

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591115

研究課題名(和文) Dokファミリータンパク質の呼吸器疾患における役割

研究課題名(英文) The role of Dok adaptors in pulmonary disorders

研究代表者

真嶋 隆一 (Mashima, Ryuichi)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：00401365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、チロシンキナーゼシグナル抑制性アダプター分子であるDokファミリータンパク質の呼吸器疾患、特に喘息における役割を検討した。Dokファミリータンパク質は、哺乳類では7種類知られている。喘息は種々の要因で発症するが、よく分かっている原因として免疫系の異常があげられる。免疫細胞には7種のファミリー分子のうち3種類が高発現しているため、本研究ではこの3分子を欠損させたマウスを用いて、喘息の表現型について野性型と比較検討した。最終年度には、研究成果のまとめを行った。

研究成果の概要(英文)：Dok adaptor proteins play important roles on the proper regulation of tyrosine kinase-mediated signaling pathways. In this study, I particularly investigated the role of Dok adaptors in pulmonary disorders such as asthma. Although many causative factors of asthma have been suggested, dysfunction of immune cells is one of the major reason of this disease. In these immune cells, three Dok adaptors can be detected, therefore, the role of them in asthma was investigated using knockout mice.

As expected, mice lacking three Dok adaptors exhibited an abnormal increase in airway hyperreactivity, a biological measure of asthma. Consistent with previous findings, the levels of Th2 cytokines in bronchoalveolar lavage fluids were also elevated in these mice. Furthermore, histological examination revealed hyperplasia of airway epithelial cells and accumulation of goblet cells. These results proved that Dok adaptor proteins play a key role on the regulation of asthma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：喘息 チロシンキナーゼ アダプター分子

1. 研究開始当初の背景

Dok アダプタータンパク質は、チロシンキナーゼシグナル下流でシグナルを制御するタンパク質である。哺乳動物では現在 Dok-1 から Dok-7 までの7種類の分子が知られている。これらの7分子は、N 末端側に脂質との会合に重要と考えられている PH ドメインが、分子の中央付近にリン酸化チロシンとの会合に重要である PTB ドメインが、分子の C 末端付近にチロシンキナーゼによって容易にリン酸化されやすく SH2 ドメインとの会合に重要なチロシン残基が複数存在する共通構造を持つ。このうち、Dok-1 から Dok-3 は主に造血系細胞に高発現している。また、Dok-4 から Dok-7 は非造血系細胞に発現が認められる。その分子機能として、Dok-1 から Dok-6 にはチロシンキナーゼシグナルの抑制機能が、また Dok-7 には活性化機能があることが知られている。

従前の研究結果から、造血系細胞に高く発現する Dok-1/2/3 は、チロシンキナーゼシグナルの抑制性因子であるということが、既に培養レベルと分子レベルの解析で明らかにされている。これと相補するように、Dok 遺伝子欠損マウスの表現型では、細胞増殖の亢進を認める報告が多い。例えば、Dok-1/2/3 三重欠損マウスでは、129 および C57BL/6 の混合的な遺伝的背景において組織球肉腫を高頻度で発症する。また、Dok-1/2 二重欠損マウスでは、骨髄増殖性症候群様の症状を呈する。こうした原因は、いずれも骨髄球系細胞に作用するサイトカインに対する反応性の違いとされている。また遺伝子欠損マウスを用いた解析で、Dok-3 は B 細胞の機能を抑制的に制御しているとする報告がある。これまでの Dok-1/2/3 の欠損マウスの表現型の報告を調べてみると、そのほとんどが細胞増殖もしくは Erk 活性化の抑制に関係するものである。従って、細胞増殖以外の表現型に注目した研究はまだ少なく、今後なされるべきと考えられる。

喘息は、種々の原因で惹起される可逆的な気道閉塞である。その原因には、運動、気道の乾燥、冷気への接触、アスピリンの服用などの原因が知られているが、同様に重要な原因としてアレルギーが知られている。すなわち、卵白アルブミン、魚介類、イエダニをはじめとする外来抗原に対して免疫が成立し、抗原特異的 IgE が亢進している状態においては、再度体内に抗原を取り込んだ場合に肥満細胞上に発現する IgE が抗原特異的に架橋され、即時的にヒスタミンをはじめとする顆粒成分と脂質メディエーターを放出し、最終的に気道を収縮させる。こうした免疫反応による喘息の基本

的なメカニズムはよく分かってきているものの、こうしたシグナル伝達経路の下流で働くアダプター分子によるシグナル制御メカニズムの詳細については不明な点が多い。

本研究では、こうした Dok-1 から Dok-7 の7分子のうち、特に造血系/免疫系に発現する Dok-1 から Dok-3 に注目した。免疫細胞のうち、Dok-1 と Dok-2 は T 細胞に、Dok-2 と Dok-3 は B 細胞に、Dok-1 から Dok-3 の3分子は骨髄球系細胞に高く発現していることが知られている。これら3分子の喘息における生理機能については、研究開始当初には全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、Dok ファミリータンパク質の呼吸器疾患における役割を明らかにすることを目的とした。特に喘息に注目して解析を行った。この理由は、Dok-1/2/3 の呼吸器疾患における機能を明らかにする場合、喘息、インフルエンザ感染、プレオマイシンによる急性肺傷害などの呼吸器疾患モデルのうちで、喘息が最もチロシンキナーゼシグナルとの関連が深いと考えられたからである。

3. 研究の方法

本研究では、Dok-1/2/3 のすべてを欠損させた三重欠損マウスを作成し、その喘息における表現型を解析することで、個体レベルにおける Dok-1/2/3 の機能を精査した。呼吸機能の測定は、刺激物質であるメタコリン依存的な気道収縮を、肺に空気を導入する際の抵抗値を指標として、専用測定装置 ELAN RC-4 (Buxco 社)を用いて測定した。本方法を含めた類似の呼吸生理機能のバイオアッセイは本分野で広く用いられている。本方法によると、喘息となった場合には気道が収縮するため、人工呼吸器から肺へ送気される際の空気抵抗が上昇して検出される。

また、肺の Th2 サイトカインを測定するため、PBS を用いて肺胞洗浄液を回収した。その後、この肺胞洗浄液に含まれる IL-4、IL-5、IL-13 および Th1 サイトカインである IFN- γ の測定を ELISA にて測定した。また、肺の組織学的検討は、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って検討した。検討項目は、喘息病態時に頻繁に認められる粘液産生過多、気道上皮細胞の過形成、杯細胞産生増多等を中心として、その他の病変も含めて多角的に検討した。

肺胞洗浄液の単核球(好酸球、単球/マクロファージ、好中球、リンパ球)は専用

フローサイトメーター (Sysmex 社 XT-1800i) で測定した。

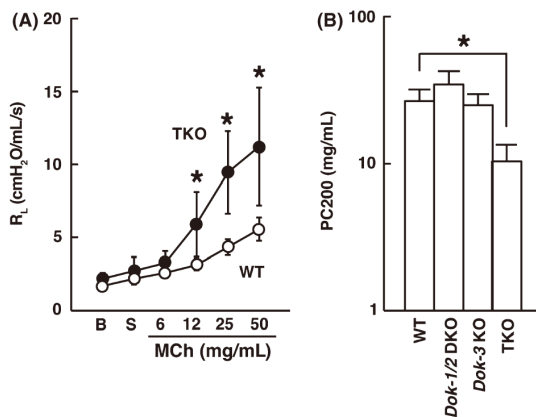


図1 メタコリン依存性的な気道過敏性の亢進。

4. 研究成果

メタコリン依存性的な気道過敏性における Dok-1/2/3 欠損マウスの反応性を検討するため、まず、三重欠損マウスと野性型における気道過敏性を比較検討した。その結果、野性型に比べて三重欠損マウスで有意に気道過敏性が上昇していることが分かった (図1)。次に、Dok-1/2、Dok-2/3、Dok-1/3 の各二重欠損マウスの気道過敏性を野性型マウスと比較したところ、いずれも統計的に有意な差異は認められなかった。

次に、三重欠損マウスで認められた気道過敏性の上昇の理由を明らかにするため、肺胞洗浄液を調製し、この中に含まれる Th2 サイトカインの量を ELISA 法にて検討した。具体的には Th2 サイトカインとして IL-4/5/13 を、また陰性コントロールとして Th1 サイトカインである IFN- γ の量を測定した。その結果、三重欠損マウスにおいては、野生型マウスに比べて Th2 サイトカインの優位な上昇が認められたが、IFN- γ の値には有意差は認められなかった。

一般的に、Th2 サイトカインが上昇し、気道過敏性が亢進している場合には、好酸球の浸潤をはじめとした免疫細胞の遊走が認められることが知られている。そこで、Dok-1/2/3 三重欠損マウスで認められた喘息様病態についても同様の所見が得られるか検討した。そこでまず肺胞洗浄液を調製し、検体に含まれる好酸球、単球/マクロファージ、好中球、リンパ球のレベルを専用フローサイトメーターで測定した。その結果、予想通り、肺胞洗浄液における好酸球数の上昇が認められた。興味深いことに、三重欠損マウスでは、好酸球のみならず、

その他の細胞数も全て増加していた。

気道過敏性が亢進し、Th2 サイトカイン値が上昇している場合、組織学的には、粘液の産生、上皮細胞の過形成および/もしくは杯細胞の増多などが観察される。そこで、Dok 三重欠損マウスの肺の病理切片を作成して観察したところ、こうした喘息に

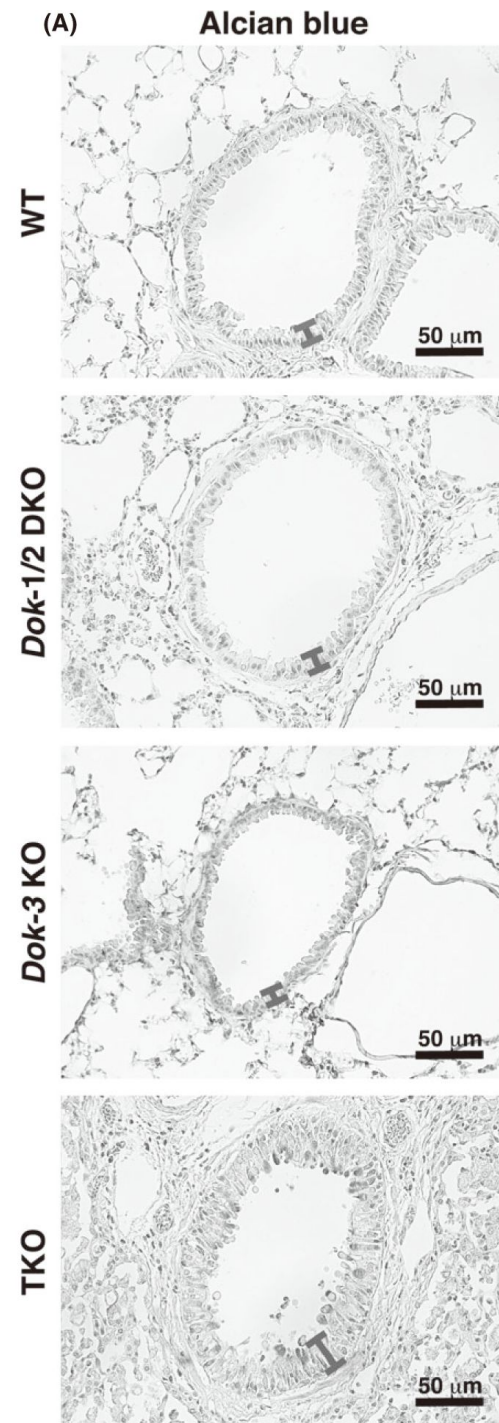


図2 気道上皮細胞の過形成と杯細胞の過形成。アルシアンブルー染色。Dok-1/2/3 三重欠損 (TKO) マウスの場合にのみ、気道上皮細胞が過形成し、同時に増生した杯細胞が顕著となっている。

特徴的な所見、すなわち、上皮細胞の過形成、杯細胞の増多および、粘液の産生過多が確認された(図2)。

以上の結果から、Dok-1/2/3 三重欠損マウスは喘息様病態を呈することが明らかになった。この三重欠損マウスは、129 および C57BL/6 の混合的な遺伝的背景下では加齢に伴い組織球肉腫を発症することが知られている。この腫瘍を発生する原因としてチロシンキナーゼシグナルの亢進による細胞増殖の異常な上昇が示唆されている。今回の研究で見出された喘息様病態の発症においても、肺胞洗浄液中の種々の免疫細胞が増加していることが認められている。局所での細胞の増加は、その場での細胞増殖亢進に加え、局所への細胞遊走も重要であることが知られている。今回の検討では、肺胞洗浄液中に検出された4種類全ての細胞の増多が認められている。どの細胞が喘息様病態の増悪化に重要な、細胞増殖亢進と遊走のどちらの機序で増加したのかは本研究の結果からは結論付けられず、今後の検討課題と考えられる。

喘息の要因は多様であるが、本研究の成果により、チロシンキナーゼシグナル制御の重要性が明らかになった。この成果を基に、喘息を対象疾患とした、新たなチロシンキナーゼシグナル制御薬の開発などへの応用的発展が期待される。

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 1件)

1. Mashima R, Arimura S, Kajikawa S, Oda H, Nakae S, Yamanashi Y. Dok adaptors play anti-inflammatory roles in pulmonary homeostasis. Genes Cells. 2013 Jan;18(1):56-65. doi: 10.1111/gtc.12016. 査読あり。

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真嶋 隆一 (MASHIMA, Ryuichi)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号: 00401365

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中江 進 (NAKAE, Susumu)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号: 60450409

山梨 裕司 (YAMANASHI, Yuji)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号: 40202387