

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：82610  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25871164  
研究課題名(和文)細胞移入による誘導型腸炎モデルにおけるIELの機能解析

研究課題名(英文)Function of IELs in the development of IBD.

## 研究代表者

小田 浩代(Oda, Hiroyo)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10450595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患の背景には本来異物を認識する免疫系の異常が存在し、典型T細胞だけでなくTreg、IEL等の非典型T細胞が重要な役割を有すると考えられている。本研究では、炎症性腸疾患におけるT細胞の作用を解明する目的で、T細胞特異的遺伝子群(ISC1-13)の機能解明を行なった。その結果、T細胞特異的遺伝子ISC4とT細胞内で結合することが推定される新規タンパク質を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Dysregulation of immune response plays important roles in the pathogenesis of IBD.

To understand the role of T cells in IBD, we focused on the function of T cell specific genes (ISC1-13) in the development and function of T cells.

We newly identified 4 candidate proteins that can associate with ISC4 in T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：非典型T細胞 胸腺特異的遺伝子 自己免疫

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患の背景には、本来異物や異常な自己成分を認識、排除する免疫系の異常が存在すると推定されており、免疫応答の司令塔である T 細胞の分化及び機能の機構解明は急務である。T 細胞には典型的 (CD8 陽性キラーまたは CD4 陽性ヘルパー) T 細胞に加えて、非典型的 T 細胞(制御性 T 細胞(Treg)、NKT 細胞および TCR 陽性 CD8 陽性腸管上皮内リンパ球 (IEL)) が存在し、その免疫制御活性が最近注目されている。一方、胸腺内での T 細胞の分化運命は、未熟 T 細胞が発現する TCR (抗原受容体) の自己成分への親和性により決定する。すなわち自己抗原に弱く反応する TCR を発現する細胞は正の選択を受け、強く反応する自己反応(攻撃)性 T 細胞は負の選択により除去される。しかしながら近年、アゴニスト選択と呼ばれる機構により自己反応性 T 細胞が生存し、非典型 T 細胞(Treg、NKT 細胞、TCR CD8 IEL) へと分化することが明らかになった。Treg、NKT 細胞の分化・機能については我が国を中心に精力的に研究が進められているのに対して、TCR CD8 IEL については未知な点が多い。

疾患のコントロールに向けた典型及び非典型 T 細胞の分化・活性化機構の解明には、その細胞内シグナル伝達の全貌の解明が必要である。我々は、T 細胞のシグナル伝達を明らかにするためには、胸腺に特異的に発現する機能未知遺伝子の抽出と、候補遺伝子の胸腺細胞および成熟 T 細胞における機能の解明が有効であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、新規 T 細胞特異的遺伝子群 (ISC1~13) の、T 細胞分化・活性化および腸炎発症における機能の解明を目的とする。すなわち、それぞれの遺伝子の欠損変異体マウスを作成し、T 細胞分化および活性化における機能、特に腸炎発症における当該遺伝子の機能解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

新規 T 細胞特異的遺伝子 ISC13KO マウスにおける T 細胞の分化・活性化の解析

常法に従って ISC13 遺伝子欠損マウスを作成し、T 細胞の分化・活性化における ISC13 の機能解析を行う。すなわち、一次及び二次リンパ組織より精製した T 細胞表面における CD4、CD8 等の分化・成熟マーカーの発現をフローサイトメトリーを用いて解析し、リンパ組織内の各種 T 細胞サブセットの割合並びに細胞数を野生型マウスと比較することで、T 細胞の分化における ISC13 の機能解析を行う。また、各種 T 細胞サブセットをセルソーターを用いて単離し、抗 TCR 抗体で刺激した際の、サイトカイン (IL-2, IL-17, IFN ) の産生や細胞の増殖を検討するとともに、KO マウスが腸炎を始めとする自己免疫疾患を自然発症

するか否かを、体重のモニターと皮膚の観察により検討する。さらに、EAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎) を誘導した際の重症度を野生型と比較し、Th17 細胞及び Treg の活性を検討する。

T 細胞特異的遺伝子 ISC4 (Themis) の機能解析

ISC4 (Themis) は、典型 T 細胞の分化に必須の遺伝子であり、Themis 変異ラットにおいては腸炎を自然発症することが近年報告された。そこで Treg 特異的 ISC4 欠損マウスにおける腸炎発症をモニターすると同時に、T 細胞における Themis の機能を解析した。具体的には、Themis と相互作用するタンパク質はすでに報告された Grb2 や SHP1 以外にも存在するのではないかという仮説のもと、TCR 刺激の存在下/非存在下において Themis と相互作用するタンパク質の探索を行った。すなわち、胸腺細胞の抽出液より抗 Themis 抗体を用いて免疫沈降を行い、LC-MS/MS 解析を行うことにより、新規相互作用タンパク質の同定を行った。

### 4. 研究成果

新規 T 細胞特異的遺伝子 ISC13KO マウスにおける T 細胞の分化・活性化の解析

まず、B6 バックグラウンド及び BalB/c バックグラウンドにおいて、ISC13 遺伝子を欠損した際の T 細胞分化について検討した。その結果、一次及び二次リンパ組織における T 細胞の各種サブセット (典型 T 細胞、Treg、NKT 細胞、IEL) 並びにその他の血球系細胞 (B 細胞、マスト細胞、好中球、マクロファージ) の分化はいずれも正常であることが明らかになった。次に、ISC13KO マウスより単離した CD4 陽性 T 細胞に *in vitro* で TCR 刺激を加えて IL-2 の産生を、また、同刺激下で Th1、Th17 コンディションにおける IFN $\gamma$ 、IL-17 の産生量を測定したが、いずれも野生型 CD4 陽性 T 細胞と同等であった。また、MOG ペプチドと完全アジュバントを用いて B6 バックグラウンドの ISC13KO マウス並びに野生型マウスに EAE を誘導したが、EAE 発症速度やクリニカルスコアは野生型と比べて顕著な差はなかった。さらに ISC13 KO マウスの体重および皮疹の有無を約 1 年半に渡りモニターしたが、腸炎や皮膚炎の兆候は現れなかった。

以上のことから、新規胸腺特異的遺伝子 ISC13 は、典型並びに非典型 T 細胞の分化および、上記条件における T 細胞の活性化には必須ではないことが明らかになった。

T 細胞特異的遺伝子 ISC4 (Themis) の機能解析

Themis を全身の細胞でノックアウトしたマウスにおいては腸炎を発症することはないが、Themis 変異ラットにおいては腸炎を発症するという知見から、マウスにおいて

Themis を成熟典型 T 細胞または非典型 T 細胞のみで欠損すると腸炎を発症するのではないかと考えた。なぜならば、全身での Themis KO マウスは、T 細胞分化が強く抑制されるため、活性化して自己免疫疾患を起こすに十分な典型 T 細胞がそもそも存在しないことが推測されるためである。これを検証する目的で、まず Treg 特異的 ThemisKO マウスの腸炎発症をモニターしたが、腸炎の兆候は認められなかった。さらに Themis KO Treg を単離して *in vitro* における Treg 活性(ナイーブ T 細胞との共培養におけるナイーブ T 細胞の増殖抑制活性)を検討したが、野生型 Treg と同等であることが明らかになった。典型 T 細胞におけるコンディショナルノックアウトマウスの作成は現在進行中である。

Themis はこれまでに、T 細胞内で Grb2 及び SHP1 と結合することが我々や他のグループにより明らかにされてきたが、その作用機序は不明な点が多い。その中でも特に、上記ラットにおいて、腸炎を発症するメカニズムと、Themis の機能については全く明らかになっておらず、既知の Themis 結合タンパク質の欠損マウスの表現型からも、腸炎発症のメカニズムを推測することは不可能である。そこで申請者は、Themis の作用点は既知のタンパク質以外にも存在するのではないかという仮説をたて、これを検証することを目指した。

まず、Themis 野生型または Themis KO マウスの胸腺細胞より Themis を免疫沈降した。この沈降物をプロテオミクス解析したところ、2 回の解析において、Themis 自身と Grb2、また、新たに 4 つのタンパク質を同定することができた。さらに、これらのうち一部は培養細胞を用いた強制発現系において、恒常的活性化 Fyn の存在下で Themis との結合が著しく増強することが明らかになった。この結果は、胸腺細胞内で当該タンパク質と Themis との相互作用が、TCR 刺激依存的に増強することを示唆しており、今後は胸腺細胞内におけるこれらタンパク質の動態および T 細胞分化における機能について解析を進める予定である。

## 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 5 件)

Xiao C, Lai M, Gonzalez-Martin A, Cooper A, Oda H, Jin HY, Shepherd J, He L, Zhu J, and Nemazee D. Regulation of B Cell Development and Tolerance by Different Members of the miR-17-92 Family MicroRNAs Nat. Commun (2016). *in press*

Tamehiro N, Oda H, Shirai M, Suzuki H. Overexpression of RhoH permits to bypass the pre-TCR checkpoint. PLoS One. (2015)

10:e0131047,doi:10.1371/journal.pone.0131047

Nitta T, Muro R, Shimizu Y, Nitta S, Oda H, Ohte Y, T Goto M, Yanobu R, Narita T, Takayanagi H, Yasuda H, Okamura T, Murata S, Suzuki H. The thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing T cells. EMBO Rep. (2015) 16: 638-53, doi: 10.15252/embr.201540096

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 (2014) 9: e89115, doi:10.1371/journal.pone.0089115

Jin HY\*, Oda H\*, Lai M\*, Skalsky RL, Bethel K, Shepherd J, Kang SG, Liu WH, Sabouri-Ghomi M, Cullen BR, Rajewsky K, Xiao C MicroRNA-17-92 plays a causative role in lymphomagenesis by coordinating multiple oncogenic pathways EMBO J. 32:2377-91 (2013) \*All authors contributed equally to this work, doi: 10.1038/emboj.2013.178

〔学会発表〕(計 9 件)

Muro R, Nitta T, Tamehiro N, Oda H, Suzuki H Rho H is essential for development of IL-17 producing T cell 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 19 日 札幌

Suzuki H, Tamehiro N, Muro R, Oda H, Niita T Role of Rho H in differentiation and function of various types of T cells. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 18 日 札幌

Oda H, Kitajima M, Okada T, Suzuki H ISC13 is essential for IL-2 production in T cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日 京都

Tamehiro N, Oda H, Suzuki H Over-expression 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

Okada T, Nitta T, Kitajima M, Oda H, Suzuki H 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 13 日 京都

Nitta T, Muro R, Oda H, Murata S, Suzuki H Cortical thymic epithelial cells control conventional and innate T cell development. 第 42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 11 日~13 日 幕張

Okada T, Nitta T, Oda H, Michael MS,

Suzuki H 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～13日 幕張

Tamehiro N, Oda H, Suzuki H A non-synonymous SNP variant of RhoH reduces TCR mediated signal transduction via degradation. 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11日～13日 幕張

爲廣紀正、小田浩代、鈴木春巳 RhoH 欠損マウスで認められる乾癬様皮膚炎の解析 KTCC 第24回学術集会 2014年5月16日～17日 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 浩代 (ODA Hiroyo)

学術振興会特別研究員

国立国際医療研究センター客員研究員

研究者番号：10450595