

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590497
 研究課題名（和文） アレルギー発症における細胞骨格制御分子DOCK2の役割
 研究課題名（英文） DOCK2 regulates allergic disease through a mechanism dependent on CD4⁺ T cells.
 研究代表者
 田中 芳彦 (TANAKA YOSHIHIKO)
 九州大学・生体防御医学研究所・准教授
 研究者番号：00398083

研究成果の概要：アレルギー反応と密接に関連したインターロイキン4の受容体が、抗原刺激に伴い一過性にその発現を低下させ、過剰なシグナルがTリンパ球に伝わるのを未然に防ぐメカニズムを世界で初めて明らかにしました。このダウンレギュレーションは、DOCK2という分子がRacという分子を活性化し、インターロイキン4受容体をリソソームと呼ばれるタンパク質処理場に輸送することに起因しており、DOCK2を欠損するマウスではアレルギー疾患を自然発症します。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、アレルギー・ぜんそく、細胞・組織、シグナル伝達、発生・分化、細胞骨格、ヘルパーTリンパ球、サイトカインレセプター

1. 研究開始当初の背景

戦後我が国の予防医学及び医療技術の飛躍的進歩と相まって感染症や脳卒中による死亡者数は大幅に減少したものの、アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患患者数は、先進諸国を中心に著明に増加しており、その治療法についての社会的関心は高い。近年、アレルギー疾患ではヘルパーTリンパ球(Th)サブセットTh1/Th2バランスが破綻していることが明らかにされた。現代の環境中の化学物質の作用などの影響を受け、生体内

免疫系とりわけヘルパーTリンパ球に作用し様々なアレルギー疾患をもたらす我々を悩ませている。最近になってアレルギー疾患に対する分子レベルの理解が進み、多くの知見がここ数年来蓄積され、その病態の解析が進み新しい治療の標的が明らかにされつつある。しかし、最も重要なステップであるアレルギー発症におけるヘルパーTリンパ球の分化制御機構などの詳細については依然不明な部分が多い。生体内においてこれまでにアレルギーとの関与が知られていない分子が

アレルギー発症において重要な役割を果たしているものとも推察される。

DOCK2 は研究代表者のグループで同定された免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子であり、これまでにこの分子が T 細胞抗原受容体 (TCR) やケモカイン受容体の下流で機能し、Rac の活性化を介してリンパ球の遊走や免疫シナプス形成を制御することが明らかにされている (Nature 412: 826-831, 2001; Immunity 19: 119-129, 2003; Immunity 21: 429-441, 2004; J. Exp. Med. 202: 1121-1130, 2005)。

研究代表者は Th1/Th2 細胞内情報伝達機構に関連して新規 T リンパ球特異的遺伝子 *SLAT* を同定し、Th1/Th2 細胞における TCR シグナル伝達機構を世界に先駆けて明らかにした (Immunity 18: 403-414, 2003)。また、Vav 欠損により転写因子 c-Maf の発現が障害され、その結果 Th1 型の免疫応答が亢進することを見いだした (Blood 106: 1286-1295, 2005)。このように、これまでに研究代表者はアレルギー発症において重要な役割を果たす Th1/Th2 細胞のシグナル伝達機構を明らかにしてきた。一方、研究代表者は最近になって、DOCK2 欠損 BALB/c マウスが重篤なアレルギー反応を惹起することを見いだした。そこで本研究課題においては、アレルギー発症における細胞骨格制御分子 DOCK2 の役割を詳細に解析し、ヘルパー T リンパ球の分化制御機構についての新規概念の発見を目指すと共に、得られた知見のアレルギー疾患治療への応用を目的として立案された。

2. 研究の目的

アレルギー疾患ではサイトカインならびにサイトカインレセプターが重要な役割を果たしていることが示され、それに伴う Th1/Th2 バランスがアレルギー発症と関連していることが明らかにされている。しかしながら、Th1/Th2 分化に関するこれまでの研究の多くは、*in vitro* での細胞分化や *in vivo* での感作誘導性の反応を対象としており、アレルギーを自然発症するモデルマウスを用いた研究は進んでいない。研究代表者は、*in vitro* における Th1/Th2 分化について、Th1 型反応を示す TCR トランスジェニックマウスの CD4⁺T リンパ球を抗原ペプチドで刺激した場合、コントロール群では Th1 分化が優位であるのに対して、DOCK2 欠損 CD4⁺T リンパ球では大量の IL-4 を産生し、Th2 分化が著明に亢進することを見いだした。real-time RT-PCR を用いて、この primary 刺激後の継時的な IL-4 産生を定量したところ、DOCK2 欠損 CD4⁺T リンパ球の 2nd phase (72 時間後) での IL-4 産生亢進は予想通り認められたものの、驚いたことに分化を規定する initial

phase (3 時間後) の IL-4 産生は DOCK2 欠損 CD4⁺T リンパ球でむしろ低いことを見いだした。一方、抗 IL-4 中和抗体の存在下で primary 刺激後の CD4⁺T リンパ球を initial phase で回収し IL-4 刺激したところ、STAT6 のリン酸化が DOCK2 欠損 CD4⁺T リンパ球で著明に亢進していることを見いだした。このように DOCK2 欠損による Th1/Th2 バランスの破綻は、initial phase での IL-4 産生の亢進が原因ではなく、その受け手側である IL-4 レセプターの発現レベルや分解機構が影響している可能性を見いだした。さらに、DOCK2 欠損 BALB/c マウスが重篤なアレルギー反応を自然惹起することを見いだした。研究代表者は、以上のような予備実験を重ねて本研究課題を立案するに至った。

本研究は、個体レベルで細胞骨格制御分子 DOCK2 とアレルギー発症との因果関係を明らかにすると共に、細胞・分子レベルでヘルパー T リンパ球の分化制御機構の詳細とそれにおける DOCK2 の役割を解明にすることで、アレルギー発症における細胞骨格制御分子 DOCK2 の重要性を実証し、その理解に立脚して、新しいアレルギー疾患の治療法開発に向け、その分子基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

アレルギー発症における細胞骨格制御分子 DOCK2 の機能を個体レベルで解析するために、BALB/c バックグラウンドマウスを用いて以下の計画に従い本研究を進めた。

(1) DOCK2 欠損 BALB/c マウスでは、週齢を重ねるに従ってアレルギー性眼瞼炎を自然発症するようになる。野生型 BALB/c マウスおよび DOCK2 欠損 BALB/c マウスを対象に、血清 IgE, IgG1, IgG2b を測定し、DOCK2 欠損により Th2 型免疫グロブリン産生が優位であることを統計学的に検討を行った。また、血清 IgE 値を指標として、生後早期からの各週齢で測定しアレルギー発症起点を検定した。さらに、眼瞼炎を指標にして、6 ヶ月間以上の長期間モニターすることで、個体レベルでのアレルギー発症を検証した。

(2) 眼瞼の固定標本作製し、アレルギー性免疫応答の指標となる好酸球ならびに肥満細胞などの細胞浸潤を組織学的に解析した。

(3) 野生型 BALB/c マウスおよび DOCK2 欠損 BALB/c マウスを対象に、抗 CD4 抗体の *in vivo* 投与を行い、アレルギー発症が CD4⁺T リンパ球に起因することを IgE 産生ならびに眼

眼炎を指標に証明した。

細胞・分子レベルでのヘルパーTリンパ球分化における細胞骨格制御分子DOCK2の機能解析に関しては、アレルギー発症の影響を除外するため、MHCクラスII拘束性TCRトランスジェニックマウス(2B4 TCR Tg)を用いて以下のように研究を進めた。

(4) DOCK2欠損および野生型の2B4 TCR TgマウスよりCD4⁺ Tリンパ球を単離し、抗IL-4抗体の存在下及び非存在下でTCR刺激を行い、IL-4レセプターα鎖およびcommon γ鎖の細胞表面での発現をFACSを用いて解析した。また、common γ鎖、IL-2レセプターβ鎖、IFN-γレセプターα鎖、IL-7レセプターα鎖に関しても同様に解析し、DOCK2欠損の影響がIL-4レセプターα鎖に特異的か否かにつき検討を行った。

(5) DOCK2欠損がIL-4レセプターα鎖の分解に及ぼす影響を解析するため、DOCK2欠損および野生型の2B4 TCR TgマウスよりCD4⁺ Tリンパ球を単離しTCR刺激を行い、cycloheximideで蛋白合成を止めた後、IL-4レセプターα鎖の発現をウェスタンブロットにて解析した。また、より定量的な解析のため、³⁵Sを用いたpulse chaseの実験を行った。

ここまでの研究成果を基にして、個体レベルならびに細胞・分子レベルで、さらに以下のように研究を進めた。

(6) 新たに作成したIL-4レセプターα鎖欠損とDOCK2欠損のダブルノックアウトBALB/cマウスを対象に、血清IgEの測定と眼炎のモニターを行い、DOCK2欠損によるアレルギー発症とIL-4レセプターとの関係を個体レベルで解析した。

(7) 野生型BALB/cマウスおよびDOCK2欠損BALB/cマウスから、CD4⁺ Tリンパ球を単離し、nudeマウスへ移入することでアレルギー発症を誘発する実験系を構築し、アレルギー発症におけるCD4⁺ Tリンパ球とDOCK2欠損の因果関係を個体レベルで検証した。

(8) DOCK2がRacの制御分子であることから、IL-4レセプターにおけるRacの関与を検討した。具体的には、DOCK2欠損および野生型の2B4 TCR TgマウスよりCD4⁺ Tリンパ球を単離し、ドミナントネガティブ変異体を一過性に発現させた後、FACSを用いてIL-4レセプ

ターの発現や分解に及ぼす影響を検討した。変異体の発現は、Tat配列を挿入した組み換え蛋白によるprotein transferあるいはGFPをコードするようにデザインしたプラスミドDNAのgene transferによって行った。

(9) DOCK2欠損および野生型の2B4 TCR TgマウスよりCD4⁺ Tリンパ球を単離し、細胞表面のみならず細胞内でのIL-4レセプターの局在をDeltaVisionを用いて観察した。分解系リソソームのマーカーとしてLAMP1、リサイクリングのマーカーとしてTransferrinを用いてIL-4レセプターとの局在について比較解析した。

4. 研究成果

アレルギー発症における細胞骨格制御分子DOCK2の機能を個体レベルで解析するために、BALB/cバックグランドマウスを用いて、血清IgE、IgG1、IgG2bを測定し、DOCK2欠損によりTh2型免疫グロブリン産生が優位であることを明らかにした。また、眼炎を指標にして、6ヶ月間以上の長期間モニターすると共に、眼炎の固定標本を作製しアレルギー免疫応答の指標となる好酸球ならびに肥満細胞などの細胞浸潤を組織学的に解析し、DOCK2欠損により個体レベルでのアレルギー発症が優位であることを明らかにした。さらに、細胞・分子レベルでのヘルパーTリンパ球分化における細胞骨格制御分子DOCK2の機能解析に関しては、アレルギー発症の影響を除外するため、MHCクラスII拘束性TCRトランスジェニックマウス(2B4 TCR Tg)よりCD4⁺ Tリンパ球を単離し、抗IL-4抗体の存在下及び非存在下でTCR刺激を行い、IL-4レセプターα鎖の細胞表面での発現をFACSにて解析したところ、DOCK2欠損によりその発現レベルが高く維持されていた。また、DOCK2欠損および野生型の2B4 TCR TgマウスよりCD4⁺ Tリンパ球を単離しTCR刺激を行い、³⁵Sを用いたpulse chaseなどの実験によりIL-4レセプターα鎖の発現を確認したところ、DOCK2欠損によりIL-4レセプターα鎖の分解が障害されていることが明らかとなった。

IL-4レセプターα鎖欠損とDOCK2欠損のダブルノックアウトBALB/cマウスを対象に、血清IgEの測定と眼炎のモニターを行い、DOCK2欠損によるアレルギー発症がIL-4レセプター依存的事であることを明らかにした。また、野生型BALB/cマウスおよびDOCK2欠損BALB/cマウスから、CD4⁺ Tリンパ球を単離しnudeマウスへ移入したところ、DOCK2欠損によるアレルギー発症がCD4⁺ Tリンパ球依存的事であることを個体レベルで明らかにした。さらに、DOCK2欠損および野生型マウスより

CD4⁺ T リンパ球を単離し、Rac のドミナントネガティブ変異体を一過性に発現させた後、IL-4 レセプターの発現や分解に及ぼす影響を解析したところ、DOCK2-Rac シグナルが IL-4 レセプター分解を制御していることを明らかにした。また、DOCK2 欠損および野生型マウスより CD4⁺ T リンパ球を単離し、細胞内での IL-4 レセプターの局在を DeltaVision を用いて詳細に観察したところ、DOCK2-Rac シグナルが IL-4 レセプター分解系への蛋白輸送を制御していることが明らかとなった。本研究において明らかとなったアレルギー発症における細胞骨格制御分子 DOCK2 の役割をさらに詳細に解析することで、今後、アレルギー治療法開発に向けての分子基盤が確立されることが期待される。

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 4 件)

- ① Nishikimi, A., Fukuhara, H., Su, W., Hongu, T., Takasuga, S., Mihara, H., Cao, Q., Sanematsu, F., Kanai, M., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Shibasaki, M., Kanaho, Y., Sasaki, T., Frohman, M. A. and Fukui, Y., Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis, *Science*, 324, 384-387, 2009. (査読; 有)
- ② Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Inayoshi, A., Enjoji, M., Takayanagi, R., Sasazuki, T. and Fukui, Y. Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid DCs versus myeloid DCs. *Blood*, 111, 2973-2976, 2008. (査読; 有)
- ③ Tanaka, Y., Hamano, S., Gotoh, K., Murata, Y., Kunisaki, Y., Nishikimi, A., Takii, R., Kawaguchi, M., Inayoshi, A., Masuko, S., Himeno, K., Sasazuki, T. and Fukui, Y. T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor- α subunit controlled by the Rac activator Dock2. *Nat. Immunol.*, 8, 1067-1075, 2007. (査読; 有)
- ④ Bécart, S., Charvet, C., Canonigo, A. J., de Trez, C., Tanaka, Y., Duan, W., Ware, C., Croft, M. and Altman, A. SLAT regulates Th1 and Th2 inflammatory responses by controlling Ca²⁺/NFAT signaling. *J. Clin. Invest.*, 117, 2164-2175, 2007. (査読; 有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 田中芳彦、錦見昭彦、後藤和人、稲吉あゆみ、福井宣規、アレルギー反応を制御する DOCK2-Rac シグナルを介した新しい分子メカニズムの解明、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1-3 日、京都
- ② 後藤和人、田中芳彦、錦見昭彦、前田直良、石川天洋、稲吉あゆみ、吉開泰信、福井宣規、形質細胞様樹状細胞の遊走・活性化における CDM family 分子 DOCK2 の役割、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1-3 日、京都
- ③ 錦見昭彦、田中芳彦、福井宣規、好中球におけるリン脂質を介した Rac 活性分子 DOCK2 の時空間制御、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1-3 日、京都
- ④ Tanaka, Y. and Fukui, Y. T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor- α subunit controlled by the Rac activator DOCK2. The 2nd Global COE International Symposium joint with the 18th Hot Spring Harbor Symposium of Medical Institute of Bioregulation, 2008 年 11 月 9-10 日、福岡
- ⑤ Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A. and Fukui, Y. Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells. The AWAJI International Forum on Infection and Immunity, 2008 年 9 月 7-11 日、淡路
- ⑥ 田中芳彦、福井宣規、ヘルパー T 細胞 lineage commitment を制御する DOCK2 の役割、第 18 回 Kyoto T Cell Conference、2008 年 6 月 13-14 日、京都
- ⑦ Tanaka, Y. and Fukui, Y. Dock2-Rac signaling pathway controls lineage commitment of CD4⁺ T cells via intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor- α subunit. International Symposium on Membrane Traffic. 2007 年 11 月 27-28 日、淡路
- ⑧ 田中芳彦、錦見昭彦、後藤和人、川口真喜子、稲吉あゆみ、福井宣規、IL-4 受容体のメンブレントラフィックを介した DOCK2-Rac シグナルによる CD4⁺T 細胞 lineage commitment 制御機構の解明、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑨ 川口真喜子、錦見昭彦、田中芳彦、福井宣規、B 細胞の分化・増殖における DOCK2 の機能、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑩ Tanaka, Y. and Fukui, Y. DOCK2 links TCR

signals to IL-4 receptor downregulation to control lineage commitment of CD4⁺ T cells. The AWAJI International Forum on Infection and Immunity, 2007年9月1-5日、淡路

〔図書〕（計1件）

- ① 田中芳彦、後藤和人、福井宣規、樹状細胞の遊走を制御する CDM ファミリー分子 DOCK2、羊土社、実験医学、2008、26、53-58.

〔その他〕

報道関連情報

- ① NHK テレビ；研究論文紹介（2007年9月3日）
- ② FBS テレビ；研究論文紹介（2007年9月3日）
- ③ 毎日新聞；研究論文紹介「アレルギー反応の抑制システム解明」（2007年9月3日）
- ④ 日本経済新聞；研究論文紹介「アレルギー抑える遺伝子解明」（2007年9月3日）
- ⑤ 西日本新聞；研究論文紹介「アレルギー構造解明」（2007年9月3日）
- ⑥ 朝日新聞；研究論文紹介「アレルギー抑制たんぱく質作用」（2007年9月5日）

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 芳彦 (TANAKA YOSHIHIKO)
九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：00398083

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし