

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790462

研究課題名(和文)ケモカイン受容体会合分子「フロント」の生体内における発現機能解析

研究課題名(英文)Expressional and functional analysis of FROUNT in mice

研究代表者

寺島 裕也(Terashima, Yuya)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90538729

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)：我々が発見した分子「フロント」は、種々の炎症性疾患に關与するケモカイン受容体CCR2およびCCR5に結合し、白血球遊走を正に制御する。本研究では「フロント」遺伝子改変マウスの作出・検証を行い、これまでは欠損マウスがなかったために多くが謎であった「フロント」の生理的条件下での発現および機能解析を行った。その結果、「フロント」は生理的条件下で単球/マクロファージに高発現し、その遊走を制御していることを明らかにした。

今後この新しい研究ツールを用いた種々の疾患モデルの解析を通して、「フロント」を新しい切り口とし生体内における免疫・炎症制御機構を解明することが期待される。

研究成果の概要(英文)：FROUNT binds to the intracellular region of chemokine receptors CCR2 and CCR5, which are involved in the various inflammatory diseases. FROUNT promotes CCR2/CCR5-mediated chemotaxis by regulating PI3K/Rac/lamellipodium cascade.

In this study, we generated FROUNT-genetically modified mice. These new tools enabled us to investigate biological function of FROUNT under physiological conditions. We identified that FROUNT is highly expressed on monocytes/macrophages and regulates chemotaxis of these cells in mice. Future studies of FROUNT using these new tools in the various disease models will help us to understand the regulatory mechanisms of immune and inflammatory system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基本医学・免疫学

キーワード：白血球遊走

1. 研究開始当初の背景

「フロント」は、種々の炎症性疾患に関与するケモカイン受容体である CCR2 および CCR5 の細胞内領域に結合し、その下流の PI3K-Rac-葉状仮足形成カスケードの活性化をコントロールすることで細胞遊走を正に制御する分子として我々が発見/命名した分子である。その後、他のグループからは間様系幹細胞のホーミング、および、がん細胞の経内皮遊走における重要な役割が報告され、「フロント」の多様な働きが明らかにされはじめている。しかし、「フロント」遺伝子改変マウスについては、これまでに報告がないことから、生理的条件下における生体レベルでの「フロント」の発現および機能は多くが謎のままであった。

2. 研究の目的

本研究では「フロント」遺伝子改変マウスの作出およびその検証試験を通して新しい研究ツールを開発し、生理的条件下における「フロント」の発現および機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マウス生体内における「フロント」の発現を解析するために、レポーターとして蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をフロントゲノム部位に挿入し、「フロント」プロモーターの活性を GFP の発現レベルとして生理的条件下でモニタリングできることを期待した遺伝子改変マウスを作成した。このマウス系統をホモ化することで「フロント」遺伝子を完全欠損させた場合、胎生致死となることを見出した。そこで、Cre/loxP システムを用いて成体マウスで「フロント」を全身性に欠損誘導できる新たなマウス系統を作出し、「フロント」の生体における機能解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 「フロント」発現可視化マウスの解析

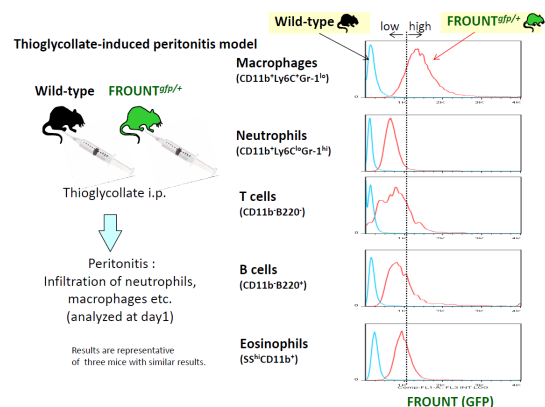
①発現可視化マウスの作出・検証

定常状態 (非炎症時) の「フロント」発現可視化マウス由来細胞における「フロント」の発現レベルと GFP 発現 (蛍光) 強度との相関関係を「フロント」に対する特異的抗体を用いたフローサイトメトリー解析で検証した。

その結果、ほぼすべての細胞が GFP 陽性であり、「フロント」は広範な細胞に発現することが示唆された。GFP 陽性細胞の中でも、GFP の強度には強弱があり、中でも単球・マクロファージにおいて高発現が認められた。この結果は、「フロント」に対する特異的抗体による染色結果と相関することが確認されたことから、このマウス系統を用いてフロント発現を可視化できることが検証できた。

②炎症時の「フロント」発現

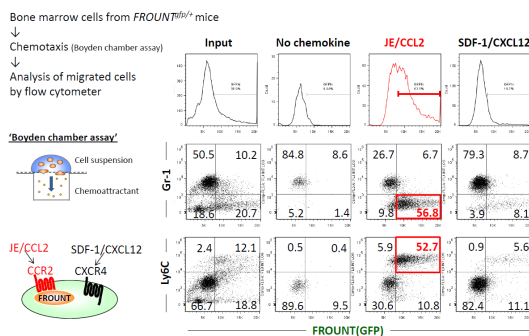
「フロント」発現可視化マウスにチオグリーコレート腹腔内投与することにより腹膜炎を発症させ、腹腔内の浸潤細胞におけるフロントの発現レベルをフローサイトメーターを用いて解析した。他のグループからは、培養細胞を用いた解析により、ケモカイン刺激に伴って「フロント」発現レベルが上昇するという報告があることから、炎症時の発現上昇が予想された。しかし明らかな「フロント」の炎症依存的な発現上昇は確認できなかった。一方、炎症時に浸潤するマクローファー



ジにおいても「フロント」の高発現が認められた。

③フロント高発現細胞の遊走活性

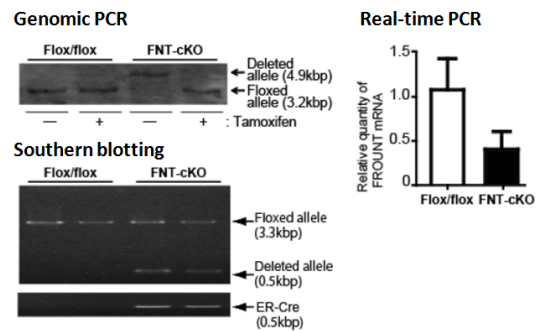
「フロント」発現可視化マウス由来の骨髓細胞について、CCR2 のリガンドである CCL2 および CXCR4 のリガンドである CXCL12 に対する遊走活性をボイデンチャンバー法で測定した。遊走細胞はフローサイトメーターを用いて、ポピュレーションごとに「フロント」(GFP) 発現強度を解析した。その結果、CCL2 に対しては「フロント」(GFP) が高レベルに発現している単球が選択的に遊走することを見出した。



(2) 誘導型「フロント」欠損マウスの解析

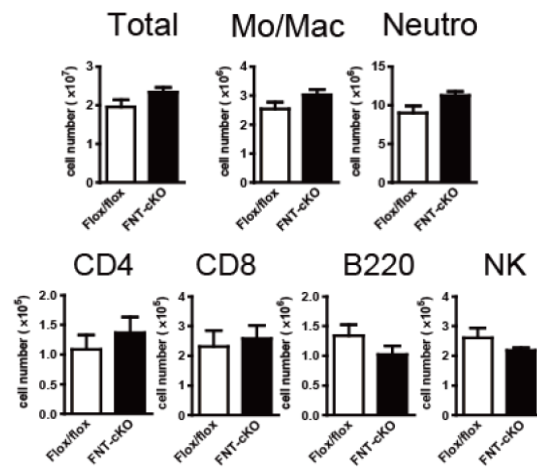
①誘導型「フロント」欠損マウスの作出および検証

誘導型「フロント」欠損マウスとは、「フロント」エクソンの上流と下流に loxp 配列を挿入した Floxed マウスを作出し、CreER を全身性に発現するトランスジェニックマウスと交配した遺伝子改変マウスであり、タモキシフェン投与依存的に「フロント」を欠損させることが期待できる。タモキシフェンの投与による欠損誘導条件を検討・最適化し、誘導依存的な「フロント」欠損をゲノミック PCR、サザンブロッティングおよび Real-time PCR により確認した。



②「フロント」欠損における血球細胞解析

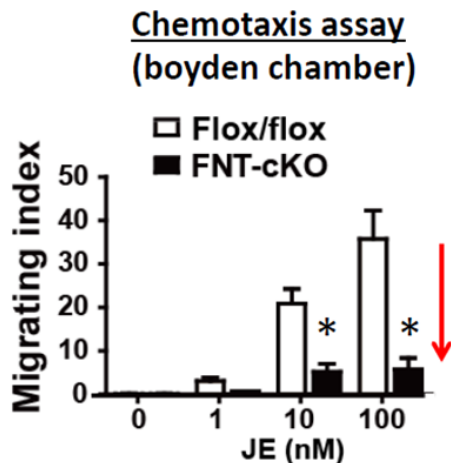
「フロント」欠損誘導によりケモカイン受容体からのシグナルが低下し、骨髓から末梢への細胞の供給・浸潤および分化・増殖に異常が生じることが予測される。そこで、末梢血および骨髓、脾臓、リンパ節等の各臓器の構成細胞をフローサイトメーターで解析し、定常状態における各細胞サブセットの構成を解析した。誘導型「フロント」欠損マウスにおける血球細胞をフローサイトメーターを用いて解析した結果、主要な血球サブセットの数・比率には有意な変化はみられなかった。



③「フロント」欠損誘導細胞の遊走活性解析

「フロント」発現可視化マウスの解析で「フロント」の高発現が確認された単球・マクロファージにはケモカイン受容体 CCR2 が発現している。「フロント」誘導型欠損マウスの細胞について、CCR2 に対するリガンドであるケモカイン CCL2 刺激依存的な細胞遊走活性を評価した。その結果、CCL2 に対する遊走活

性が「フロント」欠損により顕著に低下していた。



本研究で得られた以上の結果より、単球細胞株の cDNA ライブラリーから CCR2 への結合活性を指標として酵母ツーハイブリット法を用いて単離・命名した分子「フロント」は、生理的条件下のマウスで単球・マクロファージに高レベルで発現しており、その個体レベルでの遊走・浸潤シグナルの制御に重要な働きを担っていることを明らかにした。今後、これらの新しい研究ツールを用いた様々な疾患モデルの解析を通して、「フロント」を新しい切り口として免疫・炎症制御機構を解明することを目指す。

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 3 件)

- ① Toda E, Terashima Y (Corresponding author), Esaki K, Yoshinaga S, Sugihara M, Kofuku Y, Shimada I, Suwa M, Kanegasaki S, Terasawa H, Matsushima K. Identification of a binding element for the cytoplasmic regulator FROUNT in the membrane-proximal C-terminal region of chemokine receptors CCR2 and CCR5. *Biochem J.* 2014 Jan15;457(2):313-22. (査読有) DOI: 10.1042/BJ20130827.
- ② 松島綱治、上羽悟史、寺島裕也、羊土社、実験医学増刊号「腫瘍免疫学とがん免疫療法」、2013、48-52 (査読無)

- ③ 遠田悦子、寺島裕也、松島綱治、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科「ケモカイン受容体 CCR2, CCR5 とシグナル促進分子フロント」、2013、386-391 (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 寺島裕也、松島綱治、Identification of Small-Molecule Inhibitors of FROUNT. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、神奈川県横浜市
- ② 遠田悦子、寺島裕也、松島綱治 他、ケモカイン受容体とフロント間相互作用を阻害する低分子化合物の探索、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、神奈川県横浜市
- ③ 寺島裕也、遠田悦子、松島綱治 他、ケモカイン受容体とフロント間相互作用を阻害する低分子化合物の探索、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡県福岡市
- ④ 遠田悦子、寺島裕也、松島綱治、ケモカイン受容体 CCR2/5 と受容体会合分子フロントとの相互作用様式の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡県福岡市

[図書] (計 1 件)

- ④ 寺島裕也 他、南山堂、がん基盤生物学「ケモカイン受容体シグナル制御分子フロント (フロント) へのパラダイムシフト」、2013、130-136

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島裕也 (TERASHIMA YUYA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90538729