

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790475

研究課題名(和文) T細胞の機能構築に果たす正の選択の役割

研究課題名(英文) Role of positive selection in the functional development of T cells

研究代表者

高田 健介 (Takada, Kensuke)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・講師

研究者番号：40570073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：beta5tを構成鎖とする胸腺プロテアソームは胸腺皮質上皮細胞に発現されCD8T細胞の正の選択を司る。beta5t欠損マウスにおけるOT-I CD8T細胞はSIINFEKL抗原およびそのバリエーションに過剰応答を示した。また、beta5t欠損マウスの末梢リンパ組織ではメモリー様細胞が増加していた。この異常はIL-2/15受容体シグナルに依存し、T細胞の恒常性維持への関与が示唆された。さらにbeta5t欠損マウス由来のOT-I細胞はリステリア菌の感染に伴って短期生存エフェクター細胞に分化する傾向があった。これらの結果は正の選択がT細胞の抗原特異性のみならず抗原応答性をも決定していることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：beta5t-containing thymoproteasomes expressed in cortical thymic epithelial cells (cTECs) are essential for positive selection of CD8 T cells. In this study, we characterized monoclonal CD8 T cells that were selected in the absence of beta5t. We found that OT-I CD8 T cells generated in beta5t-deficient mice were hyperresponsive to SIINFEKL antigen and its variants. In the periphery, CD8 T cells generated in beta5t-deficient mice were enriched with CD44hiCD122hi memory-phenotype depending on IL-2/15 receptor signals, suggesting that beta5t-dependent positive selection is required for homeostatic maintenance of CD8 T cells. In response to infection with *Listeria monocytogenes* expressing ovalbumin, OT-I CD8 T cells from beta5t-deficient mice preferentially differentiated into short-lived effector cells. These results indicate that the positive selection in the thymus not only determines TCR recognition specificity but also preconditions antigen responsiveness of CD8 T cells.

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：獲得免疫 T細胞 正の選択 胸腺

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系が病原体を始めとした非自己成分に特異的に反応する能力は、その主役であるリンパ球が、分化過程において自己成分との相互作用を繰り返すことで形成される。胸腺では、T 前駆細胞上の抗原受容体 (TCR) と、抗原提示細胞上の自己ペプチド・MHC 複合体との相互作用を通して、生体防御に有用なクローンのみが分化成熟する。胸腺髄質上皮細胞および樹状細胞に提示された自己ペプチドに高い親和性をもつクローンは、負の選択を受けて排除され、自己寛容が成立する。一方、正の選択は、胸腺皮質上皮細胞上の自己ペプチドに対して弱い親和性をもつクローンが生存シグナルを供与される過程であり、T 細胞の数と抗原認識特異性、自己 MHC 拘束性を規定するとされている。

プロテアソームは MHC クラス I に提示されるペプチドの産生に重要な役割を担うプロテアーゼ複合体であるが、最近、触媒活性部位として $\beta 5t$ サブユニットを含有する胸腺プロテアソームが新たに発見された (Murata ら、2007 Science)。胸腺プロテアソームは正の選択を司る胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現され、従来知られていた構成型プロテアソームや免疫プロテアソームとは異なる基質特異性を示す。その構成鎖である $\beta 5t$ の欠損マウスでは、正の選択の異常によって CD8T 細胞数の減少 (Murata ら、2007 Science) と、TCR レパトアの変容が認められる (Nitta ら、2010 Immunity)。これらの知見は、胸腺プロテアソーム依存的に作り出される胸腺皮質上皮細胞に特有の自己ペプチドレパートリーが、正の選択による T 細胞数と抗原認識特異性の決定に重要であることを明らかにした。一方、研究代表者は $\beta 5t$ 欠損マウスのさらなる解析から、胸腺皮質上皮細胞における胸腺プロテアソームの欠損が抗原応答性を中心とする T 細胞の機能に影響を与えるという予備的知見を得た (Takada ら未発表)。

2. 研究の目的

本研究では、胸腺プロテアソームの最近の発見を背景とし、これまでレパトア選択を司る過程として理解されてきた正の選択の生理的意義を再検討する。

胸腺プロテアソームの欠損によって T 細胞が示す機能異常の詳細と分子メカニズムを検討することで、正の選択を介した T 細胞の機能的教育の実態解明を目指す。さらに、その異常が個体の生体防御機能に与える影響を検討することで、胸腺プロテアソーム依存的な正の選択の生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

$\beta 5t$ 欠損 Rag 欠損 OT-I トランスジェニック (Tg) マウス、および Rag 欠損 OT-I Tg マウスの骨髄細胞を $\beta 5t$ 欠損マウスに移入すること

で作成した骨髄キメラマウスを主な材料として使用した。

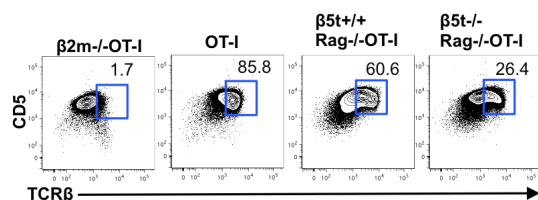
上記マウスから得られたナイーブ CD8T 細胞を、OT-I 細胞の特異的抗原である卵白アルブミン由来ペプチド (OVAp) およびその配列の一部を別のアミノ酸で置換した各種 OVAp バリエーションを用いて *in vitro* で刺激し、細胞内シグナル分子の活性化、細胞表面における活性化マーカーの発現、細胞増殖を検討した。

$\beta 5t$ 欠損マウスでは、メモリー様の表現系 (CD44^{hi}CD122⁺) をもつ CD8T 細胞の頻度が増加する。また、メモリー様細胞の分化には恒常性サイトカインが重要な役割を果たすことが知られている。 $\beta 5t$ 欠損マウスにおけるメモリー様細胞の増加のメカニズムを検討するため、 $\beta 5t$ 欠損マウスから得られたナイーブ CD8T 細胞を CFSE ラベルしたのちに、放射線照射マウスに移入し、IL-7 依存的であることが知られているホメオスタティック増殖を観察した。また、IL-2 および IL-15 の受容体である CD122 (IL-2R β) 欠損マウスから得られた骨髄細胞を $\beta 5t$ 欠損マウスに移入した骨髄キメラマウスを作成し、メモリー様細胞の分化への影響を検討した。

$\beta 5t$ 欠損マウスにおける CD8T 細胞の活性化異常はその後のエフェクター機能やメモリー機能に影響する可能性がある。 $\beta 5t$ 欠損 Rag 欠損 OT-I Tg マウスから得られたナイーブ T 細胞を正常マウスに移入した後、レシピエントマウスに対して OVA 発現リステリア菌を感染させた。感染後、経時的にドナー OT-I 細胞における KLRG1 および IL-7R α の発現を観察し、短期生存エフェクター細胞およびメモリー前駆細胞への分化を検討した。

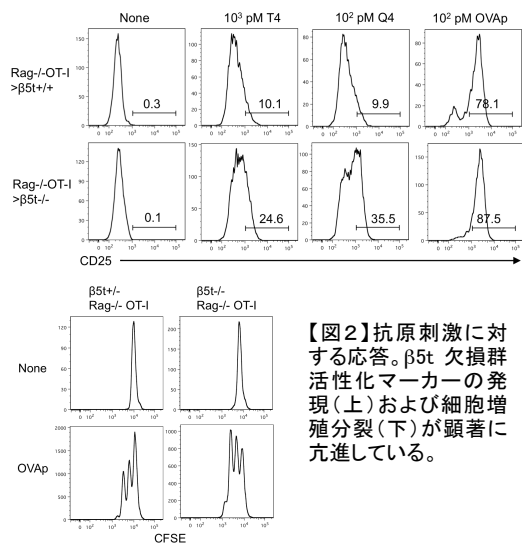
4. 研究成果

$\beta 5t$ 欠損 Rag 欠損 OT-I Tg マウスにおける胸腺細胞の分化を検討したところ、CD4+CD8+(DP)細胞の明らかな増加が認められる一方で、より分化の進んだ CD4-CD8+(CD8SP)細胞の頻度が減少していた。特に、正の選択を受ける以前の TCR^{lo}DP 細胞の蓄積が顕著であり、 $\beta 5t$ 欠損 Rag 欠損 OT-I Tg マウスでは正の選択に異常があることが確認された。



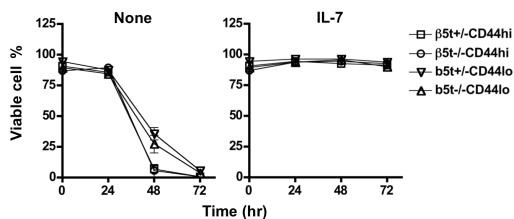
【図1】OT-I トランスジェニックマウスの CD4+CD8+胸腺細胞。青枠で示す正の選択を受けた細胞の割合が、 $\beta 5t$ 欠損下では減少している。

$\beta 5t$ 欠損下で分化した OT-I 細胞に *in vitro* で抗原刺激を加えたところ、活性化マーカーの発現および増殖応答が亢進していた。



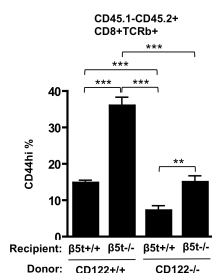
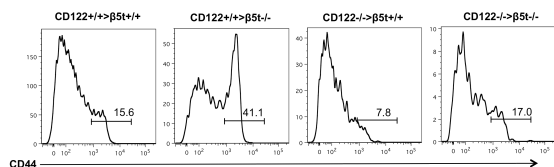
【図2】抗原刺激に対する応答。β5t 欠損群活性化マーカーの発現(上)および細胞増殖分裂(下)が顕著に亢進している。

β5t 欠損マウスでは、メモリー様の表現系 (CD44^{hi}CD122⁺) をもつ CD8T 細胞の頻度が増加する。この異常における恒常性サイトカインの関与を検討した。放射線照射マウスに移入後のホメオスタティック増殖および IL-7 存在下での *in vitro* での生存を観察したところ、β5t 欠損群およびコントロール群で違いは見られなかった。



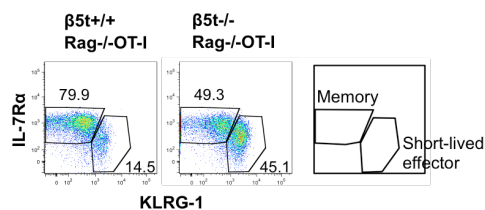
【図3】β5t 欠損マウスから得られた CD8T 細胞を IL-7 存在下および非存在下で培養した。

一方、IL-2 および IL-15 の受容体である CD122 (IL-2Rβ) 欠損マウスから得られた骨髓細胞をβ5t 欠損マウスに移入した骨髓キメラマウスを作成し、これらのサイトカインの関与を検討したところ、β5t 欠損レシピエントマウス中でもメモリー様細胞の増加が抑制された。このことから、β5t 欠損マウスにおけるメモリー様細胞の増加には IL-2 あるいは IL-15 が関与していることが明らかとなった。



【図4】メモリー様 CD8T 細胞の増加における IL-2 あるいは IL-15 の関与。CD122 欠損マウスの骨髓をβ5t 欠損マウスに移入することで作成された骨髓キメラマウスでは、β5t 欠損マウスにおけるメモリー様細胞の異常増加が見られない。

正の選択を介した T 細胞の機能制御が生体防御に果たす役割を検討するため、β5t 欠損マウスの CD8T 細胞の病原体感染への応答を *in vivo* で検討した。β5t 欠損 RAG 欠損 OT-I Tg マウスから得られたナイーブ T 細胞を正常マウスに移入した後、レシピエントマウスに対して OVA 発現リステリア菌を感染させた。その結果、リステリア菌感染 5~8 日後のエフェクター期および 35 日後のメモリー期において、β5t 欠損マウスの OT-I CD8T 細胞では正常 OT-I 細胞と比較して KLRG1^{hi}IL-7R^{lo} を発現するエフェクター CD8 細胞の割合が顕著に増加していた。すなわち、β5t 欠損下で分化した CD8T 細胞は感染後、エフェクター細胞に分化しやすい一方でメモリー細胞への分化不全を呈することが明らかとなった。



【図5】β5t 欠損マウスおよび正常マウスから得られた OT-I CD8 T 細胞をレシピエントマウスに移入後、OVA 発現リステリア菌を感染させた。β5t 欠損マウスの OT-I CD8T 細胞は、感染から 35 日後のメモリー期でも多くが KLRG-1^{hi}IL-7Rα^{lo} のエフェクターフェノタイプを示している。

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 4 件)

1. Togoo K, Takahama Y, Takada K. Alpha-smooth muscle actin expression identifies subpopulations of lymph node non-hematopoietic cells. 査読有 Biochem Biophys Res Commun. 449:241-247 (2014) DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.023.
2. Yano K, Carter C, Yoshida N, Abe T, Yamada A, Nitta T, Ishimaru N, Takada K, Butcher GW, Takahama Y. Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse. 査読有 Eur J Immunol. 44:561-572 (2014) DOI: 10.1002/eji.201343750
3. Takada K, Ohigashi I, Kasai M, Nakase H, Takahama Y. Development and function of thymic cortical epithelial cells. 査読有 Curr Top Microbiol Immunol. 373:1-17 (2014) DOI: 10.1007/82_2013_322
4. Takahama Y, Takada K, Murata S, Tanaka K.

Beta5t-containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8+ T cells. 査読有
Curr Op Immunol. 24:92-98 (2012)
DOI: 10.1016/j.coi.2012.01.006

[学会発表] (計 8 件)

1. Takada K. and Takahama Y. What is the positive selection for? The 3rd Bizan Immunology Symposium, The University of Tokushima, Tokushima, Japan (2014.2.2)
2. Takada K. and Takahama Y. Functional conditioning of CD8 T cells by thymoproteasome-dependent positive selection. 第 42 回 日本免疫学会学術集会 千葉県 幕張メッセ (2013.12.11)
3. Takada K. and Takahama Y. Functional conditioning of CD8 T cells by thymoproteasome-dependent positive selection. The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference. Kyoto University, Kyoto, Japan (2013.7.5)
4. Takada K. and Takahama Y. Functional conditioning of CD8 T cells by thymoproteasome-dependent positive selection. The 100th American Association of Immunologists Annual Meeting. Hawaii Convention Center, Honolulu, USA (2013.5.6)
5. Takada K. and Takahama Y. Thymoproteasome-dependent positive selection conditions cytokine reactivity of mature CD8 T cells. Bizan Immunology Symposium - "Immune System Development, Deviation, and Regulation". University of Tokushima, Tokushima, Japan (2013.1.25)
6. 高田健介、高浜洋介 $\beta 5t$ 欠損マウスにおける末梢 CD8T 細胞の解析 第 41 回 日本免疫学会学術集会 兵庫県 国際会議場 (2012.12.7)
7. 高田健介、高浜洋介 $\beta 5t$ 欠損マウスにおける末梢 CD8T 細胞の機能異常 第 21 回 Kyoto T Cell Conference. 京都府 京都大学 (2012.7.6)
8. Takada K. and Takahama Y. Functional abnormality of peripheral CD8 T cells in $\beta 5t$ -deficient mice. The 99th American Association of Immunologists Annual Meeting. Hynes Convention Center, Boston, USA (2012.5.6)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dei>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
高田 健介 (TAKADA, Kensuke)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・講師
研究者番号：40570073

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：