

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06108

研究課題名(和文) 上皮組織リモデリングにおける自己抗原タンパク質を介したT細胞の分子認識機構

研究課題名(英文) Molecular recognition mechanism of T cells vs self antigen in the skin tissue remodeling

研究代表者

井筒 ゆみ (Izutsu, Yumi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20301921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、従来、病原菌から体を守る生体防御機構として位置づけられてきた免疫が、動物の器官形成において発生過程で発現する自己抗原分子を認識して、自らの体を構成する細胞を要・不要(イチorゼロ)で判断し、幼生から成体への組織リモデリングに関与するという新たな概念を提案するものである。研究代表者は、これまでに他の種に先駆けてアフリカツメガエルから新規抗原タンパク質Ouro1とOuro2を単離同定し、免疫系の作用がおたまじゃくしの尾の上皮トリミング(アポトーシスによる細胞の消失)に働くことを明らかとしてきたが、本研究では、鰓蓋上皮(brachial sac skin)についても関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の発生過程における器官形成が「免疫の自己・非自己認識」によって起こる、という観点からの研究は、哺乳類を含め本研究以外無く、本研究の独創性は極めて高い。研究代表者が学生時代から自らの着想に基づき長年継続してきた一連の研究から、近年、正常な発生過程に自己抗原を介した免疫認識が関わるという実験的証拠を提出し、「体を守る」という免疫の既存の概念に「体をつくる」という新規の視点を与えた。その学術的意義は大きい。研究成果の一部は新聞等で報道され、さらに国立科学博物館での高校生を含む一般市民向け講演や、動物学の百科事典への出筆などを通して、新たな器官形成のしくみを広くアピールし、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The immune system has been traditionally regarded as a DEFENSE to protect the body from pathogens. In this study, we propose a new concept that the immune system is involved in tissue remodeling from larvae to adults by recognizing molecules expressed in own-cells during the developmental process of animal organogenesis, and judging the cells that constitute the body as necessary or unnecessary (one or zero). Izutsu (principal investigator of this study) has isolated and identified two novel antigen proteins named Ouro1 and Ouro2, from the African clawed frog (*Xenopus laevis*), and has shown that the immune system is involved in epithelial trimming (tissue loss by apoptosis) in the larval tail. In this study, we showed that the immune system is also involved in gill epithelium (brachial sac skin).

研究分野：発生生物学、免疫学

キーワード：抗原タンパク質 発生・分化 発現調節 組織・細胞 免疫 両生類 アポトーシス T細胞

1. 研究開始当初の背景

全ての脊椎動物にはリモデリングとよばれる共通のプロセスがある。そこには、組織の細胞死と分化・再生という過程が含まれる。魚のような形をした胚(幼生・胎児)から四肢を持つ成体への発生過程上のプロセスは個体発生上必須なものであると考えられる。これら脊椎動物の発生に共通のシステムが関わっていることは、1901年にフォンベールが直感的に提案して以来、半世紀以上を経た1980年代にホメオボックス遺伝子の発見によって、ハエからヒトに至るまで共通の遺伝子配列が存在することが判明し、広く一般に受け入れられるようになった。しかし、分子的に説明できない未知の部分も多く存在する。

研究代表者の疑問点は、この動物のリモデリングに、新たなメカニズムとして細胞間の自己・非自己分子認識が加わるのか、ということである。このような免疫の認識と器官形成を直接関連づけた研究は、申請者らの他に国内外を含めて無く、本研究のオリジナリティーは極めて高い。本研究の分子機序が明らかになれば、免疫細胞の分子認識が直接自分の体の中の細胞を見分け、胚から成体への組織リモデリングに関与する、という新たな概念を提案できると考えた。

着想に至った経緯は、研究代表者の大学院生時代に自らの提案に基づき行った皮膚移植実験が最初である(Izutsu & Yoshizato, *J. Exp Zool.*, 1993)。この移植実験の主眼は、胚(幼生)の不要な組織が成体から免疫的に拒絶されることから、発生過程で不要な組織は成体型免疫によってトリミングされる可能性を示唆することであった。このような実験は胎生である哺乳類では不可能で、ツメガエルの受精卵から成体までの全ての発生過程が外から観察可能である卵生の利点が活かされる。しかも、両生類で唯一交換移植可能な近交系が存在する(現在、新潟大学 井筒研究室で系統維持されている)。一般に両生類の変態は甲状腺ホルモンの作用により細胞自律的に進行すると考えられ、実際、一部の細胞について報告されている(Schreiber & Brown, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2003)。このようなコンテキストの中、ホルモン以外の要因を言及することは応募者以外になかった。着想、実験材料という点からも、本研究は研究代表者の研究グループでしか行えず、学術的に独自性を有している。

2. 研究の目的

研究の主目的は、自己・非自己認識を担当する免疫システムが death 抗原を介して個体形成において寄与する、という新たな概念を一般化することである。そのために最も劇的なリモデリングの変化が見られる両生類を実験動物として用いた。ツメガエルを含む無尾両生類は、脊椎動物のなかでもっとも大規模な組織の再編成が起こる。この無尾両生類の再編成過程(両生類の変態)では、体を構成する表皮細胞などの細胞だけでなく、リンパ球集団においても、幼生型から成体型への入れ換わりを含む免疫系の大規模な変動が起こることが1980年代初頭に既にスイスパーゼル研究所のDu Pasquierらのグループにより見出されている。幼生にとって成体という新たに分化してきた細胞や組織を受け入れるときに起こるトレランス(免疫寛容)とのかかわりで一時期医学的な観点から注目されたが、成体型免疫系の発生的意義は不明のままであった。研究代表者は、無尾両生類の変態では、従来の甲状腺ホルモンによる直接的細胞死誘導システムに加え、免疫システムの自己非自己組織認識に関与するという作業仮説を基に、実験的証明を目的として本研究は行われた。

3. 研究の方法

(1) 免疫細胞機能の検証：これによって抗原であるオウロタンパク質を介した形態形成に必要な細胞死における免疫機能を裏付ける。

これまでに研究代表者は、アフリカツメガエルから成体免疫系の標的となる抗原として、幼生皮膚に発現する2つのタンパク質をコードする新規遺伝子を単離同定し、己の尾を食らう動物の意味のオウロボロス (Ouroboros、遺伝子名は *ourol1*, *ourol2*) と命名しその機能を報告した (Mukaigasa & Izutsu*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009)。抗原タンパク質 Ouro 側の機能については既に報告されているが、それを認識して排除する側の免疫 T 細胞の機能解析はなされていない。そこで、研究室で独自に系統維持されている J 系統ツメガエル雌と、当研究室で既に樹立されているトランスジェニックライン (F2 世代から F5 世代) の雄をかけあわせたハイブリッドラインを作成した。J 系統は、研究代表者の研究室で継代されている世界で唯一の交換移植可能な純系ツメガエルであり、遺伝子の均一性も全ゲノム配列解読で確かめられている (SessionIzutsu....et al., *Nature*, 2016, 研究代表者は 74 人中 49 番目)。従って、このハイブリッドラインには、J 系統から得た T 細胞集団を生体内に移植することが可能であり、細胞死における T 細胞の役割を検証できる。Ouro タンパク質を発現させた上で、免疫 T 細胞を増やしてやると形態形成に直接関わる細胞死が誘導か促進される、失わせるとそれが阻止される、という機能解析の結果が得られれば、T 細胞が機能していることの直接的な証明となる。

(2) 免疫による形態形成という概念の一般化；これまで行われてきた幼生尾の消失だけでなく、鰓蓋上皮 (brachial sac skin) の細胞死における免疫細胞機能を検証し、これによって T 細胞のリモデリングにおける機能の一般化を目指す。

前肢が発生するときに鰓蓋上皮 (brachial sac skin) に細胞死が起こるという“現象そのもの”は、1926 年に報告されている。しかし、メカニズムは全くわかっていない。この細胞死にオウロタンパク質と、それを非自己組織と認識する免疫 T 細胞の関与について検証した。まず、細胞死が起こる時期に鰓蓋の上皮組織で T 細胞と ouro 遺伝子の発現が一過的に上昇するか、免疫組織学的に、および RT-PCR を用いて解析した。既に作製した熱刺激によって ouro 遺伝子の過剰発現可能なトランスジェニック (F4 から F5 世代を使う) の幼生を使用し、冷温付加装置 (申請装置) を使って鰓蓋皮膚に Ouro タンパク質を発現させ、表現型を観察した。ouro 遺伝子を過剰に発現させると、T 細胞の集積を伴った細胞死が誘導され鰓蓋皮膚が早まって崩壊し、穴があいて前肢が出現する、あるいは、抑制すると前肢の出現が阻止されるという結果が得られれば、前肢発生の新たなメカニズムとして呈示できる。

4. 研究成果

(1) 免疫 T 細胞の loss-of-function では、発生初期における胸腺摘出や、免疫抑制剤は有効な手段とならないことが既に研究代表者らの予備的実験や既存の知見から示されている。従って、現存する唯一の手段は T 細胞に対する抗体を投与することによって T 細胞を特異的に除去することである。この方法によって目的の内在性の T 細胞を 50% にまで減少させることができた。その個体の尾の一部に、Ouro タンパク質を過剰発現させても、尾の崩壊が有意に阻止されることが示された。その除去個体に J 系統成体から再び T 細胞を移植 (レスキュー実験) することにより、有意に回復がみられたので、T 細胞が Ouro タンパク質を介して効果細胞として尾の崩壊に働くという細胞機能が明確に確かめられた。十分再現性のあるデータが得られたので、現在投稿準備中である。

(2)

先に述べたが、前肢が発生するときに鰓蓋の皮膚に細胞死が起こるという現象そのものは、1926年に報告されている。しかし、メカニズムは全くわかっていない。このしくみは長い間、尾や腸のリモデリングに比べ規模も小さいため誰からも研究対象にすらされていなかった。研究代表者は学振 PD 時代に着目し始め、予備的な実験を試み、ここにも免疫細胞の関与があるのではないかと疑いをもってこの研究に着手した。予想通り、細胞死が起こる時期に鰓蓋の上皮組織で T 細胞と *ouro* 遺伝子の発現が一過的に上昇することが確かめられた。アポトーシスのシグナルも同時期に検出された。*ouro* 遺伝子を過剰に発現させると、T 細胞の集積を伴った細胞死が誘導され鰓蓋皮膚が早まって崩壊し、結果として穴があいて前肢が出現した。一方、抑制すると前肢の出現が有意に阻止された。これについてはあと少しの再検討を残すのみで、論文投稿準備に取りかけられる段階である。

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 1件）

1. 著者名 Izutsu Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Skin Grafting in <i>Xenopus laevis</i> : A Technique for Assessing Development and Immunological Disparity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/pdb.prot099788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石森泉、井筒ゆみ
2. 発表標題 ouro遺伝子のノックダウンによるツメガエル幼生上腕囊皮膚の消失の阻害
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林遥香、井筒ゆみ
2. 発表標題 Loss-of-function and rescue analyses revealed that the immune T cells are necessary for degeneration of <i>Xenopus</i> tail tissues
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石森泉、井筒ゆみ
2. 発表標題 Possible involvement of ouro genes in disappearance of brachial sac skin during <i>Xenopus</i> metamorphosis
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Kobayashi, Yumi Izutsu
2. 発表標題 Loss-of-function and rescue analyses revealed that the immune T cells are necessary for tail tissue degeneration of Xenopus via Ouro proteins
3. 学会等名 17th International Xenopus Conference, Seattle, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi Ishimori, Yumi Izutsu
2. 発表標題 Possible involvement of ouro genes in disappearance of brachial sac skin during Xenopus metamorphosis
3. 学会等名 17th International Xenopus Conference, Seattle, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林遥香、井筒ゆみ
2. 発表標題 アフリカツメガエルの変態における Oouroタンパク質とT細胞の役割
3. 学会等名 第13回XCIJ-MA (Xenopus Conference in Japan-Metropolitan Area) 研究集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井筒 ゆみ	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善	5. 総ページ数 770
3. 書名 動物学の百科事典 第9章 生体防御 「変態にかかわる免疫の自己・非自己認識」 P202-203.	

〔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	伊藤 道彦 (Ito Michihiko) (90240994)	北里大学・理学部・准教授 (32607)	

	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
研究協力者	小林 逢香 (Kobayashi Haruka)		
研究協力者	石森 泉 (Ishimori Izumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関