

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790355

研究課題名 (和文) T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスにおける腸炎発症メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Analysis of colitis shown in T cell specific TAK1 deficient mice

研究代表者

佐藤 慎太郎 (SATO SHINTARO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80447333

研究成果の概要：

T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスは自然発生的に大腸炎を発症する。TNF 刺激に対する応答性の亢進が認められることから、このマウスが示す表現型が TNF の二重欠損 (DKO) で回避されるかを検討したが、T 細胞分化の異常や腸炎の発症は DKO マウスでも認められた。このマウスの腸炎発症にはナチュラルレギュラトリー T (nTreg) 細胞の選択的欠失が関与していることが示唆されていたが、野生型マウスより調整した末梢 Treg 細胞の移入による腸炎発症の回避認められなかった。これらの結果は、胸腺での Cre による Tak1 遺伝子の消失を逃れた未熟な T 細胞亜集団が末梢で増殖することが腸炎の引き金になっていることを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(E) 細胞

1. 研究開始当初の背景

TGF- β activated kinase 1 (TAK1)は、TGF- β 刺激によって惹起される MAP kinase (MAPK) の活性化に関わる kinase としてクローニングされた分子である。その後、*in vitro* 解析や、TAK1 を欠損するショウジョウバエを用いた研究などから、TAK1 が IL-1 receptor (IL-1R) や TLR といった自然免疫系のシグナル伝達経路における MAPK や NF- κ B の活性

化に重要であることが明らかになった。さらに最近、組織特異的なものを含む TAK1 欠損マウスが相次いで報告され、B 細胞受容体 (BCR) や T 細胞受容体 (TCR) といった、獲得免疫を担う細胞のシグナル伝達にも TAK1 が関与していることが明らかにされた。このように TAK1 は、成体での免疫システムを形成する広範な細胞種において、それらのシグナル伝達に関与する極めて重要な分子であ

る。また、TAK1 欠損マウスは早期胎生致死を示すことから、TAK1 は哺乳類の発生、胎生分化においても必須の分子であることが示唆されている。申請者は、世界に先駆けて TAK1 欠損マウス、および B 細胞、T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスを作製し解析することで TAK1 の自然、獲得、両免疫系における機能について報告してきた。

2. 研究の目的

申請者は、T 細胞特異的 TAK1 欠損マウス (*Lck^{Cre/+}Tak1^{lox/flox}*) を解析する過程で、このマウスが SPF 環境下においても自然発生的に大腸炎を発症することを見いだした。この炎症は病理学的にヒトの潰瘍性大腸炎に類似しており、小腸では全く認められなかった。T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスでは、胸腺内の CD4SP 細胞が野生型と比較して有意に減少しているものの明らかに存在していた。しかしながら CD4SP 中の CD4+CD25+Foxp3+細胞、いわゆるナチュラルレギュラトリー T (nTreg) 細胞と呼ばれる集団は T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスではほぼ完全に消失していた。Treg 細胞は近年注目されている抑制性の T 細胞集団であり、Treg 細胞の分化、発生に関わる遺伝子のノックアウトマウスでは自己免疫疾患様の症状を呈することが知られている。したがって、この nTreg 細胞の選択的欠失が T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスの大腸炎発症に関与していることが予想される。しかし、その詳細は全く不明である。本研究では、T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスの大腸炎発症のメカニズムを分子レベルで解明することを目標とする。

3. 研究の方法

Cre-loxP システムに準じた floxed Tak1 マウス (*Tak1^{lox/flox}*) と、T 細胞特異的に Cre タンパクを発現するマウス (*Lck-Cre* もしくは *Cd4-Cre*) とを掛け合わせ、T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスを作製する。T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスでは、末梢 T 細胞の著しい消失が認められるが、これは T 細胞の分化段階での TNF α によるアポトーシス亢進によるものである可能性があるため、TNF α 欠損マウスと掛け合わせ、ダブルノックアウトを作製し解析する。また、CD45.1 ノックインマウスなどのコンジュニックマウスから末梢 Treg 細胞を調整し、腸炎発症前の T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスに移入する。移入した細胞が定着し、増殖が認められるようであれば、それが宿主側の T 細胞分化に影響を及ぼすかどうかをまずフローサイトメトリーで解析する。また、野生型の末梢 Treg 細胞移入の腸炎発症に対する効果を評価する。腸管には他の免疫担当組織に比べ、レギュラトリー T 細胞の 1 つのサブセットとして考え

られている $\gamma\delta$ T 細胞が高頻度で存在しており、この $\gamma\delta$ T 細胞群が T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスにおける腸炎発症にも関与している可能性が示唆される。そこで、小腸および大腸の上皮細胞間リンパ球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球 (LPL) における T 細胞集団を野生型のそれらと、フローサイトメーターで比較する。

4. 研究成果

T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスから調整した胸腺細胞は、TNF 刺激によるアポトーシスが亢進していることから、T 細胞特異的 TAK1 欠損マウスが呈する T 細胞の分化異常、腸炎発症が TNF との二重欠損マウス (DKO) で変化するかを観察した。その結果、DKO マウスにおいても T 細胞の分化異常や腸炎発症が認められたことから、これらの異常は少なくとも TNF のみによる影響ではないことが明らかになった。また、野生型マウス脾臓より Treg 細胞を調整し、新生児 *Lck^{Cre/+}Tak1^{lox/flox}* マウスに移入を行い上記の異常が回避されるかを検討したが、移入した Treg 細胞が定着しているにもかかわらず腸炎を発症した個体が認められた。これらの結果は、胸腺での Cre による Tak1 遺伝子の消失を逃れた未熟な T 細胞亜集団が末梢で増殖することが腸炎の引き金になっていることを示唆している。新たに作製した T 細胞特異的 TAK1 欠損マウス (*Cd4^{Cre/+}Tak1^{lox/flox}*) を用いて、小腸の上皮細胞間リンパ球 (IEL)、粘膜固有層リンパ球 (LPL) における T 細胞集団を野生型のそれらと、フローサイトメーターで比較した。脾臓や末梢リンパ節などと異なり、IEL、LPL 中の CD3 陽性 T 細胞数は野生型と TAK1^{T^{KO}} マウス間で大きな差は認められなかった。T 細胞分画を細かく見ていくと、TAK1^{T^{KO}} マウスでは CD4 陽性細胞の割合が減少し、CD8 陽性細胞の割合が増加していた。また、IEL、LPL いずれにおいても CD8 $\alpha\beta$ の分画が顕著に減少していた。それに伴い、TAK1^{T^{KO}} では CD8 α 陽性細胞のほとんどが $\gamma\delta$ T 細胞であり、逆に $\alpha\beta$ T 細胞がほとんど認められなかった。以上の結果から、 $\alpha\beta$ T 細胞と異なり、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化は TAK1 に非依存的であることが示唆された。

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9件)

- 1) Abu-Dayyeh I, Shio MT, Sato S, Akira S, Cousineau B, Olivier M. Leishmania-Induced IRAK-1 Inactivation Is Mediated by SHP-1 Interacting with an Evolutionarily Conserved KTIM Motif. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2:e305., 2008.

- 2) Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, **Sato S**, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M, Takeda K. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181:8521-8527., 2008
- 3) Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, **Sato S**, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* 9:769-776., 2008.
- 4) Kawagoe T, **Sato S**, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* 9:684-691., 2008.
- 5) Nishimura J, Saiga H, **Sato S**, Okuyama M, Kayama H, Kuwata H, Matsumoto S, Nishida T, Sawa Y, Akira S, Yoshikai Y, Yamamoto M, Takeda K. Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180:4032-4039, 2008.
- 6) Yamamoto M, Uematsu S, Okamoto T, Matsuura Y, **Sato S**, Kumar H, Satoh T, Saitoh T, Takeda K, Ishii KJ, Takeuchi O, Kawai T, Akira S. Enhanced TLR-mediated NF- κ B dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204:2233-2239., 2007.
- 7) Kawagoe T, **Sato S**, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J. Exp. Med.* 204:1013-1024., 2007.
- 8) Gohda J, Irisawa M, Tanaka Y, **Sato S**, Ohtani K, Fujisawa JI, Inoue JI. HTLV-1 Tax-induced NF κ B activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25;357(1):225-230.,

2007.

- 9) **佐藤慎太郎**、レギュラトリーT細胞の分化と TAK1、臨床免疫・アレルギー科、51:7-11、2009

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 慎太郎 (SATO SHINTARO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：80447333

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし