

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670822

研究課題名(和文)新規シグナル伝達分子によるアレルギー制御機構の解明を目指した挑戦的研究

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel immune signaling molecule involved in allergic response.

研究代表者

田中 芳彦(Tanaka, Yoshihiko)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00398083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔アレルギーは全身での免疫応答を背景として口腔内で起こるアレルギー疾患です。その病態にはT細胞による免疫応答が重要な役割を果たすことが知られていますが、疾患を引き起こす分子メカニズムについては不明な点が多く残されています。我々はアレルギー反応に関する研究を進める過程で、アレルギーに関連したT細胞の分化段階において新しいシグナル伝達分子が発現することを見出しました。この分子を標的としてヘルパーT細胞における発現パターンとサイトカイン産生に及ぼす影響といった機能について解析を行いました。その発現はTh2細胞に限定されるものであり、アレルギー応答の制御に重要な役割をもつ可能性が認められました。

研究成果の概要(英文)：T helper cells especially Th2 cells play a triggering role in the allergic response, including oral allergies. However, the mechanism underlying the differentiation of T helper cells into Th2 cells has not been completely elucidated. Our group has studied various signaling molecules controlling the differentiation of T helper cells. We found a novel signaling molecule, which was expressed specifically in Th2 cells during the differentiation of T helper cells. We investigated the characterization and function of the signaling molecule. The expression of the signaling molecule, as in Th2 cells, was not found in other types of T helper cells. The signaling molecule could have some functions in cytokine production and cell migration in T cells.

研究分野：免疫細胞生物学

キーワード：免疫・感染・炎症 シグナル伝達 遺伝子 細胞・組織 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

口腔アレルギーは口腔内の環境が原因で起こる歯科口腔領域の疾患で、年々増加傾向にあり国民の関心が高まっています。口腔アレルギーの病態は、花粉症アレルギーを背景にして交差反応で生じる口腔食物アレルギーや、指輪・ネックレス・ピアス使用者において歯科治療後に生じる口腔金属アレルギーといったように多岐にわたりますが、何れもT細胞による免疫応答が深く関与しています。しかしながら、口腔アレルギーを引き起こすメカニズムについて、T細胞の分化と遊走に参与する分子の視点からの解析は見当たりません。

研究代表者は、ディファレンシャルディスプレイ法によってマウス Th2 細胞から新規 Th2 特異的遺伝子を同定し、新しいT細胞分化制御機構を世界に先駆けて明らかにしました (*Immunity* 2003; *J. Clin. Invest.* 2007)。この蛋白質はマウス SWAP-70 とアミノ酸レベルで 45% の高い相同性をもつことから SWAP-70-like adapter of T cells (SLAT) と命名しました。マウスとヒトの間ではアミノ酸レベルで 92% の高い相同性をもちます。SLAT は胸腺細胞や末梢のT細胞に多く発現しており、マクロファージや筋肉組織にも発現しています。一方、SWAP-70 はB細胞特異的な遺伝子として単離され、B細胞に多く発現しています。SLAT は SWAP-70 とともに第3のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として分類され、PH ドメインと DH-like ドメインをタンデムにコードします。

SLAT はN末端からカルシウム結合ドメインである EF hand、不完全な ITAM シークエンスをもつ ITAM-like ドメインを有し、PH と DH-like の間に核移行シグナル (nuclear localization signal; NLS) をもちます。SWAP-70 に Rac を活性化する GEF としての機能があり、それまでに知られていた DH と DHR2 と異なるドメインをもつことが報告されています。また、SLAT にも同様に Rac1、Cdc42、RhoA に対する GEF としての機能があることが報告されております。

一方、研究代表者は Vav が欠損することで転写因子 c-Maf の発現障害により、Th1 型の免疫応答が亢進することを見出しました (*Blood* 2005)。また、アレルギー発症における DOCK2-Rac シグナルの重要性を明らかにしました (*Nature Immunol.* 2007)。さらに、ヒト高 IgE 血症の原因遺伝子 *Dock8* が生体内3次元環境下での樹状細胞の遊走を制御していることを見出しました (*Blood* 2012)。このように研究代表者はアレルギーに関わる免疫細胞のシグナル伝達および分化・遊走制御機構を明らかにしてきました。

これら一連の解析の過程で、ナイーブT細胞からアレルギー関連T細胞へ分化・成熟して行く段階で SLAT に関連した新規の分子が発現することを見出しました。本研究課題はこの新規分子に焦点をあわせて口腔アレル

ギーの新たな予防、診断、治療法のターゲットとしての意義を探ろうとするものです。

2. 研究の目的

本研究は、新規 SLAT 関連分子 (SLAT-AP: SLAT associated protein) を切り口として、T細胞の分化と遊走をシグナル伝達機構の視点から解析することで、アレルギーの病態を制御する新しい分子メカニズムの解明を目的としています。

歯科口腔疾患の中でも口腔アレルギーの病態と治療法に関する研究は取り残された領域であり、T細胞のシグナル分子という視点からそのメカニズムについて明確に示した報告はありません。これまで研究代表者が明らかにしてきたT細胞の分化と遊走におけるシグナル伝達制御機構を深く掘り下げて研究を進めました。得られた成果は口腔アレルギーの病態を解明し、新しい治療法の開発への道を切り拓くと期待されます。

3. 研究の方法

本研究では、新規シグナル伝達分子 SLAT-AP を対象として、T細胞の分化と遊走をグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)-低分子量G蛋白質シグナルの視点から解析することで、アレルギーの病態を制御する新しい分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めました。

(1) ヘルパーT細胞の各種サブセット Th1、Th2、Th17、Treg などへの分化条件で、SLAT-AP の発現パターンを real-time RT-PCR や western blotting により RNA レベル、蛋白レベルで詳細に解析しました。また、Th2 への分化段階にサイトカインの中和抗体の共存の有無によって SLAT-AP 発現を比較検討しました。

(2) 一過性に SLAT-AP を過剰発現させたヒトT細胞株 Jurkat を用いて、IL-4 や IFN- γ など各種サイトカインのルシフェラーゼアッセイにより、サイトカイン産生における SLAT-AP の役割を解析しました。

(3) より安定した実験系を構築するために、レトロウイルスを用いて恒常的に内在性 SLAT-AP の発現をノックダウンした stable Jurkat 細胞株を作製した後、SLAT-AP を再構築した細胞株を樹立して検証しました。

(4) さらに、より生理的な条件で解析するために、OVA を認識するT細胞受容体トランスジェニックマウスから分離したT細胞に、レトロウイルスにて SLAT-AP を過剰発現、あるいはノックダウンさせて、抗原提示細胞と OVA ペプチドで刺激することで IL-4 や IFN- γ など各種サイトカイン産生への影響を細胞内サイトカイン染色による Flowcytometry を用いて比較検証しました。

(5) SLAT-AP あるいは SLAT を Jurkat 細胞に過剰発現させて、ケモカインによるトランスウエルでの遊走実験を行い定量的に評価しました。

(6) GFP で標識した SLAT-AP ならびに SLAT を Jurkat 細胞に発現させることで、これら分子の細胞内局在と過剰発現による細胞の形態変化について蛍光顕微鏡を用いて比較観察しました。

4. 研究成果

研究代表者が取組んできた一連の解析の過程において、野生型マウスから分離した T 細胞に対して CD3 抗体+CD28 抗体刺激を用いて Th2 細胞への分化誘導を繰り返し行うことにより、新たな SLAT 関連分子が発現することを見出しました。また、より生理的な条件で解析するために、OVA を認識する T 細胞受容体トランスジェニック (TCR Tg) マウスにて確認したところ、この抗原特異的な Th2 細胞においても同様の結果を得ました。この分子は初期刺激による Th2 細胞への分化では認められず、再刺激後 2 日目から強く発現してくることが明らかになりました。一方で、Th1 細胞には全く発現していませんでした。この新しい SLAT 関連分子が発現してくる Th2 細胞の cDNA から新しい SLAT 関連遺伝子を単離することに成功しております。本研究では、ヘルパー T 細胞における発現パターンとサイトカイン産生に及ぼす影響といった機能について詳細に解析を進めました。

ヘルパー T 細胞の各種サブセット Th1, Th2, Th17, Treg (制御性 T 細胞) への分化条件で、新規 SLAT 関連分子 (SLAT-AP) の発現パターンをウエスタンブロッティングにより蛋白レベルで詳細に解析したところ、Th1, Th17, Treg では発現を認めず、SLAT-AP の発現が Th2 に特異的であり、IL-12 と IFN- γ に対するサイトカイン中和抗体を共存させた場合に強力に発現することが明らかになりました。また、RNA レベルでも、Th2 において一過性に発現の亢進が認められました。

完全長の SLAT は IL-4 産生を増強し、IFN- γ 産生を抑制することが明らかになっています (Tanaka et al. *Immunity* 19: 119, 2003)。一過性に SLAT-AP を過剰発現させたヒト T 細胞株 Jurkat を用いて、IL-4 や IFN- γ など各種サイトカインへの影響をルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、IL-4 や IFN- γ といったサイトカイン産生における SLAT-AP の影響はほとんど認められませんでした。また、より安定した実験系を構築するために、レトロウイルスを用いて恒常的に SLAT-AP の発現をノックダウンした Jurkat 細胞株を作製しました。これらの細胞株を利用して SLAT-AP の機能を解析したところ、ルシフェラーゼアッセイの結果と同様にサイトカイン産生における SLAT-AP の影響はほと

んど認められませんでした。

さらに、より生理的な条件で解析するために、OVA 抗原を特異的に認識する T 細胞受容体トランスジェニックマウスから分離した T 細胞に、レトロウイルスにて SLAT-AP を過剰発現させて、抗原提示細胞と OVA ペプチドで刺激することで IL-4 や IFN- γ など各種サイトカイン産生への影響を細胞内サイトカイン染色による Flowcytometry を用いて比較検証したところ、IL-4 の産生に影響を及ぼす結果が得られました。より生理的に近い条件でサイトカイン産生に対する影響が示唆されたことから、引き続き実験結果を検証していく予定です。

ケモカインによるトランスウエルでの遊走実験では、SLAT-AP の過剰発現による明らかな影響を認めませんでした。

Jurkat 細胞株を用いて SLAT-AP の細胞内局在を観察したところ、完全長の SLAT が細胞膜に局在することに比較して、細胞質内に局限して存在することが観察されました。さらに、SLAT-AP の過剰発現によりアクチン集積による細胞突起を観察するようになり、細胞形態に変化が生じる可能性が示唆されました。

これまでに得られた本研究成果に基づいて、今後、SLAT-AP を標的とした T 細胞の分化と遊走の制御機構を明らかにしていきます。また、アレルギーの病態解明と新しい治療法の開発へと研究を展開していく予定です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yanagihara, T., Sanematsu, F., Sato, T., Uruno, T., Duan, X., Tomino, T., Harada, Y., Watanabe, M., Wang, Y., Tanaka, Y., Nakanishi, Y., Suyama, M., and Fukui, Y. Intronic regulation of Aire expression by Jmjd6 for self-tolerance induction in the thymus. *Nature Commun.* 6: 8820 (2015) [査読有] doi: 10.1038/ncomms9820.

田中芳彦. 歯周病の病態からみた新しい考え方. *感染症* 45: 193-202 (2015) [査読無]

Ogawa, K., Tanaka, Y., Uruno, T., Duan, X., Harada, Y., Sanematsu, F., Yamamura, K., Terasawa, M., Nishikimi, A., Côté, J.F. and Fukui, Y. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links FceRI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *J. Exp. Med.* 211: 1407-1419 (2014) [査読有] doi: 10.1084/jem.20131926.

〔学会発表〕(計13件)

Hashimoto, M., Nagao, J., Tasaki, S., Narita, Y., Cho, T., Yuasa, K., Tanaka, Y. Functional analysis of a novel immune signaling molecule involved in Th2-mediated allergic response. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sapporo, 2015年11月18-20日、2015.

橋本麻利江, 永尾潤一, 田崎園子, 成田由香, 長環, 湯浅賢治, 田中芳彦. 新規免疫系シグナル分子によるアレルギー制御機構の解明. 第57回歯科基礎医学会学術大会、新潟、9月12-13日、2015. 田崎園子, 長環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 小島 寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明. 第57回歯科基礎医学会学術大会、新潟、9月12-13日、2015.

長環, 田崎園子, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 田中芳彦. *Candida albicans* の新規T細胞分化誘導抗原の探索. 第57回歯科基礎医学会学術大会、新潟、9月12-13日、2015.

成田由香, 田崎園子, 橋本麻利江, 永尾潤一, 長環, 田中芳彦. 免疫応答を誘導する歯周病原細菌の菌体成分の探索. 第57回歯科基礎医学会学術大会、新潟、9月12-13日、2015.

永尾潤一, 田崎園子, 橋本麻利江, 成田由香, 長環, 田中芳彦. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* に対する免疫制御機構の解明. 第57回歯科基礎医学会学術大会、新潟、9月12-13日、2015.

橋本麻利江, 永尾潤一, 田崎園子, 今吉理恵子, 長環, 湯浅賢治, 田中芳彦. アレルギー反応に関連した新しいシグナル分子の同定とその機能解析. 第56回歯科基礎医学会学術大会、福岡、9月25-27日、2014.

田崎園子, 長環, 橋本麻利江, 今吉理恵子, 永尾潤一, 小島 寛, 田中芳彦. Mild heat stress 下で発現する *Candida albicans* の表層抗原探索. 第56回歯科基礎医学会学術大会、福岡、9月25-27日、2014.

永尾潤一, 長環, 今吉理恵子, 橋本麻利江, 田崎園子, 田中芳彦. 病原真菌 *Candida glabrata* の Hsp70 タンパク質 Sse1 の機能解析. 第56回歯科基礎医学会学術大会、福岡、9月25-27日、2014.

長環, 永尾潤一, 今吉理恵子, 橋本麻利江, 田崎園子, 田中芳彦. サケ由来プロタミン派生ペプチドの抗真菌活性に関する評価. 第56回歯科基礎医学会学術大会、福岡、9月25-27日、2014.

今吉理恵子, 田崎園子, 橋本麻利江, 永尾潤一, 長環, 田中芳彦. 免疫応答を誘導する歯周病原細菌の抗原決定基の探索. 第56回歯科基礎医学会学術大会、福

岡、9月25-27日、2014.

田崎園子, 長環, 橋本麻利江, 今吉理恵子, 永尾潤一, 小島 寛, 田中芳彦. Mild heat stress 下の *Candida albicans* バイオフィルム形成時に発現する遺伝子群の解析. 第58回日本医真菌学会学術集会、横浜、11月1-2日、2014.

橋本麻利江, 長環, 永尾潤一, 今吉理恵子, 田崎園子, 田中芳彦, 庵原啓司, 御手洗 誠, 阿部 茂, 羽山和美. プロタミンペプチドの濃度依存的抗真菌活性について. 第58回日本医真菌学会学術集会、横浜、11月1-2日、2014.

〔図書〕(計1件)

田中芳彦 (分担執筆). 第2章 免疫学Ⅴ 細胞性免疫. 川端重忠、小松澤均、大原直也、寺尾豊、浜田茂幸 編集. 口腔微生物学・免疫学 第4版. 東京. 医歯薬出版. 96-102、2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fdcnet.ac.jp/col/infl/teacher/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 芳彦 (TANAKA YOSHIHIKO)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号：00398083

(2) 研究分担者

永尾 潤一 (NAGAO JUN-ICHI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号：30509047

(3) 連携研究者

なし