Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

The Rho kinase pathway regulates the migration of dendritic cells through SIRP-α

小倉，香奈子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2012-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5613
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005613

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

The Rho kinase pathway regulates the migration of dendritic cells through SIRP-α

Rho kinase 経路は SIRPα を介した樹状細胞の遊走を制御している

小倉　香奈子　　福永　淳　　田口　久美子　　永井　宏
于　希軍　　鬼木　俊太郎　　岡澤　秀樹　　的崎　尚
堀川　遠弥　　錦織　千佳子

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
皮膚科学
（指導教員：　錦織千佳子教授）

小倉　香奈子

樹状細胞は、自然および獲得免疫反応を開始する能力をもつ抗原提示細胞である。皮膚などの末梢組織においては、未熟な樹状細胞として存在し、外来抗原を処理する。抗原を捕捉した後、ランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞などの皮膚の樹状細胞は、皮膚から所属リンパ節に遊走し、抗原提示を行う。皮膚の樹状細胞の遊走は、接触過敏反応のような皮膚の免疫反応の導入に不可欠な役割を果たしている。

マウスではシグナル制御タンパクの１つである signal-regulatory protein α（SIRP-α）が、単球、マクロファージ、樹状細胞、ランゲルハンス細胞などの骨髄系細胞に豊富に発現している。SIRP-α は細胞外に３つの免疫グロブリン様ドメインを有し、細胞内に２つの ITIM と呼ばれるアミノ酸配列とチロシン残基を有している。我々は以前に、ランゲルハンス細胞または樹状細胞の遊走が SIRPα の結合により有意に抑制され、SIRPα の細胞内ドメインを欠く変異マウスではランゲルハンス細胞の遊走が損なわれていることを示した。さらに我々は、感作の前に抗 SIRPα 抗体で処理をしたマウスや、SIRPα 変異マウスでは接触過敏反応は著明に抑制されることを報告した。

Small GTPase である Rho は、細胞の遊走を含む様々な細胞機能の制御に不可欠な役割を果たしている。Rho kinase 自身は、myosin-binding subunit (MBS)をリン酸化し、in vitro, in vivo ともにミオシンフォスファターゼの不活化を導く。ヒトの単球由来の樹状細胞において、Rho GTPase は、その形態や免疫反応を調節している。

SIRPα と SHP2 は、Rho の活性の制御に寄与しており、Rho の活性増強は、少なくとも部分的には、SIRPα の結合による細胞遊走の抑制に関与している。しかしながら、樹状細胞において Rho/Rho-kinase 経路が SIRPα のシグナルの下流に関わっているかどうかについては、明らかにされていない。

今回我々は、樹状細胞の遊走における Rho kinase 活性と SIRP-α の相互作用につき検討した。

まず、新生児マウスの表皮から樹立した DC cell line である XS52 細胞を用いて chemotaxis assay を行い、遊走能について調べた。未熟な XS52 細胞ではなく、成熟した XS52 細胞が CCL19 で刺激した際に走化性を示すため、XS52 細胞を GM-CSF と IL-4 を添加した complete RPMI で 9 日間培養し、成熟させた。この細胞を CCL19 で刺激することで誘導される細胞遊走が、Rho-kinase 阻害剤（Fasudil および Y-27632）により受ける影響を調べた。Fasudil は、kinase に結合する ATP に競合することにより Rho kinase を選択的に阻害する。Y-27632 は、触媒部位に対する ATP と競合する Rho kinase1 と Rho kinase2 の両方を非選択的に阻害する。これらの Rho kinase 阻害剤はいずれも 10μM の濃度で成熟 XS52 細胞の CCL19 に対する走化性を有意に抑制し、さらに容量依存性に阻害していることが分かった。

Rho kinase 活性の強さは、Rho kinase 阻害剤の下流ターゲットの１つであるリン酸化した MBS（p-MBS）/MBS の比により比較できる。それゆえ、成熟 XS52 細胞における Rho kinase 活性を調べるために抗 p-MBS 抗体を用いてウエスタンブロット解析をおこなった。CCL19 は、成熟 XS52 細胞における MBS のリン酸化を up-regulate させたが、この up-regulation は、Rho

kinase 阻害剤である Fasudil と Y-27632 により有意に抑制された。この結果から、皮膚の免疫反応を制御している皮膚樹状細胞の遊走能は、Rho/Rho kinase の活性化または抑制により調整されていることが示唆される。さらに、Rho kinase 阻害剤処理と同様に、抗 SIRPα 抗体処理は CCL19 刺激による MBS のリン酸化を有意に抑制し、このことは、成熟樹状細胞において CCL19 により賦活される Rho/Rho kinase の活性化が SIRPα の結合により抑制されることを示している。

次に、野生型および SIRPα 変異マウスの大腿骨の骨髄から樹状細胞（BM-DC）を作成した。GM-CSF を添加し骨髄細胞を 10 日間培養した後、未熟および成熟の樹状細胞は GM-CSF と LPS とともにさらに培養し、MACS を用いて CD86 陽性の成熟樹状細胞を精製した。野生型と SIRPα 変異マウスからの CD86 陽性 BM-DC の 90～95%以上は、CCL19 のケモカイン受容体である CCR7 を発現していた。未処理の場合、野生型および SIRPα マウスの CD86 陽性 BM-DC の走化性には差がなかった。一方、CCL19 で刺激すると、野生型と比較して SIRP-α 変異マウスの CD86 陽性 BM-DC の走化性は有意に抑制されており、また、SIRPα 変異マウスの BM-DC は CCL19 刺激の有無にかかわらず有意差はなかった。これらの結果から、樹状細胞において SIRPα の細胞内領域を欠くことは、CCL19 による樹状細胞遊走の抑制につながることが示唆される。

さらに我々は、野生型および SIRPα 変異マウスからの CD86 陽性 CCR7 陽性成熟 BM-DC における、CCL19 により誘導される MBS のリン酸化を調べた。CCL19 は、野生型マウスからの BM-DC における MBS のリン酸化を有意に上昇させたが、この up-regulation は、SIRP-α 変異マウスからの BM-DC では認めなかった。この結果から、Rho/Rho kinase の活性化が、SIRP-α の細胞内ドメインの欠損により抑制されていることを示している。

最近、Rho GTPase のエフェクターである mDia1 が、マウスの樹状細胞の遊走に必要であると報告された。しかし、mDia1 と SIRPα の相互作用が樹状細胞の遊走に関わっているかどうかは判明しておらず、今後の検討課題である。

まとめると、樹状細胞において SIRPα の結合および細胞内領域の欠損は、Rho/Rho kinase 活性の抑制を通じてその走化性を阻害する。さらに、樹状細胞の遊走は、SIRPα シグナルの下流としての Rho/Rho kinase 経路により制御されていることを示唆している。また、アトピー性皮膚炎や尋常性乾癬などの他の炎症性皮膚疾患に Rho/Rho kinase 経路が関連している可能性も示唆される。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2268号	氏　名	小倉　香奈子
論文題目 Title of Dissertation	Rho kinase 経路は SIRP-αを介した樹状細胞の遊走を制御している The Rho kinase pathway regulates the migration of dendritic cells through SIRP-α		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	衛藤康博 横崎宏 飯島一誠	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

樹状細胞は、自然・獲得免疫反応を惹起する抗原提示細胞であり、ランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞等の皮膚の樹状細胞は、抗原捕捉後、所属リンパ節に遊走し、抗原提示を行うが、樹状細胞の遊走は、接触過敏反応のような皮膚の免疫反応の導入に必須の役割を担っている。

マウスではシグナル制御タンパクの１つである signal-regulatory protein α（SIRP α）が、樹状細胞、ランゲルハンス細胞等の骨髄由来細胞に高発現している。SIRP α は細胞外に３つの免疫グロブリン様ドメインを、細胞内に２つの ITIM と呼ばれるモチーフとチロシン残基を有している。我々は以前、ランゲルハンス細胞や樹状細胞の遊走が、SIRP α の細胞内ドメインを欠く変異マウスでは損なわれていることを示した。また、感作前に抗 SIRP α 抗体で処理したマウスや SIRP α 変異マウスでは接触過敏反応が著明に抑制されることを報告した。

Small GTPase である Rho は、細胞の遊走等の細胞機能の制御に必須の役割を担っている。その下流で機能する Rho kinase は、myosin-binding subunit(MBS)をリン酸化しミオシンフォスファターゼを不活化する。ヒトの単球由来の樹状細胞では、Rho は形態や免疫反応を調節している。SIRP α は、Rho の活性制御に関与しており、Rho の活性増強は、細胞遊走の抑制に関与している。しかしながら、樹状細胞において Rho/Rho-kinase 経路が SIRP α のシグナルの下流で機能しているかどうかについては不明である。

今回我々は、樹状細胞の遊走における Rho kinase 活性と SIRP α の相互作用について検討した。まず、新生児マウスの表皮由来の樹状細胞株である XS52 細胞を用いて chemotaxis assay を行い、遊走能を解析した。未熟な XS52 細胞ではなく、成熟した XS52 細胞を CCL19 で刺激した際に走化性を示すため、XS52 細胞を GM-CSF と IL-4 を添加した培地で培養・成熟させ、CCL19 で刺激した際に誘導される細胞遊走が、Rho-kinase 阻害剤により受ける影響を調べた。Rho kinase 阻害剤は成熟 XS52 細胞の CCL19 に対する走化性を有意に抑制し、その効果は容量依存的であった。

Rho kinase 活性は、その標的分子である MBS のリン酸化の程度、即ちリン酸化 MBS（p-MBS）/MBS の比により比較できる。成熟 XS52 細胞における Rho kinase 活性を調べるために抗 p-MBS 抗体を用いて免疫ブロット解析を行った。CCL19 は、成熟 XS52 細胞における MBS のリン酸化を増強させたが、その増強は Rho kinase 阻害剤により抑制されることから、皮膚樹状細胞の遊走能は、Rho/Rho kinase の活性により制御されていることが示唆される。また、抗 SIRP α 抗体処理も CCL19 刺激による MBS のリン酸化を有意に抑制することから、成熟樹状細胞では CCL19 による Rho/Rho kinase の活性化が SIRP α の結合により抑制されることを示している。

次に、野生型およびSIRPα変異マウスの大腿骨の骨髄から樹状細胞（BM-DC）を得た。GM-CSFを添加し骨髄細胞を培養後、未熟・成熟の樹状細胞をGM-CSF、LPSとともに培養し、MACSによりCD86陽性の成熟樹状細胞を精製した。野生型とSIRPα変異マウスからのCD86陽性BM-DCの殆どは、CCL19のケモカイン受容体であるCCR7を発現していたが、CCL19非存在下では、野生型・SIRPαマウスのCD86陽性BM-DCの走化性に差は認められなかった。一方、CCL19刺激時は、野生型と比較してSIRPα変異マウスのCD86陽性BM-DCの走化性は抑制されており、樹状細胞においてSIRPαの細胞内領域の欠失は、CCL19による樹状細胞遊走の抑制に繋がることが示唆される。さらに、野生型およびSIRPα変異マウス由来のCD86陽性CCR7陽性成熟BM-DCにおける、CCL19により誘導されるMBSのリン酸化を調べた。CCL19は、野生型マウスからのBM-DCにおけるMBSのリン酸化を増強させたが、SIRPα変異マウスからのBM-DCでは認められず、Rho/Rho kinaseの活性化が、SIRPαの細胞内ドメインの欠損により抑制されていることが示唆される。

本研究は樹状細胞の遊走におけるRho/Rho kinase活性とSIRPαの関連を研究したものであるが、これまで知られていなかったSIRPαを介した樹状細胞の遊走におけるRho kinase経路の役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。