

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08013

研究課題名(和文) Tリンパ球におけるラクトフェリン受容体と炎症抑制機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of lactoferrin receptor and its anti-inflammatory property in T lymphocytes.

研究代表者

高山 喜晴 (TAKAYAMA, Yoshiharu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：00343989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ケモカイン受容体的一种であるCXCR4が、T細胞においてラクトフェリン受容体として機能しているか検討した。株化ヒトT細胞であるJurkat-T細胞において、ラクトフェリン刺激によるSTAT3のリン酸化はCXCR4の阻害剤によって阻害された。しかしながら、CXCR4の活性化の指標である、リン酸化、ユビキチン化、二量体形成はラクトフェリン刺激により誘導されなかった。このことから、CXCR4のラクトフェリン受容体としての機能は細胞特異的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラクトフェリンは乳中の生体防御タンパク質であり、免疫賦活作用と過剰な免疫応答を抑制する機能を併せ持つ。そのメカニズムを解明する目的で、獲得免疫を制御する主要な細胞であるT細胞におけるラクトフェリン受容体の同定を行った。その結果、ケモカイン受容体的一种であるCXCR4が、株化T細胞において、部分的にラクトフェリン受容体として機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We addressed whether CXCR4, a chemokine receptor, acts as a lactoferrin receptor in human T-cells. In Jurkat-T cells, human immortalized T-cells, lactoferrin induced phosphorylation of STAT3 was antagonized by a CXCR4 inhibitor. However, lactoferrin stimulation does not mimicked many aspects of CXCR4 activation, including receptor dimerization, tyrosine phosphorylation. These observations suggest that role of CXCR4 as a lactoferrin receptor is cell-type specific.

研究分野：生化学

キーワード：ラクトフェリン T-細胞 CXCR4

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ラクトフェリンは、哺乳動物の乳をはじめ汗・涙などの外分泌液中に含まれる鉄結合性の糖タンパク質である。乳のラクトフェリンは授乳により母親から免疫系の未熟な新生児に移行し、強力な抗菌活性と抗ウイルス活性により外来異物の生体への侵入を防ぐ生体防御因子として機能する。一方、ラクトフェリンは外分泌液の他、好中球の分泌顆粒にも多く含まれ、細菌感染や炎症に伴い好中球から血中に放出される。ラクトフェリンは、自然免疫系の細胞を活性化することで、生体防御に寄与する一方で、過剰な炎症応答を緩和するなど、免疫応答を抑制する機能を併せ持つ。この免疫応答の制御のメカニズムとして、T細胞の活性制御が考えられる。

(2) 未分化 T 細胞から分化するヘルパー T 細胞(Th)のサブタイプにより免疫応答はコントロールされる。ヘルパー T 細胞は Th1 タイプ(細胞性免疫)と Th2 タイプ(液性免疫)のサブタイプに分けられる。マウスへのラクトフェリンの投与により、腸管において IL-12・IL-18・IFN- γ などの Th1 型のサイトカインが誘導される報告と、IL-10 などの Th2 型のサイトカインが誘導される報告が混在し、単純な Th1/Th2 バランス仮説では、ラクトフェリンの抗炎症活性は説明できない。近年、Th1・Th2 どちらのタイプにも属さない新しいタイプの T 細胞集団(制御性 T 細胞・Th17・Th9・Tr1)が発見されており、ラクトフェリンの炎症抑制効果が、これら新規の T 細胞集団を介している可能性が示唆されている。

(3) 既知のラクトフェリンの受容体として、LDL 受容体関連タンパク質-1(LRP-1)やインテレクチン-1 の存在が知られている。申請者のこれまでの研究により、ケモカイン受容体の一種である CXCR4 が Caco-2 細胞(ヒト大腸由来株化細胞)や HaCaT 細胞(ヒト株化角化細胞)においてラクトフェリン受容体として機能していることが明らかとなったが、T 細胞におけるラクトフェリン受容体は解明されていない。

2. 研究の目的

獲得免疫系を担う主要な免疫細胞である T 細胞の分化に対するラクトフェリンの機能を明らかにすることを目的とする。同時に、T 細胞におけるラクトフェリン受容体と、その下流の細胞内情報伝達系を明らかにする。大腸炎モデルマウスにラクトフェリンを経口投与した場合、炎症性サイトカインの産生が促進され、大腸炎の症状が緩和されることが知られている。ラクトフェリン存在下で分化誘導された T 細胞の抗炎症作用を明らかにすることで、ラクトフェリンの抗炎症活性のメカニズムが解明できる。

3. 研究の方法

(1) 免疫不全マウスへの T 細胞移入モデルを用いたラクトフェリンの抗炎症作用の検討
SCID マウス(免疫不全マウス)に未分化 T 細胞を移入すると、大腸炎が誘発されることが知られている。ラクトフェリンの抗炎症効果を明らかにする目的で、Balb/c マウスから脾臓を抽出し、アイソレーションキットを用いて未分化 T 細胞を精製した。精製された T 細胞を SCID マウスの腹腔内に移入した。このマウスにラクトフェリンを 5 週間経口投与し、大腸炎症の程度の評価を行った。評価項目は、マウス体重測定、糞便の目視観察による下痢スコアの測定、大腸における炎症性サイトカインの mRNA の定量および単位長さあたりの大腸重量の測定により行った。(大腸炎の発症により大腸壁が肥厚し、単位長さあたりの大腸重量が増加する。)

(2) CXCR4 のラクトフェリン受容体としての機能の検討
角化細胞で観察されたと同様に、ケモカイン受容体である CXCR4 が T 細胞においてラクトフェリン受容体として機能しているか否かを検討した。CXCR4 は内在性のリガンドである Stromal derived factor-1(SDF-1)との結合により二量体を形成し、リン酸化・ユビキチン化を受ける。これらは CXCR4 下流の細胞内情報伝達経路の活性化に必要である。ラクトフェリン刺激による CXCR4 の活性化を評価するためにヒト株化 T 細胞である Jurkat-T 細胞、およびホルボールエステル処理した THP-1 細胞を用い、ラクトフェリン刺激により、SDF-1 刺激の場合と同様、CXCR4 が二量体化を形成し、リン酸化・ユビキチン化を受けるか否かを検討した。CXCR4 の二量体形成は、ラクトフェリン刺激した Jurkat-T 細胞を細胞透過性架橋剤で処理し、電気泳動により解析した CXCR4 のバンドシフトで評価した。CXCR4 のリン酸化・ユビキチン化は特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより評価した。また、シクロヘキシミドアッセイにより、ラクトフェリンが CXCR4 の代謝回転(ターン・オーバー)速度に影響を与えるか否かを検討した。また、ラクトフェリン刺激による細胞内情報伝達経路の活性化が CXCR4 の阻害剤である AMD3100 により阻害されるか検討した。

4. 研究成果

(1) 経口投与されたラクトフェリンが T 細胞の分化を制御することで、炎症抑制効果を発揮するか検討するため、Balb/c マウスの脾臓から抽出された未分化 T 細胞を SCID マウスの腹腔内に移入し、実験的に大腸炎を誘発させた。この SCID マウスにラクトフェリンを 5 週間にわたって経口投与したが、炎症性サイトカインの産生抑制などは観察されず、この実験系では経口投与されたラクトフェリンの炎症抑制効果を明らかにすることはできなかった。

(2) Jurkat-T 細胞をラクトフェリンで刺激した場合の細胞内情報伝達経路の活性化が CXCR4 に依存しているか検討した。CXCR4 の阻害剤である AMD3100 により、ラクトフェリン刺激による

STAT3 のリン酸化は阻害された (図 1)。この阻害効果は、p38MAPK、p42/44MAPK、JNK に対しては認められなかった。このことから、ラクトフェリンは CXCR4 を介して STAT3 経路を活性化することが示唆された。また、CXCR4 に内在性のリガンドである SDF-1 (Stromal derived factor-1) が結合したときに観察される CXCR4 のユビキチン化、チロシンリン酸化、二量体化は、ラクトフェリン刺激した Jurkat-T 細胞では認められなかった。一方、ヒト単球由来の株化細胞をホルボールエステルで処理した細胞では、ラクトフェリン刺激による Akt のリン酸化は AMD3100 処理により阻害された (図 2)。この阻害効果は、p38MAPK、p42/44MAPK、JNK では認められなかったことから、ラクトフェリン刺激によって活性化された CXCR4 は PI-3K/Akt 経路を選択的に活性化することが示唆された。また、この細胞ではラクトフェリン刺激により CXCR4 のチロシンリン酸化が亢進すると共に、CXCR4 の代謝回転速度の上昇が観察された。しかしながら、CXCR4 と同様 SDF-1 をリガンドとするケモカイン受容体である CXCR7 では、ラクトフェリン刺激による代謝回転速度の上昇は認められなかった。

これらの結果から、T 細胞においてはラクトフェリンによる PI-3K/Akt 経路の活性化は CXCR4 以外の受容体に担われ、角化細胞や腸管上皮細胞などとは全く異なること、ラクトフェリン刺激により活性化される CXCR4 下流の細胞内情報伝達経路は、SDF-1 刺激の場合とは全く異なることが明らかとなった。

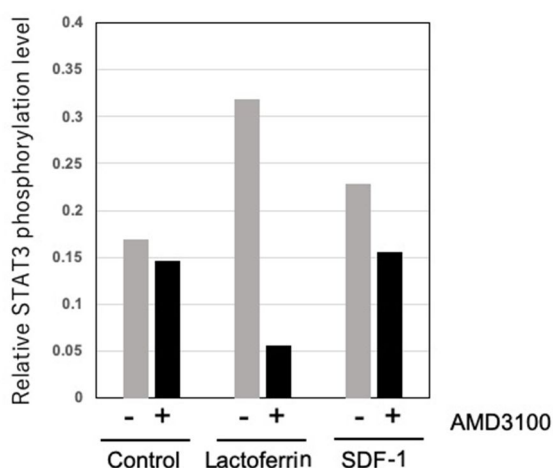


図 1 ラクトフェリン刺激による STAT3 のリン酸化に対する CXCR4 阻害剤 (AMD3100) の阻害効果

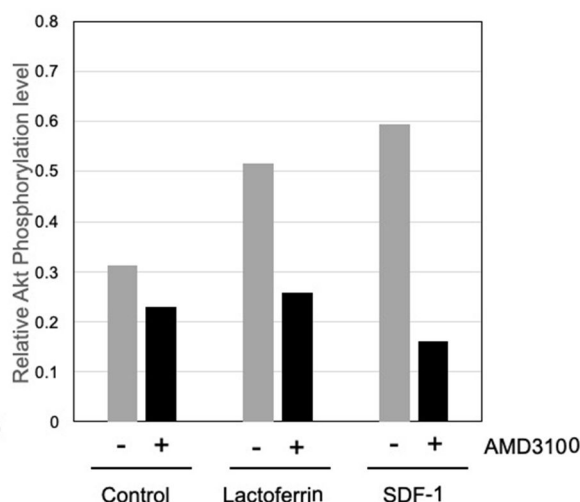


図 2 ラクトフェリン刺激による Akt のリン酸化に対する CXCR4 阻害剤 (AMD3100) の阻害効果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

高山 喜晴、角化細胞の分化とバリア機能に対するラクトフェリンの効果、畜産技術、757 巻、2018、査読無、6 - 10

高山 喜晴、内田 良、青木 玲二、青木(吉田) 綾子、田島 淳、ウシラクトフェリンによるヒト表皮角化細胞の分化とバリア機能の促進、ラクトフェリン 2017、査読無、2017、29 - 36

高山 喜晴、青木 玲二、内田 良、田島 淳史、青木(吉田) 綾子、角化細胞におけるケモカイン受容体 CXCR4 のラクトフェリン受容体としての役割、ラクトフェリン 2017、査読無、2017、21 - 28

高山 喜晴、乳由来の鉄結合蛋白質ラクトフェリンの皮膚に対する多面的な機能、ニューブードインダストリー、査読無、59 巻、2017、21 - 28

高山 喜晴、青木 玲二、内田 良、田島 淳史、青木(吉田) 綾子、Role of CXC chemokine receptor type 4 as a lactoferrin receptor、Biochemistry and Cell Biology、査読有、95 巻、2017、57 - 63

DOI: 10.1139/bcb-2016-0039

内田 良、青木 玲二、青木(吉田) 綾子、田島 淳史、高山 喜晴、Promoting effect of lactoferrin on barrier function and epithelial differentiation of human keratinocytes、Biochemistry and Cell Biology、査読有、95 巻、2017、64 - 68

DOI: 10.1139/bcb-2016-0147

〔学会発表〕(計 5 件)

高山 喜晴、ラクトフェリン：受容体への結合と細胞内動態、第8回日本ラクトフェリン学会学術集会、2018

高山 喜晴、青木 玲二、Comparison of the anti-angiogenic activity of C-lobe and N-lobe fragments of bovine lactoferrin、XIIIth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications、2017

内田 良、青木 玲二、青木(吉田) 綾子、田島 淳史、高山 喜晴、ウシラクトフェリンによるヒト表皮角化細胞の分化とバリア機能の促進、第7回日本ラクトフェリン学会学術集会、2016

高山 喜晴、青木 玲二、内田 良、田島 淳史、青木(吉田) 綾子、角化細胞におけるケモカイン受容体 CXCR4 のラクトフェリン受容体としての役割、第7回日本ラクトフェリン学会学術集会、2016

高山 喜晴、青木 玲二、内田 良、田島 淳史、青木(吉田) 綾子、CXC Chemokine Receptor 4 (CXCR4) is a novel receptor for a lactoferrin (a multifunctional iron-binding milk protein)、The EMBO Meeting 2016、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：青木 綾子

ローマ字氏名：AOKI Ayako

所属研究機関名：東京大学大学院

部局名：農学生命科学研究科

職名：特任助教

研究者番号(8桁)：60610368

(2)研究協力者

研究協力者氏名：青木 玲二

ローマ字氏名：AOKI Reiji

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。