

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07626

研究課題名(和文) GPIアンカー型タンパク質Ly6C分子による免疫応答調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of two homologous proteins Ly6C1 and Ly6C2 on immune homeostasis

研究代表者

森本 純子 (MORIMOTO, Junko)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：20451396

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)：Ly6ファミリー分子の一つであるLy6Cは、様々な免疫細胞においてその発現を認める。Ly6CにはLy6C1とLy6C2が存在し、遺伝的に両者は95%以上の相同性を有している。生体内におけるLy6Cの生理学的な役割については不明であった。我々はLy6Cの生体内での機能を解明するために、Ly6C1/6C2両方を欠失したノックアウトマウスおよびLy6C1のみを特異的に欠失したマウスを作製し、生理的機能の解明を試みた。その結果これらの分子の欠失はこれまでの報告とは異なり種々の免疫応答に全く影響を与えなかった。一方で免疫細胞によりLy6C1とLy6C2の発現パターンが異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ly6C分子の機能は現時点でも多くが不明である。Ly6Cは免疫系の細胞においてその発現が認められるが、生体内での機能はほとんど明らかにはされていなかった。本研究ではLy6C欠損マウスを初めて作製し、Ly6Cの生体内での機能を明らかにすることで、免疫応答にLy6Cがどのような役割を担っているのかを明らかにすることを試みた。本研究ではLy6Cの欠損は定常状態での免疫細胞の分布や大腸炎の病態形成に影響を与えないことが示された。今後は他の炎症性疾患やウイルス感染におけるLy6Cの機能を解析することで、Ly6Cが炎症性疾患において新たな標的分子となるかどうかを検討したい。

研究成果の概要(英文)：Ly6C comprises two homologous components of Ly6C1 and Ly6C2. Their expressions are detectable on several immune cells, such as monocyte, macrophage, granulocyte and lymphocyte. Because the role of Ly6C has not been well understood, we generated the mice deficient for both Ly6C1 and Ly6C2 with CRISPR-Cas9-mediated deletion (Ly6C1/6C2-KO). Moreover, we also generated mice deficient Ly6C1 alone (Ly6C1-KO). Ly6C1/6C2-KO mice showed major alterations in the subsets and function of monocytes and other immune cells.

研究分野：免疫学

キーワード：GPIアンカータンパク質 Ly6C 単球 大腸炎 T細胞応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Ly6C は GPI アンカー型タンパク質である Ly6 ファミリー分子の一つであり、その発現は主に血球系の細胞で認められる。Ly6C(Ly6C1 および Ly6C2)はマウスでは 15 番染色体上にあり、Ly6C1 と Ly6C2 は 95%以上の相同性を有している。ヒトでは Ly6 蛋白およびそのカウンターパートは 8 番染色体上に存在し、その機能は概ねマウスとオーバーラップしていると考えられている。Ly6C の生体内におけるリガンドは不明であり、Ly6C に関するこれまでの多くの研究は抗体を用いた Ly6C 分子のクロスリンクによる影響を解析したものであり、真の Ly6C 分子の生体内における機能は依然不明である。これまでの研究によると、潰瘍性大腸炎のモデルマウスにおいて腸管上皮細胞が炎症状態下で Ly6C を発現し、抗体を用いて Ly6C をクロスリンクすると腸管上皮細胞よりケモカインの産生が誘導されるという報告がなされている。さらに T 細胞上に発現する Ly6C に関しては、CD8 陽性 T 細胞上の Ly6C がホーミングに関与することや、CD4 陽性 T 細胞では、Ly6C の発現は T-bet や IFN- $\gamma$ によって制御されており Ly6C の発現が高い CD4 陽性 T 細胞はエフェクター機能が優れていることが報告されている。これまで Ly6C の生理的機能の解析が困難であった理由としては、上述したように 1)natural リガンドが不明であること、2)ノックアウトマウスが作製されていないことがあげられる。我々は Ly6C 分子の生理的機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いて Ly6C 欠損マウス (Ly6C1/Ly6C2 両欠損) を作製した。さらに Ly6C1 のみを欠損する Ly6C1 欠損マウスも作製し、これらのマウスを解析することで、Ly6C の生理的機能の解明に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

Ly6C 分子の機能は多くは不明である。Ly6C は主に血球細胞上でその発現が認められるが、単純な分化マーカーとして捉えられている。近年の報告では、急性ウイルス感染において Ly6C 発現が CD4 陽性 T 細胞のエフェクターおよびメモリーの識別マーカーとなることから、Ly6C シグナルが CD4 陽性 T 細胞の分化に関与する可能性が示唆されている。一方で、我々はこれまでに血球細胞ではなく、ストローマ細胞である胸腺髄質上皮細胞の一部が Ly6C を高発現することを見出しており、トランスクリプトーム解析の結果より、この集団は接着分子やケモカインを高発現していることを明らかにしている (Morimoto J, et al., *Journal of Immunology* 2018, 201(11))。腸管上皮細胞においても炎症状況下において Ly6C の発現が認められること、さらには腸管上皮細胞において Ly6C のクロスリンクによりケモカインの発現が誘導されることが報告されていることから、Ly6C が生体内で何らかの機能分子として作用していることが考えられる。我々は、生体内での Ly6C 分子の機能を明らかにするために、Ly6C 欠損マウス (Ly6C1/Ly6C2 両欠損) および Ly6C1 のみを欠損する Ly6C1 欠損マウスを作製した。本研究では、これらのマウスを使用して Ly6C が免疫応答において生体内でどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の方法

(1) **Ly6C 欠損マウスを用いた解析。**我々はまず Ly6C 欠損マウスを用いて定常状態における種々の免疫細胞について解析を行った。樹状細胞、単球、顆粒球、NKT 細胞、B 細胞、T 細胞、さらには胸腺髄質上皮細胞、胸腺内 Treg について細胞数を検討した。T 細胞については CD44 と CD62L のマーカーを用いて、エフェクターメモリー T 細胞およびセントラルメモリー T 細胞について解析を行った。腹腔内に浸潤する migratory monocyte および resident マクロファージについて解析を行った。続いて、Ly6C 欠損 T 細胞を用いて CD3/CD28 刺激による T 細胞増殖について解析を行い、Ly6C 分子の T 細胞増殖における役割について解析を行った。デキストラランサルフェイト(DSS)により誘発される大腸炎モデルを用いて大腸炎病態形成における Ly6C の機能解析を試みた。また免疫不全マウスに T 細胞を移入することで誘発する T 細胞依存的大腸炎モデルを用いてさらなる Ly6C 分子の機能解析に取り組んだ。

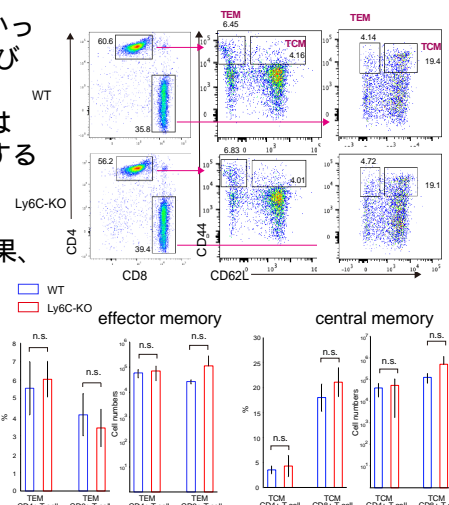
(2) **Ly6C1 特異的欠損マウスを用いた解析。**種々の免疫細胞における Ly6C1 と Ly6C2 の発現パターンを、野生型マウスと Ly6C1 特異的欠損マウスを用いることで明らかとすることを試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) Ly6C 欠損マウスを用いた解析の結果。

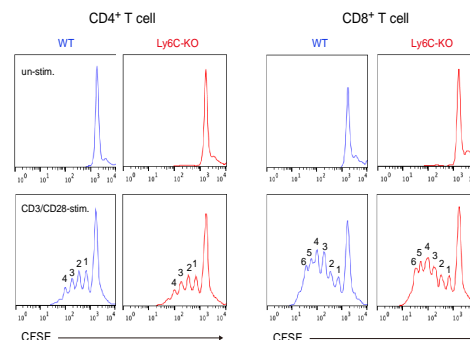
Ly6C 欠損マウスにおいて末梢血中の樹状細胞、単球、顆粒球、NKT 細胞、B 細胞、T 細胞の割合は、野生型マウスと比較して差は認められなかった。同様に胸腺髄質上皮細胞および胸腺

内 Treg の割合についても野生型マウスと差は認めなかった。腹腔内に存在する migratory monocyte および resident マクロファージの割合に関しても、野生型マウスと比較し差は認めなかった。これまでの報告で Ly6C はメモリー CD8 陽性 T 細胞のリンパ節内での保持に関与することが示唆されてきたが、Ly6C 欠損マウスを用いて脾臓および鼠径リンパ節におけるメモリー CD4 陽性 T 細胞およびメモリー CD8 陽性 T 細胞の割合を解析した結果、Ly6C 欠損マウスと野生型マウス間で差は認めなかった (図 1)。よって定常状態における免疫細胞の分布は Ly6C 分子の欠損によって影響を受けないことが明らかとなった。



(図 1) Ly6C 欠損マウスの鼠径リンパ節におけるメモリー T 細胞の割合

Ly6C 欠損 T 細胞を CD3/CD28 抗体で刺激し増殖を解析した結果、CD4 および CD8 陽性 T 細胞ともに増殖能に差は認めなかった (図 2)。この結果より T 細胞上の Ly6C 分子は T 細胞増殖には影響を与えないことが明らかとなった。



(図 2) Ly6C 欠損マウス T 細胞の増殖能の解析

3.5%の DSS 入り水を 7 日間飲水させることで大腸炎を誘発した。体重減少および生存率を解析したが、Ly6C 欠損マウスと野生型マウス間で有意な差は認めず、両グループとも day8 にかけて 20%程度の体重減少を認めたが、その後回復した (図 3)。さらに Rag2 欠損マウスへの T 細胞移入によって誘導される T 細胞依存的大腸炎の誘発を行った。Ly6C 欠損マウスおよび野生型マウスの脾臓から調整した naïve T 細胞を Rag2 欠損マウスに移入した。その結果、Ly6C 欠損マウス由来の T 細胞を移入した個体と、野生型マウスの T 細胞を移入した個体では病態形成に差は認めなかった。よって以上の結果より、Ly6C の発現は T 細胞上の Ly6C の発現も併せて、大腸炎の病態形成に関与しないことが明らかとなった。

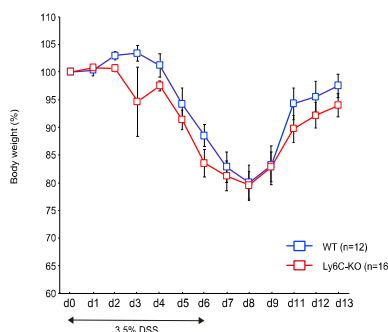


図 3. Ly6C 欠損マウスにおける DSS 誘発性大腸炎の病態形成

## (2) Ly6C1 特異的欠損マウスを用いた解析の結果。

種々の免疫細胞における Ly6C1 および Ly6C2 の発現パターンについて Ly6C1 特異的欠損マウスを用いて野生型マウスと比較検討することで解析を行った。胸腺髄質上皮細胞において Ly6C を発現する細胞は、約半分が Ly6C1 を発現していた。一方で単球、マクロファージ、樹状細胞は Ly6C2 を dominant に発現していた。T 細胞に関しては CD8 陽性 T 細胞が Ly6C2 を dominant に発現する一方で、CD4 陽性 T 細胞は 90%程度が Ly6C1 を発現し、残りは Ly6C2 を発現していた。ただし、この解析方法では Ly6C1/Ly6C2 両方を発現している細胞に関しては解析ができないが、この結果より、免疫細胞の種類によって Ly6C1 と Ly6C2 の発現が異なることが明らかとなった。免疫細胞における Ly6C の発現の使い分けがどのような免疫学的意義を持つのかは現時点では不明である。我々はこれらの研究成果を Immunohorizons 2022, 6(3) に発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto M, Tsuneyama K, Morimoto J, Hosomichi K, Matsumoto M, Nishijima H	4. 巻 32
2. 論文標題 Tissue-specific autoimmunity controlled by Aire in thymic and peripheral tolerance mechanism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 117-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz066	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 Ferreirinha P, Ribeiro C, Morimoto J, Landry JJM, Matsumoto M, Meireles C, White AJ, Ohigashi I, Araujo L, Benes V, Takahama Y, Anderson G, Matsumoto M, Alves N	4. 巻 51
2. 論文標題 A novel method to identify Post-Aire stages of medullary thymic epithelial cell differentiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 311-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/eji.202048764	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 Nishijima H, Matsumoto M, Morimoto J, Hosomichi K, Akiyama N, Akiyama T, Oya T, Tsuneyama K, Yoshida H, Matsumoto M	4. 巻 208
2. 論文標題 Aire controls heterogeneity of medullary thymic epithelial cells for the expression of self-antigens.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 303-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100692.	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 -

1. 著者名 Morimoto J, Matsumoto M, Miyazawa R, Yoshida H, Tsuneyama K, Matsumoto M	4. 巻 38
2. 論文標題 Aire suppresses CTLA-4 expression from the thymic stroma to control autoimmunity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110384.	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 -

1. 著者名 Morimoto J, Matsumoto M, Miyazawa R, Oya T, Tsuneyama K, Matsumoto M	4. 巻 6
2. 論文標題 No major impact of two homologous proteins Ly6C1 and Ly6C2 on immune homeostasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunohorizons	6. 最初と最後の頁 202-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2100114.	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森本 純子、松本 満
2. 発表標題 胸腺髄質上皮細胞からDCへの抗原転移におけるAireの役割
3. 学会等名 第40回日本胸腺研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsumoto M, Nishijima H, Morimoto J, Tsuneyama K, Matsumoto M
2. 発表標題 Tissue-specific autoimmunity controlled by Aire, a gene response for APECED
3. 学会等名 The Virtual World Conference on Rare Disease (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morimoto J, Hitoshi Nishijima, Minoru Matsumoto, Mitsuru Matsumoto
2. 発表標題 Antigen Transfer from thymic epithelial cells to DCs contributes to the production of thymic Tregs
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto M, Nishijima H, Morimoto J, Tsuneyama K, Matsumoto M
2. 発表標題 Characterization of Aire-expressing DCs with a high-sensitivity and high-fidelity Aire-reporter strain.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西嶋仁、杉田瑞季、森本純子、松本穰、松本満
2. 発表標題 Aireを発現する胸腺髄質上皮細胞の免疫学的機能とトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本純子、西嶋仁、松本穰、松本満
2. 発表標題 Treg誘導に関与する胸腺内樹状細胞サブセットとAireの機能解析
3. 学会等名 第2回若手の会（新学術領域ネオセルフの生成・機能・構造）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 森本 純子、宮澤 龍一郎、松本 穰、松本 満	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 別冊Bio Clinica 慢性炎症と疾患	

1. 著者名 森本 純子、宮澤 龍一郎、松本 稯、松本 満	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 Precision Medicine 橋渡し研究の推進	

〔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	松本 満  (MATSUMOTO Mitsuru)  (60221595)	徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・教授    (16101)	

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