

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500484

研究課題名(和文)免疫制御遺伝子Ly49を欠損した新しい免疫疾患モデルラットの確立

研究課題名(英文) Establishment of a new model rat for immunological diseases deleting the Ly49 gene regulating immune reactions

研究代表者

山田 俊幸 (Yamada, Toshiyuki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20183981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：弘前ヘアレスラット(HHR)では胸腺での制御性T細胞の分化が抑制されている一方、通常の胸腺には見られないB1-B細胞と思われる成熟B細胞が認められる。またこれらの結果と考えられる自己免疫疾患様の症状も示す。今回我々は、HHRが免疫細胞の相互作用や機能制御に関わるLy49s3遺伝子を欠失しており、その結果この遺伝子の発現がリンパ球の分化を助ける胸腺樹状細胞から消失したことがHHRの免疫異常の原因である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The Hirosaki hairless rats (HHRs) exhibit immunological abnormalities in their thymus such as differentiation inhibition of regulatory T (Treg) cells and unusual presence of mature B cells, which appear to be B1-B cells. HHR also shows symptoms of autoimmune diseases that are thought to be results of its immunological abnormalities. In this study, we showed that HHR deletes the Ly49s3 gene, regulating cell-cell interactions of immunological cells and normally expressed in thymic dendritic cells, and that functional failure of HHR thymic dendritic cells due to loss of the expression of the gene is the reason for the immunological abnormalities in HHR.

研究分野：免疫細胞の発生学

キーワード：弘前ヘアレスラット 胸腺 制御性T細胞 B1-B細胞 Ly49s3遺伝子

1. 研究開始当初の背景

弘前ヘアレスラット (HHR) は弘前大学大学院医学研究科の我々の講座で SD ラット (SDR) より自然発生した無毛の突然変異ラットである。我々は当時 HHR の免疫系について解析を進めており、以下の事柄を見出していた。

- (1) HHR 胸腺は髄質の発達が悪く、胸腺内で分化を遂げる CD4 陽性の制御性 T 細胞 (nTreg) の数が減少している。制御性 T 細胞は免疫調節の中心的役割を果たし、特に免疫反応を抑制的に制御するが、HHR の皮下組織には自己免疫疾患の特徴のひとつであるリンパ球の浸潤が認められる。
- (2) HHR 胸腺の髄質には通常の胸腺には存在しない成熟 B 細胞が認められるが、この細胞の周囲には濾胞や胚中心は認められないことから、これらは T 細胞に非依存的に分化する B1-B 細胞である可能性が高い。
- (3) HHR は免疫細胞の相互作用や機能制御に関わる *Ly49s3* 遺伝子を欠失している。この遺伝子は正常の胸腺内ではリンパ球の分化制御に関わる樹状細胞に発現していることから、この欠失が HHR の免疫異常の原因と推察された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、HHR の免疫系の異常を *Ly49s3* 遺伝子の欠失に起因する胸腺樹状細胞の異常を中心として統合的に理解することを目的とした。すなわち、「HHR 胸腺では樹状細胞が *Ly49s3* 遺伝子の消失により異常となり、nTreg の分化抑制と B1-B 細胞の胸腺への誘引と分化促進につながった」、さらに「免疫反応を負に調節する nTreg の減少と、多くの自己抗体を産生する B1-B 細胞の分化促進が自己免疫疾患を引き起こした」という仮説の証明を目的とした。

Ly49 ファミリータンパク質は NK 細胞表面に存在し、標的細胞上の MHC I を認識した場合に NK 細胞に細胞障害機能を抑えるシグナ

ルを送る「負の受容体」として同定された [1]。同ファミリータンパク質は T 細胞や樹状細胞の表面にも見出され、これらの細胞の相互作用や機能制御に関わると考えられている。しかしながら、これらタンパク質がリンパ球の分化に関わるといった報告はなく、*Ly49s3* 遺伝子のノックアウト動物も存在しない。本研究は HHR の免疫系の病態メカニズムと *Ly49* ファミリー遺伝子の新たな機能の解明を目指し、さらに HHR をリンパ球の分化に関する基礎研究から自己免疫疾患の治療に関する応用研究にまで広く供される新しい免疫疾患モデル動物として樹立することを目指した。

3. 研究の方法

HHR の免疫異常が *Ly49s3* 遺伝子の発現を失った胸腺樹状細胞の異常に起因することを示すため以下の解析を行なった。

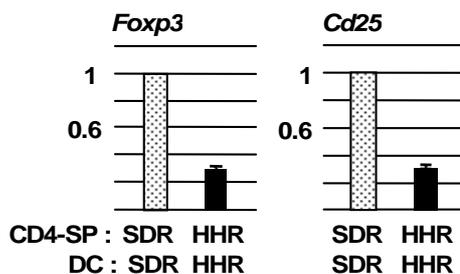
- (1) HHR 胸腺より単離した樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞 (CD4-single positive; CD4-SP 細胞) を 3 日間混合培養した後、nTreg マーカー (FoxP3, Cd25, Ctla4, Pd-1) の発現を real-time RT-PCR や FACS により検討した。対照実験として SDR 胸腺より単離した樹状細胞と CD4-SP 細胞についても同様の解析を行い、HHR 胸腺樹状細胞の nTreg に対する分化誘導能を評価した。
- (2) *Ly49s3* 遺伝子のレトロウイルス発現ベクターを構築し、上記 (1) の実験に応用した。すなわち HHR 胸腺より単離した樹状細胞に同ベクターにより *Ly49s3* 遺伝子を発現させた後 CD4 陽性 T 細胞との混合培養実験を行なった。
- (3) HHR 胸腺に存在する成熟 B 細胞が B1-B 細胞であることを、同細胞の表面に多く発現する膜結合型 IgM や CD5 に対する遺伝子発現解析や FACS 解析により示した。さらに、HHR 胸腺細胞の B1-B 細胞に対する誘引能や分化誘導能をサイトカイン

遺伝子の発現を指標として探った。

4. 研究成果

(1) HHR 胸腺樹状細胞の nTreg 分化誘導能の低下

HHR 胸腺と SDR 胸腺のそれぞれより樹状細胞と CD4-SP 細胞を単離し 3 日間混合培養し、CD4-SP 細胞の nTreg への分化を評価した。RT-PCR 解析により、HHR 胸腺由来の細胞同士の混合培養では SDR 胸腺由来の細胞同士の混合培養に比べて *Foxp3*、*Cd25*、*Ctla4*、*Pd-1* といった nTreg マーカーの遺伝子発現が低いことが示された (図 1)。また FACS 解析により *Foxp3*、*Cd25* に陽性の細胞数が HHR 胸腺由来細胞の混合培養で低いことが確認された。さらに、CD4-SP 細胞から nTreg の直前の分化段階にある CD4⁺CD25⁺細胞を除いて同様の実験を行なったところ、やはり HHR 胸腺由来細胞の混合培養において nTreg マーカーの遺伝子発現が低かった。一方、CD4-SP 細胞を単独で培養した場合の nTreg マーカーの遺伝子発現は、混合培養に比して低かったが HHR と SDR の間に差はなかった。これらの結果から、HHR 胸腺樹状細胞では CD4-SP 細胞を nTreg へと分化誘導する機能が低下していることが示された。

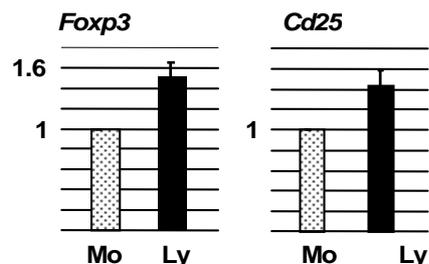


(図 1) SDR 胸腺および HHR 胸腺から CD4-SP 細胞と樹状細胞 (DC) を単離して混合培養した場合の nTreg マーカー遺伝子の発現 (*Foxp3* と *Cd25* のみ示した)。

(2) 胸腺樹状細胞の nTreg 分化誘導能における Ly49s3 の重要性

HHR 胸腺樹状細胞の nTreg 分化誘導能の低下が *Ly49s3* 遺伝子の欠失によることを示す

ため、同遺伝子をウイルスベクターにより HHR 胸腺樹状細胞で発現させた上で (1) と同様な混合培養実験を行なった。その結果 nTreg のマーカー遺伝子の発現誘導は回復したが (図 2)、樹状細胞由来と思われる MHC II 遺伝子 (*Rt1-B α* 、*Rt1-B β*) の発現も上昇していた。MHC II は CD4-SP 細胞上の T 細胞受容体 (TCR) と相互作用して T 細胞の分化に影響を与えることが知られているので [2]、この実験における nTreg のマーカー遺伝子の発現回復が *Ly49s3* の効果なのか MHC II の効果なのかは区別できない。そこで、*Ly49s3* と CD4-SP 細胞上の MHC I の相互作用を阻害する目的でこの混合培養に MHC I 抗体を加えたところ、再び nTreg のマーカー遺伝子の発現誘導が低下した。これらの結果から、胸腺樹状細胞に発現する *Ly49s3* が nTreg の分化誘導に重要であり、その機能は *Ly49s3* と CD4-SP 細胞上の MHC I との相互作用を通じて発現されるものと考えられた。また HHR 胸腺樹状細胞の nTreg 分化誘導能の低下は *Ly49s3* 遺伝子の欠失によるものと考えられた。

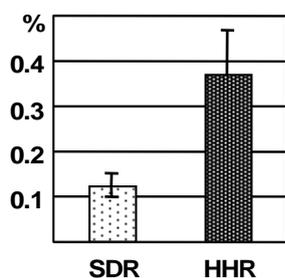


(図 2) HHR 胸腺から樹状細胞を単離し *Ly49s3* 遺伝子のウイルス発現ベクター (Ly) とコントロールの空ベクター (Mo) を感染させ、HHR 胸腺から単離した CD4-SP 細胞を混合培養した場合の nTreg マーカー遺伝子の発現 (*Foxp3* と *Cd25* のみ示した)。

(3) HHR 胸腺での成熟 B1-B 細胞の存在

FACS 解析により HHR 胸腺には B1-B 細胞の表面マーカーである膜結合型 IgM と CD5 とを共に持つ細胞の数が SDR 胸腺に比べて増加していることが示された (図 3)。また、RT-PCR により HHR 胸腺では膜結合型 IgM 重

鎖の mRNA が増加していることも示された。さらに B1-B 細胞の分化を促進するインターロイキンである IL15 の遺伝子発現や、抗体産生細胞の分化関連遺伝子 *Oct-2*, *Oca-B*, *Aid* などの発現上昇もみられ、SDR 胸腺では B1-B 細胞が成熟しているものと思われた。また HHR 胸腺では B1-B 細胞の誘引と定着に関わるストロマ細胞由来の CXCL13, CCL19 などのケモカインの遺伝子とそれらに呼応する B1-B 細胞由来の CXCR5 CCR7 などのケモカイン受容体の遺伝子発現が上昇していたことから、B1-B 細胞に対する誘引能が上昇しているものと思われた。さらに HHR 血清中では B1-B が多く生産することが知られている IgG サブタイプである IgG2a と IgG2c のレベルが上昇していた。これらの結果から、HHR 胸腺には B1-B 細胞が多く存在し形質細胞に分化しているものと考えられた。



(図3) 胸腺中の CD5⁺膜結合型 IgM⁺細胞の割合。

以上のことから、HHR 胸腺では樹状細胞の機能が *Ly49s3* 遺伝子の消失により変異し、それが nTreg の分化抑制と B1-B 細胞の胸腺への誘引と分化促進につながったと推察された。

本研究の成果の一部は、免疫学の権威ある国際誌である *Journal of Immunology* に掲載され、またその後外国誌から総説執筆の依頼も受けた。

(4) 今後の展望

最近我々は、HHR の CD4 陽性ヘルパー T 細胞の機能不全も見出しており、さらに HHR

胸腺中の T 細胞におけるビタミン A の作用不全を示唆するデータも得ている。今後は、今回得られた知見に加えて、CD4 陽性 T 細胞の分化異常とビタミン A の作用異常の関連(平成 27 年度、基盤研究 C 交付内定課題)という視点からの知見も得ることにより、HHR の免疫系の異常を多面的に理解するよう努力を続ける予定である。

<引用文献>

- [1] Nylenna, Ø., Naper, C., Vaage, J.T., et al. The gene and gene organization of the Ly49 region of the rat natural killer cell gene complex. *Eur. J. Immunol.* 35: 261-272, 2005.
- [2] Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395-1401, 2002.

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4件)

- [1] Sawano, T., Shimizu, T., Yamada, T., Nanashima, N., Miura, T., Morohashi, S., Kudo, D., Hui, F.-M., Kijima, H., Hakamada, K., and Tsuchida, S. Fatty acid synthase-positive hepatocytes and subsequent steatosis in rat livers by irinotecan. *Oncol. Rep.* 33: 2151-2160, 2015. (査読有)
DOI: 10.3892/or.20153814
- [2] Yamada, T., and Tsuchida, S. Ly49 and C-type lectin receptors on dendritic cells regulate T-cell differentiation as co-stimulatory molecules. *Receptor & Clin Invest.* 1: 101-111, 2014. (査読無、招待レビュー)
DOI: 10.14800/rci.98
- [3] Yamada, T., Nanashima, N., Akita, M., Shimizu, T., Miura, T., Yamana, D., Sawano, T., Sakurai, T., and Tsuchida, S. Lectin-like receptor Ly49s3 on dendritic cells contributes to the differentiation of regulatory T cells in the rat thymus. *J. Immunol.* 191:

3799-3809, 2013. (査読有)
DOI: 10.4049/jimmunol.1203511

- [4] Wu, Y., Sato, F., Yamada, T., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Hakamada, K., Abiko, Y., Kato, Y., and Kijima, H. The bHLH transcription factor DEC1 plays important roles in epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* 41: 1337-1346, 2012. (査読有)
DOI: 10.3892/ijo

[学会発表](計23件)

- [1] 山田俊幸、七島直樹、清水武史、土田成紀。水晶体の退縮と網膜の剥離を示す劣性遺伝性ラットの樹立と原因遺伝子の解明。第87回日本生化学会大会、2014, 10, 18、京都府京都市。
- [2] 山田俊幸、七島直樹、清水武史、土田成紀。弘前ヘアレスラット脾臓での濾胞性ヘルパーT細胞の分化異常と胸腺内CD4⁺CD8⁺細胞でのレチノイン酸結合タンパク質遺伝子および受容体遺伝子の発現異常。第80回日本生化学会東北支部会例会、2014, 5, 10、秋田県秋田市。
- [3] 山田俊幸、七島直樹、清水武史、澤野武行、土田成紀。CD4陽性T細胞からのNK細胞受容体遺伝子 *Klra17* の発現消失と濾胞性ヘルパーT細胞の機能不全。第86回日本生化学会大会、2013, 9, 11、神奈川県横浜市。
- [4] 山田俊幸、七島直樹、清水武史、土田成紀。ラット胸腺樹状細胞に発現するNK細胞受容体 Ly49s3 の制御性T細胞分化における役割。第79回日本生化学会東北支部会例会、2013, 5, 11、宮城県仙台市。
- [5] 山田俊幸、七島直樹、清水武史、澤野武行、土田成紀。ラット胸腺内樹状細胞からの *Ly49* ファミリー遺伝子の発現消失による制御性T細胞の分化抑制。第85回日本生化学会大会、2012, 12, 15、

福岡県福岡市。

- [6] 山田俊幸、七島直樹、清水武史、澤野武行、土田成紀。Regulatory T cell failure in the tumorigenesis resistant rat due to the loss of Ly49 expression in dendritic and T cells. 第71回日本癌学会総会、2012, 9, 20、北海道札幌市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 俊幸 (Yamada, Toshiyuki)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20183981

(2) 研究分担者

土田 成紀 (Tsuchida, Shigeki)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：20142862