

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590583

研究課題名(和文) T細胞生存を制御するKDEL受容体の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of KDEL receptor that regulates T cell survival

研究代表者

上村 大輔 (KAMIMURA, DAISUKE)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：20391922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫系で中心的な役割を担うT細胞は、体内で一定の数が保たれている。このT細胞恒常性は、効率的な免疫応答を誘導するために重要であり、サイトカインであるIL-7とT細胞受容体からの生存シグナルが重要であることが知られていた。今回ナイーブT細胞が大きく減少しているT-Red変異マウスの解析から、生体内でのT細胞恒常性が上記の生存シグナルと統合ストレス応答による細胞死シグナルとのバランスで成り立っていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：T cells are a central player in the acquired immune system, and their numbers are regulated to be constant in vivo. It has been known that the maintenance of this T-cell homeostasis is mediated by survival signals from cytokine IL-7 and T-cell receptor:MHC interactions. In this study, using a mutant mouse line, called T-Red, it is shown that the T-cell homeostasis is established by a balance between the survival signals and a death signal induced by integrated stress responses.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系で中心的な役割を担う T 細胞は、体内で一定の数が保たれている。この恒常性の維持には、サイトカインである IL-7 と T 細胞受容体(MHC:TCR 相互作用)からの生存シグナルが重要であることが知られている。この T 細胞恒常性は、効率的な免疫応答を誘導するために重要である。我々は、この T 細胞の活性化および恒常性維持機構についての研究を通して、恒常性の維持機構が破綻し T 細胞が無秩序に増加すると、自己免疫疾患発症のきっかけとなることを報告してきた。この T 細胞の恒常性とそのメカニズムをより詳細に理解するために、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)を得た。この T-Red マウスは T 細胞依存的免疫応答が有為に減弱している。SNP 解析から、その責任遺伝子は、小胞体とゴルジ体の間で物質の逆輸送に関わる膜タンパク質として知られる KDEL 受容体 1 (Kdelr1)であった。

2. 研究の目的

ナイーブ T 細胞数が大きく減少している T-Red 変異マウスを解析し、その原因を究明することによって生体内での T 細胞の恒常性とそのメカニズムについての新たな知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

T-Red マウスを維持、繁殖するとともに、T-Red マウスの責任遺伝子である Kdelr1 の T 細胞特異的ノックアウトマウスを作製した。ナイーブ T 細胞減少による免疫応答への影響を調べるために、CD4 T 細胞依存性コラーゲン誘導性関節炎モデル、CD8 T 細胞依存性のリステリア感染モデルなどを行った。さらに、DNA アレイによるトランスクリプトーム解析を行い、T-Red ナイーブ T 細胞で変化のある遺伝子群を同定した。In vitro の実験系において、T-Red ナイーブ T 細胞の生存性について言及した。統合ストレス応答(ISR)の指標である ISR 標的遺伝子の発現、eIF2 α リン酸化およびタンパク質合成能を検討した。

4. 研究成果

ナイーブ T 細胞数が減少している T-Red マウスでは、メモリー T 細胞数は減少していなかった。この T-Red マウスはコラーゲン誘導性関節炎モデルやリステリア感染モデルなどの T 細胞依存的免疫応答が、おそらくはナイーブ T 細胞数の減少のために、有意に低下している。SNP 解析から、ER-Golgi で物質輸送に関わる膜タンパク質として知られる Kdelr1 にアミノ酸置換を生ずる点変異が見つかった。Kdelr1 の T 細胞特異的ノックアウト(KO)マウスを作成したところ、T-Red マウスと表現型が一致したことから、Kdelr1 がその

原因遺伝子であると結論した。DNA アレイによるトランスクリプトーム解析から、T-Red ナイーブ T 細胞では ISR に関与する標的遺伝子が著しく増加していることが明らかになった。ISR は小胞体ストレスや飢餓ストレス等の細胞性ストレスの総称であり、翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化を起点として、ストレス応答が誘導されることが知られている。実際に T-Red および Kdelr1 KO 由来ナイーブ T 細胞では eIF2 α のリン酸化が野生型ナイーブ T 細胞と比較して亢進していた。一方で、野生型 T 細胞においても、ある程度の eIF2 α のリン酸化が認められ、生体内で一定のストレスを常に受けていることが示唆される。生化学的解析から、eIF2 α のリン酸化を除去し ISR を負に制御するタンパク質として知られる脱リン酸化酵素(PP1)と Kdelr1 が会合することが明らかになり、Kdelr1 との会合が PP1 機能を調節している結果を得た。つまり、ナイーブ T 細胞の恒常性には生体内から受け取る細胞性ストレスを効率的に除去する Kdelr1-PP1 経路が必要であり、IL-7 や MHC:TCR 相互作用からの生存シグナルと ISR によるストレスシグナルのバランスがナイーブ T 細胞の恒常性に重要であることを突き止めた。

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 Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R., Sabharwal, L., Jiang, J. J., Kumai, N., Miyasaka, N., Sakoda, S., Yamauchi-Takahara, K., Ogura, H., Hirano, T. & Murakami, M. Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *J Immunol* **194**, 1039-1046, doi:10.4049/jimmunol.1400562 (2015).
査読有
- 2 Ogura, H., Atsumi, T., Bando, H., Sabharwal, L., Yamada, M., Jiang, J. J., Nakamura, A., Arima, Y., Kamimura, D. & Murakami, M. The reverse-direction method links mass experimental data to human diseases. *Archivum*

- immunologiae et therapiæ experimentalis* **62**, 41-45, doi:10.1007/s00005-013-0255-9 (2014). 査読有
- 3 Sabharwal, L., Kamimura, D., Meng, J., Bando, H., Ogura, H., Nakayama, C., Jiang, J. J., Kumai, N., Suzuki, H., Atsumi, T., Arima, Y. & Murakami, M. The Gateway Reflex, which is mediated by the inflammation amplifier, directs pathogenic immune cells into the CNS. *Journal of biochemistry* **156**, 299-304, doi:10.1093/jb/mvu057 (2014). 査読有
- 4 Kamimura, D., Yamada, M., Harada, M., Sabharwal, L., Meng, J., Bando, H., Ogura, H., Atsumi, T., Arima, Y. & Murakami, M. The gateway theory: bridging neural and immune interactions in the CNS. *Frontiers in neuroscience* **7**, 204, doi:10.3389/fnins.2013.00204 (2013). 査読有
- 5 Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J. J., Atsumi, T., Shiraya, S., Nakatsuji, Y., Kinoshita, M., Kohsaka, H., Nishida, M., Sakoda, S., Miyasaka, N., Yamauchi-Takahara, K. & Hirano, T. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep* **3**, 946-959, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.028 (2013). 査読有
- 6 Lee, J., Nakagiri, T., Kamimura, D., Harada, M., Oto, T., Susaki, Y., Shintani, Y., Inoue, M., Miyoshi, S., Morii, E., Hirano, T., Murakami, M. & Okumura, M. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int Immunol* **25**, 319-332, doi:10.1093/intimm/dxs158 (2013). 査読有
- 7 Arima, Y., Kamimura, D., Sabharwal, L., Yamada, M., Bando, H., Ogura, H., Atsumi, T. & Murakami, M. Regulation of immune cell infiltration into the CNS by regional neural inputs explained by the gate theory. *Mediators of inflammation* **2013**, 898165, doi:10.1155/2013/898165 (2013). 査読有
- 8 Sasaki, M., Tojo, A., Okochi, Y., Miyawaki, N., Kamimura, D., Yamaguchi, A., Murakami, M. & Okamura, Y. Autoimmune disorder phenotypes in Hvcn1-deficient mice. *The Biochemical journal* **450**, 295-301, doi:10.1042/BJ20121188 (2013). 査読有
- 9 Ogura, H., Arima, Y., Kamimura, D. & Murakami, M. The gateway theory: how regional neural activation creates a gateway for immune cells via an inflammation amplifier. *Biomedical journal* **36**, 269-273, doi:10.4103/2319-4170.113187 (2013). 査読有
- 〔学会発表〕(計3件)
1. 第43回日本免疫学会総会
2014年12月10日~12月12日(金)
国立京都国際会館(京都府、京都市)
上村大輔
Characterization of T-Red mutant mouse line having reduced naïve T cells (口頭発表)
2. 第42回日本免疫学会総会
2013年12月11日(水)~12月13日(金)
幕張メッセ(千葉県、千葉市)
上村大輔
Characterization of an ENU mutant mouse line having reduced naïve T cells (口頭発表)

3. 第 41 回日本免疫学会総会
2012 年 12 月 5 日（水）～7 日（金）
神戸国際会議場（兵庫県、神戸市）
上村大輔

Characterization of an ENU-mutant mouse with
impaired T-cell homeostasis (口頭発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 大輔 (DAISUKE KAMIMRA)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：20391922

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：