

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 06 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手B研究

研究期間：平成23年度～平成24年度

課題番号：23790556

研究課題名（和文）胸腺細胞における Gasp 過剰発現の影響

研究課題名（英文）Effect of Gasp overexpression in thymocytes

研究代表者

パトリックマイケル（Patrick, Michael）

国立国際医療研究センター・免疫病理研究部・上級研究員

研究者番号：10589782

研究成果の概要（和文）：T細胞分化における Gasp (Themis) の機能を明らかにするために、T細胞特異的に Themis を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し検討した。胸腺で Gasp を過剰発現させると、正の選択が単純に増強されるのではなく、CD4 系列の正の選択が増強される一方で、CD8 系列の正の選択は阻害されることが明らかとなった。さらに、末梢の成熟 T 細胞で Themis を過剰発現させると、サイトカイン産生のバランスが変化することを明らかにした。以上の結果から、Themis は T 受容体依存性のシグナル伝達経路に関与している可能性が高いことが示された。

研究成果の概要（英文）：In order to study the role of Gasp (Themis) in T cell development, we made transgenic mice overexpressing Themis in a T cell specific manner. In the thymus Themis overexpression augmented positive selection in a CD4 T cell specific manner, while positive selection of CD8 cells was inhibited. Furthermore, cytokine production was altered in Themis overexpressing peripheral T cells. These data show for the first time a role for Themis in T cell receptor-dependent signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：

キーワード：胸腺、分化、T細胞

1. 研究開始当初の背景

胸腺内における T 細胞分化の正、負の選択の分子機構を解明することは、自己免疫疾患を理解する上でも極めて重要である。我々は Themis (Gasp; Gene ID: 210757) 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、この新規遺伝子が T 細胞の正の選択に必須であるが、負の選択には関係ないことを明らかにした [PNAS, 106:16345-16350]。すなわち、Themis は正の選択にのみ関与する極めてユニークな蛋白

質である。しかしながら、この分子の機能はわかっておらず、また Themis を過剰発現した際の表現型も全く報告されていない。

2. 研究の目的

前述のように、Themis は胸腺における正の選択に必須の新規遺伝子であるが、本分子の詳細な機能については未だわかっていない。そこで本研究では、T 細胞特異的に Themis を過剰発現するトランスジェニックマウスを

新たに作製し、その表現型を解析することにより、Themis の分子機能の解明に迫ろうというものである。Themis 分子を欠失すると、正の選択は強く阻害されるので、この分子を多量に発現すると、正の選択やT細胞分化がどのような影響を受けるかは非常に興味深い。さらに、本研究の結果はT細胞分化不全や機能不全症の病原性の理解にも役立つものと考えられる。そこで、ヒト CD2 プロモーターの制御下でT細胞特異的に Themis を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、その表現型を解析した。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウスの作製

Themis の ORF クローン (DNAFORM, Japan) を用いて PCR にて cDNA を増幅し、その cDNA を human CD2 プロモーターのターゲティングベクターにクローニングした。作製したターゲティングベクターを C57BL/6 マウスの単細胞胚にマイクロインジェクションし、ICR 雌マウスの卵管へ移入し T細胞特異的に Themis を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。

(2) フローサイトメトリー

胸腺および脾臓の組織を PBS バッファーに入れ 100 μ m ナイロンメッシュで潰した後、そのセルサスペンションを 40 μ m フィルターに通した。その後、細胞数をカウントし 1-2 $\times 10^6$ 細胞を 96 ウェルプレートに入れて遠心を行い、各蛍光標識抗体 [CD4 抗体 (GK1.5), CD8 α 抗体 (53.6.7)], TCR β 抗体 (H57) など) を加え、遮光して 4 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。インキュベーション後、抗体反応済みの細胞を FACS Buffer (0.2% BSA / 0.1% NaN₃ / PBS) で洗浄し、その細胞を BD FACS Canto II (Becton, Dickinson and Company, Japan) フローサイトメーターを用いて測定を行った。その後、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, Oregon) を用いて詳細なデータ解析を行った。

(3) ウェスタンブロット法

細胞を Lysis Buffer (0.5% NP-40 / 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 150 mM NaCl / 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail / 1x Protease Inhibitor Cocktail) で溶解し、10000g 10 分間遠心後、上清を回収しトータルタンパク質を抽出した。その後、サンプルバッファーと混ぜて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱処理を行った。この細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、PVDF 膜に転写後、5%BSA in TBST にて室温 1 時間ブロッキングを行った。次に、各一次抗体と反応させ

TBST にて洗浄後、HRP 標識抗ウサギ/マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) の二次抗体反応を行い、LumiGLO Reagent and Peroxide (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) で発色させ LAS-4000 イメージアナライザー (GE Healthcare) にて検出した。

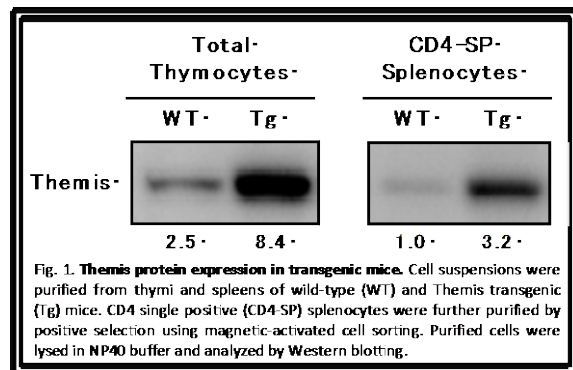
(4) CD4 T細胞の単離および ELISA 解析

脾臓細胞に Biotin 標識された抗マウス CD4 抗体 (clone GK1.5) を加え、4 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。MACS Buffer (2 mM EDTA / 0.5% BSA / PBS) で 3 回洗浄後、175 μ l の MACS Buffer で細胞を再浮遊し Streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec) を 25 μ l 添加し 4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。その細胞懸濁液を MACS Buffer で 2 回洗浄後、Separation buffer にてリサスペンドした。その細胞懸濁液を AutoMACS によりポジティブセレクションを行い、脾臓細胞に含まれる脾臓 CD4+T 細胞を単離した。あらかじめ前日に抗 CD3 ϵ 抗体 (5 μ g/mL, clone 2C11) を平底の 96 ウェルプレートに吸着させておき、そのプレートへ単離した CD4+T 細胞 0.25 million cell/well と抗 CD28 抗体 (5 μ g/mL, clone 37.51) を播き 16-24 時間刺激を行い、その培養上清を回収した。

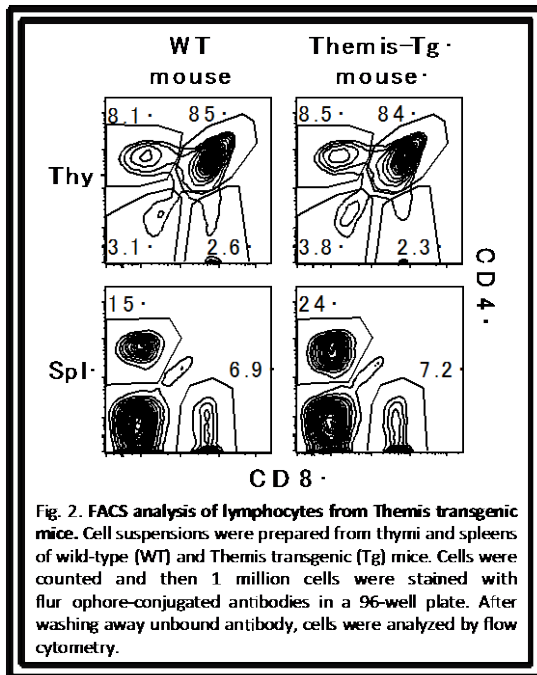
回収した培養上清を Ready Set Go IL-2 ELISA (eBioscience, San Diego, California) を用いて、製品マニュアルに従い IL-2 の産生量を測定した。

4. 研究成果

多くの Tg ファウンダーの Themis 蛋白発現量をウェスタンブロットにて検定し、最終的に



野生型の 3 倍程度の蛋白量を過剰発現する Tg マウス系統を樹立した。(Fig. 1)。Tg マウスは胸腺においても末梢においても、野生型の 3 倍程度の Themis 蛋白質を過剰発現していた。この Tg マウスの解析により、CD4 系列の正の選択がわずかに増加していることが明らかとなった (FIG. 2)。



胸腺における CD8 系列の選択においては統計的な有意差は見られなかった。末梢の脾臓細胞においては、CD4SP-T 細胞の数は明らかに増加し、CD8-SP の数は微弱ではあるが統計的に有意に減少していた。Themis 欠損マウスにおいては CD4 系列も CD8 系列も同様にその分化が阻害されたことから、この過剰発現マウスの表現型は予想外であった。TCR トランスジェニックマウスを用いた詳細な解析の結果も、CD4 系列の正の選択は増強するが、CD8 系列の正の選択は減弱していることが確認され、Themis の過剰発現による影響は CD4 系列と CD8 系列とでは異なることが初めて明らかとなった。

また、HY-TCR トランスジェニックマウスとの交配により負の選択に対する効果を検討したが、Themis 過剰発現によって負の選択は全く影響を受けないことが明らかとなった。次に、Themis を過剰発現する成熟 CD4T 細胞の機能を検定した。TCR 刺激による IL-2 産生は Themis-Tg で野生型よりも大きく亢進していることがわかった。しかしながら、細胞の増殖自体の増加はみられなかった。これらの結果から、Themis が TCR 依存性のシグナル伝達に何らかの役割を果たしていることを示唆している。しかしながら、今のところ、TCR 依存性の ERK 活性化、Ca イオン流入などのシグナル伝達においては違いは見られていない。今後は AKT 経路、NFκB 経路など、他のシグナル伝達経路にも着目して解析を進める必要がある。

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 5 件)

(1) Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Hayakawa K, Suzuki H. Differential requirement for RhoH in development of TCRαβ CD8αα IELs and other types of T cells. Immunol Lett. 2013 Mar;151 (1-2):1-9.

(2) Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, Sato Y, Eshima K, Kirikae T, Iemura S, Shirai M, Abe T, Natsume T, Sasazuki T, Suzuki H. Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 22; 106(38):16345-50.

(3) Sato Y, Oda H, Patrick MS, Baba Y, Rus'd AA, Azuma Y, Abe T, Shirai M, Suzuki H. Rac GTPases are involved in development, survival and homeostasis of T cells. Immunol Lett. 2009 May 14; 124(1): 27-34.

(4) Oda H, Fujimoto M, Patrick MS, Chida D, Sato Y, Azuma Y, Aoki H, Abe T, Suzuki H, Shirai M. RhoH plays critical roles in Fc epsilon RI-dependent signal transduction in mast cells. J Immunol. 2009 Jan 15;182(2):957-62.

(5) Oda H, Suzuki H, Sakai K, Kitahara S, Patrick MS, Azuma Y, Sugi K, Kitamura T, Kaye J, Shirai M. Rac1-mediated Bcl-2 induction is critical in antigen-induced CD4 single-positive differentiation of a CD4+CD8+ immature thymocyte line. J Leukoc Biol. 2007 Feb; 81(2): 500-8.

[学会発表] (計 3 件)

(1) パトリックマイケル
2011年11月27日
日本免疫学会、幕張メッセ
Themis (Gasp) is indispensable in early thymocyte positive selection

(2) 岡田季之
2011年11月27日
日本免疫学会、幕張メッセ

Analysis of Themis (Gasp) Transgenic mice

(3) 岡田季之

2011年6月10日

Kyoto T Cell Conference、京都平安ホテル
Gasp (Themis) トランスジェニックマウスの解析

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

(1) パトリックマイケル、鈴木春巳
胸腺内の正の選択に必須な新規分子
Gasp(Themis)の発現
感染・炎症・免疫 40: 174 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

パトリックマイケル (Patrick, Michael)
国立国際医療研究センター・免疫病理研究
部・上級研究員
研究者番号: 10589782

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし