

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16602

研究課題名(和文)炎症性 T細胞の分化機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of inflammatory gdT cell development

研究代表者

室 龍之介 (Ryunosuke, Muro)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特別研究員

研究者番号：80761262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は以前、IL-17産生型gdT(gd17)細胞の分化にチロシンキナーゼであるSykが必須であることを見出した。本研究課題では、リンパ球系特異的にSykを欠損する(Syk cK0)マウスを作成し、成体マウスにおけるSykの役割を調査すると共に、Sykの活性に関与しうるSrc family kinase(SFK)の同定を目的とした。Syk cK0マウスでは、gdTCRシグナル伝達が障害され、全身性にgdT17細胞を欠損していた。SFKの一つであるLckを欠損するマウスでは、Syk cK0マウスと酷似した表現型が認められた。よって、LckがSykの活性化に関与する可能性が示唆された。

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、新生仔だけでなく、成体期においてもgdT細胞の分化にSykが重要な役割を果たしていることを見出した。また、本研究により、LckがSykの活性化に関与することが示唆された。一方で、我々の結果は、BlkというSFKはgdT17細胞の分化に不要であることを示しており、過去の報告とは異なっている。gdT細胞におけるBlkの役割を再議論する必要があり、検証を継続しなければならない。本研究結果から、SykやLckを標的とすることで、炎症性gdT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)：We previously have found that Syk, a tyrosine kinase, is essential for the thymic development of IL-17 producing gdT cells. In this study, we aimed to clarify a role of Syk in regulating development of gdT cells in adult mice, by means of lymphoid lineage-specific Syk-deficient (Syk cK0) mice. In addition, we explored Src family kinase (SFK) that stimulates Syk activation in gdT cell. Our result showed that impaired gdTCR signaling and nearly complete loss of gdT17 development in Syk cK0 mice. Mice defective in Lck, one of the SFK essential for generation of abT cells, displayed a phenotype similar to Syk cK0 mice. Thus, these results suggest an essential role of Lck in activation of Syk to support thymic development of gdT17 cells.

研究分野：免疫学

キーワード：gdT Syk Lck IL-17

1. 研究開始当初の背景

免疫系は、常に感染や腫瘍等の脅威を生体から排除することで、我々の生体恒常性を維持している。よって、免疫細胞の分化や機能制御機構を解明することは免疫関連疾患の治療法の確立に寄与し、基礎医学研究の重要な課題である。 $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺にて分化する非典型的 T 細胞であり、炎症性サイトカインを産生することで生体防御の一助を担う。しかし、 $\gamma\delta$ T 細胞がどのようにサイトカイン産生能を獲得するのかは十分に理解されていない。これまでの研究から、炎症性 $\gamma\delta$ T 細胞の分化や維持に必要なとされる液性因子や転写因子が同定されてきたが、T 細胞受容体(TCR)シグナルが $\gamma\delta$ T の機能決定に果たす役割については、統一的な見解が得られていなかった。研究代表者は、その原因が $\gamma\delta$ TCR シグナル伝達を担う分子群が同定されていないためであると考えた。主要な T 細胞集団である $\alpha\beta$ T 細胞は、数十年にも及ぶ研究成果により、TCR シグナル経路の全体像が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 $\gamma\delta$ 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。研究代表者は、胸腺における IL-17 産生型 $\gamma\delta$ T($\gamma\delta$ 17)細胞の分化機構を制御する TCR シグナルの同定を試み、チロシンキナーゼである Syk を介した TCR シグナルが $\gamma\delta$ 17 細胞の分化に必須であることを証明した(Muro et al, *J Clin Invest* 2018)。Syk は LAT/ERK および PI3K/AKT の経路を独立に活性化することで、 $\gamma\delta$ 17 細胞の分化を制御していることを *in vivo* で示した。

2. 研究の目的

研究代表者の以前の研究成果から、 $\gamma\delta$ 17 細胞の分化に必須の分子である Syk を同定することができた。Syk 欠損(KO)マウスは、血管内皮細胞の分化障害により新生仔致死である。ゆえに、これまでの Syk KO マウスを用いた研究は、新生仔期の解析にとどまっており、成体マウスにおいて Syk が $\gamma\delta$ T 細胞の分化に必要なか不明である。また、 $\gamma\delta$ T 細胞における Syk の活性化に必要な分子は同定されていない。本研究課題では、リンパ球系列特異的に Syk を欠損したマウスを解析することで、成体期における Syk の $\gamma\delta$ T 細胞分化・機能制御への役割を解明する。さらに、 $\gamma\delta$ T 細胞における Syk の活性化を制御する Src family kinase (SFK)として Lck と Blk に着目し、これら二つの因子による $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御機構の解明に挑む。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作成

Syk^{fllox} マウスと CD127-cre マウスを交配し、リンパ球系列特異的に Syk を欠損するマウスを作成した。Blk と Lck のそれぞれに対する 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

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。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、IFN γ 産生型 $\gamma\delta T$ ($\gamma\delta T1$)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

細胞懸濁液にストレプトアビジンで架橋した抗 CD3 ϵ 抗体を添加し、TCR シグナルを誘導した。刺激後、PFA により細胞を固定し、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) イミキモド(IMQ)誘導性乾癬様皮膚炎発症モデル

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、 $\gamma\delta T$ 細胞の絶対数を定量化した。

4 . 研究成果

I. Syk は成体マウスにおける炎症性 $\gamma\delta T$ 細胞の分化に必須である

Syk^{fllox} マウスと CD127^{cre} マウスを交配し、Syk をリンパ球系列特異的に欠損したマウス(Syk cKO)マウスを作成した。本マウスでは、 $\alpha\beta T$ 細胞と $\gamma\delta T$ 細胞において Syk が欠損していると考えられる。Syk cKO マウスの胸腺をフローサイトメトリーによって解析した結果、 $\alpha\beta T$ 細胞系列の分化に以上は認められなかった。また、以前の報告と一致して、Syk cKO マウスでは、軽微な β 選択の障害が認められた。一方、Syk cKO マウスにおける $\gamma\delta T$ 細胞の頻度と絶対数は有意に減少していた。Syk 欠損による $\gamma\delta TCR$ シグナル伝達への影響を解析するために、TCR 刺激によって誘導された ERK と AKT のリン酸化を定量化した。Syk を欠損する $\gamma\delta T$ 細胞では、ERK と AKT のリン酸化が劇的に減少した。以上の結果より、Syk は成体マウスにおいて、 $\gamma\delta TCR$ シグナル伝達を制御し、 $\gamma\delta T$ 細胞の分化に必要であることが示された。

次に、Syk cKO マウスにおける $\gamma\delta T$ 細胞のエフェクター機能を精査した。コントロールマウスにおける $\gamma\delta T17$ 細胞は総 $\gamma\delta T$ 細胞の 5%ほどであったが、Syk cKO マウスでは 0.3%程度であった。また、精製した胸腺 $\gamma\delta T$ 細胞から調整した cDNA を定量的 PCR によって解析したところ、 $\gamma\delta T17$ 細胞の分化プログラムを制御する転写因子である Sox13 や ROR γt の発現は、Syk の欠損により有意に減少していた。Syk cKO マウスの末梢組織について $\gamma\delta T17$ 細胞数を解析した結果、脾臓や肺にて $\gamma\delta T17$ 細胞がほとんど存在しないことがわかった。そこで、 $\gamma\delta T17$ 細胞が中心的な役割を果たすイミキモド(IMQ)誘導性乾癬様皮膚炎のモデル実験により、炎症応答における Syk の重要性を検証した。その結果、Syk cKO マウスでは耳介の肥厚や頸部リンパ節の腫脹が有意に減少した。また、頸部リンパ節の $\gamma\delta T17$ 細胞はほとんど検出されず、IL-17 によって動員される好中球の絶対数も有意に減少した。以上の結果から、Syk は $\gamma\delta T17$ 細胞によって誘導される炎症反応の誘導に必要であることが示された。

II. Lck は $\gamma\delta T17$ 細胞の分化に必要

Syk の活性を制御しうる SFK として、研究代表者は Blk と Lck に着目した。Blk は主に B 細胞

に発現する遺伝子であるが、一部の $\gamma\delta$ T細胞にも発現が認められる。また、以前の報告から、Blkを欠損するマウスでは、 $\gamma\delta$ T17細胞の分化が障害されることが報告されている。一方、LckはT細胞系列の細胞に特異的に高発現するSFKであり、T細胞の分化に必須である。そこで、BlkおよびLckを欠損するマウスをCRISPR/Cas9法により作成し、 $\gamma\delta$ T細胞の表現系を解析した。生後1日目のBlk欠損マウスの胸腺において、 $\gamma\delta$ T細胞の絶対数と頻度は野生型マウスと同等であった。また、 $\gamma\delta$ T17細胞や $\gamma\delta$ T1細胞について詳細な解析を行った結果、Blk欠損による $\gamma\delta$ T細胞のエフェクター機能への影響は認められなかった。さらに、TCRシグナルマーカであるCD5の発現も正常であることがわかった。以上の結果から、Blkは $\gamma\delta$ T細胞の分化に必要なではないことが示唆された。

次に、生後1日目のLck欠損マウスの解析に取り組んだ。Lck欠損マウスでは、胸腺における $\gamma\delta$ T細胞の総数が減少し、 $\gamma\delta$ T17細胞の分化も明らかに障害されていた。また、CD5の発現はV γ 4陽性 $\gamma\delta$ T細胞($\gamma\delta$ T17細胞を含む $\gamma\delta$ T細胞集団)で、著明に減少したが、V γ 1陽性 $\gamma\delta$ T細胞($\gamma\delta$ T1細胞を含む $\gamma\delta$ T細胞集団)では、部分的な減少しか認められなかった。また、同様の表現系はSyk cKOマウスでも観察された。

以上の結果から、Lckは $\gamma\delta$ T細胞において、Sykの活性化を制御する重要なSFKであることが示唆された。今後、生化学的解析により、LckによるSykのリン酸化やLck欠損 $\gamma\delta$ T細胞における細胞内シグナル伝達の動態に迫っていく必要がある。これらの知見を積み重ね、将来的には人為的に炎症性 $\gamma\delta$ T細胞を制御し、炎症性疾患や癌転移などを治療するための基礎理論の構築に役立てたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asano T, Okamoto K, Nakai Y, Tsutsumi M, Muro R, Suematsu A, Hashimoto K, Okamura T, Ehata S, Nitta T, Takayanagi H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Soluble RANKL is physiologically dispensable but accelerates tumour metastasis to bone.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature metabolism	6. 最初と最後の頁 868-875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-019-0104-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muro R, Takayanagi H, Nitta T.	4. 巻 2111
2. 論文標題 Retroviral Gene Transduction into T Cell Progenitors for Analysis of T Cell Development in the Thymus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 193-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0266-9_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsukasaki M, Huynh NCN, Okamoto K, Muro R, Terashima A, Kurikawa Y, Komatsu N, Pluemsakunthai W, Nitta T, Abe T, Kiyonari H, Okamura T, Sakai M, Matsukawa T, Matsumoto M, Kobayashi Y, Penninger JM., Takayanagi H	4. 巻 2
2. 論文標題 Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 1382 ~ 1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-020-00318-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsukasaki M, Asano T, Muro R, Huynh N CN, Komatsu N, Okamoto K, Nakano K, Okamura T, Nitta T, Takayanagi H	4. 巻 32
2. 論文標題 OPG Production Matters Where It Happened	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108124 ~ 108124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nitta T, Tsutsumi M, Nitta S, Muro R, Suzuki EC., Nakano K, Tomofuji Y, Sawa S, Okamura T, Penninger JM., Takayanagi H	4. 巻 21
2. 論文標題 Fibroblasts as a source of self-antigens for central immune tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1172 ~ 1180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-020-0756-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 室龍之介
2. 発表標題 炎症性gdT細胞の分化における分子シグナル伝達
3. 学会等名 第19回東京大学生命化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室龍之介
2. 発表標題 炎症性gdT細胞の分化を誘導するTCRシグナルの解明ポスター
3. 学会等名 第40回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryunosuke Muro
2. 発表標題 Molecular mechanism of Syk-mediated TCR signal in gdT cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------