

学位論文題名

ヒト単球由来樹状細胞におけるDOCK180とDOCK2の
発現と遊走能に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

樹状細胞 (Dendritic cell, 以下DC) は免疫応答に必要な細胞であり, リンパ組織のみならず広く全身に分布している. 全身組織において未熟なDCは炎症組織へ移動しアポトーシス細胞や種々の外来抗原を貪食し成熟DCへと分化したのち, 二次リンパ組織へ移動し抗原提示細胞として機能する. このような炎症環境下において, DCの遊走能はその機能を発揮するうえで非常に重要である.

DCの遊走に重要な役割を果たす分子機構のうち, 低分子量G蛋白Rhoファミリーの一つであるRacがある. Racを活性化する特異的なguanosine nucleotide exchange factor (以下, GEF) のひとつに, 今回着目したDOCKファミリー蛋白と呼ばれる分子群がある. DCにはDOCKファミリー蛋白の中のDOCK180とDOCK2が発現していることが報告されている. しかし, ヒトDCにおけるDOCK180と細胞遊走の関連についての検討や, DOCK2とDOCK180が二重発現することの意義についてはこれまでに報告されていない.

本研究ではヒトDCの遊走能におけるDOCK180およびDOCK2の関与を明らかにするために, 正常単球からDCへ分化誘導したヒト単球由来DCを用いて, DOCK180およびDOCK2の蛋白発現抑制を行い, その遊走能の変化について検討した.

【方法と結果】

ヒト単球は健康者献血由来廃棄血を用い, Ficoll-Hypaque PLUSを用いた比重遠心法で単核細胞を分離し, 抗CD14磁気ビーズ抗体と磁気細胞分離システムを用いて単離した. 単離直後からDOCK180 mRNAおよびDOCK2 mRNAに対する合成short interfering RNA (siRNA)を用い, RNA干渉によるリポフェクション法でDOCK180ノックダウン細胞, DOCK2ノックダウン細胞およびDOCK180とDOCK2のダブルノックダウン細胞を作成した. 未熟DCへの分化誘導は既報のとおり行った. リポフェクション終了後72時間経過した時点で未熟DCを回収し, DOCK180 mRNAおよびDOCK2 mRNA発現量をリアルタイム定量RT-PCR法で, 走化率をトランズウェルマイグレーションアッセイで検討した. 各サンプルのDOCK180 mRNAおよびDOCK2 mRNA発現量はGAPDH mRNAの発現量で補正後, DOCK180では293T細胞の発現量を1000 Unitsに, DOCK2ではJurkat細胞の発現量を1000 Unitsに規定して, それぞれに対する相対量として数値化した.

未熟DCにおけるDOCK180 mRNA発現量は, 陰性コントロール細胞の1337 ± 166 Unitsに対して, DOCK180ノックダウン細胞では552 ± 92 Unitsと有意に低下していた ($p < 0.05$). DOCK2 mRNA発現量は, 陰性コントロール細胞の1858 ± 242 Unitsに対して, DOCK2ノックダウン細胞では1010 ± 4.7 Unitsと有意に低下していた ($p < 0.05$). ダブルノックダウン細胞におけるDOCK180 mRNA発現量は陰性コントロール細胞の1756 ± 681 Unitsに対し541 ± 212 Unitsと有意に低下しており, DOCK2 mRNA発現量も陰性コントロール細胞の2444 ± 661 Unitsに対し832 ± 110 Unitsと有意に低下していた ($p < 0.01$)

次に, これらノックダウン細胞における走化性をトランズウェルマイグレーションアッセイにより検討した. DOCK180ノックダウン細胞のCXCL12およびCCL19刺激による走化率は, 陰性コントロール細胞の9.1% ± 1.7%, 11.1 ± 2.6%に対して4.3 ± 2.2%, 3.8 ± 1.5%と有意に走化率が低下していた ($p < 0.05$). DOCK2ノックダウン細胞のCXCL12およびCCL19刺激による走化率は, 陰性コントロール細胞の6.3% ± 2.4%, 7.5 ± 2.3%に対して4.3 ± 2.2%, 3.8 ± 1.5%と有意に走化率が低下していた ($p < 0.05$). なお, CXCL12およびCCL19受容体であるCXCR4およびCCR7の発現量は, 陰性コントロールおよびそれぞれのノックダウン細胞において差を認めなかった.

次に、未熟DCの走化性とケモカイン受容体下流のRacとの関連を明らかにするための検討を行った。Rac阻害剤で処理した未熟DCを用い、トランズウェルマイグレーションアッセイを行ったところ、DCはほぼその走化性を失った。次にDOCK2およびDOCK180のノックダウンによる発現低下と、CXCL12下流でのRac活性化の関連を検討するためにRac pull downアッセイを行った。陰性コントロール細胞に対し、単独およびダブルノックダウンした細胞でCXCL12刺激によるRacの活性低下を認めた。

最後に、成熟DCにおいてDOCK180およびDOCK2ノックダウンした際の走化性について検討した。DCの成熟化にはリポポリサッカライド（以下、LPS）を用いた。DCの成熟はCD83の発現上昇を確認した。

成熟DCにおけるDOCK180 mRNA発現量は、陰性コントロール細胞の 1322 ± 499 Unitsに対して、DOCK180ノックダウン細胞では 388 ± 227 Unitsと有意に低下していた($p < 0.05$)。DOCK2 mRNA発現量は、陰性コントロール細胞の 1769 ± 380 Unitsに対して、DOCK2ノックダウン細胞では 786 ± 163 Unitsと有意に低下していた($p < 0.05$)。次に、トランズウェルマイグレーションアッセイを行ったが、陰性コントロール細胞とDOCK2およびDOCK180ノックダウン細胞との間に差を認めなかった。

【考察】

本研究の結果から、ヒトの未熟DCにおいてはDOCK180もしくはDOCK2のいずれかの発現を選択的に低下させることで、CXCL12およびCCL19に対する遊走能が低下することが明らかとなった。この遊走能の低下が、細胞表面のケモカイン受容体の発現量低下に起因している可能性について、フローサイトメトリーを用いて解析した結果、DOCK180およびDOCK2ノックダウン細胞と陰性コントロール細胞との間でCCR7やCXCR4の発現量に差は認められなかった。このことから、ヒトの未熟DCにおける遊走能の制御は、単純な受容体変化ではなく、DOCK180およびDOCK2を介した細胞内情報伝達経路が重要な働きを持っている、と考えられる。

上皮系細胞においてはDOCK180が、血液細胞においてはDOCK2がRacを活性化し、細胞運動に関与することが知られているが、両者を持つヒトのDCにおいてRacがどのように制御されているかは全く報告がなかった。今回の検討で、DOCK180およびDOCK2をノックダウンしたヒトの未熟DCにおいてCXCL12刺激によるRacのリン酸化は、いずれのノックダウン細胞においても低下していた。すなわち、DOCK180およびDOCK2の両者を同時に発現するヒトのDCにおいて、DOCK180およびDOCK2がRacを二重支配することが初めて示された。

未熟なDCは炎症環境下で外来抗原を食食した後、成熟DCとなり、二次リンパ組織へ移動し抗原提示細胞としてその機能を発揮する。しかしその際の成熟DCの走化性の制御機構も未解明な部分が多い。そこでDOCK180およびDOCK2をノックダウンした際の成熟DCの走化性についても検討したところ、ノックダウンの有無で遊走能に変化は無く、成熟DCにおいてはヒト未熟DCと異なる結果が得られた。すなわち炎症環境下で成熟DCへ誘導された後の遊走能は、DOCK180やDOCK2の支配から外れることが示唆された。現在、DOCKファミリー以外でのRacのGEFにはVav, Tiam, PIXが知られている。ヒト成熟DCの遊走の際にDOCK180やDOCK2は関与していないことが明らかとなったことから、その遊走にはVav, Tiam, PIXなどが関与している可能性があり、今後の検討課題であると言える。

今回の研究で、ヒトの未熟DCにおいてDOCK180およびDOCK2からそれぞれRacが活性化され遊走能に関連していることが示された。この経路がヒトの生体内で機能していることの証明や、この経路の異常が免疫疾患を引き起こす可能性について検討することも今後の重要な課題であると考えられた。

【結語】

1. ヒトの未熟DCでは、DOCK180およびDOCK2の両者がRacの活性化を介してCXCL12およびCCL19による遊走能に関与していた。
2. ヒトの成熟DCでは、DOCK180およびDOCK2はCXCL12およびCCL19による輸送能に関与していなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 田 中 伸 哉

学位論文題名

ヒト単球由来樹状細胞におけるDOCK180とDOCK2の 発現と遊走能に関する研究

樹状細胞 (Dendritic cell, 以下DC) は免疫応答に必要な細胞であり, DCの遊走能はその機能を発揮するうえで非常に重要である. ヒトDCにおけるDOCK180と細胞遊走の関連についての検討や, DOCK2とDOCK180が二重発現することの意義についてはこれまでに報告されていない. 本研究ではヒトDCの遊走能におけるDOCK180およびDOCK2の関与を明らかにするために, 正常単球からDCへ分化誘導したヒト単球由来DCを用いて, DOCK180およびDOCK2の蛋白発現抑制を行い, その遊走能の変化について検討した.

ヒト単球は健常者献血由来廃棄血から単核細胞を分離した後, 抗CD14磁気ビーズ抗体と磁気細胞分離システムを用いて単離した. 単離直後からDOCK180 mRNAおよびDOCK2 mRNAに対する合成short interfering RNA (siRNA)を用い, RNA干渉によるリポフェクション法でDOCK180ノックダウン細胞, DOCK2ノックダウン細胞およびDOCK180とDOCK2のダブルノックダウン細胞を作成した. 未熟DCへの分化誘導は既報のとおり行った.

未熟DCにおけるDOCK180 mRNA発現量は, 陰性コントロール細胞と比較して, DOCK180ノックダウン細胞で有意に低下しており, DOCK2 mRNA発現量は, 陰性コントロール細胞と比較して, DOCK2ノックダウン細胞で有意に低下していた. ダブルノックダウン細胞におけるDOCK180 mRNA発現量およびDOCK2 mRNA発現量はいずれも陰性コントロール細胞と比較して有意に低下しており, それぞれ単独でノックダウンした時と同程度までmRNA発現量は低下していた.

次に, これらノックダウン細胞における走化性をトランズウェルマイグレーションアッセイにより検討した. DOCK180ノックダウン細胞およびDOCK2ノックダウン細胞のCXCL12およびCCL19刺激による走化率は, 陰性コントロール細胞に対して有意に走化率が低下していた. なお, CXCL12およびCCL19受容体であるCXCR4およびCCR7の発現量は, 陰性コントロールおよびそれぞれのノックダウン細胞において差を認めなかった.

次に, 未熟DCの走化性とケモカイン受容体下流のRacとの関連を明らかにするための検討を行った. Rac阻害剤で処理した未熟DCを用い, トランズウェルマイグレーションアッセイを行ったところ, DCはほぼその走化性を失った. 次にDOCK2およびDOCK180のノックダウンによる発現低下と, CXCL12下流でのRac活性化の関連を検討するためにRac pull downアッセイを行った. 陰性コントロール細胞に対し, 単独およびダブルノックダウンした細胞でCXCL12刺激によるRacの活性低下を認めた.