The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF-κB activation
Author(s)	森本, 桂子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59577
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	森本　桂子
論文題名 Title	LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF-κB activation (LRRK1はB細胞応答の制御及びCARMA1依存的なNF-κBの活性化に重要である)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

B細胞は抗体産生によって病原体の除去を行い獲得免疫において中心的な役割を果たしており、B細胞受容体(BCR)のcrosslinkによって開始される反応は、NFAT/NF-κB/MAPK系を活性化し、B細胞の増殖、活性化、抗原提示に必要な遺伝子の発現を誘導する。特にBCR刺激によるNF-κBの活性化はCARMA1, BCL10, MALT1の複合体形成によって開始され、CARMA1がscaffolding platformとして重要なことが知られているがその詳細なメカニズムは不明である。
一方、LRRK１はParkinson病およびCrohn病の原因遺伝子として知られるLRRK2と同じfamilyに属し、これまでにEGF受容体の細胞内輸送・細胞分裂時の紡錘体の配向・オートファジーの制御に関わることが知られている。しかし免疫系においてはヒトの末梢血中のB細胞や単球に発現すること以外は明らかになっていない。そこで本研究ではノックアウトマウスを用いてLRRK1のB細胞における機能を解明することも目的に研究を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

LRRK1ノックアウトマウスを用いてB細胞の分化をフローサイトメトリーで解析したところ、ノックアウトマウスで腹腔のB1a細胞が著明に減少すること、未刺激の状態でのIgM, IgA産生は増加しIgG2b, IgG3の産生は減少することが明らかとなった。またマウスにT細胞依存的 (T cell–dependent: TD)な刺激であるNP-CGG、T細胞非依存的 (T cell–independent: TI)な刺激であるNP-LPS (TI-1)、NP-Ficoll (TI-2)で免疫してELISAを用いて抗体産生能を評価したところTI-2刺激に対するIgG3の産生のみが障害されていることが明らかになった。NP-Ficollで免疫したマウスの脾臓のB細胞におけるmRNA発現をRT-PCRで調べた結果、IgG3へのクラススイッチに重要なgermline transcript (GLT)の発現、activation-induced cytidine deaminase (AID)の発現がノックアウトマウスのB細胞で低下していることがわかった。さらに、これらの反応がB細胞intrinsicなものか検討するためにCD43 negativeとして回収したB細胞をCFSEで染色し各刺激条件下で培養し、フローサイトメトリーを用いて解析した結果、LPSやanti-CD40刺激では増殖能の障害を認めないものの、BCR刺激では著明に増殖が抑制され、これはIL-4やanti-CD40を加えることで部分的に回復した。またBCR刺激ではB細胞の生存率も低下していることが明らかとなった。そこでこのメカニズムを、BCR刺激を行ったB細胞を用いてウェスタンブロッティングで検討したところ、NFAT, MAPK系の活性化は正常に起きるものの、IκBαのリン酸化及び分解が障害され、NF-κBのsubunitであるp65の核移行もノックアウトマウスのB細胞で障害されていることが確認された。さらにNF-κBのtarget遺伝子でありBCR刺激によるB細胞の生存・増殖に重要なBcl-x_L, cyclin D2, NFATc1/αAのタンパク発現をウェスタンブロッティングで評価したところ、いずれも発現が低下していることが明らかとなった。次にCARMA1とLRRK1の共発現によるNF-κBの活性化をHEK293T細胞を用いてLuciferase assayで解析した結果、共発現でNF-κBの活性が亢進し、PMAとionomycinでCa刺激を行うとさらにNF-κBの活性化が増強されることが明らかとなった。またHEK293T細胞に強制発現し結合に関して検討した結果、LRRK1とCARMA1が結合しCaシグナルにより結合が増強することが明らかとなった。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究により、LRRK1はBCR刺激によるB細胞の生存・増殖に重要であり、ノックアウトマウスにおいてBCR刺激によって増殖維持されているB1a細胞が減少することが明らかとなった。また、GLTやAID発現が低下することによりTI-2刺激でのIgG3産生も障害された。メカニズムとしてLRRK1がCARMA1と結合してCARMA1依存的なNF-κBシグナルを正に制御していることが明らかとなった。BCR刺激によるNF-κBシグナルの活性化は種々のリンパ腫において病態に関与することが知られており、LRRK1がこの経路を制御するという今回の発見は新たな治療ターゲットとしても今後の研究が期待される領域と考えられる。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）森本　桂子

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	熊ノ郷 淳
	副　査	大阪大学教授	田中敏郎
	副　査	大阪大学教授	竹田潔

論文審査の結果の要旨

LRRK1はパーキンソン病及びクローン病の原因遺伝子として精力的に研究が行われているLRRK2と同じファミリーに属する分子であり、ヒトの末梢血中の免疫細胞で発現することが知られているが、これまでLRRK1の免疫系における機能に関しては未解明であった。本論文において著者らは、*Lrrk1*ノックアウトマウスを詳細に解析し、LRRK1が腹腔におけるB1a細胞の発生、およびT細胞非依存的な抗体産生に重要であることを初めて明らかにした。またメカニズムとしてB細胞受容体刺激においてLRRK1がCARMA1と複合体を形成し、CARMA1依存的なNF-κBシグナルを正に制御することも明らかにした。BCR刺激によるNF-κBシグナルの活性化は種々のリンパ腫において病態に関わる重要な経路として知られており、この経路に新たにLRRK1が関与することを示唆する本論文は学位論文に値する。