

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21651

研究課題名(和文) 胸腺機能に必要な生体膜リン脂質代謝の解明

研究課題名(英文) Analysis of phospholipid metabolism for thymus function

研究代表者

吉田 智美 (YOSHIDA, TOMOMI)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：30610216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺特異的なLPCAT3遺伝子欠損マウスをIck-Creマウス、CD4-Creマウスの2系統を用いて作製した。LPCAT3-Flox/CD4-Creマウスでは野生型と遺伝子欠損型での胸腺の細胞数やTリンパ球のポピュレーションの違いが観察されなかった。一方、LPCAT3-Flox/Ick-Creマウスでは遺伝子欠損型で細胞数の若干の減少がみられた。Tリンパ球のポピュレーションをFCMで確認するとDP、CD4SP、CD8SPが減少し、ダブルネガティブ(DN)の増加していた。現在、この原因を解明するために詳細な解析を行なっている。

研究成果の概要(英文)：Thymus specific LPCAT3 deleted mouse were generated using Ick-Cre and CD4-Cre mouse. T-cell population were not different between LPCAT3 wild-type mice and LPCAT3 deleted mice in CD4-Cre mouse by flow cytometry. However, a cell number of thymocyte was slightly decreased in LPCAT3 deleted mice having Ick-Cre. The populations of DP cells, CD4SP cells and CD8SP cells were decreased, and DN cells were increased in LPCAT3 deleted mice. Now, the precise mechanism is searched.

研究分野：脂質生物化学

キーワード：リン脂質 胸腺

1. 研究開始当初の背景

リン脂質は生体膜の主要な構成成分であり、エネルギー源やシグナル分子としての働きも持つ。生体内においてリン脂質は 1,000 種類近く存在し、この多様性は代謝酵素であるリゾリン脂質アシル転移酵素により生み出される (Shindou et al. J. Biol. Chem. 2009)。その一つリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 3 (LPCAT3) はさまざまな組織に発現し、特定の脂肪酸 (アラキドン酸) を含むリン脂質の調節に関係している (Hishikawa et al. PNAS 2008, Zhao et al. JBC 2008, Gijon et al. JBC 2008)。

近年遺伝子欠損マウスの解析から、LPCAT3 が小腸における中性脂肪 (トリグリセリド) の吸収に寄与し、血液中のリポタンパク質の濃度や性質に影響を与えることがわかった (Hashidate-Yoshida et al. Elife 2015, Rong et al. Elife 2015, Wang et al. Cell Metabolism 2016, Kabir et al. JBC 2016)。LPCAT3 の全身性遺伝子欠損マウスは、生後一週間以内に全て死亡する新生児致死であった。生後 1 日目のノックアウトマウス小腸において、母乳由来のトリグリセリドの蓄積が観察された。同時に血漿中トリグリセリドの濃度低下が検出され、電子顕微鏡観察により小腸上皮細胞の構造が壊れている事も明らかになった。また血糖値の低下も見られた事から、新生児致死の主な原因は小腸機能不全による栄養吸収障害と考えられる。さらに、数種類のリン脂質を使った *in vitro* のトリグリセリド輸送タンパク質 (MTP) 活性測定から、LPCAT3 が調節しているアラキドン酸含有リン脂質が効率的なトリグリセリド輸送に重要であること

がわかった。

2. 研究の目的

本研究では、リン脂質合成酵素であるリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 3 (LPCAT3) の胸腺における役割について、条件的遺伝子欠損マウスを用いて明らかにする。

最近申請者らは、全身性 LPCAT3 遺伝子欠損マウスの生後 1 日目の胸腺において多くの細胞が死んでおり、誘導全身性遺伝子欠損マウスにおいても胸腺の萎縮がみられ死細胞が増加していることを見つけた。これらの結果から本酵素が胸腺細胞の分化・成熟・維持に関わっている可能性が示唆された。本研究により、リン脂質による新たな胸腺の調節機構を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

全身性 LPCAT3 遺伝子欠損マウスが新生児致死であるため、誘導性遺伝子欠損マウスを作製した。LPCAT3-Flox マウスと Rosa26-CreERT² マウスの掛け合わせを行い、生まれた 5 - 6 週齢の LPCAT3^{+/+}, Rosa26-Cre⁺ と LPCAT3^{flox/flox}, Rosa26-Cre⁺ にタモキシフェンを投与し誘導性遺伝子欠損マウスを作製した。その後マウスから胸腺を回収し、組織染色や細胞数測定、フローサイトメーターを使った T 細胞割合解析を行った。

LPCAT3 は多くの組織に発現しているおり胸腺での機能をより明らかにするため、LPCAT3-Flox マウスと CD4-Cre マウス、Ick-Cre マウスの掛け合わせを行い、胸腺特異的な遺伝子欠損マウスを作製した。これらのマウスを用いて、組織染色や細胞数測定、フローサイトメーターを使った T 細胞割合解析を行った。また LPCAT3 の産生物であるリン脂質組成測定も行った。

4. 研究成果

タモキシフェン誘導性マウスの胸腺を回収し組織染色 (HE 染色、TUNEL 染色) を行った。胸腺は皮質と髄質から構成されているが、HE 染色の結果から LPCAT3^{flx/flx}, Rosa26-Cre⁺ の皮質と髄質ともに小さくなっており特に皮質領域の減少が大きいことが分かった (図 1)。

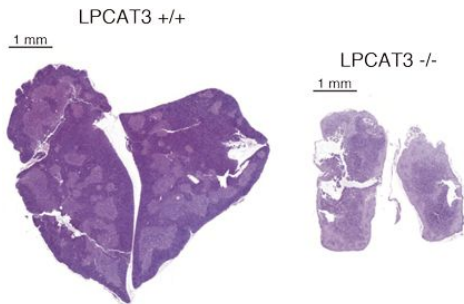


図 1 タモキシフェン誘導遺伝子欠損マウスの胸腺組織染色また TUNEL 染色の結果より、髄質において胸腺細胞のアポトーシスが起きていることも分かった。さらに回収した胸腺細胞数測定を行ったところ、LPCAT3^{+/+}, Rosa26-Cre⁺ と比べて 1/10 以下となっていた。また表面抗原を染色しフローサイトメーターで解析すると、T 細胞の割合としては DP (ダブルポジティブ) -T 細胞の割合が減少し DN (ダブルネガティブ) -T 細胞が増加していた (図 2)。これは皮質の縮小と一致した結果であった。

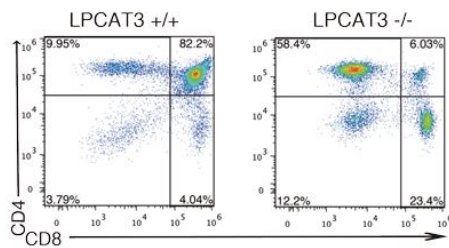


図 2 タモキシフェン誘導遺伝子欠損マウス T 細胞細胞割合

胸腺特異的な LPCAT3 遺伝子欠損マウスを Ick-Cre マウス、CD4-Cre マウスの 2 系統を用いて作製した。LPCAT3^{flx/flx}, CD4-Cre⁺ マウスと LPCAT3^{+/+}, CD4-Cre⁺ マウスでの胸腺細胞数や T 細胞割合の違いなどは観察されなかった (図 3)。一方、LPCAT3^{flx/flx}, Ick-Cre⁺ マウスは LPCAT3^{+/+}, Ick-Cre⁺ マウスと比べて若干細胞数が減少していた。T 細胞の割合を

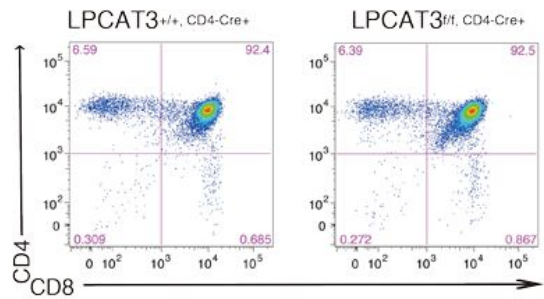


図 3 CD4-Cre 遺伝子欠損マウス T 細胞細胞割合 FCM で確認すると DP-T 細胞、CD4SP (シングルポジティブ) -T 細胞、CD8SP-T 細胞が少し減少し、DN-T 細胞が若干増加していた (図 4)。

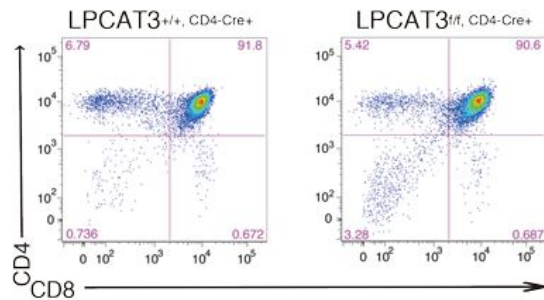


図 4 Ick-Cre 遺伝子欠損マウス T 細胞細胞割合現在、この原因を解明するためにさらなる詳細な解析を行ないっているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tabé S, Hikiji H, Ariyoshi W, Hashidate-Yoshida T, Shindou H, Okinaga T, Shimizu T, Tominaga K, Nishihara T.

Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 1/membrane-bound O-acyltransferase 1 regulates morphology and function of P19C6 cell-derived neurons.

The FASEB Journal, (2016), 30, 2591-2601

Tabé S, Hikiji H, Ariyoshi W, Hashidate-Yoshida T, Shindou H, Shimizu T, Okinaga T, Seta Y, Tominaga K, Nishihara T.

Lysophosphatidylcholine acyltransferase 4

is involved in chondrogenic differentiation
of ATDC5 cells.

Sci Rep., (2017), 7, 16701

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 智美(TOMOMI YOSHIDA)
国立研究開発法人国立国際医療研究セン
ター その他部局等 上級研究員
研究者番号：30610216

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 研究協力者

()