

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08524

研究課題名(和文) T細胞胸腺内分化とヘルパー機能獲得機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of T cell development and functional differentiation in the thymus

研究代表者

木村 元子 (KIMURA, Motoko)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：00345018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘルパー機能を有するCD4T細胞と、キラー活性を有するCD8T細胞の運命決定は、未熟胸腺細胞が正の選択によって受け取るTCRシグナルの長さに依存する。そして、ヘルパー機能の付与は分化過程の全ての細胞においてTCR依存的に誘導されることがわかった。一方、CD8T細胞の分化過程においては、一時的に付与されたヘルパー機能が、Runx3依存的に抑制されることがわかった。つまりキラーT細胞への分化の過程においては、“機能的な逆転”が起きることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Functional lineage-decision either becoming helper lineage cells or killer lineage cells is determined by the duration of TCR signaling that developing T cells receive. Long duration of TCR signaling promotes helper lineage (i.e. CD4T cells); whereas short duration of TCR signaling results in the development of killer cells (i.e. CD8T cells). In this study, we have found that helper function is imposed by TCR signaling independently of Thpok expression so that all positively selected developing cells including MHC-I selected cells once acquire the helper function. However, during CD8T cell development, cytokine-induced Runx3d expression suppresses helper function and endows killer function. In summary, our data reveal that "functional reversal" is occurred during CD8T cell development.

研究分野：T細胞の発生・分化機構の解明、並びに病態形成の分子メカニズムの解明

キーワード：免疫学 胸腺 胸腺内細胞分化 細胞の運命決定 T細胞

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫の主役である T 細胞は、胸腺という特殊な器官で分化成熟することにより、T 細胞としての二つの重要なアイデンティティを確立する。一つ目に、自己-MHC と適度なアフィニティーをもつ TCR を有するクローンのみが分化成熟することで、免疫細胞としての自己認識能を確立する。二つ目に、CD4T 細胞、CD8T 細胞、抑制性 T 細胞といった、各 T 細胞サブセット特有の細胞表面分子の発現（表現系）と特有の機能を有する細胞として分化成熟する。これらの T 細胞としてのアイデンティティの確立は、成熟 T 細胞が、末梢において適切な免疫応答を発揮する上での根幹をなすものであり、いずれのステップに間違いが生じても重篤な問題を引き起こす。重要なことに、T 細胞の分化成熟は、共通の未熟 CD4+CD8+ダブルポジティブ (DP) 胸腺細胞がランダムに再構成された TCR を発現し、自己-MHC 複合体からのシグナルを受け取ることで開始される。つまり、共通の前駆細胞が、同じ TCR シグナルを受け取るにも関わらず、最終的に「表現系的」にも「機能的」にも全く異なる T 細胞サブセットに分化する。これを T 細胞の運命決定と呼ぶ。T 細胞の運命決定の分子機構は、カイネティックシグナリングモデルでよく説明される。すなわち DP 未熟胸腺細胞は、ポジティブセレクションシグナル (TCR シグナル) を受け取ると、CD8 コレセプターの発現を下げ intermediate (IM) 細胞となる。もし IM 細胞が MHC I/CD8 依存的なシグナルを受け取っているならば、CD8 の発現抑制は TCR のシグナルを中断させる。やがて細胞は IL-7 などのサイトカインシグナル依存的に Runx3 を発現し、CD8T 細胞へと分化する。一方、IM 細胞が MHC II/CD4 依存的なシグナルを受け取っているならば、CD8 の発現抑制による影響は受けないので、TCR のシグナルは持続する。持続的な TCR シグナルはやがて Thpok を誘導し、細胞は CD4T 細胞へと分化する。このことから、Thpok/Runx3 は、それぞれ CD4T/CD8T 細胞への分化決定因子と認識されている。一方、CD4T/CD8T 細胞がそれぞれの機能（ヘルパー機能とキラー機能）を獲得する過程においても、Thpok/Runx3 が重要な役割を担っているのか、異なる分子機序が存在するのかが不明であった。

2. 研究の目的

T 細胞は胸腺内にて、共通の前駆細胞である未熟胸腺細胞が、胸腺上皮細胞上に発現する自己抗原-MHC 複合体を認識することでその分化プロセスを開始する。そして CD4T 細胞、CD8T 細胞、抑制性 T 細胞といった、細胞表面分子の発現（表現系）も、機能も全く異なる各細胞へと分化する。しかし「表現系の獲得」と「機能獲得」という二つの形質が、分化過程において同時に同じ機構によって規定されるのか、別々の機構により規定さ

れるのか、その分子機構はまだ明らかにされていない。末梢において各々の T 細胞が正しい機能を発揮するためには、分化過程において「機能獲得」が正しくなされることが必須である。そこで本研究では、「機能獲得」の分子機構に特に注目することで、T 細胞のアイデンティティの確立に重要な分子機構を解明することを目的に解析を行った。

3. 研究の方法

CD4T 細胞へ分化する細胞のみがヘルパー機能を獲得する分子メカニズムを解明するために、以下の点に着目して研究した。

TCR シグナルの重要性について：持続的な TCR シグナルは、CD4T 細胞の分化において Thpok を誘導する以上の役割を担っている可能性を検討する。Thpok と Runx3 の役割について：Thpok の非存在下でも CD40L の発現が誘導できることは判明したが、Thpok が全く必要ないのかが不明である。また Runx3 は CD4T 細胞への分化を負に制御することから、ヘルパー機能獲得に関しても Runx3 が負に制御する可能性を検討する。

胸腺内分化に伴う T 細胞の機能獲得に重要な新規分子の解析：ヘルパー機能の獲得には Thpok 以外の新規の重要な分子が関与する可能性が高い。これまでに絞り込んだ候補分子群を詳細に解析し、その機能を明らかにする。

4. 研究成果

はじめに TCR シグナルの直接的な関与を調べるために、正の選択を受けていない CD69-CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ (DP) 細胞を、*in vitro* で TCR 刺激した。TCR シグナルを受けた細胞は、ヘルパー機能の指標の一つである CD40L の発現を顕著に誘導する一方で、細胞運命決定因子である Thpok、Runx3 の発現はいずれも見られなかった。つまり、ヘルパー機能の付与は細胞運命の決定がなされる前に、TCR 刺激依存的に誘導されることがわかった。TCR シグナルを受けた細胞は、IL-7 シグナル依存的に Runx3 を発現し CD4⁺CD8⁺シングルポジティブ (8SP) 細胞へと分化する。そこで *In vitro* 実験系を用いて 8SP 細胞への分化過程における CD40L の発現変化を調べたところ、Runx3 依存的に低下することがわかった。この結果は、8SP 細胞への運命決定に伴って Runx3 がヘルパー機能を積極的に抑制することを示唆している。

次に、Runx3 による CD40L の発現抑制制御をより詳細に解析する目的で、レトロウイルスを用いて Runx3 を CD4T 細胞へと導入したところ、Runx3 を発現した CD4T 細胞は、CD40L の発現が低いことがわかった。

さらに、*in vivo* における Runx3 の CD40L の発現に対する役割を調べた。機能的な Thpok も Runx3 も持たない HD.CBFβ^{-/-}. β2m^{-/-} マウスを解析したところ、SP 細胞における CD40L の発現が高く維持されることがわか

った。これらの結果から、ヘルパー機能の付与は分化過程の全ての細胞において TCR 依存的に誘導されることがわかった。しかし 8SP 細胞の分化過程においては、Runx3 依存的に、一時的に付与されたヘルパー機能が抑制されることがわかった。つまりキラーT細胞への分化の過程においては、“機能的な逆転”が起きることが明らかとなった。

では、なぜ CD4T 細胞、CD8T 細胞の分化決定は間違いなく起こるのだろうか。その機構について明らかにする目的で、初めに、ヘルパー機能の獲得に必要な TCR シグナルの長さの同定を行った。実際の TCR シグナルの長さは、Rag2-GFP BAC Tg マウスを利用することにより測定した。その結果、本来 CD8T 細胞へと分化誘導する MHC クラス I 依存的な TCR シグナルにおいても、約 53 時間を超える長さの TCR シグナルを受けとった細胞は、ヘルパー機能を有する CD4T 細胞へと分化することが明らかとなった。つまり、ヘルパー機能を有する CD4T 細胞と、キラー活性を有する CD8T 細胞の運命を決定する TCR シグナルの長さには閾値が存在し、その閾値を境に運命決定がなされることがわかった。この結果は論文としてまとめ一流誌に報告した(原著論文2)。

これらの成果は、胸腺内における細胞の運命決定の緻密な分子機構を明らかにしたものであり、この分野の発展に大きく貢献するものであると考えている。

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)(全て査読有)

原著論文

1. *Kimura, M.Y., Hayashizaki, K., Tokoyoda, K., Takamura, S., Motohashi, S. and *Nakayama, T.: Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses. *Immunol. Rev.* 278:87-100 (2017). *Co-corresponding author
DOI:10.1111/imr.12559
2. *Kimura, M.Y., Thomas, J., Tai, X., Cuinter, T.I., Shinzawa, M., Etzensperger, R., Li, Z., Love, P., Nakayama, T. and *Singer, A.: Timing and duration of MHC I positive selection signals are adjusted in the thymus to prevent lineage errors. *Nat. Immunol.*, 17:1415-23 (2016).
*Co-corresponding author
Doi: 10.1038/ni.3560
3. *Hayashizaki, K., *Kimura, M.Y., *Tokoyoda, K., Hosokawa, H., Shinoda, K., Hirahara, K., Ichikawa, T., Onodera, A.,

Hanazawa, A., Iwamura, C., Kakuta, J., Muramoto, K., Motohashi, S., Tumes, D.J., Iinuma, T., Yamamoto, H., Ikehara, Y., Okamoto, Y. and Nakayama, T.: Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. *Sci Immunol.* 1:eaaf9154 (2016) *Co-first author

DOI: 10.1126/sciimmunol.aaf9154

4. Pobeziński, L.A., Etzensperger, R., Jeurling, S., Alag, A., Kadakia, T., McCaughtry, T.M., Kimura, M.Y., Sharrow, S.O., Guinter, T.I., Feigenbaum, L. and Singer, A.: Let-7 microRNAs target the lineage-specific transcription factor PLZF to regulate terminal NKT cell differentiation and effector function. *Nat. Immunol.*, 16:517-24 (2015)

Doi: 10.1038/ni.3146

5. Hosokawa, H., Kato, M., Tohyama, H., Tamaki, Y., Endo, Y., Kimura, M.Y., Tumes, D.J., Motohashi, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Tanaka, T. and Nakayama, T.: Methylation of gata3 protein at arg-261 regulates transactivation of the il5 gene in T helper 2 cells. *J. Biol. Chem.*, 290:13095-103 (2015).

Doi:10.1074/jbc.M114.621524

[学会発表](計15件)

1. Kimura M.Y., Hayashizaki K. and Nakayama T.: CD69-My19 system regulates pathogenesis of inflammatory disorders. The 2nd Chiba University-UC San Diego Symposium "Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine", Mar. 28 2018. School of Medicine, Chiba University(千葉県・千葉市)
2. Kimura M.Y., Hayashizaki K. and Nakayama T.: Myosin light chain 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017, Oct. 31 2017. Ishikawa Ongakudo(石川県・金沢市)
3. Kimura M.Y.: Roles of CD69 on NKT cell development. Experimental Immunology Branch, NCI/NIH, Bethesda USA, May 5th 2017.
4. Hayashizaki K., Kimura M.Y., Igi A. and

- Nakayama T.: Myosin light chains 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2017年3月13-17日、(O/P)、京都大学芝蘭会館(京都府・京都市)
5. Hayashizaki K., Kimura M.Y. and Nakayama T.: Myosin light chains 9 and 12 are functional ligands for CD69 that regulate airway inflammation. The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience “Chronic Inflammation –Initiation, Progression and Resolution” 2017年1月20-21日、(P)、武田薬品研修所(大阪府・吹田市)
 6. Kimura M.Y.: Timing and duration of MHC-I positive selection and CD8 lineage choice in the thymus. NIH Thymus Symposium, Bethesda USA, Dec. 9th 2016.
 7. Kimura M.Y., Nakayama T. and Singer A.: Timing and duration of MHC-I positive selection signals in the thymus reveal a novel compensatory signaling mechanism that prevents lineage fate errors. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 2016年12月5-7日、(O/P)、沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル、(沖縄県・宜野湾市)
ベストプレゼンテーション賞受賞
 8. Kimura M.Y., Nakayama T. and Singer A.: A compensatory signaling mechanisms that prevents lineage errors during MHC class I positive selection in the thymus. ThymUS international conference 2016 Jun. 5-9, 2016, Maui USA (P)
 9. 木村元子, 林崎浩史, Alfred Singer, 中山俊憲: A compensatory signaling mechanisms that prevents lineage errors during MHC class I positive selection in the thymus. 第26回 Kyoto T Cell Conference, 2016年5月20-21日 (O/P)、比叡山延暦寺会館(滋賀県・大津市)
 10. Sarkar, H. M., Yagi, R., Nakajima, T., Kimura, M.Y., Nakayama, T., and Zhu, J.: Roles of IkBNS in T follicular helper cell differentiation and function. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 2015年11月18-20日、(P) 11/18、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
 11. Kimura M.Y., Nakayama T. and Singer A.: Molecular basis for acquisition of helper function during thymocyte development. 第25回 Kyoto T Cell Conference, 2015年5月15-16日、(O/P)、京都大学芝蘭会館(京都府・京都市)
 12. Kimura M.Y., Nakayama T. and Singer A.: Strong TCR signaling prolongs lineage uncertainty during MHC-I specific positive selection. Immunology 2015, 2015 May 8-12, New Orleans(USA) (P)
 13. Kimura M.Y., Shinzawa M., Etzensperger R., Yagi R., Hayashizaki K., Igi A., Nakayama T. and Singer A.: Molecular basis for acquisition of helper function during thymocyte development. Venice Thymus Meeting 2015. Venice, Italy, Apr. 2015 (P)
 14. Kimura M.Y.: Timing of positive selection and CD8 lineage choice, IGMM-UMR5535-CNRS Seminar, Montpellier/ France, Apr. 8th 2015.
 15. Kimura M.Y.: Timing of positive selection and CD8 lineage choice, Biological Sciences and bioengineering Program seminar at Sabanci University, Istanbul Turkey, Apr. 14th 2015.
- 〔図書〕(計0件)
- 〔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
千葉大学大学院 医学研究院 免疫発生学
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
木村 元子(KIMURA, Motoko)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 00345018