

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07178

研究課題名(和文)細胞内イオン濃度調節によるT細胞初期分化の新規制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel molecular mechanisms of early T cell development by regulation of intracellular ion homeostasis

研究代表者

大洞 將嗣(Masatsugu, Oh-hora)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授

研究者番号：40351506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの身体を感染症などから守るT細胞の機能にはイオンが必要である。本研究では、胸腺の未熟T細胞で高発現する2価陽イオンチャネルTRPM7に注目し、その機能を明らかにすることを目指した。リンパ球特異的なTRPM7欠損マウスを解析した結果、TRPM7は未熟なT細胞の増殖と生存に必須であることが明らかになった。さらに、網羅的な遺伝子発現解析の結果、betaセレクション後に発現が上昇する遺伝子の発現が低下していた。このうち、新規RNA結合分子は未熟T細胞でのみ発現していることを見出した。さらに、この分子のT細胞分化における役割を解析するために、ノックアウトマウスの樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞は免疫系の司令塔であり、その活性化や分化の仕組みを理解することは、アレルギー治療や感染防御の観点から重要な課題である。また、健康を維持するために必要な栄養素である必須ミネラルは、体内ではイオンとして存在する。本研究では、カルシウム、マグネシウム、亜鉛など透過するイオンチャネルがT細胞の分化に必須であることを明らかにした。この成果は、イオンチャネルの機能異常を特徴とする病態機序を理解する上でも重要であり、免疫疾患におけるイオンチャネルを標的とする創薬開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Ions are required for T cell development and function. In this study, we focused on TRPM7, which is a non-selective divalent cation channel and highly expressed in immature thymocytes. In lymphocyte-specific TRPM7 deficient mice, TRPM7 is required for cell proliferation and survival in immature thymocytes. In addition, we have found that expressions of genes upregulated after beta-selection was downregulated by TRPM7 deficiency. Among these genes, a novel RNA-binding molecule was selectively expressed in immature thymocytes. In order to elucidate the roles of this molecule in T cell development, we have established the knockout mouse.

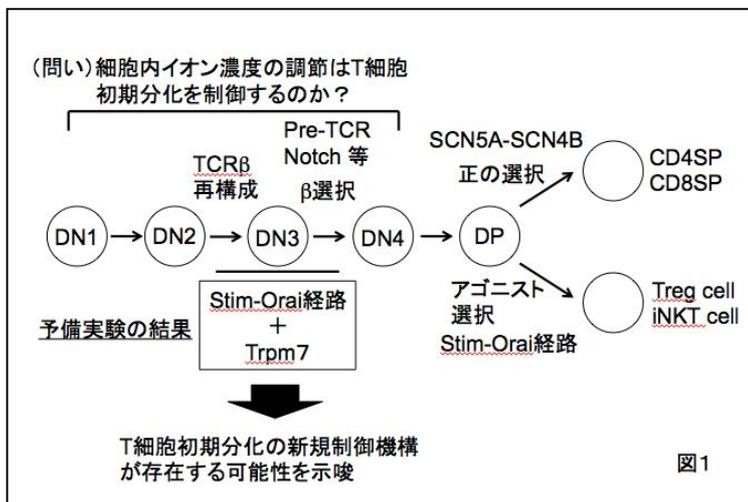
研究分野：免疫学

キーワード：T細胞分化 イオンチャネル シグナル情報伝達 betaセレクション

### 1. 研究開始当初の背景

生体は、細菌やウイルスなどの病原体から身体を防御するために免疫システムを備えている。免疫応答のうち、獲得免疫応答では T 細胞が中心的な役割を果たす。最も多く存在する TCRα/β(+) T 細胞の分化は、CD4(-)CD8(-)ダブルネガティブ (DN) CD4(+)CD8(+)ダブルポジティブ (DP) CD4(-)CD8(+)あるいは CD4(+)CD8(-)シングルポジティブ (SP) 胸腺細胞へと段階的に進行する。DN 胸腺細胞は、CD44(+)CD25(-) (DN1)、CD44(+)CD25(+) (DN2)、CD44(-)CD25(+) (DN3) CD44(-)CD25(-) (DN4) と、さらに 4 つの分化段階に分けられる (図 1)。DN2 から DN3 にかけて TCRβ 鎖の再構成が、DN3 から DN4 への移行期には、T 細胞分化の重要なチェックポイントの 1 つである beta セレクション (beta 選択) が惹起される。beta セレクションには pre-TCR を介したシグナルが必須である。しかし他のシグナル伝達経路も beta セレクションに関与していることが報告されており、その分子制御機構の全貌は解明されていない。

シグナル伝達を担う酵素やアダプター分子などの活性にはカルシウムやマグネシウムなどのイオンの存在が必要であり、それらの細胞内濃度の平衡や変化はイオンチャネルやトランスポーターなどを介して制御されている。これらの分子は T 細胞にも多様に発現しており、胸腺内 T 細胞分化やエフェクター機能を制御している。申請者は、Stromal interaction molecule (Stim)1 / Stim2-Orai1 経路を介したストア作動性カルシウム流入の活性化が、強い TCR シグナルを分化に必要とする制御性 T 細胞 (Treg 細胞) など「アゴニスト選択性 T 細胞」の分化に必須であることを明らかにしている (Oh-hora, et al. Nat Immunol. 2008, Oh-hora, et al. Immunity 2013, McDonald, et al. Immunity 2015)。その他に、電位依存性ナトリウムチャネル SCN5A-SCN4B が「正の選択」



に関与していること (Lo WL, et al. Nat Immunol. 2012) が示唆されている。これらのように、細胞内イオンの流入を調節する分子が DP 細胞以降の分化に関与していることが明らかになりつつある。しかし、細胞内イオン濃度の調節機構によって、T 細胞の初期分化が制御されるのかが不明である (図 1)。

申請者は、Stim1 / Stim2-Orai1 経路を欠損した細胞を用いて、in vitro T 細胞培養分化系とカルシウム透過性チャネル阻害剤を用いたスクリーニングによって、T 細胞分化に関わるカルシウムを透過する新規イオンチャネルとして Transient receptor potential melastatin 7 (Trpm7) を同定した。Trpm7 は、カルシウム、マグネシウムなど様々な 2 価陽イオンを透過するチャネルであり、胸腺上皮細胞の分化を介して T 細胞分化に関与していることが報告されている (Jin J, et al. Science 2008)。しかし、Trpm7 の T 細胞初期分化における生理作用は明らかにされていなかった。

そこで申請者が、Lck-Cre トランスジェニック (Tg) マウスを用いて T 細胞特異的な Stim1、Stim2、Trpm7 の 3 重欠損 (S1S2M7 KO) マウスを作成・解析した結果、DN3 から DN4 にかけて分化障害が認められた。さらに DN4 細胞では、野生型とは異なり、細胞内 TCRβ を発現していない集団の増加を認めた。

これらの結果から、3 つの遺伝子による細胞内イオン濃度の調節機構は、beta セレクションを正に制御する新規メカニズムの可能性があるのでないかと考えた (図 1)。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、Trpm7 および Stim1 / Stim2-Orai1 を介したカルシウム流入経路の T 細胞の初期分化における役割、それらが制御するシグナル伝達経路や遺伝子発現を含む分子制御機構を解析し、イオン濃度調節機構を介した T 細胞初期分化の制御機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) コモンリンパ球系前駆細胞から Cre を発現する Rag1-Cre ノックイン (KI) マウスを用いて、早期 DN 細胞の段階で Trpm7、Stim1、Stim2 の全ての遺伝子が完全に欠損するマウス、および Trpm7 単独の欠損 (Trpm7KO) マウスを作製し、それぞれの DN 細胞の分化について解析を行った。

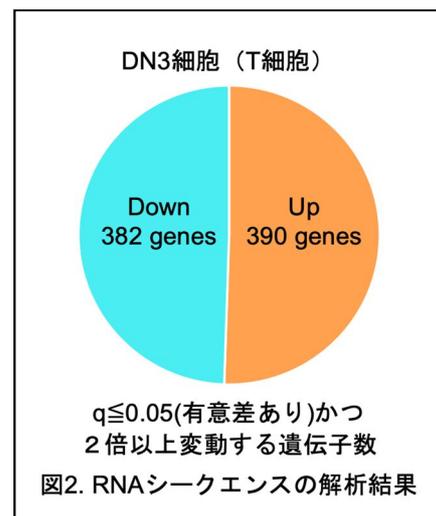
- (2) セルソーティングによって採取した各マウスの DN3 細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法を用いて TCRbeta 鎖の VDJ 再構成について解析を行った。
- (3) 細胞増殖と細胞周期に関して、チミジン類縁体である Edu (5-エチニル-2'-デオキシウリジン) をマウスに投与した 6 時間後に、Click 法と DAPI 染色によって解析した。また、細胞生存に関して、安楽死直後に Annexin V と propidium iodide (PI) の染色によって解析を行った。
- (4) 野生型と Trpm7 単独欠損マウスの DN3 細胞を用いて RNA シークエンスを行い、Trpm7 欠損による T 細胞分化障害の原因となる候補分子を探索した。さらに、候補分子に関して、定量的 PCR 法を用いて野生型と Trpm7 単独欠損マウスの DN3 細胞における発現量の比較を行った。
- (5) 候補分子の 1 つについて CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いてノックアウトマウスを作製した。

#### 4. 研究成果

- (1) Trpm7、Stim1、Stim2 の全ての遺伝子が完全に欠損するマウス (3 重欠損マウス) と Trpm7KO マウスでは、DN3 ではほぼ完全に分化が停止し、胸腺細胞数も野生型の約 1/100 に減少していた。また、両マウス間で表現型に差が無かった。Stim1 と Stim2 の 2 重欠損マウスでは、DN 細胞が正常に分化していることから、3 重欠損マウスの表現型は Trpm7 の欠損に依存することが強く示唆された。そのため、以降の解析は Trpm7KO マウスを用いて行うこととした。  
Trpm7 欠損 DN3 細胞では、細胞内 TCRbeta 鎖の発現が約 1/3 (WT:15.2% vs KO:4.7%、n=5) に減少していた。  
Trpm7 欠損 DN3 細胞では、細胞表面における TCRbeta 鎖を発現しておらず、CD28 の発現も著減していた。  
TCRbeta 鎖を強制的に大量発現させることによって分化が回復するかどうかを調べるために、ニワトリ卵白アルブミン (OVA) を認識する TCR を CD4<sup>+</sup> T 細胞に発現する OT-II トランスジェニック (Tg) マウスと Trpm7 KO マウスを交配した。その結果、交配したマウスでは、DN3 細胞以降の分化が僅かに認められたが、胸腺細胞数は全く回復しなかった。
- (2) TCRbeta 鎖のうち Vbeta2、Vbeta5、Vbeta8、Vbeta10、Vbeta15 における VDJ 再構成では、野生型 DN3 細胞と Trpm7 欠損胸 DN3 細胞では差がほとんど認められなかった。
- (3) 細胞増殖に関しては、Trpm7 欠損 DN3 細胞において Edu 陽性の増殖細胞が著減していた。細胞周期に関しては、Trpm7 欠損 DN3 細胞において S 期以降の細胞が減少し、sub G0/G1 期の細胞が増加していた。  
細胞生存に関しては、Trpm7 欠損 DN3 細胞において Annexin V 単独陽性の早期アポトーシス細胞、および Annexin V と PI が共に陽性の後期アポトーシス細胞が野生型に比べて増加していた。

以上の結果から、Trpm7 は DN3 細胞において細胞の増殖と正常な細胞周期の進行、および細胞の生存を正に制御していることが示唆された。

- (4) RNA シークエンス解析の結果、Trpm7 欠損によって多くの遺伝子に発現変動が認められた (図 2)。著明に発現低下していた遺伝子は、複数の最初期遺伝子 (IEGs: immediate early genes)、T 細胞では機能が未知のキナーゼ遺伝子などであった。さらに、定量的 PCR によって、これらの遺伝子の大部分は beta セレクション後に発現が上昇する遺伝子であることが明らかとなった。特に、長鎖ノンコーディング RNA を制御する RNA 結合分子 X は、DN2 から発現が始まり、DN3 から DN4 にかけて発現が最大になる分子であった。
- (5) RNA 結合分子 X はある種の細胞の生存に関与すると報告されているが、その制御メカニズムや生理的な機能は未知である。そこで、ノックアウトマウスの作製を行なった結果、欠失する塩基数が異なる 3 ラインの樹立に成功した。



以上、これまでに得られた結果から、Trpm7 は Stim1、Stim2-Orai1 を介したストア作動性カルシウムとは独立していること、Trpm7 は単独で T 細胞の beta セレクションに必須であることが明らかとなった。そのメカニズムとして pre-TCR 複合体の形成または細胞表面発現を正に制御している可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Oh-hora M, Lu X, Shiokawa M, Takayanagi H, Yamasaki S.	4. 巻 202
2. 論文標題 Stromal interaction molecule deficiency in T cells promotes spontaneous follicular helper T cell development and causes type 2 immune disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2616-2627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1700610.	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 -

1. 著者名 Yoshikawa S, Oh-hora M, Hashimoto R, Nagao T, Peters L, Egawa M, Ohta T, Miyake K, Adachi T, Kawano Y, Yamanishi Y, Karasuyama H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pivotal role of STIM2 but not STIM1 in IL-4 production by IL-3-stimulated murine basophils.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaav2060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aav2060.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Oh-hora M, Lu X, Shiokawa M, Takayanagi H, Yamasaki S.
2. 発表標題 Stim-deficiency in T cells promotes spontaneous follicular T cell development and causes type 2 immune disorders
3. 学会等名 FASEB Science research conferences（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大洞将嗣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 251
3. 書名 医学のあゆみ	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------