

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07554

研究課題名(和文) 動態制御シグナルRap1によるNKT細胞の産生の時空間的制御

研究課題名(英文) Spatiotemporal regulation of NKT cell production by Rap1 GTPase

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：インバリエントNKT(iNKT)細胞は脂質を認識するT細胞でがん免疫を調節する。この研究では、ノックアウトマウスモデルを用いて動態制御分子Rap1欠損マウスにおける胸腺のiNKT細胞産生を解析した。Rap1欠損によりNKT細胞が低下した。また、Rap1欠損マウスを免疫してNKT細胞のサイトカイン産生を検討すると、Rap1欠損NKT細胞ではサイトカイン産生がほとんど見られなかった。よってRap1シグナルが、胸腺のNKT細胞産生と末梢のNKT細胞活性化に重要な役割を持つことが明らかとなった。以上よりRap1の新たな機能が明らかとなり、NKT細胞を標的とした創薬に応用される可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NKT細胞は多くの人間で共通のT細胞受容体によりCD1dに提示された脂質を認識する自然T細胞で脾臓・肝臓・肺や腸組織に常在して、組織の炎症反応やがん免疫を制御していると考えられている。本研究により、接着動態シグナル分子であるRap1が胸腺におけるNKT細胞の分化や末梢における活性化を調節することが明らかになった。これにより、NKT細胞応答を制御する炎症やがんの新規の分子標的薬の開発が期待される。このようなNKTを標的とした治療薬は、TCR多様性が少なく多くの患者で共通である利点があり、効率性かつ有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Invariant NKT cells are a special subset of t cells to recognize fatty antigen and essential role for tumor immunity. In this study, We investigate the role of small GTPase Rap1 in NKT cell production and activation. By using knockout animal model, we found that Rap1 deficiency reduced NKT cells without TCR repertoire alteration in the thymus. Rap1 deficiency also required for activation of the periphery in response to alpha-Galactosylceramide. These data indicate Rap1 is required for NKT cell production and activation.

研究分野：免疫学

キーワード：Rap1 胸腺 NKT

1. 研究開始当初の背景

NKT細胞は多くの人間で共通のT細胞受容体によりCD1dに提示された脂質を認識する自然T細胞で脾臓・肝臓・肺や腸組織に常在して、組織の炎症反応やがん免疫を制御していると考えられている。本研究では、NKT細胞の分化および活性化におけるリンパ球の接着と移動を調節する分子Rap1の欠損の影響を検討することで、Rap1によるNKT細胞の分化や活性化における接着・動態制御ポイントが明らかとする。これにより、NKT細胞応答を制御する炎症やがんの新規の分子標的薬の開発が期待される。このようなNKTを標的とした治療薬は、TCR多様性が少なく多くの患者で共通である利点があり、効率性かつ有用性が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、胸腺におけるNKT細胞の分化・移動・活性化におけるRap1シグナルの役割を、接着を介したT細胞受容体シグナル制御によるTCRレパトア調節および細胞間接着・組織間移動による時空間的な分化・活性化調節の観点から明らかにすることを目的とする。さらに、これらRap1欠損によるNKT細胞の破綻が末梢のNKT細胞応答に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

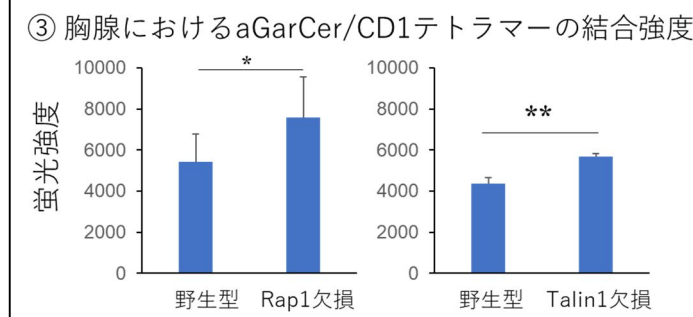
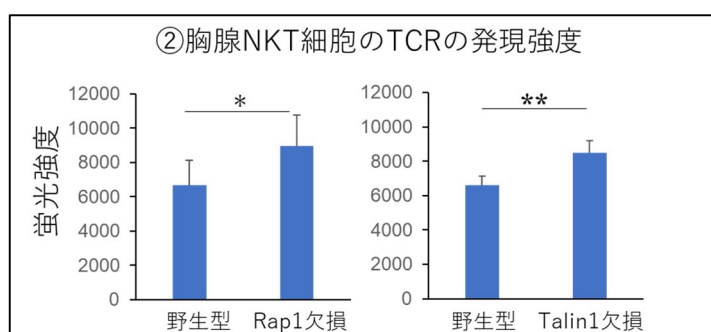
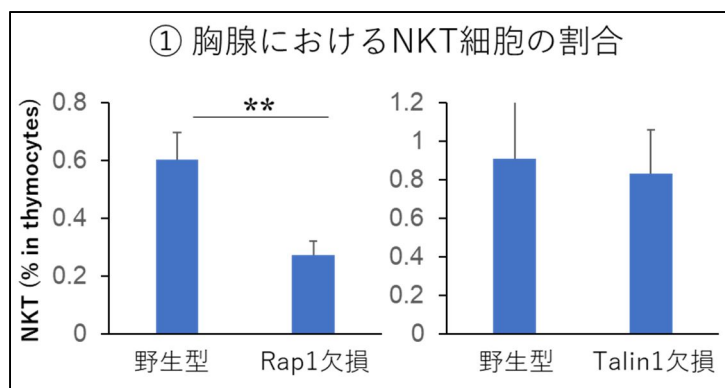
(1) Rap1シグナル改変マウスの胸腺NKT前駆細胞やNKT細胞サブセットやその局在を詳細に検討する。またこれらのマウスにおけるNKTのレパトア形成を検討する。

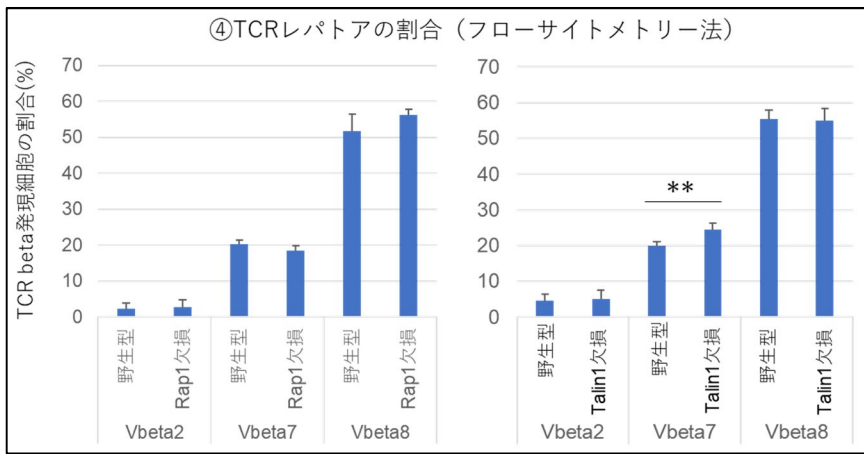
(2) Rap1シグナル改変マウスにおける末梢のNKTの活性化を測定することでこれらのRap1シグナルの破綻が末梢のNKT細胞応答に与える影響を検討する。

4. 研究成果

iNKT細胞の産生におけるRap1の役割を検討するためにRap1欠損マウスの胸腺に存在するiNKT細胞をNK1.1およびβ-ガラクトシセラミドのアナログを導入したCD1dテトラマーにより測定したところ、iNKT細胞の割合が半分に低下することが明らかとなった(図)。また、Rap1欠損マウスのiNKT細胞は野生型に比べてT細胞受容体(TCR)の表面発現およびCD1dテトラマーの結合強度が上昇していた(図)。このことはRap1によりiNKT細胞の分化やレパトアが調節されている可能性を示唆すると考えられる。

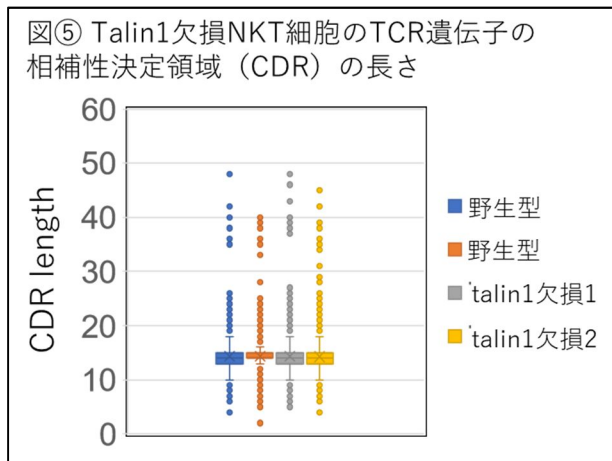
Rap1はTalin1を活性化し接着分子インテグリンの鎖への結合を促進させることでインテグリンを活性化し、細胞間接着やシグナルを誘導する。Rap1欠損によるiNKT細胞の変化においてインテグリンシグナルにどうかを調べるために、Talin1欠損マウスにおけるiNKT細胞の割合を検討したところ、変化しなかったことからRap1によるiNKT細胞の産生低下はインテグリンシグナル以外の経路が関与す





る可能性が考えられる(図)。一方、Talin1 欠損マウス由来の iNKT 細胞は、Rap1 欠損マウス由来の iNKT 細胞と同様に、TCR の表面発現および CD1d テトラマーの結合強度が上昇していたことから、これらの変化にはインテグリンシグナル調節が重要である可能性が示唆された(図)。

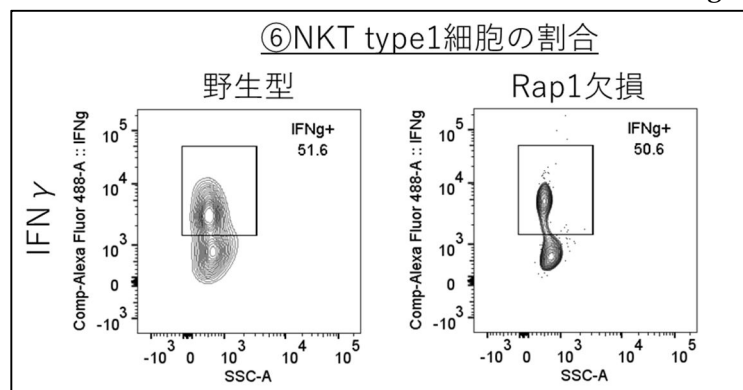
Rap1 欠損マウスにおいては iNKT 細胞数が低下し、Rap1 および Talin1 欠損マウスの NKT 細胞では T 細胞受容体 (TCR) の表面発現および CD1d テトラマーの結合強度が上昇していたため、Rap1 や Talin1 により iNKT 細胞の分化やレパトアが調節されている可能性を示唆すると考えられる。そこで Vbeta 抗体を用いた染色により、Rap1 と Talin1 欠損マウス由来の iNKT 細胞のレパトアをフローサイトメトリーにより測定したところ、Talin1KO 由来の NKT 細胞において TCR の Vbeta7 を発現する T 細胞の割合が有意に上昇していたものの、Rap1 と talin1 の欠損により大きな変動は観察されなかった(図)。また、次世代シーケンスを用いた T 細胞受容体遺伝子解析による TCR レパトアの解析を行ったところ、多様性指数や CDR3 の配列、長さに大きな違いが観察されなかった(図)。したがって NKT のような極めて限定された TCR を持つ T 細胞の選択や増殖においては TCR のレパトア調節よりも TCR 発現レベルでの調節が行われている可能性が考えられる。



図⑤ Talin1欠損NKT細胞のTCR遺伝子の相補性決定領域 (CDR) の長さ

次に Rap1 や Talin1 欠損が胸腺 iNKT の分化に与える影響を検討した。iNKT は胸腺内で IFN γ , IL-4, IL-17 をそれぞれ分泌する iNKT1,2,17 に分化・増殖する。そこで細胞内染色法により、これらのサイトカインを測定したところ、大きな差異は見られなかった(図)。

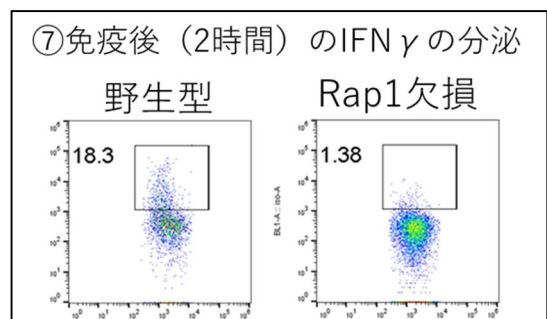
したがって、胸腺の NKT の後期発生過程に影響を与える可能性は小さいと考えられる。以上のことから Rap1 欠損による iNKT 細胞の低下は前期発生過程による増殖や生存に影響がある可能性がある。



⑥NKT type1細胞の割合

一方 Rap1 シグナルが末梢の NKT 細胞の活性化に影響を与える可能性は明らかになっていなかったため、Rap1 欠損マウスを NKT を活性化する α -ガラクトシルセラミドで免疫し、in vivo で NKT の活性化をサイトカイン産生により検討したところ、免疫をした野生型マウスから単離した NKT は IFN γ や IL4 の分泌が観察されたが、Rap1 欠損マウスでは分泌がほとんど見られなかった。

また、これらのマウスの脾臓細胞を調整し、in vitro で α -ガラクトシルセラミドで刺激をしたところ、野生型 NKT ではサイトカイン産生が誘導されたが、Rap1 欠損マウスでは誘導されなかった。以上のことから、Rap1 シグナルが、抗原提示細胞との相互

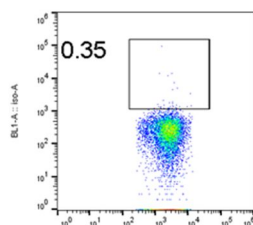
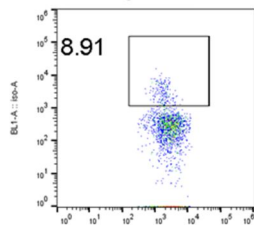


⑦免疫後 (2時間) の IFN γ の分泌

⑧In vitro刺激後（3時間）のIL-4の分泌

野生型

Rap1欠損



作用あるいは TCR シグナルなど末梢の NKT 細胞の活性化の過程に重要な役割を持つことが明らかとなった。この研究により、Rap1 と Talin1 を標的とした。NKT の活性化を制御する新規の分子標的薬の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naoyuki Kondo, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Kindlin-3 disrupts an intersubunit association in the integrin LFA1 to trigger positive feedback activation by Rap1 and talin1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eabf2184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abf2184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshihiro, Kondo Naoyuki, Kinashi Tatsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 MST1/2 Balance Immune Activation and Tolerance by Orchestrating Adhesion, Transcription, and Organelle Dynamics in Lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.00733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Naoyuki Kondo, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi 1	4. 巻 11
2. 論文標題 LFA1 Activation: Insights from a Single-Molecule Approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11111751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshihiro Ueda, Koichiro Higasa, Yuji Kamioka, Naoyuki Kondo, Tatsuo Kinashi
2. 発表標題 Rap1 facilitates T cell polarity via spatial regulation of MLC and ARAP1
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuji Kamioka, Yoshihiro Ueda, Naoyuki Kondo, Tatsuo Kinashi
2. 発表標題 Differential requirement of Rap1 and integrin adaptors for distinct modalities of T cell adhesion under shear flow
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoyuki Kondo, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi
2. 発表標題 Kindlin-3 breaks of integrin LFA-1 inhibitory clasp to promote positive feedback activation of LFA-1 by talin1 and Rap1
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤直幸、植田祥啓、木梨達雄
2. 発表標題 Rap1/Talin-1/Kindlin-3を内包する新規ポジティブフィードバック回路によるインテグリン活性化の離散的制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会、2P-0195
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoyuki Kondo 1 Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi
2. 発表標題 Distinct binding properties of integrin adaptors talin1 and kindlin-3 to LFA1 and 4 integrins modulate adhesive responses in static and shear-flow conditions.
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Kamioka, Y. Ueda, N. Kondo, Y. Ikeda, T. Kinashi,
2. 発表標題 Subsecond Rap1 activation by outside-in signaling of LFA1/ICAM1 interactions strengthens L-selectin mediated rolling of T cells
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Ueda, K. Higasa, Y. Kamioka, N. Kondo, S. Horitani, Y. Ikeda, T. Fukuhara, Y. Fukui, T. Kinashi
2. 発表標題 Rap1 facilitates cell polarization via RhoA signaling in T cells
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Horitani, Y. Ueda, Y. Kamioka, N. Kondo, Y. Ikeda T. Fukuhara, M. Naganuma, T. Kinashi
2. 発表標題 The critical role of Rap1GAPs in T cell recirculation and egress from lymph node.
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本食品免疫学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 492
3. 書名 食品免疫学事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------