

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08746

研究課題名(和文) ストレス応答MAPキナーゼJNKのアレルギー性炎症誘導機構と分子イメージング研究

研究課題名(英文) Mechanism of allergic inflammation induction of MAP kinase JNK

研究代表者

豊田 博子 (Toyota, Hiroko)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：80468660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：核タンパクThy28分子はin vitroにおけるBおよびT細胞の抗原受容体を介する細胞死を制御していることを明らかにしてきた。我々はThy28TGマウスを作製し、Thy28の役割を検討した。抗CD3の投与によって誘導される胸腺細胞死は野生型マウスに比べて抑制されており、この抗CD3誘導性の細胞死の抑制に伴って、JNK活性化やBcl-xLダウンレギュレーションの抑制が観察された。Thy28 TGマウスでは自己ペプチドによって誘導されるEAEに感受性が高く、その原因としてCD4陽性ナイーブT細胞によって誘導されるIFN-g産生の亢進が関わっているものと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

JNK活性化にも関与するThy28がアポトーシス誘導に関わっていることが示唆された。今後さらに実験を重ねThy28機能的役割を明らかにすることによって、アポトーシス誘導機構、さらには癌、自己免疫疾患などの誘導の解明に寄与すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The nucleoprotein Thy28 molecule has been shown to control antigen receptor-mediated cell death of B and T cells in vitro. We made Thy28TG mice and examined the role of Thy28. Thymic cell death induced by administration of anti-CD3 is suppressed compared to wild-type mice, and suppression of JNK activation and Bcl-xL down-regulation is observed along with suppression of this anti-CD3-induced cell death. It was speculated that Thy28 TG mice were highly sensitive to EAE induced by self-peptides, and the cause thereof was the increase in IFN-g production induced by CD4-positive naive T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：ストレス応答MAPキナーゼ&#12441;JNK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プログラム死であるアポトーシスは、正常リンパ球の発達や機能に必要であり、ネクローシス(細胞壊死)と異なり原則的に炎症を惹起しないという性質から、生体内の細胞環境のホメオスタシスを維持する重要なメカニズムである。免疫系の発達、調節にも深く関与しており、特に胸腺における自己反応性T細胞の除去など免疫学的寛容の成立には必須である。このレギュレーションが破綻すると、癌や自己免疫疾患を引き起こす。JNK (c-Jun N-terminal kinases) は、MAPK(Mitogen-activated protein kinases)のメンバーであり、ストレス反応を媒介している。JNK は細胞増殖、細胞死、細胞分化、および炎症・腫瘍形成などに重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、免疫系、精巣などに高度に発現している Thy28 をクローニングし、Thy28 が JNK 活性化を介して胸腺における正・負の選択を調節していることを示した。胸腺細胞の正/負の選択にはアポトーシスが関与していることが明らかとなっていることから、Thy28 分子は胸腺内細胞分化選択において重要な役割を担っている可能性がある。また、その働きが自己免疫疾患の誘導等に関わっているかもしれない。

2. 研究の目的

マウス Thy28 は私たちの講座でクローニングした遺伝子で、さまざまなタイプの細胞に発現している。これまでに、Thy28 は *in vitro* において抗原受容体を介する B 細胞、T 細胞の死をレギュレートしていることを明らかにしてきた。今回、Thy28 トランスジェニック (TG) マウスを作製し、*in vivo* において、リンパ球が抗原刺激を受けたときの Thy28 の役割について検討した。その結果、Thy28TG マウスの胸腺細胞は抗 CD3 抗体誘導性の細胞死に対して部分的な抑制をもつこと、そしてそれはおそらく JNK のシグナリングの減少などが関係していることを明らかにしたので報告する。

3. 研究の方法

フローサイトメトリー：FACSCantoII を使い、定法通り行った。

胸腺細胞死の誘導：Thy28TG マウスおよび WT マウスに抗 CD3 抗体を腹腔内投与して誘導した。2 日後、胸腺細胞を採取し各抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。胸腺細胞数はトリパンブルー染色で調べた。ミトコンドリア膜電位は JC-1 で、アポトーシスの割合は Annexin V-FITC/7-AAD の染色で測定した。

サイトカイン産生の測定：脾臓ナイーブ CD4T 細胞は autoMACS で分離した。得られた T 細胞を抗 CD3/CD28 で 5 日間刺激し、フローサイトメトリーでサイトカイン産生を調べた。

EAE 誘導：Thy28TG マウスおよび WT マウスに MOG ペプチドと結核死菌を不完全フロイントアジュバントとともに免疫し、更に百日咳毒素を尾静脈投与して誘導した。2~3 日毎にクリニカルスコアを判定した。

4. 研究成果

1) Thy28 TG マウスを作製し、臓器ごとのタンパク発現量を調べた。私たちが作製した抗 Thy28 抗体と、導入遺伝子のタグである V5 を認識する抗 V5 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、導入した Thy28 は、特に免疫系臓器に多く発現していることがわかった。

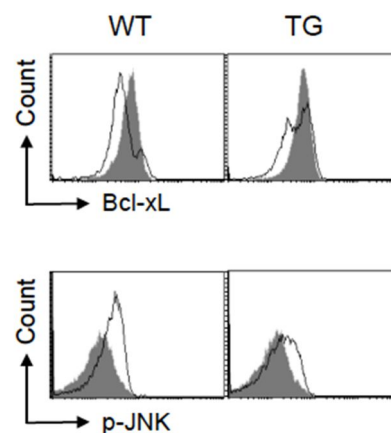
(2) 作製した Thy28 TG マウスの胸腺細胞と骨髄細胞の development を調べたところ、WT マウスと変わらなかった。脾臓細胞、リンパ節細胞についても WT マウスと違いはなかった。

(3) 免疫系臓器において細胞数を調べたところ、WT と比べ、Thy28 TG マウスでは胸腺細胞の数が有意に増加しており、胸腺過形成が認められた。脾臓では若干増加している傾向があるものの有意差はなく、骨髄、リンパ節の細胞数においては、WT と違いがなかった。

(4) 胸腺細胞のアポトーシスに Thy28 が関係しているかを調べるため、抗 CD3 抗体をマウスに投与し、48 時間後に CD4/CD8 DP 細胞のアポトーシスを測定した。DP のポピュレーションを WT マウスと比較したところ、Thy28 TG マウスでは DP 胸腺細胞が約 3~4 倍多く生き残っていた。TG の胸腺は WT と比べて厚みがあって大きい。抗 CD3 抗体投与後は WT の胸腺がかなり小さくなっているのに対し、TG では縮小が抑えられていた。このことから、*in vivo* における DP 胸腺細胞の deletion に、Thy28 が部分的に関与していることが示唆された。

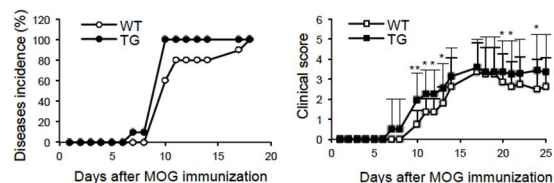
(5) 細胞死が誘導されるとミトコンドリア膜電位の低下が認められるため、マウスに抗 CD3 抗体を投与し、胸腺細胞のミトコンドリア膜電位を測定した。Thy28 TG マウスでは、WT マウスに比べて、ミトコンドリア膜電位の低下が抑制されていた。これにより Thy28 が T 細胞抗原受容体を介する細胞死に対して抑制的に働くことが示唆された。

6) MAPK ファミリーである JNK は、様々なストレスによって活性化されるキナーゼである。JNK の活性化がアポトーシスを誘導することから、抗体刺激時における胸腺細胞の JNK リン酸化の状態を測定した。WT と比べ、Thy28 TG マウスでは抗 CD3 抗体刺激によって誘導される JNK のリン酸化や Bcl-xL ダウンレギュレーションの抑制が観察された。これにより、Thy28 は JNK の活性化を抑制する働きがあることが示唆された。



(7) 細胞死の誘導にはサイトカインも関わっているため、脾臓ナイーブ T 細胞を抗 CD3/CD28 で刺激し、サイトカイン産生量を比較した。Thy28TG マウスでは、WT マウスに比べ、IFN- γ 産生量が有意に増強していた。

(8) 胸腺過形成が自己免疫疾患に関わっているという報告があるため、Thy28 TG マウスに自己ペプチド MOG によって誘導される EAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎) を発症させたとき、発症日、悪性度に違いがあるかを調べた。すると WT より Thy28TG マウスの方が発症が早く、悪性度のピークも早く迎えることがわかった。



(9) EAE 発症には炎症性サイトカインが関与しているため、発症の前期のサイトカイン産生量に違いがあるかを調べた。すると IFN- γ 、TNF- α などの炎症性サイトカイン産生量が、WT より亢進していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Badr MEISG, Hata K, Furuhashi M, Toyota H, Yokosuka T.	4. 巻 25 Oct.
2. 論文標題 The Multifaceted Role of PD-1 in Health and Disease	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Chronic inflammation	6. 最初と最後の頁 441-457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-4-431-56068-5_34	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tadashi Yokosuka, Ei Wakamatsu, Noriko Yanase, Hiroko Toyota, Masae Furuhashi, Kikumi Hata, Hiroaki Machiyama
2. 発表標題 Dynamics of the PI3K signaling pathway induced by a T cell costimulator, ICOS
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yanase Noriko, Machiyama Hiroaki, Toyota Hiroko, Furuhashi Masae, Hata Kikumi, Takehara Tomohiro, Wakamatsu Ei, Yokosuka Tadashi
2. 発表標題 Extrinsic and intrinsic inhibition of T cell response by co-inhibitory receptors, TIGIT and CD96
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakamatsu E, Machiyama H, Toyota H, Furuhashi M, Hata K, Yanase N, Yokosuka T
2. 発表標題 Indirect suppression of CD4+ T cell activation by LAG3-mediated trogocytosis of MHC Class II
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	矢那瀬 紀子 (Yanase Noriko) (10210303)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	秦 喜久美 (Hata Kikumi) (30287156)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	古畑 昌枝 (Furuhata Masae) (90468661)	東京医科大学・医学部・助手 (32645)	