

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500979

研究課題名(和文) 脂質栄養が胸腺の支持細胞の機能と免疫細胞(T細胞)産生に及ぼす効果の検討

研究課題名(英文) Effects of lipids on the function of thymic epithelial cells

研究代表者

安達 泰弘 (ADACHI, Yasuhiro)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10346546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスと表皮型脂肪酸結合タンパク(FABP5)ノックアウトマウス(FABP5-KO)の比較により、FABP5と脂肪酸が胸腺上皮細胞の形態、増殖能、及び胸腺機能に及ぼす効果について検討した。その結果、長鎖不飽和脂肪酸は胸腺上皮細胞の形態と機能に大きな影響は及ぼさず、増殖に促進的であった。同様に、レチノイン酸もFABP5を介して増殖に促進的に機能すると考えられた。胸腺細胞の分化状態と分化に必要な液性因子の遺伝子発現においても両マウス系統間で差は無かった。これらの結果から、脂肪酸(長鎖不飽和脂肪酸とレチノイン酸)はFABP5を介して胸腺上皮細胞の増殖・分化制御に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the effect of fatty acids and function of fatty acid-binding protein 5 (FABP5) in thymopoiesis, morphology and proliferation/differentiation of thymic epithelial cells through the comparison of wild-type (WT) and FABP5-knock out (KO) mice. We found that long chain-polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) and retinoic acid (RA) promotes proliferation of cultured thymic epithelial cells via FABP5 rather than the specific function of thymic epithelial cells which regulates differentiation of thymocytes.

研究分野：分子細胞生物学、解剖学

キーワード：胸腺上皮細胞 脂肪酸結合タンパク FABP 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

統合失調症・双極性障害等の精神疾患や型糖尿病や脂質異常症等の生活習慣病の発症には、胎児期に暴露される脂質栄養環境が大きく関係している事がわかりつつある。

脂質の中でも特に注目されているのが魚油に多く含まれる n-3 系長鎖不飽和脂肪酸と肉類に含まれる n-6 系長鎖不飽和脂肪酸である。これらは生体における重要な栄養素であると同時に生体反応の調節因子としても機能しており、末梢免疫系においてはリンパ球に直接作用して炎症反応の強度を調節する事が数多く報告されている。

リンパ球は T 細胞と B 細胞に大別され、B 細胞は骨髄で、そして全ての T 細胞は胸腺で分化する。胸腺は未熟な T 細胞である胸腺細胞が分化・成熟する場であり、その過程は胸腺上皮細胞によって厳密に制御され、最終的には非自己にのみ反応し排除する機能的な T 細胞が産生されることになる。

胸腺上皮細胞による胸腺細胞の分化誘導には多くの因子が関わる事が示されているが、近年、母ラットの脂質栄養状態を変化させると、胎仔の胸腺細胞の分化状態が変化することが報告されている (Childs et al., 2010)。一方で、単離した胸腺細胞に脂肪酸を直接作用させると直ちに死滅する (Prasad et al., 2010) ことから、胸腺微小環境において脂肪酸は胸腺細胞に直接作用するのではなく、むしろ胸腺上皮細胞を含む支持細胞側に作用すると考えられたが、どのような分子機序でどう影響するのかについては全くわかっていないのが現状である。

脂肪酸結合タンパク (fatty acid-binding protein: FABP) は約 130 アミノ酸から成る低分子量 (14-15 kDa) 細胞質タンパク分子である。FABP は細胞内で脂肪酸に結合して可溶化し、脂肪酸の輸送や貯蔵、細胞の増殖・分化に関するシグナル伝達の調節等に幅広く関与していると考えられている。また分子ファミリーを形成し、各組織・細胞ごとに単一または複数の FABP 分子種が発現していることが知られているが、特異的な機能については不明な点が多い。

我々は、免疫系で発現する上皮型 FABP (epidermal type, E-FABP, FABP5) に着目し、FABP が液性因子産生を調節すること (Kitanaka et al., 2006, Yamamoto et al., 2008) 更に一部の胸腺上皮細胞では 2 種類の FABP (FABP4, FABP5) が発現し、モデル細胞系で液性因子産生を調節し得ることを見出した (Adachi et al., 2012)。しかしながら、成体胸腺の機能における脂肪酸の影響や、FABP の胸腺特異的な機能については、未だ理解が不十分である。

2. 研究の目的

本研究計画では、脂肪酸が FABP を介し胸腺機能にどのような影響を及ぼすのか、また

その結果、胸腺で起こっている胸腺細胞の分化がどのように変化するのかについて、C57BL/6N (野生型) と FABP5-KO マウス胸腺の比較により検討した。

3. 研究の方法

(1) 初代培養系の構築と細胞形態の観察

生後 3 日以内の野生型及び FABP5-KO マウス新生仔より胸腺を摘出・細片化し、1 mg/ml collagenase/DNase I で消化後、Röpke の方法 (Röpke, 2002) による無血清初代培養系を構築した。培養 3 日目で顕微鏡画像を取得し、細胞形態の観察を行った。

(2) 細胞増殖アッセイ

培養 12 日目に trypsin/EDTA で増殖した上皮細胞を回収し、 5×10^3 個ずつ 4-chamber スライドに播種した。48 時間後に種々の脂肪酸を含む培養液に交換し、48 時間の刺激後に EdU (Invitrogen) 添加による増殖細胞の標識 (4 時間、37 °C) を行った (Pinto et al., 2013)。EdU の検出操作後に抗 Ki-67 抗体による染色を行い、蛍光顕微鏡下で EdU 陽性細胞及び EdU/Ki-67 共陽性細胞数をカウントし、細胞増殖における各種脂肪酸の効果と FABP5 の役割について検討した。

(3) 成体胸腺における胸腺細胞分化の検討

8~10 週齢の野生型及び FABP5-KO マウスより胸腺細胞懸濁液を調製し、蛍光標識抗体 (抗 CD4-PE、抗 CD8-FITC、抗 TCR β -PECy5、抗 CD25-FITC、抗 CD44-PECy5) で細胞を標識後、産業医科大学・共同利用研究センターに既設の EC800 Cell Analyzer (SONY) にて分析を行った。

(4) 液性因子遺伝子発現の変化

8~10 週齢の野生型及び FABP5-KO マウスより胸腺を摘出・細片化し、Liberase-TM (Roche) による細胞分散処理を行うことにより、胸腺ストローマ細胞分画を得た。この分画から樹状細胞等の骨髄由来の細胞を除去するため磁気ビーズ標識抗 CD45 抗体を添加し、磁気細胞分離システム (MACS) で除去した。MACS カラム通過分画に上皮細胞マーカーである CD326 に対する抗体と磁気ビーズ標識 2 次抗体を順次加えて胸腺上皮細胞を標識し MACS 精製することにより、最終的に CD326 陽性胸腺上皮細胞の濃縮分画を得た。この細胞分画から全 RNA を抽出し、産業医科大学・共同利用研究センターに既設の DNA Micro Array System (Agilent Technologies) 及び GeneSpring Ver. 12.6 (Tomy Digital Biology) にて解析を行った。

(5) 胸腺上皮細胞機能の検討

胸腺上皮細胞の機能、すなわち胸腺細胞の分化誘導能における脂肪酸と FABP5 の関わりを解析するため、re-aggregated thymic organ culture (RTOC) を行った。

野生型及び FABP5-KO マウスの 14.5 日齢胎仔より胸腺を摘出し、増殖中の胸腺細胞を除去するため 1.35 mM 2-deoxyguanosine (2dGuo)を含む 10% FBS/DMEM にて 7 日間処理した。残存する 2dGuo を除去するため 10% FBS/DMEM で更に 24 時間培養し、trypsin/EDTA 処理で分散した。14.5 日齢胎仔胸腺から分取した胸腺細胞と分散した胸腺ストローマ細胞（主に胸腺上皮細胞を含む）を細胞数比 1 : 1 で混合して nucleopore filter (Sartorius) 上に滴下し、細胞集塊を形成させるため培養液面で更に 24 時間培養した。その後、各種脂肪酸を含む培養液に交換し、5 日後にフローサイトメーターで胸腺細胞の分化状態について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 培養胸腺上皮細胞の形態

初代培養 3 日目において、胸腺上皮細胞の形態を比較した結果、野生型 (WT) と FABP5-KO マウス胸腺上皮細胞との間で細胞サイズ、伸展度合いに顕著な差異は見られなかった (図 1)。

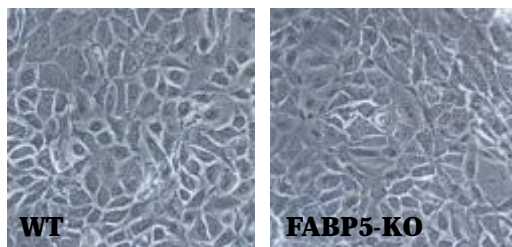


図 1 無血清初代培養 3 日目における培養胸腺上皮細胞の位相差顕微鏡像 (x200)

(2) 細胞増殖における脂肪酸の効果と FABP5 の機能

細胞周期において、核酸アナログである EdU は DNA 合成期 (S 期) で取り込まれ、細胞増殖マーカーである核抗原 Ki-67 は休止期 (G0 期) 以外で陽性となることが知られている。従って、EdU 陽性細胞は検出操作のため細胞を固定するまでは S 期にあったことを示すと同時に、増殖中であった細胞は Ki-67 も陽性となる。一方、EdU 陽性であるが Ki-67 陰性の細胞は、脂肪酸添加後に G0 期、すなわち増殖状態から休止期、或いは分化状態に移行した細胞であると考えられる。

コントロール (NT) において、野生型、FABP5-KO マウス胸腺上皮細胞は共に 90% 以上が EdU 陽性であり、そのうち約 80% が Ki-67 陽性の増殖細胞であった。これに飽和脂肪酸 (PA 及び SA) を添加した場合、両マウス系統の Ki-67 陽性細胞数に大きな差は見られなかったが、低濃度 (10 μ M) で長鎖不飽和脂肪酸 (ALA, LA, AA) を添加した場合に FABP5-KO 胸腺上皮細胞において Ki-67 陽性細胞数が減少した。この減少は AA

添加時に顕著であった。長鎖不飽和脂肪酸を比較的高濃度 (50 μ M) で添加すると、両マウス系統の胸腺上皮細胞において Ki-67 陽性細胞の割合が増加した。レチノイン酸は上皮細胞の分化因子であることから、添加によって両マウス系統の Ki-67 陽性細胞数は著減したが、FABP5-KO 上皮細胞に低濃度 (1 μ M) で ATRA を添加した場合、野生型の約 1/5 に減少していた (図 2)。

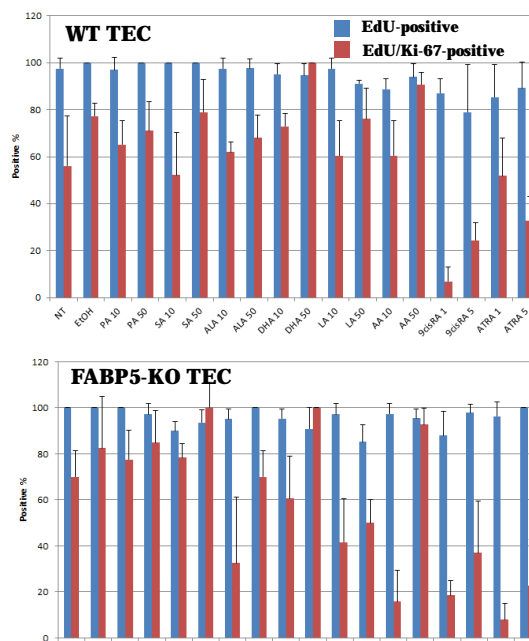


図 2 細胞増殖における脂肪酸の効果と FABP5 の機能

NT: No treatment, PA: パルミチン酸、SA: ステアリン酸、ALA: α -リノレン酸、DHA: ドコサヘキサエン酸、LA: リノール酸、AA: アラキドン酸、9cisRA: 9-cis-レチノイン酸、ATRA: all-trans-レチノイン酸; 数字は脂肪酸濃度 (μ M) を示す

(3) 胸腺細胞分化における FABP5 の機能

両マウス系統の成体胸腺における胸腺細胞の分化状態について、フローサイトメトリーで比較を行った。

CD4CD8 両陰性 (DN) 両陽性 (DP) CD4 単陽性 (CD4SP) 及び CD8 単陽性 (CD8SP) の各分化段階のマーカー陽性率に差は無く、TCR の陽性率にも差は見られなかった。

DN 胸腺細胞を CD25 と CD44 で更に分画したところ、DN1 から DN4 の各分化段階のマーカー陽性率にも顕著な差は見られなかった (図 3)。

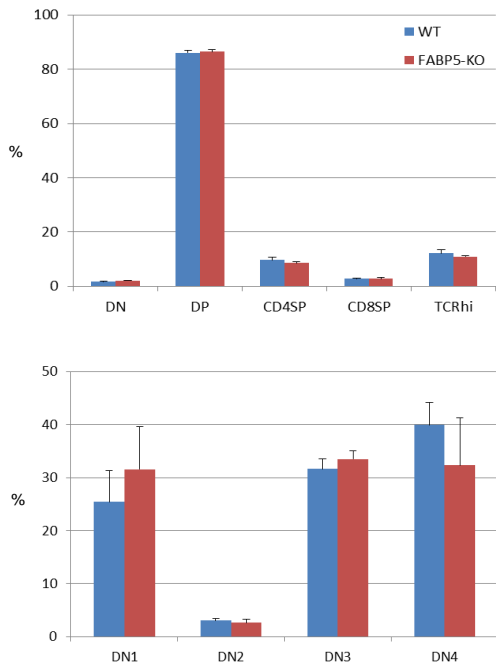


図3 野生型及び FABP5-KO 胸腺細胞の分化段階の比較

DN:CD4CD8 double-negative, DP: double-positive, SP: single-positive

(4) 液性因子の遺伝子発現

両マウス系統の胸腺上皮細胞濃縮分画において発現している遺伝子の網羅的比較を行い、胸腺細胞の分化誘導に関連するサイトカインの遺伝子発現を比較したところ、両マウス系統間で大きな発現変動は見られなかった。

Gene symbol	Expression level in FABP5-KO TEC
<i>Il4</i>	1.382
<i>Il7</i>	1.016
<i>Il12b</i>	1.367
<i>Il15</i>	1.091

表1 サイトカイン遺伝子発現レベルの変化

野生型胸腺上皮細胞における発現レベルを 1.0 とした場合の発現比を示す。

(5) 胸腺上皮細胞機能の検討 (ROTC)

胎生 14.5 日齢の野生型及び FABP5-KO マウスの胎仔胸腺上皮細胞と野生型マウスの胎仔胸腺細胞を分離・再懸濁・培養することにより、胸腺上皮細胞の胸腺細胞分化誘導能の比較を行った。しかしながら、結果のばらつきが大き過ぎたため明確な結果は得られなかった。この系に各種脂肪酸を添加した場合も同様であったが、CD4CD8 両陽性 (DP) 胸腺細胞数は長鎖不飽和脂肪酸に反応して増加する可能性が示唆された。

(6) 網羅的な遺伝子発現レベルの比較

DNA array 解析により、両マウス系統の胸腺上皮細胞で発現する遺伝子の網羅的な比較を行ったところ、FABP5 遺伝子の除去によって発現レベルが極端に低下する遺伝子 (Hmgn1) を見出した (図4)。Hmgn1 はヌクレオソーム結合能を有する非ヒストン性クロマチン構造制御タンパクであり、遺伝子発現の制御と微調整がその機能であると推定されているが、機能の詳細は不明である (Kugler et al., 2013)。今回の遺伝子発現比較結果において Hmgn1 遺伝子の周囲にプロットされた複数の遺伝子は、Fabp5 の偽遺伝子とアレイ上に配置されているが未知の遺伝子であった。

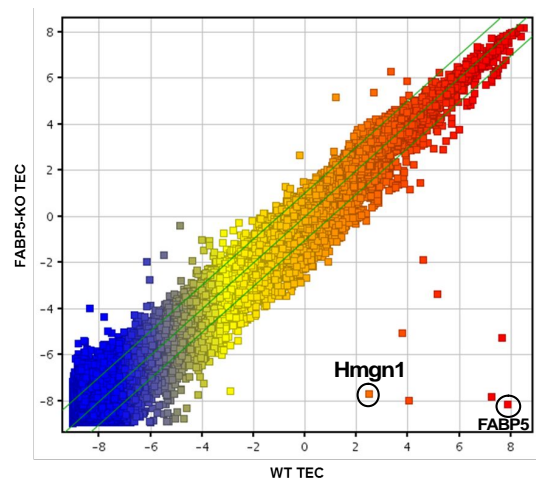


図4 野生型及び FABP5-KO マウス胸腺上皮細胞における網羅的遺伝子発現解析

考察

胸腺上皮細胞は胸腺細胞の分化環境 (胸腺微小環境) を構築する上で本質的な細胞群である。本研究では、野生型及び FABP5-KO マウス由来の初代培養胸腺上皮細胞について細胞形態、増殖、細胞機能の比較解析を行った。

培養胸腺上皮細胞の形態は FABP5 の有無に関わらず同様であった (図1)。

増殖に及ぼす脂肪酸の効果を検討した結果、胸腺上皮細胞の増殖には高濃度の長鎖不飽和脂肪酸が関与していることが示唆された。また、低濃度の長鎖不飽和脂肪酸添加では増殖が抑制されて分化或いは G0 期への移行が促進されていると考えられ、FABP5-KO 胸腺上皮細胞でより顕著であったことから、FABP5 は長鎖不飽和脂肪酸に濃度依存的に反応する形で胸腺上皮細胞の増殖において促進的に機能すると考えられた。レチノイン酸は分化因子として機能すると同時に、ヒト乳癌細胞においては FABP5 をキャリアーとする増殖シグナルとして機能することが報告されているが (Schug et al., 2007)、本実験系においても FABP5-KO 胸腺上皮細胞に

において増殖が著しく抑制されていることから、レチノイン酸は FABP5 を介して重要な増殖シグナルとして機能している事が推察された(図2)。

両マウス系統間で胸腺細胞の分化状態に差異があるかどうかを検討した結果、一般的な分化マーカーである CD4、CD8、TCR の陽性率で分析した限りでは全く両者に差は見られなかった。更に CD4CD8-DN 分画について胸腺細胞の初期分化マーカーである CD25、及び CD44 で分析したところでも全く差は見られなかった(図3)。胸腺細胞の分化誘導に重要なサイトカインの遺伝子発現レベルにも大きな変化は無かった(表1)ことから、FABP5 は胸腺上皮細胞の特異的な機能である胸腺細胞の分化誘導よりは、長鎖脂肪酸とレチノイン酸に反応する形で胸腺上皮細胞自身の増殖・分化制御においてより重要な分子であると考えられた。これをより明確にするべく RTOC による胸腺細胞の分化誘導実験を行ったが、結果が不安定であったため明確な結論には至らなかった。

本研究計画における DNA アレイ実験の結果、Fabp5 遺伝子ノックアウトにより発現が大きく低下する遺伝子を同定した(図4)。この遺伝子(Hmgn1)は非ヒストン性のクロマチン構造制御タンパクをコードしており、標的遺伝子の転写を制御する事が報告されている(Rubinstein et al., 2005)。上述の通り、Hmgn1 は Fabp5 遺伝子ノックアウトにより発現が低下することから、Fabp5 が関与する脂肪酸シグナル伝達系の下流に位置する新たな Fabp5 の標的遺伝子である可能性が考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

安達 泰弘 (ADACHI, Yasuhiro)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10346546

(2)研究分担者

大和田 祐二 (OWADA, Yuji)

山口大学・大学院・医学系研究科・教授

研究者番号：20292211