

主論文の要旨

**RHOF PROMOTES MURINE MARGINAL ZONE  
B CELL DEVELOPMENT**

〔 RhoF はマウスの濾胞辺縁帯 B 細胞の分化を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

岸本 磨由子

## 【諸言】

RhoA、Rac1、Cdc42 などの Rho ファミリー GTPase は生体内で普遍的に発現しており、細胞接着、細胞骨格形成、遊走、細胞周期、細胞死、転写調節など多くの生命現象において分子スイッチとして働いている。糸状仮足 (filopodia) はアクチンに富むスパイク状の細胞突起であり、細胞の極性、遊走、血管新生、貪食、軸索形成等に重要な役割を果たしている。filopodia を制御する分子は Rho GTPase の一種である Cdc42 と RhoF のみである。Cdc42 は酵母以後の広範な細胞に発現し、そのノックアウトマウスは胎生致死を来す。血球特異的な Cdc42 コンディショナルノックアウトマウスは骨髄系前駆細胞の増加と赤血球造血のブロックを示す。近年新たな filopodia 制御蛋白として RhoF が注目されている。RhoF は脊椎動物以降の主に造血系、神経系細胞に発現する低分子量 GTPase であり、Cdc42 を介さない特徴的な長い filopodia 形成を制御している。しかしながら RhoF の下流エフェクターは殆ど同定されていない。RhoF は神経細胞での軸索形成を促進する。また、RhoF 欠失血小板では filopodia は正常に形成され、血小板機能は正常である。RhoF はリンパ組織に発現しているが、RhoF の B 細胞分化における役割は不明である。Cdc42 を造血幹細胞特異的に欠失させたマウスでは骨髄での B 細胞の増殖が障害され、成熟 B 細胞は減少し、抗原特異的な抗体産生は障害される。RhoA を造血幹細胞特異的に欠失させたマウスでは骨髄での B 細胞の生存能が障害され、その結果脾臓の B 細胞数が減少する。今回我々は全身性に *RhoF* 遺伝子を欠失させた遺伝子組み換えマウスを作製し、RhoF の B 細胞分化への関与を解析した。その中でも特に濾胞辺縁帯 (marginal zone, MZ) B 細胞は MZ と白脾髄を往復し、filopodia を含む多彩な形態変化を示す B 細胞であり、白脾髄由来のケモカインである CXCL13 の濃度勾配に拮抗し MZ に位置するための能力を有すると考えられる。マウスでは MZ を流れる血液中には S1P が含まれ、MZ B 細胞はその受容体である S1PR1 や S1PR3 を有している。CXCL13 とその受容体である CXCR5 によって引き起こされる濾胞への B 細胞の誘導を S1PR1 や S1PR3 からのシグナルが阻害し、その結果マウスの MZ B 細胞は MZ に位置することができると考えられているが、正確な MZ B 細胞の分化のメカニズムはまだ解明されていない。今回我々は特に MZ B 細胞の分化に注目して解析を行った。

## 【方法】

ターゲティングベクター *mRhoF*NT を使用して相同組換え体を単離、同定した。これを C57BL/6 マウスより採取した胚盤胞に注入し、回復を待って仮親の子宮に移植した。仮親から生まれたターゲットアレルを持つキメラマウスを CAG-FLPe Tg マウスと交配することによりコンディショナル (floxed) アレルを持つマウスを得る事ができた。floxed アレルを持つマウスと CAG-Cre Tg マウスと交配することにより全組織で *RhoF* 遺伝子エクソン 2 を欠失したマウス (RhoF KO マウス) を得た。RhoF KO マウス及び野生型マウスを用いて、脾臓、胸腺の組織学的解析、FACS 解析、B 細胞遊走能、免疫応答、MZ の免疫染色の解析を行った。B 細胞遊走能では SDF-1 $\alpha$ 、BLC に対する MZ B 細胞の遊走能を解析した。免疫応答試験では MZ B 細胞特異的な I 型 T 細胞依存性抗原 (TNP-LPS)

に対する IgM、IgG3 の産生能を解析した。MZ の免疫染色では辺縁性メタル好性マクロファージを抗 CD169 抗体で標識し、B 細胞を抗 B220 抗体で標識することで、脾臓における MZ B 細胞領域を計測した。

### 【結果】

RhoF KO マウスはメンデルの法則に従い出生し、胎生致死ではなかった。外見、体重とも正常であった。RhoF KO マウスでは *RhoF* 遺伝子の exon2 が欠失していることを PCR で確認し、RhoF タンパクが欠失していることをウェスタンブロットで確認した。RhoF KO マウスの胸腺、脾臓の HE 染色標本では構造異常は見られなかった (Fig. 1A、1B)。RhoF KO マウスの TCR  $\beta$  陽性胸腺細胞では CD4+CD8-T 細胞は有意に増加し CD4+CD8+T 細胞は有意に減少していたが、脾臓の T 細胞分画は野生型に比べ差は認められなかった (Fig. 2A、2B)。RhoF KO マウスでは、骨髄において B 細胞分画に異常は見られなかったが (Fig. 3A、3C)、脾臓において MZ B 細胞は有意に減少しており (Fig. 3B、3D)、脾臓の MZ は有意に狭小化していた (Fig. 3E)。しかしながら、TNP-LPS に対する IgM、IgG3 産生能は RhoF KO マウスと野生型マウスの間に差は認められなかった (Fig. 4A、4B)。さらに、SDF-1 $\alpha$ 、BLC に対する B 細胞の遊走能は RhoF KO マウスでは異常が見られなかった (Fig. 4C)。

### 【考察】

RhoF KO マウスの脾臓では MZ が狭小化し、MZ B 細胞は減少していた。その機序として、MZ B 細胞が MZ にとどまるために必要なケモカインに対する MZ B 細胞の遊走能、あるいは B 細胞の増殖能や生存能への RhoF の関与が考えられた。脾臓の濾胞帯では濾胞 (follicular) B 細胞は BLC の濃度勾配に従って濾胞帯へ引き付けられるが、MZ B 細胞はそのケモカインの濃度勾配に抵抗することで MZ に限局する。しかし、RhoF KO マウスの MZ B 細胞の BLC や SDF-1 $\alpha$  に対する遊走能は正常であった。過去の研究では Cdc42、Rac2、RhoA KO マウスは B 細胞の遊走能だけでなく、増殖能や生存能が障害されることで MZ B 細胞が減少すると報告されている。BTK からのシグナルは Notch2 からのシグナルを阻害することで T2 B 細胞から MZ B 細胞への分化を阻害する。比較的強い BCR シグナルや BTK 阻害性のシグナルは成熟 follicular B 細胞を産生するのに必要だが、比較的弱い BCR シグナルや Notch2、NF- $\kappa$ B からのシグナルは MZ B 細胞の形成に必要であるとされている。RhoF は BCR、Notch2、BTK シグナルや TLR を制御することで MZ B 細胞への分化を促進する可能性がある。これらの仮説を検証するためには、今後 RhoF KO マウスの脾臓細胞でのシグナル伝達分子を解析する必要があると考えられる。

### 【結語】

RhoF はマウスの MZ B 細胞の分化を促進する。