

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19102

研究課題名(和文) T細胞の機能を決定するTCRシグナル経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the T cell receptor signaling pathway that determines the functions of gdT cells

研究代表者

室 龍之介 (Muro, Ryunosuke)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：80761262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IL-17産生型 T ( T17) 細胞は感染初期の防御応答を担う一方で、炎症性疾患や癌の転移に関与することが示され、様々な疾患の治療標的として注目を集めている。 T17細胞は胸腺で分化するが、その分化機構には不明な点が多い。本研究ではT細胞受容体(TCR)シグナルが T細胞の分化に果たす役割を解明することを目的とした。遺伝子改変マウスを用いた解析から、チロシンキナーゼSykが TCRシグナル伝達に重要な役割を担い、PI3K/AKT経路およびLAT/ERK経路を活性化することで T17細胞の分化プログラムを制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて、研究代表者らは T細胞におけるSyk依存的なTCRシグナルを同定した。これまで T細胞のシグナル伝達機構は典型的 T細胞と類似していると考えられてきたが、研究代表者らは T細胞に特有のTCRシグナル伝達が T細胞の機能決定に重要であることを明らかにし、世界に先駆けて発表した。免疫学領域における新たな知見を提供し、学術的意義の高い成果となった。本研究結果から、SykやPI3Kを標的とすることで、炎症性 T細胞を人為的に制御できる可能性があり、炎症性疾患の治療法確立に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：IL-17 producing T ( T17) cells play an important role in the early response to infection, whereas they are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases and metastasis. Although the T17 cells are known to develop in the thymus, its precise molecular mechanism remained unclear. In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism how T cell receptor (TCR) signal controls the development of T17 cells in the thymus. Studies with genetically modified mice revealed that Syk functions as a dominant tyrosine kinase in TCR signaling. We also found that Syk activates the PI3K/AKT pathway and LAT/ERK pathway, both of which are mandatory for the development of T17 cells.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 T細胞受容体 T細胞 Syk

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む脊椎動物は常に感染や腫瘍等の脅威に曝されているが、免疫系がこれらを排除することで生体恒常性を維持している。よって、免疫細胞の分化プロセスや機能獲得機構を解明することは免疫関連疾患の克服に繋がると期待され、基礎医学研究の重要な課題である。

T細胞は胸腺にて分化し、細胞表面上のT細胞レセプター(TCR)によって $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞に分けられる。 $\gamma\delta$ T細胞は、ヒトやマウスでは $\alpha\beta$ T細胞よりもマイナーな集団であることから、研究が進んでおらず、その分化メカニズムや生理学的重要性は十分に理解されていない。 $\gamma\delta$ T細胞は感染早期に炎症部位に出現し、自然免疫から獲得免疫への移行を円滑にすることが知られている。しかし、近年になって乾癬、がんの転移などに $\gamma\delta$ T細胞が関与することが示され、治療標的としての有用性が見出されつつある。

$\gamma\delta$ T細胞は胸腺にてIL-17産生型 $\gamma\delta$ T( $\gamma\delta$ T17)細胞またはIFN $\gamma$ 産生型 $\gamma\delta$ T( $\gamma\delta$ T1)細胞に分化する。 $\gamma\delta$ T17細胞は胎仔期から新生仔期の短い期間でのみ分化し、その後、成長と共に $\gamma\delta$ T1細胞が優位に分化するというユニークな特徴を持つ(Bonneville et al, *Nat. Rev Immunol* 2010, Carding et al, *Nat Rev Immunol* 2002)。また、細胞表面に発現するTCR-V $\gamma$ 鎖と $\gamma\delta$ T細胞の機能には密接な関係があることが知られ、 $\gamma\delta$ T17細胞はV $\gamma$ 4とV $\gamma$ 6を、 $\gamma\delta$ T1細胞はV $\gamma$ 1とV $\gamma$ 5を発現する。多くの遺伝子改変マウスを用いた解析によって、 $\gamma\delta$ T17細胞の分化に必須の転写因子や液性因子が同定されたが、TCRシグナルが $\gamma\delta$ T細胞のサイトカイン産生能獲得にどのような機能を担っているのかについては統一的な見解がない。研究代表者はその原因が $\gamma\delta$ TCRシグナル伝達を担う重要なTCRシグナル関連分子が同定されていないためであると考えた。 $\alpha\beta$ TCRシグナル伝達は数十年にも及ぶ研究の蓄積から、その全体像がほぼ明らかにされている。一方、 $\gamma\delta$ T細胞はTCR複合体の構造やTCRシグナル関連分子が $\alpha\beta$ T細胞とは部分的に異なるという報告から(Hayes & Love *JEM* 2006; Laird et al, *J Immunol* 2010)、申請者は $\gamma\delta$ T細胞に特有のTCRシグナルが $\gamma\delta$ T細胞の機能的分化を制御するという仮説を立てた。そこで、抗原受容体の近傍のチロシンキナーゼであるZap70 (Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70)とSyk (Spleen tyrosine kinase)に着目した。Zap70は $\alpha\beta$ TCRのシグナル伝達に必要であり(Negishi et al, *Nature* 1995)、SykはB細胞受容体(BCR)やFc受容体などの自然免疫シグナル伝達に必要である(Turner et al, *Nature* 1995; Cheng et al *Nature* 1995)。

## 2. 研究の目的

本研究では、TCR近傍のチロシンキナーゼであるZap70とSykに焦点をおき、 $\gamma\delta$ T細胞におけるTCRシグナル伝達の分子メカニズムを理解することで、TCRシグナルが $\gamma\delta$ T細胞の機能決定に果たす役割を解明することを目的とした。具体的には、CRISPR/Cas9法を用いて遺伝子改変マウスを作成し、表現系解析を行うことでTCRシグナルと $\gamma\delta$ T細胞の分化・機能との関係を調べた。また、チロシンキナーゼ下流の分子(LAT、PI3K)も含め、 $\gamma\delta$ T細胞への役割を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウスの作成

標的遺伝子(Zap70, Syk, Lat, Pik3cd, Pik3cg)に対するsingle guide RNAおよびヒト化Cas9をコードするmRNAを前核期受精卵に注入し、偽妊娠ICRマウスの卵管へ移植した。得られた胎仔・新生仔マウスについてPCR法、サンガーシークエンス法などで標的遺伝子が欠損していることを確認した。

## (2) 胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞の分化、機能解析

野生型(WT)および KO マウスの胸腺を採取し、フローサイトメトリーによって胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞の絶対数と頻度を計測した。また、TCR-V $\gamma$ 1、-V $\gamma$ 4、-V $\gamma$ 5、-V $\gamma$ 6 サブセットの細胞数についても定量化を行った。胸腺細胞を Brefeldin A 存在下にて PMA (Phorbol12-myristate13-acetate)と Ionomycin によって刺激し、 $\gamma\delta$ T1 細胞および $\gamma\delta$ T17 細胞の絶対数を定量化した。

## (3) TCR シグナル伝達解析

1 日齢の WT マウスの胸腺から $\gamma\delta$ T 細胞を精製し、TCR シグナルを誘導した。TCR シグナルの誘導には、ストレプトアビジンで架橋した抗 CD3 $\epsilon$ 抗体を用い、37 °C で 2 分刺激を行った。刺激後、細胞を可溶化し、抗リン酸化抗体(clone: 4G10)を用いて免疫沈降を行い、Western blot によりリン酸化 Zap70 および Syk を検出した。WT および KO マウスから調整した胸腺細胞懸濁液を同様の方法にて刺激した後、抗リン酸化 ERK 抗体(197G2)および抗リン酸化 AKT 抗体(D9E)によって染色し、フローサイトメトリーによって各々の蛍光強度を定量した。さらに、生体内における $\gamma\delta$ T 細胞の活性化状態を TCR シグナルマーカーである CD5 の発現量を定量化することで評価した。

## (4) 新生仔期特異的に分化する $\gamma\delta$ T 細胞におけるチロシンキナーゼの機能解析

胎生 15.5 日の WT および Syk KO マウスから肝臓を採取し、Gr-1<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup>の T 前駆細胞を含む細胞画分を調整した。Stem Cell Factor (SCF)および IL-7 存在下で 24 時間培養し、レトロウイルスによって Zap70 または Syk をコードする cDNA 配列を導入した。デオキシグアノシン処理を施した胎生 15.5 日の胸腺と遺伝子導入した T 前駆細胞をハンギングドロップで 24 時間共培養し、フィルターメンブレン上で胎仔胸腺器官培養(FTOC)を行った。9~14 日後、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化や機能について解析を行った。

## (5) イミキモド(IMQ)誘導性乾癬様皮膚炎発症モデル

胎生 15.5 日の WT または Syk KO マウスの肝臓に由来する T 前駆細胞を X 線照射した TCR $\beta$ /TCR $\delta$  dKO マウスに移入し、骨髄キメラマウスを作成した。マウスの両耳介に 5% IMQ クリームを 5 日間反復塗布し、乾癬様皮膚炎を誘導した。耳介腫脹をノギスで計測し、皮膚炎症反応の指標とした。5 日目に頸部リンパ節を回収し、 $\gamma\delta$ T17細胞の絶対数を定量化した。

## 4. 研究成果

### (1) 胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞の分化を制御するチロシンキナーゼの同定

1 日齢の胸腺から精製した $\gamma\delta$ T 細胞に TCR 刺激を誘導し、Zap70 および Syk のリン酸化を Western blot により解析した結果、どちらの分子も $\gamma\delta$ TCR 刺激依存的にリン酸化された。そこで、Zap70 KO、Syk KO、Zap70/Syk dKO マウスの胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞の分化を評価した。WT および Zap70 KO マウスの胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞数は約  $2 \times 10^5$  であり、Zap70 欠損による $\gamma\delta$ T 細胞数の有意な変化は認められなかった。一方、Syk KO マウスでは $\gamma\delta$ T 細胞数が WT の 25%程度であった。さらに、Zap70/Syk dKO マウスでは、WT マウスの 10%程度まで減少した。これら KO マウスの胸腺細胞を用いて、TCR を誘導し、ERK のリン酸化を評価した。Zap70 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞は WT マウスと同程度に ERK のリン酸化が誘導された。一方、Syk 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞は、ERK のリン酸化が著しく障害されていた。また、Zap70/Syk 両欠損 $\gamma\delta$ T 細胞では ERK のリン酸化が全く検出されなかった。これらの結果と一致して、 $\gamma\delta$ T 細胞における CD5 の発現量は Zap70 欠損による影響を受けず、Syk の欠損に

よって減少した。また、Zap70 と Syk を両方欠損する $\gamma\delta$ T 細胞では CD5 を発現する $\gamma\delta$ T 細胞は全く検出されなかった。よって、Syk 依存的な TCR シグナルが胸腺 $\gamma\delta$ T 細胞の分化に中心的な役割を果たしていると考えられた。

#### (2) $\gamma\delta$ T 細胞の機能決定における TCR シグナルの役割

Zap70 欠損および Syk 欠損による $\gamma\delta$ T 細胞機能への影響について解析を行った。0 日齢の WT マウスにて $\gamma\delta$ T17 細胞数は約  $6 \times 10^4$  であり、Zap70 KO マウスでは 50%減少していた。Syk KO マウスおよび Zap70/Syk dKO マウスでは $\gamma\delta$ T17 細胞は全く検出されなかった。次に、 $\gamma\delta$ T17 細胞を含むサブセットである V $\gamma$ 4 と V $\gamma$ 6 に注目した。Zap70 欠損マウスでは V $\gamma$ 6 陽性  $\gamma\delta$ T 細胞のみが特異的に減少し、その他のサブセットに大きな変化が認められなかった。また、V $\gamma$ 4 陽性  $\gamma\delta$ T17 細胞の細胞数は野生型マウスと同等に検出された。一方、Syk KO マウスでは V $\gamma$ 6 および V $\gamma$ 4 サブセットが著しく減少していた。 $\gamma\delta$ T1 細胞はいずれのマウスでも検出された。さらに、Syk を欠損する骨髓キメラマウスおよびリンパ球系列特異的に Syk を欠損するマウスを作成し、末梢 $\gamma\delta$ T 細胞の表現型について解析を行った。その結果、Syk を欠損するマウスでは、肺や脾臓にて $\gamma\delta$ T17 細胞がほとんど検出されなかった。また、IMQ 誘導性乾癬様皮膚炎を誘導した結果、Syk の欠損によって耳介の肥厚が有意に減少した。また、炎症時における頸部リンパ節にて $\gamma\delta$ T17 細胞はほとんど検出されなかった。以上の結果から、Syk によって誘導される TCR シグナルが $\gamma\delta$ T17 細胞への運命決定に必要であり、末梢組織における炎症応答の規模を決定づける重要な因子であることが示された。

#### (3)Zap70 と Syk の $\gamma\delta$ T 細胞分化における機能相補性の検証

Zap70 と Syk は Syk family に属し、構造的に近縁なチロシンキナーゼである。Zap70 が Syk の機能を代替できるかを検証する目的で、レトロウイルスを用いて Syk KO マウスに由来する T 前駆細胞に Zap70 を過剰させ、in vitro にて $\gamma\delta$ T17 細胞分化を再構築する実験系を確立した。本手法では、WT マウスに由来する T 前駆細胞を用いた場合、ウイルス感染が成立した $\gamma\delta$ T 細胞のうち 5%程度の細胞が IL-17 を産生する。また、Syk 欠損 T 前駆細胞を用いた場合、 $\gamma\delta$ T17 細胞はほとんど検出されなかった。Syk 欠損 T 前駆細胞に Zap70 を導入した結果、 $\gamma\delta$ T17 細胞の検出頻度は 2.5%程であり、統計的に有意な減少を認めた。また、CD5 の発現量も WT と比較して 50%ほど減少していた。したがって、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化において、Zap70 は Syk の機能を相補することはできず、 $\gamma\delta$ T 細胞の機能獲得には Syk 特有の機能が必要であることが示された。

#### (4)Syk によって制御する TCR シグナル分子の解析

過去の報告から B 細胞において Syk が Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)の活性化に関与することが示唆されている。PI3K は膜リン脂質である PIP3 の生成を介して AKT の活性化を誘導するキナーゼである。よって、Syk が PI3K/AKT 経路の活性化を誘導することで $\gamma\delta$ T17 細胞の分化を誘導する可能性を検証した。Syk 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞に TCR 刺激を誘導した結果、AKT のリン酸化は有意に抑制された。一方で、Zap70 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞では AKT のリン酸化に有意な変化は認められなかった。次に、PI3K が $\gamma\delta$ T17 細胞の分化に必要なかを検証するために PI3K KO マウスを解析した結果、 $\gamma\delta$ T17 細胞は全く検出されなかった。興味深いことに、PI3K 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞では、TCR 刺激依存的な AKT のリン酸化は抑制されるものの、ERK のリン酸化にほとんど影響はみられなかった。また、CD5 の発現量にも有意差は認められなかった。ERK の活性化には LAT が必要であることが知られている。このような実験的観察結果から、PI3K/AKT 経路と LAT/ERK

経路は Syk によって独立に制御されているのではないかと予想された。したがって、LAT 欠損マウスを作成し、LAT 欠損による TCR 刺激依存的な AKT および ERK の活性を解析した。その結果、TCR 刺激誘導性の AKT のリン酸化は LAT とは無関係に誘導され、ERK のリン酸化に LAT が必要であることが確認された。また、LAT 欠損マウスでは $\gamma\delta$ T 細胞数の著明な減少と $\gamma\delta$ T17 細胞の消失が認められた。以上の結果から Syk は PI3K/AKT 経路と LAT/ERK 経路の活性化を制御し、 $\gamma\delta$ T17 細胞の分化を支持することが示された。

これらの成果を総括し、Journal of Clinical Investigation 誌に発表した。 $\gamma\delta$ T 細胞は初期分化段階において Zap70 よりも Syk に依存しており、 $\alpha\beta$ T 細胞よりもむしろ B 細胞に近いシグナル伝達機構を備えるという新しい知見が明らかになった。これらの成果を応用し、将来的には人為的に $\gamma\delta$ T1 や $\gamma\delta$ T17 の分化や機能を制御し、自己免疫疾患や癌転移などを治療するための基礎理論の確立に発展させたい。

#### 5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

1. Muro R, Takayanagi H, Nitta T. T cell receptor signaling for  $\gamma\delta$ T cell development. *Inflammation and Regeneration*, 39, 2019. 査読有 DOI <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0095-z>
2. Inoue M, Okamoto K, Terashima A, Nitta T, Muro R, Negishi-Koga T, Kitamura T, Nakashima, Takayanagi H. Arginine methylation controls the strength of  $\gamma$ c-family cytokine signaling in T cell maintenance. *Nature Immunology*, 19, 1265-1276, 2018. 査読有 DOI 10.1038/s41590-018-0222-z
3. Muro R, Nitta T, Nakano K, Okamura T, Takayanagi H, Suzuki H.  $\gamma\delta$ TCR recruits the Syk/PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program. *The Journal of Clinical Investigation*, 128, 415-426, 2018. 査読有 DOI 10.1172/JCI95837.
4. Muro R, Nitta T, Kitajima M, Okada T, Suzuki H. Rasal3-mediated T cell survival is essential for inflammatory responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128, 415-426, 2018. 査読有 DOI 10.1016/j.bbrc.2017.12.159.
5. Nitta T, Kochi Y, Muro R, Tomofuji Y, Okamura T, Murata S, Suzuki H, Sumida T, Yamamoto K, Takayanagi H. Human thymoproteasome variations influence CD8 T cell selection. *Science Immunology*, 2, eaan5165, 2017. 査読有 DOI 10.1126/sciimmunol.aan5165.
6. Takikita S, Muro R, Takai T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Oda H, Kitajima M, Oshima K, Hattori M, Endo TA, Toyoda T, Weis J, Shinkai Y, Suzuki H. A Histone Methyltransferase ESET Is Critical for T Cell Development. *The Journal of Immunology*, 197, 2269-2279, 2016. 査読有 DOI10.4049/jimmunol.1502486

#### 〔学会発表〕(計17件)

1. Muro R, Nitta T, Takayanagi H. “The tyrosine kinase Syk is required for development of proinflammatory  $\gamma\delta$ T cells” 第 47 回日本免疫学会学術集会 2018 年 12 月 福岡
2. 室 龍之介、新田 剛、高柳 広 「炎症性 $\gamma\delta$ T 細胞の分化を誘導する TCR シグナル伝達経路の同定」第 5 回 日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス 2018 年 9 月 東京
3. 室 龍之介、新田剛、高柳広「炎症性 $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御機構」第 39 回日本炎症・再生医学会 2018 年 7 月 東京
4. 室 龍之介、新田 剛、高柳 広「非典型的 TCR シグナルによる炎症性 $\gamma\delta$ T 細胞の制御」第 33 回 自己免疫研究会 2018 年 7 月 東京
5. 室 龍之介、新田 剛、鈴木 春巳、高柳 広「 $\gamma\delta$ T 細胞におけるユニークな TCR シグナル伝達」

第 28 回 Kyoto T cell conference 2018 年 6 月 京都

6. Muro R, Nitta T, Suzuki H, Takayanagi H. “Proinflammatory  $\gamma\delta$ T cell development by Syk/PI3K-mediated TCR signal transduction” 8th International  $\gamma\delta$  T cell conference 2018 年 6 月 Bordeaux
7. 室 龍之介、新田 剛、鈴木 春巳、高柳 広 「炎症性 $\gamma\delta$ T 細胞の分化を制御する Syk 依存的 TCR シグナル」第 27 回東京免疫フォーラム 2018 年 3 月 東京
8. Muro R, Nitta T, Suzuki H, Takayanagi H. “ $\gamma\delta$ TCR recruits the Syk-PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program” ThymOz International Conference on Thymus and T-cell Biology 2018 年 3 月 Australia
9. 室 龍之介、新田 剛、高柳 広 「Syk 依存的 TCR シグナルによる炎症性 $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御」第 3 回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー 2018 年 1 月 長野
10. Muro R, Nitta T, Takayanagi H, Suzuki H. “Control of proinflammatory  $\gamma\delta$ T cell development by lineage-specific TCR signaling pathway” 第 46 回 日本免疫学会学術集会 2017 年 12 月 宮城
11. Muro R, Nitta T, Suzuki H, Takayanagi H. “Deciphering lineage-specific TCR signaling in IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cell development” The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017 年 10 月 Ishikawa
12. 室 龍之介、新田 剛、鈴木 春巳、高柳 広 「TCR シグナルによる炎症性 $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御」第 4 回 日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス 2017 年 9 月 東京
13. Muro R, Nitta T, Takayanagi H, Suzuki H. “Syk-mediated TCR signaling is required for  $\gamma\delta$ T cell development and acquisition of proinflammatory potential” International Kyoto T Cell Conference 2017. 2017 年 3 月 Kyoto
14. Muro R, Nitta T, Takayanagi H, Suzuki H. “The distinct roles of proximal TCR kinase regulate  $\gamma\delta$ T cell development” 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 那覇市
15. 室 龍之介、新田 剛、鈴木 春巳、高柳 広 「Syk 依存的 TCR シグナルによる IL-17 産生型  $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御」第 3 回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス 2016 年 10 月 東京
16. Muro R, Nitta T, Tamehiro N, Oda H, Kitajima M, Takayanagi H, Suzuki H. “DIFFERENTIAL REQUIREMENT OF ZAP/SYK KINASES FOR THE EARLY DEVELOPMENT OF  $\gamma\delta$ T CELLS IN THE THYMUS” 2016 ThymUS International Conference 2016 年 6 月 Hawaii
17. Muro R, Nitta T, Tamehiro N, Oda H, Takayanagi H, Suzuki H. “The critical roles of RhoH for development of IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cell” Gamma/Delta T Cell Conference. 2016 年 6 月 London

〔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：<http://www.osteimmunology.com/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。