

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590565

研究課題名(和文)末梢免疫寛容成立におけるカルシウムシグナルの役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of calcium signaling on peripheral immune tolerance.

研究代表者

大洞 將嗣 (Oh-hora, Masatsugu)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：40351506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞と樹状細胞におけるカルシウムシグナルに焦点をあて、末梢免疫寛容の成立のメカニズムを解析した。遺伝子欠損マウスの解析により、ストア作動性カルシウム流入が欠損した場合、胸腺における制御性T細胞の分化が前駆細胞の段階で阻害され、その結果免疫寛容が破綻することを明らかにした。樹状細胞においてカルシウムシグナルを欠損させた場合は、免疫寛容には変化は認められなかった一方、抗原投与などに対する免疫応答を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of immune tolerance in the periphery, we analyzed the role of calcium signaling in regulatory T cells and dendritic cells using cell-type specific Stim-deficient mice. In the absence of store-operated calcium entry in T cells, regulatory T cell development in the thymus was blocked at the transition of precursor cells to mature regulatory T cells. As a result, peripheral immune tolerance was disrupted. Block of calcium signaling in dendritic cells resulted in mild impairment of immune response to antigen but not of peripheral immune tolerance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：制御性T細胞 カルシウムシグナル 樹状細胞 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

私達は、免疫システムを用いることで、病原性微生物の感染などから生体を守っている。免疫システムは、異物を認識する一方で、自己には反応しないように厳密に制御されている。末梢では、クローン除去、不応答性(アナジー)の誘導、制御性T細胞(Treg細胞)によって、自己を攻撃しないように免疫寛容が維持されている。末梢免疫寛容の成立には、CD4陽性T細胞や樹状細胞の相互作用が重要である。CD4陽性T細胞を介した免疫寛容の成立に必須のシグナル伝達経路は、カルシウムシグナルである。カルシウムシグナルは、アナジーの誘導、Treg細胞の機能に重要であることが明らかにされている。我々は、T細胞における最大のカルシウム流入機構であるストア作動性カルシウム流入を欠損するStim1とStim2欠損マウスを用いて、ストア作動性カルシウム流入-カルシウムシグナルがTreg細胞の分化に関与することを報告している。しかしながら、ストア作動性カルシウム流入が、どのようにTreg細胞の分化、可塑性、生存を制御しているのかは不明であった。一方、樹状細胞も、Treg細胞の分化や抑制機能の支持、IL-10を産生する抑制性のT細胞の分化、アナジーの誘導など免疫寛容の成立をサポートする重要な細胞である。しかし、T細胞と同様に、樹状細胞におけるカルシウムシグナルが、免疫寛容の成立、感染に対する生体防御を制御しているかどうかは不明である。近年まで、樹状細胞におけるカルシウムシグナルの役割は未解明のままであったが、C型レクチン受容体刺激やCD14刺激によって、カルシウム依存性転写因子NFATが活性化することが報告された。したがって、樹状細胞由来のNFATで制御される多様なサイトカインや表面分子が、獲得免疫応答や免疫寛容を制御している可能性は十分ある。

2. 研究の目的

本研究は、T細胞と樹状細胞におけるストア作動性カルシウム流入-カルシウムシグナルの制御機構を解析し、それらを介した末梢自己免疫寛容の成立機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カルシウムシグナルによるTreg細胞の分化・機能の制御機構を、以下の研究方法で解析を行う。Foxp3-Cre-EGFP Tgマウス(以下、Foxp3-Cre)やMx1-Creマウスなどを用いて、Treg細胞の分化、可塑性、生存や機能におけるカルシウム流入-カルシウムシグナルの役割を解析した。さらに、Treg細胞と樹状細胞に高発現する新規分子Tbc1d4の発現制御機構、遺伝子欠損マウスの作製によって、その機能を解析した。

(2) 樹状細胞におけるカルシウム流入-カルシウムシグナルの制御機構と役割を、以下

の研究方法で解析を行った。樹立済みのCD11c-Cre Tgマウスを用いた樹状細胞特異的なStim1単独、Stim1とStim2の2重欠損マウス、NFAT欠損マウスを用いて、生体防御反応、樹状細胞や各T細胞の分化、リガンド刺激によるサイトカインや表面分子の発現、樹状細胞によるT細胞の活性化などを、*in vivo*、または*in vitro*培養系を用いて解析する。生体防御反応は、カンジダ菌感染に対する防御反応、免疫応答は抗原とアジュバントの投与などを用いて解析を行った。樹状細胞によるT細胞の活性化能は、様々なリガンドで刺激した樹状細胞をOVAペプチドでパルスし、OVA特異的なTCRを持つOT-II CD4陽性T細胞と共培養を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) ストア作動性カルシウム流入によるFoxp3の発現制御機構について解析した。BrdUラベルを用いて、個体レベルで細胞を標識後に、Mx1-CreマウスとポリICを用いて、時期特異的にSTIM1とSTIM2を欠損させた。その結果、胸腺において新規に生成されるTreg細胞の数が著しく減る一方、末梢におけるTreg細胞はわずかに減少しただけであった。さらに、Foxp3の発現レベルも同程度であった。以上の結果から、ストア作動性カルシウム流入はTreg細胞の分化に必須であるが、末梢における生存やFoxp3発現の維持においてはそれほど重要ではないことが明らかとなった。

(2) ストア作動性カルシウム流入によるTreg細胞の胸腺内分化制御機構の解析を行った。その結果、Foxp3陰性CD25陽性のTreg前駆細胞は存在することから、Treg細胞としての選択は正常であること、Foxp3の発現は誘導されるが、その後のFoxp3とCD25の発現上昇が阻害されていた。さらに、IL-2を用いて、Foxp3陽性CD25陽性のSTIM欠損Treg細胞を作製したが、このSTIM欠損Treg細胞は抑制機能を有していなかった。したがって、ストア作動性カルシウム流入はTreg細胞の増殖や機能的な成熟過程に重要であることが明らかとなった。また、ストア作動性カルシウム流入は、Treg細胞の他に、インバリアントナチュラルキラーT細胞やCD8陽性TCR陽性の腸管上皮細胞間リンパ球の分化も制御していることが併せて明らかとなった。つまり、ストア作動性カルシウム流入は抑制機能を持つT細胞であるアゴニスト選択性T細胞の分化を制御していることが明らかとなった。この成果は、筆頭著者かつ責任著者として、Immunity誌に発表した。

(3) Treg細胞と樹状細胞において高発現している新規分子Tbc1d4の同定と発現制御メカニズムの解析を行った。我々はTreg前駆細胞と成熟Treg細胞を用いた網羅的な遺伝子発現解析から、カルシウムシグナル依存性に発現が変化する分子としてTbc1d4を同定した。この分子は、別名AS160と呼ばれており、グルコーストランスポーターGLUT4の細胞膜

への移動を制御する RabGAP である。また、Akt によってリン酸化され、その活性が制御される。Tbc1d4 は筋肉などで機能することが知られているが、免疫細胞における機能は不明であった。そこで、まず T 細胞における発現パターンを解析した。その結果、iTreg と T_H1 へ分化する培養条件下では発現が上昇し、カルシウムシグナルの欠損によって著減する分子を同定した。逆に、 T_H2 や T_H17 へ分化する条件下では、発現が抑制されることが明らかとなった。また、その発現はストア作動性カルシウム流入が欠損した場合に、著明に減少することが明らかとなった。

(4) Tbc1d4 の免疫細胞における役割を解析するために、Tbc1d4(flox/flox) マウスを作製した。まず、Actin-Cre Tg マウスを用いて、全身で Tbc1d4 を欠損したマウスを作製したところ、個体の発生は正常であり、生殖活動にも影響は認められなかった。そこで、免疫細胞の分化を解析したが、T 細胞、樹状細胞などの分化は正常であった。次に、T 細胞の増殖能、T 細胞や樹状細胞のサイトカイン産生を解析したが、やはりこれらの機能も正常であった。以上から、Tbc1d4 単独の欠損では免疫細胞の分化や機能に影響は与えないことが示唆された。この結果は、その後の報告から、免疫細胞では GLUT4 より GLUT1 の機能が重要であることと矛盾しないと考えられた。

(5) ストア作動性カルシウム流入-カルシウムシグナルによる樹状細胞の分化における役割の解析を行った。その結果、脾臓、小腸、大腸などにおける CD11c⁺MHC class II⁺ のサブセット、プラズマサイトイド樹状細胞の比率や細胞数は野生型と同等であった。また、胸腺、脾臓、リンパ節などの CD4 陽性あるいは CD8 陽性 T 細胞、制御性 T 細胞の比率や数も正常であった。

(6) ストア作動性カルシウム流入-カルシウムシグナルによる樹状細胞を介した感染防御における役割を解析した。千葉大学・真菌センターとの共同研究によるカンジダ菌に対する真菌感染防御反応を調べたが、STIM 欠損マウスと野生型マウスの間で真菌に対する抵抗性に有意な差は認められなかった。

(7) リガンド刺激による樹状細胞のエフェクター機能におけるストア作動性カルシウム流入の役割の解析を行った。骨髓由来の STIM 欠損樹状細胞をザイモザン刺激した結果、STIM 欠損樹状細胞では Dectin-1 を介した IL-2 産生が著明に減少していた。さらに、IL-12 p40 産生も半減していた。より精製されたリガンドであるカルドランを用いても同様な結果が得られた。一方、IL-10 産生に影響は認めなかった。LPS 刺激では、IL-6 産生が半減していた。シグナル伝達経路を解析したところ、NFAT 経路以外に、NF- κ B 経路の活性化に影響を認めた。また、MHC class II、CD80、CD86、CD40 などのリンパ球を活性化する分子の発現レベルは、定常状態と刺激

後においても、Stim 欠損と野生型樹状細胞の間で差は認められなかった。

(8) 樹状細胞による T 細胞の分化支持能の解析を行った。その結果、樹状細胞を結核菌で刺激した場合、T 細胞の増殖および T_H17 細胞への分化が減少することが明らかとなった。これは、リガンド刺激によって IL-2 の産生や IL-6 の産生の減少による可能性が考えられるが、詳細なメカニズムは解析中である。(9) 樹状細胞のカルシウムシグナルによる獲得免疫応答への影響を解析した。抗原をアジュバントとともに投与した結果、*in vitro* の結果と同様に、カルシウムシグナルの欠損によって免疫応答が弱くなることが明らかとなった。

以上の解析から、カルシウムシグナルは、制御性 T 細胞のアゴニスト選択後の分化を制御することによって、末梢免疫寛容の成立を制御していることが明らかとなった。一方、樹状細胞におけるカルシウムシグナルは、免疫寛容や自然免疫応答ではなく、T 細胞の活性化を介した免疫応答を制御している可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J.A. and Takayanagi, H. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into T_H17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 20, 62-68 (2014) Doi:10.1038/nm.3432
- Oh-hora, M., Komatsu, N., Pishyraeh, M., Feske, S., Hori, S., Taniguchi, M., Rao, A. and Takayanagi, H. Agonist-selected T cell development requires strong T-cell receptor signaling and store-operated calcium entry. *Immunity* 38, 881-895 (2013) Doi:10.1016/j.immuni.2013.02.008
- Nunes, P., Cornut, D., Bochet, V., Hasler, U., Oh-hora, M., Waldburger, J.M. and Demareux, N. STIM1 juxtaposes ER to phagosomes, generating Ca²⁺ hotspots that boost phagocytosis. *Curr Biol* 22, 1990-1997 (2012) Doi: 10.1016/j.cub.2012.08.049
- Cheng, K.T., Alevizos, I., Liu, X., Swaim, W.D., Yin, H., Feske, S., Oh-hora, M. and Ambudkar, I.S. STIM1 and STIM2 deficiency in T lymphocytes underlies development of exocrine gland autoimmune disease, Sjögren's Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 14544-14549 (2012) Doi: 10.1073/pnas.1207354109

Li, T., Finch, EA., Graham, V., Zhang, ZS., Ding, JD., Burch, J., Oh-hora, M. and Rosenberg, P. STIM1-Ca²⁺ signaling is required for the hypertrophic growth of skeletal muscle in mice. *Mol Cell Biol* 32, 3009-3017 (2012) Doi: 10.1128/MCB.06599-11

Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, JQ, Bonewald, LF., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, EF., Penninger, JM. and Takayanagi, H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17, 1231-1234 (2011) Doi:10.1038/nm.2452

Zeiger, W., Ito, D., Swetlik, C., Oh-hora, M., Villereal, ML. and Thinakaran, G. Stanninocalcin 2 is a negative modulator of store-operated calcium entry. *Mol Cell Biol* 31, 3710-3722 (2011) Doi: 10.1128/MCB.05140-11

[学会発表](計16件)

大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広：ストア作動性カルシウム流入の異常による疾患発症メカニズム 第87回日本薬理学会年会、2014年3月19-21日、仙台

大洞将嗣：ストア作動性カルシウム流入による免疫制御 第91回日本生理学会大会、2014年3月16-18日、鹿児島

Oh-hora, M., Lu, X. and Yamasaki, S. NFAT2-dependent IL-4-producing follicular helper T cells is a critical factor in T_H2 inflammation by the lack of store-operated calcium entry. *Keystone Symposia*, 2014年1月17-22日、Vancouver, Canada

Ishikawa, E., Oh-hora, M., Kurosaki, T., Saito, T. and Yamasaki, S. Search for downstream targets of protein kinase D that is critical for T cell development. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月11-13日、千葉

Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Miyake, K., Li, L., Ohta, T., Adachi, T., Horiguchi, K., Kawano, Y. and Karasuyama, H. STIM1-mediated store operated Ca²⁺ entry is essential for basophil recruitment in IgE-mediated chronic allergic inflammation. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月11-13日、千葉

Oh-hora, M., Komatsu, N., Rao, A. and

Takayanagi, H. Store-operated calcium entry and T cell development. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-7日、千葉

三宅健介、吉川宗一郎、大洞将嗣、鳥山一：STIM1を介したストア作動性カルシウム流入は好塩基球の脱顆粒および炎症局所への浸潤に重要である 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013年11月28-30日、東京

Oh-hora, M., Komatsu, N., Rao, A. and Takayanagi, H. Store-operated calcium entry is crucial for the development of agonist-selected T cells. *FASEB Science Research Conference*, 2013年6月9-14日、Nassau, Bahamas

大洞将嗣、小松紀子、Anjana Rao、高柳広：T細胞分化とストア作動性カルシウム流入 第22回東京免疫フォーラム、2013年3月14日、東京

大洞将嗣、小松紀子、Stefan Feske、堀昌平、Anjana Rao、高柳広：Strong TCR/calcium signaling specifically controls the development of regulatory T cell subsets. *Frontiers in Immunology and Inflammation*, 2013年2月12-13日、東京

Oh-hora, M., Komatsu, N., Feske, S., Hori, S., Rao, A. and Takayanagi, H. Agonist-selected T cell development requires strong TCR/calcium signaling. 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5-7日、神戸

Yoshikawa, S., Egawa, M., Oh-hora, M., Adachi, T., Horiguchi, K., Li, L., Ohta, T., Kawano, Y., Minagishi, Y. and Karasuyama, H. STIM1-mediated store operated Ca²⁺ entry is essential for basophil recruitment in IgE-mediated chronic allergic inflammation. 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5-7日、神戸

大洞将嗣：STIM依存性カルシウム流入によるT細胞の分化制御 第122回小児血液腫瘍懇話会、2012年11月2日、東京

大洞将嗣：小胞体カルシウムセンサー-STIMによるT細胞分化制御 第8回骨免疫ワークショップ、2012年11月2日、東京

大洞将嗣、小松紀子、高柳広：Agonist-selected T cell development requires strong TCR/calcium signaling. 第22回Kyoto T cell conference (KTCC)、2012年7月6-7日、京都

大洞将嗣：Lineage-specific requirement of store-operated calcium entry in T cell lineage development. 第21回Kyoto T cell conference (KTCC)、2011年6月10日、京都

〔図書〕(計 2件)

大洞将嗣、高柳広 羊土社 イラストで
徹底理解するシグナル伝達キーワード事
典、87-89 (3ページ)、2012年
大洞将嗣、黒崎知博 羊土社 イラスト
で徹底理解するシグナル伝達キーワード
事典、239-249 (11ページ)、2
012年

〔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.bioreg.kyushu-u.ac.jp/mib/divisions/summary_in_mi.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大洞 将嗣 (OHORA, Masatsugu)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 40351506