

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460606

研究課題名(和文)核内シグナル分子によるT細胞分化の制御機構

研究課題名(英文)Studies on nuclear signaling proteins required for T cell development

研究代表者

新田 剛(Nitta, Takeshi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30373343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫系の司令塔であるT細胞の分化を制御する動作原理の解明を目的とし、T細胞の分化に重要な役割を担う新規分子Themisの機能解析を行った。ThemisはT細胞の核内でアダプター分子Grb2と結合し、核内Grb2量を制御すること、およびThemisの核移行とGrb2結合はT細胞分化制御に必須であることがわかった。一方で、Themisの核移行は末梢T細胞のサイトカイン産生には必要ではなく、Themisが胸腺と末梢で異なる機能を担うことが示された。また、Themis分子内に存在する2つのCABITドメインはそれぞれ異なる様式でT細胞分化制御に機能することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Themis is a newly identified protein that localizes in cytoplasm and nucleus and is essential for inducing T cell development in the thymus. Here we found that Themis binds the adaptor protein Grb2 in the nuclei of T cells and regulates nuclear protein levels of Grb2 in T cells, and that nuclear Themis-Grb2 interaction is required for T cell development. However, the nuclear localization of Themis is dispensable for cytokine production by peripheral T cells, suggesting that Themis has different functions in the thymus and periphery. Our results also show that two CABIT domains in Themis are both required for T cell development and that each of the CABIT domains exerts distinct functions during T cell development.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 胸腺 TCR シグナル伝達 核 Themis Grb2

1. 研究開始当初の背景

T細胞は免疫系の司令塔であり、その分化と機能を制御する分子機構の解明は免疫学における重要課題のひとつである。T細胞は、自身が発現する抗原受容体 (TCR) の抗原認識に従って胸腺内で選択を受け、正の選択を受けた細胞だけが生存・分化することで生成される。T細胞の正と負の選択を制御する細胞内シグナルの研究は、国内外の多くの研究グループによって精力的に展開されてきた。正の選択には Erk、負の選択には p38 や JNK といった異なる MAP キナーゼが関与する。また、TCR シグナルの強弱に応じて Ras/Erk 経路の分子群が異なる細胞内区画に配置されることも報告されている。2009年に、正の選択に必須の役割を担う新規分子 Themis が発見された。Themis 欠損マウスでは正の選択が顕著に障害されるが、負の選択や TCR 下流のシグナルには大きな影響はみられない。Themis タンパク質は、CABIT と呼ばれる新規のドメイン構造を2つ (CABIT1 と CABIT2)、CABIT2 の中に核移行シグナル (NLS)、C 末端にプロリンリッチ配列 (PRS) をもち、TCR シグナル分子間の相互作用を仲介するアダプター分子として機能すると考えられていたが、その詳細な分子機能は明らかになっていなかった。

研究代表者らは、T細胞の正負選択を制御するタンパク質の挙動を再検証する目的で、TCR シグナル分子の細胞内局在を調べた。その結果、ZAP-70、Grb2、SOS、Ras といった、細胞質または細胞膜上の TCR 近傍に存在すると思われていた分子群が、核内にも検出された。さらに、予備実験結果より、Themis 欠損マウスの胸腺細胞では、アダプター分子 Grb2 の核内タンパク量が顕著に減少することを見出した。Themis は NLS の作用によって細胞質と核の両方に局在することが報告されていたが、核内での機能は不明であった。これらの知見と予備実験結果より、Themis は Grb2 を核内にリクルートすることで正の選択に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、モデル動物としてマウスを用い、T細胞の核内に存在する TCR シグナル分子群の機能を解析することで、T細胞の分化を制御する分子機構の解明を目的とした。特に、Themis による Grb2 の核局在の制御が T細胞の正の選択に重要な意義をもつ可能性に着目し、これを検証することを中心的な目標として設定した。また、Themis、Grb2 および他のシグナル分子の核内における機能を明らかにし、TCR シグナルと T細胞分化を制御する分子機構の新たなモデルを提唱することをめざした。

3. 研究の方法

(1) T細胞の核内に存在する TCR シグナル分子群の解析

野生型マウスおよび Themis 欠損マウスから胸腺細胞を採取し、細胞質内の可溶性タンパク質、膜タンパク質、核内の可溶性タンパク質を精製した。それぞれの画分についてウェスタンブロット解析を行い、Crk (細胞質)、LAT (膜)、PARP (核内) の検出を指標として目的の画分が精製されたことを確認した。また、各マウスの胸腺細胞から蛍光セルソーターを用いて CD4-CD8- (DN) 細胞、CD4+CD8+ (DP) 細胞、CD4+CD8- (CD4SP) 細胞を単離し、それぞれの細胞について、細胞質、膜、核の画分を精製した。精製されたそれぞれの画分に対してウェスタンブロット解析を行い、TCR シグナル経路に関与する分子群に対する抗体を用いて検出した。また、細胞質と核の抽出液に対して抗 Themis 抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロットによって Grb2 が共沈降するかどうかを確認した。

(2) Themis/Grb2 複合体の機能の解明

Themis タンパク質のドメイン / モチーフ構造のうち、Grb2 との相互作用に関わると考えられた PRS、および核移行に関わると考えられた NLS に着目した。これらのモチーフ構造を欠失させたマウス Themis cDNA をヒト CD2 プロモーター下流に挿入したプラスミドベクターを作製した。これを BDF1 x C57BL/6 マウス受精卵に注入して偽妊娠 ICR マウスに移植することで、トランスジェニックマウスを作製した。得られたトランスジェニックマウスを Themis 欠損マウスと交配し、野生型 Themis の非存在下で変異型 Themis を発現するマウス (deltaPRS および deltaNLS) を作製した。これらのマウスの胸腺、脾臓、リンパ節から血球細胞を採取し、細胞表面マーカー分子に対する蛍光標識抗体を用いて染色した後、フローサイトメーターによって解析した。また、それぞれの細胞の全抽出液、および細胞質と核の抽出液を調製し、免疫沈降およびウェスタンブロット解析を行った。

Themis の核内局在を調べるため、野生型マウスおよび Themis 変異マウスの胸腺細胞を対象として、抗 Themis 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。Grb2 については内在性タンパク質の検出が困難であったため、Grb2-RFP 融合タンパク質を胸腺細胞に遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡解析によって核内局在および Themis との共局在を解析した。

(3) Themis 分子内構造の機能解明

(2) と同様の手法を用いて、Themis の CABIT1 ドメインと CABIT2 ドメインそれぞれの中心領域を欠失させた変異体 (deltaCore1 と deltaCore2)、および CABIT1 と CABIT2 を入れ替えた変異体 (CAB2-1) を発現するマウスを作製した。胸腺、脾臓、リンパ節から採

取した血球細胞について、フローサイトメーター解析および細胞質と核内タンパク質の解析を行った。TCR シグナルによる Themis のリン酸化を調べるため、胸腺細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD4 抗体で架橋刺激して細胞抽出液を調製し、抗 Themis 抗体で免疫沈降したのち、抗リン酸化チロシン抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

(4) Themis 相互作用タンパク質の同定

野生型マウスの胸腺細胞抽出液に対して抗 Themis 抗体での免疫沈降を行い、共沈降するタンパク質を質量分析によって同定した。また、免疫沈降後のウェスタンブロット解析によって Themis と当該分子が結合することを確認した。

(5) Themis による制御性 T 細胞分化の制御

野生型および Themis 変異マウスの胸腺細胞を用いて、細胞表面染色と細胞内染色およびフローサイトメーターにより CD4⁺ CD8⁻ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞 (Treg) を解析した。また、脾臓からナイーブ CD4⁺ T 細胞を単離し、IL2 と TGF-beta 存在下で抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激培養することで、誘導性 Treg の生成を調べた。

4. 研究成果

(1) T 細胞の核内に存在する TCR シグナル分子群の解析

Themis 欠損マウスの胸腺細胞では、核画分における Grb2 の量が著しく減少していた。また、Themis と Grb2 は細胞質内だけでなく核内でも結合することが明らかになった。Themis と Grb2 の核内量は、胸腺 T 細胞の分化段階によって変化し、DP 細胞において最も多く、DN 細胞や CD4SP 細胞では少ないことがわかった。DP 細胞では、Grb2 以外の TCR シグナル分子 (Zap70, Slp76, PLCgamma1, RasGRP, SOS) の核内量も増加したが、これらは Themis 欠損により影響を受けなかった。Themis 欠損マウスにおける核内 Grb2 の減少は正の選択の障害による二次的な影響である可能性も考えられた。そこで、正の選択に障害を示す Zap70 欠損マウスおよび MHC 欠損マウスの胸腺細胞を用いて同様の実験を行ったところ、核内 Grb2 は影響を受けなかった。従って、核内 Grb2 の減少は Themis 欠損マウスに特有の現象であり、Themis と Grb2 の相互作用の意義を反映していると考えられた。

Themis 欠損マウス由来の末梢 T 細胞においても、核内 Grb2 の減少がみられた。また、B 細胞における核内 Grb2 は Themis 欠損によって影響を受けなかった。B 細胞には Themis が発現していないことと符合する。従って、Themis は胸腺 DP 細胞および末梢 T 細胞において、核内 Grb2 と結合し、Grb2 の核局在を特異的に制御することが示唆された。

(2) Themis/Grb2 複合体の機能の解明

PRS および NLS を欠失した変異型 Themis のみを発現するマウス (deltaPRS および deltaNLS) を作製した。胸腺細胞において、deltaPRS タンパク質は細胞質と核に局在したが、deltaNLS タンパク質は核局在が完全に失われていた。また、deltaPRS、deltaNLS とともに、Grb2 との結合は全くみられなかった。PRS に特異的に結合するモノクローナル抗体 2E7 は Themis-Grb2 複合体を免疫沈降できないことから、Themis と Grb2 との結合は PRS を介することが証明された。

deltaPRS および deltaNLS マウスでは、胸腺細胞の正の選択が著しく阻害されていた。従って、Themis と Grb2 との結合および Themis の核移行は、正の選択に重要であることが示唆された。また、Themis は末梢 T 細胞において TCR 刺激による IL-2 産生にも必須の役割を担っているが、deltaNLS マウスの T 細胞は正常な IL-2 産生を示した。以上の結果より、Themis の核局在は胸腺細胞の正の選択に重要な役割を果たすが、末梢 T 細胞の IL-2 産生には関与しないことが示され、核内 Themis が胸腺と末梢で異なる機能を担うことが示唆された。

Themis がどのように核内に局在するのかを明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて胸腺細胞における内在性 Themis の局在を解析した。Themis は核内に検出されたが、核小体マーカーである Fibrillarin や DNA 染色剤である DAPI による染色像とは局在が一致せず、核小体やクロマチン DNA とは異なる領域に存在することが明らかとなった。また、Themis-GFP および Grb2-RFP 融合タンパク質を胸腺細胞に遺伝子導入することで、Themis と Grb2 が核内で共局在することを確認した。しかしながら、内在性の Grb2 を検出するための抗体や染色条件を確立することはできず、Themis 欠損によって核内 Grb2 が減少することを形態学的に示すという課題は達成できなかった。

また、胸腺細胞の核内で Grb2 と結合するタンパク質を探索したところ、RNA 結合タンパク質である hnRNP-C が同定された。しかし、Themis 欠損胸腺細胞において核内 hnRNP-C 量の変化がみられないことから、Themis-Grb2 複合体との機能的な関連性は低いと考えられた。

以上のように、核内 Themis-Grb2 複合体の機能を明らかにすることはできなかった。そこで、Themis の分子内モチーフ構造に着目し、Grb2 との相互作用、正の選択の誘導、末梢 T 細胞の活性化や制御性 T 細胞の誘導における役割の解明をめざすべく、研究の方向性を変更した。

(3) Themis 分子内モチーフの機能解明

(2) で解析した deltaPRS、deltaNLS マウスに加え、CABIT1 ドメインと CABIT2 ドメインそれぞれの中心領域を欠失させた変異体

(deltaCore1 と deltaCore2) および CABIT1 と CABIT2 を入れ替えた変異体 (CAB2-1) を発現するマウスを作製し、表現型を解析した。いずれのマウスにおいても、胸腺における変異型 Themis タンパク質の発現が検出された。deltaCore1 と CAB2-1 は、deltaNLS と同程度に核移行が阻害されていたが、deltaCore2 の核移行は正常であった。従って、CABIT1 モチーフ、および CABIT1 と CABIT2 の位置関係が Themis の核移行に必要であることが明らかになった。

胸腺と末梢リンパ組織から細胞を調製しフローサイトメーター解析を行ったところ、作製した全ての変異マウス (deltaPRS、deltaNLS、deltaCore1、deltaCore2、CAB2-1) において、胸腺細胞の正の選択が著しく阻害され、末梢 T 細胞数が減少していた。また、Themis の TCR シグナル依存的なリン酸化および Grb2 との結合も、全ての変異マウスにおいて阻害されていた。従って、本研究で解析対象とした Themis の分子内ドメイン / モチーフ構造はいずれも正の選択に必要であることが示され、正の選択における各ドメイン / モチーフ構造の固有の機能を明らかにすることはできなかった。

一方、これらの変異マウスを様々な条件下で丹念に解析したところ、deltaCore1 は正常 Themis が存在する野生型マウスにおいても、正の選択を阻害することがわかった。deltaCore1 を発現する野生型マウスでは、DP 細胞における正の選択の低下や、TCR シグナルによる Erk 活性化の阻害がみられ、末梢のナイーブ T 細胞と Treg の数が著しく低下していた。従って、deltaCore1 は T 細胞分化においてドミナントネガティブ様式の阻害効果を示すことが明らかになった。このような性質は deltaCore2 および他の変異体では全くみられなかった。これらの結果は、Themis の CABIT1 ドメインと CABIT2 ドメインが T 細胞分化において異なる機能をもつことを明確に示し、CABIT ドメインの生物学的意義を明らかにした初めての成果となった。

CABIT ドメインの構造と機能を理解するためには、立体構造に基づいて分子内および分子間の相互作用機序を解明する必要がある。そこで、Themis タンパク質の結晶化と X 線構造解析を進めている。これまでに、徳島大学先端酵素学研究所の真板宣夫博士との連携により、Themis の大量発現と精製系を確立した。現在のところ、Themis の不安定性のため結晶化には至っていない。今後は、Grb2 と結合した状態で安定な共結晶を形成させ、X 線構造解析による立体構造の解明を進める予定である。

(4) Themis 相互作用タンパク質の同定

質量分析とウェスタンブロット解析によって、Themis と結合する新規タンパク質の同定を試みた。その結果、TCR の構成鎖である CD3zeta、およびミトコンドリアに局在する

新規タンパク質が Themis と相互作用することを新たに見出した。培養細胞に発現させて免疫沈降で相互作用をみる実験から、これらの相互作用には TCR シグナルが必要であることが示唆された。現在、これらのタンパク質の Themis との結合機序と、T 細胞分化における機能について解析を進めている。

(5) Themis による制御性 T 細胞分化の制御

Themis 欠損マウスにおける非典型的 T 細胞分化について詳しく調べたところ、Treg の分化が有意に低下していた。一方、野生型 Themis を過剰発現するマウスでは Treg の数が増加し、Treg の機能に重要な転写因子 Foxp3 の発現も増加していた。(2)(3) で作製した変異マウスの解析から、Themis は Akt および TGFbeta シグナル経路を介して Foxp3 の発現を正に制御すること、その制御には Themis の PRS および NLS が重要であることが明らかになった。また、(4) の解析から、Themis が SHIP1 と結合することを見出した。SHIP1 は細胞質と核の間をシャトルする inositol 5'-phosphatase である。SHIP1 阻害剤 (3AC) を用いて SHIP1 の活性を阻害すると、Themis によって亢進する Akt のリン酸化、Foxp3 の発現、Treg の分化が抑制された。以上の結果より、Themis は SHIP1 と結合し、Akt シグナルを介して Treg の分化を促進することが示唆された。Themis-SHIP1 相互作用は正の選択や末梢 T 細胞の活性化にも関与するのか、Grb2 との結合が関わるのか、といった課題が残っており、さらに解析が必要である。

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 4 件)

1. Nitta T, Suzuki H. Thymic stromal cell subsets for T cell development. *Cell Mol Life Sci*, 73, 1021-1037, 2016. 査読有
DOI 10.1007/s00018-015-2107-8

2. Tamehiro N, Oda H, Shirai M, Suzuki H. Overexpression of RhoH permits to bypass the pre-TCR checkpoint. *PLoS One*, 10, e0131047, 2015. 査読有
DOI 10.1371/journal.pone.0131047

3. Muro R, Nitta T, Okada T, Ideta H, Tsubata T, Suzuki H. The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naïve T cells" *PLoS One*, 10, e0119898, 2015. 査読有
DOI 10.1371/journal.pone.0119898

4. Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS, Suzuki H. Differential

function of Themis CABIT domains during T cell development. *PLoS One*, 9, e89115, 2014. 査読有
DOI10.1371/journal.pone.0089115

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Harumi Suzuki, Norimasa Tamehiro, Ryunosuke Muro, Hiroyo Oda, Takeshi Nitta, Akihiro Kimura. “Differential roles of TCR-proximal signaling adaptors in T cell development” 第 44 回日本免疫学会学術集会 2014 年 11 月 18 日 (招待講演) 札幌市

2. Ryunosuke Muro, Takeshi Nitta, Norimasa Tamehiro, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki. “RhoH is essential for development of IL-17-producing gamma/delta T cells” 第 44 回日本免疫学会学術集会 2014 年 11 月 19 日 札幌市

3. Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Masayuki Kitajima, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki. “Themis is important for differentiation of regulatory T cells” 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 12 日 京都市

4. Norimasa Tamehiro, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki. “Overexpression of RhoH activates the transition of CD4-CD8- (DN) to CD4+CD8+ (DP) cells in RAG-/- background” 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 10 日 京都市

5. 新田 剛 「免疫システムを形づくる胸腺微小環境」第 5 回関東甲越免疫不全症研究会特別講演 2014 年 9 月 21 日 (招待講演) 東京都

6. 新田 剛 「胸腺微小環境の新機能」沖縄感染免疫シンポジウム 2014 2014 年 7 月 3 日 (招待講演) 那覇市

7. 為広紀正、小田浩代、鈴木春巳 「RhoH 欠損マウスで認められる感癬様皮膚炎の解析」第 24 回 Kyoto T Cell Conference 2014 年 5 月 16-17 日 京都市

8. Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Norimasa Tamehiro, Michael Scott Patrick, Harumi Suzuki. “Themis regulates cytokine production in mature naïve T cells” *ThymOz International Conference*, 2014 年 4 月 2-7 日 Heron Island, Queensland, Australia.

9. Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Hiroyo Oda, Harumi Suzuki. “Thymic cortical epithelium determines the TCR

repertoire of IL-17-producing gdT cells” *ThymOz International Conference*, 2014 年 4 月 2-7 日 Heron Island, Queensland, Australia.

10. Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Hiroyo Oda, Michael Scott Patrick, Harumi Suzuki. “Differential function of two CABIT domains in Themis” 第 42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 11 日 千葉市

〔その他〕

国立国際医療研究センター研究所 免疫病理研究部ホームページ

<http://plaza.umin.ac.jp/~suzukih/cgi-bin/lab/index.cgi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新田 剛 (NITTA, Takeshi)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30373343

(2) 研究分担者

岡田 季之 (OKADA, Toshiyuki)

国立国際医療研究センター・研究所・研究員
研究者番号：10607328

為広 紀正 (TAMEHIRO, Norimasa)

国立国際医療研究センター・研究所・上級研究員
研究者番号：80597881