

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08591

研究課題名(和文) 制御性T細胞の分化におけるアクチン重合因子mDiaの機能解析

研究課題名(英文) Role of mDia, a polymerization factor, in Treg differentiation

研究代表者

Thumkeo Dean (Thumkeo, Dean)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：40372594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1) mDia1/3DKOマウスを用いて、mDia1/3がnTreg細胞の分化に促進的に働くことを見出した。2) in vitroでiTreg細胞の分化誘導を行い、mDia1/3がiTregの分化においても不可欠であることを見出した。3) F-actinの蛍光標識であるEGFP-lifectをT細胞に導入し、Treg細胞への分化に不可欠であるTCR刺激を加えた時に、mDia1/3欠損T細胞のF-actin構造及び動態が著しく阻害されることを見出した。4) 遺伝子発現解析のために、Treg細胞がEGFP蛍光標識されるmDia1/3 cDKOマウスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はTreg細胞の分化にアクチン重合因子mDiaが不可欠であることを見出した。さらに、Treg細胞の分化におけるmDiaの分子作用機序の一端を明らかにし、これまでの研究によって明らかになっているTreg細胞分化メカニズムの知見と統合させることにより、Treg細胞の分化及び機能発現の理解を深めることができると考えている。さらには、臨床的な観点から、Treg細胞の分化あるいは機能発現に関わる分子とその働くメカニズムの解明は将来的に自己免疫疾患に応用できる新しい免疫抑制薬の開発につながる可能性があり、非常に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1) Using mDia1/3 DKO mice, we found that mDia1/3 promoted differentiation of nTreg cells. 2) We induced differentiation of iTreg cells in vitro and found that mDia1/3 is also essential for iTreg differentiation. 3) When we stimulated TCR signaling that is critical for Treg differentiation, we found that the F-actin structure and kinetics of mDia1/3-deficient T cells were significantly inhibited. 4) For gene expression analysis, we generated mDia1/3 cDKO mice in which Treg cells were fluorescently labeled with EGFP.

研究分野：薬理学

キーワード：制御性T細胞 アクチン細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

免疫寛容とは、本来反応しうる抗原に対して、その反応が抑制される状態である。その基本は、自己抗原に対する免疫不応答、即ち免疫自己寛容の獲得にある。生体内における免疫寛容獲得の重要なメカニズムの一つとして CD4+CD25+制御性 T 細胞(Treg)による免疫抑制が知られている。これまでの研究により Treg 細胞の異常は免疫寛容の破綻を来し、自己免疫疾患やがんの原因となりうるということが明らかになっているが、その分化メカニズムについてまだ不明な点が多く、特に細胞骨格の関与もほとんど分かっていない。

哺乳類動物においてはアクチン重合因子として mDia が知られており、mDia1、mDia2 及び mDia3 の 3 つのアイソフォームが発現している。申請者はこれまで、生体内における mDia の機能を明らかにするために、ノックアウトマウスを作製し、その表現系解析を行ってきた。その結果、T 細胞において、mDia1/3 がアクチン細胞骨格の重合を介して、T 細胞の活性化に必要である TCR シグナル伝達に促進的働くことを明らかにした。しかし、TCR シグナルが寄与して Treg 細胞の分化において mDia1/3 がどのように働くかについては未解明である。

2. 研究の目的

本研究では Treg 細胞の分化における mDia1/3 の機能及び分子作用メカニズム解明を目指し、mDia1/3 が Treg 細胞の分化に伴う遺伝子発現変化にどう働くかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず mDia1/3 DKO マウスの FACS 解析により Treg 細胞分化における mDia の関与を明らかにする。さらに mDia1/3 阻害・欠損における *in vitro* の iTreg 細胞の分化を検討する。また、Treg 細胞の分化における mDia の分子作用機序を解明するために、F-actin の染色を行い顕微鏡による観察を行う。最後に、mDia1/3 欠損 Treg 細胞を単離し、遺伝子発現を解析し、control Treg 細胞との比較を行う。

4. 研究成果

本研究では Treg 細胞の分化にアクチン重合因子 mDia がどのように関わっているかを明らかにすることを目的とし、研究を行った。これまで得られた主な成果として、1) mDia1/3 二重欠損(DKO)マウスにおいて、胸腺での nTreg 細胞産生の障害及び 2 次リンパ組織及び末梢血での Treg 細胞の減少を見出し、mDia1/3 が nTreg 細胞の分化に促進的に働くことを見出した。2) Tamoxifen 誘導型 mDia1/3 の conditional knockout マウス(cDKO)より naïve CD4 T細胞を単離し、*in vitro* で iTreg 細胞の分化誘導を行い、mDia1/3 が iTreg の分化においても不可欠であることを見出した。3) F-actin の蛍光標識である EGFP-lifect を T細胞に導入し、Treg 細胞への分化に不可欠である TCR 刺激を加えた時に、mDia1/3 欠損 T細胞の F-actin 構造及び動態が著しく阻害されることを見出した。4) 遺

伝子発現解析のために、mDia1/3 cDK0 マウスと EGFP-foxp3 マウスの掛け合わせを行い、Treg 細胞が蛍光標識される mDia1/3 cDK0 マウスを作成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sumitomo A, Siriwach R, Thumkeo D, Ito K, Nakagawa R, Tanaka N, Tanabe K, Watanabe A, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Honda T, Kabashima K, Aoki J, Narumiya S.	4. 巻 139
2. 論文標題 LPA Induces Keratinocyte Differentiation and Promotes Skin Barrier Function through the LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF Axis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1010-1022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jid.2018.10.034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lee J, Aoki T, Thumkeo D, Siriwach R, Yao C, Narumiya S.	4. 巻 143
2. 論文標題 T cell-intrinsic prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling is critical in pathogenic TH17 cell-driven inflammation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 631-643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jaci.2018.05.036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakamoto S, Thumkeo D, Ohta H, Zhang Z, Huang S, Kanchanawong P, Fuu T, Watanabe S, Shimada K, Fujihara Y, Yoshida S, Ikawa M, Watanabe N, Saitou M, Narumiya S.	4. 巻 16
2. 論文標題 mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS Biology	6. 最初と最後の頁 e2004874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pbio.2004874.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shuh Narumiya, Dean Thumkeo	4. 巻 592
2. 論文標題 Rho Signaling Research: History, Current Status and Future Directions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1763-1776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/1873-3468.13087.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Thumkeo D, Katsura Y, Nishimura Y, Kanchanawong P, Tohyama K, Ishizaki T, Kitajima S, Takahashi C, Hirata T, Watanabe N, Krummel MF, Narumiya S	4. 巻 6
2. 論文標題 mDia1/3-dependent actin polymerization spatiotemporally controls LAT phosphorylation by Zap70 at the immune synapse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eay2432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1126/sciadv.aay2432.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計19件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 桂義親、Thumkeo Dean, 成宮周
2. 発表標題 Critical role of formin-dependent cortical F-actin remodeling in TCR signaling
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会、大阪
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊滉平、Thumkeo Dean, 成宮周
2. 発表標題 リゾホスファチジン酸(LPA)によるヒト表皮細胞の分化誘導及び皮膚バリア機能の促進
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会、神戸
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dean Thumkeo, Matthew Krummel, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Indispensable role of formin-dependent cortical F-actin remodeling in TCR signaling
3. 学会等名 EMBO Workshop "Lymphocyte antigen receptor signaling", Sienna, Italy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jinju Lee, Dean Thumkeo, Tomohiro Aoki, Chengcan Yao, Shuh Narumiya
2. 発表標題 IL-23 generates pathogenic Th17 cells by triggering T cell-intrinsic prostaglandin E2-EP2EP4 signaling
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Indispensible role of formin-dependent cortical F-actin remodeling in TCR signaling
2. 発表標題 Yoshichika Katsura, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lysophosphatidic acid facilitates human keratinocyte differentiation through the LPAR1/LPRA5-Rho-ROCK-SRF axis and promotes skin barrier function
2. 発表標題 Kohei Tanabe, Dean Thumkeo, Ratklao Siriwach, Junken Aoki, Shuh Narumiya
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dean Thumkeo, Xiaojun Ma, Jinju Lee, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Roles of prostaglandins E2-EP2 signaling in colitis-associated cancer model
3. 学会等名 第45回内藤カンファレンス “ Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy ”, 札幌
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柱義親、Thumkeo Dean, 成宮周
2. 発表標題 アクチン制御タンパクforminのT細胞受容体シグナル伝達における機能解析
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会、広島
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊滉平、Thumkeo Dean, Siriwach Ratklao, 青木淳賢、成宮周
2. 発表標題 ヒト表皮細胞のバリア機能におけるリゾホスファチジン酸(LPA)の役割解明
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会、広島
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Lysophosphatidic acid facilitates human keratinocyte differentiation through the LPAR1/LPAR5-Rho-ROCK-SRF axis and promotes skin barrier function
3. 学会等名 第3回 京都皮膚基礎研究会、京都
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshichika Katsura, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 T細胞受容体シグナル伝達におけるforminの機能解析
3. 学会等名 第138回日本薬理学会関東部会、東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dean Thumkeo
2. 発表標題 Cortical F-actin meshwork in Sertoli cells is a structure in continuous with contractile F-actin bundles and dependent on formins activity
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議、東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jinju Lee, Tomohiro Aoki, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 PGE2-EP2/EP4シグナリングによるTh17細胞の増殖制御機構とその病理に対する寄与
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会, 大阪
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ratklao Siriwach, Akiko Sumitomo, Kentaro Ito, Kohei Tanabe, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Lysophosphatidic acid induces Filaggrin expression and promotes skin barrier function in human keratinocyte
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会, 大阪
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshichika Katsura, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 TCRシグナル伝達におけるformin依存的なアクチンの機能解析
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会, 大阪
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 LPA induces keratinocyte differentiation and promotes skin barrier function through LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF axis
3. 学会等名 The 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dean Thumkeo, Yoshichika Katsura, Yukako Nishimura, Pakorn Kanchanawong, Naoki Watanabe, Matthew Krummel, Shuh Narumiya
2. 発表標題 mDia1/3 facilitate Lat phosphorylation by Zap70 via the spatiotemporal control of F-actin polymerization at the immune synapse
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 meeting, Washington DC (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Thumkeo Dean
2. 発表標題 T細胞受容体シグナル伝達におけるフォルミンタンパクmDia1/3の分子作用機序
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会、pdf開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口牧郎、Thumkeo Dean、成宮周
2. 発表標題 New compounds for atopic dermatitis promote selective AHR-induced Filaggrin transcription in NHEK cells
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿支部会、オンライン開催
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

創業医学講座の業績

<http://www.mic.med.kyoto-u.ac.jp/dddm/publications>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----