

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08518

研究課題名(和文) KDEL受容体によるT細胞恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文) Elucidation of T cell homeostasis regulated by KDEL receptor

研究代表者

上村 大輔 (Kamimura, Daisuke)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：20391922

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)：ナイーブT細胞数が激減している変異マウスを同定し、ナイーブT細胞の恒常性について新たな機構を提唱した。ナイーブT細胞の恒常性には、生存シグナルに加え、Kdelr1-PP1経路によるストレスシグナルの解消がナイーブT細胞の生体内での生存に重要であることを報告した(Nat Commun 2015)。また、T細胞受容体からの生存シグナルが、抗原への親和性の強度に従ってストレス解消に正に働くことを明らかにした(Int Immunol 2016)。

研究成果の概要(英文)：This study proposed a new mechanism as a result of research using a mutant mouse line with reduced naive T cells. In addition to survival signals, this study showed that homeostasis of naive T cells requires a cellular stress resolution mechanism that involves the Kdelr1-PP1 pathway (Nat Commun 2015). Moreover, survival signals from T cell receptor positively regulate the cellular stress resolution depending on the affinity of a T cell receptor (Int Immunol 2016).

研究分野：免疫学、炎症学、神経免疫学

キーワード：T細胞 恒常性

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系で中心的な役割を担う T 細胞は、体内でその細胞数がほぼ一定に保たれている。この T 細胞恒常性は、効率的な免疫応答を誘導するために重要であり、また我々はこの恒常性の破綻が自己免疫疾患などの病態を招くことを報告している。国内外の今までの研究からは、末梢でのナイーブ T 細胞恒常性は、T 細胞受容体 (TCR) シグナルおよび IL-7 や IL-15 などのサイトカインという専ら生存シグナルによって維持されていると考えられている。

我々は、T 細胞の活性化および恒常性維持機構についての研究を通して、T 細胞の恒常性が破綻する事が自己免疫疾患発症のきっかけとなることを報告してきた。T 細胞恒常性維持機構をより深く理解するために、我々は、変異剤 ENU を用いてマウス個体に突然変異を導入し、T 細胞の割合に異常を持つ個体をスクリーニングした。その結果、ナイーブ T 細胞数が激減している変異個体 (T-Red マウス) を得る事ができた。興味深いことに、メモリー T 細胞数は減少していなかった。この T-Red マウスはさまざまな T 細胞依存的免疫応答が、おそらくはナイーブ T 細胞数の減少のために、有意に低下している。SNP 解析から、ER-Golgi で物質輸送に関わる膜タンパク質として知られる KDEL 受容体 1 (Kdelr1) にアミノ酸置換を生ずる点変異が見つかった。Kdelr1 の T 細胞特異的ノックアウト (KO) マウスを作成したところ、T-Red マウスと表現型が一致したことから、Kdelr1 がその原因遺伝子であると結論した。トランスクリプトーム解析から、T-Red ナイーブ T 細胞では統合ストレス応答 (integrated stress response, ISR) に関与する標的遺伝子が著しく増加していることが明らかになった。ISR は ER ストレスや飢餓ストレス等の細胞性ストレスの総称であり、翻訳開始因子 eIF2a のリン酸化によって細胞死に至るストレス応答が誘導されることが知られている。実際に T-Red および Kdelr1 KO 由来ナイーブ T 細胞では eIF2a のリン酸化が亢進していた。一方で、野生型 T 細胞においても、ある程度の eIF2a のリン酸化が認められ、生体内で一定のストレスを常に受けていることが示唆される。生化学的解析から、eIF2a のリン酸化を除去し ISR を負に制御するタンパク質脱リン酸化酵素 (PP1) と Kdelr1 が会合することが明らかになり、この会合が PP1 機能を調節している結果を得た。この一連の研究過程において、我々は、T-Red マウスを OT-I、P14 といった TCR トランスジェニック (Tg) マウスと交配すると、T-Red マウスにおけるナイーブ T 細胞が減少するという表現型が回復することに気づいた。これ

と一致して、OT-I/T-Red マウスの CD8 T 細胞は、T-Red マウス由来 CD8 T 細胞に比べてストレス応答が減弱していた。TCR Tg マウスは既に V(D)J 組換えが完了した TCR 遺伝子を発現しているため、この現象に V(D)J 組換え過程の関与を疑ったが、T-Red マウスにおいて TCR 遺伝子の V(D)J 組換えは正常に完了していることが判明していたので、TCR Tg による T-Red 表現型回復は V(D)J 組換えが本質的な原因ではないと考えられた。

2. 研究の目的

一般的に、OT-I や P14 TCR は、自己ペプチドに対する親和性が、ポリクローナル TCR をもつ T 細胞集団と比べて相対的に高いことが知られている。前述のように T-Red マウスや Kdelr1 ノックアウトマウスでは、全てのナイーブ T 細胞が細胞死に陥るわけではなく、ある集団はメモリー T 細胞として体内で維持されている。これら残存している T 細胞は、TCR Tg の知見と同様に、自己ペプチドに対する親和性が比較的高く、TCR からの生存シグナルをより受け取りやすいために生き残っているのではないだろうか？

本申請では、これまでの申請者の一連の研究で得た知見から、「末梢のナイーブ T 細胞の恒常性は TCR 等からの生存シグナルと ISR による細胞死シグナルのバランスによって決定される」という仮説のもとに、その分子機構を証明することで、ナイーブ T 細胞恒常性は専ら生存シグナルによって維持されているという現在の一般的な理解を発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

TCR からの生存シグナルと ISR からの細胞死シグナルのバランスが T 細胞の恒常性を決定することを証明するために、以下の 5 項目に焦点を当てて研究を行う。

- (1). T 細胞受容体 (TCR) 親和性の検討
ポリクローナルな状態で TCR 親和性を直接計測することは現在でも非常に困難であるが、以下の方法によって自己に対する TCR 親和性がより高いナイーブ T 細胞が T-Red マウスで生き残っている可能性を示す。
- (2). 生存シグナルと細胞死シグナルのバランスの人為的操作
TCR からの生存シグナルと ISR による細胞死シグナルを体内で変化させた状態で、ナイーブ T 細胞の恒常性を調べる。
- (3). TCR シグナルと統合ストレス応答 (ISR) シグナルのクロストークの解析
T-Red/OT-I マウスのナイーブ T 細胞は、

T-Red マウスのナイーブ CD8 T 細胞に比べて ISR 標的遺伝子の誘導が明らかに低い。つまりトランスジェニック TCR からのシグナルが、T-Red 変異による ISR 誘導を抑制していることが示唆されるので、その分子機構を明らかにする。具体的には、TCR シグナルを与えたときに ISR によるストレス応答が変化するか、反対に Thapsigargin の添加や starvation といったストレス因子で ISR を誘導した時に TCR シグナルに変化が起こるかを検討し、TCR と ISR シグナル間のクロストークの分子機構を見いだす。TCR シグナルについては生存シグナルに着目するので、Bcl2 などの抗アポトーシス分子の誘導、NF- κ B の活性化や IL-2 産生にとくに焦点を当てて解析する。生化学実験には Jurkat 細胞などの T 細胞株を利用することも視野に入れる。

- (4). 生体内でのナイーブ T 細胞に対するストレス因子の同定
マウスから単離したナイーブ T 細胞は、すでにある一定レベルの eIF2a リン酸化を受けており、培養するとリン酸化状態が低下することを見つけている。このことは T 細胞が体内で ISR を引き起こすストレスを常時受けていることを示唆している。このストレス因子が何か突き止める。MHC ノックアウトマウスへの T 細胞移入、抗サイトカイン中和抗体投与によって、それぞれ MHC-TCR シグナル、サイトカインシグナルの関与を調べる。また FTY720 の投与によって、T 細胞をリンパ節や脾臓に貯留させることによって、血流による shear stress の関与を検討する。並行して *in vitro* において様々な刺激を試し、eIF2a リン酸化を亢進もしくは低減させるものを検索する。
- (5). T 細胞特異的 Kdelr2 KO マウスの作製および Kdelr1/2 ダブル KO マウスの解析
哺乳類では Kdel 受容体は Kdelr1 から 3 まで遺伝子が存在する。T-Red マウスは Kdelr1 にミスセンス点変異があり、また Kdelr1 コンディショナル KO マウスはすでに作製している。T 細胞には主に Kdelr1 と 2 が発現しており、Kdelr2 の機能を調べるために Kdelr2 gene-trap マウスを入手したが、このマウスのホモは致死であった。上述のように、Kdelr1 KO/Kdelr2 ヘテロマウスではより顕著で早期のナイーブ T 細胞欠損が認められたので、Kdelr1、2 の間の機能重複性が疑われる。これを明らかにするため、また Kdelr1 KO/Kdelr2 ヘテロマウスが白斑様の表現型を示したのでこの発症機序を検討するために、Kdelr2 のコンディショナル KO マウスを作製し解析に用いる。

4. 研究成果

獲得免疫系で中心的な役割を担う T 細胞は、体内で一定の数が保たれている。この恒常性の維持には、サイトカインや T 細胞受容体からの生存シグナルが重要であることが知られている。我々は、変異剤 ENU を用いてマウス個体に突然変異を導入することで、ナイーブ T 細胞数が激減している変異マウス(T-Red マウス)を同定し、その責任遺伝子が KDEL 受容体 1 (Kdelr1)であることを見出した。ナイーブ T 細胞数が激減した分子機構として、Kdelr1 とそれに結合する PP1 の機能不全により、ナイーブ T 細胞の統合ストレス応答が解消されず、アポトーシスに陥ることを証明し、論文として報告した。さらに、T 細胞受容体からの生存シグナルが統合ストレス応答を抑制できることを発見した。実際に、T-Red マウスで生き残っているナイーブ T 細胞は自己親和性の高いことが証明され、これらの結果を論文として報告した。このように、ナイーブ T 細胞の恒常性には生体内から受け取る細胞性ストレスを効率的に除去する Kdelr1-PP1 経路が必要であり、サイトカインや T 細胞受容体からの生存シグナルに加え、ストレスシグナルの解消がナイーブ T 細胞の恒常性に重要であることを突き止めた。また、T 細胞受容体からの生存シグナルが、T 細胞受容体の抗原への親和性の強度に従ってストレス解消に正に働くことを明らかにした。野生型 T 細胞においても、生体内での細胞分裂に伴い、細胞ストレスのマーカーが上昇しており、T 細胞受容体への親和性が高い抗原を用いて T 細胞を刺激した場合には、誘導される細胞ストレスの程度が低かった。このことは、T 細胞受容体シグナルとストレス解消シグナルとのクロストークが存在する可能性を示唆している。さらに、Kdelr2 の変異マウスを用い、Kdelr1 と Kdelr2 が機能的に重複していることも示した。

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 6 件)

1. Arima, Y., T. Ohki, N. Nishikawa, K. Higuchi, M. Ota, Y. Tanaka, J. Nio-Kobayashi, M. Elfeky, R. Sakai, Y. Mori, T. Kawamoto, S. Andrea, Y. Sakashita, Y. Morimoto, M. Kuwatani, T. Iwanaga, Y. Yoshioka, N. Sakamoto, A. Yoshimura, M. Takiguchi, S. Sakoda, M. Prinz, D. Kamimura, and M. Murakami. Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *eLife* 6: e25517 DOI: 10.7554/eLife.25517, 2017. (査読有)

2. Tanaka, T., Y. Arima, D. Kamimura, and M. Murakami. The gateway reflex, a novel neuro-immune interaction for the regulation of regional vessels. *Front Immunol.* 8: 1321, doi: 10.3389/fimmu.2017.01321, 2017. (査読有)
3. Kamimura, D., Y. Arima, M. Tsuruoka, J-J Jiang, H. Bando, J. Meng, L. Sabharwal, A. Stofkova, N. Nishikawa, K. Higuchi, H. Ogura, T. Atsumi, and M. Murakami. Strong TCR-mediated signals suppress integrated stress responses induced by KDELR1 deficiency in naïve T cells. *Int Immunol.* 28(3), 117-126, 2016. (査読有)
4. 上村大輔, 村上正晃「ナイーブ T リンパ球の生存には細胞ストレスの解消が重要である」臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 66(1), 29-32, 2016(査読無)
5. Kamimura, D., K. Katsunuma, Y. Arima, T. Atsumi, J-J Jiang, H. Bando, J. Meng, L. Sabharwal, A. Stofkova, N. Nishikawa, H. Suzuki, H. Ogura, N. Ueda, M. Tsuruoka, M. Harada, J. Kobayashi, T. Hasegawa, H. Yoshida, H. Koseki, I. Miura, S. Wakana, K. Nishida, H. Kitamura, T. Fukada, T. Hirano, and M. Murakami. KDEL receptor 1 regulates T-cell homeostasis via PP1 that is a key phosphatase for ISR. *Nat. Commun.* 6, Article number: 7474, doi:10.1038/ncomms8474, 2015 (査読有)
6. 上村大輔, 村上正晃「ナイーブ T リンパ球のストレス制御機構、KDEL 受容体の新しい機能」実験医学 33(18), 2998-3000, 2015 羊土社 (査読無)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 上村大輔, 第 1 回北大部局横断シンポジウム
2016 年 3 月 7 日 北海道大学
Kdelr1 はナイーブ T 細胞の細胞ストレス解消に必要である
2. 上村大輔, 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大会
2015 年 12 月 1-4 日 神戸ポートアイランド
KDELR1 regulates integrated stress responses in naïve T cells
3. 上村大輔, 第 44 回日本免疫学会総会
2015 年 11 月 18-20 日 札幌コンベンションセンター
Strong TCR-mediated signals inhibit stress-mediated apoptosis in naïve T cells
4. 上村大輔, 第 48 回北海道病理談話会(第 95 回北海道医学大会病理分科会)
2015 年 10 月 17 日 札幌医科大学
Kdelr1 は生体内においてナイーブ T 細胞の細胞ストレスの解消に必要である

5. 上村大輔, 第 10 回研究所ネットワーク国際シンポジウム
2015 年 7 月 23 日、24 日 北海道大学
Kdel receptor regulates integrated stress response in naïve T cells
6. 上村大輔, UCL Molecular Cell Biology Symposium 2015
2015 年 7 月 9 日、10 日 イギリス(ロンドン)・Senate House
KDEL receptor 1 controls the integrated stress response in naïve T cells

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
上村 大輔 (KAMIMURA, Daisuke)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師
研究者番号：20391922

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()