

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790470

研究課題名(和文) T前駆細胞の胸腺進入過程における新たな制御機構の解明

研究課題名(英文) Novel mechanism for the regulation of lymphocyte dynamics

研究代表者

鈴木 一博 (Suzuki, Kazuhiro)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・准教授

研究者番号：60611035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々はケモカイン受容体CCR7の細胞内領域に会合するタンパク質としてCOMMD3を同定した。本研究では、当初の目的であるCCR7を介したT前駆細胞の胸腺への進入におけるCOMMD3の役割を明らかにすることは技術的に困難であったが、COMMD3がスフィンゴシン1リン酸受容体S1P1のシグナル制御因子として胸腺からのT細胞の脱出を調節することが明らかになり、予想外の成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We identified COMMD3 as a novel regulator of chemoattractant receptor signaling. In this study, we aimed at clarifying a novel mechanism for the regulation of lymphocyte dynamics through functional analysis of COMMD3. By analyzing gene-targeted mice, we found that COMMD3 acts as a positive regulator of sphingosine 1-phosphate receptor S1P1 and promotes T cell exit from the thymus.

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：ケモカイン受容体 シグナル伝達 免疫細胞動態

## 1. 研究開始当初の背景

我々は生体内の複雑なケモカイン環境における免疫細胞の新たな動態制御機構を明らかにすることを目的として、ケモカイン受容体 CCR7 のシグナル制御因子の同定を試みた結果、CCR7 の細胞内 C 末端領域に会合する分子として copper metabolism gene MURR1 domain 3 (COMMD3) を同定した。細胞株において COMMD3 の発現を small hairpin RNA (shRNA) を用いて抑制したところ、CCR7 のリガンドに対する走化性が低下することが確認され、COMMD3 が CCR7 のシグナル伝達の正の制御因子であることが示唆された。さらに生体内での COMMD3 の役割を明らかにするため、COMMD3 に対する shRNA を骨髄の造血幹細胞に導入し、放射線照射マウスに移入することによって、血液細胞における COMMD3 の発現を抑制することを試みた。作製した shRNA 導入骨髄キメラマウスのリンパ組織をフローサイトメトリーで解析した結果、COMMD3 に対する shRNA が導入された細胞が胸腺内にはごく少数しか存在しないことを見出した。このことから、COMMD3 が T 前駆細胞の胸腺への進入において重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれらの予備的な実験結果を踏まえて、CCR7 のシグナル伝達制御、および CCR7 によって媒介される T 前駆細胞の胸腺への進入過程における COMMD3 の役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *Commd3* 遺伝子欠損マウスの作製

マウス *Commd3* 遺伝子の第 2 エクソンから第 7 エクソンまでを loxP で挟み込んだターゲティングベクターを B6 マウス由来の ES 細胞に導入した。得られた *Commd3<sup>lox/lox</sup>* マウスを CAG プロモーターの支配下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (CAG-Cre) と交配し、全身性に *Commd3* 遺伝子を欠損するマウスの作製を試みた。造血幹細胞を含め血液細胞で *Commd3* 遺伝子を欠損させるためには Vav-Cre マウスを、T 細胞で *Commd3* 遺伝子を欠損させるためには CD4-Cre マウスを

*Commd3<sup>lox/lox</sup>* マウスと交配した。

### (2) フローサイトメトリー

末梢血およびリンパ組織から細胞懸濁液を作製し、蛍光標識抗体で染色後にフローサイトメーターで解析した。本研究では以下の細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体を使用した: CD3ε (145-2C11), CD4 (RM4-5), CD8α (57-6.7), CD62L (MEL-14), CD44 (IM7), CD69 (H1.2F3)。

### (3) 走化性試験

トランスウェルを用いた走化性試験においてスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) に対するリンパ球の走化性を評価した。

### (4) 免疫沈降法

マウス細胞株 2PK-3 に Flag-S1P<sub>1</sub>, HA-COMMD3 および Myc-β-arrestin 2 をレトロウイルスを用いて導入した。細胞を S1P で刺激した後溶解し、タグペプチドに対する抗体で免疫沈降を行い、各分子間の会合について検討した。

## 4. 研究成果

COMMD3 の生体内における役割を明らかにするために shRNA を用いた予備的な検討を行ったが、shRNA による非特異的な遺伝子抑制効果 (off-target 効果) の可能性が否定できないため、*Commd3* 遺伝子欠損マウスの作製を行った。まず *Commd3* 遺伝子を全身性に欠損するマウスを作製したところ、胎生早期に致死であったため解析が困難であった。そこで *Commd3* 遺伝子を細胞特異的に欠損するマウスを作製した。T 前駆細胞を含めた幼弱な血液細胞で *Commd3* 遺伝子を欠損させるため、Vav-Cre<sup>+</sup> *Commd3<sup>lox/lox</sup>* マウスを作製したが、この場合もマウスは胎生早期に致死であり解析は困難であった。続いて CD4-Cre<sup>+</sup> *Commd3<sup>lox/lox</sup>* マウスを作製し、成熟 T 細胞において *Commd3* 遺伝子を欠損させたところ、生児が得られ外見上は大きな異常もなく成体まで成長した。その血液およびリンパ組織をフローサイトメトリーを用いて解析した結果、野生型マウスに比べて胸腺において成熟 T 細胞の蓄積が認められる一方、末梢血中の成熟 T 細胞の数が 10 分の 1 程度にまで減少するという表現型が確認された。このことは、*Commd3* 遺伝子を欠損することによって、胸腺から血液中への成熟 T 細胞の脱出が阻害されていることを示して

いる。

成熟T細胞が胸腺から脱出する際に必須のスフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1P<sub>1</sub> の反応性について走化性試験を用いて検討した結果, COMMD3 欠損 T 細胞の反応性が野生型 T 細胞に比べて低いことが確認された(図)。このことは, COMMD3 が S1P<sub>1</sub> の正の制御因子として機能していることを示唆している。一方で, COMMD3 欠損 T 細胞の CCR7 の反応性は野生型 T 細胞と同等であった。したがって, shRNA を用いて COMMD3 の発現を抑制することによって得られた実験結果は, off-target 効果によるものと推測される。

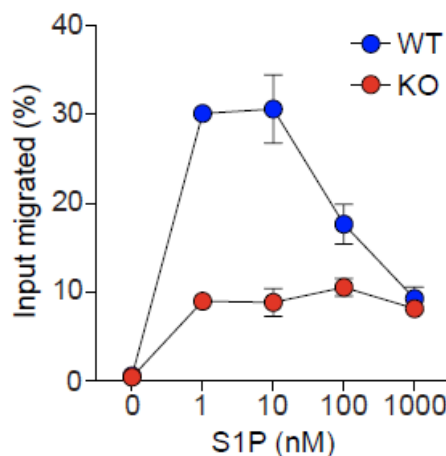


図. CD4-Cre<sup>+</sup>Commd3<sup>+/+</sup> マウス (WT) と CD4-Cre<sup>+</sup>Commd3<sup>fllox/fllox</sup> マウス (KO) の CD4 陽性 T 細胞の S1P<sub>1</sub> に対する反応性。

細胞株に COMMD3 と S1P<sub>1</sub> に強制発現させ, 両者の会合について検討したところ, S1P<sub>1</sub> が刺激されることによって COMMD3 の S1P<sub>1</sub> への会合が誘導されることを見出した。さらに, COMMD3 が G タンパク共役型受容体の主要なシグナル制御因子である  $\beta$ -arrestin 2 と会合することも確認されており, COMMD3 が  $\beta$ -arrestin 2 との相互作用を介して S1P<sub>1</sub> のシグナル伝達を制御している可能性が示唆された。今後 COMMD3 による S1P<sub>1</sub> のシグナル伝達制御のメカニズムについてさらに解析を進めたい。

このように本研究では, T 前駆細胞の胸腺への進入過程における COMMD3 の役割を明らかにすることは技術的に困難であったが, COMMD3 が S1P<sub>1</sub> のシグナル制御因子として胸腺からの成熟 T 細胞の脱出を調節す

ることが明らかになり, 当初は予想しなかった成果が得られた。

#### 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1件)

1. Gray, E.E., Friend, S., Suzuki, K., Phan, T.G. and Cyster, J.G. Subcapsular sinus macrophage fragmentation and CD169 (+) bleb acquisition by closely associated IL-17-committed innate-like lymphocytes. ***PLoS One*** 7: e38258; 2012. (査読有)

[学会発表](計4件)

1. 鈴木一博. 2光子励起顕微鏡を用いたリンパ節のイメージング. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012年12月7日 (口頭発表, 招聘講演)。
2. 鈴木一博. 2光子励起蛍光顕微鏡で見るB細胞免疫応答. 愛媛大学分子病態医学セミナー, 愛媛, 2013年3月13日 (口頭発表, 招聘講演)。
3. Kazuhiro Suzuki. Adrenergic control of B cell egress from lymph nodes. 42th Annual Meeting of JSI, Makuhari, Dec 13, 2013 (Oral & Poster presentation).
4. Kazuhiro Suzuki. Adrenergic control of lymphocyte dynamics. RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2014, Yokohama, Jun 27, 2014 (Oral presentation, Invited).

[図書](計2件)

1. 鈴木一博 他. *In vivo* イメージング 実験プロトコール. 羊土社, 2013, 118-126.
2. 鈴木一博 他. 生体イメージング研究最前線. 南山堂, 2014.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kazuhirosuzuki.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 一博 (SUZUKI, Kazuhiro)  
大阪大学免疫学フロンティア研究センター  
・特任准教授  
研究者番号：60611035

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし