HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	α9インテグリンとXCL1/Lymphotactinの相互作用同定と自己免疫疾患モデルにおける機能解析
Author(s)	松本, 尚樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12890号
Issue Date	2017-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12890
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67375
Type	doctoral thesis
File Information	Naoki_Matsumoto.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

α9 インテグリンと XCL1/Lymphotactin の相互作用同定と自己免疫疾患モデルにおける機能解析

北海道大学大学院生命科学院　生命科学専攻
生命医薬科学コース　衛生化学研究室

松本　尚樹

2017 年 9 月

目次

略語表 - 2 -

序章 - 4 -

本章 - 6 -

1-1 実験方法 - 6 -

1-2 実験結果 - 18 -

1-2-1 新規α9 インテグリンリガンドの同定 - 18 -

1-2-2 ヒト及びマウス XCL1 タンパク質の精製 - 18 -

1-2-3 XCL1 とα9 インテグリン及び SFα9 の結合 - 19 -

1-2-4 XCL1 によるα9 インテグリン発現細胞の遊走 - 20 -

1-2-5 XCL1 誘導性遊走の方向性検証 - 22 -

1-2-6 XCL1 による内在性α9 インテグリン発現細胞の遊走試験 - 24 -

1-2-7 XCL1 誘導性細胞遊走における XCR1 関与の検討 - 25 -

1-2-8 関節炎モデルマウス (CAIA) における XCL1 の機能解析 - 25 -

1-2-9 α9 インテグリン中和抗体による CAIA 抑制効果 - 26 -

1-2-10 抗マウス XCL1 モノクローナル抗体の作製 - 27 -

1-2-11 XCL1 抗体の細胞遊走能への影響 - 29 -

1-2-12 XCL1 中和抗体による CAIA 抑制効果 - 30 -

1-2-13 XCL1 中和抗体による EAE 抑制効果 - 31 -

1-2-14 *ex vivo* 解析による生体内での XCL1-α9 インテグリン相互作用の検証 - 32 -

1-3 考察 - 33 -

終章 - 37 -

参考文献 - 38 -

謝辞 - 43 -

略語表

2-Me	2-Mercaptoethanol
APC	Allophycocyanin
Ab	Antibody
BSA	Bovine serum albumin
CAIA	Collagen antibody-induced arthritis
CBB	Coomassie brilliant blue
CD	Cluster of differentiation
CFA	Complete Freund's adjuvant
Ct	Cycles to threshold
DMEM	Dulbecco's modified Eagle’s medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FLS	Fibroblast-like synoviocytes
FN-EIIIA	Fibronectin EIIIA
G3PDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H&E	Hematoxylin & Eosin
HAT	Hypoxanthine aminopterin thymidine
HEK293	Human embryonic kidney cell-line
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish peroxidase
IB	Immunoblot
IFA	Freund's incomplete adjuvant
IgG	Immunoglobulin G
Kir	Inward-rectifier potassium ion channel
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LPS	Lipopolysaccharide
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
OD	Optical density

OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylene glycol
PVDF	Polyvinylidene difluoride
Plat-GP	Platinum-GP
Ptx	Pertussis toxin
RD	Rhabdomyosarcoma
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SD	Sprague-Dawley
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SFα9	Short form of α9 integrin
SPF	Specific-pathogen-free
TBS	Tris-buffered saline
TGF	Transforming Growth Factor
TN-C	Tenascin-C
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WCL	Whole cell lysate
XCL1	X-C motif chemokine ligand 1
XCR1	X-C motif chemokine receptor 1
cDNA	Complementary DNA
mAb	Monoclonal antibody
pp-vWF	Propolypeptide of von Willebrand factor
shRNA	Short hairpin RNA

序章

生体が恒常性を維持するため、細胞は常に様々な情報を細胞内外に伝達している。病原体の体内への侵入や細胞のがん化などは、この情報伝達機構に障害が生じ、その結果恒常性が破綻する。免疫系は非自己である病原体やがん化細胞などを認識し、適切に排除することで生命を維持するが、免疫系もまた多様な免疫シグナルにより恒常性が保たれており、その破綻は自己免疫疾患やがんなどの疾患を引き起こす。自己免疫疾患は、免疫系が自己の組織や細胞を攻撃し、全身および局所で過度の炎症反応を誘導することにより発症する疾患である。年々患者数が増加しているが、近年、抗体医薬をはじめとした生物学的製剤の発展により有効な治療法が開発されている。しかしながら、疾患発症のメカニズムが不明な疾患や、既存薬による副作用が問題であり、さらには、既存薬の治療効果が全ての患者において一様ではないことなどの理由により、未だに有効な治療法のない患者が多く存在する。これらのことから、自己免疫疾患の発症や増悪化における新たな分子作用機構を解明することは重要な課題である。

免疫系細胞をはじめとする細胞間情報伝達には、接着分子やサイトカイン等の液性因子が重要な役割を担っている。接着分子として細胞膜上に発現するインテグリン受容体は種々のα鎖とβ鎖で構成されるヘテロ 2 量体で、現在までに 18 個のα鎖と 8 個のβ鎖が報告されている (1) 。これらが 24 種のインテグリン受容体を形成し、それらのインテグリンは結合する細胞外基質の違いにより複数の分子群に分類される (図 1A, B)。インテグリンはフィブロネクチンやコラーゲン等の細胞外マトリックスや、サイトカイン/ケモカイン等と直接的または間接的に相互作用することにより、免疫細胞を含め様々な細胞の接着 (2, 3) 、遊走 (4) 、分化 (5) 、増殖 (6) 、細胞死 (7, 8) などの恒常性維持に関わる重要な分子である。その一方で、欠損マウスや中和抗体を用いた解析から、自己免疫疾患 (9, 10) やがん転移 (4, 11, 12) など、様々な疾患に関与することが報告されており、疾患標的分子として注目されている分子群である。

インテグリン分子群のなかで、ヒトα9 インテグリンは 1993 年に肺と小腸の cDNA ライブラリーからクローニングされた (13) 。α9β1 インテグリンは、気管上皮細胞やリンパ管内皮細胞、他にも様々な組織や正常細胞で発現している一方、癌細胞でもその発現が確認されている (13) 。また、α9 インテグリン欠損マウスは生後 1~2 週間で乳糜胸及びリンパ管形成不全により死亡してしまうことから (14) 、α9 インテグリンは発生過程において必要不可欠な分子であることが示唆される。α9 インテグリンに対する中和抗体が開発され、前臨床試験ではα9 インテグリンが癌細胞の増殖や転移 (15) 、関節リウマチ (9, 16) 、そのマウスモデルである抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) (9) 、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) (10) 、等の自己免疫疾患にも関与することが報告されている。また、CAIA や EAE で抗α9 インテグリン抗体投与での疾患抑制効果が示されているが (9, 10) 、既知のα9 インテグリンリガンドであるオステオポンチンやテネイシン C を治療標的とした

効果は弱く (17)、関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患では新たなα9 インテグリンリガンドの関与が示唆される。

インテグリンには多くのスプライシングバリアントが存在し、様々なプロセスに関与することが報告されている (18-20)。実際、ヒトではα9 インテグリンのスプライシングバリアントである SFα9 が同定されている。SFα9 はα9 インテグリンのβプロペラ領域と Thigh 領域を有し、Thigh 領域の C 末部分にユニークな 19 アミノ酸配列を持つタンパク質である (図 1C)。SFα9 はα9 インテグリンの膜貫通領域を有していないにもかかわらず、細胞膜上に発現している。SFα9 はα9 インテグリンとは異なり、β1 インテグリンとは相互作用せず、既存のα9 インテグリンリガンドとも結合しない (21)。SFα9 とα9 インテグリンを共発現させた細胞では、細胞接着能を亢進させることから、新規内在性制御因子であることを報告している。

本研究では、SFα9 のリガンドが未知であることに着目し、SFα9 の細胞外結合因子を探索することで、SFα9 特異的、もしくは SFα9 とα9 インテグリンに共通する新規リガンドが同定できると考えた。そのリガンドがα9 インテグリンを介した細胞の機能や自己免疫疾患に関与すると想定して解析を行った。

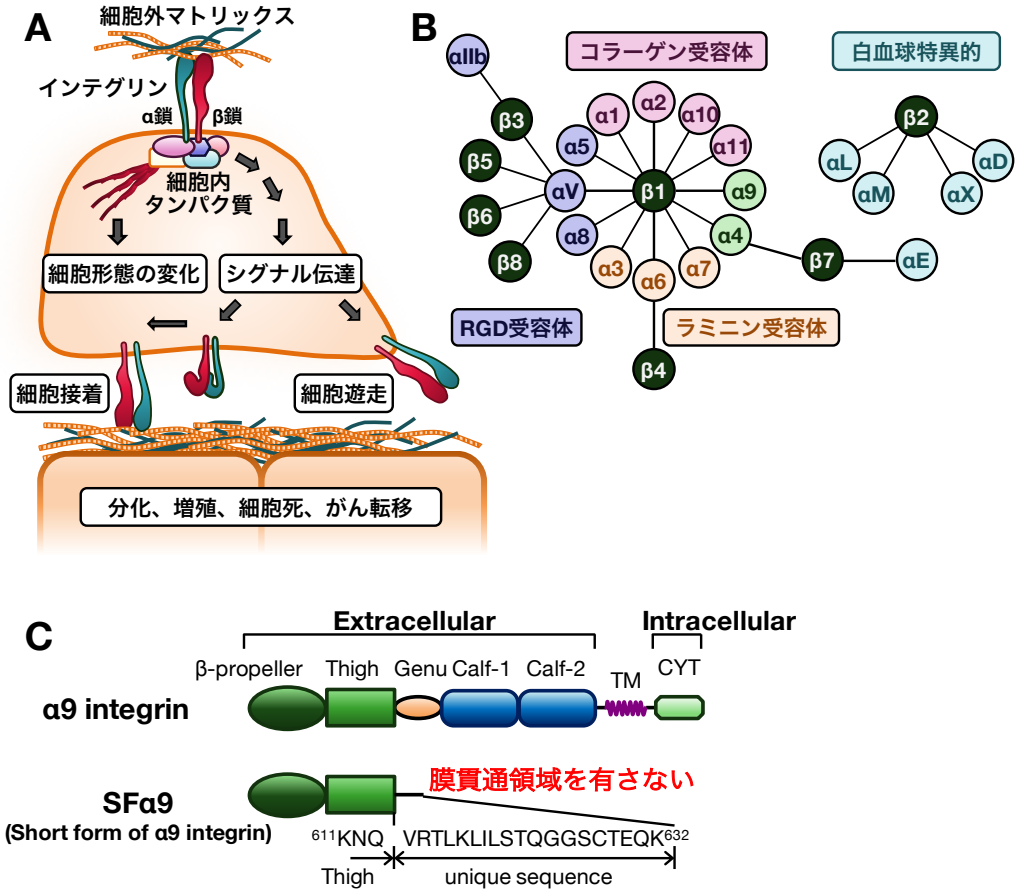


図 1. インテグリン受容体の働き
A) インテグリンによるシグナル伝達とその機能 B) インテグリンファミリー
C) α9 インテグリンとそのスプライシングバリアント SFα9 の構造

本章

1-1　実験方法

1-1-1　　実験材料および試薬

本研究において用いた試薬及び機材の入手先を以下に示す。

DMEM (Product # : D5648-50L)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 (Product # : R6504-50L)	Sigma-Aldrich
FreeStyle 293 Expression Medium (Catalog # : 12338-018)	Invitrogen
293fectin (Catalog # : 12347-019)	Invitrogen
TIL (Catalog # : 33640)	IBL
Hyclone FBS (Catalog # : SH3091003)	Thermo scientific
Opti-MEM (Catalog # : 31985-070)	Life Technologies
Lipofectamine 2000 (Catalog # :11668-500)	Invitrogen
Polybrene (Catalog # : H9268)	Sigma-Aldrich
Ligation-Convenience Kit (Code # : 319-05961)	Nippon Gene
*Eco*RI (Catalog # : 1040B)	Takara
*Bam*HI (Catalog # : 1010B)	Takara
*Nru*I (Catalog # : 1168A)	Takara
*Sal*I (Catalog # : 1080A)	Takara
TRIzol (Code # : 15596-026)	Life Technologies
0.45 μm フィルター (Catalog # : 11306-047ACN)	Sartorius
In-Fusion HD Cloning Kit (Catalog # : ST0344)	Takara
pcDNA3.1 (+) (Catalog # : V790-20)	Life Technologies
pM-secSUMOstar vector (Catalog # : 7121)	LifeSensors
Ab-Capcher ExTra (Code # : P-003-10)	ProteNova
Dialysis membrane (Catalog # : 040-30931)	和光純薬
HIS-Select Nickel Magnetic Agarose Beads (Catalog # : H-1786)	Sigma-Aldrich
Imidazole (Catalog # : 095-00015)	和光純薬
CelLytic M (Catalog # : C2978)	Sigma-Aldrich
Protease inhibitor cocktail (Catalog # : 11697498001)	Roche
Anti-FLAG M2 affinity gel (Catalog # : A2220)	Sigma-Aldrich
Vivaspin (Catalog # : VS0122)	Sartorius
Amicon Ultra Centrifugal Filters 10K (Ref : UFC801024)	Millipore
CFA (Catalog # : 263810)	Difco

IFA (Catalog # : 263910)	Difco
PEG 1500 (Product # : 10783641001)	Roche
HAT (Product # : H0262-10VL)	Sigma-Aldrich
EDTA (Catalog # : 151-13)	ナカライ
FACSCalibur	BD
Recombinant Human Fc-G1 (Catalog # : BE0096)	Bio X Cell
Normal mouse IgG (Catalog # : 015-000-003)	Jackson ImmunoResearch
Normal rat IgG (Catalog # : 012-000-003)	Jackson ImmunoResearch
hIgG (Product # : I 4506)	Sigma-Aldrich
Mouse anti-α9 integrin mAb Y9A2 (Catalog # : MAB2078Z)	Chemicon
Mouse anti-DYKDDDDK tag mAb 1E6 (Catalog # : 018-22381)	和光純薬
Mouse anti-His tag mAb OGHis (Catalog # : D291-3S)	MBL
PE Goat anti-mouse IgG Poly4053 (Catalog # : 405307)	BioLegend
PE anti-mouse/rat XCR1 Antibody (Catalog # : 148203)	BioLegend
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (Catalog # : NA931-1ML)	GE Healthcare
Protein A sepharose (Catalog # : 17-0780-01)	GE Healthcare
ASF (Catalog # : 104N)	Ajinomoto
CELLine (Catalog # : 353137)	BD
Transwell Permeable Supports (Catalog # : 3421)	Corning
Diff-Quik (Catalog # : 16920)	Sysmex
Puromycin (Catalog # : A11138-02)	Life Technologies
Blasticidin S (Catalog # : KK-400)	科研製薬
PolyScreen PVDF transfer membrane (Catalog # : NEF1002001PK)	PerkinElmer
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Catalog # : WBKLS0500)	Millipore
Recombinant Human Lymphotactin/XCL1 (Catalog # : 300-20)	PeproTech
Recombinant Mouse Integrin α9β1 (Catalog # : 7826-A9-050)	R&D Systems
SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate Kit (Catalog # : 52-00-03)	KPL
X 線フィルム (Catalog # : 47410 07523)	Fuji Film
KAPA SYBR FAST qPCR kit (Catalog # : KK4602)	Nippon Genetics
CFX96 Touch	Bio-Rad
iMark microplate reader	Bio-Rad
抗 II 型コラーゲン抗体カクテル/LPS (Catalog # : 62100)	IBL
Type II collagenase (Catalog # : LS004176)	Worthington
70 μm cell strainer (Catalog # : 542070)	Greiner
Cell Counting Kit-8 (Catalog # : CK04)	Dojindo
MOG 35-55 peptide	Sigma-Aldrich

抗α9 インテグリンポリクローナル抗体はウサギにヒトα9 インテグリンの C 末端領域 CEAEKNRKENEDSWDWVQKNQ をペプチド免疫することにより作製した。

他の試薬は、特に断りのない限り市販の特級試薬を用いた。

1-1-2 実験動物

BALB/c 及び C57BL/6 マウスは SPF 条件下で飼育した。SD ラットはコンベンショナル飼育室で飼育した。動物実験は全て北海道大学動物実験ガイドラインに沿って行った。

1-1-3 細胞培養

マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 HEK293T 細胞、滑膜線維芽細胞 FLS、及びレトロウイルス発現システムパッケージングセルライン Plat-GP 細胞は、10％ウシ胎児血清 (FBS，56℃、30 分非働化処理)、100 U/ml ペニシリン G、100 μg/ml 硫酸ストレプトマイシン及び 0.15％ $NaHCO_3$ を含む DMEM を用いて、37℃、5 % CO_2 の条件下で継代培養した。

ヒト胎児横紋筋肉腫由来細胞株 RD 細胞、ヒト悪性黒色腫由来細胞株 G361 は、10％FBS を含む TIL 培地を用いて、37℃、5 % CO_2 の条件下で継代培養した。

FreeStyle 293-F 細胞は FreeStyle 293 Expression Medium、シェーカー、振とうフラスコを用いて、37℃、8 % CO_2、125 rpm の条件下で継代培養した。

1-1-4 過剰発現株の樹立

(1) 遺伝子導入のためのコンストラクト作製

α9-FLAG/pBabepuro とα4-FLAG/pBabepuro は以下の手順で作製した。当研究室で有していたα9-FLAG-pcDNA3.1 (21) とα4-pWZLBlast2 (11) を鋳型とし、以下のプライマーを使用して目的の遺伝子を PCR 法により増幅した。

α9-FLAG

Sense	5'-GGCGCCGGCCGGATCCGCCACCATGGGCGGCCCGGCTGGGCT-3'
Antisense	5'-ATTCCACAGGGTCGACTCACTTGTCATCGTCGTCCTT-3'

α4-FLAG

Sense	5'-GGCGCCGGCCGGATCCGCCACCATGGCTGCGGAAGCGAGGTG-3'
Antisense	5'-ATTCCACAGGGTCGACTTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCATC ATTGCTTTTGCTGTT-3'

PCR 産物は In-Fusion HD Cloning Kit を用いて、あらかじめ *Bam*HI と *Sal*I で切断された pBabepuro ベクターに組み込んだ。作製したプラズミドの配列は DNA シークエンス解析を用いて確認した。

(2) トランスフェクション及びセレクション

α9 インテグリン、SFα9-FLAG を発現する NIH3T3 細胞は以下の手順で樹立した。α9-pWZLBlast2 (21) 、SFα9-FLAG-pBabepuro (21) 、及び SFα9-FLAG-His-pBabepuro を、エンベロープタンパク質をコードする pCMV-VSV-G ベクターと共に Plat-GP 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて同時遺伝子導入し、組み換えウイルスを産生させた。72 時間後に、ウイルスを含んだ培養上清を 0.45 μm フィルターを用いて濾過し、40 %コンフルエントの NIH3T3 細胞に添加した後、polybrane を 8 μg/ml となるように加え、37℃、5 % CO_2 で 24 時間培養した。その後、上清を 10 μg/ml Puromycin/ 10 % FBS/ DMEM、もしくは 5 μg/ml Blasticidin/ 10 % FBS/ DMEM に培地交換し、薬剤耐性細胞をセレクションした。α9 インテグリンと SFα9 を共発現する NIH3T3 細胞は、SFα9-FLAG-pBabepuro を Plat-GP と pCMV-VSV-G を用いてレトロウイルスにパッケージングし、樹立したα9/NIH3T3 に添加した。共発現細胞のセレクションには 10 μg/ml Puromycin 5 μg/ml Blasticidin 10 % FBS DMEM を使用した。

α9 インテグリン、α4 インテグリン過剰発現 CHO 細胞は以下の手順で樹立した。作製したα9-FLAG-pBabepuro とα4-FLAG-pBabepuro を Plat-GP と pCMV-VSV-G を用いてレトロウイルスを作製し、40 %コンフルエントの CHO 細胞に添加した後、polybrane を 8 μg/ml となるように加え、37℃、5 % CO_2 で 24 時間培養した。セレクションには 10 μg/ml Puromycin/ 10 % FBS/ DMEM を用いた。

1-1-5 LC-MS/MS

樹立した SFα9-FLAG-His 発現 NIH3T3 細胞を 15 cm dish 20 枚に培養し、低浸透圧性溶解液 (25 mM NaCl, 0.5 mM CaCl2, 18 mM Tris–HCl, pH 8.0)を用いて細胞を破壊した後、4℃、4,000 rpm で 10 分間遠心し、膜画分を沈降させた。上清を除去し、膜画分を Protease inhibitor cocktail を含む CelLytic M を用いて溶解させ、4℃、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。この上清を Anti-FLAG M2 affinity gel に添加し、TBS で洗浄した後、FLAG ペプチドを含む TBS 用いて結合タンパク質を溶出した。溶出液をウェスタンブロット法を用いて結合タンパク質の量を確認し、Vivaspin で 20 倍に濃縮した検体を用いて、LC-MS/MS 法による質量分析を行った。

1-1-6 XCL1 タンパク質の作製

A. Fc 融合タンパク質

(1) Fc 融合タンパク質の構築

C57BL/6 マウスの胸腺組織より TRIzol を用いてトータル RNA を抽出した後、ランダムプライマーを使用した逆転写により first-strand cDNA を合成した。NCBI データベースから、次に示すプライマーを合成し、マウス XCL1 の cDNA クローニングを行った。

mXCL1-Ig

Sense 5'-AGTGAATTCGCCACCATGAGACTTCTCCTCCTGA-3'

Antisense 5'-TGTGGATCCCCAGTCAGGGTTATCGCTGT-3'

各プライマーには制限酵素認識部位を組み込んだ。PCR 産物を *Eco*RI と *Bam*HI で切り出し、ヒト IgG の Fc 領域融合ベクターに Fc 領域とフレームが合うように組み込み、Fc 融合タンパク質発現ベクターを構築した。

ヒト XCL1 および XCL2 は次に示すプライマーを合成し、Open Biosystems 社から購入した hXCL1 と hXCL2 の cDNA を鋳型として同様にクローニングを行い、Fc 融合タンパク質発現ベクターを構築した。

hXCL1-Ig 及び hXCL2-Ig

Sense 5'-GGTGAATTCGCCACCATGAGACTTCTCATCCTGG-3'

Antisense 5'-ATGGGATCCCCAGTCAGAGTCACAGCTGTA-3'

作製したプラスミドは全て DNA シークエンス解析により配列を確認した。

(2) Fc 融合タンパク質の発現と精製

90 %コンフルエントまで培養した HEK293T 細胞を、PBS で 2 回洗浄してから無血清 DMEM に培地交換し、Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入した。72 時間後に上清を回収し、4℃、4,000 rpm で 10 分間遠心した後、0.45 μm フィルターを用いて濾過し、Ab-Capcher ExTra にアプライした。PBS で洗浄後、溶出液 (0.2 M Glycine-HCl、pH 2.5)で溶出した。溶出後は、速やかに 1/10 量の中和バッファー (1.0 M Tris-HCl、 pH 9.0)を添加し、転倒混和で中和した。その後、透析膜を用いて 100 倍量の PBS に対し透析を 3 回行い、280 nm の吸光度を測定し、分子吸光係数を 1.37 として濃度を算出した (抗体濃度 mg/ml = 吸光度 ÷ 1.37)。

(3) CBB 染色とウェスタンブロット法による精製タンパク質の検出

CBB 染色では、ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にてタンパク質を分離し、ゲルを CBB 染色液 (0.25 %CBB、45 % methanol、10 % acetic acid)で 1 時間染色した後、脱色液 (45 % methanol、10 % acetic acid)で脱色した。ウェスタンブロット法では、ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE でタンパク質を分離した後、タンパク質を PVDF 膜に転写した。この膜を、5 % スキムミルクを含む TBS-T (0.05 % Tween-20 を含む TBS)を用いて室温にて 15 分間ブロッキングし、TBS-T で 5 分間、10 分間と洗浄した後、1 次抗体と 4℃で一晩反応させた。続いてその膜を TBS-T で室温、5 分間×3 回洗浄後、HRP 標識二次抗体と室温で 45 分間反応させ、TBS-T で 5 分間、10 分間と洗浄し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate と反応させ、化学発光により X 線フィルムに検出した。

B. His タグ融合タンパク質

(1) His タグ融合タンパク質の構築

次に示す In-Fusion 用プライマーを合成し、構築した Fc 融合タンパク質のプラスミドを鋳型として PCR を行った。

mXCL1-His

Sense	5'-TACCGAGCTCGGATCCGCCACCATGAGACTTCTCCTCCTGA-3'
Antisense	5'-GCCCTCTAGACTCGAGTCAATGGTGATGGTGATGATGCCCAGTCAGGGTTATCGCTGT-3'

3'側プライマーには 6×His タグの配列を組み込んだ。PCR 産物を In-Fusion を用いて pcDNA3.1 ベクターに組み込み、His タグ融合タンパク質の発現ベクターを構築した。作製したプラスミドは DNA シークエンス解析により配列を確認した。

(2) His タグ融合タンパク質の発現と精製

FreeStyle 293-F 細胞を 3×10^7 個/ 30 ml となるよう培地に懸濁し、293fectin を用いて遺伝子導入した。72 時間後に回収した細胞懸濁液を室温、1,500 rpm で 5 分間遠心した後、0.45 µm フィルターを用いて上清中の不純物を除去し、His タグ融合 XCL1 を含む培養上清を回収した。His タグ融合タンパク質は、バッチ法で精製した。回収した上清に、PBS で洗浄した HIS-Select Nickel Magnetic Agarose Beads を添加し、4℃で 1 時間転倒混和した。その後、ビーズを洗浄液 (50 mM NaH_2PO_4、500 mM NaCl、20 mM imidazole)で 3 回洗浄し、溶出液 (50 mM NaH_2PO_4、500 mM NaCl、500 mM imidazole)で溶出した。溶出後は Amicon Ultra を用いて限外濾過を行い、得られた精製タンパク質をウェスタンブロット法により検出した。

C. His-SUMO タグ融合タンパク質

(1) His-SUMO タグ融合タンパク質の構築

次に示す In-Fusion 用プライマーを合成し、構築した Fc 融合タンパク質のプラスミドを鋳型として PCR を行った。

Full

Sense	5'-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTGTGGGGACTGAAGTCCTA-3'
Antisense	5'-ATGCCTGCAGGTCGACTTACCCAGTCAGGGTTATCGCTG-3'

22-83

Sense	5'-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTGTGGGGACTGAAGTCCTA-3'
Antisense	5'-ATGCCTGCAGGTCGACTTAAGTCTTGATCGCTGCTTTCA-3'

53-114

Sense 5'-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTGGGGCCATGAGAG CTGTA-3'

Antisense 5'-ATGCCTGCAGGTCGACTTACCCAGTCAGGGTTATCGCTG-3'

68-114

Sense 5'-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTATTTGTGCTGATCC AGAA-3'

Antisense 5'-ATGCCTGCAGGTCGACTTACCCAGTCAGGGTTATCGCTG-3'

84-114

Sense 5'-TATTGAGGCTCATCGCGAACAGATTGGAGGTGTGGATGGCAGGG CCAGT-3'

Antisense 5'-ATGCCTGCAGGTCGACTTACCCAGTCAGGGTTATCGCTG-3'

PCR 産物を In-Fusion を用いて *Nru*I と *Sal*I で切断した pM-secSUMOstar ベクターに組み込み、His-SUMO タグ融合タンパク質の発現ベクターを構築した。作製したプラスミドは DNA シークエンス解析により配列を確認した。

(2) His-SUMO タグ融合タンパク質の発現

90 %コンフルエントの HEK293T 細胞にとなるよう培地に懸濁し、Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入した。72 時間後に回収した細胞懸濁液を室温、1,500 rpm で 5 分間遠心した後、0.45 μm フィルターを用いて上清中の不純物を除去し、His-SUMO タグ融合 XCL1 を含む培養上清を回収した。上清中における His-SUMO タグ融合タンパク質はウェスタンブロット法により検出した。

1-1-7 プルダウンアッセイ

(1) 付着細胞のライセート調製

細胞培養液を除去し、PBS で 1 回洗浄後、CelLytic M を添加してプレート上の細胞を懸濁した。懸濁液を数回ピペッティングした後、4℃で 15 分間転倒混和して溶解させた。4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心分離後に上清を回収し、ライセートとした。

(2) プルダウンアッセイ

ライセートに hIgG1 Fc (Recombinant Human Fc-G1)、mXCL1-Ig、hXCL1-Ig、hXCL2-Ig (5 μg/tube)を添加し、4℃で 30 分間転倒混和した後、Protein A-Sepharose ビーズ (50 % slurry)を 12 μl 加えてさらに 4℃で 1 時間転倒混和した。反応後、4℃、5,000 rpm で 1 分間遠心分離し

てビーズを沈降させ、上清を除去した後、TBS-T 1 ml を緩やかに添加して洗浄した。この洗浄工程を 3 回繰り返した後、ビーズに 3×SDS sample buffer (93.75 mM、 Tris-HCl pH 7.8、30 %グリセロール、15 %メルカプトエタノール、7.5 % SDS)を 50 µl 加え、100℃で 5 分間加熱処理したものを、ウェスタンブロッティング用サンプルとして使用した。

1-1-8 ELISA

Recombinant mouse Integrin α9β1 を 0.1 M 炭酸–重炭酸緩衝液 (pH9.2)で 1 µg/ml となるように希釈し、プレートに 50 µl の希釈液を添加後、4℃で一晩静置して固相化した。PBS で 1 回洗浄した後、5 %スキムミルクを含む PBS を 200 µl/well で添加して室温で 1 時間ブロッキングした。その後、0.05 %の Tween-20 を含む PBS（PBS-T）で 1 回洗浄し、5 µg/ml の Recombinant Human Fc-G1、もしくは mXCL1-Ig を添加して室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄した後、HRP 標識二次抗体を添加しさらに室温で 30 分反応させた。その後、PBS-T で 4 回洗浄し、TMB 基質を添加して室温で 15 分静置した。反応は同量の 1 N 硫酸を用いて停止させ、プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。この時、参照波長として 620 nm の吸光度も測定した。

1-1-9 XCL1 中和抗体の作製

(1) ラットへの免疫

構築した mXCL1-Ig 精製タンパク質を使用し、SD ラットへ免疫した。精製タンパク質を Freund's adjuvant を用いてエマルションを作製し、ラットの皮下、皮内に計 5 回投与した後、追加免疫として精製タンパク質を腹腔内投与した (20 µg/head)。初回免疫では CFA を使用し、以降の免疫は IFA を用いて行った。

(2) 細胞融合

追加免疫 24 時間後に安楽死させたラットの脾細胞を採取し、マウス骨髄腫由来細胞株 X63-Ag8-653 と PEG 1500 を用いて細胞融合させた。その後、HAT 培地によるセレクションを行い、融合細胞のみを選抜した。

(3) モノクローナル抗体産生細胞の単離

XCL1 特異的抗体を産生する細胞を単離するため、コントロール hIgG と免疫抗原である mXCL1-Ig 精製タンパクを固相化し、融合細胞の上清を用いて抗原固相 ELISA 法によるスクリーニングを行った。さらに特異性を高めるため、初回のスクリーニングで得られた候補株を、タグの異なる XCL1 タンパク質である mXCL1-His 精製タンパク質を固相化して再度スクリーニングし、反応性が得られた株を 3 回限外希釈を行うことで単クローンを単離した。その結果、1A3A と 3P11R の二つのモノクローナル抗体産生クローンを得た。

(4) モノクローナル抗体の作製

得られた抗体産生細胞を、無血清培地 ASF 培地を用いて培養した。72 時間後に回収した培養上清を 4℃、4,000 rpm で 10 分間遠心した後、0.45 μm フィルターを用いて上清中の不純物を除去した。抗体はカラム法で精製し、Fc 融合タンパク質の精製法と同様に透析と濃度算出を行った。

1-1-10 フローサイトメトリー解析

RD 細胞、G361 細胞、α9/NIH3T3 細胞、FLS 細胞を EDTA で剥離し、PBS で 1 回洗浄後、抗ヒトα9 インテグリン抗体 Y9A2 (10 μg/ml)と PE 標識抗マウス IgG 抗体 (4 μg/ml)、APC を標識した抗マウスα9 インテグリン抗体 18R18D (21) 、または PE を標識した抗マウス XCR1 抗体 ZET を含む 2 % FBS/ 0.05 % NaN_3/ PBS で懸濁し、20 分間、氷上で反応させた。その後、PBS で 1 回洗浄し、FACSCalibur フローサイトメーターを用いて各細胞におけるα9 インテグリンと XCR1 の発現を解析した。

1-1-11 細胞遊走試験

(1) XCL1 による遊走能の検討

XCL1 による遊走能の検討は Transwell (pore size : 5 μm)を用いて行った。1 % FBS を含む RPMI 1640 培地を用いた。下層と上層に培地を添加し、一晩、37℃で平衡化を行った。濃度依存性の遊走を検討した実験では、下層に mXCL1-Ig を 20、50、100、300、600 ng/ml の濃度で、その他の実験では下層にはコントロール hIgG、hIgG1-Fc、mXCL1-Ig、hXCL1-His (300 ng/ml)をケモアトラクタントとして培地に添加した。上層には 1.0×10^5 個/ 100 μl となるよう調整した NIH3T3 細胞、α9 インテグリン発現 NIH3T3 細胞を添加し、5 時間 37℃で遊走させた。上層に残った細胞を綿棒にて取り除き、Diff-Quik で下層を固定、染色し、下層に遊走した細胞を光学顕微鏡で計数した。各サンプルにおいて 4 視野計数し、その平均値を算出、比較検討を行った。RD 細胞を用いた遊走能の検討は、37℃で 24 時間反応させた。

(2) α9 インテグリン中和抗体による XCL1 に対する細胞遊走抑制効果の検討

Transwell を用いた細胞遊走は(1)と同様に行った。細胞懸濁液に Normal mouse IgG、及び Y9A2 (10 μg/ml)を添加し、15 分間、4℃で反応させた。下層には mXCL1-Ig (300 ng/ml)を含む培地を添加し、(1)の方法で評価した。

(3) XCL1 中和抗体による細胞遊走抑制効果の検討

Transwell を用いた細胞遊走は(1)と同様に行った。Transwell の下層に、15 分間、4℃で静置させた mXCL1-Ig (300 ng/ml)と PBS、Normal rat IgG、抗 mXCL1 抗体 1A3A、3P11R (10 μg/ml)を含む培地を、上層にα9 インテグリン発現 NIH3T3 を添加し、(1)の方法で評価した。

1-1-12　抗 II 型コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA)

(1)　CAIA の発症と重症度の評価

6~8 週齢の BALB/c マウスに抗 II 型コラーゲン抗体カクテルを 2 mg/匹で静脈内投与し、3 日目に LPS を 50 μg/匹で腹腔内投与することで関節炎を発症させた。XCL1 投与モデルでは、精製 mXCL1-Ig タンパク質 (300 ng/匹)とコントロールヒト IgG を、抗体カクテル投与の 1 日前から 9 日目まで毎日腹腔内投与し、関節炎に及ぼす影響を検討した。α9 インテグリン中和モデルでは、XCL1 投与モデル CAIA マウスに抗体カクテルを投与する 1 日前と 3 日後にそれぞれ抗マウスα9 インテグリン中和抗体 55A2C もしくはコントロール抗体 18R18D (21) を 400 μg/匹で腹腔内投与した。XCL1 中和モデルでは、CAIA モデルに抗体カクテルを投与する 1 日前と 3 日後にそれぞれ作製した抗マウス XCL1 インテグリン中和抗体 1A3A もしくはコントロール抗体 3P11R を 400 μg/匹で腹腔内投与した。関節炎スコアは次に示す 5 段階に従って四肢の関節炎重症度を評点化し、最大で 16 点とした。

0 :　症状なし
1 :　四肢の指など小関節が 1 本のみ腫脹発赤
2 :　小関節 2 本以上、あるいは手首や足首などの比較的大きな関節が腫脹発赤
3 :　1 本の手や足全体が腫脹発赤
4 :　さらに 1 本の手や足の全体的な腫脹が最大限に達している

(2)　関節組織の観察と病理的評価

抗体カクテル投与の 16~18 日後に安楽死させたマウスから、後肢の関節を 10％ ホルマリン溶液中で固定、その後 H&E とサフラニン O を用いて関節組織を染色した。H&E 染色した組織では、滑膜浸潤細胞の増殖、炎症細胞の浸潤度合いを観察した。サフラニン O 染色では軟骨マトリックスの成分であるプロテオグリカンを染色することで、関節部の軟骨の変性を観察した。

1-1-13　FLS の単離

CAIA マウスに抗体カクテルを投与してから 9 日後、関節炎症状のピークを迎えたマウスを安楽死させ、後肢の関節を採取した。採取した関節組織から皮膚や腱、靱帯、脂肪などの余分な組織を取り除き、残りの軟組織を骨から剥離した後、解剖用ハサミを用いて軟組織を細かくした。粉砕した軟組織を培養液で 1 回洗浄した後、3 mg/ml の Type II collagenase を含む DMEM を添加し、37℃で 30 分振盪して軟組織から細胞を剥離した。反応は FBS を 10% になるように添加して停止させ、剥離した細胞を含む上清を 70 μm cell strainer を通して回収した。この作業を 3 回繰り返した後、回収した細胞を 10％ FBS DMEM を用いて 37℃で一晩培養した。その後プレートに付着した細胞を培養し、増殖を続けた細胞を FLS とした。

1-1-14　Real-time PCR による mRNA の発現解析

各細胞とマウス組織から cDNA を前述と同様に調製し、以下のプライマーを用いて Real-time PCR を行った。

HPRT	Sense	5'-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-3'
	Antisense	5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'
β-actin	Sense	5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3'
	Antisense	5'-CGCTCAGGAGGAGCAATG-3'
XCL1	Sense	5'-AGACTTCTCCTCCTGACTTTCCT-3'
	Antisense	5'-GGACTTCAGTCCCCACACC-3'
XCR1	Sense	5'-GCACTGGAGGAGATCAAAGG-3'
	Antisense	5'-CGGGATGCAGGGATACTGAG-3'
α9 integrin	Sense	5'-ATGACGGGTTCCCAGATG-3'
	Antisense	5'-TGTAGACTGCGCCAGCAA-3'
TNFα	Sense	5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3'
	Antisense	5'-TCCACTTGGTGGTTTGCTACG-3'
TGFβ	Sense	5'-TGGACCGCAACAACGGCATCTATGAGAAAACC-3'
	Antisense	5'-TGGAGCTGAAGCAATAGTTGGTATCCAGGGCT-3'
IL-6	Sense	5'-CCAAACTGGATATAATCAGGAAAT-3'
	Antisense	5'-CTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC-3'
IL-1α	Sense	5'-AAGACCAGCCCGTGTTGCT-3'
	Antisense	5'-TTCCAGAAGAAAATGAGGTCGG-3'
IL-1β	Sense	5'-CCTCATCTTTGAAGAAGAGCCC-3'
	Antisense	5'-CTCTGCAGACTCAAACTCCAC-3'

Real-time PCR には CFX96 touch を使用し、SYBR Green を用いて増幅産物の生産量を計測した。cDNA 濃度は閾値に達するまでのサイクル数 (Ct)として表され、各遺伝子発現量は、内在性コントロール遺伝子 HPRT もしくはβ-actin の Ct 値を基準とした相対定量法 (ΔΔCt 法)を用いて比較した。

1-1-15　細胞生存性試験

細胞生存性試験は 1 % FBS を含む RPMI 1640 培地と Cell Counting Kit-8 を用いて検討した。PBS、コントロール Rat IgG、作製した抗 XCL1 モノクローナル抗体 1A3A と 3P11R を含んだ培地でα9 インテグリン発現 NIH3T3 細胞を 1.0×10^4 個 /100 µl となるよう調整し、96 well プレートに添加した。37℃で 22 時間培養した後、Cell Counting Kit-8 を各 well に 10 µl ずつ添加し、さらに 37℃で 2 時間反応させた。反応後はプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

1-1-16　実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)

8 週齢の C57BL/6 マウスに、等量の CFA で乳化した MOG 35–55 ペプチド (MEVGWY-RSPFSRVVHLYRNGK) を 100 µg/匹で尾根部に皮下注射した。MOG ペプチド投与日とその 2 日後に Ptx を 400 ng/匹で尾静脈注射により投与し、7、14、21、28 日後の脊髄から cDNA を前述と同様に調整して Real-time PCR による mRNA 発現解析を行った。抗 XCL1 抗体投与モデルでは、MOG ペプチド投与の 1 日前と 2 日後に作製した XCL1 抗体と PBS を 400 µg/匹で投与した。重症度の評価は先行論文を参考にして以下に示すとおりに評価した (22)。

0 :　症状無し
0.5 :　部分的な尾の引きずり
1 :　尾の完全麻痺
2 :　運動失調・後肢の不全麻痺
2.5 :　片後肢の完全麻痺
3 :　両後肢の完全麻痺
3.5 :　両後肢の完全麻痺・前肢の脱力
4 :　前肢の完全麻痺
5 :　瀕死

1-1-17　FLS 刺激

単離してきた FLS を 12 ウェルプレートで培養し、80 %コンフルエントの時に hIgG Fc もしくは mXCL1-Ig を 300 ng/ml 含む培養液を添加した。37℃で 3 時間刺激した後、cDNA を調製して各炎症性サイトカインの mRNA 発現量を Real-time PCR により解析した。α9 インテグリン中和抗体を用いた時は、mXCL1-Ig を 300 ng/ml 含んだ培養液に抗α9 インテグリン抗体を 10 µg/ml となるように添加し、37℃で 3 時間刺激した後に先程と同様に炎症性サイトカインの mRNA 発現量を解析した。このとき、内在性コントロール遺伝子はβ-actin を用いた。

1-1-18　統計処理

実験は、同一サンプルにおいて Triplicate 以上で独立に 3 回以上繰り返して行い、データの平均値と標準誤差を求めた。有意差は、両側分布を使用した等分散の 2 標本を対象とする student の t 検定により算出し、p 値が 0.05 (*) 、0.01 (**) 以下で有意差があるとした。

1-2　実験結果

1-2-1　　新規α9 インテグリンリガンドの同定

SFα9 特異的、またはα9 インテグリンと SFα9 の共通する新規リガンドを同定するために、FLAG タグを付加させた SFα9 をマウス線維芽細胞 NIH3T3 に過剰発現させた細胞株を樹立した。SFα9 は細胞膜上に発現するため (21) 、低浸透圧性溶解液で細胞膜画分を濃縮し、抗 FLAG 抗体ビーズにて SFα9 を精製した。ウェスタンブロットにて精製 SFα9 ンパク質を確認した後、精製 SFα9 タンパク質を vivaspin にて濃縮を行い、LC-MS/MS 法で SFα9 結合分子の探索を行った。その結果、20 種類のタンパク質が SFα9 と結合し、その候補分子の一つとしてケモカインファミリーである XCL1/Lymphotactin を見出した（表 1）。α9 インテグリンは VEGF-A、C、D といった分泌性の増殖因子とも相互作用することが報告されている (23, 24) 。このことから、同じく分泌性ケモカインである XCL1 もα9 インテグリン、もしくは SFα9 と相互作用する可能性があると考え、今後の実験を行なった。

No.	Protein
1	heat shock 70kD protein
2	BiP
3	heat shock protein 70 cognate
4	rearranged immunoglobulin light chain variable region, partial
5	proto-oncogene, DE3 isoform
6	Utp20 protein
7	Entpd4 protein, partial
8	heart alpha-kinase
9	APG-1
10	histone-lysine N-methyltransferase 2E
11	OBOX5
12	flavin containing monooxygenase 4
13	Serine/threonine-protein kinase N2
14	ATRX protein
15	mKIAA0284 protein
16	Efcab6 protein
17	**XCL1/Lymphotactin**
18	eIF3-p44
19	Gm1070
20	thioredoxin, mitochondrial precursor

表 1. LC-MS/MS で得られた SFα9 の結合タンパク質候補

1-2-2　　ヒト及びマウス XCL1 タンパク質の精製

LC-MS/MS の結果を確認するため、リコンビナント XCL1 タンパク質を作製した。XCL1 タンパク質を精製するため、マウスの XCL1-Ig、XCL1-His、ヒトの XCL1-Ig 及び XCL1 のホモログである XCL2-Ig 遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、HEK293T 細胞もしくは FreeStyle 293-F 細胞にトランスフェクションした後、培養上清を回収し、タンパク質を精製した。Fc タグはヒンジ部を有する為、Fc 融合タンパク質は 2 量体を形成することが想定される。CBB とウェスタンブロット法により精製タンパク質を検出したところ、Fc 融合タン

パク質では 2-メルカプトエタノール添加による還元時と非添加による非還元時でタンパク質の移動度が変化する結果を得た (図 2A, B)。また、還元時において XCL1-Ig と XCL2-Ig の移動度に変化は見られなかった (図 2C) 。一方、His タグ融合タンパク質は、還元時、非還元時の両方で移動度は同じであった (図 2D)。これらの結果から、目的のタンパク質が精製できていることを確認した。

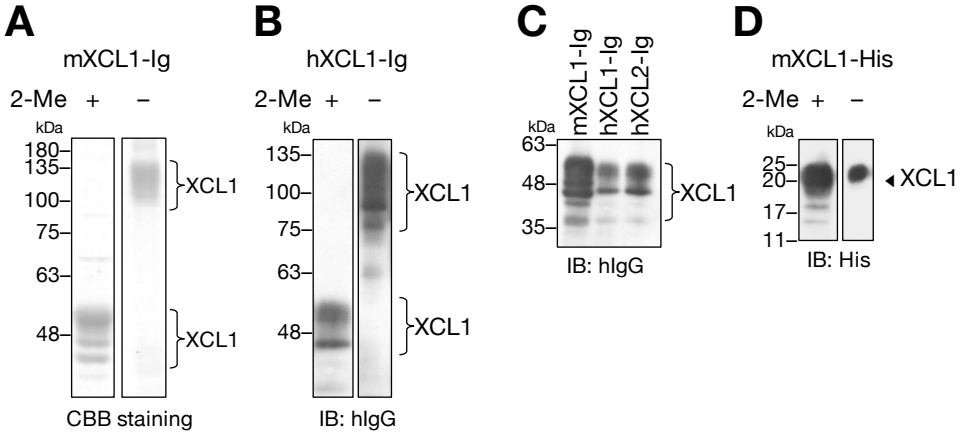


図 2. リコンビナント XCL1 タンパク質の精製
A) mXCL1-Ig の CBB 染色図 B) hXCL1-Ig のウェスタンブロット図 C) mXCL1-Ig、hXCL1-Ig、hXCL2-Ig のウェスタンブロット図 D) mXCL1-His のウェスタンブロット図

1-2-3 XCL1 とα9 インテグリン及び SFα9 の結合

XCL1 が実際にα9 インテグリンと結合するかどうかを明らかにするため、マウス線維芽細胞である NIH3T3 細胞にα9 インテグリン、SFα9、両分子を共発現させた細胞株を樹立した。それらの樹立した細胞を用いて、精製ヒト XCL1-Ig と XCL2-Ig とのプルダウンアッセイを行いα9 インテグリン及び SFα9 と XCL1、XCL2 との結合を解析した。その結果、XCL1 とそのホモログである XCL2 は、α9 インテグリンと SFα9 の両方に結合した (図 3A) 。また、XCL1 とα9 インテグリン、SFα9 との結合は、XCL2 よりも強いことが示唆された。XCL1 とα9 インテグリンとの結合がα9 インテグリンに選択的なのかをα9 インテグリンと構造的、機能的に同じファミリーに分類されるα4 インテグリン発現 CHO 細胞を用いて、同様にプルダウンアッセイを行った。その結果、α9 インテグリンはマウス XCL1-Ig との結合能を有したが、α4 インテグリンとマウス XCL1-Ig との結合は観察されなかった (図 3B) 。これらの結果より、XCL1 は、α9 インテグリン及び SFα9 の新規リガンドであり、その結合はα9 インテグリンに選択的であることが示唆された。次に、α9 インテグリンと XCL1 の相互作用が内在的にも存在するのかを、α9 インテグリンを発現する細胞株を用いて確認した。ヒト胎児横紋筋肉腫由来細胞株 RD とヒト悪性黒色腫由来細胞株 G361 は内在的にα9 インテグリンを細胞膜上に発現していることをフローサイトメトリーにより確認し、それらの細胞を用いて先程と同様にプルダウンアッセイを行った。その結果、RD 細胞、G361 細胞の両方で、α9 インテグリンと XCL1 が結合することを明らかとした (図 3C) 。このことから、

XCL1 が内在性α9 インテグリンとも相互作用することが示唆された。最後に、XCL1 とα9 インテグリンの相互作用が直接的であるのかを ELISA 法により検討した。96 ウェルプレート上にリコンビナントα9β1 インテグリンを固相化し、XCL1-Ig を添加した後に結合の有無を HRP 標識された抗 human IgG 抗体を用いて確認したところ、XCL1 がα9β1 インテグリンに結合していることを明らかとした (図 3D) 。このことから、XCL1 はα9 インテグリンと直接相互作用することが示唆された。

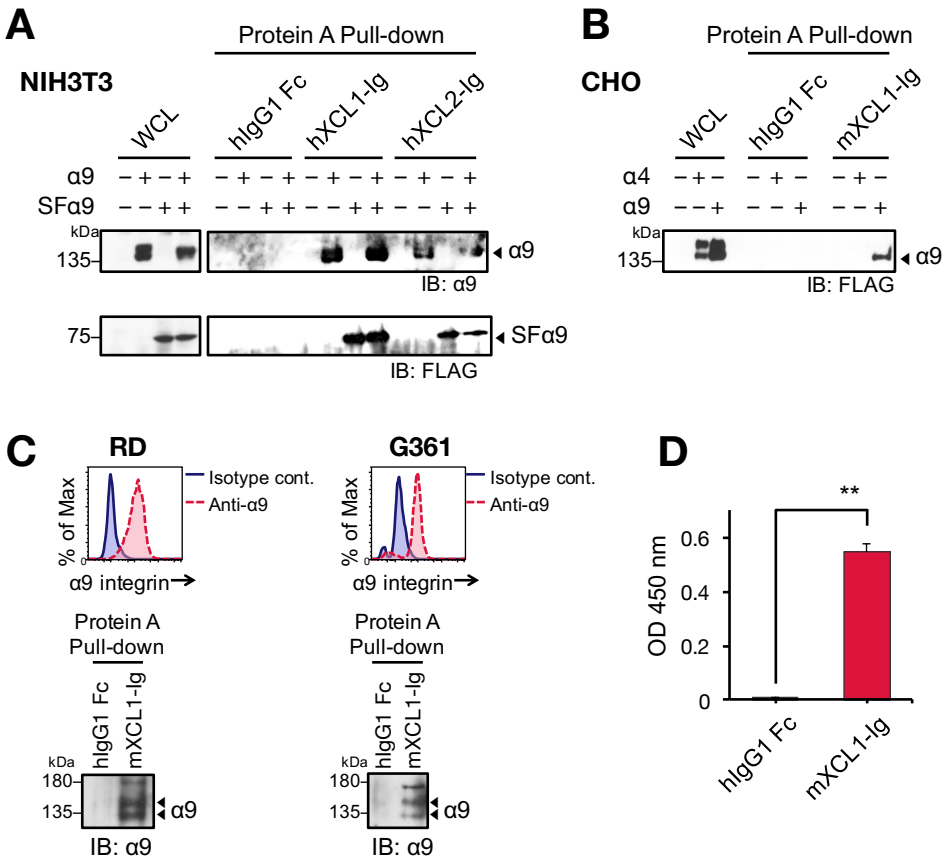


図 3. α9 インテグリン、SFα9 と XCL1、XCL2 の相互作用
A) Protein A を用いたプルダウンアッセイによる XCL1-Ig、XCL2-Ig と α9 インテグリン、SFα9 の結合検証 B) Protein A を用いたプルダウンアッセイよる α9 インテグリンと XCL1 の選択的相互作用の検証。α4 インテグリンと XCL1 は相互作用しなかった。 C) Protein A を用いたプルダウンアッセイよる XCL1 と内在性 α9 インテグリンの相互作用検証 D) ELISA によるリコンビナント α9β1 インテグリンと XCL1 の直接的な相互作用検証。 プレート上にリコンビナント α9β1 インテグリンを固相化し、XCL1 と反応させて結合を検出した。

1-2-4　XCL1 によるα9 インテグリン発現細胞の遊走

XCL1 とα9 インテグリンの相互作用の生物学的機能を検討するため、Transwell を用いた細胞遊走試験を行い検討した。Transwell インサート上層にα9 インテグリン発現 NIH3T3 細胞を、下層に異なる濃度の XCL1-Ig を含む培地を添加し、5 時間インキュベートした後に、インサート上層に残った未遊走の細胞を取り除き、下層に遊走した細胞を Diff-Quik を用いて染色した (図 4A) 。遊走細胞を光学顕微鏡上で計測した結果、XCL1 はα9 インテグリン

発現 NIH3T3 細胞の遊走を濃度依存的に亢進することが明らかとなった (図 4A) 。さらに、XCL1 による遊走能の亢進は濃度が 300 ng/ml の時にピークを示し、それ以上の濃度だと細胞遊走の亢進度が減弱する結果を得た。XCL1 が既知の受容体である XCR1 を介して遊走を亢進させるときもこのような二相性の反応を示すことから (25) 、XCL1 がα9 インテグリンを介して細胞の遊走を亢進させる因子であることが示唆された。

この XCL1 による細胞遊走が実際にα9 インテグリンを介しているかを検討するため、α9 インテグリン発現 NIH3T3 細胞とその親株である NIH3T3 細胞を用いて先程と同様に細胞遊走試験を行った。その結果、XCL1-Ig と、タグの異なる XCL1-His の両者は親株である NIH3T3 細胞の遊走能に影響を与えなかったが、α9 インテグリンを発現させた NIH3T3 細胞では有意に遊走能が亢進した (図 4B) 。さらにα9 インテグリンに対する中和抗体 Y9A2 を細胞懸濁液に添加して遊走試験を行った結果、Y9A2 添加によりα9 インテグリン発現細胞の細胞遊走が有意に抑制されることがわかった (図 4B) 。α9 インテグリン依存性の細胞遊走には内向き整流性 K^+チャネル (Kir) が関与しており、Ba^{2+}を用いることで Kir をブロックしてα9 インテグリン依存性の細胞遊走が抑制されることが報告されている (26) ので、α9 インテグリンを介した XCL1 による遊走の亢進が Ba^{2+}で抑制できるかを検討したところ、XCL1 により亢進したα9 インテグリン発現細胞の遊走が、Ba^{2+}の添加により抑制できることを明らかとした (図 4C) 。これらの結果より、XCL1 がα9 インテグリンを介して細胞の遊走能を亢進し、その作用機序には Kir が関わることが示唆された。

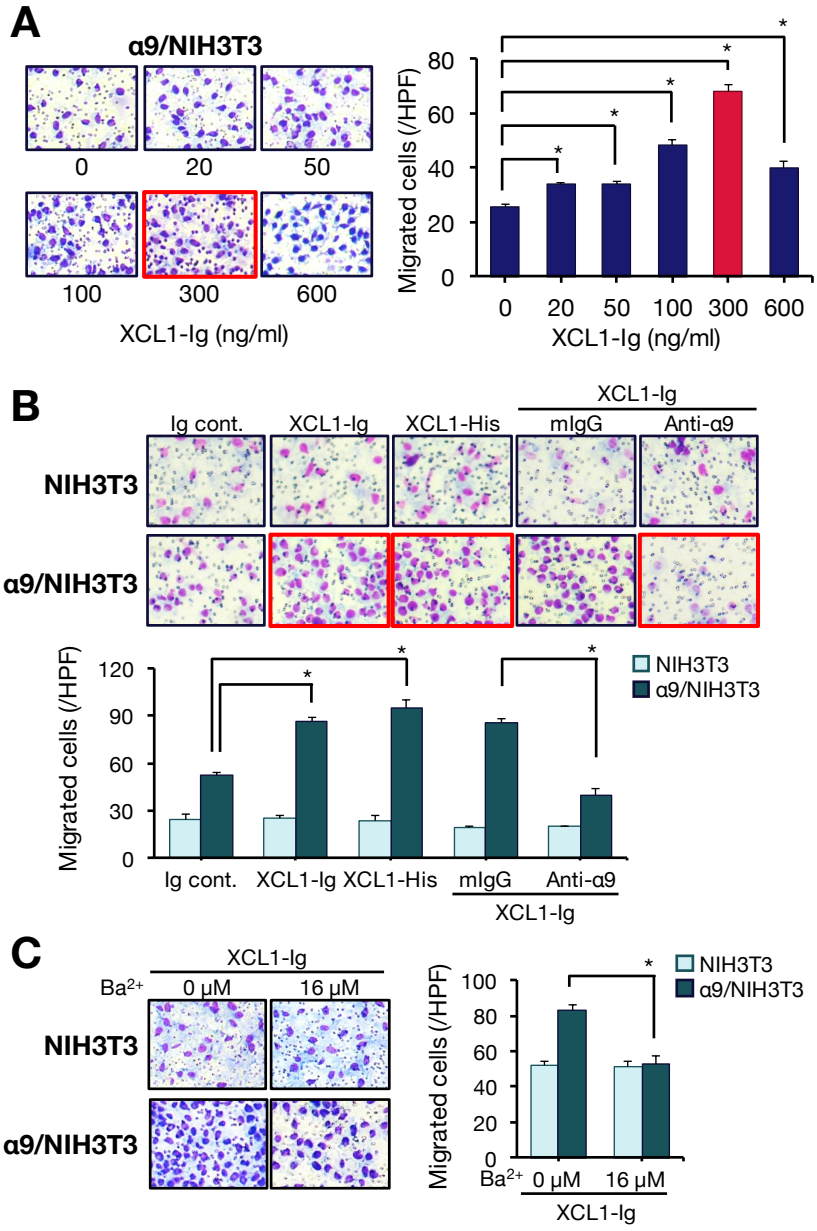


図 4. XCL1 と α9 インテグリン相互作用の細胞遊走への影響
A) α9 インテグリン発現細胞の XCL1 濃度依存的な細胞遊走能亢進。XCL1 濃度が 300 ng/ml の時、細胞遊走が最も亢進した。 B) α9 インテグリン発現細胞とその親株における XCL1 の遊走能への影響。親株である NIH3T3 細胞では XCL1 による細胞遊走の亢進は認められず、XCL1 に誘導された α9 インテグリン発現細胞の細胞遊走能亢進は抗 α9 インテグリン中和抗体により抑制された。 C) Ba^{2+}による α9 インテグリン依存性細胞遊走の抑制効果。XCL1 により誘導された細胞遊走は Ba^{2+}を用いて α9 インテグリン依存性の遊走を阻害することにより抑制された。

1-2-5　　XCL1 誘導性遊走の方向性検証

遊走能の亢進は、方向性を持つ Chemotaxis と方向性を持たない Chemokinesis の 2 種類に分類される (27) 。XCL1 によるα9 インテグリン依存性の遊走能亢進が Chemotaxis なのかを、Transwell を用いたチェッカーボード法で検討した。Transwell の上層のみ、下層のみ、もし

くはその両方にケモカインを添加することにより、異なった濃度勾配を作り出すことで遊走能にどのような影響が出るのかを観察した。その結果、下層のみに XCL1-Ig を添加した Transwell では細胞遊走が観察されたのに対し、上層のみに XCL1-Ig を添加した Transwell では、α9 インテグリン発現細胞の下層への遊走が、コントロール群や下層のみに XCL1-Ig を添加した群と比較して有意に低下した (図 5) 。さらに上層と下層の両方にケモカインを添加し、濃度勾配を排除した環境下では、下層への遊走はコントロールと同程度であった (図 5) 。これらの結果より、XCL1 誘導性のα9 インテグリンを介した細胞遊走能の亢進は、方向性を有する chemotaxis であることが示唆された。

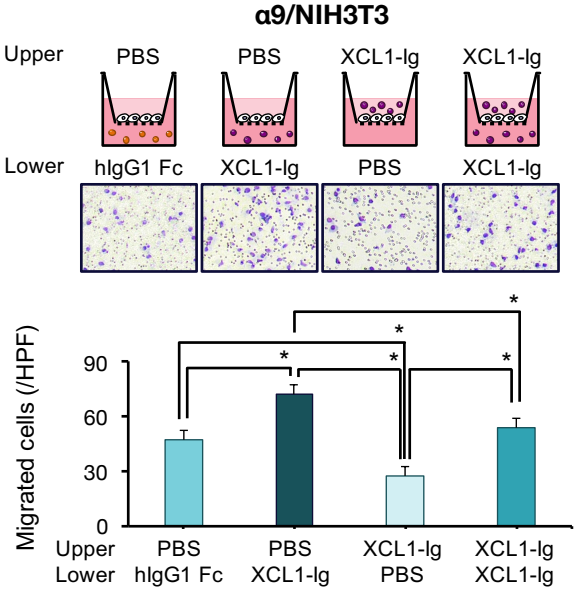


図 5. XCL1 による α9 インテグリン依存性細胞遊走の方向性の検証

1-2-6　XCL1 による内在性α9 インテグリン発現細胞の遊走試験

さらに、XCL1 が内在的にα9 インテグリンを発現する細胞の遊走能にも影響するかを RD 細胞を用いて検討した。その結果、XCL1 によって RD 細胞の遊走が有意に促進し、Y9A2 によってその遊走が抑制された (図 6) 。このことから、内在性α9 インテグリンに対しても XCL1 が機能を及ぼすことを明らかとした。

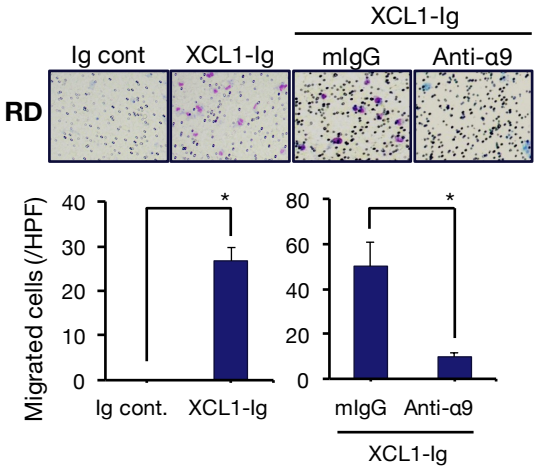


図 6. XCL1 による内在性 α9 インテグリン発現細胞の遊走亢進

1-2-7　XCL1 誘導性細胞遊走における XCR1 関与の検討

XCL1 には既知の受容体として XCR1 が存在し、その相互作用は CD8α$^+$ 樹状細胞の遊走に関与することが報告されている (28)。このことから、これまで得られた結果が XCR1 にも依存しているのかを検討するため、shRNA を用いて XCR1 をノックダウンした細胞株を樹立して検討した。α9 インテグリン発現 NIH3T3 細胞の XCR1 を shRNA によりノックダウンし、ノックダウン効率を Real-time PCR とフローサイトメトリーの両方で確認した。その結果、コントロール株と XCR1 ノックダウン株では、α9 インテグリンの発現量は変化しなかったが XCR1 の発現が減弱していることを確認した (図 7A) 。これらの細胞株を用いて先程までと同様に遊走試験を行った結果、XCR1 ノックダウンによる細胞遊走能への影響は認められなかった (図 7B) 。これらのことより、前述の結果は XCL1 が既知の受容体である XCR1 を介さず、α9 インテグリンと直接相互作用し細胞遊走能を亢進させる新規作用機序であることを明らかとした。

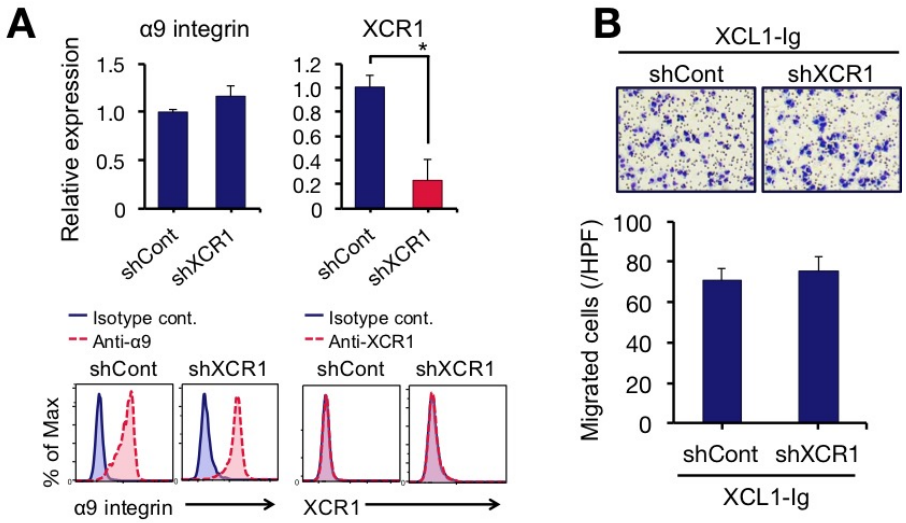


図 7. XCR1 発現ノックダウン細胞株を用いた細胞遊走
A) shRNA を用いた α9 インテグリン発現細胞における XCR1 の発現抑制。Real-time PCR とフローサイトメトリーにより、XCR1 がノックダウンされたことを確認した。
B) XCL1 による XCR1 ノックダウン株とコントロール株の細胞遊走には差がなかった。

1-2-8　関節炎モデルマウス (CAIA) における XCL1 の機能解析

次に生体内で XCL1 が自己免疫疾患に関与するのかを明らかにするため、α9 インテグリンが発症、増悪化に密接に関与するマウス関節炎モデルである抗 II 型コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) (29) を用いて検討した。正常マウスと CAIA を発症して重症度のピークを迎えたマウスの関節から滑膜浸潤細胞 (FLS)を単離し、XCL1 の発現量を Real-time PCR で測定した。CAIA マウスから単離した FLS では正常マウス由来 FLS と比べて XCL1 の発現が有意に亢進していた (図 8A) 。このことから、XCL1 が CAIA の発症に関与することが示唆された。次に、抗Ⅱ型コラーゲン抗体カクテル投与前日から投与後 9 日目まで精製 XCL1-

Ig タンパク質とコントロールヒト IgG を毎日腹腔内投与し、四肢の関節炎スコア (最大 16 点) を測定した。13 日目まで観察した結果、XCL1 タンパク質を投与したマウスではコントロール群と比較して関節炎の発症開始は同時であったにも関わらず、臨床症状の有意な増悪化が観察された (図 8B) 。これらのマウスの関節組織を病理学的に解析する為、16 日目の後肢関節組織を H&E とサフラニン O を用いて染色した。H&E 染色の関節組織を観察した結果、XCL1 投与群ではコントロール群と比較して、白血球の浸潤や滑膜線維芽細胞の増殖が亢進している事が明らかとなった (図 8C) 。軟骨組織の状態を観察するため、サフラニン O 染色した関節部の軟骨を観察した結果、XCL1 投与群ではプロテオグリカンの破壊が亢進し、軟骨変性が進行していることがわかった (図 8C) 。以上の結果から、XCL1 は生体内で関節炎の増悪化に関与していることが明らかとなった。

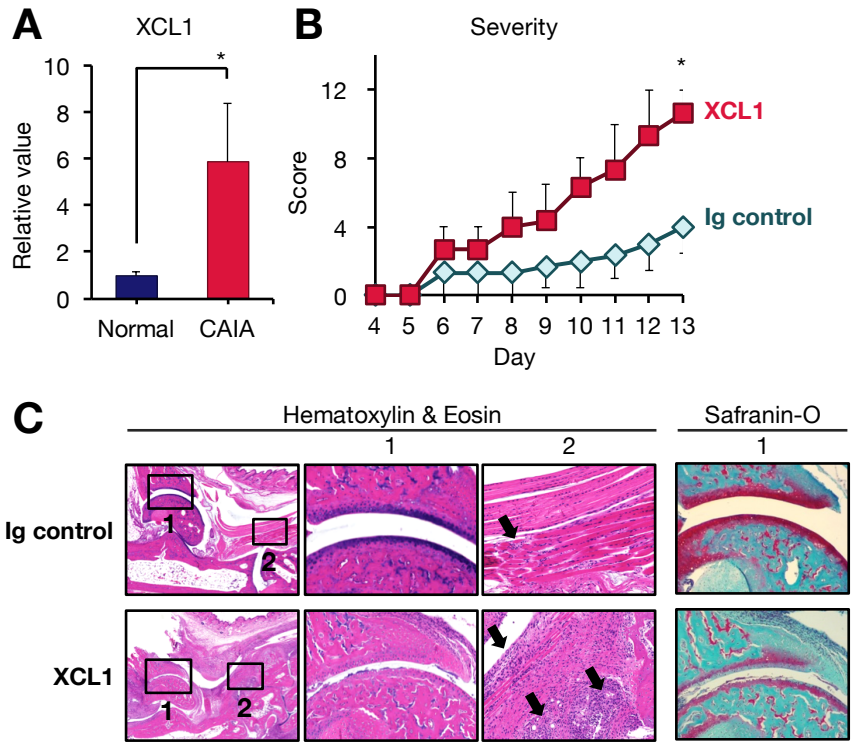


図 8. CAIA における XCL1 の関与
A) 関節炎症状がピーク時の CAIA マウス関節組織から FLS を単離し、XCL1 の発現を Real-time PCR により解析した。 B) CAIA マウスに XCL1 を継続的に投与し、症状の経過を観察した。C) B のマウスから関節組織を採取し、H&E と Safranin-O により染色した。図中黒矢印は浸潤した炎症性細胞を示す。

1-2-9　α9 インテグリン中和抗体による CAIA 抑制効果

CAIA マウスはα9 インテグリン中和抗体により疾患症状を抑制できることが報告されている (9) 。そこで、XCL1 により増悪化した CAIA マウスモデルに抗α9 インテグリン中和抗体を投与し疾患の悪化を抑制できるのか検討した。先程と同様に XCL1-Ig タンパク質を継

続的に投与した CAIA マウスに、抗Ⅱ型コラーゲン抗体カクテル投与日の前日と 3 日後にα9 インテグリンの中和抗体もしくはそのコントロール抗体を腹腔内投与し、四肢の関節炎スコアを測定した。その結果、XCL1 投与により増悪化した CAIA の関節炎症状が、α9 インテグリン中和抗体により抑制されることを確認した (図 9A) 。これらマウスの後肢関節を H&E とサフラニン O で染色して関節組織を観察したところ、関節炎症状が抑制されていたα9 インテグリン中和抗体投与群では炎症細胞の浸潤と軟骨組織の破壊がコントロール抗体投与群と比較して抑制されていることが明らかとなった (図 9B) 。これらのことより、XCL1 による CAIA の増悪化にはα9 インテグリンが関与していることが示唆された。

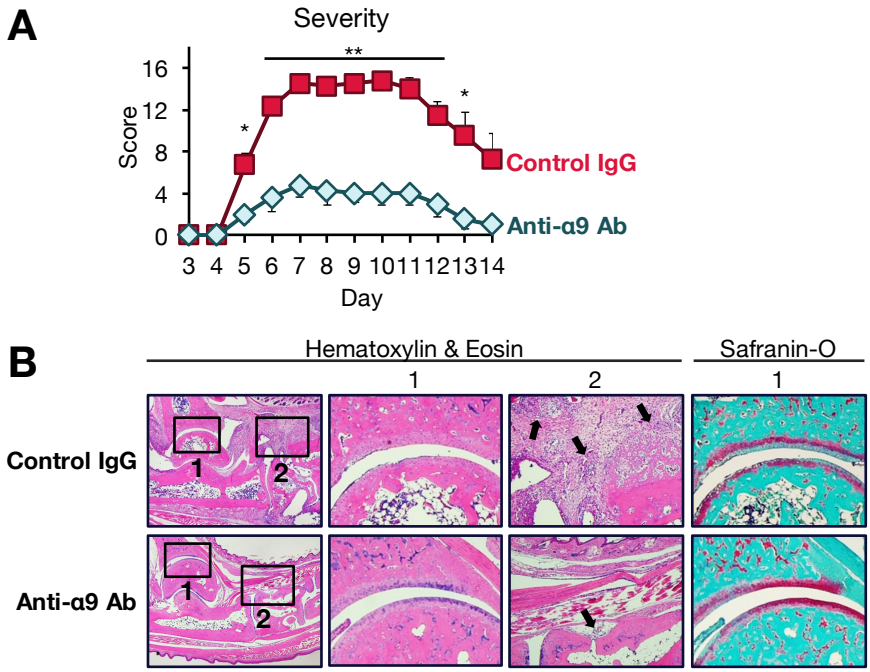


図 9. XCL1 投与 CAIA における抗 α9 インテグリン抗体の影響
A) XCL1 投与 CAIA マウスに抗 α9 インテグリン抗体を投与し、症状の経過を観察した。
B) A のマウスから関節組織を採取し、H&E と Safranin-O により染色した。図中黒矢印は浸潤した炎症性細胞を示す。

1-2-10　抗マウス XCL1 モノクローナル抗体の作製

次に、XCL1 の機能阻害による遊走、及び自己免疫疾患への影響を検討するため、XCL1 の中和抗体の作製を試みた。ラットに XCL1-Ig 精製タンパク質を抗原として免疫した後、脾細胞と X63-Ag8-653 を細胞融合させ、特異性と親和性の高いハイブリドーマを ELISA 法により選別することで、二つのモノクローナル抗体、1A3A と 3P11R を作製することに成功した。これらのモノクローナル抗体はヒト XCL1 を認識しなかったことから、作製した抗 XCL1 抗体がマウスに特異的であることが明らかとなった (図 10A) 。1A3A と 3P11R の XCL1 認識領域を検索するため、His-SUMO タグを付加した種々の XCL1 変異体を作製した

(図 10B, C) 。これらの変異体を用いて ELISA とウェスタンブロットによる解析を行ったところ、両抗体が XCL1 の C 末端領域を認識することがわかった (図 10D, E) 。

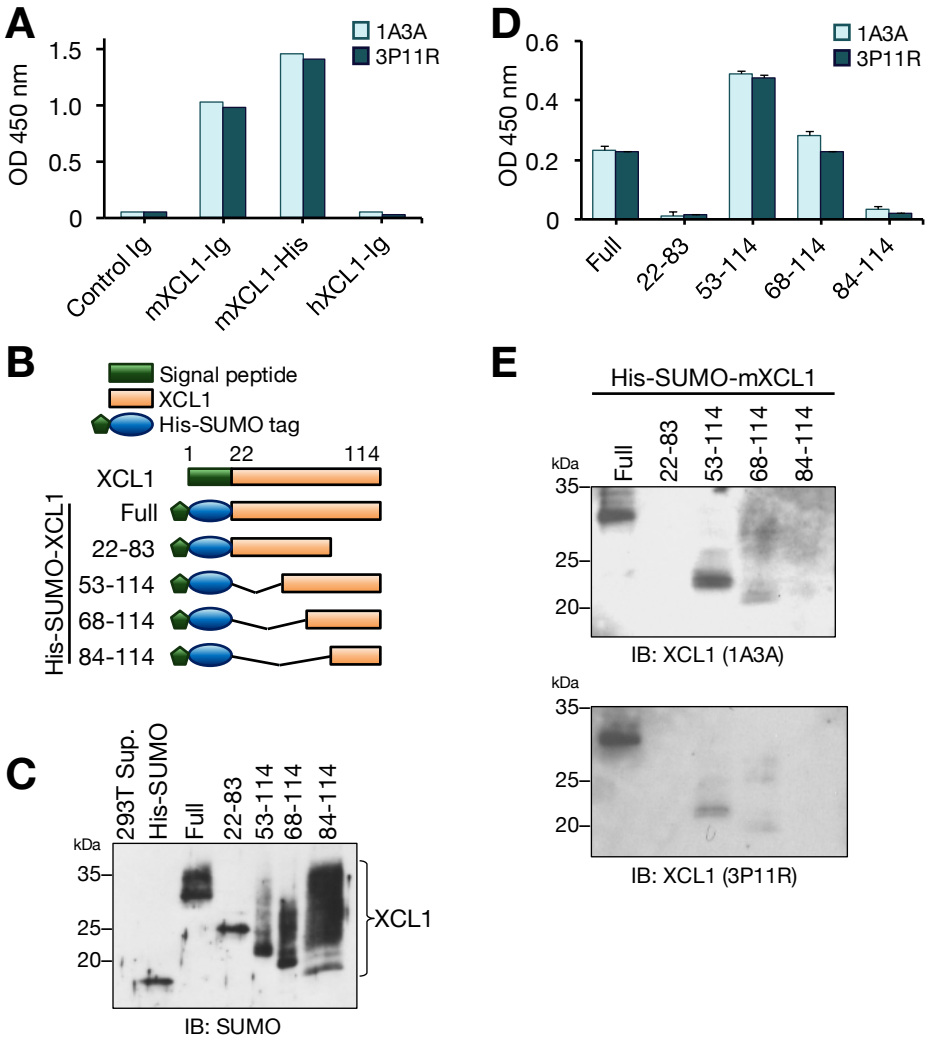


図 10. 抗マウス XCL1 モノクローナル抗体の作製
A) 得られたモノクローナル抗体の特異性をタグの異なるマウス XCL1 とヒト XCL1 を用いて検証した。 B) His-SUMO XCL1 バリアントの構築。 C) 構築した His-SUMO XCL1 バリアントを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、72 時間後に回収した培養上清中の His-SUMO XCL1 タンパク質をウェスタンブロットにて検出した。 D) His-SUMO XCL1 を含んだ HEK293T 細胞の培養上清と XCL1 モノクローナル抗体を用いて ELISA を行った。 E) His-SUMO XCL1 を含んだ HEK293T 細胞の培養上清と XCL1 モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

1-2-11　XCL1 抗体の細胞遊走能への影響

作製した抗マウス XCL1 抗体が中和能を有するのかを、細胞遊走試験を用いて確認した。XCL1 で亢進したα9 インテグリン発現細胞の遊走は、抗 mXCL1 抗体 1A3A の添加により抑制した。一方で、3P11R は細胞の遊走能に影響を及ぼさなかった (図 11A) 。1A3A による遊走能の抑制が抗体依存性の細胞傷害による細胞死の結果によるものか検証するため、細胞生存試験を行った。その結果、1A3A、3P11R は共に細胞障害を誘導しないことが明らかとなった (図 11B) 。これらの結果より、モノクローナル抗体 1A3A は、XCL1 とα9 インテグリンの相互作用を抑制する中和抗体であることがわかった。また、1A3A と 3P11R は同じサブクラスであったことから、1A3A を XCL1 中和抗体として、3P11R をそのコントロール抗体として今後の実験に使用することとした。

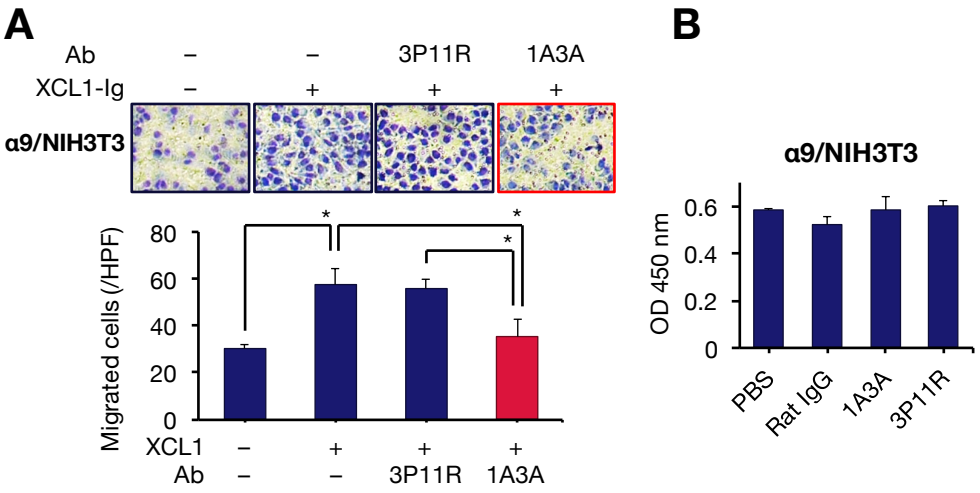


図 11. XCL1 モノクローナル抗体の細胞遊走における中和能の検証
A) XCL1 による α9 インテグリン発現細胞の遊走が XCL1 抗体により中和できるのかを検証した。
B) XCL1 抗体が抗体依存性細胞障害を誘導するのかを生存試験で検証した。

1-2-12　XCL1 中和抗体による CAIA 抑制効果

作製した抗マウス XCL1 抗体を用いて、XCL1 が CAIA の発症にどう関与するのかを検証した。XCL1 中和抗体 1A3A とコントロール抗体 3P11R を抗 II 型コラーゲン抗体カクテル投与の前日と 3 日後に投与し、症状の経過を観察したところ、XCL1 を中和した 1A3A 投与群では、コントロール抗体 3P11R 投与群と比較して関節炎重症度が有意に抑制されていることを確認した (図 12A) 。前述と同様にして後肢関節部位を H&E とサフラニン O で染色したところ、コントロール抗体投与群では見られた炎症細胞や滑膜線維芽細胞の浸潤、軟骨組織の破壊が、1A3A 抗体の投与により有意に抑制されていることがわかった (図 12B) 。これらのことより、XCL1 が CAIA の増悪化に関与する因子であることが示唆された。

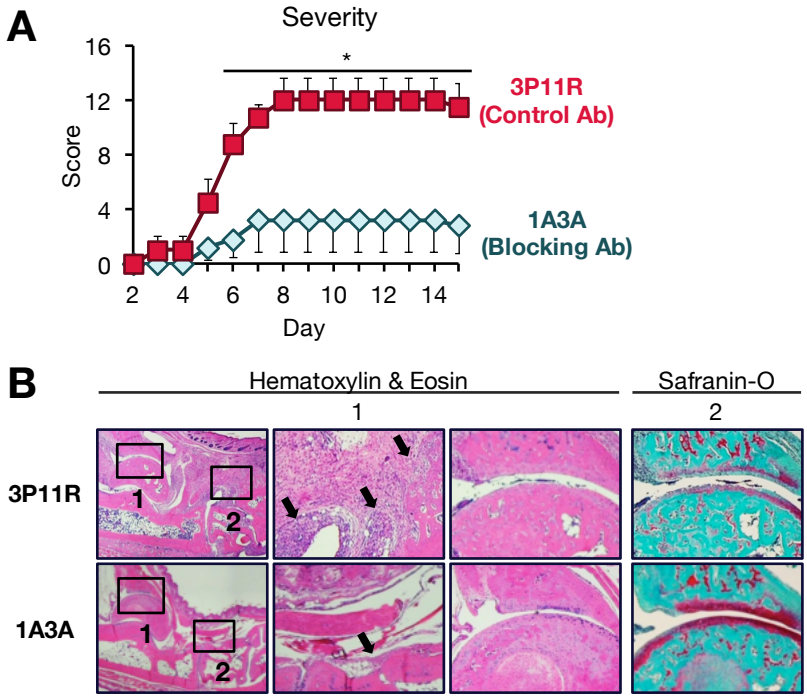


図 12. XCL1 モノクローナル抗体の細胞遊走における中和能の検証
A) CAIA マウスに抗 XCL1 抗体を投与し、症状の経過を観察した。
B) A のマウスから関節組織を採取し、H&E と Safranin-O により染色した。図中黒矢印は浸潤した炎症性細胞を示す。

1-2-13　XCL1 中和抗体による EAE 抑制効果

次に、α9 インテグリンが疾患増悪化に関与するもう一つの自己免疫疾患モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎 （EAE）を用いて、XCL1 の関与を検証した。EAE マウスに MOG ペプチドを投与し、7 日おきにマウスの脊髄から mRNA を調整して XCL1、XCR1、α9 インテグリンの発現量を比較した。その結果、XCL1 と XCR1 の発現は症状が進行するにつれて増加し、α9 インテグリンの発現は 7 日目の早期段階で増加することがわかった (図 13A) 。このことから、EAE においても XCL1 が増悪化に関与していることが示唆された。

次に、作製した XCL1 抗体を用いて EAE が抑制できるのかを検討した。EAE マウスに MOG ペプチドを投与する前日と 3 日後に PBS、XCL1 中和抗体 1A3A、コントロール抗体 3P11R を投与し、症状の経過を観察したところ、PBS と 3P11R 投与群では EAE の増悪化に差は無かったが、XCL1 中和抗体である 1A3A 投与群はコントロール抗体投与群と比較して症状の増悪化が有意に抑制された (図 13B)。このことから、EAE においても XCL1 が疾患発症に関与していることが示唆された。

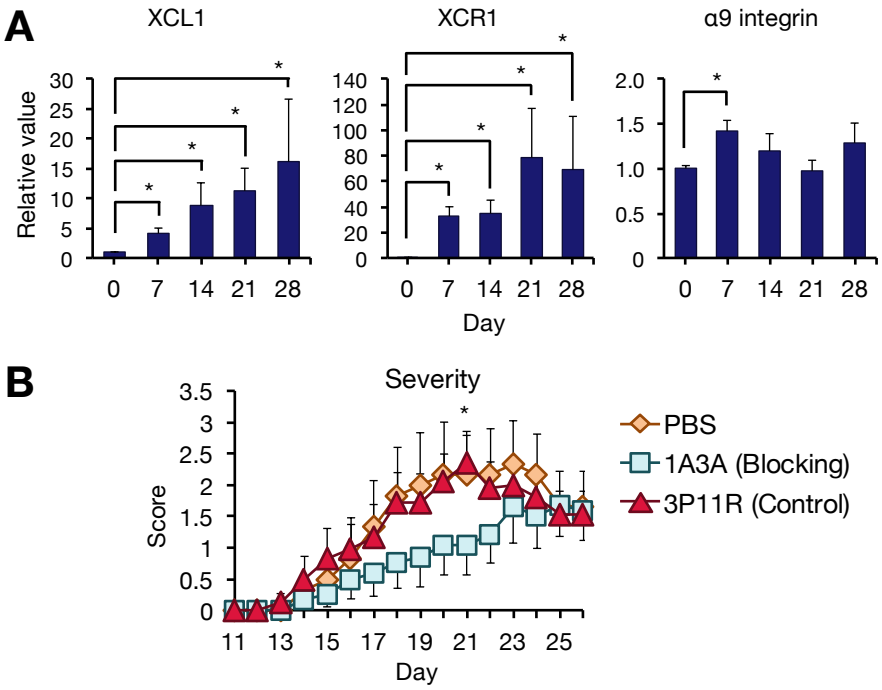


図 13. EAE における XCL1 の関与
A) EAE マウスの脊髄を、MOG ペプチドを投与後 7 日おきに採取し、XCL1、XCR1、α9 インテグリンの発現を解析した。 B) EAE マウスに抗 XCL1 抗体を投与し、症状の経過を観察した。

1-2-14　*ex vivo* 解析による生体内での XCL1-α9 インテグリン相互作用の検証

最後に、自己免疫疾患モデルにおいて、FLS の活性化は XCL1 が直接誘導するのか、さらにはその誘導がα9 インテグリンに依存的かを検証した。ここでは、CAIA の症状がピークを迎えたマウスの FLS を単離して解析を行った。FLS におけるα9 インテグリンと XCR1 の発現をフローサイトメトリーで確認したところ、CAIA の FLS は XCR1 を発現しておらず、α9 インテグリンが発現していることがわかった (図 14A) 。次に、FLS を XCL1 で刺激し、3 時間後の炎症性サイトカインの発現量を Real-time PCR を用いて解析した。その結果、CAIA の発症に関与する炎症性サイトカインである TNFα、TGFβ、IL-6、IL-1α、IL-1βが XCL1 刺激により増加することが明らかとなった (図 14B) 。さらに XCL1 刺激時にα9 インテグリン抗体を添加すると、これらの炎症性サイトカインの発現を抑制できることがわかった (図 14C)。これらの結果より、CAIA では XCL1 がα9 インテグリンを発現する FLS に作用し、炎症性サイトカインの発現を増加させることが示唆された。

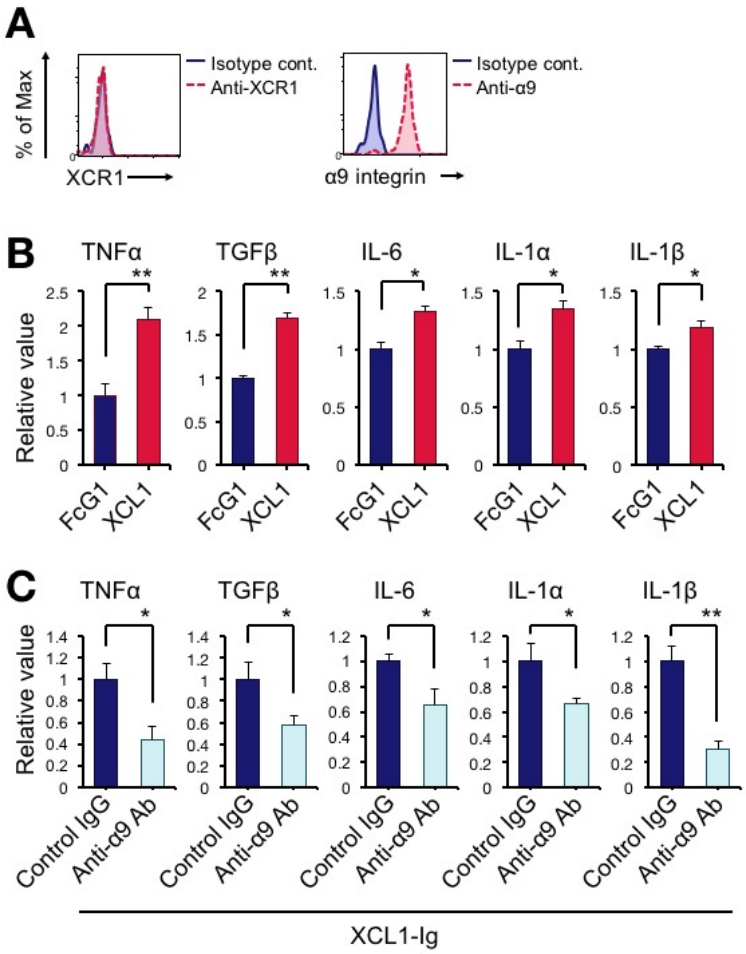


図 14. FLS における XCL1 と α9 インテグリン相互作用の機能検証
A) CAIA マウスから単離した FLS における XCR1 と α9 インテグリンの発現をフローサイトメトリーにより確認した。 B) FLS を XCL1 で刺激し、3 時間後における炎症性サイトカインの発現量を Real-time PCR により検証した。 C) FLS を XCL1 で刺激し、同時に α9 インテグリン抗体を添加して 3 時間後における炎症性サイトカインの発現量を Real-time PCR により検証した。

1-3　考察

α9 インテグリンは、気管上皮細胞、扁平上皮の基底層、平滑筋、骨格筋、肝細胞、乳房といった様々な組織や細胞に発現し (13, 30) 、黒色腫 (31) 、小細胞肺がん (32) といった癌細胞でも発現が確認されている。α9 インテグリンのリガンドとしては OPN (33, 34) や TN-C (35) 、pp-vWF (36) 、FN-EIIIA (37) 、Polydom (38) 等が知られる。OPN 欠損マウス (39) や OPN に対する中和抗体 (17) を用いた解析では、CAIA 抑制効果は、α9 インテグリン中和抗体を用いた場合よりも弱い (9) 。また当研究室ではその他のリガンドに対する抗体を用いて CAIA 抑制実験を行ったが、抗α9 インテグリン抗体よりも疾患抑制効果が弱いことがわかっている。そこで、本研究では自己免疫疾患に関与するα9 インテグリンの新規リガンド同定と、その機能解析を目的として研究を行った。

α9 インテグリンにはスプライシングバリアント SFα9 が存在し、内在性制御因子としてα9 インテグリン依存性の細胞接着能を亢進させる (21) 。SFα9 はα9 インテグリンのリガンド結合に重要な領域であるβプロペラ領域を有しながらも既知のα9 インテグリンリガンドとは結合しないことに着目し、SFα9 の結合分子を同定することで、α9 インテグリンの自己免疫疾患に関与する新規リガンドが同定できると考えた。そこで、SFα9 過剰発現細胞から、SFα9 を精製し 、LC-MS/MS 法による質量分析を行った。その結果、候補分子の一つとしてケモカインファミリーである XCL1 を見出すことができた (表 1) 。

XCL1 は二つのシステイン残基を有する C クラスケモカインで、$CD8^+$ T 細胞 (40, 41) 、$CD4^+$ T 細胞 (42) 、NK 細胞、NKT 細胞 (43, 44) 、γδ T 細胞 (45) 等の多くの免疫細胞や、胸腺髄質上皮細胞 (46) に発現することが報告されている。XCL1 には既知の受容体として G タンパク質共役受容体である XCR1 が報告されており (47) 、XCR1 を発現する $CD8\alpha^+$ DC 細胞の遊走能を亢進することが報告されている (42) 。また、ヒトにおいては XCL1 のホモログ XCL2 が存在し、両者ではわずか 2 アミノ酸の配列が異なっている (48) 。白血球遊走能を有するケモカインは炎症形成に強く関与していることからも、α9 インテグリンの自己免疫疾患における機能への関連が示唆される。また、α9 インテグリンは細胞外マトリックスの他にも VEGF といった分泌性因子とも相互作用することが報告されている (23, 24) ことから、分泌性ケモカインである XCL1 もα9 インテグリンと相互作用すると想定し、LC-MS/MS の結果を確認するため相互作用の検証を行った。

XCL1 と SFα9 との結合をプルダウンアッセイ法で確認したところ、XCL1 は SFα9 と結合することがわかった。また、予想通り XCL1 はα9 インテグリンとも結合したことから、XCL1 と XCL2 はα9 インテグリンと SFα9 の両方に結合する分子であることが明らかとなった。さらに、XCL2 もα9 インテグリンと SFα9 に結合することを確認したが、その結合能は XCL1 と比較すると弱かった (図 3A) 。これは、XCL1 と XCL2 の両者間で異なる 2 つの

アミノ酸がその結合に影響したと考えられる。過去の研究では、XCL2 がグリコサミノグリカンといった多糖への結合が XCL1 よりも若干強いことが報告されている (25) 。このことからも、XCL1 と XCL2 ではその機能が異なることが示唆される。今後は XCL1 と XCL2 でα9 インテグリンを介した機能にどのような違いが生じ、生体にどのような影響をおよぼすのかを検討する必要がある。ケモカインは G タンパク質共役受容体と結合し、細胞内シグナル伝達により間接的なインテグリンの機能制御に関与することが知られている (49, 50) 。近年、膜上に局在するケモカインである CX_3CL1 のケモカイン領域がαvβ3、α4β1、α5β1 インテグリンの活性化に直接作用することは報告されているものの (51) 、他のケモカインが同様の機能を有するかどうか、またα9 インテグリンにも機能的に作用するのか、そして直接的な相互作用が遊走能に影響するのかは未だ明らかにされていない。本研究は、インテグリンとケモカインの新たな相互作用を解明した。また、XCL1 はα9 インテグリンと同じファミリーに属するα4 インテグリンとは結合しなかったこと (図 3B) 、α9 インテグリンと XCL1 の相互作用は直接的であったことから、XCL1 がα9 インテグリン、SFα9 の新たな選択的なリガンドであることが示唆された (図 3D) 。

次に、XCL1 とα9 インテグリン相互作用の機能について解析を行った。好中球に発現するα9 インテグリンは、VCAM-1 に対する遊走能があることが報告されていること (52, 53) 、XCL1 が XCR1 を介して細胞遊走を亢進させる (28) ことから、XCL1 とα9 インテグリンの相互作用は細胞の遊走能に関与する可能性があると考えた。検証の結果、XCL1 がα9 インテグリン発現細胞の遊走を濃度依存的に亢進させることを明らかとした (図 4A) 。XCL1 によるα9 インテグリンの細胞遊走は、XCL1 濃度が 300 ng/ml の時に一番亢進し、濃度が 600 ng/ml になると 300 ng/ml の時より遊走能が減弱した。この二相性反応は他のケモカインにも存在する反応であることから (25) 、XCL1 がケモカインとしてα9 インテグリンと相互作用し、遊走能を亢進させることが示唆される。

XCL1 による遊走の亢進がα9 インテグリンを介して作用しているかを確認するため、α9 インテグリンの中和抗体である Y9A2、及びα9 インテグリン依存性の細胞遊走を抑制する Ba^{2+}を用いて遊走試験を行ったところ、α9 インテグリン中和抗体と Ba^{2+}の両者によって XCL1 による細胞遊走が抑制されたことから、XCL1 による細胞遊走の亢進はα9 インテグリンを介して作用することがわかった (図 4B, C) 。この細胞遊走の亢進は方向性を持つ Chemotaxis であり (図 5) 、内在性α9 インテグリン発現細胞にも作用することを確認した (図 6) 。これらの結果からも、XCL1 がα9 インテグリンの遊走能を亢進させる新規リガンドであることが示唆された。

しかしながら、XCL1 の既知の受容体である XCR1 を介した作用が存在する可能性も考えられた。そこで、α9 インテグリン発現細胞の XCR1 を shRNA でノックダウンすると XCL1 による遊走能に影響するのかを検討したところ、XCL1 誘導性の細胞遊走に XCR1 のノックダウンによる影響は見られなかった (図 7B) 。この結果により、これまでα9 インテグリン

発現細胞株で確認された XCL1 誘導性の遊走亢進が、XCR1 に非依存的であることが示唆された。

マウス関節炎モデルである抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (CAIA) において、α9 インテグリンが滑膜線維芽細胞 (FLS) に発現し、リガンドであるオステオポンチンやテネイシンとの相互作用により関節炎における初期炎症反応に関与することが報告されている (9)。本研究では、CAIA マウスの関節炎症状がピークの時、FLS では XCL1 の mRNA 発現量が増加することを解明し、さらにリコンビナント XCL1 を投与すると CAIA の疾患症状が増悪化することを明らかとした (図 8A, B, C) 。XCL1 により増悪化した CAIA は、抗α9 インテグリン抗体を投与することにより抑制されたことから、XCL1 がα9 インテグリン依存的に CAIA を増悪化させることが示唆された (図 9A, B) 。ヒト関節リウマチ患者の血清中では、XCL1 の濃度が上昇することが報告されていることから (54) 、ヒトにおいても XCL1 が関節炎に関与することが示唆される。

XCL1 の自己免疫疾患への関与をさらに検証するため、マウス XCL1 に対する中和抗体を作製した。得られた 2 つのモノクローナル抗体 1A3A と 3P11R はヒト XCL1 には反応を示さず、マウス XCL1 の C 末端領域 68 番目から 114 番目のアミノ酸配列中に認識部位が存在することがわかった (図 10A, D) 。さらに両者とも、XCL1 を 83 番目のアミノ酸で切断した場合ではどちらとも反応を示さなかったことから、XCL1 の C 末端領域がその構造に重要な領域であることが示唆される。さらにこの 2 つの抗体は、認識領域は同じであるにも関わらず、1A3A のみが細胞遊走を中和できる抗体であることを明らかとした (図 11A) 。今後はこの機能の差がなぜ生じるのかを、結合領域をさらに細かく解析し翻訳後修飾の影響も考慮して検討する必要がある。

本研究で作製したマウス XCL1 に対するモノクローナル抗体 1A3A と 3P11R を用いて、CAIA を行ったところ、中和能を有する 1A3A を投与することで疾患の増悪化が抑制された (図 12A, B) 。このことから、XCL1 が CAIA に深く関与する因子であることを明らかとした。さらに、α9 インテグリンが関与するもう一つの自己免疫疾患モデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における XCL1 の関与を検討したところ、XCL1、XCR1、α9 インテグリンの mRNA 発現量が EAE の症状が進行するにつれて増加することが明らかとなった (図 13A) 。さらに EAE マウスに作成した抗 XCL1 抗体を投与すると、CAIA と同様に中和抗体 1A3A を投与した群では疾患の症状が抑制された (図 13B) 。しかしながら、EAE では MOG ペプチド投与から 25 日後に中和抗体投与群とコントロール群で差が見られなくなった。これは、抗体の最終投与日から時間が経ったため、効力が失われた為だと考えられる。このことから、抗体を継続的に投与することで疾患抑制が持続する可能性がある。また、動物モデ

ルを用いた実験では XCR1 の関与も考えられる。今後は XCR1 の関与について検討するため、XCR1 の中和抗体作製を試みている。

最後に、生体内で XCL1 とα9 インテグリンの相互作用がどの細胞で生じるのかを検証した。ここでは、α9 インテグリンを発現し、CAIA で XCL1 の発現量が増加していた FLS に着目した。CAIA マウスから単離した FLS における膜上の XCR1 とα9 インテグリンの発現をフローサイトメトリーで確認したところ、過去の報告通り FLS はα9 インテグリンを発現しており、XCR1 は発現していないことを明らかとした (図 14A) 。さらに、XCL1 で刺激された FLS では TNFα、TGFβ、IL-6、IL-1α、IL-βといった CAIA の増悪化に関与する炎症性サイトカインの発現量が増加し、その増加は抗α9 インテグリン抗体により抑制された (図 14B, C) 。このことから、XCL1 は FLS に発現するα9 インテグリンと相互作用し、炎症性サイトカインの発現量を増加させることにより疾患の増悪化に関与することが示唆された。FLS には XCR1 が発現していなかったことからも、XCL1 がα9 インテグリン依存的に作用したことが考えられる。さらにこの結果から、XCL1 はα9 インテグリン発現細胞の遊走能を亢進させるのみならず、α9 インテグリンを介して FLS の炎症性サイトカイン発現量を増加させる因子であることが明らかとなった。CAIA では、FLS の他に滑膜浸潤マクロファージがα9 インテグリンを発現している (9) 。今後の実験では、CAIA マウスより単離した滑膜浸潤マクロファージを用いて、XCL1 に対する細胞遊走能や炎症性サイトカインなどの分泌促進などを検討する必要がある。

本研究により、α9 インテグリンの新規リガンドとして XCL1 を同定し、XCL1 とα9 インテグリンの直接的相互作用と作用機構を明らかとした。これまでケモカインはケモカイン受容体を介して間接的にインテグリンに作用することが知られていたが、本研究ではケモカイン受容体非依存的にインテグリンの作用に関与することを解明した。今後は、XCL1 とα9 インテグリンの結合領域をさらに細かく同定することで、作用機序の詳細と疾患治療の標的を解明したい。さらには、XCR1 の中和抗体や、α9 インテグリンとの相互作用をもたない XCL1 変異体、XCL1 とα9 インテグリンの相互作用を特異的に中和できる抗体を作製することにより、生体内における XCL1 の機能をより詳細に解析できると考えられる。また、XCL1 と XCL2 の両分子が卵巣癌上皮細胞に発現することは報告されているものの (55) 、未だに XCL1 と XCL2 の機能に関して詳細は解明されていない。本研究では XCL2 とα9 インテグリンの相互作用は XCL1 と比較すると若干弱いことを明らかとしている。今後はα9 インテグリンに着目した検討を進めることで、XCL1、XCL2 の機能的差異を見出すことができる可能性がある。さらには、作製した XCL1 中和抗体を用いて XCL1 が関与する自己免疫疾患への影響を検証することにより、新規疾患治療標的の発見に繋がることが期待される。

終章

本研究において、新規α9 インテグリンリガンドの同定と自己免疫疾患における機能解析に取り組み、以下の点を明らかにした。

- 質量分析法により XCL1 が新規α9 インテグリンリガンドであることを同定した。
- プルダウンアッセイにより XCL1、XCL2 とα9 インテグリンおよび SFα9 との結合を確認した。
- XCL1 はα9 インテグリン依存的に細胞遊走能を亢進させ、その遊走は方向性をもつ Chemotaxis であることを解明した。
- XCL1 は CAIA マウスにおける関節炎症状を増悪化させ、その増悪化はα9 インテグリン中和抗体を用いることで抑制できた。
- XCL1 に対するモノクローナル抗体 1A3A と 3P11R を作製し、1A3A が中和能を有することを明らかにした。
- XCL1 を中和することで、CAIA と EAE が抑制された。
- XCL1 は CAIA の FLS に作用し、炎症性サイトカインの発現量を増加させた。

本研究から、XCL1 がα9 インテグリンを受容体とする新しい作用機序があることを見出すことができた (図 15) (56)。本研究の大きな特色として、ケモカインとインテグリンとの直接的な相互作用を示したということにある。また、世界で初めて XCL1 の中和能を持つモノクローナル抗体の作製に成功したことも大きな成果である。抗 XCL1 抗体投与により、XCL1 がα9 インテグリンの自己免疫疾患に関与するリガンドであることを解明した。本研究が自己免疫疾患の新たな発症メカニズムの解明と、新規治療法の確立へ繋がることが期待できる。

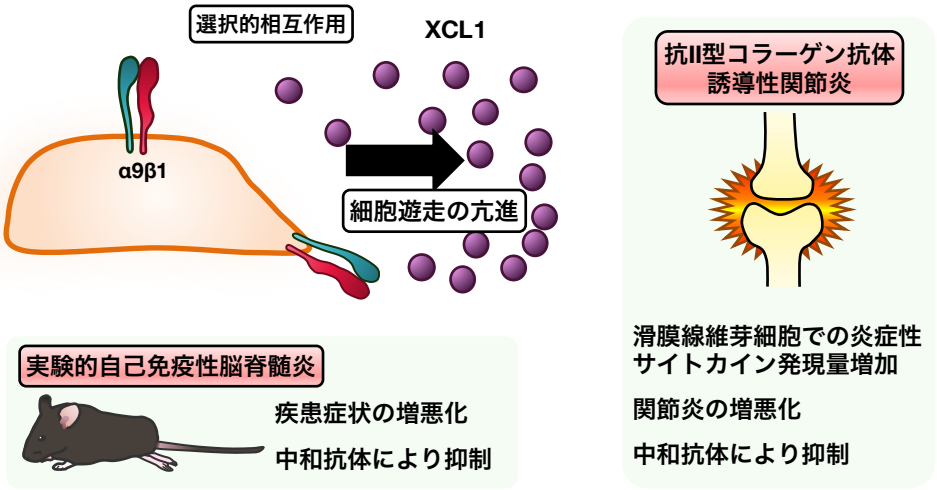


図 15. 本研究のまとめ

参考文献

1. Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687.
2. Arnaout, M. A., S. L. Goodman, and J. P. Xiong. 2007. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 495-507.
3. Luo, B. H., C. V. Carman, and T. A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 619-647.
4. Hood, J. D., and D. A. Cheresh. 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2: 91-100.
5. Aplin, A. E., A. K. Howe, and R. L. Juliano. 1999. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 737-744.
6. Soung, Y. H., J. L. Clifford, and J. Chung. 2010. Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. *BMB Rep* 43: 311-318.
7. Stupack, D. G., X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard, and D. A. Cheresh. 2001. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J. Cell Biol.* 155: 459-470.
8. Zhao, H., F. P. Ross, and S. L. Teitelbaum. 2005. Unoccupied alpha(v)beta3 integrin regulates osteoclast apoptosis by transmitting a positive death signal. *Mol. Endocrinol.* 19: 771-780.
9. Kanayama, M., D. Kurotaki, J. Morimoto, T. Asano, Y. Matsui, Y. Nakayama, Y. Saito, K. Ito, C. Kimura, N. Iwasaki, K. Suzuki, T. Harada, H. M. Li, J. Uehara, T. Miyazaki, A. Minami, S. Kon, and T. Uede. 2009. Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 182: 8015-8025.
10. Ito, K., J. Morimoto, A. Kihara, Y. Matsui, D. Kurotaki, M. Kanayama, S. Simmons, M. Ishii, D. Sheppard, A. Takaoka, and T. Uede. 2014. Integrin alpha9 on lymphatic endothelial cells regulates lymphocyte egress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 3080-3085.
11. Kouro, H., S. Kon, N. Matsumoto, T. Miyashita, A. Kakuchi, D. Ashitomi, K. Saitoh, T. Nakatsuru, S. Togi, R. Muromoto, and T. Matsuda. 2014. The novel alpha4B murine alpha4 integrin protein splicing variant inhibits alpha4 protein-dependent cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 289: 16389-16398.
12. Desgrosellier, J. S., and D. A. Cheresh. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10: 9-22.
13. Palmer, E. L., C. Ruegg, R. Ferrando, R. Pytela, and D. Sheppard. 1993. Sequence and tissue distribution of the integrin alpha 9 subunit, a novel partner of beta 1 that is widely distributed in epithelia and muscle. *J. Cell Biol.* 123: 1289-1297.
14. Huang, X. Z., J. F. Wu, R. Ferrando, J. H. Lee, Y. L. Wang, R. V. Farese, Jr., and D. Sheppard. 2000. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5208-5215.

15. Gupta, S. K., S. Oommen, M. C. Aubry, B. P. Williams, and N. E. Vlahakis. 2013. Integrin [alpha]9[beta]1 promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 32: 141-150.

16. Asano, T., N. Iwasaki, S. Kon, M. Kanayama, J. Morimoto, A. Minami, and T. Uede. 2014. alpha9beta1 integrin acts as a critical intrinsic regulator of human rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 53: 415-424.

17. Yamamoto, N., F. Sakai, S. Kon, J. Morimoto, C. Kimura, H. Yamazaki, I. Okazaki, N. Seki, T. Fujii, and T. Uede. 2003. Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 112: 181-188.

18. Kääriäinen, M., L. Nissinen, S. Kaufman, A. Sonnenberg, M. Järvinen, J. Heino, and H. Kalimo. 2002. Expression of α7β1 Integrin Splicing Variants during Skeletal Muscle Regeneration. *The American Journal of Pathology* 161: 1023-1031.

19. Armulik, A. 2002. Splice variants of human beta 1 integrins: origin, biosynthesis and functions. *Front. Biosci.* 7: d219-227.

20. Groulx, J.-F., V. Giroux, M. Beauséjour, S. Boudjadi, N. Basora, J. C. Carrier, and J.-F. Beaulieu. 2014. Integrin α6A splice variant regulates proliferation and the Wnt/β-catenin pathway in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 35: 1217-1227.

21. Kon, S., A. Atakilit, and D. Sheppard. 2011. Short form of alpha9 promotes alpha9beta1 integrin-dependent cell adhesion by modulating the function of the full-length alpha9 subunit. *Exp. Cell Res.* 317: 1774-1784.

22. Stromnes, I. M., and J. M. Goverman. 2006. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protoc.* 1: 1810-1819.

23. Vlahakis, N. E., B. A. Young, A. Atakilit, A. E. Hawkridge, R. B. Issaka, N. Boudreau, and D. Sheppard. 2007. Integrin alpha9beta1 directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 282: 15187-15196.

24. Vlahakis, N. E., B. A. Young, A. Atakilit, and D. Sheppard. 2005. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. *J. Biol. Chem.* 280: 4544-4552.

25. Fox, J. C., T. Nakayama, R. C. Tyler, T. L. Sander, O. Yoshie, and B. F. Volkman. 2015. Structural and agonist properties of XCL2, the other member of the C-chemokine subfamily. *Cytokine* 71: 302-311.

26. deHart, G. W., T. Jin, D. E. McCloskey, A. E. Pegg, and D. Sheppard. 2008. The alpha9beta1 integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 7188-7193.

27. Petrie, R. J., A. D. Doyle, and K. M. Yamada. 2009. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 538-549.

28. Yamazaki, C., R. Miyamoto, K. Hoshino, Y. Fukuda, I. Sasaki, M. Saito, H. Ishiguchi, T. Yano, T. Sugiyama, H. Hemmi, T. Tanaka, E. Hamada, T. Hirashima, R. Amakawa, S. Fukuhara, S. Nomura, T. Ito, and T. Kaisho. 2010. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397: 756-761.

29. Khachigian, L. M. 2006. Collagen antibody-induced arthritis. *Nat. Protoc.* 1: 2512-2516.

30. Mostovich, L. A., T. Y. Prudnikova, A. G. Kondratov, D. Loginova, P. V. Vavilov, V. I. Rykova, S. V. Sidorov, T. V. Pavlova, V. I. Kashuba, E. R. Zabarovsky, and E. V. Grigorieva. 2011. Integrin alpha9 (ITGA9) expression and epigenetic silencing in human breast tumors. *Cell Adh Migr* 5: 395-401.

31. Lydolph, M. C., M. Morgan-Fisher, A. M. Hoye, J. R. Couchman, U. M. Wewer, and A. Yoneda. 2009. Alpha9beta1 integrin in melanoma cells can signal different adhesion states for migration and anchorage. *Exp. Cell Res.* 315: 3312-3324.

32. Hibi, K., K. Yamakawa, R. Ueda, Y. Horio, Y. Murata, M. Tamari, K. Uchida, T. Takahashi, Y. Nakamura, and T. Takahashi. 1994. Aberrant upregulation of a novel integrin alpha subunit gene at 3p21.3 in small cell lung cancer. *Oncogene* 9: 611-619.

33. Smith, L. L., H. K. Cheung, L. E. Ling, J. Chen, D. Sheppard, R. Pytela, and C. M. Giachelli. 1996. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* 271: 28485-28491.

34. Yokosaki, Y., N. Matsuura, T. Sasaki, I. Murakami, H. Schneider, S. Higashiyama, Y. Saitoh, M. Yamakido, Y. Taooka, and D. Sheppard. 1999. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* 274: 36328-36334.

35. Yokosaki, Y., E. L. Palmer, A. L. Prieto, K. L. Crossin, M. A. Bourdon, R. Pytela, and D. Sheppard. 1994. The integrin alpha 9 beta 1 mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin. *J. Biol. Chem.* 269: 26691-26696.

36. Takahashi, H., T. Isobe, S. Horibe, J. Takagi, Y. Yokosaki, D. Sheppard, and Y. Saito. 2000. Tissue transglutaminase, coagulation factor XIII, and the pro-polypeptide of von Willebrand factor are all ligands for the integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1. *J. Biol. Chem.* 275: 23589-23595.

37. Liao, Y. F., P. J. Gotwals, V. E. Koteliansky, D. Sheppard, and L. Van De Water. 2002. The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* 277: 14467-14474.

38. Sato-Nishiuchi, R., I. Nakano, A. Ozawa, Y. Sato, M. Takeichi, D. Kiyozumi, K. Yamazaki, T. Yasunaga, S. Futaki, and K. Sekiguchi. 2012. Polydom/SVEP1 is a ligand for integrin alpha9beta1. *J. Biol. Chem.* 287: 25615-25630.

39. Yumoto, K., M. Ishijima, S. R. Rittling, K. Tsuji, Y. Tsuchiya, S. Kon, A. Nifuji, T. Uede, D. T.

Denhardt, and M. Noda. 2002. Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 4556-4561.

40. Kelner, G. S., J. Kennedy, K. B. Bacon, S. Kleyensteuber, D. A. Largaespada, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, J. F. Bazan, K. W. Moore, T. J. Schall, and et al. 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science (New York, N.Y.)* 266: 1395-1399.

41. Ordway, D., D. M. Higgins, J. Sanchez-Campillo, J. S. Spencer, M. Henao-Tamayo, M. Harton, I. M. Orme, and M. Gonzalez Juarrero. 2007. XCL1 (lymphotactin) chemokine produced by activated CD8 T cells during the chronic stage of infection with Mycobacterium tuberculosis negatively affects production of IFN-gamma by CD4 T cells and participates in granuloma stability. *J. Leukoc. Biol.* 82: 1221-1229.

42. Dorner, B. G., A. Scheffold, M. S. Rolph, M. B. Huser, S. H. Kaufmann, A. Radbruch, I. E. Flesch, and R. A. Kroczek. 2002. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 6181-6186.

43. Hedrick, J. A., V. Saylor, D. Figueroa, L. Mizoue, Y. Xu, S. Menon, J. Abrams, T. Handel, and A. Zlotnik. 1997. Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J. Immunol.* 158: 1533-1540.

44. Dorner, B. G., H. R. Smith, A. R. French, S. Kim, J. Poursine-Laurent, D. L. Beckman, J. T. Pingel, R. A. Kroczek, and W. M. Yokoyama. 2004. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 172: 3119-3131.

45. Boismenu, R., L. Feng, Y. Y. Xia, J. C. Chang, and W. L. Havran. 1996. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J. Immunol.* 157: 985-992.

46. Lei, Y., A. M. Ripen, N. Ishimaru, I. Ohigashi, T. Nagasawa, L. T. Jeker, M. R. Bosl, G. A. Hollander, Y. Hayashi, W. Malefyt Rde, T. Nitta, and Y. Takahama. 2011. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 208: 383-394.

47. Yoshida, T., T. Imai, M. Kakizaki, M. Nishimura, S. Takagi, and O. Yoshie. 1998. Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J. Biol. Chem.* 273: 16551-16554.

48. Yoshida, T., T. Imai, S. Takagi, M. Nishimura, I. Ishikawa, T. Yaoi, and O. Yoshie. 1996. Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin. *FEBS Lett.* 395: 82-88.

49. Shannon, L. A., P. A. Calloway, T. P. Welch, and C. M. Vines. 2010. CCR7/CCL21 migration on fibronectin is mediated by phospholipase Cgamma1 and ERK1/2 in primary T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 285: 38781-38787.

50. Till, K. J., K. Lin, M. Zuzel, and J. C. Cawley. 2002. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes.

Blood 99: 2977-2984.

51. Fujita, M., Y. K. Takada, and Y. Takada. 2014. The chemokine fractalkine can activate integrins without CX3CR1 through direct binding to a ligand-binding site distinct from the classical RGD-binding site. *PLoS One* 9: e96372.

52. Shang, T., T. Yednock, and A. C. Issekutz. 1999. alpha9beta1 integrin is expressed on human neutrophils and contributes to neutrophil migration through human lung and synovial fibroblast barriers. *J. Leukoc. Biol.* 66: 809-816.

53. Taooka, Y., J. Chen, T. Yednock, and D. Sheppard. 1999. The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J. Cell Biol.* 145: 413-420.

54. Blaschke, S., P. Middel, B. G. Dorner, V. Blaschke, K. M. Hummel, R. A. Kroczek, K. Reich, P. Benoehr, M. Koziolek, and G. A. Muller. 2003. Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48: 1858-1872.

55. Kim, M., L. Rooper, J. Xie, J. Rayahin, J. E. Burdette, A. A. Kajdacsy-Balla, and M. V. Barbolina. 2012. The lymphotactin receptor is expressed in epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell migration and proliferation. *Mol. Cancer Res.* 10: 1419-1429.

56. Matsumoto, N., S. Kon, T. Nakatsuru, T. Miyashita, K. Inui, K. Saitoh, Y. Kitai, R. Muromoto, J. I. Kashiwakura, T. Uede, and T. Matsuda. 2017. A Novel alpha9 Integrin Ligand, XCL1/Lymphotactin, Is Involved in the Development of Murine Models of Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* 199: 82-90.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導、御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 衛生化学研究室 松田 正教授、柏倉 淳一講師、室本 竜太講師、鍛代 悠一助教、ならびに福山大学薬学部 分子免疫学研究室 今 重之教授に深く御礼申し上げます。

本論文を審査していただきました北海道大学大学院薬学研究院臨床病態解析学の武田宏司教授、中川 宏治講師に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、実験手技の御指導を賜りました東京医科歯科大学 難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 生体防御学分野の金山 剛士助教、ならびに北海道大学大学院医学研究科 整形外科学分野 遠藤 努先生に深く御礼申し上げます。

研究面のみならず、様々な面においてお世話になりました衛生化学研究室の諸先輩方、後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後に、学生生活を支えていただきました、友人、家族に心から感謝いたします。

2017 年 7 月

著者