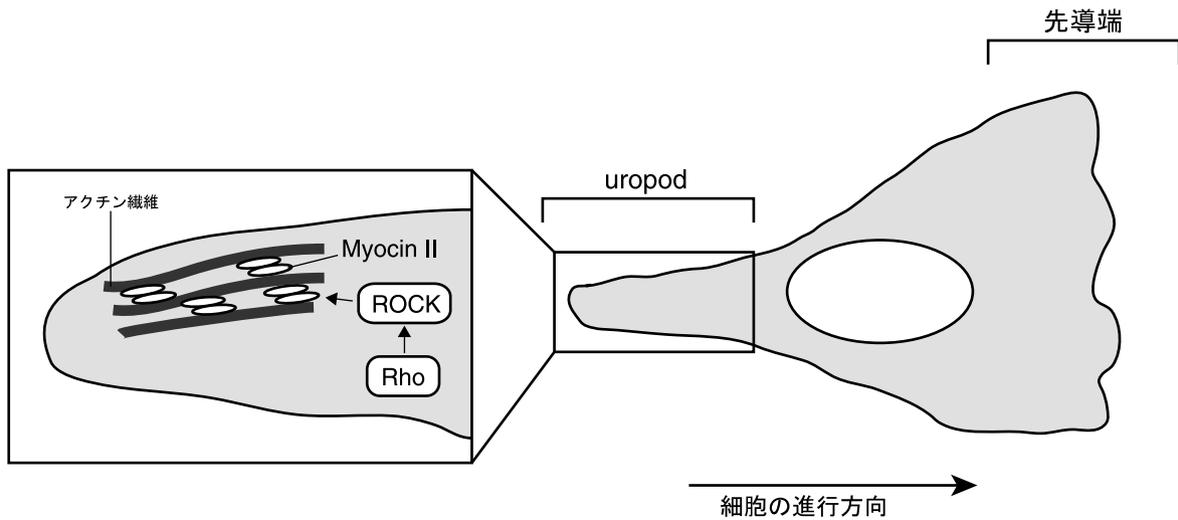


図7 接着の解除と牽引を制御する Rho シグナル伝達経路.

でいくと考えられるが、このようなアメーバ様運動 amoeboid migration において、接着応答が必要かどうかは不明であった。この疑問に答えるべく Sixt らのグループは、樹状細胞に発現するすべてのインテグリンを欠損させたマウスを作製し、その白血球動態を解析した¹⁵⁾。その結果、インテグリンを介した接着応答は、樹状細胞の2次元空間での運動には必須であったが、真皮組織やコラーゲンゲルといった3次元環境下での遊走には必要ではなかった¹⁵⁾。同様の結果は、インテグリンの細胞質領域に会合することでその活性化を担うタリンを欠損させた樹状細胞でも得られている¹⁵⁾。このことから、樹状細胞は2次元環境と3次元環境では、異なったマシーナリーを用いて運動していることが示唆された。

Cdc42 は酵母から哺乳類に至るまで、細胞極性を制御するマスター分子として機能している。最近、この Cdc42 が樹状細胞の遊走に重要な役割を演じることが報告された¹⁶⁾。すなわち、Cdc42 を欠損した樹状細胞は2次元環境下ではほぼ正常に動くことができるものの、3次元環境下での遊走応答はひどく障害されていた。Cdc42 の下流で機

能するエフェクター分子として、Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) や fascin, Eps8 が知られているが、これらの KO マウス由来の樹状細胞の遊走応も、やはり障害されている^{17~19)}。特に Eps8 は IRSp53 の存在下で活性型 Cdc42 と複合体形成する分子であり²⁰⁾、Eps8 欠損樹状細胞では3次元環境下での形態適応が障害されていることが報告されている¹⁹⁾。

このように、Cdc42 は間質組織における遊走応答に重要な低分子量 G タンパク質であり (図6)、免疫細胞がどのようにして2次元環境と3次元環境を識別しているかという点も含め、その制御機構の解明は今後の大きな課題である。

7. 接着の解除と牽引を制御する Rho シグナル経路

免疫細胞をケモカインで刺激すると、他の低分子量 G タンパク質と同様に RhoA の活性化も検出できる。しかしながら、Rac や Cdc42 が先端端で活性化され、その形成を制御しているのに対し、RhoA の活性化はむしろ細胞後端の uropod の形成に重要であると考えられている (図7)。

RhoA の主なエフェクター分子として、以下の二つが知られている。第1は mDia であり、mDia1 の欠損マウスでは T 細胞遊走が部分的に障害される²¹⁾。第2のエフェクター分子は Rho 結合キナーゼ (ROCK) であり、ミオシン脱リン酸化酵素の不活性化およびミオシン軽鎖のリン酸化を介して、アクチン系系の収縮を惹起することが知られている。これまでに、ROCK やミオシン II の阻害剤を用いた実験やミオシン IIa の KO マウスを用いた解析から、Rho-ROCK-ミオシン経路が、リンパ球や樹状細胞において、接着応答の解除やポアサイズが小さい場合の3次元細胞運動に重要な役割を演じることが報告されている^{15, 22, 23)}。

8. おわりに

遺伝子改変マウスを用いた研究から、免疫細胞の動態制御に関わるケモカインとその受容体、下流で活性化する低分子量 G タンパク質の機能が明らかとなってきた。しかしながら、それぞれのシグナル伝達経路がどのように関連し合い、統合されているのか、十分に解明されたとは言い難い。免疫細胞において、これらシグナル分子の挙動を時間軸や空間軸も含め、一つのネットワークとして理解し、それがリンパ組織という「場」においてどのように変動するかを検証することが、今後の重要な課題となろう。

文 献

- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., & Lipp, M. (1999) *Cell*, **99**, 23–33.
- Förster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., & Lipp, M. (1996) *Cell*, **87**, 1037–1047.
- Côté, J.-F. & Vuori, K. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 4901–4913.
- Benvenuti, F., Hugues, S., Walmsley, M., Ruf, S., Fetler, L., Popoff, M., Tybulewicz, V.L.J., & Amigorena, S. (2004) *Science*, **305**, 1150–1153.
- Faroudi, M., Hons, M., Zachacz, A., Dumont, C., Lyck, R., Stein, J.V., & Tybulewicz, V.L. (2010) *Blood*, **116**, 5536–5547.
- Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., & Sasazuki, T. (2001) *Nature*, **412**, 826–831.
- Kunisaki, Y., Nishikimi, A., Tanaka, Y., Takii, R., Noda, M., Inayoshi, A., Watanabe, K., Sanematsu, F., Sasazuki, T., Sasaki, T., & Fukui, Y. (2006) *J. Cell Biol.*, **174**, 647–652.
- Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Stein, J.V., Sasazuki, T., & Fukui, Y. (2003) *Blood*, **102**, 2948–2950.
- Nombela-Arrieta, C., Lacalle, R.A., Montoya, M.C., Kunisaki, Y., Megias, D., Marqués, M., Carrera, A.C., Mañes, S., Fukui, Y., Martínez-A., C., & Stein, J.V. (2004) *Immunity*, **21**, 429–441.
- Nombela-Arrieta, C., Mempel, T.R., Soriano, S.F., Mazo, I., Wymann, M.P., Hirsch, E., Martínez-A., C., Fukui, Y., von Andrian, U.H., & Stein, J.V. (2007) *J. Exp. Med.*, **204**, 497–510.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., & Cyster, J.G. (2004) *Nature*, **427**, 355–340.
- Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Inayoshi, A., Enjoji, M., Takayanagi, R., Sasazuki, T., & Fukui, Y. (2008) *Blood*, **111**, 2973–2976.
- Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., & Kinashi, T. (2003) *J. Cell Biol.*, **161**, 417–427.
- Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M., & Kinashi, T. (2003) *Nat. Immunol.*, **4**, 741–748.
- Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Förster, R., Critchley, D.R., Fässler, R., & Sixt, M. (2008) *Nature*, **453**, 51–55.
- Lämmermann, T., Renkawitz, J., Wu, X., Hirsch, K., Brakebusch, C., & Sixt, M. (2009) *Blood*, **113**, 5703–5710.
- de Noronha, S., Hardy, S., Sinclair, J., Blundell, M.P., Strid, J., Schulz, O., Zwirner, J., Jones, G.E., Katz, D.R., Kinnon, C., & Thrasher, A.J. (2005) *Blood*, **105**, 1590–1597.
- Yamakita, Y., Matsumura, F., Lipscomb, M.W., Chou, P.-C., Werlen, G., Burkhardt, J.K., & Yamashiro, S. (2011) *J. Immunol.*, **186**, 2850–2859.
- Frittoli, E., Matteoli, G., Palamidessi, A., Mazzini, E., Maddaluno, L., Disanza, A., Yang, C., Svitkina, T., Rescigno, M., & Scita, G. (2011) *Immunity*, **35**, 388–399.
- Disanza, A., Mantoani, S., Hertzog, M., Gerboth, S., Frittoli, E., Steffen, A., Berhoerster, K., Kreienkamp, H.J., Milanese, F., Di Fiore, P.P., Ciliberto, A., Stradal, T.E., & Scita, G. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1337–1347.
- Sakata, D., Taniguchi, H., Yasuda, S., Adachi-Morishima, A., Hamazaki, Y., Nakayama, R., Miki, T., Minato, N., & Narumiya, S. (2007) *J. Exp. Med.*, **203**, 2031–2038.
- Jacobelli, J., Friedman, R.S., Conti, M.A., Lennon-Dumenil, A.-M., Piel, M., Sorensen, C.M., Adelstein, R.S., & Krummel, M.F. (2010) *Nat. Immunol.*, **11**, 953–961.
- Soriano, S.F., Hons, M., Schumann, K., Kumar, V., Dennier, T. J., Lyck, R., Sixt, M., & Stein, J.V. (2011) *J. Immunol.*, **187**, 2356–2364.