

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06992

研究課題名(和文)動物の組織リモデリングに働く抗原タンパク質と獲得免疫系の分子間相互作用の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanisms of interactions between immune cells and its target antigens involved in the vertebrate tissue remodeling

研究代表者

井筒 ゆみ (Izutsu, Yumi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20301921

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)：脊椎動物の幼生期には、幼生特異的器官の一部を壊し、成体へと体の作り換えを行う、リモデリングというプロセスがある。最も劇的な例は、おたまじゃくしの尾の消失に見ることができる。これまで、ツメガエルをモデルとして、リモデリングに、成体型の免疫T細胞が、不要となる幼生の尾を異物(非自己)として認識し、排除するという独創的な考えを示唆してきた。免疫系から認識される抗原タンパク質をコードする遺伝子として、既にオウロ1とオウロ2を同定しているが、本研究では、それらをターゲットとして攻撃する免疫T細胞の機能阻害解析を追試し、さらに、外からT細胞を補ってやるというレスキュー実験(回復実験)を成功させた。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that Ouro proteins and adult T cells are involved in the process of the tail degeneration during metamorphosis (Mukaigasa et al..... & Izutsu, 2009). We presented here the loss-of-function and rescue analyses to investigate whether or not the immune T cells are necessary for the tadpole's tail regression via Ouro proteins during metamorphosis. To remove the T cells from the tadpoles, we used a monoclonal antibody against Xenopus T cell named XT-1. After XT-1 treatment with pre-metamorphic tadpoles, degeneration of Ouro-expressing tail tissues was significantly inhibited. To investigate T cell potency upon degeneration of the tadpole tail tissues, the rescue experiment was performed by transfer of T cells obtained from the J strain frogs into tadpoles, in which the T cells were depleted. It was succeeded in providing degenerated tails of a transgenic.

研究分野：発生生物学、免疫学

キーワード：タンパク質 発現調節 発生・分化 組織・細胞 両生類 アポトーシス T細胞 免疫学

1. 研究開始当初の背景

動物の体作りには、組織の作り換え(リモデリング)というプログラムがある。その最も劇的な例は、両生類の変態現象に見ることが出来る。研究代表者らは、上皮に発現する2つの自己抗原タンパク質をコードする新規の遺伝子 *ouro1* および *ouro2* をアフリカツメガエルから発見した。これらの自己抗原は、ケラチンであるが通常のものとは異なるサブグループに属するタンパク質である。研究代表者らは、これらを非自己と認識する免疫系が発生の過程で不要となる幼生(胎児型)自己組織を破壊することを明らかにしてきた。すなわち、従来、生体防御に働くと考えられてきた免疫システムが「個体形成においても働く」という新たな概念を提案してきた。このような発想は、研究代表者らにおいて国内外において無く、本研究のオリジナリティーは極めて高い。本研究では、免疫系の動態と機能に焦点を当て、抗原タンパク質との作用分子機序を明らかとすることを目的として行われた。

研究の背景としては、両生類のリモデリングには甲状腺が関与することが1900年初頭に報告されている(Allen, Science, 1916)。それ以降、甲状腺ホルモンとその受容体、および、その作用機構に焦点が当てられてきた。リモデリングの一つである幼生組織(尾)の消失も、甲状腺ホルモンの作用により細胞自律的に進行すると考えられ、実際、一部の細胞について、甲状腺ホルモンの直接作用によるアポトーシス(プログラムされた細胞死)が示唆されている(Schreiber & Brown, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2003; Das, et al., Dev. Biol., 2006)。このコンテキストの中、現在の研究は、甲状腺ホルモン関連遺伝子の転写促進機構など、『ホルモンの作用と遺伝子発現』に特化した研究がほとんどであり、それ以外のシステムに要因を言及することは、動物のリモデリングという観点からは研究代表者以外にない。

一方、免疫系は、従来、微生物やウイルスなどの外来の異物に対して、動物の体を守るための生体防御システムとして独自に進化してきたと考えられてきた。しかし、研究代

表者らは、免疫システムは、生体防御だけではなく、個体発生にも関わるという新規の概念を提唱してきた。すなわち、成体にとって必要な細胞を『自己』、不要な幼生細胞を『非自己』として、免疫系が自らの体を要・不要(イチ or ゼロ)で判断し、自分の体の中の細胞を見分けて組織のリモデリングに貢献している、という新しい考えである。言いかえると、抗原タンパク質をコードする遺伝子のオン・オフの組み合わせと、免疫細胞の自己・非自己の認識で体が完成する、という考え方である。このような考えに基づいた研究は、免疫学研究においても、研究代表者ら他に国内外を含めて全く無い。

これまでに、研究代表者らは、無尾両生類の発生過程において、免疫系が幼生組織の破壊に働くことを報告した(Mukaigasa & *Izutsu, Proc Natl Acad Sci USA., 2009)。研究代表者等の考えを支持する主な報告である。これらは全て研究代表者らの研究である。

2. 研究の目的

主題としている研究テーマ「無尾両生類のオウロ抗原タンパク質をターゲットとして働く免疫細胞による幼生尾の組織の細胞死」を、動物の形態形成の必須のプロセスとしてその重要性を位置づけるには、効果細胞(T細胞)側の機能解析が必要不可欠である。そしてそれらが進化的にも重要な役割を担っていることを支持する解析も必要である。従って、本研究では、上記モデルの検証を目的とし、以下の3つのサブテーマの解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 免疫細胞の機能の実証

トランスジェニック系統を用い、免疫細胞を生体内から除去するというloss-of-function、逆に、移入してことによりrescueするという実験、この2つにより、自己抗原に対するT細胞の上皮組織破壊に関与するエフェクター細胞の機能を明らかにする。

(2) オウロボロスを介して細胞死に関わる効果免疫細胞の同定

核移植法により遺伝子導入(トランスジェニック)ツメガエルが既に作製されているが、トランスジェニック系統を用い、Ouro タンパク質に対するT細胞受容体の発現を明らかとし、正常個体の変態期に一過的に尾に集積する細胞と比較することによって、自己細胞の除去に関与するエフェクター細胞の同定を行う。これには、F4およびF5世代を作製し、用いる。一般的に、ツメガエルの性成熟には約2年の期間を要し、さらに、導入された遺伝子が次世代に必ずしも遺伝する訳ではない。しかし、我々の研究室において未だに難しいが、比較的早く継代する技術を確立する。

(3) オウロボロスを介した免疫系の自己組織排除システムの進化的考察

ouro 遺伝子は、脊椎動物各種でそのオースログが存在する。有尾両生類のイモリと硬骨魚類のゼブラフィッシュにおいて、発生過程におけるオースログの発現解析を行い、自己抗原に対する免疫認識システムにおける自己組織排除システムの進化的保存性を考察する。

4. 研究成果

(1) 免疫細胞の機能の実証について

当該研究室内で樹立されたトランスジェニックの兄弟同土野中から、発現の強いものを選びかけあわせることによって、F4やF5ラインを作製した。各ラインにおける遺伝率は、申請した試薬をもちいてPCR法によって検証した。それらをもちいて、T細胞に対する特異的抗体を生体内に腹腔内投与したところ、T細胞の数が明らかに減少した。この減少の割合はFACS解析(セルソーター解析)、および、免疫組織化学的に検証した。一方、T細胞以外の免疫細胞には影響がみられなかった。また、コントロール抗体投与によっても、ほとんど影響は見られなかった。この上で、尾の一部に異時的に抗原タンパク質Ouro 1とOuro 2を両方発現させてやると、従来は、発現領域にT細胞の逡巡が増加し、発現組織に細胞死が誘導されるのだが、T細胞

除去個体ではそれが誘導されなかった。細胞死の割合は、Ouro タンパク質を発現させた尾の面積をImageJでひとつひとつ計測することで判定した。そこに、外から成体のT細胞を補ってやると、尾の組織は崩壊した。なお、移入に使用した成体のT細胞と、変態中の尾が退縮しつつある発生段階のT細胞の性状の類似性は、*in vitro*系で尾の崩壊に対する試験で既に報告済みである(Izutsu et al., Differentiation 1996; Dev. Biol., 2000)。これらの結果から、Ouro タンパク質を発現した変態期の尾の崩壊にはT細胞が必要・不可欠であることが示された。これらは独立した複数回の実験により、十分再現性のあるデータが得られたので、現在、投稿準備中である。

(2) オウロボロスを介して細胞死に関わる効果免疫細胞の同定について

PCR法でたしかめたところ、Ouro過剰発現領域、および、通常の尾の退縮時に皮膚組織に集まってきているT細胞には、T細胞の受容体アルファとベータの発現が増加している傾向があったが、再現性に乏しい。これについては再度検証する必要がある。

(3) オウロボロスを介した免疫系の自己組織排除システムの進化的考察について

脊椎動物各種のオースログの機能解析は、魚類や進まなかったが、別種である*X. tropicalis*を用いて、尾の退縮時におけるOuroタンパク質の発現箇所にてT細胞の大量の集積が見られることをみいだした。このような共発現は、変態前後ではみられなかった。PCR法にての発現量の増加を今後調べる予定である。そのための基礎的な組織学的なデータは揃ったと言える。

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3件)

1. Otsuka-Yamaguchi R., Kawasumi-Kita A., Kudo N., Izutsu Y., Tamura K., & Yokoyama H. Cells from subcutaneous tissues contribute

to scarless skin regeneration in *Xenopus laevis* froglets. *Dev. Dyn.*, 248: 586-597 (2017). doi: 10.1002/dvdy.24520. (査読有り)

2. Mawaribuchi S., Musashijima M., Wada M, Izutsu Y., Kurakata E, Park MK, Takamatsu N, & Ito M. Molecular evolution of two distinct dmrt1 promoters for germ and somatic cells in vertebrate gonads. *Mol. Biol. Evol.*, 34: 724–733 (2016). doi:10.1093/molbev/msw273. (査読有り)

3. Session AM, *et al.*, Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*.

Nature, 538: 336-343 (2016). doi:

10.1038/nature19840. (査読有り)

(74人中井筒ゆみは49番目、研究分担者・伊藤道彦は63番目)

〔学会発表〕(計7件)

1. 井筒 ゆみ (招待講演)

「おたまじゃくしの尾を認識して排除するカエルの免疫システム」日本比較免疫学会第29回学術集会(北海道大学医学部学友会館フラテ、札幌、2017年8月24日-26日)

2. Kobayashi H., Izutsu Y.

「Loss-of-function and rescue analyses of immune T cells involved in *Xenopus* tail degeneration via Ouro antigens」第50回日本発生生物学会(タワーホール船堀、東京、2017年5月10-13日)

3. 井筒 ゆみ、三浦 正幸 (招待講演)

「破壊と創造の生物学：メタモルフォーゼの謎を解く」国立科学博物館・発生生物学会主催：『発生学おもしろ Duo トーク』(国立科学博物館、東京_上野、2017年5月13日)

4. 井筒 ゆみ (招待講演)

「両生類の変態に関わるホルモンと免疫システム」第41回日本比較内分泌学会大会(北里大学相模原キャンパス、神奈川、2016年

12月9-11日)

5. 小林 遥香, 井筒 ゆみ

「ツメガエルの尾部退縮における免疫T細胞の働き」第10回XCIJ-MA研究集会(東京大学本郷キャンパス、東京、2016年7月3日)

6. 浅野 亮人, 井筒 ゆみ

「トランスジェニックツメガエル F2 世代を用いた *ouro* 遺伝子のノックダウンによる尾の退縮阻害」第10回XCIJ-MA研究集会(東京大学本郷キャンパス、東京、2016年7月3日)

7. 小林 遥香, 井筒 ゆみ

「T細胞の除去によるツメガエル尾部抗原タンパク質 Ouro を介する細胞死の抑制」日本動物学会第86回大会、朱鷺メッセ、新潟、2015年9月17-19日)

〔図書〕(計2件)

1. 井筒 ゆみ

「第9章-13 両生類の変態と自己・非自己認識」ページ未定、印刷中。動物学の百科事典 第9章 生体防御 [柄内新・藤井保・永田三郎 編] 発行日：2018年 出版予定、出版 丸善。

2. 井筒 ゆみ

「第6章 両生類の変態とホルモン」P82-99. 「ホルモンから見た生命現象と進化」シリーズ、第2巻 時 発生・変態・リズム [天野勝文・田川正朋 編] 発行日：2016年8月1日、出版 裳華房。

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ(申請者らが作製)

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biology/index/izutsu/welcome.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者研究代表者

井筒 ゆみ (IZUTSU YUMI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20301921

(2)研究分担者

伊藤 道彦 (ITO MICHIHIKO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：90240994

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

大学院生 小林 遙香

大学院生 浅野 亮人