

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成29年 4月28日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学
職 名 大学院医学系研究科皮膚科学 講師
研究代表者 茂木 精一郎

下記のとおり平成28年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 14014)

1. 共同研究課題名	皮膚における Rab27 及びそのエフェクター分子の役割の解明			
2. 共同研究目的	皮膚細胞や皮膚疾患モデルにおける Rab27 エフェクター分子の役割を解明する。			
3. 共同研究期間	平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 茂木 精一郎	医学系研究科皮膚科学	講師	主任研究者	
(分担研究者)				
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	遺伝生化学	氏 名	泉 哲郎

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

メラノサイトにおけるメラニン輸送において Rab27a が必須であることはよく知られており、また、近年、皮膚表皮細胞に Rab27 エフェクター分子 Exophilin 5 が発現し、その遺伝子異常が皮膚表皮の脆弱性を誘導することが報告された。一方で、皮膚免疫細胞(樹状細胞やランゲルハンス細胞など)やケラチノサイトなど、メラノサイト以外の皮膚細胞における Exophilin5 以外の Rab27 関連分子の役割は、まだ不明な点が多い。本研究では、各分子の遺伝子欠損マウスや各分子のノックダウン・過剰発現の系を用いて、上記皮膚細胞や皮膚疾患モデルにおける Rab27 及びそのエフェクター分子の役割を解明する。本共同研究において、これまでに、各免疫細胞や皮膚表皮細胞における各分子の発現パターンを確認し、更に、いくつかの分子の遺伝子欠損マウスにおける接触性皮膚炎モデルの表現型を確認した。本年度は、昨年度からの実験を継続し、これまでに得られた結果の再現性を確認し、更に、皮膚における Rab27 関連分子の役割をより詳細に明らかにする為に、下記の検討を行う計画を立てた。

1) マウスを用いた実験: 各分子遺伝子欠損マウスを用いて、皮膚疾患モデル(Th1型免疫応答により誘導される接触性皮膚炎モデルや創傷治癒モデル)における表現型を、野生型マウスと比較検討する。更に、骨髄キメラマウス(血球細胞の置換の為)や細胞移入の系を用いて、その表現型の責任細胞の同定を行う。

2) 皮膚細胞や免疫細胞を用いた検討: これまでに、表皮細胞全体や、脾臓から単離した免疫細胞における Rab27 関連分子の発現は検討済みである。本年度も、野生型マウス、又は各分子欠損マウスからケラチノサイトや各種免疫細胞を単離・精製後、各種細胞機能の比較検討を行い、また、電子顕微鏡を用いて細胞構造の差異を評価する。免疫染色により、各分子の細胞内局在を同定する。同様の検討を、各分子のノックダウン・過剰発現の系を用いても行う。

7. 共同研究の成果

本年度は、11種類ある Rab27 エフェクター分子のうち、ハプテンである DNFB 塗布により惹起される Th1 優位の接触性皮膚炎モデルで、その欠損が再現的に皮膚炎を減弱させることを確認済みの1分子にまず焦点を当て、その分子の欠損マウスにおける接触性皮膚炎減弱の機序の解明を試みた。これまでの検討で、この分子は、皮膚表皮細胞には発現を認めない一方で、肥満細胞には強く発現することを確認している。そこで、当該分子欠損マウスにおける DNFB 誘発接触性皮膚炎の減弱の責任細胞が、血球系細胞か非血球系細胞かを明らかにする為に、骨髄キメラマウスを作製し、DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルの表現型の比較検討を行った。その結果、骨髄細胞がこの分子の遺伝子欠損マウス由来のマウスでは、DNFB 塗布により誘導される DNFB 特異的 Th1 応答(DNFB 塗布 5 日後に、所属リンパ節を取り出し、抗原で再刺激した際の IFN- γ の産生量で評価)が強く抑制され、更に、接触性皮膚炎反応も減弱する傾向を認めた。そして、同様の骨髄キメラマウスを用いて、Th2 応答により誘導される疾患の代表例である喘息モデルの表現型を比較検討したところ、Th1 型応答である接触性皮膚炎モデルと同様に、当該 Rab27 関連分子の欠損マウス由来の骨髄細胞を移入されたマウスで、喘息様気道炎症の減弱を認めた。前述のように、この分子が、血球系細胞では肥満細胞に強く発現することを確認済みであった。肥満細胞は、刺激に応じて、速やかに、多種多様な生理活性物質を分泌することが知られている。そして、最近、肥満細胞から分泌される IL-2 が、制御性 T 細胞の増殖ならびに活性化を誘導し、その結果、免疫応答を抑制すること、すなわち、肥満細胞が、IL-2 分泌を介した強力な免疫抑制作用を有することが報告された。以上を踏まえると、当該分子欠損マウスでも、肥満細胞からの IL-2 分泌が亢進した結果、免疫応答が抑制されている可能性が考えられた為、野生型マウス、及びこの分子の遺伝子欠損マウスから骨髄細胞を取り出し、IL-3 の存在下で培養して誘導した肥満細胞を FACS sorting で単離・精製し、その IL-2 分泌能の比較検討を行った。その結果、当該分子欠損マウス由来の骨髄細胞から誘導された肥満細胞では、野生型マウス骨髄由来肥満細胞と比較して、IL-2 分泌能が亢進していることを確認した。以上、本年度には、Rab27 エフェクター分子のうち一つの分子に関して、血球系細胞におけるこの分子の欠損により、Th1、Th2 いずれの免疫応答も抑制されるという結果を得た。更に、その免疫応答抑制の機序として、肥満細胞からの IL-2 分泌亢進に伴う制御性 T 細胞活性化の可能性を示唆する結果を得た。なお、前述の結果の一部は、まだ統計学的有意差を認めていないものもあり、再現性の確認の意味も含めて、同様の検討を来年度以降も継続して行っていく予定である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

特になし。