

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570188

研究課題名（和文） RAPL-Mst1 シグナルによる細胞極性制御の分子機構

研究課題名（英文） Regulation of cell polarization by RAPL-Mst1 signaling

研究代表者 片桐 晃子 (KATAGIRI KOKO)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00322157

研究成果の概要：

免疫細胞の活発な生体内移動の基盤であるインテグリンを介する接着および遊走を制御する低分子量 G タンパク質 Rap1 会合分子 RAPL の下流で、Mst1 が細胞極性の形成に重要な役割を果たすことを見出した。Mst1 のノックアウトマウスを作製し、免疫細胞の動態への影響を *in vitro* 及び *in vivo* で定量解析し、Mst1 がケモカインを介する極性形成や遊走に重要な働きをすることを明かにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内・細胞間情報伝達、インテグリン、接着、遊走

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞は、全身を活発に移動しながら、外敵の侵入を監視している。この動的監視システムの基盤となっているのが、インテグリン LFA-1 を介する接着および遊走である。免疫細胞上に発現する LFA-1 の接着活性はケモカインや抗原の刺激によって速やかに上昇するので、リンパ球は生体内の必要とされる場所へ的確に移動することができる。従って LFA-1 の接着活性の制御がどのようになされているのか解明することは、動的な生体防御システムである免疫応答を理解する上で、重要であるが、十分明となっていない。

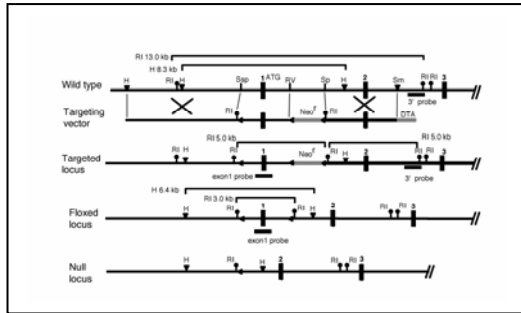
2. 研究の目的

4 次元的に厳密な制御を必要とする免疫細胞の生体内移動を支えている LFA-1 を介する接着および遊走を制御する分子機構を解明することが最終目標である。これまで我々の研究より、Rap1 及び会合分子 RAPL が LFA-1 の接着制御に重要な役割を果たすことを明らかとしてきた。Mst1 リン酸化酵素が RAPL の下流標的分子として LFA-1 を介する接着遊走に関与することを見出した。Mst1 のノックアウトマウスを作製し、*in vitro* において、Mst1 が接着カスケードのどのポイント

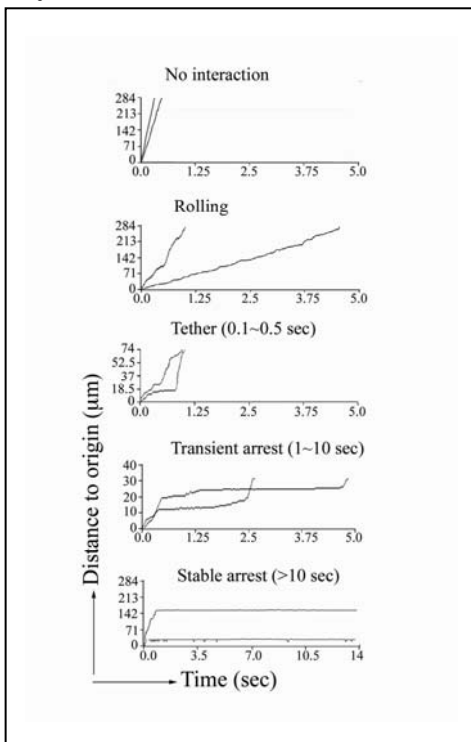
に機能するのかを解明するとともに、*in vivo* において、リンパ節内でのストローマネットワーク上での遊走に関与するかどうか明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) Cre-loxP システムによって、conditional knock out マウスを作製した。CAG-cre マウスと掛け合わせて、Exon1 を欠如させ、*Mst1* 欠損マウスを得た。



(2) *Mst1* 欠損マウスから得たリンパ球を用いて、*in vitro* において還流下で、血管内皮細胞との接着反応をビデオ撮影し、Metamorph ソフトウェアを用いて single cell tracking し定量解析した。血管内皮細胞として、I-selectin ligand となる糖鎖を発現するための糖鎖転移酵素を導入した LS12 細胞を用いた。ローリングは、0.1 秒以上停止することなく、血管内皮細胞に結合し減速した場合、0.5 秒以上停止したが 10 秒以内に脱接着した場合と「transient arrest」、10 秒以上停止した場合「Stable arrest」と分類した。

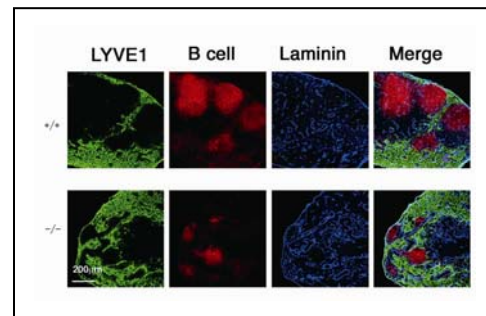


(3) リンパ節由来ストローマ細胞上での T および B リンパ球の遊走を Time Lapse 撮影し、同様に Metamorph ソフトウェアを用いて定量解析した。

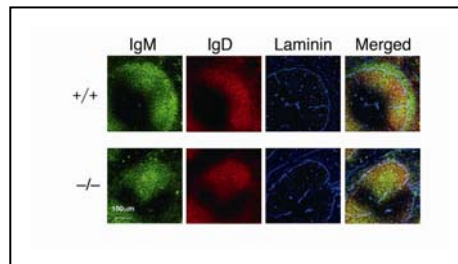
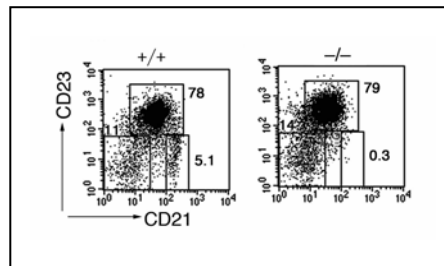
(4) 蛍光標識した T 或いは B リンパ球をマウスへ adoptive transfer し、リンパ節を取り出し、高酸素下で、リンパ節内でのリンパ球の interstitial migration を、2 光子顕微鏡を用いて測定した。Velocity ソフトウェアを用いて定量解析した。

4. 研究成果

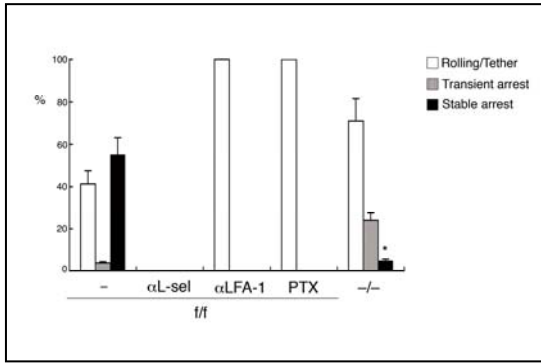
(1) *Mst1* 欠損マウスの 2 次リンパ組織であるリンパ節、脾臓は、低形成となり、T 細胞、B 細胞数とも 3 分の 1 に低下した。この原因として、2 次リンパ組織へのホーミング活性が低下しているためであることが、野生型および *Mst1* 欠損マウスより T および B リンパ球を取り出し、それぞれ異なる蛍光で標識し、adoptive transfer 1 時間後にリンパ節および脾臓を取り出し、リンパ組織への移行を定量することにより明らかとなった。



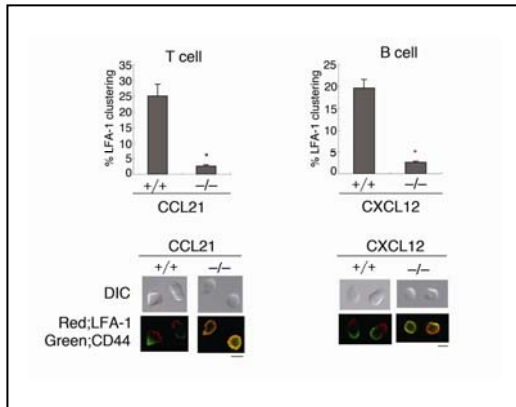
(2) 脾臓の白脾髄の marginal zone B 細胞は、その局在化にインテグリンを介する接着が重要であることが判明している marginal zone B 細胞が消失することがわかった。



(3) リンパ球のホーミング異常が、血管内皮細胞との接着反応によるのかどうか、また、その場合、多段階の接着カスケードのどのステップに異常があるのかを解析した。Mst1 欠損リンパ球のローリングに全く異常は認められなかった。また、1秒以下の停止も認められたが、接着は安定せず、脱接着することが判明した。このことから、Mst1 は、血管内皮細胞との安定した接着に重要であることがわかった。

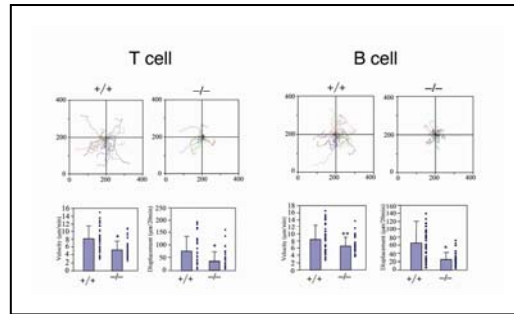


(4) Mst1 欠損リンパ球は、ケモカイン刺激によって誘導される LFA-1, VLA-4 を介する接着が低下していることと、さらに極性形成が損なわれていることが判明した。これに伴い、前方での LFA-1 クラスターの形成が誘導されず、ICAM-1 との接着点に Talin の集積が生じないことが判明した。このため、接着の安定性が低下したと考えられた。

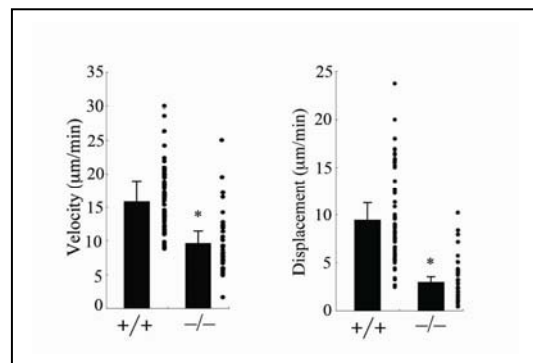
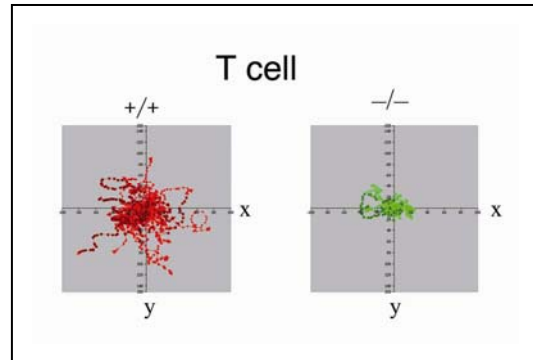


(5) Mst1 ノックアウトマウスにおいて、血液中における T 細胞の顕著な減少と、胸腺細胞数の増加が認められたので、胸腺からの成熟 T リンパ球の emigration に異常があるかどうかを、in vitro で胸腺を取り出し、培養液中のケモカイン ECL を加え、培地中に egress する single positive T 細胞数を測定した。Mst1 欠損胸腺細胞の emigration が顕著の低下していることが判明した。

(6) Mst1 欠損リンパ球において、極性形成の低下が認められたので、in vitro においてリンパ節由来のストローマ細胞上での遊走を検討したところ、velocity, displacement とも顕著に低下していることが判明した。



(7) 2光子顕微鏡を用いて、Mst1 欠損 T および B リンパ球のリンパ節内での遊走を解析したところ、in vitro での結果と同様に velocity, displacement とも顕著に低下していることが判明した。



Mst1 は、これまで in vitro においてアポトーシスの促進に関与することが示唆されているが、生体内での機能は全く明らかになっていなかった。本研究において初めて、免疫細胞において、Mst1 は動態制御に主要な役割を果たしていることが判明した。今後はさらに Mst1 がどのような分子機序で細胞極性形成を誘導し、インテグリンのクラスター形成を空間的に制御しているのかを解明する。これらの研究は、インテグリンを介する接着と遊走の調節機構の解明、そして免疫シ

システムの動態制御の分子機構の解明につながる。

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 2 件)

1 T. Katakai , H. Suto, M. Sugai, H. Gonda, A.Togawa , S. Suematsu, Y. Ebisuno, K. Katagiri, T. Kinashi, A. Shimizu. Organizer-like reticular stromal cell layer common adult secondary lymphoid organs. J.Immunol., 181:6189-6200, 2008.査読有

2 K.Katagiri, T. Katakai , Y. Ebisuno , Y. Ueda, T. Okada, T. Kinashi. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. EMBO J., 6: 1319-1331, 2009.査読有

[学会発表] (計 1 件)

1 片桐 晃子 他 ; Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. 、日本免疫学会 2008、12 月 1 日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片桐 晃子 (KATAGIRI KOKO)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00322157

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者