

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 23 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570207

研究課題名（和文） Rap1-RAPL-Mst1 シグナルによる動態制御のメカニズム

研究課題名（英文） Regulation of immune dynamics by Rap1-RAPL-Mst1 signaling

研究代表者

片桐 晃子（KATAGIRI KOKO）

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：00322157

研究成果の概要（和文）：RAPLはRap1結合タンパク質で、Rap1活性化によって誘導される接着・遊走に重要な役割を果たしている。このRAPLを欠損するマウスは加齢とともにループス腎炎などの自己免疫疾患やBリンパ腫を発症することがわかった。その発症メカニズムとして、RAPLがCDKインヒビターp27<sup>kip1</sup>の核内移行を促進することで、リンパ球の増殖を抑えているために、RAPLが欠損するとリンパ球の過剰な増殖を招いていることが明らかとなった。この成果は、リンパ球の接着と増殖が連携して制御されており、両者に関与する分子の破綻は単独でも、リンパ球増殖性疾患の発症につながることを示している。

研究成果の概要（英文）：RAPL, Rap1 binding protein, plays crucial roles in Rap1-dependent lymphocyte adhesion and migration. RAPL-deficient mice experienced age-related lupus-like glomerulonephritis and developed B cell lymphomas. RAPL promoted the nuclear localization of p27, cdk2 inhibitor, and prevented the hyperproliferation of both T and B lymphocytes induced by the crosslinking with the antibody to antigen receptors. These data demonstrated that lymphocyte adhesion and proliferation were coordinately regulated by RAPL, and the deficiency of such molecule solely led to the development of lymphoproliferative diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：Rap1, RAPL, adhesion, autoimmunity, p27

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ球の全身性の移動は異物侵入に対する免疫監視に重要な働きをしている。リンパ

球は血管内皮に接着してリンパ組織や炎症部位に移動し、異物由来の抗原を認識することによって免疫反応の担い手としての能力

を獲得することができる。これまでがん抑制遺伝子である R A S S Fファミリーに属する R A P Lが、細胞表面のたんぱく質であるインテグリンを介して、リンパ球と血管内皮や抗原提示細胞との接着を調節していることを明らかにしてきた。近年、R A S S Fファミリー遺伝子群は、アポトーシス誘導能および増殖抑制機能を持つことから、がん抑制遺伝子として重要であることが示唆されている。しかし R A P Lの接着を制御する働きが R A S S Fファミリー遺伝子群によるがん抑制の働きとどのようにつながっているのかは不明である。また、生体免疫系の過剰応答に起因する自己免疫疾患やアレルギー疾患で、R A P Lがどのような働きをしているのかも分っていない。

## 2. 研究の目的

そこで、R A P Lを欠損するマウスを用いて加齢するとリンパ増殖性疾患を発症するのかどうかを解析するとともに、R A P L欠損 Tおよび Bリンパ球の抗原受容体を介する増殖応答を In vivo および In vitro で解析し、その異常の原因を追究した。

## 3. 研究の方法

(1) R A P Lゲノムの exonI を欠損したマウスを作製し、R A P Lタンパク質の発現が消失していることを western blot により確認した。(2) このマウスを定期的に解剖し、血清および病理学的解析を行った。(3) 糸球体腎炎を発症していることがわかったので、抗 Ig および補体に対する抗体を用いて、腎臓の凍結切片を染色することにより免疫複合体が沈着していることを確かめた。また血中の抗 double strand DNA 抗体価は、MBL 社の M E S C A P D N A I I テストを用いて ELI Z A 法で定量した。(4) In vivo におけるリンパ球の活性化状態を、

F A C S ( C a l i b u r ) を用いて、CD62L, CD44, CD138 などの細胞表面受容体の発現の変化を解析した。(5) In vivo での増殖反応の有無を BrdU を投与し、その取り込みを抗 BrdU 抗体を用いて検討した。(6) In vitro における B および T リンパ球の抗原受容体を介する増殖応答をそれらに対する抗体を用いて架橋刺激することで、<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みおよび B D 社の BrdU Flow kit を用いた細胞周期解析により検討した。(7) 細胞周期制御分子群の発現の違いを western blot により検討した。

## 4. 研究成果

(1) R A P L 欠損マウスでは加齢とともに抗 double strand DNA 抗体などの自己抗体価が上昇し、腎臓に免疫複合体が沈着し、ループス腎炎を発症することが判明した ( 図 1 )。また、1 年以内に 3 0 % の割合で、リンパ節および脾臓において B リンパ腫を発症することが明らかとなった ( 図 2 )。

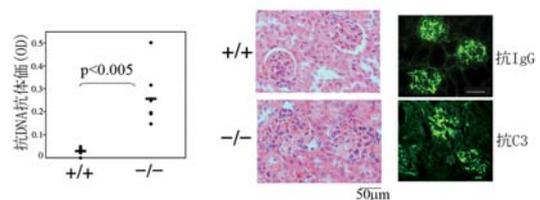


図 1 R A P L 欠損マウスは加齢するとループス腎炎を発症する

左側：10ヵ月齢 R A P L 欠損マウス ( - / - ) は正常マウス ( + / + ) に比べ、S L E などの自己免疫疾患で陽性になる抗 d s D N A 抗体価が上昇している。

右側：腎臓切片の H E 染色像、抗 I g G、C 3 抗体による蛍光染色像。R A P L 欠損マウス ( - / - ) の糸球体は肥大し、免疫複合体が沈着している。

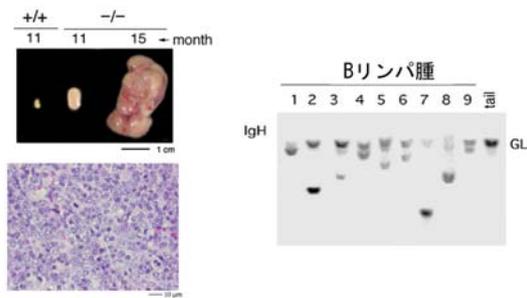


図2 RAPL欠損マウスはBリンパ腫を発症する

左側：11ヵ月と15ヵ月齢のRAPL欠損(-/-)マウスの腫脹したリンパ節(上)と組織像。リンパ節は巨大化し、組織像からBリンパ腫であることが示唆された。

右側：RAPL欠損マウス由来Bリンパ腫の免疫グロブリンの再編成をサザンブロットで検討したところ、全て1種類のB細胞由来であることが確認された。

(2)発症前の6週齢RAPL欠損マウス由来のB及びT細胞の抗原受容体を介する増殖応答を *in vitro* で検討したところ、いずれもG1期からS期の移行が亢進していることが判明した。10ヵ月齢RAPL欠損マウスへBrdUを投与し、*in vivo* におけるリンパ球の増殖を検討したところ、RAPL欠損マウスのリンパ節および脾臓のB及びT細胞のBrdU取り込みが亢進していることが判明した(図3)。

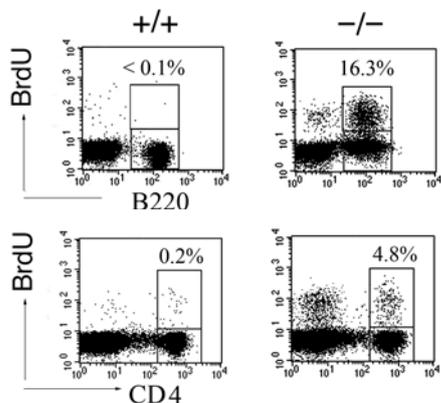


図3 RAPL欠損リンパ球は、生体内で増

殖している

上：B220陽性B細胞のBrdU(ブロモデオキシウリジン)取り込みを示す。BrdUはチミジンのアナログで、細胞周期のS期特異的にDNAに取り込まれる。RAPL欠損B細胞(-/-)は、正常B細胞(+/-)に比べ、BrdU取り込みが亢進している。

下：CD4陽性T細胞のBrdU取り込みを示す。RAPL欠損T細胞(-/-)は、正常T細胞(+/-)に比べてBrdU取り込みが亢進している。

(3)RAPL欠損リンパ球における増殖応答亢進の機構を明らかにするため、細胞周期制御因子サイクリンの発現及びCDK活性を調べたところ、サイクリンEの発現には差がないにもかかわらず、CDK2活性が2~3倍、RAPL欠損B及びT細胞で上昇していることが明らかとなった。

(4)サイクリンE・CDK2複合体に結合しその活性を阻害するp27<sup>kip1</sup>は、正常リンパ球では、抗原刺激によって、G1期に核内でユビキチン-プロテアソームによって分解されることがわかっている。RAPL欠損リンパ球では、CDK2活性が上昇しているにもかかわらず、p27<sup>kip1</sup>は分解されないことが判明した。そこでRAPL欠損リンパ球のp27<sup>kip1</sup>の局在を免疫染色法で検討したところ、p27<sup>kip1</sup>は細胞質に蓄積していることが判明した(図4)。p27<sup>kip1</sup>は核内でCDK2活性を阻害できなければ、細胞増殖を抑制することができない。RAPLはp27<sup>kip1</sup>の核内移行に重要な働きをしている可能性が示唆された。

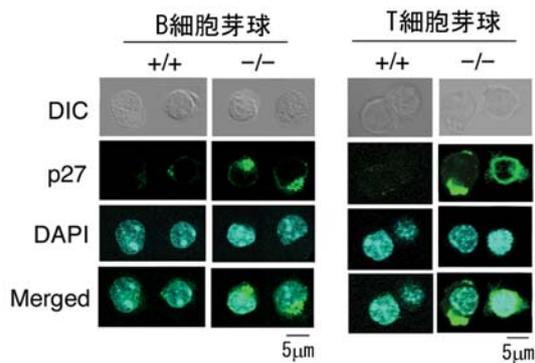


図4 抗原刺激したRAPL欠損リンパ芽球では、p27<sup>kip1</sup>が細胞質に蓄積している  
左側：正常B細胞芽球（+/+）ではp27<sup>kip1</sup>は分解されてなくなっているが、RAPL欠損B細胞芽球（-/-）ではp27<sup>kip1</sup>が細胞質に蓄積している。

右側：正常T細胞芽球（+/+）ではp27<sup>kip1</sup>は分解されてなくなっているが、RAPL欠損T細胞芽球（-/-）ではp27<sup>kip1</sup>が細胞質に蓄積している。

(5) 抗原刺激後のp27<sup>kip1</sup>の細胞内局在の変化を詳細に調べたところ、無刺激でB細胞ではp27<sup>kip1</sup>は細胞質に存在するが、T細胞ではもともと核内に存在することが明らかとなった（図5）。抗原刺激によって、正常B細胞ではp27<sup>kip1</sup>は、数分以内に細胞質から核内へ移行するのに対し、RAPL欠損B細胞では、細胞質に留まったままであることが明らかとなった。正常T細胞では、抗原刺激後p27<sup>kip1</sup>は核内から細胞質へ移行するが、RAPL欠損T細胞ではその割合が2倍に増加していることが判明した（図6）。

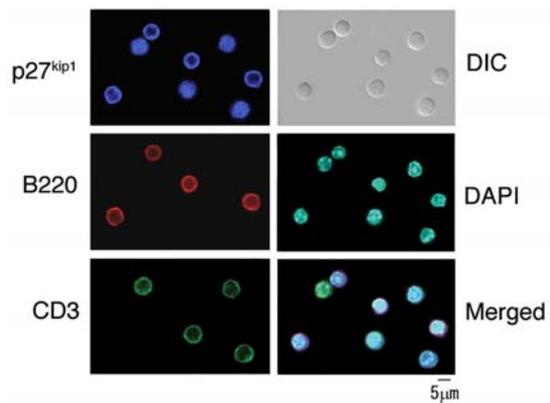


図5 p27<sup>kip1</sup>の細胞内局在は、B細胞とT細胞で異なる

赤い蛍光色素で示したB細胞ではp27<sup>kip1</sup>が細胞質に存在するが、緑の蛍光色素で示したT細胞はp27<sup>kip1</sup>が核内に存在する。

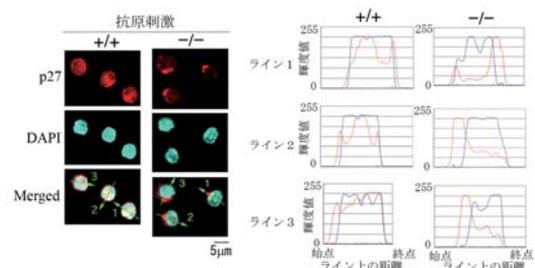


図6 RAPL欠損B細胞では、p27<sup>kip1</sup>の核内移行が起こらない

左側：赤い蛍光色素はp27<sup>kip1</sup>、青い蛍光色素はDAPI染色（核）を示す。抗原受容体刺激2時間後、正常B細胞（+/+）では、核内にp27<sup>kip1</sup>が存在するが、RAPL欠損B細胞（-/-）では、細胞質に留まったままである。

右側：赤（p27<sup>kip1</sup>）と青（核）の蛍光強度を左側の1番下のラインに沿って定量した結果を示す。正常B細胞（+/+）では、青いラインと赤いラインが重なっていて、核内にp27<sup>kip1</sup>が存在するが、RAPL欠損B細胞（-/-）では、青いラインと赤いラインが重なっておらず、p27<sup>kip1</sup>が細胞質に存在することが分かる。

(6)核から細胞質への移行には10番目のセリン(S10)のリン酸化が必要であるが、RAPLは、そのリン酸化を抑制することが明らかになった。すなわち、293細胞へRAPLを過剰させると、p27<sup>kip1</sup>のS10リン酸化が抑制され核内に局在し、細胞の増殖が抑制された。抗原刺激後のRAPL欠損B及びT細胞におけるp27<sup>kip1</sup>のS10リン酸化のレベルは、正常細胞に比較し亢進していることがわかった。これらの結果より、RAPLはp27<sup>kip1</sup>のS10リン酸化を抑制することで、p27<sup>kip1</sup>の核内移行を促進していることが明らかとなった。

(7)RAPL欠損マウスのp27<sup>kip1</sup>が正常に核内に移動できるように、p27<sup>kip1</sup>の10番目のセリンをアラニンに変換したp27<sup>kip1</sup>をノックインしたマウスと掛け合わせてS10のリン酸化が起きないようにしたところ、RAPL欠損による自己免疫疾患やリンパ腫の発症が抑制されることが判明した。

#### [結論]

接着制御分子RAPLがp27<sup>kip1</sup>の核内移行を促進し、リンパ球の増殖を抑制するシグナルとして、リンパ球増殖性疾患の発症抑制に重要な機能を果たしていることが明らかになった。RAPLの破綻により自己免疫疾患を発症するモデルマウスを用いて、接着制御因子欠損による自己寛容の成立・維持の機構を明らかにすることで、さらに詳細に自己免疫疾患発症機構が提示できるものと予想される。また、RAPLによってp27<sup>kip1</sup>が核内に移行する際の分子機構を解明することで、リンパ球の増殖を抑制させる働きを担うターゲット分子が見いだされ、リンパ球増殖性疾患に新たな治療法を確立できるものと期待される。

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3件)

1. Katagiri K, Ueda Y, Tomiyama T, Yasuda K, Toda Y, Ikehara S, Nakayama I. K and Kinashi T. Deficiency of Rap1-GTP binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through the mislocalization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup>. *Immunity* 34:24-38, 2011, 査読有
2. Katagiri K, Ebisuno Y, Katakai T, Ueda Y, Nemoto T, Inada H, Nabekura J, Okada T, Kannagi R, Tanaka T, Miyasaka M, Hogg N, Kinashi T. Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood* 115:804-14, 2010, 査読有
3. Katagiri K, Katakai T, Ebisuno Y, Ueda Y, Okada T, Kinashi T. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J.* 28:1319-31, 2009, 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 石原沙耶花、木梨達雄、片桐晃子、Lymphocyte arrest under shear flow、第40回日本免疫学会総会・学術集会、2011年11月29日、千葉・日本
2. 金みんす、木梨達雄、片桐晃子、Rab13 is critical for LFA-1 clustering required for lymphocyte migration、第40回日本免疫学会総会・学術集会、千葉市、2011年11月29日

3. Katagiri K., et. al., Deficiency of RAPL causes lymphoproliferative disorders through the mislocalization of p27<sup>kip1</sup>, 2<sup>nd</sup> RASSF meeting, 2011年7月14日, Oxford, UK,
4. Katagiri K., et. al., Deficiency of Rap1 binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through the mislocalization of p27<sup>kip1</sup>, 40<sup>th</sup> keystone symposia, Breckenridge, USA, 2011年1月10日
5. Ishihara S., Katagiri K., et. al., Rap1 controls lymphocyte adhesion cascades and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. 14<sup>th</sup> international congress of immunology, 2010年8月23日、神戸・日本
6. Kim, M., Katagiri K., et. al., Mst1 controls lymphocyte trafficking and motility within lymph nodes. 14<sup>th</sup> international congress of immunology, 2010年8月23日、神戸・日本
7. 吉田行輝、木梨達雄、片桐晃子、Regulation of lymphocyte polarization and motility by Rab proteins、第38回日本免疫学会総会・学術会議、2009年12月1日、大阪・日本
8. 河田美穂、片桐晃子、木梨達雄、Rap1 controls lymphocyte adhesion cascades、第38回日本免疫学会総会・学術会議、2009年12月1日、大阪・日本

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片桐 晃子 (KATAGIRI KOKO)  
関西学院大学・理工学部・教授  
研究者番号：00322157