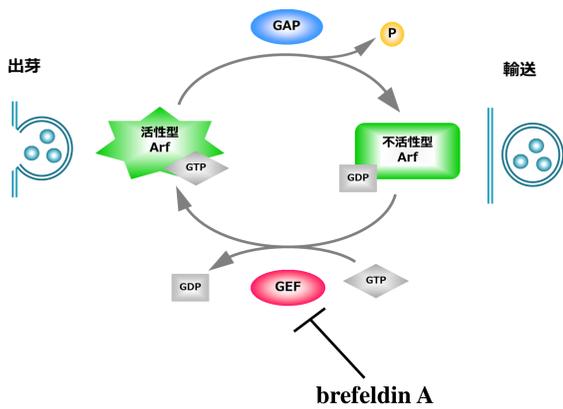


高次生命現象における 小胞輸送制御因子Arf1・Arf6の協働

所属 附属生命医学研究所・生体情報部門

参加者氏名 住吉麻実、松田達志

ADP-ribosylation factor (Arf) とは

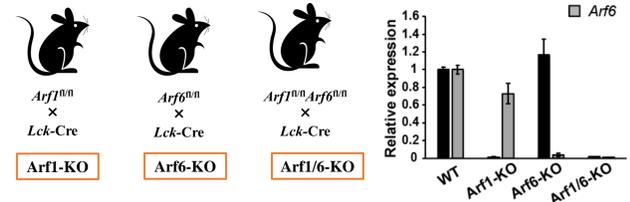


- 小胞輸送を制御する低分子量Gタンパク質である。
- Arf1-6のアイソフォームが存在する。(ヒトはArf2がない)
- brefeldin A (Arf経路の阻害剤)は活性化T細胞のサイトカイン分泌を阻害する。

目的

CD4⁺ T細胞に着目し、免疫系におけるArf経路の生理的な機能を明らかにする。

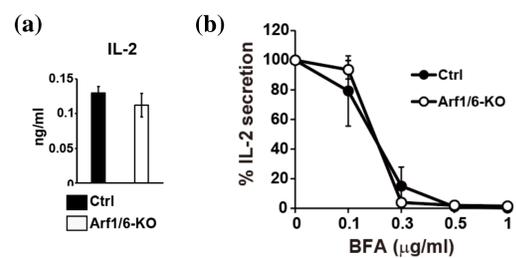
方法



野生型マウス(WT)、Arf1-KOマウス、Arf6-KOマウス、ならびにArf1/6-KOマウス脾臓由来CD4⁺ T細胞を対象に、Arf1またはArf6の発現レベルをqPCRによって定量した。WTマウス由来の細胞におけるCyclophilin Aに対するArf1またはArf6の発現を1とした時の、各マウス由来細胞における相対的な発現レベルを示す。

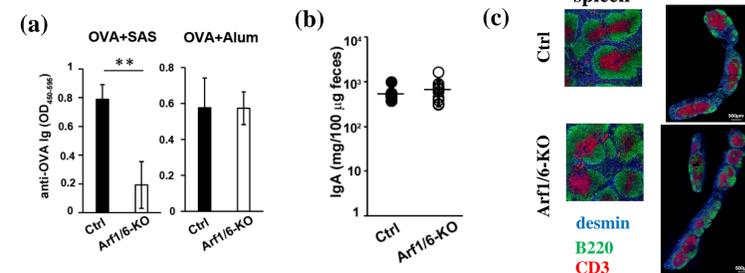
結果

1 Arf1/6-KO CD4⁺ T細胞におけるサイトカイン分泌能は正常である



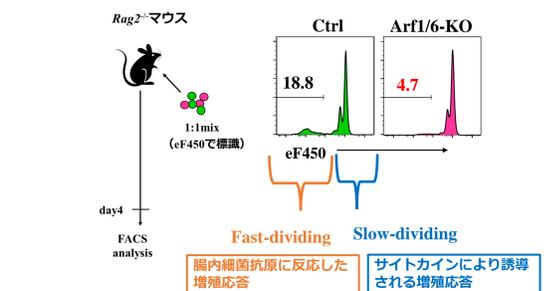
(a) ControlならびにArf1/6-KOマウス由来naïve CD4⁺ T細胞を抗CD3ε/CD28抗体によって刺激した後、24時間後の培養上清中のIL-2量を評価した。(b) 各濃度のbrefeldin A (BFA)存在下で(a)と同様の実験を行った。BFA非存在下で分泌されたIL-2量を100%として示した。

2 Arf1/6-KOマウスでは、Th2条件における抗体産生応答が維持されている



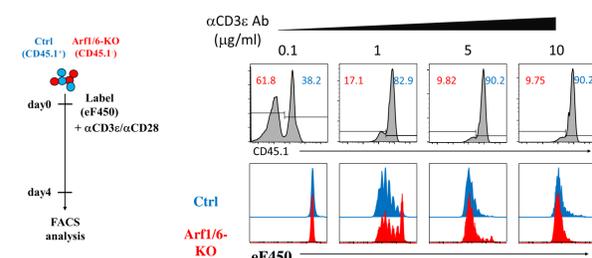
(a) ControlマウスとArf1/6-KOマウスにSASもしくはAlumをアジュバントとしてOVAを免疫した後、血清中のIg量を測定した。(b) ControlマウスとArf1/6-KOマウスの糞便中におけるIgAの量を測定した。(c) 定常状態におけるcontrol・Arf1/6-KOマウス由来の各組織の切片を作製し、T細胞の局在を調べた。

3 Arf1/6-KO CD4⁺ T細胞は腸内細菌に対する応答が減弱している



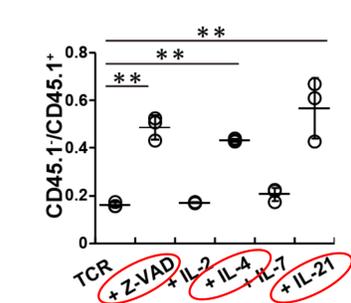
Control (CD45.1⁺)・Arf1/6-KO (CD45.1⁻)マウス由来CD4⁺ T細胞を1:1で混合し、eF450でラベルした後に1×10⁶ cellsずつRag2KOマウスへ移入した。4日後に各細胞の増殖能を評価した。

4 Arf1とArf6を両方欠損すると、TCR刺激時の細胞生存能が低下する



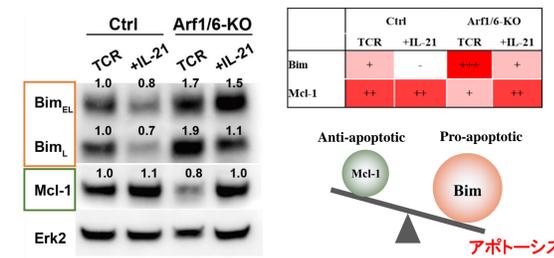
Control (CD45.1⁺)・Arf1/6-KO (CD45.1⁻)マウス由来CD4⁺ T細胞を1:1で混合し、CTVでラベルした後に様々な濃度の抗CD3ε抗体で刺激した。4日後に両者の比率と増殖能を評価した。

5 Arf1/6の欠損に伴うアポトーシスはIL-4やIL-21によって抑制される



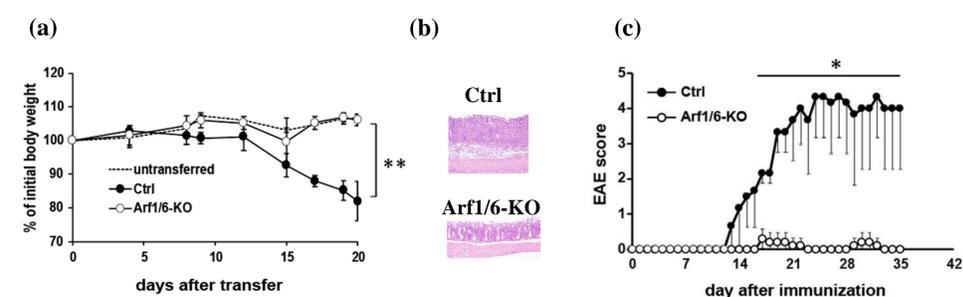
Control (CD45.1⁺)・Arf1/6-KO (CD45.1⁻)マウス由来CD4⁺ T細胞を1:1で混合し、抗CD3ε/CD28抗体によって単独刺激 (TCR)、もしくはグラブ横軸に示す各試薬存在下で刺激した。4日後に両者の比率を評価した。

6 Arf1/6の欠損によりBcl-2ファミリーの発現バランスが崩れる



ControlならびにArf1/6-KOマウス由来naïve CD4⁺ T細胞をIL-21存在下・非存在下に抗CD3ε/CD28抗体によって刺激し (TCR)、96時間後のBimとMcl-1の発現を調べた。

7 Arf1とArf6を欠損すると自己免疫疾患の発症が抑制される

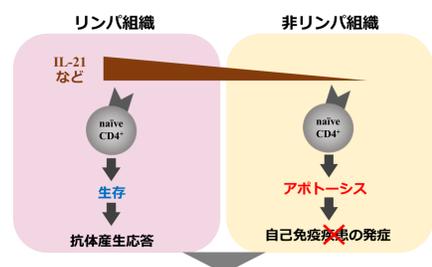


(a) Rag2KOマウスに2×10⁶ cellsずつnaïve CD4⁺ T細胞を移入して大腸炎を誘導した。マウス体重の経時変化を示す。(b) 細胞を移入して3週間後の大腸の組織像。(c) Control・Arf1/6-KOマウスにMOGペプチド/CFAと百日咳毒素を投与してEAEを誘導し、経時的に病態を評価した。

結論と考察

- Arf1/6を欠損してもサイトカインの分泌は阻害されない。
- Arf1/6-KOマウスの抗体産生応答は正常である。
- Arf1/6-KO CD4⁺ T細胞ではTCR刺激に伴うアポトーシスが亢進している。
- Arf1/6-KOマウスでは自己免疫疾患の発症が抑制される。

なぜ抗体産生応答が誘導されるのか？



日和見感染等の副作用が少ない自己免疫疾患の治療法へ応用

謝辞

新潟大学・片貝智哉教授、小澤まどか特任助手 (脾臓・MLNs・PPの組織切片の作製と解析)
 埼玉医科大学・山田健人教授 (大腸組織切片の作製)
 群馬大学・鈴江一友講師 (EAEの解析)
 関西医科大学・小谷唯研究員 (奈良女子大学D1) (IgA抗体価の測定)