

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592828

研究課題名(和文)免疫抑制性シグナルの可視化技術による記憶T細胞形成のメカニズムの解析

研究課題名(英文)Visualization of immune-inhibitory signaling in memory formation

研究代表者

岩井 佳子(IWAI, Yoshiko)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：90362467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では記憶T細胞形成における抑制性転写因子BATFの役割を調べるためにBATF発現の可視化を目的として、BATFのプロモーターの領域にGFP等を融合したレポーターミニ遺伝子を構築した。マウスから単離した樹状細胞をTLRリガンドにより刺激するとBATFのmRNA発現が誘導されたが、樹状細胞株では恒常的な発現がみられレポーターミニ遺伝子を導入してTLR刺激を行ってもレポーター活性の上昇はみられなかった。以上の結果から両者における発現制御の違いが示唆され、生理的な発現のメカニズムを解明するには細胞株ではなくprimary細胞を用いた実験系の構築が必要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To visualize BATF expression during memory T cell formation, reporter gene constructs were generated by fusing the luciferase, GFP, or dsRED gene to the BATF promoter. Interestingly, BATF expression was induced both in T cells and dendritic cells upon stimulation. While BATF expression was induced upon TLR stimulation in murine dendritic cells derived from spleen and bone marrow, BATF was constitutively expressed in dendritic cell lines, suggesting that mechanisms regulating BATF expression in primary cells and cell lines may be different. These results suggest that it might be important to establish the reporter system using primary cells for the analysis of molecular mechanisms regulating BATF-expression.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

自然免疫と獲得免疫を担う樹状細胞は T 細胞の記憶を形成する重要な役割を担っている。記憶 T 細胞の形成にはエフェクター T 細胞の最終分化をとめる何らかの抑制性シグナルが必要と考えられるが、その詳細については知られていない。

抑制性シグナルの解析が難しい点として促進性シグナルの減弱という間接的な方法で依存し定量化が難しいという問題がある。そこで本研究では記憶 T 細胞で発現の高い抑制性転写因子に注目して、*in vitro* および *in vivo* で免疫抑制性シグナルを可視化する技術を開発する。可視化技術を用いて生体内における記憶 T 細胞形成を視覚化することにより、記憶 T 細胞形成のメカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

樹状細胞は自然免疫と獲得免疫を結びつける重要な役割を担う。樹状細胞は微生物を感知すると活性化して、共刺激分子と炎症性サイトカインを産生し、T 細胞免疫応答を発動する。

樹状細胞の重要な役割の一つとして T 細胞の記憶形成があげられる。ナイーブな T 細胞は樹状細胞から抗原提示を受けるとエフェクター T 細胞になり、大部分は細胞死にいたるが一部分は生き残って記憶 T 細胞となる。記憶 T 細胞の形成にはエフェクター T 細胞の最終分化をとめる何らかの抑制性シグナルが必要と考えられるが、これまでのところ T 細胞の記憶形成に関わる抑制性シグナルは同定されていない。

BATF は AP-1/ATF ファミリーに属する転写因子で、活性化 T 細胞に発現して、c-Jun とヘテロダイマーを形成し AP-1 の転写活性を負に制御する。我々はこれまでの研究で BATF が機能的なエフェクター CD8T 細胞の分化に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。さらに興味深いことに BATF 遺伝子は活性化した T 細胞と樹状細胞の双方に発現することを見出し、BATF は記憶 T 細胞形成過程における T 細胞-樹状細胞連関を制御している可能性が考えられる。そこで本研究では、活性化した T 細胞と樹状細胞の双方に発現する BATF に注目しその発現を可視化するシステムを開発する。

3. 研究の方法

(1) レポーターミニ遺伝子の作成

マウス BATF 遺伝子のプロモーターの領域を PCR により増幅し、Luc 遺伝子 GFP

遺伝子、dsREDExpress2 遺伝子を融合した 3 種類のレポーターミニ遺伝子を構築した。

(2) 樹状細胞における BATF の発現解析

C57BL/6 マウスの脾臓から MACS を用いて樹状細胞を単離して、TLR リガンドで刺激後、さまざまな time point で細胞を回収し RNA を単離した。同様にマウス骨髄由来の樹状細胞をさまざまな TLR リガンドで刺激し RNA を単離した。脾臓および骨髄由来樹状細胞における BATF の mRNA 発現を real-time PCR により解析した。

(3) 樹状細胞株へのレポーターミニ遺伝子の導入

BATF の発現をモニタリングするために、レポーターミニ遺伝子をマウス由来樹状細胞株にエレクトロポレーションにより導入し、TRL リガンドの存在下および非存在下でのレポーター活性を蛍光顕微鏡および FACS により解析した。

(4) BATF-GFP ノックインマウスの解析

BATF の発現を *in vivo* で可視化するため、BATF 遺伝子座に GFP 遺伝子を挿入した GFP ノックインマウスを作製した(新潟大学との共同研究)。このマウスを用いて、組織標本を作製し蛍光顕微鏡による解析を行う予定であったが、平成 25 年度に所属が東京医科歯科大学から産業医科大学に変更となり、実験室のセットアップ、遺伝子組換え動物の移動および繁殖に時間を要したため、実験計画に大幅な遅れが生じた。

4. 研究成果

(1) マウス骨髄および脾臓由来樹状細胞における BATF の mRNA 発現解析

マウス骨髄由来の樹状細胞および脾臓から単離した樹状細胞を TLR リガンドで刺激すると BATF の mRNA 発現が誘導された。一方、樹状細胞株では恒常的な発現がみられ、TLR 刺激による発現上昇はみられず、むしろ発現低下が観察された。また刺激後さまざまな time point で細胞を回収し、time course を調べたところ、刺激後 24-72hr の比較的遅い時期に発現が高くなることがわかった。

(2) 樹状細胞株へのレポーターミニ遺伝子の導入と BATF 発現のモニタリング

マウス由来樹状細胞株にレポーターミニ遺伝子をエレクトロポレーションにより導入した後 TLR リガンドで刺激を行ったところ、レポーター活性の上昇はみられなかった。この結果は(1)の実験結果と一致していた。

さらに primary の樹状細胞(骨髄および脾臓由来)へのレポーターミニ遺伝子の導入を試みたが、生存率が非常に低く解析が困難であった。

(3) BATF 発現を誘導するシグナル経路の探索

BATF の発現が TLR シグナル下流のアダプター分子 MyD88 を介しているかどうかを調べるために、MyD88 欠損マウスおよび野生型マウスの脾臓から樹状細胞を単離して TLR リガンドにより刺激を行った。すると MyD88 欠損樹状細胞においても TLR 刺激により BATF の発現が誘導された。以上の結果から、BATF の発現を誘導するシグナル経路は MyD88 を介さない可能性が示唆された。

(4) BATF-GFP ノックインマウスの作製および解析

BATF-GFP ノックインマウスは新潟大学(崎村教授)との共同研究により既に作成済みであったが、平成 25 年度に所属が東京医科歯科大学から産業医科大学に変更となり、遺伝子組換え動物の移動および繁殖に時間を要したため、実験計画に大幅な遅れが生じた。

BATF-GFP ノックインマウスを凍結胚から個体化して繁殖させた後、サンプリングを行い、組織標本作製した。ノックインマウスでは本来 BATF が発現する場所に GFP が発現するようにターゲティングベクターを作成したが、実際には発現レベルが低く、顕微鏡下での観察は難しかった。

一方、BATF-GFP ノックインマウスから単離した T 細胞を抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体 + IL-12 により刺激すると、GFP 発現がみられた。さらに CD44-T 細胞と CD44+T 細胞を単離して、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体により刺激すると後者でより高い GFP 発現がみられた。以上の結果から BATF が naïve な T 細胞よりもエフェクター T 細胞や記憶 T 細胞で発現が高いことが示唆され、これまでの結果と一致することから in vitro で BATF の発現をモニタリングすることが可能な実験系を確立できた。

以上の結果から、primary の樹状細胞と細胞株では BATF の発現誘導パターンが著しく異なり、生理的な BATF 発現のメカニズムを解明するには細胞株ではなく

primary 細胞を用いた実験系の構築が重要であることがわかった。また primary 細胞における TLR リガンドによる BATF の発現誘導は TLR 下流の MyD88 を介さない可能性が示唆された(論文投稿準備中)。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

岩井 佳子、

「SIRT1 と T 細胞分化」

第 15 回日本抗加齢医学会総会、

2015 年 5 月 20 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

[図書](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 佳子 (Iwai, Yoshiko)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：90362467
平成 25 年 3 月まで
東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究
科・准教授

(2)研究分担者

(3)連携研究者