

平成22年5月31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790372

研究課題名 (和文) リンパ球における mDia ファミリー蛋白質の包括的機能解析

研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of function of mDia family proteins in lymphocytes

研究代表者

坂田 大治 (SAKATA DAIJI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70456870

研究成果の概要(和文):アクチン蛋白質は繊維状に繋がって、細胞の内部に張りめぐっており、細胞が形を作るための骨組みを形成している。アクチン蛋白質を繊維状に繋げる蛋白質が mDia 蛋白質であり、mDia1、mDia2、mDia3 の3種類がある。研究代表者らは、それぞれの mDia 蛋白質を欠損させたマウスを作製して、生体でどのような影響が出るかを研究し、これらのマウスではある種の免疫反応が減弱していることを明らかとした。

研究成果の概要 (英文) : Actin protein are polymerized and work as a cytoskeleton in cells, and then regulates cell shape. mDia proteins are actin nucleating proteins, which consist of three types of mDia proteins, mDia1, mDia2, and mDia3. We made mice deficient in each type of mDia protein and examined roles of mDia proteins in the body. We found that certain immune responses are impaired in these mDia deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：mDia、アクチン、リンパ球、免疫、遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

リンパ球は、骨髄や胸腺から出てリンパ節や脾臓などの二次リンパ組織へ遊走して末梢免疫組織を形成する。また、外来抗原の侵入時には樹状細胞のような抗原提示細胞が

その抗原を取り込み、所属リンパ節へ遊走し、T細胞へ抗原提示を行う。抗原を認識し活性化されたT細胞はリンパ節を出て炎症部位へと遊走して免疫反応にあたる。このような免疫系細胞の遊走や細胞間接触は免疫監視機

構で最も重要な現象の一つである。免疫担当細胞の方向性を持った移動はケモカインなどの走化性シグナルが細胞内でアクチンなど細胞骨格系の極性をもった変化を起こすことで誘導される。また樹状細胞がT細胞に抗原提示する際にはこれらの細胞間で「免疫シナプス」と呼ばれる安定した接触構造を作るが、この際にも細胞骨格系の再編成が起こることが知られている。これら細胞骨格系の再編成時に働くのが、Rho、Rac、Cdc42などの低分子量GTP結合蛋白質とその下流で働くエフェクター分子である。mDia蛋白質とWiskott-Aldrich症候群蛋白質(WASP)はそれぞれRho及びCdc42の下流で働くエフェクター分子であり、mDiaは長い直鎖状のアクチン線維を、WASPはArp2/3を介して網目状のアクチン線維を作り出すことにより、哺乳類細胞の二つの主要なアクチン重合システムとして働いている。WASPの免疫反応での重要性は、WASP遺伝子に変異を持つWASの患者やWASP欠損マウスが免疫不全を生じることで示されてきたが、mDiaの免疫系における意義は不明であった。mDia分子が研究代表者の所属研究室で発見され、また、研究代表者が大学院時代を通して免疫研究に携わってきた経緯から、申請者はこの分子の免疫系での生理的役割を解明したいと考えた。研究代表者は遺伝子欠損マウスを使い世界に先駆けてmDia1の免疫系での生理的役割を明らかにした (Sakata *et. al. J. Exp. Med.*, **204: 2031-2038, 2007**)。本研究ではそれらの知見をさらに発展させて、mDia1、mDia2、mDia3の全てのアイソフォームについてその免疫系での生理的役割を明らかにする計画で研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的はアクチン重合促進蛋白質

であるmDiaのアイソフォーム全て(mDia1、mDia2、mDia3)について免疫系での生理的意義を明らかにすることである。そのために、本研究ではmDiaの全てのアイソフォーム(mDia1、mDia2、mDia3)について遺伝子欠損マウスを使って包括的解析を行う。このことにより哺乳類細胞の主要なアクチン形成システムの一つである直鎖状アクチンの形成が免疫系の生理でどのような役割を持つかが明らかにできる。また何も表現型が出ない場合、WASPの報告と照らし合わせて全く新しい(未知の分子も含む)分子の存在や新規システムの概念が出る可能性もある。(即ち、アクチンの重合が細胞の運動や細胞間接着にとって非常に基本的な現象であることから表現型の有無に関わらず、次の研究への足がかりを作ることができる。特に免疫系では免疫細胞特異的に重要な働きをする分子の存在も知られている(例えばDOCK2など))。mDia1、mDia3については遺伝子欠損マウスを使って個体全体での反応からスタートし、最終的に分子レベルでの機能メカニズムの解明までを目指す。

3. 研究の方法

(1) mDia1欠損マウスでの免疫反応の解析

病態時の免疫系でのmDia1の役割を解析するため、野生型およびmDia1欠損マウスに接触皮膚炎モデルを適用し、リンパ球の反応性を調べた。まず、剃毛したマウス腹部にハプテンであるDNFBを塗布することで感作し、5日後にDNFBを耳介に塗布することで免疫反応を惹起する。6日後に耳介の腫脹を指標にして免疫反応を評価する。またDNFB感作後、5日目の時点で所属リンパ節を摘出し、同一抗原性を有するDNBSで刺激することで、メモリーT細胞の活性化を引き起こし、チミ

ジンの取り込みを指標に抗原に対する細胞増殖反応を評価する。それぞれの実験で、野生型と mDia1 欠損マウスでの反応を比較する。

(2) mDia3 の免疫系での役割の解析

ナイーブ状態での野生型マウスと mDia3 欠損マウスとで胸腺および末梢リンパ組織での免疫系細胞の構成について、組織染色およびフローサイトメトリーにより解析した。また、トランスウェルを用いたケモタキシスアッセイを行い、mDia3 欠損リンパ球の遊走能について検討した。

(3) プレオマイシン誘導性肺繊維症モデルでの mDia1 の役割の解析

病態での mDia1 の役割を解析するため、野生型および mDia1 欠損マウスに対してプレオマイシン誘導性肺繊維症モデルを適用して繊維化における mDia1 の役割を解析する。経気管的にマウスにプレオマイシンを投与し、繊維化の主成分であるコラーゲン産生の指標として、7、14、21 日後の肺のハイドロキシプロリン量を測定することで、野生型と mDia1 欠損マウスとで繊維化の程度を比較する。

(4) mDia1/3 二重欠損マウスの表現系の解析

mDia1/3 二重欠損マウスの表現系を調べるため、各臓器の組織染色を行い、野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) mDia1 欠損マウスでの免疫反応の解析

病態時の免疫系での mDia1 の役割を解析するため、野生型および mDia1 欠損マウスに接触皮膚炎モデルを適用し、その反応性を調べ、

mDia1 欠損マウスでは免疫反応が減弱していることが明らかとなった。また、ハプテン感作後 5 日目の所属リンパ節細胞の抗原への反応性を調べると、mDia1 欠損マウス由来のリンパ節細胞では、抗原に対する反応性が野生型と比較して減弱していることが明らかとなった。

(2) mDia3 の免疫系での役割の解析

①野生型と mDia3 欠損マウスで免疫器官を中心とした組織の比較を H&E 染色により行ったが、両マウス間で構造等の明確な違いは認められなかった。②また免疫組織染色により、胸腺、脾臓、リンパ節を調べたが、両マウス間で染色パターンの違いは認められなかった。③さらにフローサイトメトリーにより野生型と mDia3 欠損マウスとで胸腺、脾臓、リンパ節、血液での免疫系細胞の分画を調べたが、有意な差は認められなかった。④次に mDia3 欠損マウス由来リンパ球の遊走能を比較するため、トランスウェルを用いたケモタキシスアッセイを行い、mDia3 欠損マウス由来 T 細胞が野生型由来 T 細胞と比較して、有意な遊走能の減弱を示すことを明らかとした。B 細胞については、mDia3 欠損マウス由来と野生型由来とで有意な差を認めなかったが、mDia3 欠損マウス由来 B 細胞で減弱傾向を示した。⑤mDia3 欠損マウス由来 T 細胞と野生型由来 T 細胞とで anti-CD3 刺激に対する反応性を調べ、mDia3 欠損マウス由来 T 細胞が野生型由来 T 細胞と比較して有意な反応性の減弱を示すことを明らかとした。

(3) プレオマイシン誘導性肺繊維症モデルでの mDia1 の役割の解析

プレオマイシン誘導性肺繊維症モデルを野生型と mDia1 欠損マウスに適用し、ハイドロキシプロリンを指標にして繊維化の程度

を比較した。その結果、mDia1 欠損マウスでは繊維化が減弱していることが明らかとなった。

(4) mDia1/3 二重欠損マウスの表現系の解析

mDia1/3 二重欠損マウスの表現系を調べ、mDia1/3 二重欠損マウスは野生型と比較して、産仔が得難いこと、生まれた mDia1/3 二重欠損マウスでは、野生型と比較して、明らかな体長縮小が見られることが明らかとなった。

また、ナイーブ状態で白血球数の増大、胸腺萎縮、脾臓炎症を示すなど、興味深い免疫関連異常を示すことが明らかとなった。

上記の成果はいずれも mDia ファミリー蛋白質の生体での役割を様々なレベルで示したものであり、世界的にも類似の報告のない我々独自の成果である。

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 Sakata D., Yao C., Narumiya S., Prostaglandin E₂, An immunoactivator, J. Pharm. Sci., 査読有、112巻、2010、1-5

② Oga T., Matsuoka T., Yao C., Nonomura K., Kitaoka S., Sakata D., Kita Y., Tanizawa K., Taguchi Y., Chin K., Mishima M., Shimizu T., Narumiya S., Prostaglandin F_{2α}-FP signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of TGF-β, Nat. Med., 査読有、15巻、2009、1426-30

③ Yao C., Sakata D., Esaki Y., Li Y., Matsuoka T., Kuroiwa K., Sugimoto Y., Narumiya S., Prostaglandin E₂-EP4 signaling promotes immune inflammation through T_H1 cell differentiation and T_H17 expansion, Nat. Med., 査読有、15巻、2009、633-40

④ 坂田大治、T細胞の遊走とアクチン再編成、臨床免疫・アレルギー科、査読無、50巻、

2008年、265-270

[学会発表] (計2件)

① Daiji Sakata, Prostaglandin E₂-EP4 signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of TGF-β, The 9th world congress on inflammation, July 7-9, 2009, Keio Plaza Hotel, Tokyo

② 坂田大治、Dual role of the PGE₂-EP4 signaling in mouse EAE model, 第83回日本薬理学会、2010年3月17日、大阪グランキューブ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 大治 (SAKATA DAIJI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70456870