

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06796

研究課題名(和文)新規動物モデルを用いたヘルパー T 細胞分化に対する胸腺内ビタミンAの作用機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of importance of thymic vitamin A to helper T cell differentiation using a newly established animal model

研究代表者

山田 俊幸 (Yamada, Toshiyuki)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20183981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、CD4陽性T細胞の分化にとって胸腺内CD4+CD8+ (DP) T細胞でのレチノイン酸(RA)反応性が重要なこと、またRAは標的遺伝子であるCryabの発現誘導とそれに引き続くNF-kBの活性化を通じてCD4陽性T細胞分化のマスター転写因子であるGata3の発現を誘導している可能性が示された。またRA反応性の獲得には胸腺内樹状細胞が関与することが示された。さらに本研究において、CD4陽性T細胞でのGata3の発現はDP T細胞では高くその後は低下するが、その調節には同遺伝子の2つのプロモーターのうち上流側に位置するプロモーターのヒストン修飾の変化が関わっていることも示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was revealed that retinoic acid (RA)-reactivity in thymic CD4+CD8+ (DP) T cells is important for proper differentiation of CD4+ T cells. We suggested the possible pathway that RA upregulates expression of its target gene Cryab which is involved in NF-kB activation and nuclear translocation, and activated NF-kB then induce expression of the Gata3 gene, a master regulator of CD4+ T cell-differentiation. It was also shown that thymic dendritic cells are implicated in acquisition of the RA-reactivity of CD4+ T cells in the thymus. We also demonstrated that high level of expression of the Gata3 gene observed in thymic DP T cells is downregulated in subsequent differentiation stages of CD4+ T cells and alternation of histone modification status in the upstream promoter region of the gene is responsible for the downregulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：CD4+T細胞 分化 胸腺 レチノイン酸

1. 研究開始当初の背景

ビタミン A の欠乏により感染症にかかりやすくなる等、古くからビタミン A の免疫反応における重要性は知られていた。免疫反応の中心的役割を担う T 細胞は中枢免疫器官である胸腺で発生し、胸腺内で CD8⁺ の細胞傷害性 T 細胞、CD4⁺ のヘルパー T 細胞や制御性 T 細胞などへ分化が決定される。その後ヘルパー T 細胞は脾臓やリンパ節などの 2 次リンパ器官に移行し、抗原を提示された後、各種エフェクターヘルパー T 細胞へとさらに分化し機構を果たす。ヘルパー T 細胞の分化におよぼすビタミン A の役割は、主に 2 次リンパ器官におけるエフェクターヘルパー T 細胞への分化に対して調べられてきたが詳細は不明であり、胸腺でのヘルパー T 細胞の分化における役割についてはほとんど解明されていない。

我々は、我々により樹立、維持されている弘前ヘアレスラット (Hirosaki hairless rat: HHR) と呼ばれる SD ラット (SDR) に由来する変異ラットについて、その胸腺では CD4⁺ の制御性 T 細胞の分化が不全でありその原因が同細胞の分化を助ける樹状細胞からの *Ly49s3* 遺伝子 (細胞間相互作用に関わる) の欠失にあることを報告した<引用文献>。さらに、抗原を投与した後の HHR 脾臓では SDR 脾臓に比べて胚中心での濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) が減少していること、また CD4⁺ のヘルパー T 細胞の分化に重要な転写因子 *Gata3* の発現が HHR においては胸腺内の CD4⁺CD8⁺ (double positive; DP) 細胞、CD4-single positive (SP) T 細胞、および脾臓内の CD4⁺ T 細胞で低下していることも見出した。

DP 細胞の時期は胸腺での T 細胞の分化決定にとって重要であるが、その後我々は HHR の DP 細胞では、ビタミン A の代謝物質であるレチノイン酸 (retinoic acid; RA) を細胞質内に留めておく *Crabp1* 遺伝子の発現が高い一方、RA の核内受容体である *Rara* 遺伝子の発現は低いというデータを得て、HHR の DP 細胞では RA が作用しにくい状況にあると想像した。

2. 研究の目的

上に述べた背景に基づき、我々は正常動物では「胸腺での DP 細胞へのビタミン A の作

用」「*Gata3* の発現とその維持」「脾臓でのヘルパー T 細胞の分化」という経路が存在し、HHR では DP 細胞でのビタミン A の作用不全によりこの経路の機能が低下しているものと考えた。そこで本研究は、HHR を用いた解析によりこの経路の存在を示し、ヘルパー T 細胞の分化誘導における胸腺内ビタミン A の役割を明らかにすることを目的として立案した。

3. 研究の方法

- (1) 細胞の単離：SDR、HHR の胸腺より DP 細胞、CD4-SP T 細胞、樹状細胞を、脾臓より CD4⁺ T 細胞をマイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて単離した。
- (2) 抗原の投与：1 頭当たり 50 μg の KLH (keyhole limpet hemocyanin) をアジュバント (Complete Freund's adjuvant) に混合して皮下投与した。
- (3) ATRA (all-trans retinoic acid) の投与：SDR、HHR に 10mg/kg、20mg/kg、50mg/kg の ATRA を腹腔内投与した。
- (4) 細胞培養：胸腺より単離した CD4-SP T 細胞と樹状細胞との混合培養は細胞数の比率が 4 : 1 の条件で行った。脾臓より単離した CD4⁺ T 細胞の活性化はイオノマイシンと PMA を加えることにより行った。脾臓より単離した CD4⁺ T 細胞での *Fog1* 遺伝子の発現抑制は同遺伝子に対する siRNA (sense: GAA GAA AGA GGA AAA GGA ATT, antisense: UUC CUU UUC CUC UUU CUU CTC) を導入することにより行った。
- (5) 遺伝子の発現解析：SDR、HHR の胸腺内 DP 細胞で発現している遺伝子の網羅的解析はマイクロアレイにより行い、その後の各遺伝子の発現解析はリアルタイム PCR を用いた RT-PCR により行った。
- (6) タンパク質の解析：NF-kB p65 の細胞内分布の解析は免疫組織化学染色により行った。SDR 脾臓の CD4⁺ T 細胞における *Gata3* と *Fog1* の結合は免疫沈降法とそれに続く Western blot で、また同細胞での *Fog1* 遺伝子に対する siRNA の効果は Western blot で解析した。
- (7) クロマチン構造の解析：*Gata3* 遺伝子、*Fog1* 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造の解析は、抗メチル化ヒスト

ン抗体、抗アセチル化ヒストン抗体を用いた Chip 解析により行った

4. 研究成果

(1) T 細胞におけるレチノイン酸から *Gata3* に至る経路の解明

RA により発現誘導されることが知られている遺伝子の発現状況を HHR 胸腺内 DP 細胞で網羅的に解析したところ、*Crystallin alpha B* 遺伝子 (*Cryab*) の発現が顕著に低下していた。*Cryab* は IKK の活性化を通して *Gata3* 遺伝子の発現に重要な NF-kB を活性化することが知られている。そこで、HHR 胸腺内の T 細胞のうち核内に NF-kB p65 をもつ細胞の割合を調べたところ SDR に比して減少していた。これらのことから、RA から *Cryab* の発現誘導、NF-kB の活性化を経て *Gata3* 遺伝子の発現に至る経路があるものと考えられた。

そこでこれらの点をさらに追求するために、腹腔内への all-trans retinoic acid (ATRA) 投与実験を行った。対照に用いた DMSO の投与時には HHR 胸腺では SDR 胸腺に比して *Crabp1* 遺伝子の発現は高く、*Rara*、*Cryab* 遺伝子の発現は低かった。ATRA 投与時には投与量に関わらず HHR 胸腺では *Crabp1* 遺伝子の発現は高いまま、*Rara* 遺伝子の発現は低いままであり、RA の作用低下がうかがわれた。また、ATRA の腹腔内投与により SDR 胸腺では *Gata3* 遺伝子の発現が上昇したが HHR では上昇しなかったため、RA の作用により *Gata3* の発現が制御されている可能性が考えられた。

HHR は *Ly49s3* 遺伝子の欠失により胸腺で T 細胞の教育に関わる樹状細胞から *Ly49s3* の発現が消失している。そこで HHR 胸腺内 T 細胞の ATRA 反応性の低下に樹状細胞が関与しているか否かを探るために HHR、SDR 胸腺より単離した樹状細胞と CD4⁺T 細胞との混合培養実験を行った。その結果、T 細胞がどちらの動物に由来しても樹状細胞が HHR に由来した場合には *Rara*、*Cryab* 遺伝子の発現は低下したことから、HHR 胸腺内 T 細胞の RA 反応性の低下には樹状細胞が関わっているものと考えられた。

次に脾臓の T 細胞に着目した。HHR および SDR 脾臓由来の CD4⁺T 細胞をイオノマイシンと PMA の存在下で培養したところ、

HHR 由来の T 細胞では *IL-4* 遺伝子の発現が低下していたが、ここでも *Crabp1* 遺伝子の発現は上昇し *Rara* 遺伝子の発現は低下していた。さらに HHR 脾臓白脾髄の中心動脈付近 (T 細胞が分布する領域) の細胞では SDR に比して核内に NF-kB p65 をもつ細胞の数が減少していた。これらのことから、CD4⁺T 細胞の分化にとって RA への反応性が重要であり、その反応性の獲得には胸腺内の樹状細胞が関与している可能性が考えられた。

(2) ヘルパー T 細胞の分化過程における *Gata3* と *Fog1* の発現調節と *Fog1* の重要性

転写因子 *Gata3* は CD4⁺T 細胞の胸腺における初期発生から脾臓におけるヘルパー T 細胞への分化までに重要な役割を果たしているが、*Gata3* の転写活性を正または負に調節する転写共役因子 *Fog1* もこれら細胞の分化に関わっている。そこでヘルパー T 細胞の分化に伴う両者の遺伝子発現を検索した。SDR 胸腺内の T 細胞における *Gata3* 遺伝子の発現は、DP 細胞から CD4-SP T 細胞への移行時に 1/5 程度に低下した。脾臓の CD4⁺T 細胞での発現レベルは胸腺 CD4-SP 細胞と同程度であり、抗原投与前後で大きな変化はなかった。HHR での発現レベルはすべての分化段階において SDR より低いものの発現パターンに差はなかった。一方、*Fog1* 遺伝子の発現は SDR、HHR とともに DP 細胞から脾臓の CD4⁺T 細胞まで大きく変化せず、その発現レベルも両者の間で同程度であったが、抗原投与後には SDR 脾臓の CD4⁺T 細胞では 5 倍程度上昇したのに対し、HHR では 2 倍程度の上昇にとどまった。

そこで次に *Gata3*、*Fog1* 遺伝子の発現変化の原因を探るため、両遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造の変化を検索した。抗メチル化ヒストン抗体、抗アセチル化ヒストン抗体を用いた Chip 解析により、SDR においては胸腺 DP 細胞では *Gata3* 遺伝子の上流側プロモーター、下流側プロモーターともに活性型クロマチンの特徴を持つが、CD4-SP 細胞以降は上流側プロモーターが不活性型に変化することが明らかになり、これが *Gata3* 遺伝子の発現低下の原因と考えられた。HHR でも両プロモーターのクロマチン構造は SDR と同様な変化を示した。また前述のように HHR ではすべての CD4⁺T 細

胞の分化過程において *Gata3* 遺伝子の発現は低下していたが、Chip 解析のレベルでは SDR と HHR の間に顕著な差は認められなかった。抗原投与後の SDR 脾臓の CD4⁺ T 細胞における *Fog1* 遺伝子の発現上昇時には同遺伝子の近位に存在する *Gata3* 結合配列を含む領域のクロマチン構造が活性型に変化していることが明らかになった。これらのことから、ヘルパー T 細胞の分化に伴う *Gata3*、*Fog1* 遺伝子の発現変化は両遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造の変化により調節されているものと考えられた。

さらに、抗原投与後の SDR 脾臓の CD4⁺ T 細胞においては *Gata3* と *Fog1* が結合していることが確認され、また同細胞において siRNA によって *Fog1* 遺伝子の発現を低下させると Tfh の機能分子である Pd-1、Icos の遺伝子発現が低下した。以上のことから、Tfh の分化には胸腺 DP 細胞での RA による *Gata3* の発現誘導と脾臓 CD4⁺ T 細胞での抗原遭遇後の *Fog1* の発現誘導が重要であると考えられた。

(3) 今後の展望

今回得られた知見を元に、たとえばゲノム編集技術等を利用して *Crabp1* 遺伝子や *Cryab* 遺伝子をノックアウトすることにより、ビタミン A とヘルパー T 細胞の分化との関連がさらに明らかになるものと思われる。

<引用文献>

Yamada T., Nanashima N., Akita M., Shimizu T., Miura T., Yamana D., Sawano T., Sakurai T., and Tsuchida S. Lectin-like receptor Ly49s3 on dendritic cells contributes to the differentiation of regulatory T cells in the rat thymus. *J. Immunol.*, 191, 3799-3809, (2013). doi: 10.4049/jimmunol.1203511. (査読有)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

山田俊幸. 眼球の白濁, 水晶体の退縮, 網膜の剥離を示す遺伝性小眼球ラットにおける *Cryba1* 遺伝子の欠失. 日本白内障学会誌, 29, 37-39, (2017). (査読有)

Nanashima N., Horie K., Yamada T., Shimizu T., Tsuchida S. Hair keratin KRT81 is expressed in normal and breast cancer cells and contributes to their invasiveness. *Oncol. Rep.*, 37, 2964-2970, (2017). doi: 10.3892/or.2017.5564. (査読有)

Nanashima N., Yamada T., Shimizu T., Tsuchida S. Involvement of clustered genes in mammalian functions: their relation in a rat mutant strain. *J. Mol. Evol.*, 84, 159-161, (2017). doi: 10.1007/s00239-017-9788-6. (査読有)

Yamada T., Tsuchida S., The hirosaki small-eye rat: a novel recessive model animal of lens and retinal degeneration with loss of β A3/A1-crystallin. *Precision Medicine*, 2, e1140, Doi: 10.14800/pm, 1140, URL : http://www.smartscitech.com/index.php/pm, (2016). (査読有)

Yamada T., Nanashima N., Shimizu T., Nakazawa Y., Nakazawa M., Tsuchida S. Establishment of a recessive mutant small-eye rat with lens involution and retinal detachment associated with partial deletion and rearrangement of the *Cryba1* gene. *Biochem. J.*, 471, 293-305, (2015). doi: 10.1042/BJ20150165. (査読有)

Nanashima N., Yamada T., Shimizu T., Tsuchida S. Deletion of phospholipase A2 group IVc induces apoptosis in rat mammary tumor cells by the nuclear factor-kB/lipocalin 2 pathway. *Biochem. J.*, 469, 315-324, (2015). doi: 10.1042/BJ20150064. (査読有)

Sawano T., Shimizu T., Yamada T., Nanashima N., Miura T., Morohashi S., Kudo D., Hui F-M., Kijima H., Hakamada K., Tsuchida S. Fatty acid synthase-positive hepatocytes and subsequent steatosis in rat livers by irinotecan. *Oncol. Rep.*, 33, 2151-2160, (2015). doi: 10.3892/or.2015.3814. (査読有)

Nanashima N., Yamada T., Shimizu T., Tsuchida S. Phospholipase A2 group

Ivc blocks mammary tumor apoptosis. *Atlas of Science*,

URL:<http://atlasofscience.org/phospholipase-a2-group-ivc-blocks-mammary-tumor-apoptosis/>, (2015). (査読無)

Yamada T., Tsuchida S. Rat model of small opaque eyes open the door to eye research. *Atlas of Science*,

URL:<http://atlasofscience.org/rat-model-of-small-opaque-eyes-open-the-door-to-eye-research/>, (2015). (査読無)

Sawano T., Shimizu T., Yamada T., Nanashima N., Miura T., Morohashi S., Kudo D., Hui F-M., Kijima H., Hakamada K., Tsuchida S., Fatty acid synthase-positive hepatocytes and subsequent steatosis in rat livers by irinotecan. *Global medical discovery*,

URL:<https://globalmedicaldiscovery.com>, (2015). (査読無)

[学会発表](計5件)

山田俊幸, 清水武史, 土田成紀. 濾胞性ヘルパーT細胞分化への胸腺でのレチノイン酸による Gata3 誘導と脾臓での Fog1 誘導関与. 第40回日本分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会, 合同年会, (2017).

山田俊幸. 眼球の白濁, 水晶体の退縮, 網膜の剥離を示す遺伝性小眼球ラット (Hirosaki Small Eye Rat; HiSER) における *Cryba1* 遺伝子の欠失. 第55回日本白内障学会総会, 第42回水晶体研究会, 合同学会, シンポジウム, (2016).

山田俊幸, 七島直樹, 清水武史, 土田成紀. ラット脾臓でのヘルパーT細胞分化における転写共役因子 Fog1 の重要性. 第89回日本生化学会大会, (2016).

山田俊幸, 七島直樹, 清水武史, 土田成紀. ヘルパーT細胞の分化と機能におよぼすレチノイン酸の影響: 弘前ヘアレスラットを用いた解析. 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会, 合同年会, (2015).

山田俊幸, 七島直樹, 清水武史, 土田成紀. 水晶体の退縮と網膜の剥離を伴う劣性遺伝性小眼球ラット (Hirosaki Small Eye Rat; HiSER) の樹立とその原因遺伝子の

解明. 第81回日本生化学会東北支部会例会, (2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 俊幸 (Toshiyuki Yamada)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 20183981

(2) 研究分担者

土田 成紀 (Shigeki Tsuchida)
弘前大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号: 20142862

七島 直樹 (Naoki Nanashima)
弘前大学・保健学研究科・講師
研究者番号: 80333730

清水 武史 (Takashi Shimizu)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号: 90374818