



Title	Defective Chemokine-Directed Lymphocyte Migration and Development in the Absence of Rho Guanosine Diphosphate-Dissociation Inhibitors α and β
Author(s)	石崎, 宏好
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49005
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いし ざき ひろ よし 石 崎 宏 好
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 6 5 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 1 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Defective Chemokine-Directed Lymphocyte Migration and Development in the Absence of Rho Guanosine Diphosphate-Dissociation Inhibitors α and β (Rho GDP 解離抑制蛋白質 α/β の二重欠損によるリンパ球のケモカイン 誘導性遊走能および発生の異常)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高井 義美 (副査) 教 授 平野 俊夫 教 授 宮坂 昌之

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

Rho GDI は、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーの活性制御蛋白質であり、GDP の解離を抑制することにより Rho 活性化を抑制する。Rho GDI には、 α 、 β 、 γ 3 種類のアイソフォームが存在する。Rho GDI α は全臓器で発現し、Rho GDI β は血球系組織で特異的に発現し、Rho GDI γ は脳、脾臓で発現するがその GDI 活性は α 、 β の 1/10 以下である。それぞれの単独欠損マウスは顕著な血球系組織の表現型を示さない。私どもは血球系組織で同時に発現する Rho GDI α が β の機能を代償しているために顕著な表現型が現れない可能性を想定し、血球系組織における Rho GDI 蛋白質の生理的機能を明らかにする目的で α および β の二重欠損マウスを作製し、血球系組織に焦点をしばって解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

I. Rho GDI α/β 二重欠損マウスの作製および特徴

Rho GDI α または β 遺伝子のエキソン 1 を含む領域を ES 細胞内で相同組み換えによりネオマイシン耐性遺伝子で置換し、マウス Blastocyst へ注入することによりキメラマウスを作製し、その子孫より単独欠損マウスを得た。Alpha 単独欠損マウスは精子形成異常を示すが、 β 単独欠損マウスでは生殖異常が見られない。そこで最初に β ホモ α ヘテロマウスを交配により作製し、さらに β ホモ α ヘテロマウス同士の交配により二重欠損マウスの作製を試みた。しかし、自然交配では二重欠損マウスは得られなかった。そこで β ホモ α ヘテロ同士の体外受精により得られた受精卵を野生型マウスの子宮内へ移植し、その結果初めて 6.5%程度の割合で二重欠損マウスが得られた。Rho GDI α/β 二重欠損マウスは SPF (Specific Pathogen Free) 環境下で 12 ケ月まで生存可能であり、加齢と共に眼瞼の炎症や脱腸が観察された。 α 単独欠損マウスは加齢に伴い精細管の変性による不妊傾向を示すが、二重欠損マウスでは若齢より完全に不妊であることから、精巣においても α と β が協調的に機能していることが明らかとなった。

II. B 細胞集団の解析

Rho GDI α/β 二重欠損マウスの脾臓細胞を FACS 解析し、脾臓の免疫組織染色を行った結果、marginal zone B-cell (MZB) 数の顕著な減少が観察された。Alpha/beta 二重欠損マウスの加齢と共に脾臓全 B 細胞数は減少し、腸間膜リンパ節 B 細胞は増加を示した。骨髄での未分化 B 細胞の細胞集団の割合は、若齢マウスで顕著な変化はみられなかった。従って、B 細胞への初期の分化過程には異常がないことが推定された。

III. T 細胞集団の解析

Rho GDI α/β 二重欠損マウスの胸腺細胞を FACS 解析し、胸腺の免疫組織染色を行った結果、胸腺内成熟 T 細胞数の増加、胸腺髄質内に分化した T 細胞の蓄積、末梢 T 細胞数の顕著な減少が観察された。また、末梢 T 細胞の CD3、CCR7 発現強度の低下、ナイーブ T 細胞の顕著な減少に伴い、メモリー様 T 細胞の割合が増加していた。

IV. リンパ球の機能解析

Rho GDI α/β 二重欠損マウスの B 細胞および T 細胞の増殖能をそれぞれ LPS および CD3+CD28 刺激に対する BrdU の取り込み亢進によって検討した。B 細胞では刺激に対する応答性が亢進していたのに対し、T 細胞では顕著な低下を示した。さらに T 細胞では CD3 の発現強度の低下が認められた。トランスウェル法を用いて数々のケモカインに対する応答性を検討し、末梢 T 細胞では CXCL12、CCL21、CCL19 に対する顕著な応答性の低下、末梢 B 細胞では CXCL12 に対する応答性亢進が観察された。

V. 好酸球の解析

Rho GDI α/β 二重欠損マウスの骨髄細胞の FACS 解析および組織染色により、骨髄好酸球数の増加が観察された。ELISA 解析により血清中 IL-5 の濃度が顕著に上昇しており、これが直接的な好酸球増加の原因であることが想定された。

VI. 生化学的解析

Rho GDI α/β 二重欠損マウスの脾臓、胸腺、骨髄細胞を分離し、Pull-Down Assay および Western Blot 解析により、Rho、Rac、Cdc42、GTP 結合型分子の割合と総蛋白質量をリンパ系臓器別に検討した。その結果、血球系組織およびリンパ球の Rho ファミリー総蛋白質量はそれぞれ臓器特異的に加齢に伴い顕著な低下を示すが、活性型 GTP 結合型 Rho 蛋白質の割合は逆に増加傾向を示した。定量的 RT-PCR 解析により mRNA 量に変化は見られなかったことから、Rho GDI が直接 Rho ファミリー蛋白質の安定性および活性化調節し、Rho GDI α/β 二重欠損マウスは残存 Rho ファミリー蛋白質を最大限に活性化して生存することが示唆された。

〔 総 括 〕

Rho GDI α/β 二重欠損マウスの解析より、血球系細胞において Rho GDI α および β 蛋白質が Rho 蛋白質の活性サイクルを協調的に制御し、リンパ球の分化と遊走能を調節することが明らかとなった。Rho GDI 蛋白質はすべての Rho 蛋白質に対して GDI 活性を示すことから、血球系組織における個々の Rho、Rac、Cdc42 蛋白質の果たす役割については今後の研究課題である。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーの活性抑制蛋白質である Rho GDP-dissociation inhibitor (GDI) の血球系細胞における生理的機能を明らかにする目的で Rho GDI α/β 二重欠損マウスを作製し解析を行った。その結果、Rho GDI 二重欠損マウスでは末梢 T 細胞の減少、成熟 T 細胞の胸腺髄質内での蓄積、リンパ球の抗原刺激およびケモカインに対する応答性の異常、marginal zone-B 細胞集団の消失、骨髄内の好酸球異常増加が観察された。

生化学的な解析により総 Rho 蛋白質量が顕著な低下を示したが、活性型 Rho 蛋白質量は高い状態を維持していた。以上の結果より Rho GDI α および β 蛋白質が Rho 蛋白質の活性サイクルを協調的に制御し、リンパ球の分化、遊走、機能調節を行っていることが明らかとなった。

本研究は、Rho GDI 蛋白質が免疫不全症、好酸球増多症の原因遺伝子の一つである可能性を示唆するものであり、重要な意義を持つものと考えられ学位授与に値するものと認める。