

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890146

研究課題名（和文）樹状細胞と T 細胞の相互作用におけるロイコトリエン B4 の役割の解明

研究課題名（英文）The role of Leukotrine B4 in dendritic cell-T cell interaction

研究代表者

古賀 友紹 (KOGA TOMOAKI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30615092

研究成果の概要（和文）：ロイコトリエン B4-BLT1 経路が抗原依存的な免疫シナプス形成を促進する事を見いだした。また、この機能には樹状細胞 (DC) 側の BLT1 が重要である事も明らかにした。一方で、*in vivo* における BLT1 の役割を検討するために樹状細胞特異的 BLT1 遺伝子欠損マウスの作製を進めており、現在 floxed マウスが得られている。

研究成果の概要（英文）：I revealed the important role of LTB4-BLT1 axis in antigen-dependent immunological synapse (IS) formation between dendritic cells (DC) and CD4⁺ T cells. By using *in vitro* DC-T cell co-culture system, I also found that BLT1 in DC is important for IS formation. In parallel, to investigate the role of BLT1 in DC *in vivo*, I established the BLT1^{floxed} mice. I will generate DC-specific BLT1 conditional knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生化学、免疫学、脂質免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：GPCR、樹状細胞、T 細胞、生理活性脂質

1. 研究開始当初の背景

ロイコトリエン B4 (LTB4) は、主に白血球において産生され、炎症細胞を活性化する生理活性脂質である。その受容体である BLT1 は好中球やマクロファージなどに多く発現しており、炎症反応を促進する。しかしながら近年、BLT1 がリンパ球や樹状細胞などの免疫細胞にも発現し、免疫反応にも深く関わる事が示唆されてきた。申請者らは BLT1 を世界に先駆けて遺伝子同定し、BLT1 遺伝子欠損マウスの解析を通じて、LTB4-BLT1 経路が Th1 および Th2 免疫応答の両経路を促進する事を明らかにしてきた。この LTB4-BLT1 経路による免疫反応促進作用は、古典的な Th1/Th2 バランスの制御では説明できず、樹状細胞-T 細胞免疫応答における LTB4-BLT1 の役割について

は不明な点が多い。

2. 研究の目的

上述のような背景の中、申請者は、樹状細胞-T 細胞間の相互作用における BLT1 の役割を明らかにすることを目的とし「LTB4-BLT1 経路が樹状細胞と T 細胞の物理的なコンタクトを促進する」と仮説を立て、検討を行うものとした。これが明らかになれば新たな免疫抑制剤の創薬標的として BLT1 を提起する事ができるだけでなく、ほとんど明らかにされていない免疫応答における生理活性脂質の新規機能を明らかにすることができ、臨床・学術、両面において重要な発見となると考えられる。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞から分化誘導した樹状細胞 (BMDC) とオボアルブミンペプチド特異的に反応する T 細胞受容体を発現する OT-II トランスジェニックマウスを用いて、抗原特異的な BMDC と T 細胞との接触をモニタリングする。実験系の評価には多検体タイムラプスと FACS を用いた方法を使用する。また、マイクロアレイのデータから候補分子を探索し、分子メカニズムの解析を行う。一方で、細胞特異的な BLT1 の *in vivo* 解析を行うために、樹状細胞もしくは T 細胞特異的な BLT1 コンディショナルノックアウトマウスの作製を行う。具体的にはノックアウトマウスコンソーシアムから ES 細胞を購入し、キメラマウスを作製し、Germ line transmission の確認を行う。その後、CAG-FLPe トランスジェニックマウスと掛け合わせて、BLT1 floxed マウスを完成させ、Floxed マウスを CD11c-Cre もしくは Lck-Cre マウス等と掛け合わせ、樹状細胞特異的もしくは T 細胞特異的 BLT1 ノックアウトマウスを作製する。

4. 研究成果

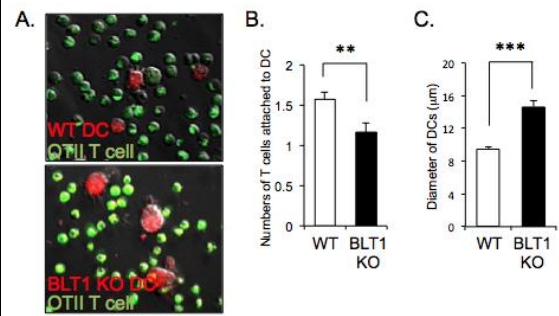
1) 多検体タイムラプスを用いた DC-T 細胞間物理的接触の定量

DC と T 細胞間の物理的接触を定量するために多検体対応型タイムラプス顕微鏡 (Molecular Device) を用いたシステムを構築したが、T 細胞のプレートへの張り付きが悪く、コラーゲンコート等を試したが、プレートが動くタイプのタイムラプス顕微鏡ではやはり評価できなかつた。そこで、いくつかの検討の結果、マウスリンパ節由来支持細胞を T 細胞の下に播くことで T 細胞の張り付きの問題を解決できる事を見いだした。このシステムが完成すると一度に大量の検体を解析する事ができるため、とても有用なツールとなる。現在、システム構築の継続中である。

2) 共焦点顕微鏡を用いた DC-T 細胞間物理的接触の定量

BMDC を WT と BLT1 KO の骨髄から誘導し、CMTMR でラベルした。一方、OT-II マウスの脾臓から単離した CD4⁺ T 細胞を CMFDA でラベルした。両細胞を DC:T 細胞=1:8 になるようにガラスボトムディッシュに播き、共培養した。48 時間後の DC と T 細胞の状態を共焦点顕微鏡で観察し、DC 1 個当たりに接着する T 細胞の数をカウントした。その結果、図 1A & 1B に示すように、赤で示される DC に接着する T 細胞の数は、WT に比べて BLT1 欠損 BMDC の方が、有意に少ない事が明らかとなった。また、BLT1 欠損 BMDC の直径は WT に比べて有意に大きい事もわかった。

図 1. 共焦点顕微鏡による DC-T 細胞コンタクトの観察. A. 共焦点顕微鏡による観察像。B. DC 1 個当たりの接着 T 細胞数。C. DC の直径。



3) フローサイトメトリーを用いた DC-T 細胞間コンタクトの定量

BMDC を WT と BLT1 KO の骨髄から誘導し、CMTMR でラベルした。一方、OT-II マウスの脾臓から単離した CD4⁺ T 細胞を CMFDA でラベルした。両細胞を DC:T 細胞=1:4 になるようにラウンドボトムディッシュに播き、共培養した。24 時間後の DC と T 細胞を回収し、ボルテックスを用いて非特異的な細胞接着を外した。それらの細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、抗原を入れない場合、DC-T 細胞間接着は BLT1 KO BMDC で少し高く、抗原を入れた場合、細胞間接着は WT で高いことがわかった (図 2A)。抗原の有無による DC-T 細胞間接着のパーセンテージの差を取り、抗原依存的な DC-T 細胞間接着を定量したところ、BLT1 KO BMDC では、T 細胞との物理的な接着が有意に弱くなる事が示された (図 2B)。

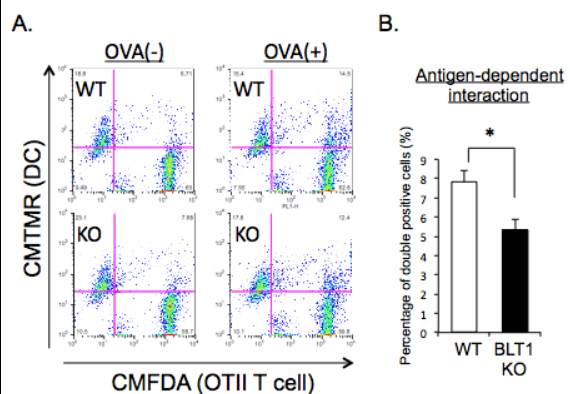


図 2. フローサイトメトリーによる DC-T 細胞コンタクトの解析。A. フローサイトメトリーによる解析データ。KO: BLT1 KO, OVA: オボアルブミン, 抗原。B. CMFDA, CMTMR 両陽性細胞の OVA (+) 群と OVA (-) 群との差を定量化したデータ。

4) BLT1 による DC-T 細胞間相互作用の制御機構の解明.

2)、3)より BLT1 が DC-T 細胞相互作用に促進的に働く事が明らかになった。そこで分子メカニズムを解明する目的で、BMDC を WT と BLT1 KO の骨髓から誘導し、DNA マイクロアレイを行った。その結果、WT で2倍以上発現が高い遺伝子が16、BLT1 KO で2倍以上発現量が高い遺伝子が8つ検出された。現在これらの遺伝子を候補分子として、BLT1 による DC-T 細胞間相互作用の制御機構の解明を引き続き行っている。

WT/BLT1 KO	Gene Symbol
	Cxcl1
	Cd38
	Gpr35
	Odz3
	Cx3cr1
	F830002E14Rik(AK089567)
	LOC239097
	Ear11
	Stfa1
	Gorasp1
	Ngp
	Gmnn
	Cyp1b1
	6720456H20Rik
	Ear3
	Tslp
	Ear3
	1100001H23Rik
	Ear10
	Ripk3
	Ddhd1
	Rpgrip1
	1700123Q20Rik
	2810004A10Rik

図 3. WT、BLT1 KO DC の DNA マイクロアレイデータ。両者を比較して WT で高いものほど赤色で、低いものほど緑色で示している。

5) DC 特異的 BLT1 コンディショナルノックアウトマウスの作製

細胞特異的な BLT1 の役割を in vivo で解析するために、BLT1 コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。ES 細胞をノックアウトマウスコンソーシアムから購入し、microinjection 法および aggregation 法によりキメラマウスの作製を試みた。その結果、microinjection 法により 50%キメラマウスが3匹得られ、aggregation 法によりほぼ 100%のキメラマウスが5匹得られた。これらを WT マウスと掛け合わせ、Germ line transmission を確認したところ、aggregation キメラマウスから産まれた仔マウスに target allele が受け継がれている事が確認できた。これを NeoR および LacZ 配列を抜く目的で CAG-FLPe マウスと掛け合わせた結果、配列が抜けたのを確認した。これまでの結果より、BLT1 floxed マウスを得る事が出来た。現在、CD11c-Cre と Lck-Cre を導入中で、出来次第、DC 特異的、T 細胞特異的な BLT1 コンディショナルノックアウトマウスを作製していく。

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 6 件)

1. Komatsu K, Lee J, Miyata M, Lim JH, Jono H, Koga T, Xu H, Yan C, Kai H, Li JD. Suppression of inflammation via PDE4B-JNK2-dependent upregulation of deubiquitinase CYLD. *Nature Commun.* 4:1684. (2013)
2. Koga T, Kai Y, Fukuda R, Morino-Koga S, Suico MA, Koyama K, Sato T, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation and heat shock ameliorates progressive proteinuria and renal inflammation in mouse model of Alport syndrome. *PLoS ONE.* 7(8):e43852. (2012)
3. Morino-Koga S, Yano S, Kondo T, Shimauchi Y, Matsuyama S, Okamoto Y, Suico MA, Koga T, Sato T, Shuto T, Arima H, Wada I, Araki E, Kai H. Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. *J Cell Physiol.* 228(2):439-446. (2013)
4. Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Nishitoh H, Okiyoneda T, Kokame K, Kaneko M, Taura M, Miyata M, Chosa K, Koga T, Morino-Koga S, Wada I, Kai H. STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol Cell.* 47(1):99-110. (2012)
5. Lim JH, Jono H, Komatsu K, Woo CH, Lee J, Miyata M, Matsuno T, Xu X, Huang Y, Zhang W, Park SH, Kim YI, Choi YD, Shen H, Heo KS, Xu H, Bourne P, Koga T, Xu H, Yan C, Wang B, Chen LF, Feng XH, Li JD. *Nature Commun.* 3:771. (2012)
6. Watanabe K, Shuto T, Sato M, Onuki K, Mizunoe S, Suzuki S, Sato T, Koga T, Suico MA, Kai H, Ikeda T. Lucidenic acids-rich extract from antlered form of *Ganoderma lucidum* enhances TNF-alpha induction in THP-1 monocytic cells possibly via its modulation of MAP kinases p38 and JNK. *Biochem Biophys Res Commun.* 408(1):18-24. (2011)

[学会発表] (計 28 件)

1. 甲斐友佳理, 古賀友紹, 福田亮介, 古賀沙緒里, Mary Ann Suico, 小山皓介, 松山真吾, 佐

- 藤卓史,首藤剛,甲斐広文. 遺伝性糸球体腎炎アルポート症候群に対する新たな physical medicine の腎病態改善効果. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜.
2. 福田亮介,小山皓介,古賀友紹,甲斐友佳理,スイコモリーアン,大町紘平,本村敬士,首藤剛,甲斐広文. 慢性腎疾患 Alport syndrome モデルマウスを用いた癌抑制遺伝子 p53 の腎保護的機能の解明. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21-23 日, 福岡.
 3. 四反田伊穂李,島内祐一郎,古賀沙緒里,矢野脩一郎,古賀友紹,松山真吾,スイコモリーアン,首藤剛,甲斐広文. 直流電流による T 細胞からの IL-2 産生抑制作用とその機序の検討. 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012 年 12 月 8-9 日, 熊本.
 4. 古賀友紹,佐々木文之,佐伯和子,奥野利明,横溝岳彦. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subsets. 第 41 回日本免疫学会, 2012 年 12 月 5-7 日, 神戸.
 5. 佐々木文之,古賀友紹,佐伯和子,奥野利明,横溝岳彦. Expression and Function of a Leukotriene B4 receptor 1 in M2-type macrophage. 第 41 回日本免疫学会, 2012 年 12 月 5-7 日, 神戸.
 6. Kai Y, Koga T, Fukuda R, Morino-Koga S, Suico MA, Koyama K, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates proteinuria and nephritis in mouse model of X-linked alport syndrome. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2012 年 11 月 23-24 日, 京都.
 7. 福田亮介,小山皓介,古賀友紹,甲斐友佳理, Mary Ann Suico,首藤剛,甲斐広文. 慢性腎疾患 Alport syndrome モデルマウスを用いた癌抑制遺伝子 p53 の腎保護的機能の解明. 第 65 回日本薬理学会西南部会, 2012 年 11 月 23 日, 熊本.
 8. 佐々木文之,古賀友紹,佐伯和子,奥野利明,横溝岳彦. BLT1 発現が規定するマクロファージサブセットの解析. 第 9 回東京呼吸器リサーチフォーラム, 2012 年 11 月 17 日, 東京.
 9. Koga T, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. A novel dendritic cell subset that promotes Th17 differentiation. 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) Meeting, 2012 年 10 月 23-26 日, 東京.
 10. Okamoto Y, Morino-Koga S, Koga T, Omachi K, Suico MA, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock(BioMetronome) ameliorates diabetic nephropathy. ICHO & JCTM 2012, 2012 年 8 月 28-31 日, 京都.
 11. Kai Y, Koga T, Fukuda R, Morino-Koga S, Suico MA, Koyama K, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates proteinuria and nephritis in mouse model of X-linked alport syndrome. ICHO & JCTM 2012, 2012 年 8 月 28-31 日, 京都.
 12. Kai H, Koga T, Kai Y, Morino-Koga S, Suico MA, Shuto T. Mild electrical stimulation and heat shock ameliorates progressive proteinuria and renal inflammation in mouse model of chronic kidney diseases. ICHO & JCTM 2012, 2012 年 8 月 28-31 日, 京都.
 13. Koga T, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subset. The 9th Global COE International Symposium& 8th Young Investigators Forum, 2012 年 1 月 21 日, 福岡.
 14. Koga T, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subset. The 10th International Symposium & 7th Young Investigators Forum, 2011 年 12 月 23 日, シンガポール.
 15. Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Nishitoh H, Kokame K, Kaneko M, Okiyoneda T, Suico MA, Shuto T, Koga T, Morino-Koga S, Wada I, Kai H. Posttranslational N-glycosylation regulates the quality control of transthyretin in the ER. 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜.
 16. 福田亮介,小山皓介,古賀友紹,甲斐友佳理,メリーアンスイコ,首藤剛,甲斐広文. 遺伝性腎疾患 Alport 症候群における癌抑制遺伝子 p53 の腎病態進行抑制機構の解

- 明. 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011 年 12 月 10-11 日, 福岡.
17. 岡本有加, 古賀(森野)沙緒里, **古賀友紹**, 大町紘平, メリーアンスイコ, 首藤剛, 甲斐広文. 糖尿病性腎症に対する新たな physical medicine の病態改善効果. 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011 年 12 月 10-11 日, 福岡.
 18. 甲斐友佳理, **古賀友紹**, 福田亮介, 古賀(森野)沙緒里, メリーアンスイコ, 小山皓介, 佐藤卓史, 首藤剛, 甲斐広文. 遺伝性腎疾患 Alport 症候群に対する新たな physical medicine の病態改善効果. 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011 年 12 月 10-11 日, 福岡.
 19. Fukuda R, Koyama K, **Koga T**, Kai Y, Suico MA, Shuto T, Kai H. Protective effects of p53 in a mouse model of progressive hereditary kidney disease Alport syndrome. ASCB 51st Annual Meeting, 2011 年 12 月 3-7 日, Denver, Colorado, USA.
 20. Okamoto Y, Morino-Koga S, **Koga T**, Omachi K, Suico MA, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates diabetic nephropathy. ASCB 51st Annual Meeting, 2011 年 12 月 3-7 日, Denver, Colorado, USA.
 21. Shitanda I, Shimauchi Y, Morino-Koga S, Yano S, **Koga T**, Matsuyama S, Suico MA, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation suppresses pro-inflammatory cytokines expression via inhibition of multiple signaling pathways. 5th Young Investigators Symposium on Clinical Pharmaceutical Sciences, 2011 年 11 月 26-27 日, 名古屋.
 22. Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Nishitoh H, Kokame K, Kaneko M, Suico MA, Shuto T, Koga T, Morino-Koga, S, Wada I, Kai H. 8th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, 2011 年 11 月 20-22 日, 熊本.
 23. **古賀友紹**, 佐伯和子, 佐々木文之, 奥野利明, 横溝岳彦. BLT1 は樹状細胞の新規マーカー分子となりうるか? 第 8 回東京呼吸器リサーチフォーラム, 2011 年 11 月 19 日, 東京.
 24. Sasaki F, **Koga T**, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. Expression of an LTB4 receptor BLT1 in M2 macrophages. The 10th JBS Biofrontier Symposium: New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011 年 11 月 14-16 日, 福岡.
 25. **Koga T**, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subsets. The 10th JBS Biofrontier Symposium: New aspects of phospholipid biology and medicine, 2011 年 11 月 14-16 日, 福岡.
 26. Suico MA, Taura M, Fukuda R, **Koga T**, Shuto T, Sato T, Morino S, Okada S, Kai H. Mef/Elf4 transactivation by E2F1 is inhibited by p53. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋.
 27. **古賀友紹**, 甲斐友佳理, 福田亮介, 古賀(森野)沙緒里, Mary Ann Suico, 小山皓介, 佐藤卓史, 首藤剛, 甲斐広文. 第 84 回日本生化学会年会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都.
 28. **Koga T**, Sasaki F, Saeki K, Okuno T, Yokomizo T. BLT1 as a potential marker of mouse dendritic cell subsets. 第 6 回 GCOE 理医連携リトリート, 2011 年 8 月 5 日, 阿蘇.
- [その他]
ホームページ等
http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/Biochem1/
<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=4838>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
古賀 友紹 (KOGA TOMOAKI)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 30615092