



## Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8<sup>+</sup> T cells via dopamine receptor D3

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 賀子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/336">http://hdl.handle.net/10271/336</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 479号	学位授与年月日	平成19年 3月14日
氏名	渡邊 賀子		
論文題目	Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8 <sup>+</sup> T cells via dopamine receptor D3 (ドーパミンはドーパミンレセプターD3 を介してナイーブ CD8 陽性 T 細胞の遊走とホーミングを選択的に誘導する)		

博士(医学) 渡邊 賀子

## 論文題目

Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8<sup>+</sup> T cells via dopamine receptor D3

(ドーパミンはドーパミンレセプターD3を介してナイーブCD8陽性T細胞の遊走とホーミングを選択的に誘導する)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

ドーパミンは中枢神経系における主要な神経伝達物質である。ドーパミンは7回膜貫通型のGタンパク共役型レセプターを介して生理機能を誘導することが知られており、これまでに5つのドーパミンレセプター(D1~D5)が同定されている。近年、免疫担当細胞が神経伝達物質の受容体を発現すること、また、神経系はこれらの神経伝達物質を介して免疫機能を修飾することが明らかとなってきた。神経系と免疫系を結ぶネットワークは、生体全体としての恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられている。ドーパミンを産生する交感神経が二次リンパ組織にはりめぐらされていること、またリンパ球自身がドーパミンを産生可能であることが知られている。さらにドーパミンレセプターがリンパ球において発現しうることが報告されたが、その詳細な発現や機能については不明である。そこで、ドーパミンレセプターのリンパ球における詳細な発現および免疫系における役割について検討した。

[材料ならびに方法]

1. ヒト各種組織(脳、骨格筋、肺、肝、腎、骨髄、扁桃、胸腺、脾、リンパ節、小腸、大腸)およびヒトとマウスのリンパ球サブセット(CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、B細胞、単球)におけるドーパミンレセプターのmRNA発現をRT-PCRにより検討した。
2. ヒトリンパ球サブセット(CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞)におけるドーパミンレセプターD3(D3)のタンパク発現を免疫組織染色により検討した。
3. マウスL1.2細胞株(pre-B cell)を用いてD3の安定発現細胞を作製し、ドーパミンによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇反応と遊走反応を検討した。
4. ドーパミンによるヒトおよびマウスのナイーブCD8陽性T細胞での遊走反応を検討した。
5. ドーパミンによるヒトナイーブCD8陽性T細胞におけるインテグリンの活性化能を検討した。
6. D3特異的阻害剤を腹腔内に投与したマウス(C57/BL6)に、蛍光標識したT細胞を静注しその動態を調べることで、リンパ節へのホーミングに与える影響を検討した。

[結果]

1. D3が組織においてはヒトのリンパ組織で強く発現していること、リンパ球サブセットにおいてはヒトおよびマウスのCD8陽性T細胞で選択的に発現していることが明らかとなった。
2. D3がナイーブCD8陽性T細胞においてタンパクレベルで発現することが確認された。
3. D3安定発現細胞において、ドーパミンは細胞内カルシウムイオン濃度上昇反応および遊走反応を誘導し、これらの反応はD3阻害剤により特異的に抑制されることが示された。また、チェッカーボード解析でこの遊走反応は一方方向性を持ったケモタキシスであることが示された。

4. ヒトおよびマウスのナイーブCD8陽性T細胞でもドーパミンによる遊走反応が認められ、これらの反応もD3阻害剤により特異的に抑制された。さらにナイーブCD8陽性T細胞の主要な遊走因子であるケモカインCCL19、CCL21、CXCL12との共存下においてドーパミンは相乗的な遊走反応を誘導することが示された。
5. ドーパミンは、ナイーブCD8陽性T細胞のインテグリンVLA-4とVLA-5を介したファイブロネクチンへの接着反応、および、インテグリンLFA-1を介したICAM-1への接着反応をD3依存的に誘導した。
6. D3特異的阻害剤を腹腔内に投与したマウスにおいて、蛍光標識したナイーブCD8陽性T細胞のリンパ節中での数の減少が特異的に認められた。

#### [考察および結論]

二次リンパ組織へのナイーブCD8陽性T細胞のホーミングはケモカインCCL19、CCL21、CXCL12によって調節されていることが知られている。これらのケモカインはナイーブCD8陽性T細胞に発現するCCR7、CXCR4を介してインテグリンの活性化、およびリンパ節内への遊走を誘導する。今回の結果から、D3がナイーブCD8陽性T細胞に選択的に発現しており、ドーパミンはD3を介してインテグリンの活性化、および細胞遊走を誘導することが明らかとなった。さらにマウスへのT細胞の移入実験において、D3特異的阻害剤がナイーブCD8陽性T細胞のリンパ節内での数を選択的に減少することから、ホーミングを部分的に阻害することが明らかとなった。また、これらのケモカインとの共存下においてドーパミンが相乗的な遊走反応を誘導することから、ドーパミンはケモカインと協調して二次リンパ組織へのナイーブCD8陽性T細胞のホーミングに関与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ドーパミンは中枢神経系における主要な神経伝達物質である。ドーパミンを産生する交感神経が二次リンパ組織にはりめぐらされていること、またリンパ球自身がドーパミンを産生可能であることが知られている。さらにドーパミンレセプターがリンパ球において発現しうることが報告されたが、その詳細な発現や機能については不明である。そこで、ドーパミンレセプターのリンパ球における詳細な発現および免疫系における役割について検討した。

以下の方法を用いた。

1. ヒト各種組織(脳、骨格筋、肺、肝、腎、骨髄、扁桃、胸腺、脾、リンパ節、小腸、大腸)およびヒトとマウスのリンパ球サブセット(CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、B細胞、単球)におけるドーパミンレセプターのmRNA発現をRT-PCRにより検討した。
2. ヒトリンパ球サブセット(CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞)におけるドーパミンレセプターD3(D3)のタンパク発現を免疫組織染色により検討した。
3. マウスL1.2細胞株(pre-B cell)を用いてD3の安定発現細胞を作製し、ドーパミンによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇反応と遊走反応を検討した。
4. ドーパミンによるヒトおよびマウスのナイーブCD8陽性T細胞での遊走反応を検討した。
5. ドーパミンによるヒトナイーブCD8陽性T細胞におけるインテグリンの活性化能を検討した。
6. D3特異的阻害剤を腹腔内に投与したマウス(C57/BL6)に、蛍光標識したT細胞を静注しその動態を

調べることで、リンパ節へのホーミングに与える影響を検討した。

結果として明らかになったことは、

1. D3が組織においてはヒトのリンパ組織で強く発現していること、リンパ球サブセットにおいてはヒトおよびマウスのCD8陽性T細胞で選択的に発現していることが明らかとなった。
2. D3がナイーブCD8陽性T細胞においてタンパクレベルで発現することが確認された。
3. D3安定発現細胞において、ドーパミンは細胞内カルシウムイオン濃度上昇反応および遊走反応を誘導し、これらの反応はD3阻害剤により特異的に抑制されることが示された。また、チェッカーボード解析でこの遊走反応は一方向性を持ったケモタキシスであることが示された。
4. ヒトおよびマウスのナイーブCD8陽性T細胞でもドーパミンによる遊走反応が認められ、これらの反応もD3阻害剤により特異的に抑制された。さらにナイーブCD8陽性T細胞の主要な遊走因子であるケモカインCCL19、CCL21、CXCL12との共存下においてドーパミンは相乗的な遊走反応を誘導することが示された。
5. ドーパミンは、ナイーブCD8陽性T細胞のインテグリンVLA-4とVLA-5を介したファイブロネクチンの接着反応、および、インテグリンLFA-1を介したICAM-1への接着反応をD3依存的に誘導した。
6. D3特異的阻害剤を腹腔内に投与したマウスにおいて、蛍光標識したナイーブCD8陽性T細胞のリンパ節中での数の減少が特異的に認められた。

以上の結果から、申請者は、1) ドーパミンはナイーブCD8陽性T細胞のD3を介してインテグリンを活性化し、細胞遊走を誘導する、2) ドーパミンはケモカインと協調して二次リンパ組織へのナイーブCD8陽性T細胞のホーミングに関与する、と結論付けた。本研究は神経伝達物質であるドーパミンが免疫担当細胞であるリンパ球の機能を修飾することを、ヒトおよびマウスの細胞を用い、*in vitro*と*in vivo*による実験により証明し、神経系と免疫系の相互関連を明らかにした点を審査委員会は高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ドーパミンD1様レセプターとD2様レセプターの差について
- 2) ヒト各組織のcDNAの入手について
- 3) D1-D5レセプター遺伝子のPCRプライマーのデザインについて
- 4) 骨髄でD3が発現せず、扁桃で高発現する意味について
- 5) ナイーブCD8陽性T細胞の刺激法について
- 6) ナイーブCD8陽性T細胞の末梢血中の割合について
- 7) 遊走能実験における対照群との差について
- 8) マウスL1.2細胞株(pre-B cell)を使用した理由について
- 9) CD44<sup>low</sup>とCD44<sup>high</sup>の分類方法について
- 10) マウスの系による差について
- 11) CD8陽性T細胞の遊走能を高める因子の軽重について
- 12) 細胞骨格の変化について
- 13) ヒトの血液採取の時間帯について

