

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791063

研究課題名（和文）臓器特異的シタキシン3欠損マウスを用いたサイトカイン分泌機構の解析とその応用

研究課題名（英文）Analysis of cytokine secretion and its application using macrophage specific syntaxin 3 knockout mice

研究代表者

入内島 伸尚（IRIUCHIJIMA NOBUHISA）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：10431719

研究成果の概要（和文）：マクロファージ特異的シタキシン3ノックアウトマウスを作成し、TNF α の分泌に関係しているかどうかを、ELISA、染色により評価した。当初の見込みと異なりシタキシン3はTNF α の分泌には関与していないことが明らかとなった。しかし、ゴルジ体から細胞辺縁にシタキシン3は移動することから、他のサイトカインの分泌に関与していることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：Using macrophage specific syntaxin 3 knockout mice, whether syntaxin 3 was involved in the secretion of TNF α , it was evaluated by staining and ELISA. Unlike the initial estimates, the syntaxin 3 was not found to be involved in the secretion of TNF α . However, syntaxin 3 to move from the Golgi apparatus to the cell periphery, It was thought it is involved in the secretion of other cytokines.

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	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：集中治療医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：シタキシン3、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ、マスト細胞、好中球、好酸球などの免疫系細胞は重要な生体防御機構であり lipopolysaccharide (LPS) などの刺激により tumor necrosis factor α (TNF α)

やインターロイキンなどのサイトカインを産生し分泌する。サイトカインの分泌は開口放出によるが、典型的には神経において granule plasma fusion として神経伝達物質の放出として知られている。神経における開口

放出には soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

(SNARE) 蛋白である syntaxin、や vesicle-associated membrane protein (VAMP)、synaptosome-associated protein (SNAP) などが関与し、Munc18 による制御などがかわってくる。SNARE 仮説では小胞上に存在する VAMP と、細胞膜に存在する syntaxin と SNAP25 (または 23) が複合体を形成し小胞を係留しカルシウムの流入により小胞の膜と細胞膜が融合し開口放出が起こる。Munc18 は syntaxin を折りたたむように結合し syntaxin の働きを制御している。

これまでの報告でマクロファージ、マスト細胞、好中球には SNARE 蛋白である syntaxin3 と 4、SNAP23、VAMP が存在することが示されている (The Journal of Immunology 1996, respiratory MEDICINE 2000)。またこれらと関係している Munc18 もマクロファージ、マスト細胞に存在することが報告されている (Journal of Cell Science 2003)。

マクロファージ培養細胞 RAW264 を用いた実験で LPS 刺激により活性化したマクロファージから TNF α が放出される過程で syntaxin 4 は trans-Golgi network からの輸送と開口放出に重要な役割をしているという報告がある (Current Biology 2003、The Journal of Biological Chemistry 2006)。また、マスト細胞の培養細胞系 RBL 細胞を用いた実験で、マスト細胞の開口放出に Munc18-2 が関与しており、Munc18-2 は syntaxin 3 と複合体を作っているという報告もある (FEBS Letters 2003、Molecular Immunology 2007)。さらに、syntaxin 3 は SNAP 23 と開口放出過程において相互作用し、SNAP 23 はマスト細胞の開口放出に関係している (Cell 1998、The Journal of Biological Chemistry 2005)。以上のことから、syntaxin 3 がサイトカイン放出に関

して重要な役割を果たしていることが推測されるがその報告はほとんどない。

Syntaxin3 は全身に発現している蛋白であり上皮細胞において trans-Golgi network から apical plasma membrane への輸送に重要な役割を担っていることが知られている。全身に発現しているためコンベンショナルノックアウトマウスでは胎生 8.5 日以前に死亡することを確認している。そこでコンディショナルノックアウト法を行うために syntaxin3 の floxed mouse を作成した。このマウスは exon 8, 9 を loxP で挟んでありこのマウスと臓器特異的に Cre recombinase を発現するマウスと掛け合わせることで loxP の間の配列が欠損することにより臓器特異的ノックアウトマウスを作成することができる。今回使用する Cre マウスは MX1 プロモータに Cre recombinase cDNA を結合させたトランスジェニックマウスで Cre recombinase の発現は肝臓、腎臓など一部の臓器に限られ、主にマクロファージやリンパ球に存在し免疫系の研究目的として使用されている (Blood 2007)。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は臓器特異的 syntaxin 3 ノックアウトマウスを用いて syntaxin 3 のサイトカイン放出過程の細胞レベルでの役割と固体における作用を明らかにするものである。

1) マクロファージを培養し LPS を投与し細胞内のサイトカイン量、培養液中のサイトカイン量を調べることにより、マクロファージの開口放出過程に syntaxin3 が関与しているかどうか調べる。またこれらのマクロファージを TNF α やインターロイキンで免疫染色する。これにより放出されないサイトカインが細胞内に蓄積されている像が得られる可能

性がある。さらに syntaxin3 に green fluorescent protein を融合させたプラスミド(syntaxin3-GFP)をアデノウイルスに組み込んだものをマクロファージに導入し syntaxin3 を過剰発現させたマクロファージを作成し、syntaxin3-GFP を過剰発現させた細胞に LPS をかけてマクロファージ内の syntaxin3-GFP の動きを解析する。過剰発現した syntaxin3 の動きを見ることにより生体内での syntaxin3 の役割を推測できる。またこの時のサイトカイン濃度を測定し、サイトカイン濃度が増加していれば syntaxin3 のサイトカイン放出時の関与が確実なものとなる。

2) コンディショナルノックアウト法を用いて得た臓器特異的ノックアウトマウスと野生型マウスに LPS を腹腔内に投与して生存曲線を作成する。また、肝臓や腎臓などの臓器について組織を取り出し組織切片を作成しその侵襲の大きさの違いを比較する。さらに血中の炎症性サイトカイン TNF α やインターロイキンの濃度を測定する。Syntaxin3 がマクロファージなどからのサイトカイン放出に関与しているのであれば、臓器特異的ノックアウトマウスでは過度な高サイトカイン血症を引き越すことはなく、野生型マウスより生存が伸びることが予想され組織侵襲も少ないものとなる。

3. 研究の方法

マクロファージ特異的コンディショナルノックアウトマウスの作成 ; Syntaxin3 floxed マウスと Mx1 Cre マウスを交配することによりコンディショナルノックアウトマウスを作成する。交配したマウスを PCR で genotyping し (使用するプライマーは syntaxin3 については GACCCTGCTGCTTGTGCCTCTTTATTC と

TGGGCAGCCCTCCTGCAACCTTACTG、 Cre recombinase については AGGTTTCGTTCTCTCATGGA と TCGACCAGTTTAGTTACCC を使用) Mx1 Cre syntaxin3 floxed/floxed マウスを得る。Mx1 Cre マウスの Cre recombinase は polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) により誘導され発現するので生後 3 週のマウスの腹腔内に pI-pC 250 μ g を隔日 3 回腹腔内投与し完全なコンディショナルノックアウトマウスを作成する。これを用いて以下の実験を行った。

syntaxin3 コンディショナルノックアウトマウスと野生型マウスの腹腔内よりマクロファージを取り出してきてマクロファージの反応を見た

マウスの腹腔内に 4ml の thioglycolate を投与する。3 日後に腹水を採取し PBS で洗浄後遠心分離しマクロファージを採取する。これを DMEM と 10%FCS と 5%ペニシリンを含む培養液の中で初代培養をする。以下の実験はこの初代培養を用いて行った。

a) シンタキシン 3 がマクロファージでノックアウトされているか RT-PCR で確認した。実際に PIPC で誘導をかけたマクロファージのシンタキシン 3 は減少していた。

b) 培養マクロファージに LPS で刺激して TNF α の放出に関係があるか ELISA, シンタキシン 3-GFP のマクロファージない導入による染色で確認した。ELISA の結果は一定せず、ノックアウトも野生型もはっきりと関連性は見出せなかった。シンタキシン 3-GFP をマクロファージに感染させ、LPS で刺激後、30 分、1 時間で GFP と TNF α の関係をコンフォーカルレーザー顕微鏡で確認した。すると、刺激前は、シンタキシン 3-GFP と TNF α はゴルジ体で共局在しているように観察された

が、LPS 刺激をすることで TNF α は細胞の辺縁に移動し、またシタキシシン 3-GFP も細胞辺縁に移動していったが、共局在していなかった。このことから、シタキシシン 3 は LPS 刺激による TNF α 放出には関係がないことが示された。

4. 研究成果

シタキシシン 3 は TNF α の放出には関係していないことがわかった。しかし LPS 刺激により、1 時間以内にゴルジ体から細胞辺縁に移動していることから、早期に分泌される他のサイトカインの放出と関係している可能性がある。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入内島 伸尚 (IRIUCHIJIMA NOBUHISA)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：10431719