

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 21 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22390098

研究課題名（和文）胸腺特異的に発現する新規分子 Gasp の機能の解析

研究課題名（英文）Function of novel molecule Gasp exclusively expressed in the thymus

研究代表者 鈴木春巳 (Harumi Suzuki)

国立国際医療研究センター 研究所 免疫病理部 部長

研究者番号：70235985

研究成果の概要（和文）：

Themisが胸腺での正の選択だけでなく、TCR刺激によるIL-2の産生に重要であることを見出した。Themis過剰発現マウスではIL-2産生が亢進していた。Themis分子に存在するCABIT1/2、NLS、PRSのいずれの分子内ドメインも、Grb2との結合、リン酸化、および正の選択に必須であった。本研究により、Themisが胸腺だけでなく、末梢の成熟T細胞においても重要な機能を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We identified a novel gene Gasp (Themis), which is exclusively expressed in the thymus and reported that Themis is critical in positive selection of thymocytes. Themis is a unique molecule that is absolutely required for positive selection, but is not required for negative selection and homeostatic expansion. Themis constitutively associates with Grb2 and tyrosine phosphorylated upon TCR-stimulation, therefore likely to be involved in TCR-dependent signal transduction. It is also involved in TCR-dependent IL-2 production, however, we could not observe any sign of modulating signaling strength. From domains deletion analysis of Themis, two of CABIT domains, a proline rich sequence (PRS), and a nuclear localization signal (NLS) are all shown to be required for its function. Collectively, Themis is not simply modulating strength of signal, but may be important for sustaining weak signal required for positive selection in the thymus. Molecular mechanism of Themis is still not well known, however, the current study unveiled its importance for IL-2 production, and differential function of the two CABIT domains. Themis may not simply modulate signaling strength like other signal transducers, but it may involved in spatiotemporal regulation of intracellular signal transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
23 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000

24年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	10,200,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球・胸腺・T細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はT細胞分化に関与する新規遺伝子を探索する目的で、NCBIのUnigeneデータベースから独自のアルゴリズムを用いて胸腺に特異的に発現する一連の未知遺伝子を「胸腺特異的遺伝子」として抽出、単離した。これらの新規遺伝子のノックアウトマウスを作製、解析することにより、各遺伝子の機能解析を行ってきた。Gasp(Themis)はこの胸腺特異的遺伝子の一つであり、我々が世界に先駆けて欠損マウスを作製し、正の選択が強く阻害されていることを2009年9月に報告した(PNAS 106: 16345, 2009)。驚くべきことに、世界中の他の4つのグループからこの新規遺伝子(Themis)に関するほぼ同様の報告が、我々と同時になされ(Nature Immunol 10: 831, 2009, Mol Cell Biol 29: 5128, 2009)、大きな注目を集めた。

2. 研究の目的

免疫系において中心的な役割を果たしているT細胞は胸腺内で正と負の選択を受けてレパートリーを形成することにより自己と非自己を識別する。この選択の分子メカニズムはまだよくわかっておらず、これを解明することは免疫系の理解のみならず、自己免疫疾患の新たな治療戦略の開発においても極めて重要である。本研究は、

我々が独自に単離し、胸腺細胞の正の選択に必須であることを発見した新規遺伝子Themisの機能を解明し、正の選択の分子メカニズム、特に正と負の選択の分子機構の相違を解明することを目標とする。T細胞分化のシーンに全く新たな分子が登場することにより、胸腺での選択過程の分子メカニズムの解明が飛躍的に進み、自己・非自己の識別の分子基盤の理解が大きく進むことが期待される。

3. 研究の方法

本研究は(1)Themis欠損マウスの表現型解析、(2)Tgマウスの作製および表現型解析、(3)胸腺細胞におけるシグナル伝達の解析、(4)ドメイン変異体の作製、機能解析、および(5)新規結合タンパクの探索の5つの項目を柱として、Themisがどのような機能を持つかを解明する。

(1) Themis欠損マウスの表現型解析：負の選択は2つの独立した実験系を用いる。コンベンショナルな $\alpha\beta$ T細胞以外にも、 $\gamma\delta$ 細胞、NKT細胞、腸管CD8 $\alpha\alpha$ 型IELなどの分化、活性化における影響も検討する。(2) Tgマウスの作製および表現型解析：lckプロモーターの下流にThemisのcDNAを繋いだコンストラクトを受精卵に導入し、Tgマウスのファウンダーを得ている。TgマウスをTCR-Tgマウスと交配し、その胸腺において正の選択が増強されている

か、あるいは正と負の選択の間に転換があるかを解析する。(3) 胸腺細胞におけるシグナル伝達の解析: 抗 TCR 抗体を用いた刺激による ERK、PLC γ 、SLP76 のリン酸化、カルシウムの流入、CD69 の発現誘導などは KO マウスで変化がみられなかった。Themis は正の選択のシグナル伝達にのみ必要である可能性が高いので、正の選択を引き起こすような弱いシグナル、すなわち OT-I TCR を発現する DP 細胞においてペプチド MHC テトラマーを用いて刺激をした際のシグナル伝達を詳細に検討する。(4) ドメイン変異体の作製、機能解析: Themis はプロリンリッチ領域、核移行配列と 2 つの CABIT ドメインを持つ。各領域の欠失変異 cDNA を作成する。新たに同定された CABIT ドメインについては、ドメイン中で高度に保存されているシステイン残基の点変異体も作成する。(5) 新規結合タンパクの探索: 内在性の Themis と Grb2 の結合は証明されておらず、その生理的な意義はいまだ不明である。HA タグ付加 Themis-Tg マウスの胸腺細胞を用い、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法によって Grb2 以外の新規 Gasp 結合タンパクの同定を試みる。

4. 研究成果

(1) Themis 欠損マウスの表現型解析
胸腺における正の選択が強く阻害されることは初期の段階から分かっていたが、負の選択に対する効果を 2 つの独立した実験系を用いて詳細に検討し、Themis が負の選択には全く関与しないことを証明した。さらに、各種 TCR トランスジェニックマウスと交配し、CD4 系列と CD8 系列の双方において正の選択の強い阻害が起こっていることが示さ

れた。末梢の成熟 T 細胞において、増殖は変わらないが、TCR 刺激依存性の IL-2 産生が Themis 欠損 T 細胞で著しく阻害されることが明らかとなった。したがって、Themis は胸腺内の正の選択にだけ重要なのではなく、成熟 T 細胞の IL-2 産生にも必須であることが明らかとなった。

(2) 非定型 T 細胞における Themis の役割: 調節性 T 細胞や NKT 細胞などの非定型 T 細胞の分化も阻害されていたが、CD8 α 型の腸管内リンパ球 (IEL) の分化は阻害されないことが明らかとなった。腸管の γ δ T 細胞も変化が無く、コンベンショナルな α β T 細胞だけが減少していた。腸管内には制御性 T 細胞が多く存在し、Themis 欠損マウスでは、Treg の割合は増加していた。そこで、Treg の機能における Themis の関与を検討した。Themis 欠損マウスから調製した Treg の *in vitro* における増殖抑制能は野生型と変わらず、Treg の分化、機能には Themis は無関係であることが示唆された。Themis 欠損ラットで、Treg の機能阻害、自己免疫疾患の徴候が見られたことから、Themis コンディショナル Flox マウスと FoxP3-Cre マウスを交配することにより、Treg 細胞でだけ Themis を欠損するマウスを作製した。残念ながら、自己免疫疾患症状は見られておらず、ラットとは異なり、マウスにおいては Themis は Treg の機能に関与していないものと考えられた。

(3) Tg マウスの解析
内在性 Themis の 3 倍程度のタンパクを過剰発現する Tg 系統を樹立した。この Tg マウスの表現型は予想外であり、単純に正の選択を増強するのではなく、CD4 系列では正の選択を増強したが、CD8 系列では正の選択が弱く阻害され

ていた。Tg マウスの末梢の成熟 T 細胞では、TCR 刺激による IL-2 産生の増強が観察された。また、エフェクター T 細胞の誘導 (Th1、2、17、Treg) においても影響がみられた。

(4) ドメイン解析

Themis の 2 つの CABIT ドメイン、プロリン豊富領域 (PRS)、核移行配列 (NLS) のそれぞれの欠失変異体の Tg マウスを樹立し、Themis 欠損マウスと交配することにより、各ドメインの機能について検討した。Grb2 との結合、およびチロシンリン酸化にはいずれのドメインも必要であったが、核への移行に関しては NLS と CABIT1 だけが必要であった。さらに CABIT1 欠失変異体 Tg だけが、優性不能型の T 細胞分化阻害を示した。2 つの CABIT ドメインは異なる機能を持つことが明らかとなった。

(5) シグナル伝達解析

Grb2 と結合し、TCR 刺激によってチロシンリン酸化をうける本分子は、アダプターとしてシグナル伝達に関与する可能性が高いものと考えられる。そこで、Themis 欠損マウスの T 細胞における TCR 依存性のシグナル伝達について詳細に検討した。胸腺未熟 DP 細胞においては、ERK の活性化、Ca イオンの流入、Akt、NfKB、JNK、p38 の活性化など検討したかぎりにおいては全く野生型と変わらなかった。抗 TCR 抗体を用いた強い刺激では変化がないが、正の選択を誘導できるような弱い刺激によるシグナル伝達を検討するために、OT-I TCR-Tg マウスと、各種 ALP ペプチド+MHC テトラマー試薬を用いた実験系を利用して、詳細な検討を行った。正の選択を誘導することが知られている Q4H7 テトラマーを用いて未選択 DP 細胞を刺激しても、ERK の活性化、Ca イオンの流入については変

化が見られなかった。現在までに、シグナルの強弱にかかわらず、Themis 欠損マウスで TCR 依存性のシグナル伝達が阻害されている証拠は得られていない。Themis を過剰発現する Tg マウスにおいても同様のシグナル解析を行ったが、変化はみられていない。

(6) 生化学的解析

Grb2 以外の Themis 結合蛋白の探索は、酵母 2 ハイブリッド系を用いて、Themis の N 末および C 末に結合する新規蛋白質の探索を試みたが、結局特異的に結合する蛋白の同定にまでは至らなかった。免疫沈降実験による結合蛋白の探索も Grb2 以外の新規結合蛋白質を見つけ出すことは出来なかった。TCR 刺激した DP 細胞の免疫沈降物から MS 解析によりリン酸化されるチロシン残基を同定した。他のグループからの報告も踏まえ、3 つのチロシン残基を全てフェニルアラニンに置換すると、刺激依存性のチロシンリン酸化が消失し、驚いたことに Grb2 との結合も失われた。また、Themis が細胞質内だけでなく核内にも存在することを、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、生化学的文画法などにより証明した。Themis 蛋白の核内移行には NLS (核移行シグナル) が必要であった。

(7) 結語

Themis の分子機能についてはいまだに解明されていないが、IL-2 産生にも関与すること、CABIT ドメインの働きなど、本研究により重要な知見を得ることが出来た。Themis は従来のシグナル関連因子のようにシグナル伝達の強さを単純に調節しているのではなく、時空間的なシグナル伝達を制御しているのではないかと考えている。

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 6 件)

1. Sato Y, Suzuki H, Sato T, Suda T, Yoda T, Iwakura Y, Chida D. The role of endogenous glucocorticoid in lymphocyte development in MC2R^{-/-} mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 403:253-257. 2010
2. Tagawa Y, Hiramatsu N, Kato H, Sakoh T, Nakajima S, Hayakawa K, Saito Y, John H, Takahashi S, Gu L, Yao J, Kitamura M. Induction of CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein by cigarette smoke through the superoxide anion-triggered PERK-eIF2 α pathway. *Toxicology.* 287:105-112, 2011
3. Nakajima S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Saito Y, Kato H, Huang T, Yao J, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF- κ B through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBP β and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt. *Mol Cell Biol.* 31:1710-1718, 2011.
4. Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A. Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 20:235-244. 2011
5. Eshima K, Chiba S, Suzuki H, Kokubo K, Kobayashi H, Iizuka M, Iwabuchi K, Shinohara N. Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. *Immunol. Lett.* 144:7-15. 2012
6. Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Hayakawa K and Suzuki H. Differential requirement for RhoH in development of TCR α CD8 $\alpha\alpha$ IELs and other types of T cells. *Immunol. Lett.* 151: 1-9. 2013

[学会発表] (計 15 件)

1. Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, Eshima K, Suzuki H. Gasp (Themis) is critically required for thymocyte positive selection 14th International Congress of Immunology 2010.8 Kobe, Japan
2. Hayakawa K, Patrick MS, Oda H, Suzuki H, Functional analysis of novel T

cell-specific gene ISC22 14th

International Congress of Immunology, 2010.8 Kobe, Japan

3. Patrick MS, Hayakawa K, Oda H, Suzuki H, The novel protein Gasp (Themis) is critically required for thymocyte positive selection by regulating ERK activation 第 20 回 KTCC 2010.6 京都
4. 早川 国宏, Michael S. Patrick、小田 浩代、鈴木 春巳 新規遺伝子ISC22のT細胞分化における機能の解析 第20回KTCC 2010.6, 京都
5. 早川 国宏、鈴木 春巳, Functional analysis of a T cell-specific gene ISC22 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11 千葉
6. Okada, T., Patrick M. S., Yoshimoto, T., Kaji, K., Tamehiro, N., Okamura, T., Suzuki, H. Overexpression of Gasp (Themis) augmented positive selection of thymocytes. 6th Leukocyte Signal Transduction Workshop. Crete, Greek, 2011.6
7. Okada, T., Patrick M. S., Yoshimoto, T., Kaji, K., Tamehiro, N., Okamura, T., Suzuki, H. Effect of Gasp (Themis) on T cell development and TCR signaling. EUThyme 2011, Amsterdam, Netherland, 2011.5.
8. Okada T, Patrick MS, Kaji K, Suzuki H. Analysis of Themis (Gasp) Transgenic mice. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11 千葉
9. 岡田季之、パトリックマイケル、加地健太郎、吉本拓矢、岡村匡史、鈴木春巳. Gasp(Themis)トランスジェニックマウスの解析 2011年6月10日 第21回 Kyoto T cell conference
10. 新田 剛、岡田季之、加地健太郎、小田 浩代、高島明子、Michael S. Patrick、鈴木春巳 「T細胞分化における Themis分

子内ドメインの役割」第35回日本分子生物学学会年会 2012年12月12日

11. Takeshi Nitta, Toshiyuki Okada, Hiroyo Oda, Akiko Tkashima, Michael S. Patrick, Harumi Suzuki 「Distinct protein motifs in Themis regulate positive selection of T cells」第41回日本免疫学会学術集会 神戸、2012年12月6日
12. 新田 剛、岡田季之、加地健太郎、小田浩代、高島明子、Michael S. Patrick、鈴木春巳 「Themis 分子内ドメインの機能解析」第22回 Kyoto T Cell Conference 2012年7月6日
13. 早川国宏, 鈴木春巳. The novel gene ISC22 is involved in TCR-mediated IL-2 production in mature T cells. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012年12月6日
14. Nitta T, Okada T, Kaji K, Oda H, Takashima A, Patrick MS, Suzuki H, Function of distinct domains in Themis in positive selection. ThymUS, 2012. 11. 5, Miami USA.
15. Okada T, Patrick MS, Kaji K, Suzuki H. Themis regulates cytokine production and differentiation of Th subsets 2012年12月5-7日 第41回日本免疫学会学術集会 神戸

[図書] (計2件)

1. 小田浩代、鈴木春巳, マスト細胞の活性化とG蛋白質 臨床免疫・アレルギー科 52: 169-175, 2010
2. パトリックマイケル、鈴木春巳, 胸腺内の正の選択に必須な新規分子 Gasp(Themis)の発見 感染・炎症・免疫 40: 174 (2010)

[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

鈴木春巳 (Harumi Suzuki)
国立国際医療研究センター・免疫病理部・部長
研究者番号: 70235985

(2) 研究分担者

早川国宏 (Kunihiro Hayakawa)
国立国際医療研究センター・免疫病理・研究員
研究者番号: 00573007

(3) 連携研究者

()

研究者番号: