



Title	Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation
Author(s)	小林, 大地
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69262
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 小林 大地		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 竹田 潔
	副 査	大阪大学教授 石井 優
	副 査	大阪大学教授 長澤 近司

論文審査の結果の要旨

CCR7 はケモカインリガンドと選択的に結合する受容体であり、リンパ球や樹状細胞の二次リンパ組織への移行を媒介する。CCR7 はホモ二量体や別のケモカイン受容体 CXCR4 とのヘテロ二量体を形成することから、二量体形成により CCR7 依存的細胞遊走が調節される可能性が示唆される。この可能性を詳細に検討するため、申請者は生細胞内で分子二量体形成を誘導できる技術を用いて、CCR7 ホモ二量体形成および CCR7/CXCR4 ヘテロ二量体形成が CCR7 リガンド依存的細胞遊走に与える影響を解析した。その結果、CCR7 ホモ二量体形成誘導により、T 細胞における CCR7 リガンド結合レベルおよび CCR7 依存的細胞遊走が亢進した。一方、CCR7/CXCR4 ヘテロ二量体形成誘導では、リガンド結合レベルおよび細胞遊走に影響は見られなかった。次に CCR7 由来ペプチドを用いたホモ二量体形成抑制実験により、CCR7 リガンド結合レベル、シグナル分子の活性化および細胞遊走が抑制されることを見出した。以上より、CCR7 ホモ二量体形成により CCR7 依存的細胞遊走が調節されることが明らかになった。

上記内容は、博士（医学）の学位授与に値する。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	小林 大地
論文題名 Title	Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation (CCR7 ホモ二量体形成による CCR7 依存的細胞遊走制御)
〔目 的(Purpose)〕 G タンパク質共役型受容体の一つであるケモカイン受容体 CCR7 は、リンパ球や樹状細胞などの免疫細胞に発現し、リガンドケモカインと結合することで細胞内にシグナルを伝達し、免疫細胞の二次リンパ組織への移行を媒介する。これまでの研究から、ケモカイン受容体は定常的あるいはリガンド依存的に分子二量体を形成することが報告されており、同一分子間（ホモ）あるいは異種分子間（ヘテロ）二量体形成が受容体活性調節に関与することが示唆されている。一方 CCR7 については、リンパ球のリガンド依存的細胞遊走能の亢進に伴い、CCR7 ホモ二量体形成あるいは別のケモカイン受容体である CXCR4 とのヘテロ二量体形成レベルの上昇が見出されているものの、CCR7 の二量体形成によってリガンド依存的細胞遊走が調節されるか否かは不明であった。そこで、私は CCR7 依存的細胞遊走における CCR7 ホモ二量体形成および CCR7/CXCR4 ヘテロ二量体形成の寄与を明らかにすることを本研究の目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 私はCCR7 ホモ二量体形成および CCR7/CXCR4 ヘテロ二量体形成誘導により CCR7 依存的細胞遊走が促進するか否かを検討するため、生細胞内で分子二量体形成を任意のタイミングで誘導できる技術（iDimerize）を用いて、CCR7 ホモ二量体形成および CCR7/CXCR4 ヘテロ二量体形成を誘導し、解析をおこなった。その結果、ヒトTリンパ球ではCCR7 ホモ二量体形成を誘導した場合、CCR7 依存的細胞遊走が有意に亢進した。また CCR7 ホモ二量体形成誘導に伴い、CCR7 リガンド結合レベルの有意な上昇がみられた。一方、CCR7/CXCR4 ヘテロ二量体形成誘導では、CCR7 依存的細胞遊走、CCR7 リガンド結合のいずれにおいても変化はみられなかった。また、CCR7 ホモ二量体形成誘導の効果は Gai 阻害剤（百日毒: PTX）、SHP2 阻害剤（PHPSI）、SHP1/2 阻害剤（NSC87877）のいずれかで阻害された。このことから、CCR7 ホモ二量体形成は Gai および SHP2 を介して CCR7 依存的細胞遊走を制御することが示唆された。 次に、CCR7 ホモ二量体形成の阻害により CCR7 依存的細胞遊走が抑制されるか否かを検討した。これまでに CXCR4 では、第四膜貫通領域に位置するアミノ酸配列由来の合成ペプチド（CXCR4 TM4 ペプチド）がホモ二量体形成およびリガンド依存的細胞遊走を阻害することが報告されている。私の解析から、この領域は CCR7 の第四膜貫通領域と高い相同性示すことが明らかになった。そこで、CXCR4 TM4 ペプチドに相当する CCR7 TM4 ペプチドを合成し、阻害実験をおこなった。CCR7 ホモ二量体形成を検出する Split gaussia luciferase assay および Proximity ligation assay（PLA）を用いて CCR7 TM4 ペプチドの効果を解析したところ、CCR7 TM4 ペプチド存在下で CCR7 ホモ二量体形成が有意に抑制された。次にCCR7 TM4 ペプチド存在下で CCR7 依存的細胞遊走を解析したところ、T 細胞株、ヒト初代培養 T 細胞およびヒト乳癌細胞株 MDA-MB231 のいずれにおいても細胞遊走が有意に抑制された。またCCR7 リガンド誘導性細胞内シグナル伝達の指標である Akt および Erk のリン酸化、および CCR7 の細胞内取り込みを解析したところ、いずれにおいても CCR7 TM4 ペプチド存在下で有意に抑制された。CCR7 TM4 ペプチド存在下では、T 細胞株における CCR7 リガンド結合レベルの低下がみられたことから、CCR7 ホモ二量体形成阻害によりリガンド結合が低下し、CCR7 依存的シグナルおよび細胞遊走が阻害された可能性が示唆された。 〔総 括(Conclusion)〕 本研究により、CCR7 ホモ二量体形成が CCR7 リガンド結合レベル、CCR7 の下流シグナル分子の活性化、および CCR7 依存的細胞遊走を調節することが明らかになった。また CCR7 TM4 ペプチドを用いた阻害実験から、CCR7 ホモ二量体形成に CCR7 TM4 領域が関与することが明らかになった。リンパ球だけでなく癌細胞においても CCR7 ホモ二量体形成と細胞遊走が相関することから、リンパ組織へのCCR7依存的樹状細胞移動にもCCR7 ホモ二量体形成が関与する可能性がある。今後 CCR7 ホモ二量体が形成される生体内微小環境の解析やホモ二量体誘導活性をもつ組織由来分子の同定がすすむことで、生体内における CCR7 ホモ二量体形成の重要性が明らかになると考えられる。	