

平成21年6月1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790152
 研究課題名 (和文) 胸腺上皮細胞における脂肪酸結合タンパクの生体機能と作用機構の解明
 研究課題名 (英文) Expression and functional analysis of fatty acid-binding proteins in mouse thymic epithelial cells.
 研究代表者
 安達 泰弘 (ADACHI YASUHIRO)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：10346546

研究成果の概要：

胸腺上皮細胞における表皮型 (E-) FABP の発現・機能解析、及び他分子種の発現解析を、主に組織学的手法により実施した。野生型および E-FABP KO マウスとの比較解析の結果、E-FABP 分子の欠損は胸腺上皮細胞の機能においては大きく影響しないことが判明した。また今回、胸腺内に分布する血管内皮細胞、並びに胸腺ナース細胞 (TNC) に脂肪細胞型 (A-) FABP 分子が局在することを新たに見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：解剖学、組織学、免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：脂肪酸結合タンパク分子、胸腺上皮細胞、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

1) 中枢免疫臓器である胸腺は、胸腺上皮細胞を含むストローマ細胞と、骨髄に由来する T 前駆細胞 (胸腺細胞) で構成され、末梢で機能的な T 細胞の分化誘導、及び選択が行われている。これらの過程は、胸腺細胞と胸腺上皮細胞の直接接触と、胸腺上皮細胞からのタンパク質性のサイトカイン産生による間接的な相互作用によって厳密に制御されていることが明らかにされている。

2) 胸腺細胞の分化誘導には、胸腺上皮細胞が産生するサイトカイン以外にも生理活性

脂質であるプロスタグランジン (PG) E2 が関与しているという報告がある。

脂肪酸結合タンパク (FABP) ファミリー分子は、低分子量 (~15kDa) の細胞質タンパクであり、各種組織・細胞中に単一または複数種類が存在する。FABP 分子は脂肪酸代謝 (生体エネルギー産生、各種生理活性脂質合成、膜脂質合成等) の材料となる脂肪酸及び代謝産物に結合・可溶化し、脂肪酸の細胞内局在を制御するキャリア分子であると考えられてきた。しかし近年、様々なシグナル伝達系への FABP 分子の関与を介した遺伝子発現調節を行っていることが報告されており、

FABP ノックアウト (KO) マウスを用いた我々の解析でも、末梢免疫系細胞からのサイトカイン産生調節に FABP 分子が関与していることが判明している (Yamamoto et al., 2008)。

2. 研究の目的

免疫器官における FABP 分子発現・機能解析については殆ど報告されておらず、特に中枢免疫臓器である胸腺については表皮型 (E-) FABP 分子が胸腺上皮細胞に局在するという我々の報告以外、内外を問わず皆無である。

従って、本研究課題は組織学的手法を中心に、主に以下の4点について検討を行い、胸腺における FABP 分子発現の意義について明らかにする事を目的とした。

- 1) FABP 分子の組織学的及び発生学的な発現解析
- 2) E-FABP 分子の胸腺上皮細胞の増殖・分化への関与
- 3) E-FABP 分子の胸腺細胞の分化誘導への関与
- 4) 脂肪細胞型 (A-) FABP 分子の発現解析、及び機能解析

3. 研究の方法

- 1) FABP 分子の組織学的及び発生学的な発現解析

①胸腺組織内で他の FABP 分子が発現する可能性を検討するため、成体 WT マウス胸腺の凍結切片を作製し、各種 FABP 分子に対する特異抗体で染色、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。また、胸腺組織から全 RNA、全タンパク質を抽出し、半定量 RT-PCR、及び Western blot 法により FABP 分子の発現解析を行った。

②発生段階における E-FABP 分子発現を検討するため、胎齢 (E) 10.5、11.5、14.5、生直後 (P0)、4 週齢、8 週齢の WT マウス胸腺原基、及び胸腺組織の凍結切片を作製し、特異抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

- 2) E-FABP 分子の胸腺上皮細胞の増殖・分化への関与

WT 及び我々が樹立した E-FABP KO マウス胸腺から、磁気細胞分離システム (MACS) により胸腺上皮細胞を単離し、胸腺皮質上皮細胞マーカーである Ly-51 及び MHC class II 分子に対する特異抗体で染色後、フローサイトメトリーで胸腺上皮細胞数を比較した。

- 3) E-FABP 分子の胸腺細胞の分化誘導への関与

E-FABP 分子が胸腺細胞の分化誘導に関与

するか否かを検討するため、WT 及び E-FABP KO マウス胸腺から胸腺細胞懸濁液を調製し、CD3、CD4、CD8、CD45 に対する特異抗体で染色し、フローサイトメトリーにより胸腺細胞の分化状態について比較検討した。

- 4) 脂肪細胞型 (A-) FABP 分子の発現解析、及び機能解析

①A-FABP 陽性脈管構造の同定

A-FABP を発現する脈管構造が血管であるか否かを検討するため、FITC 標識タチナタマメレクチン (BS-1) を成体 WT マウスに尾静脈注入し、5 分後に屠殺・4% PFA で灌流固定した後、凍結切片を作製した。切片は抗 A-FABP 抗体で 2 重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

②A-FABP 陽性皮質ストローマ細胞の細胞種同定

胸腺皮質における A-FABP 陽性ストローマ細胞の細胞種同定を行うため、成体 WT マウス胸腺の凍結切片を作製し、以下の特異抗体と抗 A-FABP 抗体で 2 重染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

表 1 使用した抗体

Antibodies	Target (cell)
Anti-mA-FABP rabbit poly	A-FABP
Anti-mE-FABP rabbit poly	E-FABP
Anti-F4/80 (A3-1)	(macrophage)
Anti-CD11b (M1/70.15.1)	(macrophage)
ER-TR4	(Type-I TEC)
ER-TR7	(Fibroblast)
Anti-I-A/I-E (M/5.114.15.2)	MHC class II
Anti-DEC205 (NLDC145)	CD205

③胸腺ナース細胞 (TNC) の分離及びマーカー染色

成体 WT マウス胸腺からの TNC の分離は Wekerle らの方法に準じて行った (Wekerle and Ketelsen, 1980)。分離した TNC はスライドガラス上に塗布・乾燥させ、4% PFA 固定後に上記抗体、及び抗 A-FABP 抗体との 2 重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

④Dexamethasone (Dex) 投与によるアポトーシス誘導モデルの作製

成体 WT マウス腹腔内に体重 1g 当たり 12.5mg の用量で Dex を投与し、投与後 2、4、8、12、24 時間後に屠殺・灌流固定を行い、凍結切片を作製した。これら標本に対し、定法に基づいた TUNEL 染色と A-FABP 抗体による 2 重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

⑤A-FABP 陽性皮質ストローマ細胞、及び胸腺細胞の 3 重染色

A-FABP 陽性皮質ストローマ細胞が取り囲んでいる胸腺細胞の分化状態を検討するため、抗 CD4、CD8 抗体と抗 A-FABP 抗体による 3 重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

4. 研究成果

1) FABP 分子の組織学的及び発生学的な発現解析

①胸腺内で発現する FABP 分子種の検討

我々は、胸腺では E-FABP が発現している事実を報告しているが、他組織では複数種類の FABP 分子発現しているため、胸腺内でも他の FABP 分子種が発現している可能性を検討した。その結果、成体マウス胸腺ではこれまでに報告した通り E-FABP 分子を発現する胸腺上皮細胞が皮質において緻密な網目構造を形成していることを確認した他 (図 1 A)、今回新たに A-FABP 分子を発現する細胞が存在することを見出した。A-FABP 陽性細胞は皮質に存在する小型の脈管、皮髄境界部及び髄質に存在する大型の脈管構造に広く分布していた。この他に A-FABP 陽性細胞は胸腺皮質にも散在性に存在し、局所的な網目構造を呈し、その内部に多数の胸腺細胞を抱え込む形態であった (図 1 B 矢頭)。この細胞形態は胸腺ナース細胞 (TNC) と一致するものであった (詳細は研究成果 4 に示す)。胸腺における A-及び E-FABP の遺伝子・タンパク分子発現は RT-PCR、及び Western blot 法で確認済みである。

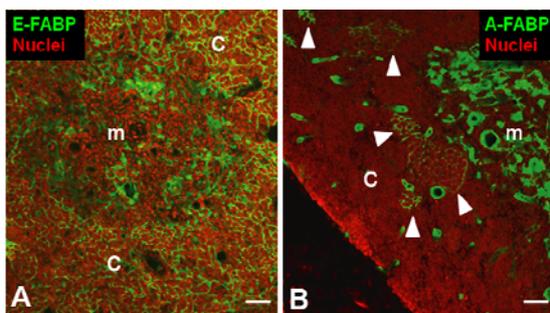


図 1 胸腺における FABP 分子発現

A) E-FABP、B) A-FABP c:皮質、m:髄質
矢頭: A-FABP 陽性ストローマ細胞、Bar=50 μm

②発生段階における FABP 分子の発現解析

WT マウス胸腺の各発生段階における E-FABP 分子発現について検討した結果、第 3・第 4 鰓弓の間に胸腺原基が形成される E10.5 及び 11.5 の段階では E-FABP 発現は検出されず、骨髄から胸腺原基内に T 前駆細胞が移入した後の少なくとも E14.5 から上皮細胞に発現することが判明した。この後は P0 (生直後)、P56 に至るまで発現が持続してい

た (表 2)。この結果は、E-FABP 分子は T 前駆細胞と未分化胸腺上皮細胞との相互作用によりその発現が誘導される可能性を示唆する。

表 2 胸腺の発生段階における FABP 分子発現

	E10.5	E11.5	E14.5	P0	P28	P56
EFABP	-	-	++	+++	+++	+++
AFABP	N. A.	N. A.	+	+++	+++	+++

N. A.: Not assayed

2) E-FABP 分子の胸腺上皮細胞の増殖・分化への関与

E-FABP 分子が胸腺上皮細胞の増殖・分化に関与しているか否かについて、MACS システムで単離した WT 及び E-FABP KO マウス胸腺上皮細胞を用い、抗体で標識後にフローサイトメーターで Ly-51/MHC (II) 共陽性の胸腺上皮細胞数を測定した。その結果、WT と E-FABP KO マウス間で差は認められなかった。即ち、WT 及び E-FABP KO マウス胸腺に含まれる胸腺上皮細胞の割合には変化がないことが判明した。

3) E-FABP 分子の胸腺細胞の分化誘導への関与

E-FABP 分子が胸腺上皮細胞の特異的機能である胸腺細胞の分化誘導に関与するか否かを検討するため、成体 WT 及び E-FABP KO マウス胸腺から胸腺細胞懸濁液を調製し、フローサイトメーターによる胸腺細胞の分化状態の解析を行った。その結果、各分化段階にある胸腺細胞の割合は WT 及び E-FABP KO マウス間で顕著な差はなかった (図 2)。即ち、胸腺上皮細胞による胸腺細胞の分化誘導に E-FABP 分子は関与していないことが明らかになった。この結果は、上記 3) と合わせて考えると、E-FABP 分子は胸腺上皮細胞の機能である胸腺細胞の分化誘導、及び胸腺上皮細胞自身の機能的分化において本質的、または大きく影響を及ぼす分子ではないと考えられる。しかし、末梢免疫細胞においてはシグナル伝達系への関与を介した液性因子産生に変化が生じていることから (Yamamoto, 2008)、中枢免疫臓器である胸腺においても液性因子産生という点で変化が起きている可能性があるため、現在精査中である。

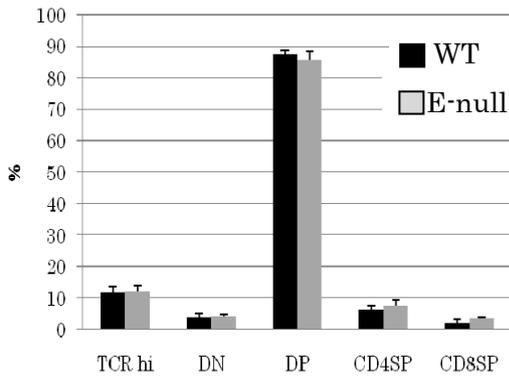


図2 WT及びE-FABP KO(E-null)マウス間における胸腺細胞の分化解析

TCRhi: T細胞レセプター強陽性
 DN:CD4 CD8 共陰性、DP:CD4 CD8 共陽性
 CD4SP:CD4 単陽性、CD8SP:CD8 単陽性

4) 脂肪細胞型 (A-) FABP 分子の発現解析、及び機能解析

この項目では、研究成果1) で新たに見出した A-FABP 陽性ストローマ細胞の細胞腫同定、及び機能解析を行った。

① A-FABP 陽性脈管構造の同定

胸腺皮質・髄質において A-FABP を発現している脈管構造が血管であるか否かを検討するため、血管内皮細胞を FITC 標識レクチン (BS-1) で標識し、抗 A-FABP 抗体との 2 重染色後に標本の観察を行った。その結果、皮質の微小血管と皮髄境界部及び髄質に存在する比較的大型の脈管において BS-1 と E-FABP の共存は観察されなかったが (図 3 A)、A-FABP との局在が良く一致したことから、A-FABP 陽性脈管構造は胸腺内に分布する血管であることが判明した (図 3 B)。また、強拡大像の観察から、BS-1/A-FABP 共陽性の細胞は血管内皮細胞であることも同時に判明した (図 3 C)。

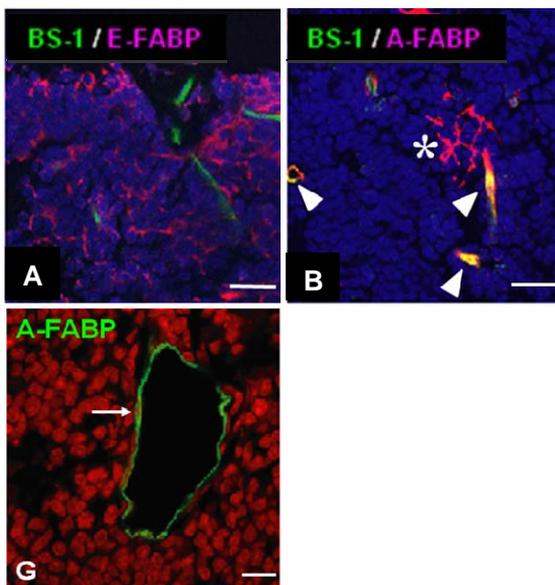


図3 A-FABP 陽性脈管構造の同定

矢頭: BS-1/A-FABP 共陽性の血管、矢印: 血管内皮細胞の核、*: A-FABP 陽性ストローマ細胞、Bar = 20 μ m (A&B)、10 μ m (C)

② A-FABP 陽性皮質ストローマ細胞の細胞腫同定

胸腺皮質に散在性に認められ、内部に多数の胸腺細胞を抱え込む A-FABP 陽性ストローマ細胞はどのような細胞であるのかを検討するため、各種細胞マーカー分子に対する抗体を使用し、A-、及び E-FABP との 2 重染色を行った。その結果、A-FABP 陽性皮質ストローマ細胞は胸腺マクロファージや線維芽細胞ではなく、これまでに判明している E-FABP 陽性胸腺上皮細胞と同様のマーカー分子を発現している、即ち皮質上皮細胞の一群であることが判明した。しかし、E-FABP 陽性上皮細胞は胸腺皮質全体で緻密な網目構造を形成するのにに対し、今回新たに見出した A-FABP 陽性上皮細胞は皮質において島状の限局した網目構造を形成し、内部に多数の胸腺細胞を抱え込むという特異な構造を有している。この細胞構造は、これまでに報告されている胸腺ナース細胞 (TNC) とよく一致するものであった。

表3 FABP 分子と上皮細胞マーカーの共存

	CD11b	F4/80	ER-TR7	ER-TR4	DEC205	MHC (II)
A	-	-	-	+	+++	+++
E	-	-	-	+	+++	+++

A: A-FABP、E: E-FABP、-: 共存しない、+: 一部共存、+++ : 非常に良く共存

③ 胸腺ナース細胞 (TNC) の分離及びマーカー染色

成体 WT マウス胸腺から TNC を分離し、上皮細胞マーカーに対する抗体、及び A-、E-FABP 抗体で 2 重染色を行った結果、TNC は CD205/MHC (II)/A-FABP 陽性であることが判明した。また、分離 TNC では E-FABP 分子も発現していたことから、TNC は A-、E-FABP 双方を発現する細胞である可能性が示された。

分離 TNC における A-FABP 遺伝子・タンパク分子発現は、RT-PCR 及び Western blot 法により確認済である。

表4 分離 TNC における FABP 分子と上皮細胞マーカーの共存

	DEC205	MHC (II)
A-FABP	+++	+++
E-FABP	+++	+++

+++ : 非常に良く共存

④Dex 投与によるアポトーシス誘導モデルの作製

胸腺皮質内では機能的な T 細胞レセプター (TCR) を発現する胸腺細胞クローンの選択 (正の選択) が行われており、選択されなかった胸腺細胞はアポトーシスが誘導され、胸腺マクロファージに貪食・除去されることが知られている。しかし、実験的に胸腺細胞のアポトーシス誘導を行った場合、TNC も胸腺マクロファージと同様に貪食を行うようになるという報告がある (Cao et al., 2004)。

ここでは成体 WT マウスへの Dex 投与により胸腺細胞のアポトーシスを誘導し、A-FABP 陽性上皮細胞が貪食機能を有するか否かについて、TUNEL 染色との組み合わせによる組織学的な検討を行った。その結果、Dex 投与後 8 時間目の観察において、A-FABP 陽性皮質上皮細胞が TUNEL 陽性胸腺細胞を取り囲んでいる像を確認した。従って、A-FABP 陽性皮質上皮細胞は TNC と同様の機能を有すると考えられた。

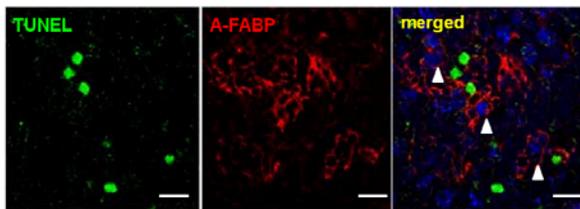


図 4 TNC による apoptotic cell の貪食像 (Dex 投与後 8 時間)

矢頭：核濃縮した胸腺細胞、Bar = 20 μm

⑤A-FABP 陽性皮質上皮細胞及び胸腺細胞の 3 重染色

胸腺皮質において、TNC は CD4、CD8 共陽性 (ダブルポジティブ: DP) 胸腺細胞と特異的に相互作用すると報告されている (Guyden et al., 2003)。A-FABP 陽性皮質上皮細胞は形態学的、機能的に TNC と酷似していることから、この細胞が取り囲んでいる胸腺細胞の分化状態を調べるために抗 CD4、CD8 抗体及び A-FABP 抗体による 3 重染色を行った。その結果、A-FABP 陽性皮質上皮細胞が相互作用する胸腺細胞は DP 胸腺細胞であることが判明した (図 5)。

これらの結果から、本研究計画で新たに見出した A-FABP 陽性皮質上皮細胞は形態学的・機能的にこれまで報告されている TNC の特徴と矛盾するものではない。従って、A-FABP 陽性皮質上皮細胞は TNC であると考えられた。

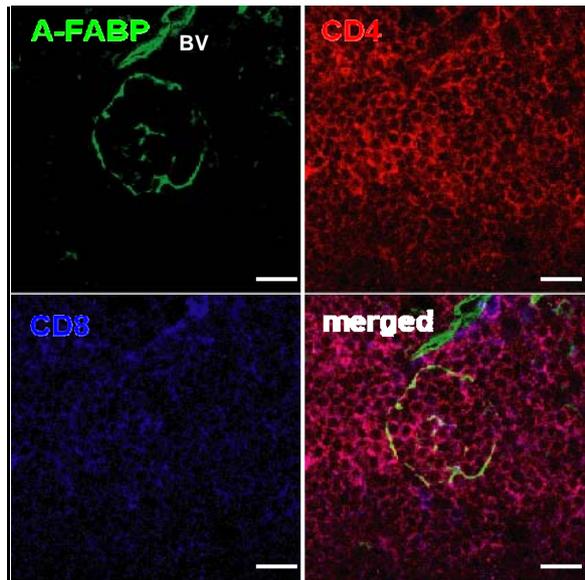


図 5 A-FABP 陽性皮質上皮細胞と胸腺細胞マーカーの 3 重染色像

BV: 血管、Bar = 10 μm

まとめと今後の展望

1. WT 及び E-FABP KO マウスとの比較解析から、胸腺上皮細胞の機能的分化、及び胸腺細胞の分化誘導能に E-FABP 分子は大きく影響を及ぼすものではないことが判明した。しかし、液性因子産生能が変化している可能性があることから、この点については現在解析中である。

2. 本研究計画により、胸腺では E-FABP のみならず A-FABP が発現している事実を新たに見出した。同時に行った細胞同定の結果、A-FABP 分子は胸腺内に分布する血管の内皮細胞と、皮質に散在する TNC に局在することが判明した。

他組織中に分布する血管内皮細胞では心臓型 (H-) FABP 分子の発現が報告されていることから、発現する FABP 分子の種類が血管機能の組織特異性を規定している可能性が考えられるため、非常に興味深い結果である。

また、TNC はその存在こそ知られてはいるが、機能的には不明な点が多い細胞である。この細胞において脂質シグナリング関連分子である FABP 分子の局在を見出した成果は、既存のタンパク質性リガンドによるシグナル伝達系に脂肪酸をリガンドするシグナル伝達系が関与するという新たな視点を加えることができる点で極めてユニークであり、今後の国際的な TNC 機能の研究において大きなアドバンテージになるものと思われる。

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1件)

Noriko Yamamoto, Izumi Kaneko, Keiju Motohashi, Hiroyuki Sakagami, Yasuhiro Adachi, 以下8名、Fatty acid-binding protein regulates LPS-induced TNF- α production in mast cells, Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids、79巻、2008年、p21-26、査読有、

[学会発表] (計3件)

1. 安達 泰弘、平松 澄恵、徳田 信子、澤田 知夫、大和田 祐二、マウス胸腺ナース細胞における脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク (A-FABP/FABP4) の局在、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009年3月29日、岡山理科大学

2. 安達 泰弘、平松 澄恵、本橋 慧樹、北中 のり子、徳田 信子、澤田 知夫、近藤 尚武、大和田 祐二、マウス胸腺における脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク (A-FABP/FABP4) の局在、第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008年3月29日、大分大学医学部

3. Yasuhiro Adachi, Nobuko Tokuda, Tomoo Sawada, Noriko Kitanaka, Hisatake Kondo, Yuji Owada, Localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in thymic epithelial cells of adult mouse, 6th International Conference on Lipid Binding Proteins, June 3-5, 2007, Simon Fraser University, Canada

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~da/1kaibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 泰弘 (ADACHI YASUHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10346546

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし