

ヒト末梢血単球由来マクロファージおよび 樹状細胞における DOCK180蛋白の発現と貪食能との関連

学位論文内容の要旨

血液細胞の一つである単球は骨髓造血幹細胞から分化増殖し、さらにサイトカインの刺激を受けてマクロファージや樹状細胞 (dendritic cell, 以下 DC) へと分化する。マクロファージは生体に侵入した各種の病原体を貪食し、また一方では死細胞やアポトーシス細胞を貪食することで生体の免疫防御機構および恒常性維持に重要な役割を果たしている。DC も様々な抗原を貪食して成熟 DC へ分化し、抗原提示細胞として生体の免疫システムを稼働させるのに重要な役割を果たしている。このようにマクロファージや DC による貪食作用は生体内で不可欠であるが、この貪食作用を行うために低分子量 G タンパク質の一つ Rac が重要な役割を果たすことが知られている。CDM ファミリー分子の一員である DOCK180 はこの Rac に対する特異的 guanine nucleotide exchange factor (GEF) の一つであり、ヒトの上皮系細胞株を用いた検討ではインテグリンからの刺激により、この DOCK180 による Rac の活性化を介してアポトーシス細胞の貪食や細胞遊走が行われることが報告されている。一方、末梢白血球では DOCK180 の発現が認められず、相補的に相同体の一つである DOCK2 を発現しており、リンパ球においてはこの DOCK2 による Rac の活性化を介して細胞遊走を制御していることが報告されている。しかし、DOCK2 のノックアウトマウスを用いた検討では、リンパ球の細胞遊走は抑制されたが、単球では抑制されなかったため、単球系細胞においては DOCK2 以外の分子による Rac 活性化機構の関与が推測されていた。最近、未熟 DC は DOCK2 に加えて DOCK180 を発現しており、マウスの DC 細胞株を用いた検討において、DC の成熟に伴い貪食能が低下すると DOCK180 の発現も相関的に低下することが報告され、DOCK180 が DC の Rac を介した貪食作用に関与していることが示唆されたものの、貪食能を有していない単球や分化誘導されたマクロファージを含めて単球系細胞における DOCK180 の発現と貪食能獲得については殆ど解明されていない。

本研究では単球系細胞における DOCK ファミリー蛋白の貪食能への関与を明らかにするために、ヒト検体から分離された正常単球を用いてマクロファージおよび DC へ分化誘導を行い、DOCK180 と DOCK2 の発現の変化と貪食能との関連について検討を行った。

1. マクロファージおよび DC における DOCK180 の経時的な発現増強

ヒト末梢血から分離した単球を M-CSF を用いてマクロファージに、GM-CSF と IL-4, TNF- α を用いて DC に誘導した。フローサイトメトリーによる表面抗原解析ではマクロファージでは CD14 の発現を維持しており、一方、DC では分化に伴い CD14 の発現が低下し、CD1a, CD40, CD80, CD83 の発現増強が認められ、形態的所見とも合わせて、この系でマクロファージおよび DC への正常な分化誘導が行われたと考えられた。

次に定量 RT-PCR によりマクロファージおよび DC における DOCK180 と DOCK2 mRNA の発現量を経時的に解析した。純化した単球においては DOCK180 mRNA の発現は殆ど認められなかったが、マクロファージまたは DC への誘導により、誘導開始 2 日後から、単球に比較して DOCK180 mRNA の発現は有

意に増加した。誘導されたマクロファージにおいて DOCK180 mRNA の発現は経時的に増加し、誘導 7 日目に最大量に達した。一方、DC では誘導 4 日目に DOCK180 mRNA の発現は最大量に達した。同時に測定した DOCK2 mRNA の発現量は、純化単球において既に高いレベルの発現が認められ、マクロファージおよび DC への誘導後もその発現量に有意な変化は認められなかった。

さらに Immunoblot によりマクロファージおよび DC における DOCK180 蛋白の発現を経時的に解析したところ、マクロファージおよび DC いずれの誘導においても培養 2 日目から DOCK180 蛋白の発現が認められ、その発現は経時的に増加した。

2. マクロファージおよび DC における食食能の経時的な増加

Zymosan A particle を用いてマクロファージおよび DC の phagocytosis assay を経時的に行った。マクロファージおよび DC いずれの誘導下においても、細胞の食食能は経時的に増加した。マクロファージにおいては誘導開始 2 日後から単球と比較して食食能の有意な上昇が認められた。一方、DC では誘導開始 1 日後から単球と比較して食食能の有意な上昇が認められた。

3. DOCK180 mRNA の RNA interference による DC の食食能低下

マクロファージおよび DC への分化誘導にて同時に誘導された DOCK180 が、獲得された食食能に関与していることを証明するために、DOCK180 mRNA に対する siRNA を導入して DOCK180 gene knock-down assay を行った。siRNA 導入 48 時間後に DOCK180 蛋白の発現を Immunoblot により確認したところ、エレクトロポレーションのみ施行した DC および random oligo を導入した DC の二種類のコントロール細胞と比較して、DOCK180 に対する siRNA を導入した DC では明らかな DOCK180 蛋白の発現低下が認められた。さらにこの条件下において zymosan A particle を用いて phagocytosis assay を行ったところ、DOCK180 に対する siRNA を導入した DC では、コントロールの DC と比較して有意に食食能が低下した。

以上のように、本研究において私は、末梢血から単離されたヒト単球では、マクロファージおよび DC への分化に伴い、それまで発現が認められなかった DOCK180 が誘導され、相関的に食食能が亢進することを明らかとし、さらに siRNA を用いた解析により、DOCK180 がヒトの DC の食食作用に重要な役割を果たしていることを示し、ヒトにおける DOCK ファミリー蛋白の生理的機能を初めて明らかとした。これらの知見により、HIV 感染による単球系細胞の食食能低下機構や難治性の自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスの病態解明が成され、これらの難治性疾患の新規治療へと結びつくことが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 助 教 授 田 中 伸 哉

学位論文題名

ヒト末梢血単球由来マクロファージおよび 樹状細胞における DOCK180蛋白の発現と貪食能との関連

マクロファージや樹状細胞 (dendritic cell, 以下 DC) は高い貪食能を有し、生体の免疫防御機構および恒常性維持に貢献しているが、この貪食作用を行うために低分子量 G タンパク質の一つ Rac が重要な役割を果たすことが知られている。CDM ファミリー分子の一員である DOCK180 はこの Rac に対する特異的 guanine nucleotide exchange factor (GEF) の一つであり、ヒトの上皮系細胞株を用いた検討では、この DOCK180 による Rac の活性化を介してアポトーシス細胞の貪食や細胞遊走が行われることが報告されている。一方、リンパ球においては DOCK180 の発現が認められず、相補的に相同体の一つである DOCK2 を発現しており、この DOCK2 による Rac の活性化を介して細胞遊走を制御していることが報告されている。しかし、DOCK2 のノックアウトマウスを用いた検討から単球系細胞においては DOCK2 以外の分子による Rac 活性化機構の関与が推測されており、またマウスの DC 細胞株を用いた検討において DOCK180 が DC の Rac を介した貪食作用に関与していることが示唆されたものの、単球や分化誘導されたマクロファージを含めて単球系細胞における DOCK180 の発現と貪食能獲得については殆ど解明されていない。本研究では単球系細胞における DOCK ファミリー蛋白の貪食能への関与を明らかにするために、ヒト検体から分離された正常単球を用いてマクロファージおよび DC へ分化誘導を行い、DOCK180 と DOCK2 の発現の変化と貪食能との関連について検討を行った。はじめにヒト末梢血から分離した単球を M-CSF を用いてマクロファージに、GM-CSF と IL-4、TNF- α を用いて DC に誘導した。フローサイトメトリーによる表面抗原解析の結果から、この系でマクロファージおよび DC への正常な分化誘導が行われたことを確認した。定量 RT-PCR による DOCK180 と DOCK2 mRNA の発現量の経時的解析では、純化した単球においては DOCK180 mRNA の発現は殆ど認められなかったが、マクロファージまたは DC への誘導により、誘導開始 2 日後から、単球に比較して DOCK180 mRNA の発現は有意に増加した。DOCK180 mRNA の発現は経時的に増加し、マクロファージにおいて誘導 7 日目に、DC では誘導 4 日目に最大量に達した。同時に測定した DOCK2 mRNA の発現量は、純化単球において既に高いレベルの発現が認められ、マクロファージおよび DC への誘導後もその発現量に有意な変化は認められなかった。さらに Immunoblotting により DOCK180 蛋白の発現を経時的に解析したところ、マクロファージおよび DC いずれの誘導においても培養 2 日目から DOCK180 蛋白の発現が認められ、その発現は経時的に増加した。次に zymosan A particle を用いた phagocytosis assay を経時的に行ったところ、マクロファージおよび DC いずれの誘導下においても、細胞の貪食能は経

時的に増加した。マクロファージにおいては誘導開始 2 日後から、DC では誘導開始 1 日後から単球と比較して食食能の有意な上昇が認められた。さらにマクロファージおよび DC の DOCK180 が、獲得された食食能に関与していることを証明するために、DOCK180 mRNA に対する siRNA を導入して DOCK180 gene knock-down assay を行った。siRNA 導入 48 時間後に DOCK180 蛋白の発現を Immunoblotting により確認したところ、エレクトロポレーションのみ施行した DC および random oligo を導入した DC の二種類のコントロール細胞と比較して、DOCK180 に対する siRNA を導入した DC では明らかな DOCK180 蛋白の発現低下が認められた。さらにこの条件下において phagocytosis assay を行ったところ、DOCK180 に対する siRNA を導入した DC では、コントロールの DC と比較して有意に食食能が低下した。以上のように、本研究では、末梢血から単離されたヒト単球では、マクロファージおよび DC への分化に伴い、それまで発現が認められなかった DOCK180 が誘導され、相関的に食食能が亢進することを明らかとし、さらに siRNA を用いた解析により、DOCK180 がヒトの DC の食食作用に重要な役割を果たしていることを示した。質疑応答では、副査笠原教授から、DOCK180 の knock out マウスについて、conditional knock out マウスについて、DOCK180 過剰発現系について、DOCK180 の分子複合体の挙動についての質問があった。次いで副査今村教授から、DOCK180 mRNA の発現量と食食能との解離について、RNAi で食食能の低下が不十分な理由について、DOCK180 の発現調節機構についての質問があった。次いで副査田中助教授から、DOCK180 のプロモーター解析について、DOCK180 を誘導する転写因子についての質問があった。次いで主査小池教授から、SLE の病態に DOCK180 がどのように関連するのかを検討する方法について、同じ食食能を有しながら異なる GEF を利用する生物学的な理由についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はこれまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に回答した。

本論文は、ヒト正常単球系細胞における DOCK180 蛋白と食食能の関連を明らかにし、ヒトにおける DOCK ファミリー蛋白の生理的機能を初めて明らかとした点で高く評価され、今後、難治性自己免疫疾患や免疫不全症の病態解明、新規治療の開発に繋がることが期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。