

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 6月 3日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790547

研究課題名（和文） Rap1 シグナルによる胚中心 B 細胞の動態調節の研究

研究課題名（英文） The role for Rap1 signaling in the trafficking of germinal center B cells

研究代表者

植田 祥啓 (UEDA YOSHIHIRO )

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90533208

研究成果の概要（和文）：

Rap1 シグナルの B 細胞の胚中心における役割を解析するために、正常型と Mst1 マウス・RAPL 欠損マウスの一次抗体応答と二次抗体応答を解析した結果、二次抗体応答が上昇していた。正常型 T 細胞と正常、LFA-1 欠損 B 細胞を RAG2 欠損マウスに移入して免疫し B 細胞の胚中心、記憶 B 細胞の形成能を検討したが変化がなかったため、Mst1 と RAPL における 2 次抗体応答の上昇は LFA-1 の機能とは独立した事象である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found that secondary antibody responses were enhanced in Rap1-effector RAPL and Mst1<sup>-/-</sup> mice. The fact that LFA-1<sup>-/-</sup> B cells showed normal germinal center and memory B cell generation suggests LFA-independent regulation of B cell response in enhanced antibody production of RAPL and Mst1<sup>-/-</sup> mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：獲得免疫、胚中心、動態、Rap1

## 1. 研究開始当初の背景

胚中心は抗原に対して高親和性の抗体を分泌する B 細胞を選択する重要な免疫装置である。胚中心（GC）における B 細胞の選択には胚中心 B 細胞と FDC や濾胞 T 細胞との相互作用が必須であり、胚中心 B 細胞の特有の動態がそれらの相互作用に重要であると示唆されている。しかしながら GC B 細胞の動態がどのように高親和性の B 細胞の選択過程、効率に関与するのかは未知であり、GC における親和性成熟の過程を明らかにする上で非常に重要である。興味深いことに胸腺の髄質における自己反応性の未熟 T 細胞も髄質内の高

速移動と胸腺上皮や樹状細胞と短い接着を繰り返すことが知られている。リンパ球の選択に特化された免疫器官においては、恒常的リンパ球の動態と接着とは異なる特殊な動態のプログラムが働いている可能性があり、GC の B 細胞の動態を追求することによりこれらの点を明らかにできる可能性がある。本研究室は低分子量 G 蛋白質 Rap1 そしてその下流のエフェクター分子である RAPL や Mst1 kinase (Mst1) が抗原やケモカインの刺激によるリンパ球のインテグリン活性化の過程を調節する鍵となる分子であることを突き止めた。RAPL や Mst1 の欠損マウスでは、T 細胞や B 細胞の HEV への接着低下によるホ

一ミグ異常によるリンパ節の低形成、T細胞やB細胞のリンパ節内の移動の低下、脾臓の辺縁帯B細胞の減少が観察され、Rap1シグナル経路がリンパ球の動態を調節していることを示した。またRAPL, Mst1シグナルはリンパ球の増殖にも関連していることが明らかになりつつある。

## 2. 研究の目的

本研究では細胞の動態を制御するRap1を介したシグナルが胚中心B細胞の細胞接着・移動をどのように調節しているのか、また、いかにRap1シグナルが高親和性B細胞選択過程に寄与するのかを以下の点に注目しながら明らかにする。

(1) Rap1, RAPL, Mst1を欠損(KO)させたマウス(KO)におけるGCの形成・抗体産生を測定することにより、抗体産生応答におけるRap1のシグナル経路の寄与を明らかにする。

(2) B細胞やFDC, T細胞を可視化して、2光子顕微鏡による生体イメージングにより胚中心内のGC B細胞の形態・動態の解析を行う。Rap1, RAPL, Mst1を欠損させたマウス由来のB細胞の形態・動態を追跡することにより、Rap1依存的なGC B細胞の形態・動態の過程を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 抗体産生応答に対するRap1シグナルの関与を明らかにするために、Rap1, RAPL, Mst1を欠損したマウスに免疫して誘導されるGCの形成、抗体産生の詳細な解析を以下に行った。RAPLKO, Mst1KOマウスに(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)に対する抗体産生応答を解析した。NPに対する抗体応答は優勢に選択されるBCRの組み合わせ(重鎖がV186.2, 軽鎖がλ1)や、優位なクラススイッチ(IgG1優性)、選択される体細胞突然変異によるアミノ酸置換(重鎖33番目TrpがLeuなど)が明らかになっており、抗原によるB細胞の活性化、選択、分化を追跡する上で有用である。そこでAlumをアジュバントとしてNP標識CGG(Chicken Gamma Globulin)を免疫し、責任リンパ器官におけるGCの形成、NIP抗原特異的な血中抗体価のキネティクスを測定した。

(2) B細胞のLFA-1は、B細胞とFDCとの接着や濾胞内・GCにおけるB細胞の移動に重要であると予測される。リンパ球のRAG欠損マウスにαLインテグリン(αL)を発現する正

常型のB細胞と欠損マウス由来のB細胞を正常型のT細胞とともに移入した。正常型のB細胞はCD45.1アロ抗原により区別した。この移入マウスにNP-CGGで免疫し、胚中心B細胞の割合を比較した。

(3) *in vivo*イメージングするためのレンチウイルス法の確立するために、骨髄幹細胞を単離して、αLインテグリンを挿入したレンチウイルスベクターにより作成したレンチウイルスを感染させ、目的の遺伝子を導入した。この骨髄幹細胞を用いて、ガンマ線照射したマウスを免疫再構築した。また、B細胞の活性化を可視化するためにc-RelとNFATがB細胞の活性化依存的に核移行が誘導されることを利用し、NFAT-GFPとcRel-GFPの発現ベクターを作製した。

## 4. 研究成果

Rap1シグナルのB細胞の胚中心における役割を解析するために、正常型とMst1・RAPL欠損マウスのalumをアジュバントとしてNP-CGGで免疫し、それに対する一次抗体応答を解析したが優位な差は見られなかった。しかし、Mst1欠損マウスでは胚中心細胞の割合が正常型に比べて低下していたため(図1)、これらの欠損マウス(特にMst1欠損マウス)において胚中心や記憶B細胞の形成等に影響があると考え、2次免疫応答を測定したところ、逆に上昇していた(図2)。

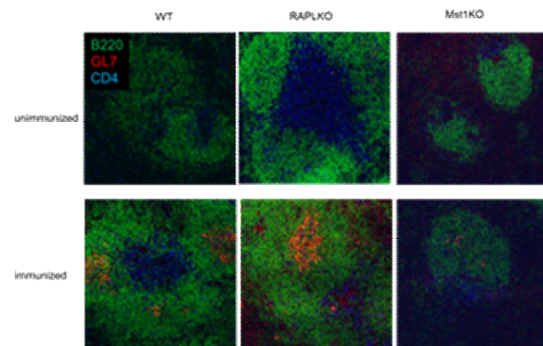


図1 Mst1, RAPL欠損マウスにおける胚中心B細胞の形成。緑がB220(B細胞マーカー)赤が胚中心B細胞に発現するGL7、青がヘルパーT細胞のマーカーであるCD4である。

この変化がB細胞に発現するLFA-1を介するかを検討するために、正常型T細胞と正常、LFA-1欠損B細胞をRAG2欠損マウスに移入してNP-CGGで免疫しB細胞の胚中心、記憶B細胞の形成能を正常型とLFA-1欠損と比較した。すると正常型とLFA-1欠損型で変わらなかった(図3)。

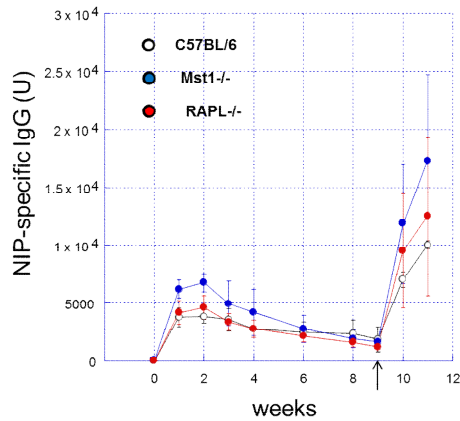


図 2 Mst1 または RAPL 欠損マウスにおける 1 次、2 次抗体産生応答。(赤)により二次抗体産生応答が増強される。矢印が 2 回目の免疫の時点を表す。

したがって、Mst1 と RAPL における 2 次抗体産生応答の上昇は LFA-1 の機能とは独立した事象である可能性が推測され、これらの分子のインテグリンの活性化以外の役割を検討中である。また、Mst1 に関しては Mst2 が Mst1 の役割を部分的に補う可能性があり、Mst1/2 の両方の影響を検討するために現在 B 細胞特異的

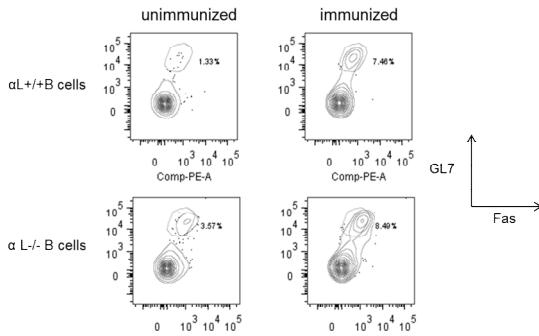


図 3 LFA-1 欠損 B 細胞は正常型と同様に胚中心 B 細胞に分化する。正常型、LFA-1 欠損型の B 細胞を正常型の T 細胞とともに RAG2 欠損マウスに移入して、免疫し胚中心 B 細胞の割合を測定した。GL7+Fas<sup>+</sup>陽性細胞が胚中心 B 細胞。

な Mst1;Mst2 のダブル欠損マウスを作製している。これらに加えて、flox 化された Rap1a; Rap1b マウスを樹立したので、B 細胞特異的 Rap1 欠損マウスを作製し、B 細胞における Rap1 欠損の影響を解析する予定である。

また、B 細胞の胚中心における機能的なイメージングを行うための実験システムを構築するために、B 細胞の蛍光活性化マーカーを作

製し、*in vivo* のナイーブ B 細胞に遺伝子導入する実験系を作製した。B 細胞の活性化には NF-κB のシグナルやカルシウムのシグナルが重要であるため、これらのシグナルを可視化するため c-Rel や NF-AT の蛍光マーカーを作製した。

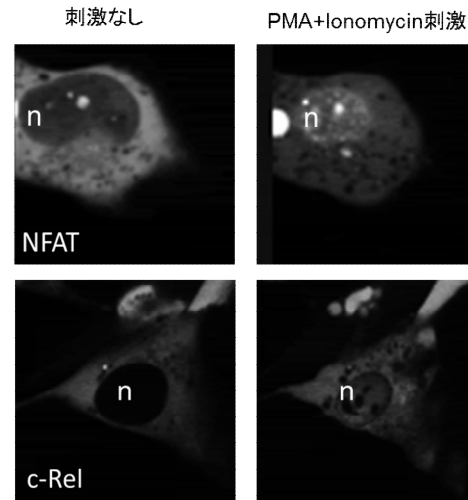


図 4 NFATc1GFP, cRel-GFP のベクターの作製。NFATc1-GFP, c-Rel-GFP を発現ベクターにクローニングし 293T 細胞あるいは NIH3T3 細胞に遺伝子導入後、PMA+Ionomycin で刺激すると刺激依存的に核移行が観察された。n は核。

*in vivo* の B 細胞にこれら目的遺伝子導入するためにレトロウイルスを用いた遺伝子導入法を確立した。骨髄から造血幹細胞を単離して、レトロウイルスベクターから作製したレトロウイルスにより標的遺伝子と融合させた蛍光タンパク質を導入して免疫再構築により、*in vivo* で B 細胞に標的遺伝子を発現させた。

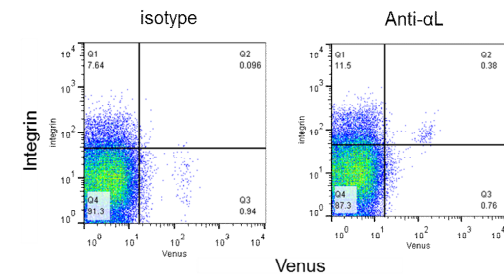


図 5 レトロウイルスベクターを用いた生体内の B 細胞への遺伝子導入。骨髄の造血幹細胞画分 (Lineage-SCA-1+CD34<sup>+</sup>細胞) にインテグリン αL をレンチウイルスを用いて遺伝子導入し、その幹細胞を用いてガンマ線照射した αL 欠損マウスを免疫構築した。移植した造血幹細胞由来の細胞が Venus によりラベルされ、anti-LFA-1 抗体によりインテグリン αL を発現していることがわかる。

また、インテグリンの活性化を可視化するために本研究室で作製した Rap1 の活性化の指標である Rap1sensor は、レトロウイルスによる導入では変異を起こしやすいのでマウスに導入するための遺伝子断片を作製している。

Mst1 や RALP 欠損マウスを用いた本研究により、Rap1 のシグナルが少なくとも部分的には T 細胞特異的な抗体産生応答に寄与していることが、明らかになった。また、蛍光プローブやレトロウイルスの遺伝子導入系な等、B 細胞の動態を直接観察する実験系を確立しつつあるので、これらを用いて Rap1 シグナルの B 細胞の胚中心における役割が明らかにすることが期待される

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ueda Y., Katagiri K., Tomiyama T., Yasuda K., Habiro K., Katakai T., Ikehara S., Matsumoto M, Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen-recognition in the thymus. *Nat. Commun.* 2012 Oct 2;3:1098. (査読有) (doi: 10.1038/ncomms2105.)

[学会発表] (計 3 件)

1. Ueda Yoshihiro, Crucial roles of LFA-1 regulation in thymocyte trafficking and antigen recognition by Mst1. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5 日～7 日、神戸国際会議場
2. Yoshihiro Ueda, Koko Katagiri, Takashi Tomiyama, Kaneki Yasuda, Katsuyoshi Habiro, Tomoya Katakai, Susumu Ikehara and Tatsuo Kinashi, Regulation of thymocyte trafficking and antigen recognition within thymic tissues through integrins and Rap1 effector Mst1, 40<sup>th</sup> keystone symposia, Breckenridge, USA, Jan .2012
3. Ueda Yoshihiro, Katagiri Koko, Tomiyama Takashi, Yasuda Kaneki, Habiro Katsuyoshi, Katakai Tomoya, Ikehara Susumu, Kinashi Tatsuo, Mst1 regulates thymocyte trafficking and antigen recognition within thymic

tissues. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba Japan, Nov. 2011

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

植田 祥啓 (UEDA YOSHIHIRO)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90533208

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：