

令和元年6月19日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18253

研究課題名(和文)LFA-1活性化シグナルによる細胞外小胞排出機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of extracellular vesicle release mechanism stimulated by LFA-1 activatory signals

研究代表者

近藤 直幸 (KONDO, Naoyuki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30570840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答の初期過程では免疫細胞間相互作用に伴って免疫シナプス(IS)と呼ばれる細胞間超分子構造が効率の良いシグナル伝達のために形成される。この過程において、遺伝情報を含有する細胞外小胞(EVs)が接着面に集積することが現在までに報告されていたが、その制御メカニズムの詳細は不明であった。本研究ではリンパ球インテグリンLFA-1活性化因子欠損マウスを作製しそこから単離したT細胞を用いて、ISにおけるEVsの排出が接着面において部位特異的に起こり、それがRap1/RAPL/Mst1/NDR1/Kindlin-3を介したLFA-1活性化シグナル経路に依存してい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

本研究は、現在まで不明な点が多かったT細胞-抗原提示細胞間ISの細胞間情報伝達過程において、EVsが接着依存的に集積することで情報伝達に関与する可能性を示唆し、またその引き金の一つとしてインテグリンLFA-1の活性化シグナルが重要な働きを担うことを初めて解明した。この結果は、ISの破綻や過剰な活性化を伴う免疫不全やアレルギー疾患の新規標的として、LFA-1活性化シグナル経路が一つの有用な候補である可能性を示唆する。また本研究で確立した実験手法は、細胞内でのLFA-1活性やシグナル強度の分子レベルでの評価にも用いることが可能であり、新規薬剤の評価系としても応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：At the early stage of immune response, a supra molecular structure, immunological synapse (IS), is formed between immune cells for the efficient signal transduction. It has been reported that extracellular vesicles (EVs), which contain genetic information, are accumulated at contact plane of IS; however precise regulatory mechanism of EVs accumulation/release is still elusive. In this work, several mice deficient for activatory molecules of LFA-1, a leukocyte integrin, were constructed. Using T-cells isolated from these mice, it was revealed that release of EVs occurred at specific compartment at IS contact plane and that LFA-1 activatory signal cascade via Rap1/RAPL/Mst1/NDR1/Kindlin-3 was important for EVs accumulation/release.

研究分野：細胞生物学

キーワード：LFA-1 インテグリン Rap1 NDR1 Kindlin-3 一分子解析 免疫シナプス 細胞外小胞

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

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の分化や刺激依存的な免疫応答において、液性因子や細胞間の直接的接着を介した正確かつ効率のよいシグナル伝達が達成されていることは幅広く認知されていたが、近年 Exosome や Microvesicle を含むこれらの総称である細胞外小胞 (extracellular vesicles, EVs)もその情報伝達的一端を担うことが明らかになりつつある。例えば T 細胞においては、免疫応答の抑制作用を担う、制御性 T 細胞(Treg)やアナジー状態の T 細胞が排出する遊離の EVs が、エフェクター T 細胞の活性化に抑制的な効果を与えることが報告されている。

一方で、NK 細胞/キラー T 細胞-標的細胞間や、T 細胞-抗原提示細胞 (APC) 間で形成される超細胞間構造である免疫シナプス (immunological synapse, IS) においても、細胞接着面から EVs の積極的な放出が起こる。前者において EVs は cytotoxic granule と呼ばれ、アポトーシス誘導分子が標的細胞に EVs を介して送りこまれることにより、標的細胞の殺傷を達成する。一方、後者の T-APC 間で放出される EVs に関しては、IS の基本構造である 3 層からなる supra molecular activation complex (SMAC) 構造の内、TCR やその下流分子群が集積する中心部の central SMAC (cSMAC) が、TCR と非リン酸化下流因子を含む EVs の排出口になり T 細胞から APC へ放出されることが近年の研究から明らかになったが、その制御機構については未解明の点が多かった。

細胞接着分子インテグリン LFA-1 は免疫細胞間の接着や IS の形成にも重要な働きをする分子であり、IS 上では cSMAC の周りにドーナツ型の peripheral SMAC (pSMAC)を形成する。以前の研究から申請者らは LFA-1 とそのリガンド ICAM-1 の結合を IS 上で一分子計測する実験系を開発(科研費若手(B) H27-28)し pSMAC 上の特異的な部位に特に結合時間の長い”活性型”LFA-1 が存在することを明らかにした。また興味深いことに活性型 LFA-1 を増加させる試薬の添加により pSMAC 領域のみならず cSMAC 領域も拡大することを発見したが、その EVs への効果やシグナル経路の詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、LFA-1 活性化シグナルが cSMAC の形成や IS 上での EVs の放出に必要なのか、また具体的にどのようなシグナル経路を介してこれらの過程が制御されているかを解明することを主要な目的とする。そのために EVs のマーカーと LFA-1 活性化シグナルを減弱させた T 細胞を用いて IS 解析・EVs 排出解析等を行い、LFA-1 活性化と EV 排出の間の missing link を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

LFA-1 変異体を発現する T 細胞や LFA-1 活性化を制御する低分子量 G タンパク質 Rap1 とその関連因子群を欠損/ノックダウン(KD)した T 細胞を作製し、申請者らが確立した平面脂質二重膜を用いた IS 解析系を中心に据え cSMAC 形成に必要な LFA-1 活性化因子群の検討を行った。またテトラスパニン CD63 を GFP で標識した融合タンパク質を EVs のマーカーとしてレンチウイルスベクターを用いて T 細胞に発現させ、IS 上での EVs の局在の可視化とその LFA-1 活性化シグナルによる影響を作製した細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

Rap1 欠損 T 細胞、活性型 Rap1 と結合する RAPL の KD T 細胞、その下流のキナーゼである Mst1 欠損 T 細胞、Mst1 のリン酸化標的物質の一つである NDR1-KD T 細胞や LFA-1 の活性型構造を安定化する Kindlin-3 欠損 T 細胞をノックアウトマウスから単離または作製し、

これらの IS 形成解析を行ったところ、これら全てにおいて cSMAC と pSMAC の両者の形成が低下することが明らかになった(図 1) . また LFA-1-ICAM-1 結合の一分子計測系を用いて作製した T 細胞の接着時の LFA-1 の活性化の程度を測定したところ、野生型に比べてすべての細胞において LFA-1 の活性化が低下していることが確認された .

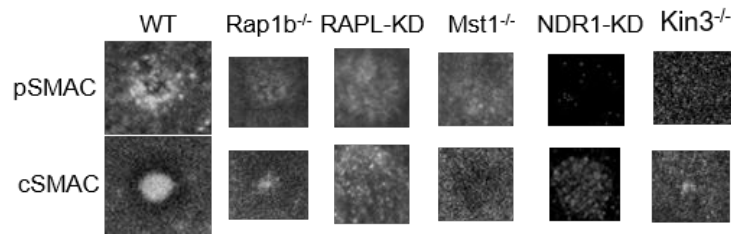


図 1 . IS 形成時の LFA-1 活性化因子の影響

また、生化学的解析と 3 次元 IS 解析から、Rap1 下流の Mst1 による NDR1 のリン酸化が RAPL/Mob1 により増強されること、NDR1 と Kindlin-3 が直接結合し接着面へリクルートされることにより LFA-1 が活性化され IS の形成を誘導することを見出した (図 1 , 2) .

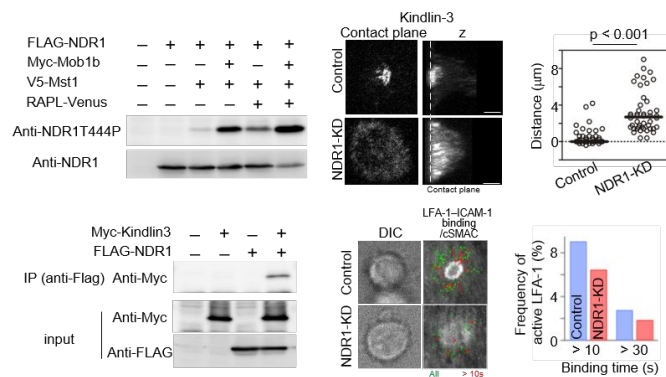


図 2 . Mst1 下流分子群は NDR1 のリン酸化を増強し、Kindlin-3 の接着面へのリクルートと LFA-1 の活性化を促進する

さらに本研究において作製した変異型 LFA-1 ノックイン(W747A)マウスから単離した T 細胞に CD63-GFP を発現させ、IS 上での CD63 の集積を野生型と比較した。野生型では CD63 は接着面での cSMAC 近傍の領域に集積することが高解像度イメージングにより初めて明らかになった。また変異による LFA-1 活性の低下により CD63 の接着面への集積は減弱した(図 3) .

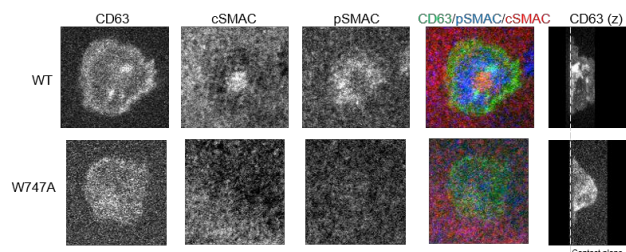


図 3 . CD63-GFP の IS 上での局在と LFA-1 活性化の影響

以上のことから Rap1-Mst1-NDR1-Kindlin-3 のシグナル経路が LFA-1 の活性化とそれに伴う cSMAC, pSMAC の形成, EVs の放出を増強することが明らかになった。今後本研究で作成した多くの材料と実験系を活用し EVs 排出マシナリーと LFA-1 活性化シグナルとの繋がりをさらに明らかにしていく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

植田祥啓, 近藤直幸, 木梨達雄 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. 2018. 査読無

Kondo N. et al. NDR1-dependent regulation of Kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. *Molecular and Cellular Biology* 37 e00424-16. 2017. “Selected as SPOTLIGHT” 査読有

[学会発表](計8件)

Kondo N. and Kinashi T. LFA-1 を介したリンパ球細胞接着の一分子解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月30日 パシフィコ横浜(神奈川県)ポスター発表

Ueda Y., Kondo N., Kamioka Y. and Kinashi T. W747 talin1 binding site in cytoplasmic domain of the integrin beta 2 subunit is crucial for T-cell migration and activation 第47回日本免疫学会・学術集会 2018年11月11日 福岡国際会議場(福岡県)口頭・ポスター発表

Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N and Kinashi T. Role of Rap1, Talin-1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing and mucosal lymph nodes 第47回日本免疫学会・学術集会 2018年11月11日 福岡国際会議場(福岡県)口頭・ポスター発表

Kinashi T., Kondo N., Ueda Y. and Kamioka Y. Rap1 signaling to NDR1 kinase regulate immune synapse formation and cell polarity. The 9th Xiamen winter meeting Nov 3, 2018, Wanda Realm Xiamen North Bay (Xiamen, China), oral presentation (invited)

Kondo N., Matsuda Z., Masui R. and Kuramitsu S. Thermus protein as versatile tools for detailed analysis of functionally unknown protein and efficient protein production. International workshop on 50th anniversary of Thermus Thermophilus discovery Sep 29, 2018, Atagawa-Heights training center (Shizuoka, Japan) poster presentation

Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N and Kinashi T. Role of Rap1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral lymph node 第46回日本免疫学会・学術集会 2017年12月14日 仙台国際センター(宮城県)口頭・ポスター発表

Ueda Y., Kondo N., Kamioka Y. and Kinashi T. Regulation of cell polarization by Rap1 via NDR/Rab8 axis upon chemokine stimulation 第46回日本免疫学会・学術集会 2017年12月12日 仙台国際センター(宮城県)ポスター発表

Kondo N., Ueda Y. and Kinashi T. NDR1 acts as a molecular hub for the organization of immunological synapse 第46回日本免疫学会・学術集会 2017年12月14日 仙台国際センター(宮城県)口頭・ポスター発表

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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。