

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790463
 研究課題名（和文） 新規 STAT 調節因子の T 細胞における機能解析
 研究課題名（英文） Characterization of a novel STAT regulating factor in T cells
 研究代表者
 上村 大輔 (KAMIMURA DAISUKE)
 大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
 研究者番号：20391922

研究成果の概要（和文）：
 T 細胞は獲得免疫系の中心となる細胞であり、体内ではその数が一定に保たれる機構がある。この T 細胞恒常性の維持機構を理解するために、変異剤を用いてマウスに突然変異を導入し、T 細胞に異常を持つ個体をスクリーニングし、ナイーブ T 細胞数が激減している変異個体(T-Red マウス)を得た。その責任遺伝子は、物質輸送に関わる膜タンパク質として知られる遺伝子であったが、これ以外にも核内で DNA 修復機構に関与するという新しい機能が示唆され、それが T 細胞生存に重要である事を示した。

研究成果の概要（英文）：
 T cells play a central role in the adaptive immune system and there is a mechanism that maintains T cell number relatively constant in vivo. To gain a new insight into this homeostatic system, we used a mutagen to introduce point mutations in mice and screened them based on abnormal T cell phenotypes. We obtained a mutant with reduced naive T cell population (T-Red mice). The responsible gene is known to function in protein shuttling, but we found this gene is also involved in DNA repair pathway. Experimental data suggested that this new function contributes to the homeostasis of naive T cells in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：T 細胞、ストレス応答、恒常性

1. 研究開始当初の背景

T 細胞は、胸腺内での発生段階において、T 細胞受容体遺伝子座が体細胞組換えを起し(V(D)J 組換え)、多様な抗原に反応しうる T 細胞が作り出される。胸腺で適切な選択を受

けた T 細胞は、末梢に出てゆき体内を循環し、抗原提示細胞上の MHC 分子に提示された抗原を探索する。外来抗原に未感作の T 細胞は、ナイーブ T 細胞と呼ばれ、CD44 分子の発現が低レベルであり、その生存には、主要組織

適合複合体(MHC)とT細胞受容体(TCR)の結合による弱いシグナルとサイトカインであるインターロイキン7が重要であることが知られている。通常、ナイーブT細胞はマウス体内で数十日という半減期をもつ。また新たなナイーブT細胞は日々胸腺から供給されており、体内でのT細胞数はほぼ一定に保たれている。

感染やワクチン接種などにより、樹状細胞に提示された外来抗原ペプチドに出会うと、抗原特異的なナイーブT細胞は活性化および増殖し、サイトカイン産生や細胞障害性メカニズムといったエフェクター機能を発揮するエフェクター細胞へ分化する。炎症が収束するとエフェクター細胞のほとんどはアポトーシスにより除去されるが、その一部はメモリー細胞として長期間体内で維持される。メモリーT細胞は、ナイーブT細胞よりも迅速にエフェクター活性を発揮することが可能であり、このことはワクチン接種による病原体排除の増強の免疫学的基盤である。また、適応免疫系に中心的役割を果たすT細胞の減少や機能不全が、日和見感染を起こすことは周知の事実である。さらに我々は、T細胞の恒常性の破綻(例えば持続的な活性化)が関節リウマチや多発性硬化症といった自己免疫疾患を招くことをマウスモデルを用いて証明している。このように、T細胞の恒常性の異常は、日和見感染や免疫疾患に直結し、したがってT細胞恒常性の人為的制御は臨床的に多くの可能性を持つが、そのためにはT細胞の恒常性の分子メカニズムのより深い理解が必要である。

2. 研究の目的

獲得免疫系の中心であるT細胞は、胸腺からの供給と細胞死のバランスによって、体内でその数がほぼ一定に保たれている。このT細胞の恒常性の異常は、自己免疫疾患や日和見感染などの病気を引き起こす原因となる。この恒常性の分子メカニズムをより深く理解するために、変異剤を用いてマウス個体に点変異を導入し、T細胞に異常を来す個体をスクリーニングした。この方法では、従来の知見にとらわれずに、T細胞恒常性に関与する遺伝子を同定できる利点がある。スクリーニングによってT細胞が激減している変異マウス(T-Red マウス)を得た。この変異マウスの原因遺伝子の機能解析から、T細胞恒常性について新たな知見を得る事を目的とする。

3. 研究の方法

我々は、*in vivo* においてT細胞の機能や発生に影響する分子を、既知のメカニズムに捕われず同定するために、N-aethyl N-nitrosourea (ENU)を用いてC57BL/6 (B6) マウスにランダムな突然変異を導入し、T

細胞に異常を来す個体を、末梢血をフローサイトメーターによって解析することでスクリーニングした。その結果、ナイーブT細胞数が大きく減少している変異マウス(T-Red マウス)を得た。この変異マウスの系統を樹立するために、遺伝子背景が同一であるB6マウスと交配し、F2世代で同じ表現型を示す個体を単離した。この表現型を担う責任遺伝子を同定するために、T-Red変異マウス(B6系統)を正常なC3H系統マウスを交配し、F2世代で見つかった変異個体をSNPタイピングすることにより、第7染色体の約400遺伝子を含む責任領域を決定した。この領域に含まれる遺伝子群のDNA配列を順次決定することにより、T-Redマウスに存在する点変異を同定し、責任遺伝子を決定した。またこの責任遺伝子の条件的ノックアウトマウスを作製し、T-Redマウスと表現型が同じであることを確認した。さらにこの条件的ノックアウトマウスをT細胞特異的Creトランスジェニックマウス(CD4-Cre Tg)と交配し、T細胞内での機能を検討した。T-Redマウスの免疫応答能を検討するために、関節リウマチモデルであるコラーゲン関節炎や感染実験などを行った。また抗原特異的な免疫応答を検出するためにT-RedマウスをOT-1トランスジェニックマウスなどの抗原特異的TCRトランスジェニックマウスと交配し、2重変異マウスを得た。さらに、T-Red遺伝子産物が会合するタンパク質を網羅的に同定するために、培養細胞内でT-Red遺伝子産物を過剰発現し、免疫沈降物に含まれるタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。その後、その遺伝子産物の機能を免疫学的、分子生物学的、および生化学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

T細胞は獲得免疫系の中心となる細胞であり、体内ではその数が一定に保たれる機構がある。この恒常性の破綻は、日和見感染や自己免疫疾患を招く可能性があり、T細胞恒常性の分子メカニズムを深く理解することは非常に大切である。このT細胞恒常性の維持機構をより深く理解するために、変異剤ENUを用いてマウス個体に突然変異を導入し、T細胞の割合に異常を持つ個体をスクリーニングした。その結果、ナイーブT細胞数が激減している変異個体(T-Redマウス)を得ることができた。この変異個体は、正常のB6マウスとの第一世代(F1)では表現型が認められず、F1どうしを交配した第2世代(F2)の約25%にナイーブT細胞減少の表現型が見られたことから、この変異は常染色体劣性遺伝形式をとることが判明した。T-Redマウスでは、ナイーブT細胞数は減少しているものの、メ

メモリーT細胞数やB細胞や樹状細胞といったその他の免疫細胞の細胞数は正常であった。また骨髄移植実験の結果、この表現型は骨髄細胞の変異が原因であることが証明された。このことは、T-Redマウスの責任遺伝子が、ナイーブT細胞の恒常性を特異的に調節していることを示唆している。

正常なC3H系統とB6系統であるT-Redマウスを交配し、そのF2世代のSNP解析の結果、T-Redマウスの責任遺伝子は、ER-Golgiで物質輸送に関わる膜タンパク質として知られる遺伝子であった。塩基配列決定からは責任領域にある点変異は上記1つのみであったが、ENUによる点変異は複数導入されるため、他の変異による影響を完全に排除するために、この責任遺伝子のノックアウトマウスを作製した。このノックアウトマウスは正常に生育したが、T-Redマウスと同様にナイーブT細胞数が野生型マウスと比較して大きく減少していた。CD4-Creトランスジェニックマウスと交配することによって得られたT細胞特異的遺伝子ノックアウトマウスの場合においても、同じ表現型が観察されたので、この表現型を担う責任遺伝子はT細胞内で機能すると結論した。この責任遺伝子は遺伝子ファミリーを形成しており、他のファミリーメンバーの機能を確認するために、これら遺伝子の変異マウスを導入した。このうち1つのファミリーメンバーはT細胞で発現しておらず、もう一つのファミリーメンバーの変異マウスは胎生致死であった。

次に、T-RedマウスでナイーブT細胞が減少していることが、免疫応答に影響するかどうかを検討するために、関節リウマチのマウスモデルであるコラーゲン誘導性関節炎や細菌感染実験などを行った。その結果、T-Redマウスでは、野生型コントロールマウスと比較して、行った全ての実験系で免疫応答が减弱していた。

なぜT-RedマウスのナイーブT細胞が減少するのかという疑問に答えるために、野生型およびT-RedマウスからナイーブT細胞を単離して*in vitro*で培養すると、T-Redマウス由来のナイーブT細胞はアポトーシスの亢進を示した。一方で、T-Redマウスの表現型と一致して、メモリーT細胞の生存性は野生型マウスとT-Redマウスの間で変化がなかった。このことは、T-RedマウスのナイーブT細胞の減少は、胸腺からのT細胞の供給不全というよりはむしろ末梢のナイーブT細胞の細胞死が促進していることが原因であることが示唆された。T細胞の細胞死を司ることで知られるアポトーシス促進因子Bimの発現量を比較してみると、上記の*in vitro*の結果と一致して、T-RedマウスのナイーブT細胞でBim発現レベルが大きく上昇していた。Bimの転写因子として知られるFoxOファミリー

分子の活性化、そしてFoxOファミリーをリン酸化するMst1キナーゼも同様にT-RedマウスのナイーブT細胞でのみ増強されており、これらの結果から、T-RedマウスのナイーブT細胞ではMst1/FoxO/Bimのストレス経路が亢進していて、これによりアポトーシスに陥る可能性が示唆された。

この責任遺伝子のT-Red変異が、どのようなメカニズムによって前述のMst1/FoxO/Bimのストレス経路を誘導し、T細胞恒常性を破綻させているかを検討するために、この遺伝子産物と会合するタンパク質を質量分析によって網羅的に探索した。このうちSTATはT-Red変異により結合能が低下したことからSTATの新規調節因子と考えられるが、T-RedマウスとT細胞受容体トランスジェニック(TCR-Tg)マウスとの交配の結果、V(D)J遺伝子再構成が低下するTCR-Tg背景ではT細胞数が減少するというT-Redの表現型が認められなくなったことから、T-Redの表現型を説明する目的で、同じく質量分析によってT-Red遺伝子産物と結合が確認された、DNA修復機構に深く関与するキナーゼDNA-PKに着目した。共焦点顕微鏡を用いてT細胞内の局在を観察すると、両タンパク質の局在が一致することが判明した。野生型マウスでは、T細胞発生段階の胸腺細胞では両者ともに主に核内に、末梢の成熟したナイーブT細胞では両者ともに主に細胞質側に存在するというように発生段階によって細胞内局在が変化することが明らかになった。一方でT-Redマウスでは、胸腺細胞では野生型マウスと同様に両タンパク質とも核内にシグナルが認められたが、末梢のナイーブT細胞においても両タンパク質とも核内に留まっている割合が明らかに多かった。さらに免疫沈降法を用いた生化学的解析によっても両タンパク質の会合が確認され、T-Red変異を持つ分子の場合にはこの会合強度が弱い事を明らかにした。さらに、T-Red責任遺伝子にさまざまな点変異を分子生物学的手法を用いて導入し、DNA-PKとの会合を調べたところ、T-Red責任遺伝子産物の細胞内領域がDNA-PKとの会合に必要であることが明らかになった。これらの結果は、T-Red原因遺伝子がDNA-PKとともに機能する可能性を示している。

DNA-PKはT細胞発生に不可欠なV(D)J組換え過程およびDNA修復機構に深く関与する酵素であることから、T-Redマウスの胸腺細胞のV(D)J組換えに異常があるか検討した。その結果、V(D)J組換えの頻度、とくに遺伝子断片間の長さが長い場合に組換え頻度が低下するという変化は認められたものの、TCR断片の結合自体に影響はみられなかった。このことから、DNA-PKのもう一つの機能であるDNA修復過程についての異常を検討した。DNA

ダメージの指標である gH2AX 分子を染色すると、野生型マウスのナイーブ T 細胞ではほとんどシグナルが認められないのに対し、T-Red ナイーブ T 細胞では、gH2AX 陽性の細胞の割合が顕著に多かった。実際に DNA に損傷があるかどうかコメントアッセイによって調べると、T-Red マウス由来のナイーブ T 細胞は野生型マウスのナイーブ T 細胞よりも多くの DNA 損傷が検出された。DNA 損傷によって Mst1 キナーゼが活性化されることは以前の報告から明らかになっていることと、前述の TCR-Tg/T-Red マウスが正常であること、そして T-Red ナイーブ T 細胞では通常核外に存在する DNA-PK および T-Red 遺伝子産物が核内にあることを考え合わせると、T-Red マウス由来ナイーブ T 細胞では、V(D)J 組換えによって誘導される TCR 遺伝子座の DNA 損傷の修復に異常があり、これによってストレス応答が起こりアポトーシスに陥る可能性が考えられた。

これらのデータから、T-Red 原因遺伝子産物は ER-Golgi で物質輸送という既知の機能以外にも核内で DNA 修復機構、特に DNA 修復完了後の反応終了機構に関与するという新しい機能が示唆され、それがナイーブ T 細胞の生存に重要であることを明らかにした。T-Red マウスのナイーブ T 細胞は、生理的な DNA 組換えである V(D)J 遺伝子再構成完了後に DNA-PK 複合体が活性を保ち、ストレス応答によってアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。

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 2 件)

- (1) Arima Y., M. Harada, D. Kamimura, J-H. Park, F. Kawano, F. E. Yull, T. Kawamoto, Y. Iwakura, U. A. K. Betz, G. Márquez, T. S. Blackwell, Y. Ohira, T. Hirano, and M. Murakami. Regional Neural Activation Defines a Gateway for Autoreactive T Cells to Cross the Blood-Brain Barrier. *Cell*. 査読有 148: 447-457, 2012
- (2) Murakami, M., Y. Okuyama, H. Ogura, S. Asano, Y. Arima, M. Tsuruoka, M. Harada, M. Kanamoto, Y. Sawa, Y. Iwakura, K. Takatsu, D. Kamimura, T. Hirano. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J. Exp. Med.* 査読有 208: 103-114, 2011

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Daisuke Kamimura, Jing-jing Jiang, Shunji Mitani, Naoko Ueda, Mineko Tsuruoka, Takanori Hasegawa, Ikuko Miura, Shigeharu Wakana, Toshiyuki Fukada, and Toshio Hirano, and Masaaki Murakami. An ENU-mutant mouse, which increased a stress signaling in naive T cells. 日本免疫学会、2011 年 11 月 28 日、千葉幕張メッセ
- (2) Kamimura D, Khiong K, Kitabayashi C, Ueda N, Sawa S, Sakamoto A, Kotzin BL, Rozzo SJ, Ishihara K, Verella-Garcia M, Kappler J, Marrack P, Hirano T, and Murakami M. Homeostatic proliferation of CD4+ T cells is involved in the pathogenesis of a mouse model of Omenn syndrome. 第 14 回国際免疫学会、2010 年 8 月 22-27 日、神戸国際展示場

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molonc/www/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 大輔 (KAMIMURA DAISUKE)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：20391912

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：