

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293108

研究課題名(和文) 胸腺細胞の選択と選択後分化の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of the selection and maturation of thymocytes

研究代表者

大洞 將嗣 (Oh-hora, Masatsugu)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：40351506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺細胞の選択と選択後の成熟における分子制御機構を明らかにするために、カルシウムシグナルを中心に解析した。ストア作動性カルシウム流入-カルシウムシグナルは成熟した制御性T細胞におけるFoxp3発現の維持、末梢での制御性T細胞の分化に必須ではないが、その免疫抑制機能には必須であった。さらに、iNKT細胞においても成熟後の細胞維持は正常であった。以上から、カルシウムシグナルは胸腺細胞の選択分化を正に制御している一方、成熟後はマスター転写因子の発現維持よりも細胞機能を正に制御していることを明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of the selection and maturation of thymocytes, we have analyzed the role of calcium signaling in T lymphocytes using cell-type specific Stim1 and Stim2 doubly or calcineurin b1 knockout mice. Using Foxp3-IRES-YFP/Cre Tg mice, we found that the store-operated calcium entry-calcium signaling axis is not essential for maintenance of Foxp3 expression in regulatory T cells after maturation, but is necessary for their inhibitory function. Cell maintenance of iNKT cells after maturation was normal in the absence of store-operated calcium entry. These results indicate that calcium signaling positively regulates differentiation of agonist selected thymocytes, while it positively regulates cell functions rather than cell maintenance after maturation.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞分化 シグナル情報伝達 カルシウム

#### 1. 研究開始当初の背景

生体は、病原微生物など外敵の侵入から守るために免疫システムを備えている。免疫応答のうち、獲得免疫応答を担う主要な細胞の1つはT細胞である。T細胞は胸腺において分化し、その過程で、胸腺T細胞は「無」「正」「負」「アゴニスト」の4種類の選択を受け、機能的なT細胞へと成熟する。これらの選択は、主要組織適合抗原複合体(MHC) - 自己抗原ペプチド断片との結合によるT細胞受容体(TCR)シグナルの強度・長さによって規定される。

TCRシグナルの強度・長さは、TCR刺激で惹起される細胞外カルシウム流入の大きさと長さと良く相関することが明らかにされている。T細胞におけるカルシウム流入経路は、小胞体カルシウムセンサー分子Stim1、Stim2と細胞膜上のカルシウム遊離活性化カルシウムチャネルOrai1で制御されるストア作動性カルシウム流入(SOC流入)である。カルシウム流入によって、脱リン酸化酵素カルシニューリン - 転写因子 Nuclear factor of activated-T cell(NFAT)経路を活性化される。これまでに、カルシニューリン欠損マウスの解析から、カルシウムシグナルは「正の選択」に必須であることが明らかにされていたが、申請者はストア作動性カルシウム流入を介したカルシウムシグナルが「正の選択」に必須でないことを報告した。その一方で、ストア作動性カルシウム流入は、アゴニスト選択性T細胞の選択後の分化・機能的な成熟、つまりマスター転写因子の発現後の前駆細胞から成熟細胞への分化に必須であることを明らかにした。

これまでの研究によってT細胞分化におけるカルシウムシグナルの制御機構、その役割の一端が明らかとなったが、「正の選択」におけるカルシウムシグナル活性化機構とその下流の分子制御機構、「正」や「アゴニスト」選択後のカルシウムシグナルによる選択後分化の詳細な分子メカニズムは不明である。

#### 2. 研究の目的

本課題の目的は、カルシウムシグナルによるT細胞の選択と選択後の成熟過程の分子メカニズムを明らかにすることである。

#### 3. 研究の方法

(1) Lck-Cre Tgマウスを用いて、T細胞特異的なカルシウム透過性チャネルTrpm7欠損マウスを作製し、Trpm7の「正の選択」における役割を解析した。さらに、末梢T細胞における機能について解析を行った。

(2) CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いて、Orai1のファミリー分子であるOrai2欠損マウスを作製し、胸腺T細胞分化におけるOrai2の役割を解析した。

(3) アゴニスト選択T細胞であるTCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>腸管上皮細胞間リンパ球(IEL)の胸腺内前駆細胞の新規同定方法を確立するために、シカゴ大学のBendelac教授のグループと共同研究を行った。申請者は、候補となる新規前駆細胞の発生を、全血球特異的(Vav-iCre Tgマウス)あるいはT細胞特異的(Lck-Cre Tgマウス)なStim欠損マウスの解析、および野生型とStim欠損マウス由来の骨髄細胞をRag1欠損マウスに移植した競合的混合キメラマウスを作製して解析を行った。

(4) 成熟したアゴニスト選択T細胞におけるカルシウムシグナルの役割を解析するために、Foxp3-IRES-YEP/Creノックインマウスを用いて、制御性T細胞特異的なStim1とStim2の2重欠損マウス、カルシニューリンb1(Cnb1)欠損マウスを、CD4-Cre Tgマウスを用いてStim欠損マウスを作製し、制御性T細胞とiNKT細胞の解析を行った。

(5) 野生型マウスとT細胞特異的なカルシニューリン欠損マウスの胸腺DP細胞を2D-DIGE法を用いて、Cnb1の標的候補分子の同定を試みた。

(6) アゴニスト選択後の胸腺T細胞分化におけるヒストン修飾制御の意義を検討するために、Stim欠損によってTreg前駆細胞で発現に変化が認められたヒストン脱メチル化酵素Kdm5bの欠損マウスを作製し、その解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) Trpm7欠損マウスにおける胸腺T細胞の分化は、若齢マウスではCD4陽性CD8陽性DP細胞は減少していたが、過齢を重ねると分化は野生型と同等であった。末梢T細胞のTh1、Th2、Th17への分化、サイトカイン産生は、野生型とほぼ同等であった。また、抗原としてOVA(ニワトリ卵白アルブミン)を投与し、遅延型過敏症反応を惹起させたが、この反応も正常であった。以上の結果から、Trpm7はT細胞の分化や機能には必須ではないことが明らかとなった。

さらに、Trpm7とStim1やStim2との2重あるいは3重欠損マウスの作製を試みた。現時点では、Stim1とTrpm7の2重欠損マウスが1匹のみ得られた。

(2) Orai2は胸腺細胞およびナイーブT細胞において高く発現していたが、T細胞の分化、TCR刺激によるカルシウム流入、増殖は野生型と同等であった。しかし、イオノマイシンやタプシガルジンによるカルシウム流入は、野生型より増大した。この結果から、生理的な条件下においてOrai2はストア作動性カルシウム流入を適切な量に調節する調節分子である可能性が示唆された。

(3)TCR $\alpha\beta^+$  CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL の新規前駆細胞として、CD4(low)CD8(low)CD69(+)PD-1(high) TCR $\alpha\beta^+$  細胞を同定した。さらに、この細胞の発生は Stim を介したストア作動性カルシウム流入に依存していることを明らかにした。本成果は、Immunity 誌(論文リスト)に共同研究として発表した。

(4)制御性 T 細胞において、Cnb1 あるいは両 Stim 分子を欠損したマウスは、激しい自己免疫疾患を発症した。Cnb1 を欠損した場合は、5 週齢前後でほぼ死亡した。Stim 分子を欠損した場合は、10 週齢以上生存する個体も存在した。いずれのマウスも、脾臓内の制御性 T 細胞は野生型より減少している一方、リンパ節では増加していた。しかしこれらの制御性 T 細胞の抑制機能は、野生型に比べ著しく低下していた。その原因は、抑制分子 CTLA-4 の発現レベルが低下していることが一因と考えられた。

iNKT 細胞も、一度成熟した後の細胞の維持にはストア作動性カルシウム流入は必須ではなかった。

以上から、カルシウムシグナルはアゴニスト選択 T 細胞の成熟後の維持には必須ではないことが明らかとなった。

(5)野生型と Cnb1 欠損の DP 細胞を TCR 刺激したサンプルを比較したが、特異的なスポット(候補分子)を得ることができなかった。現在、刺激方法、調整する細胞を変更し、さらに解析方法を 2DICAL 法に変更し、解析を続けている。

(6) 各 T 細胞集団における Kdm5b の発現を検討した結果、Stim 分子を欠損した場合、CD4SP と末梢ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞において発現レベルの低下が認められた。そこで、T 細胞特異的な Kdm5b 欠損マウスの胸腺における T 細胞の分化を解析したが、大きな変化は認められなかった。この結果から、a) Kdm5b は T 細胞の分化に必要なではない、b) 他のファミリー分子あるいは酵素が機能している、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 12 件)

Yap, K.A., Shetty, M.S., Garcia-Alvarez, G., Lu, B., Alagappan, D., Oh-hora, M., Sajikumar, S. and Fivaz, M. STIM2 regulates AMPA receptor trafficking and plasticity at hippocampal synapses. *Neurobiol Learn Mem.* 138, 54-61 (2017) Doi: 10.1016/j.nlm.2016.08.007.  
Ishikawa, E., Kosako, H., Yasuda, T., Ohmura, M., Araki, K., Kurosaki, T.,

Saito, T. and Yamasaki, S. *Nature Commun.* 7, 12756 (2016) Doi: 10.1038/ncomms12756.

Akabane, S., Uno, M., Tani, N., Shimazaki, S., Ebara, N., Kato, H., Kosako, H. and Oka, T. PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60. *Mol Cell.* 62, 371-384 (2016) Doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.037.

Shindo, Y., Iwamoto, K., Mouri, K., Hibino, K., Tomita, M., Kosako, H., Sako, Y. and Takahashi, K. Conversion of graded phosphorylation into switch-like nuclear translocation via autoregulatory mechanisms in ERK signalling. *Nature Commun.* 7, 10485 (2016) Doi: 10.1038/ncomms10485.

McDonald, B.D., Bunker, J.J., Erickson, S.A., Oh-hora, M. and Bendelac, A. Crossreactive  $\alpha\beta$  T cell receptors are the predominant targets of thymocyte negative selection. *Immunity.* 43, 859-869 (2015) Doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.009.

Kiyotake, R., Oh-hora, M., Ishikawa, E., Miyamoto, T., Ishibashi, T. and Yamasaki, S. Human Mincle binds to cholesterol crystals and triggers innate immune responses. *J Biol Chem.* 290, 25322-25332 (2015) Doi: 10.1074/jbc.M115.645234.

Garcia-Alvarez, G., Shetty, M.S., Lu, B., Yap, K.A., Oh-hora, M., Sajikumar, S., Bichler, Z. and Fivaz, M. Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes. *Front Behav Neurosci.* 9, Article 180 (2015) Doi: 10.3389/fnbeh.2015.00180.

Miyake, Y., Oh-hora, M. and Yamasaki, S. C-type lectin receptor MCL facilitates Mincle expression and signaling through complex formation. *J Immunol.* 94, 5366-5374 (2015) Doi: 10.4049/jimmunol.1402429.

Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K. and Matsuda, N. Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *J Cell Biol.* 209, 111-128 (2015) Doi: 10.1083/jcb.201410050.

Yonekawa, A., Saijo, S., Hoshino, Y., Miyake, Y., Ishikawa, E., Suzukawa, M., Inoue, H., Tanaka, M., Yoneyama, M., Oh-hora, M., Akashi, K. and Yamasaki, S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped

lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*. 41, 402-413 (2014) Doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.005.  
Tsurumi, H., Harita, Y.\*, Kurihara, H., Kosako, H., Hayashi, K., Matsunaga, A., Kajihō, Y., Kanda, S., Miura, K., Sekine, T., Oka, A., Ishizuka, K., Horita, S., Hattori, M., Hattori, S. and Igarashi, T. (2014) Epithelial protein lost in neoplasm modulates platelet-derived growth factor-mediated adhesion and motility of mesangial cells. *Kidney Int.* 86, 548-557 (2014) Doi: 10.1038/ki.2014.85.  
Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K. and Matsuda, N. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate Parkin. *Nature* 510, 162-166 (2014) Doi: 10.1038/nature13392.

[学会発表](計16件)

古川雄亮, 春山直人, 梅田まりこ, 中西正光, 笠法子, 大洞将嗣, 呉本晃一, 吉崎恵悟, 高橋一郎. Stim1 はマウスのエナメル質の石灰化およびエナメル芽細胞成熟期にみられる周期性を制御する. 第12回九州矯正歯科学会学術大会、2017年3月18-19日、宮崎  
Oh-hora, M., Lu, X. Shiokawa, M. and Yamasaki, S. Loss of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in T cells causes autoimmunity through follicular helper T cell activation. 7<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T cell Conference, 2017年3月13-17日、京都  
Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Yamanashi, Y. and Karasuyama, H. STIM2 plays an essential role in IL-4 production by IL-33-stimulated basophils. 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5-7日、那覇  
Oh-hora, M., Lu, X. Shiokawa, M. and Yamasaki, S. Loss of calcium entry in T cells causes autoimmunity associated with type 2 immune responses. 第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30-12月2日、横浜  
古川雄亮, 春山直人, 梅田まりこ, 中西正光, 笠法子, 大洞将嗣, 呉本晃一, 吉崎恵悟, 高橋一郎. ストア作動性 Ca<sup>2+</sup>流入異常による外胚葉異形成症におけるエナメル質形成不全症の発症メカニズム. 第75回日本矯正歯科学会

大会学術大会、2016年11月7-9日、徳島  
Oh-hora, M., Lu, X., Yamasaki, S. STIM-ORAI-mediated control of immune homeostasis. FASEB Science Research Conference, Calcium and cell function, 2016年6月12-17日、Lisbon, Portugal  
大洞将嗣, 陸修遠, 山崎晶. カルシウム流入欠損による濾胞ヘルパーT細胞機能亢進. Kyoto T cell Conference, 2016年5月20-21日、京都  
Oh-hora, M., Lu, X. and Yamasaki, S. T-cell specific loss of store-operated calcium entry causes Th2-type chronic inflammation. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18-20日、札幌  
Oh-hora, M., Lu, X. and Yamasaki, S. Role of STIM-mediated calcium signaling in immune system. The 10<sup>th</sup> International Symposium of the Institute Network, 2015年7月23-24日、札幌  
Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Miyake, K., Li, L., Ohta, T., Horiguchi, K., Yamanashi, Y. and Karasuyama, H. STIM1 plays an essential role in basophil recruitment during IgE-mediated chronic allergic inflammation. NIPS International Workshop, TRPs and SOCs, 2015年6月4-5日、岡崎  
大洞将嗣, 陸修遠, 山崎晶. Deficiency of Stim-dependent Ca<sup>2+</sup> entry in T cells promotes IL-4-producing follicular helper T cell differentiation and causes chronic inflammation. Kyoto T cell Conference, 2015年5月15-16日、京都  
Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Wakamori, M., Miyake, K., Li, L., Horiguchi, K., Ohta, T., Adachi, T., Yamanashi, Y. and Karasuyama, H. Molecular mechanism of Ca<sup>2+</sup> influx by IgE/antigen stimulation in basophils. 第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、京都  
Yonekawa A, Saijo S, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Yoneyama M, Oh-hora M, Yamasaki S. Dectin-2 recognizes mycobacterial lipoarabinomannan and contributes to host defense during infection. 第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、京都  
Lu, X., Oh-hora, M., Mori, M., and Yamasaki, S. Endoplasmic reticulum calcium sensors, Stim1 and Stim2, control dendritic cell functions. 第

43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、京都

Oh-hora, M., Lu, X. and Yamasaki, S. Calcium signaling in chronic inflammation. 24th Hot Spring Harbor International Symposium、2014年11月7-8日、福岡

Oh-hora, M., Lu, X., Yamasaki, S. and Takayanagi, H. Mechanism of chronic inflammation by the lack of store-operated calcium entry. FASEB Science Research Conference, Calcium and cell function、2014年6月1-6日、Nassau, Bahamas

〔図書〕(計 2件)

Oh-hora M, Lu X. Function of Orai/Stim proteins studied in transgenic animal models. In Kozak JA, Putney JW Jr, eds. Calcium entry channels in non-excitabile cells. London: CRC press, 107-125 (2017)

Oh-hora M. Elucidation of the exacerbation mechanism of autoimmune diseases caused by disruption of the ion homeostasis. In Miyasaka M, Takatsu K, eds. Chronic Inflammation. Tokyo: Springer Japan, 525-538 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/mib/divisions/summary\\_in\\_mi.pdf](http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/mib/divisions/summary_in_mi.pdf)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大洞 将嗣(OHORA, Masatsugu)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号： 40351506

(2)研究分担者

小迫 英尊(KOSAKO Hidetaka)

徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・教授

研究者番号： 10291171