

令和元年6月11日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08849

研究課題名(和文)細胞動態制御分子Rap1による胸腺制御性T細胞産生シグナルの時空間的制御

研究課題名(英文)Spatiotemporal regulation of thymic Treg production by Rap1GTPase

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫制御に重要な制御性T細胞の分化を検討するために胸腺で産生される制御性T細胞を生体に近い条件で誘導できる胸腺スライス培養系を確立した。この実験系により、制御性T細胞の分化の順序や抗原濃度による産生制御が明らかとなった。制御性T細胞の産生には髄質における胸腺上皮細胞と樹状細胞との接着が必要であると考えられているが確かめられていない。Rap1はリンパ球の接着を制御する分子で、Rap1を欠損する胸腺細胞をこの実験系で培養すると胸腺組織内移動が低下し、さらに抗原特異的な制御性T細胞の分化が阻害された。よってRap1を介した接着シグナルが制御性T細胞の分化を正に制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞は自己免疫や炎症の抑制、癌による免疫抑制に深くかかわっている。よって制御性T細胞を標的とした創薬は、上記の病気を克服するために重要である。本研究によりex vivoで制御性T細胞を誘導する系を確立したことにより、in vitroの実験系よりも生体に近い環境で制御性T細胞の産生を検討することができるようになった。この実験系を用いて制御性T細胞を標的とした抗体や低分子化合物の探索に応用できる可能性がある。また、この実験系を用いて胸腺細胞のRap1接着シグナルの阻害が制御性T細胞の産生を低下させることを明らかにし、制御性T細胞を標的する創薬の候補としてRap1シグナルの可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg) are crucial for various immune regulation but their development is still elusive. To track the development of thymic Treg, we established thymic slice culture system for induction of antigen-specific Treg even without additional cytokine supplements. This revealed the dynamics of thymic Treg development and its regulation by doses of antigen. Previous studies suggest the involvement of integrin-mediated adhesion and signaling in Treg production but were still unknown. We examined the Treg production of thymocytes deficient for Rap1, a master regulator of integrin activation, and found that Rap1-deficient thymocytes impaired migration within thymic tissues and fail to produce Treg efficiently, suggesting that Rap1-mediated integrin activation is vital for Treg-development.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 胸腺 インテグリン 組織培養 イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腺由来の制御性 T 細胞(Treg)は自己免疫やアレルギーなど過剰な免疫応答を抑制する重要な T 細胞サブセットであり、臨床への応用が期待されている。胸腺の Treg は抗原提示細胞とのコグネート相互作用により負の選択とともに誘導され、この過程は抗原レセプターからの死のシグナルと Treg への分化・生存のシグナルのバランスにより調節される。申請者はこのシグナルバランスに胸腺細胞の移動や接着が大きく関与すると予測した。本研究では細胞動態を制御する Rap1 シグナルによる胸腺細胞の細胞死と分化・生存のシグナルのバランス調節及び Treg の産生の制御機構を明らかにする。そのため、胸腺スライス培養系により Treg の産生を誘導、及びその過程を可視化する実験系を確立し、組織内ライブイメージングにより胸腺細胞の動態と共にその細胞死・分化・生存シグナル及び Treg の産生を時空間的に追跡する。

2. 研究の目的

胸腺の選択過程を詳細に解析するために、申請者は予備実験により、分取した胸腺細胞を胸腺組織スライス内で培養することによって、抗原特異的に細胞死及び Treg を誘導する実験系を確立した(右図)。この手法を用いることによって生体に近い条件下でかつ細胞の分化や活性化を同期させて直接解析を行うことができる。本研究はこの手法を活用し、胸腺 3 次元環境における胸腺細胞の運命決定の機序の解明のため、Rap1 シグナルによる調節機構に注目して以下の項目を中心に研究をおこなう。

- (1) 負の選択環境を再現した胸腺スライスと未熟胸腺細胞の共培養によってアポトーシスと Treg を誘導する実験系を確立し、その選択の過程を形質学的に解析する。
- (2) 胸腺スライス培養中の胸腺細胞集団のアポトーシス促進分子 Bim と Treg に必須の転写因子である c-Rel の発現・活性化のレベルを測定することで、細胞死シグナルと Treg の分化のシグナルのバランスと胸腺細胞の負の選択と Treg 産生の運命決定との関係を明らかにする。
- (3) 負の選択と Treg に重要な機能分子や転写因子の発現量、活性化を可視化して、胸腺組織内における細胞の動態・接着過程を明らかにする。
- (4) Rap1 および下流エフェクター分子の欠損マウスモデルや恒常活性化型の Rap1 導入マウスを用いて上記実験を行うことにより Rap1 が制御する細胞極性や接着、接着シグナルが負の選択や Treg を調節する機序を追求する。

3. 研究の方法

- (1) 胸腺スライス培養を用いて生体に近い条件下でかつ細胞の分化や活性化を同期させて負の選択と Treg を誘導する実験系を確立し、その過程を形質学的に解析する。
- (2) この培養系においてアポトーシス促進分子 bim と Treg に必須の転写因子である c-Rel の発現・活性化のバランスを比較することで、負の選択と Treg の産生にかかわる細胞集団の分布のダイナミクスを明らかにする。
- (3) Rap1 やその下流のエフェクター分子の欠損マウスや恒常活性化型 Rap1 変異体導入マウスを用いて上記の実験を行い、Rap1 シグナルが負の選択や Treg を調節する機序を追求する。

4. 研究成果

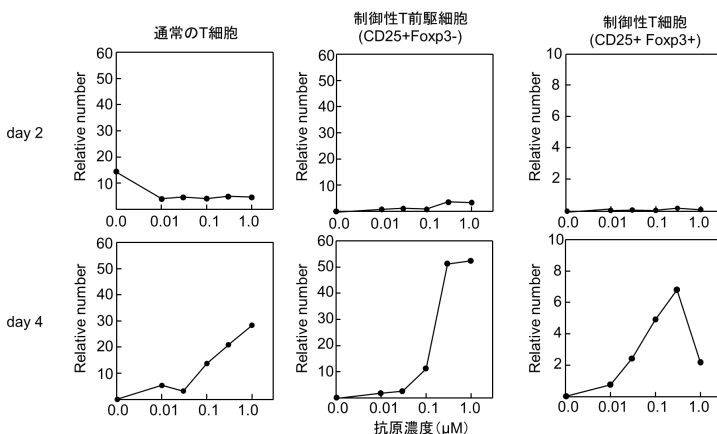


図 1 胸腺スライスに導入した胸腺細胞の、抗原濃度による制御性 T 細胞の産生調節

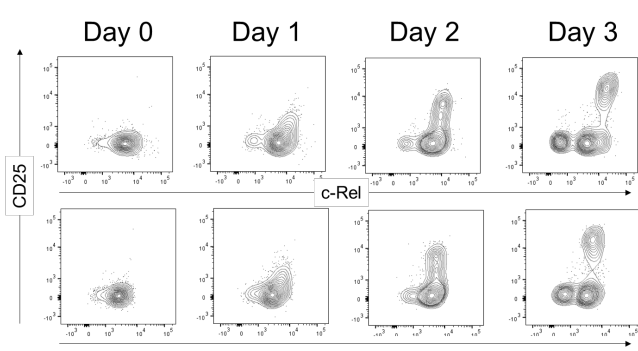
(1) 胸腺スライスを用いた制御性 T 細胞の誘導系の確立

胸腺スライス培養系を用いて制御性 T 細胞の産生を誘導する実験系を確立するために、OVA 特異的 T 細胞受容体を持つ OT-II マウスの胸腺から CD69+CD4 単陽性細胞を単離して、胸腺組織に導入し 0.03-1μM の OVA ペプチド存在下で 4 日間培養した。培養開始 1 日後、抗原存在下では細胞数が低下したことから負の選択が誘導されていることが示唆された。その後細胞数は 2 日目以降に抗原濃度依存的に増加した。制御性 T 細胞のマーカーとし

て CD25(IL-2 受容体 α 鎖)と Foxp3 がある。導入細胞の CD25 の発現は培養 1 日目から検出されたが、Foxp3 発現は抗原の濃度によらず一日目では観察されず、2 日後に検出され始め、3-4 日で急激に発現上昇が観察された。Foxp3 陽性細胞数は 0.3μM までは抗原濃度依存的に上昇したが 1μM では低下した(図 1)。3 日目以降の細胞数の Foxp3 陽性陰性ともに起こっていた。これらの結果は今までの制御性 T 細胞の分化の報告と一致するものであり、胸腺スライスにおける

制御性 T 細胞の分化の実験系が確立したと考えられた。

(2) 胸腺スライス培養によって誘導される制御性 T 細胞の産生における遺伝子制御

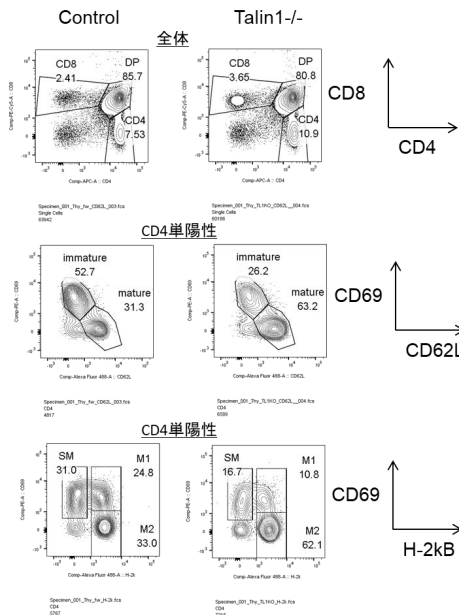


この実験系を用いて、制御性 T 細胞の分化のシグナルを明らかにするために、T 細胞の活性化指標である Nur77 の発現、CD25 の下流 STAT5 のリン酸化、および制御性 T 細胞分化に必須な cRel の発現を検討したところ Nur77 の発現は 1 日目に観察された。CD25 を発現細胞で STAT5 のリン酸化は 2 日目に、cRel の発現上昇は 3 日目に観察された(図 2)。cRel の上昇は IL-2R を発現していない導入細胞は起こらなかった。負の選択に重要なアポトーシス促進因子 Bim の発現は活性化によって 1 日目に CD25 陽性細胞に上昇がみられたものの cRel に比べて発現の上昇は小さかった。cRel の発現レベル

図 2 抗原存在下で胸腺スライスに導入した胸腺細胞の c-Rel および Bim の発現変化

の差が細胞死の感受性を決定している可能性がある。今後抗原濃度による影響を含め、詳細なキネティクスを検討する必要がある。

(3) 接着・動態制御分子 Rap1 - kindlin3 - Talin1 欠損における胸腺制御性 T 細胞の産生の影響



リンパ球におけるインテグリンの活性化には接着・動態制御分子 Rap1-kindlin3-Talin1 のシグナルカスケードが必須である。Rap1 シグナルの胸腺 T 細胞分化における役割を明らかにするために、T 細胞依存的な Rap1a/b の二重欠損マウス (Rap1 欠損マウス) とおよび下流のインテグリン活性化因子である kindlin3, Talin1 の T 細胞依存的な欠損マウスを作製し、胸腺における T 細胞の分化を測定した。その結果、これらの欠損により、DP 細胞の割合に対して CD69 陽性の CD4SP 細胞の割合、特に MHC class I 陽性 CD69 陽性の第一段階 (M1) の成熟 T 細胞の割合が低下することが明らかとなった(図 3)。また、CD69 陽性の低下は CD8SP 細胞でより顕著であった。以上のことから Rap1-kindlin3-Talin1 軸によるインテグリンの制御が CD4 および CD8 細胞の分化または生存に重要である可能性が示唆された。

図 3 Rap1 の下流分子 Talin1 の T 細胞特異的欠損マウスにおける胸腺細胞サブセットの解析

さらにこれらのマウスで胸腺における制御性 T 細胞の割合をさらに検討した。するとこれらのマウスでは CD4 単陽性 T 細胞に対する制御性 T 細胞の割合は大きく変わらなかった。しかしながら制御性 T 細胞の機能に重要な転写因子 Helios の発現を検討したところ、Rap1 欠損マウスにおける Helios の発現が低下し、それに伴い、GITR や CTLA4 の発現も低下していた。したがって、Rap1 欠損により制御性 T 細胞の質が変化している可能性が示唆された。

現を検討したところ、Rap1 欠損マウスにおける Helios の発現が低下し、それに伴い、GITR や CTLA4 の発現も低下していた。したがって、Rap1 欠損により制御性 T 細胞の質が変化している可能性が示唆された。

CD4 SP cells

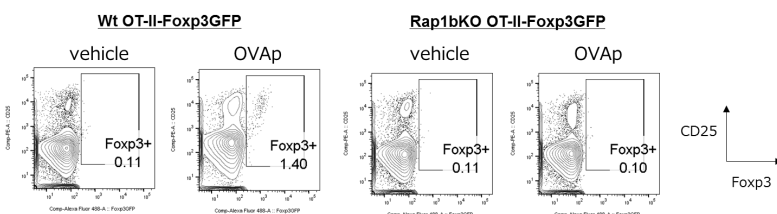


図 4 胸腺スライスに導入した Rap1b 欠損胸腺細胞の制御性 T 細胞の産生

制御性 T 細胞の質的な違いが観察されたため、Rap1 シグナルが制御性 T 細胞の産生に与える可能性を検討するために、卵白アルブミン (OVA) に特異的な TCR 遺伝子 OT-II と Foxp3 遺伝子が発現すると同時に GFP が発現する Foxp3-IRES-GFP を遺伝子導入した Rap1b 欠

損マウスを作成した。このマウスは OVA ペプチド(OVA)より刺激されて活性し、その結果制御性 T 細胞になって Foxp3 が発現すると GFP も発現するので、蛍光により制御性 T 細胞を検出

できる。この細胞から胸腺細胞を単離し、胸腺スライス培養系を用いて抗原存在下で制御性 T 細胞の産生能を検討した。その結果 Rap1 b 欠損により制御性 T 細胞の産生が顕著に低下することが明らかとなった。よって Rap1 欠損により、胸腺における制御性 T 細胞の産生異常が起きている可能性が示唆される。

(4) 接着・動態制御分子 Rap1 による胸腺細胞の動態制御

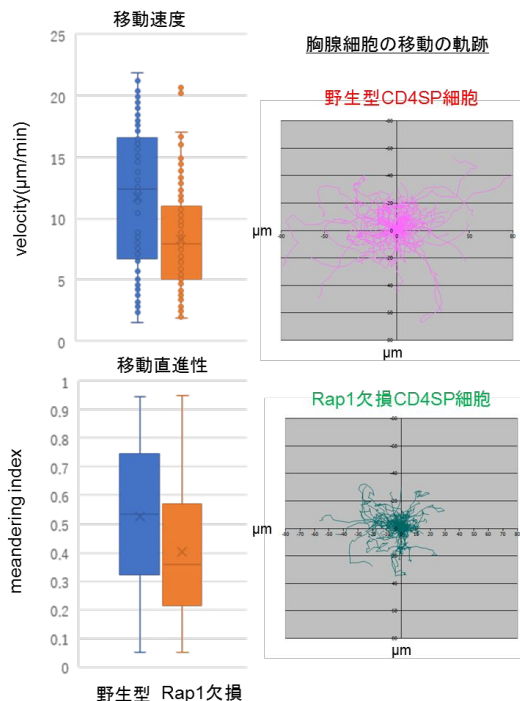


図5 胸腺スライスに導入した Rap1 欠損胸腺 CD4 単陽性 T 細胞の組織内移動の解析

Rap1 欠損マウスにおける胸腺細胞の制御性 T 細胞の産生低下にはインテグリン依存的な接着動態の異常が関与する可能性があると考えられたため、Rap1 欠損マウスから胸腺 CD4 単陽性 T 細胞を単離して蛍光ラベルし、胸腺スライスに導入してそれらの髄質における動態を 2 光子励起レーザー顕微鏡によるライブイメージングにより測定した。その結果、Rap1 欠損マウス由来の CD4 単陽性 T 細胞は野生型に比べ移動速度が低下し、また、移動の直線性が失われていた。したがって Rap1 欠損胸腺 CD4 単陽性 T 細胞は抗原探索の効率の低下が示唆された。

(5) まとめ

本研究では、免疫制御に重要な制御性 T 細胞の分化を検討するために胸腺で産生される制御性 T 細胞を生体に近い条件で誘導できる胸腺スライス培養系を確立した。この実験系により、制御性 T 細胞の分化の順序や抗原濃度による産生制御が明らかとなった。

制御性 T 細胞の産生には髄質における胸腺上皮細胞と樹状細胞との接着が必要であると考えられていたが確かめられていなかった。

動態接着制御分子 Rap1 を欠損する胸腺細胞をこの実験系で培養すると胸腺髄質の組織内移動が低下し、さらに抗原特異的な制御性 T 細胞の分化が阻害された。よって Rap1 を介した接着シグナルが制御性 T 細胞の分化を正に制御することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Konishi Y, Terai K, Furuta Y, Kiyonari H, Abe T, Ueda Y, Kinashi T, Hamazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda M. Live-Cell FRET Imaging Reveals a Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity Dynamics in Thymocyte Motility. *iScience*. 2018 Dec 21;10:98-113. doi: 10.1016/j.isci.2018.11.025. [査読有](#)

Mouri Y, Ueda Y, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, Kinashi T, Matsumoto M. Mode of Tolerance Induction and Requirement for Aire Are Governed by the Cell Types That Express Self-Antigen and Those That Present Antigen. *J Immunol*. 2017 Dec 15;199(12):3959-3971. doi: 10.4049/jimmunol.1700892. [査読有](#)

Kondo N, Ueda Y, Kita T, Ozawa M, Tomiyama T, Yasuda K, Lim DS, Kinashi T. NDR1-Dependent Regulation of Kindlin-3 Controls High-Affinity LFA-1 Binding and Immune Synapse Organization. *Mol Cell Biol*. 2017 Mar 31;37(8). pii: e00424-16. doi: 10.1128/MCB.00424-16. [査読有](#)

[学会発表] (計 10 件)

Ueda Y, Kondo N, Kamioka Y, Kinashi T. W747 talin1 binding site in cytoplasmic domain of the integrin beta2 subunit is crucial for T cell migration and activation The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2018. Fukuoka 2018/12/10

Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T. Roles of Rap1, Talin-1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2018. Fukuoka 2018/12/10

Kinashi T, Kondo N, Ueda Y, Kamioka Y. Rap1 signaling to NDR1 kinase regulate immune

synapse formation and cell polarity. The 9th Xiamen Winter Symposium, Xiamen. China. 2018/11/02

Kondo N, Ueda Y, Kinashi T. NDR1 acts as a molecular hub for the organization of immunological synapse. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 2017/12/14

Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T. Roles of Rap1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. Sendai 2017/12/14

Tanaka M, Fukuhara T, Lee S, Ren Y, Yao J, Takenouchi N, Ueda Y, Kinashi T, Jun-ichi Fujisawa Effects of Tax vaccine adjuvants in HTLV-1 humanized mice. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Yokohama 2017/09/28

田中正和, 福原貴太郎, 竹之内徳博, 任翊华, 姚錦春, 李成一, 植田祥啓, 木梨達雄, 藤澤順一 HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた感染予防ワクチンにおける組織病理学的検討. 第4回日本 HTLV-1 学会学術集会 Hirakata 2017/08/19

Ueda Y, Kondo N, Kinashi T 2016/12 Rap1-deficiency caused defective lymph node homing of lymphocytes and thymocyte-selection. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Okinawa 2017/12/12

Kondo N, Ueda Y, Kinashi T. High-affinity LFA-1/ICAM-1 binding triggers the reorganization of vesicular transport regulators to facilitate the maturation of immunological synapse The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2016. 2016/11

Tomiyama T, Fukuhara T, Uchida K, Ueda Y, Kinashi T, Okazaki K 2016/06 Hypermethylation of MST1 in type 1 autoimmune pancreatitis (AIP) GI Research, Tokyo, Japan

〔図書〕(計 1 件)

植田祥啓, 近藤直幸, 木梨達雄 2018/04 自己免疫疾患のイメージング：自己寛容の成立と維持における細胞間相互作用の可視化 臨床免疫・アレルギー科 69(4):318-325

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

関西医科大学・分子遺伝学部門 <http://www3.kmu.ac.jp/molgent/index.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。