

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370059

研究課題名(和文)自己抗原タンパク質を介して組織リモデリングに働く獲得免疫システム

研究課題名(英文)An acquired immune system involved in the tissue remodeling through self antigens

研究代表者

井筒 ゆみ (IZUTSU, YUMI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20301921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエルを含む全ての脊椎動物の発生過程には、一度作った胎児型(幼生型)器官の一部を壊し、成体型へと体の作り換えを行う、リモデリングというプログラムがある。最も劇的な例は、おたまじゃくしの尾の消失に見ることができる。これまでに、ツメガエルの変態期に新たに出限する成体型の免疫細胞が、不要となる尾を異物(非自己)として認識し、排除するという独創的な考えを支持する実験結果を得ている。免疫系から認識される抗原タンパク質として、オウロ1とオウロ2を同定しているが、本研究では、それらタンパク質をターゲットとして攻撃する免疫T細胞の機能解析をし、T細胞が尾の崩壊には必要不可欠であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Vertebrate ontogenesis, including *Xenopus* frogs, shows morphological changes from embryonic- (larval-) organs into the adult counterparts. This process is called tissue remodeling. The most drastic remodeling is seen in the tadpole tail regression during amphibian metamorphosis. We have previously proposed a new model that the adult-type immune cells, which are newly differentiated during metamorphosis, recognize and remove own tail tissues as non-self. We have isolated two genes encoding the antigen proteins, Ouro1 and Ouro2, as targets for adult immune T cells. In this study, to clarify function of T cells vs these Ouro1 and Ouro2 antigens, we analyzed gain- and loss-of function of T cells. Results suggest that T cells are necessary and sufficient for the regression of tadpole tails expressing both Ouro1 and Ouro2 antigen proteins.

研究分野：発生生物学・免疫生物学

キーワード：タンパク質 発現制御 発生・分化 細胞・組織 免疫学 両生類 アポトーシス T細胞

1. 研究開始当初の背景

全ての脊椎動物の発生過程には、魚のような形をした胎児(幼生)型から、四肢を持つ成体型へと変化するという共通のプロセスがある。この過程を組織リモデリングと呼ぶが、その最も顕著な例は、本研究でモデル動物として用いたアフリカツメガエルを含む両生類の変態現象に見られる。両生類の変態過程では、おたまじゃくしの幼生組織が全て消失し、成体組織が新たに分化し、成体(カエル)へと組織を再構成する。これは甲状腺ホルモンの作用によって、細胞自律的に進行するというのが定説となっている。特に、おたまじゃくしの尾の退縮については、ホルモンの直接作用によるアポトーシス(プログラムされた細胞死)であると説明されており(Schreiber & Brown, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 2003; Das, *et al.*, *Dev. Biol.* 2006)、教科書的な定説となっている。しかし、申請者等は、完全に系統化されたJ系統ツメガエルを用いて、成体同士では移植された臓器に対する拒絶が起こらないが、成体によって同系統の尾の移植片が免疫的に拒絶される(Izutsu & Yoshizato, *J. Exp. Zool.* 1993)、という結果を元に、これまでにない独創的な仮説を得た。変態期の組織リモデリングに免疫系が積極的に関与する、というものである。現在、形態形成システムと免疫システムの共生・共進化を言及する論説は皆無である。興味深い事に、1980年代初期に、無尾両生類の変態では、リンパ球集団の大幅な入れ換わりを含む免疫系の変動が起こるといった報告がされ、幼生組織の再編と免疫システムとの関わりで注目されたが、その機能的意義は不明のままであった。

申請者等は、成体の免疫T細胞の標的となるタンパク質をコードする新規の遺伝子を単離同定し、オウロ1,オウロ2と名付けた。2つの遺伝子の過剰発現実験では、免疫T細胞の集積を伴い、早まったおたまじゃくしの尾の退縮が誘導された。一方、アンチセンスによるオウロ1,オウロ2の抑制実験では、尾部の退縮が抑えられた。(Mukaigasa ...& Izutsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2009)。これらの結果から、2つのオウロ遺伝子産物は免疫

抗原として尾部の消失に必要であることが示唆された。主題としている研究テーマ「無尾両生類のオウロ抗原タンパク質をターゲットとして働く免疫細胞による幼生尾の組織の細胞死」を、動物の形態形成の必須のプロセスとして位置づけるには、効果細胞(T細胞)側の機能解析が必要不可欠である。

2. 研究の目的

申請者等が近年単離・同定した自己免疫のターゲット抗原タンパク質、オウロ1とオウロ2に関わる免疫細胞の機能解析がなされれば、自らの遺伝子の発現を制御する発生プログラミングによって免疫系が動き、正常の器官形成に働くという新しい器官形成メカニズムを証明することが可能となる。従って、本研究では、上記モデルの検証を目的とし、以下の3つのサブテーマの解析を行った。

3. 研究の方法

【1】尾部退縮を駆動する『甲状腺ホルモン(内分泌系)と『自己抗原タンパク質オウロポロス(免疫系)』の分子的連関の解明

オウロ遺伝子(*ouro1*, *ouro2*)は、甲状腺ホルモンによって変態後期の尾部に限局するという発現制御を受けており、尾部だけが攻撃対象となり死に至ると考えられる。幼生にホルモンを投与し、オウロ遺伝子の発現抑制が胴体部において強く起こり、結果として尾部での発現が尾の退縮完了まで保たれること分子機構を、mRNAの発現量を比較することで明らかにする。

【2】オウロポロスを介する尾の細胞死に関わる免疫細胞の機能解析

核移植法により遺伝子導入(トランスジェニック)ツメガエルが既に作製されているが、F0世代は遺伝子のコピー数もばらばらで、効果が弱い。従って、トランスジェニック同士の交配によって濃縮され、しかも、均一なF4およびF5世代を作製する。一般的に、ツメガエルの性成熟には約2年の期間を要し、さらに、導入された遺伝子が次世代に必ずしも遺伝する訳ではない。しかし、我々の研究室において未だに難しいが、早く継代する技術が確立

している。得られたトランスジェニックラインを用いて、J系統とかけ合わせることで、J系統由来のT細胞を移入可能にしておく。T細胞特異的な抗体を投与することで、T細胞を除去し、そこへT細胞の移入をすることでレスキュー実験を行い、T細胞の尾の崩壊における機能を検証する。

【3】自己抗原オウロポロスOuro1, Ouro2の免疫生化学的解析

トランスジェニックツメガエルを用いた実験から、尾の退縮にはOuro1とOuro2の2つのタンパク質が必要であることが判っているが、両者が免疫沈降によって、複合体を形成するか、このことが、免疫抗原として認識されることに意味があるかを明らかにするために、両者の抗体を作製し、生体内での共局在や、T細胞認識部位などの生化学的解析を行う。

4. 研究成果

【1】尾部退縮を駆動する『甲状腺ホルモン(内分泌系)と『自己抗原タンパク質オウロポロス(免疫系)』の分子的連関について

『甲状腺ホルモン-受容体』系によるオウロ1, オウロ2 遺伝子の転写調節機構に着目し、変態後期尾部の発現限局を調べた。その結果、幼生の皮膚特異的に発現する両オウロ遺伝子は、胴体部と尾部の皮膚では甲状腺ホルモンによる感受性が異なることが判った。胴体部と尾部の皮膚組織の、変態前期から後期に至る各ステージにおいて、量的発現の変動も明らかとした(投稿準備中)。

【2】オウロポロスを介する尾の細胞死に関わる免疫細胞の機能について

当該研究室内で樹立・維持されているトランスジェニック系統を用いて、効果細胞を特異的抗体で生体内に投与し、除去することで免疫系の阻害実験を行った。FACS 解析によると、免疫T細胞の明らかな減少が確認された。一方、その他の免疫細胞として、B細胞には影響なかった。さらに、コントロール抗体によって生体内にはほとんど影響は見られなかった。この上で、尾に異時的に抗原タンパク質オウロ1と2を発現させても、発現組織

の細胞死は誘導されず、そこに外からJ系統由来の成体のT細胞を補ってやると尾は崩壊した。これらの結果から、尾の崩壊にはT細胞が必要・不可欠であることが示された。現在、別のトランスジェニックラインでも検証を進め、同じ結果が得られたならば投稿準備に取りかかる予定である。

【3】自己抗原オウロポロスOuro1, Ouro2の免疫生化学的解析

大腸菌につくらせたOuro1とOuro2のリコンビナントタンパク質を抗原としてモノクローナル抗体の作製を試みたが、途中で陽性クローンが死滅してしまい、うまくいかなかった。そこで、ポリクローナル抗体を作製した。これによって、内在性の両タンパク質の細胞内局在を調べると、変態期に特有の共局在をすることが解った。これはセルラインを用いて単独で発現させたときには見られなかった。そこで、プロモーターを変えて2つを別々のタイミングで発現させたところ、上記の発現パターンがよりクリアに再現された(投稿準備中)。

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 3件)

1. 井筒 ゆみ

「おたまじゃくしの尾の消失-免疫学的な観点から見る動物の体作り」

化学と生物, 50 (12), 883-890 (2012).

査読あり。

2. Maéno M, Komiyama K, Matsuzaki Y, Hosoya J, Kurihara S, Sakata H, & Izutsu Y. Distinct mechanisms control the timing of differentiation of two myeloid populations in *Xenopus* ventral blood islands.

Dev. Growth. Differ., 54:187-201 (2012).

査読あり。

3. Tomiyama C., Watanabe H., Izutsu Y., Watanabe M., & Abo T.

Suppressive role of hepatic dendritic cells in concanavalin A-induced hepatitis.

Clin. Exp. Immunol., 166:258-268 (2011).

査読あり。

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 小林 遥香, 井筒 ゆみ

「ツメガエル尾部抗原タンパク質 Ouro を介した幼生尾の崩壊における T 細胞の機能」
第 9 回 XCIJ-MA/第 8 回日本ツメガエル研究会ジョイント研究集会 2014 年 11 月 28 日(北里大学相模原キャンパス、神奈川)

2. Izutsu Y. (招待講演)

「Adaptive immune system involved in the tissue remodeling during amphibian metamorphosis」

8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (ISAREN), 2014年11月7-9日, NIBB (岡崎基礎生物学研究所), Okazaki, Japan.

3. 回瀬 修治, 井筒 ゆみ, 藤谷 和子, 武蔵島 正人, 高松 信彦, 伊藤 道彦

「Promoter evolution of Dmrt1 for somatic and germ cells in vertebrates」

日本動物学会第85回大会 2014年9月11-13日(東北大学川内北キャンパス、仙台)

4. 小林 遥香, 井筒 ゆみ

「ツメガエル尾部抗原タンパク質Ouroを介した組織崩壊におけるT細胞の機能解析」

日本動物学会第85回大会 2014年9月11-13日(東北大学川内北キャンパス、仙台)

5. Mawaribuchi S., Izutsu Y., Fujitani K., Komiya T., Takamatsu N., Ito M.

「Dmrt1 controls germ cell fate in *Xenopus* developing gonads」

第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3-6日(神戸ポートアイランド、兵庫)

6. 伊藤 道彦, 回瀬 修治, 藤谷 和子, 武蔵島 正人, 和田 美加子, 井筒 ゆみ, 高松 信彦「ツメガエル性分化機構および脊椎動物雄化遺伝子Dmrt1の分子・機能進化」

第7回ツメガエル研究集会 2013年9月23-24日(秋吉台国際芸術村、山口)

7. 井筒 ゆみ (招待講演)

「両生類の器官形成における細胞死に働く免疫系」(Immune system involved in the cell death during amphibian morphogenesis)

日本比較生理生化学会 第 35 回大会 2013 年 7 月 13-15 日(イーグレひめじ, 兵庫)

8. Maruyama E., Maeno M., Izutsu Y.

「Knockdown of ouro genes represses tadpole tail regression during *Xenopus* metamorphosis」第 46 回日本発生生物学会 (APDBN 共催) 2013 年 5 月 28-31 日(くにびきメッセ、島根)

9. Izutsu Y., Kikuta T., Kazama Y., Maeno M. (招待講演)

「Immune antigen proteins Ouro1 and Ouro2 for tadpole tail degeneration in *Xenopus* metamorphosis」

14th International *Xenopus* Conference, 2012 年 9 月 9-13 日(Giens peninsula, France)

10. 屋井 潮美, 井筒 ゆみ

「トランスジェニック *Xenopus* ラインの樹立への近道」

第 5 回 XCIJ 首都圏支部会研究集会 2011 年 12 月 17 日(産総研、東京)

11. 風間 勇太, 井筒 ゆみ

「ツメガエル尾部抗原タンパク質 Ouro に対

するT細胞の増殖反応」
第5回 XCIJ 首都圏支部会研究集会 2011年
12月17日(産総研、東京)

12. 井筒 ゆみ (招待講演)
「両生類の変態における細胞死に自己抗原
タンパク質 Ouro を介して働く免疫系」
(Immune system involved in the cell
death via Ouro antigen proteins during
amphibian metamorphosis)
第84回日本生化学会大会 2011年9月
21-24日(国立京都国際会館、京都)

13. 井筒 ゆみ (招待講演)
「動物の器官発生における細胞死に働く免
疫系」(Immune system involved in the cell
death during vertebrate organogenesis)
第23回高遠シンポジウム 2011年8月25-26
日(高遠さくらホテル、長野)

14. Izutsu Y. (招待講演)
「Immune system involved in the cell death
during *Xenopus* metamorphic tail regression」
7th International Symposium on Amphibian and
Reptilian Endocrinology and Neurobiology
(ISAREN), 2011年7月11-13日 University of
Michigan, Ann Arbor, USA.

〔図書〕(計 3件)

1. 井筒 ゆみ
国立科学博物館の科学雑誌「milsil (ミルシ
ル)」第45号. 発行日: 2015年5月1日発
行、担当ページ: P16-19

2. 井筒 ゆみ
生命誌年刊号『ひらく』(書籍)中村桂子
編集発行: JT生命誌研究館, 発売: 新曜社 発
行日: 2015年1月15日、
担当ページ: P112~118

3. 井筒 ゆみ
「尾を非自己と見なすカエルの免
疫系」季刊生命誌 Webジャーナル 2013
年78号掲載.

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

研究室ホームページ(申請者らが作製)
<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/izutsu/welcome.html>

科学雑誌 Newton 別冊「生き物の超能力」
2012年9月掲載

新聞報道
東京新聞 2014年10月13日掲載

6. 研究組織
(1)研究代表者
井筒 ゆみ (IZUTSU YUMI)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 20301921

(2)研究分担者
岩淵 和也 (IWABUCHI KAZUYA)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 20184898

(3)研究分担者

伊藤 道彦 (ITO MICHHIKO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：9 0 2 4 0 9 9 4

(4)研究分担者

岡 敦子 (OKA ATSUKO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：5 0 1 7 5 2 5 4

(5)連携研究者

前野 貢 (MAENO MITSUGU)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：1 0 1 9 0 3 1 5