

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840040

研究課題名(和文) T細胞サブセット特異的な細胞膜ガングリオシド発現の機能的意義の解明

研究課題名(英文) Role of membrane gangliosides in T cell development and activation

研究代表者

永福 正和 (Nagafuku, Masakazu)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20399976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞の分化過程においてどのようなガングリオシド分子種が発現し、それがT細胞免疫機能にどのような意義を持つのがよくわかっていない。GM3SとGM2/GD2Sの二重欠損マウス(DKO)を用いてT細胞の分化を解析したところ、DN3aステージで強く抑制されていることが判明した。このDN3aステージではガングリオシド発現が顕著に上昇し、それはTCR α の発現上昇と完全に一致した。DKOマウスにおけるTCR α 鎖の発現を確認したところ、コントロールに比べて顕著な発現の抑制が認められた。TCR α が発現するDN3aステージにおいてガングリオシド発現が上昇することがT細胞の分化にとって重要であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：T cell development depends on appropriate signals mediated by T cell receptors and many other receptors. Sphingolipids (gangliosides and sphingomyelin) are thought to form a platform (lipid raft) for receptor-mediated signaling. We determined the expression profiles of gangliosides during T cell development. Ganglioside levels were greatly increased during the DN3 stage, which was coincidentally with TCR β chain expression. To determine the role of gangliosides in T cell development we prepared GM3S and GM2/GD2S double deficient mice (DKO mice) which don't express any ganglioside species. DKO mice exhibited abnormal thymic development and greatly reduced in thymocytes. T cell development in DKO mice was arrested at the DN3 stage where TCR β chain gene arrangement occurs. These results suggest unique rafts are formed in the plasma membrane during T cell development and these rafts provide the appropriate distinct intracellular signaling events for successful differentiation.

研究分野：糖鎖免疫学

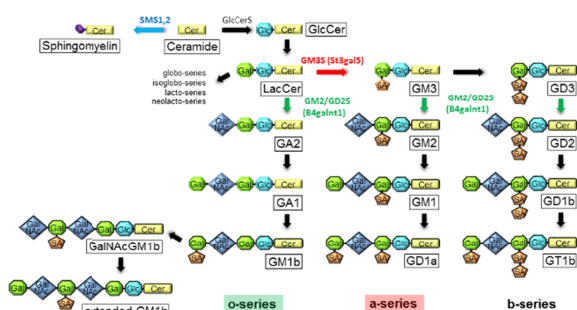
キーワード：ガングリオシド T細胞分化 TCR 胸腺 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

gangliosideは、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称である(図1)。細胞膜ではgangliosideが集積したマイクロドメインが形成され、それが様々な受容体シグナル伝達に重要であることがよく知られている。T細胞においても、このマイクロドメインはT細胞抗原受容体(TCR)シグナル伝達や免疫シナプスの構築に重要な場として機能している。gangliosideは糖鎖の数や配置の違いにより多彩なファミリーを形成し、細胞の種類や状態により発現するganglioside分子種に特徴がある。実際、エフェクターT細胞であるTh1細胞とTh2細胞とは異なるganglioside分子種を発現する。一方、T細胞の分化過程において、どのようなganglioside分子種が発現し、それがT細胞免疫機能にどのような意義を持つのかよくわかっていない。

2012年に我々はマウスの胸腺未熟T細胞および末梢のT細胞サブセット(ヘルパーTとキラーT細胞)に発現するgangliosideを液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS)を用いて解析したところ、T細胞は分化過程においてそれぞれ特異的なganglioside分子種を優位に発現させること、そしてそれがT細胞の活性化に重要であることを報告した(Nagafuku et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012)。胸腺細胞はganglioside発現そのものが低く、ヘルパーTとキラーT細胞はそれぞれa-シリーズとo-シリーズのgangliosideを優位に発現していた。さらに重要な発見として、特定のgangliosideシリーズを欠如する遺伝子改変マウス(GM3SKO、GM2/GD2S KO)を解析したところ、ヘルパーTとキラーT細胞のどちらもそれが優位に発現するganglioside分子種を欠如したKOマウスにおいてTCR刺激後の活性化が抑制されていた。さらに、GM3SKOマウスでは、ヘルパーT細胞依存性のアレルゲン誘導性気道炎症が顕著に軽減していた。また、2010年に他のグループより全身性エリテマトーデス患者においてヘルパーT細胞特異的にganglioside GM1の発現上昇が認められるという報告がされた。以上より、特異的なganglioside分子種によって構成される細胞膜マイクロドメインがT細胞の分化およびT細胞サブセットの特異的機能に重要な

Fig.1 Ganglioside biosynthetic pathways



役割を果たすことが示唆される。

2. 研究の目的

本研究課題では、T細胞の分化および活性化において特異的に発現するganglioside分子種を解析することにより、アレルギー疾患や自己免疫疾患に關与する分子機構を解明し治療戦略を構築することを目的とした。そのためにふたつの柱を立てて研究を遂行した。

(1) ganglioside合成系の遺伝子改変マウスモデルを用いてT細胞の分化および機能におけるganglioside分子種の発現の必要性を精査する。

(2) 健常人およびアレルギー疾患患者のT細胞におけるganglioside分子種の発現プロファイルを解明するとともに、in vitroにおいてgangliosideの発現を抑制させることによりT細胞の活性制御を試みる。

2. 研究の方法

(1) T細胞の分化および活性化におけるganglioside発現の意義

ganglioside完全欠損マウスの解析
GM3SとGM2/GD2Sの二重欠損マウスはすべてのgangliosideを欠損する(図1)。このマウスを用いて骨髄、胸腺、脾臓およびリンパ節におけるT細胞および他の造血系細胞の分化をFACS解析、胎児胸腺器官培養、およびOP9細胞を用いた共培養の実験系を駆使して解析した。これまでの予備的な検討より、シングル欠損マウスでは胸腺におけるT細胞分化はほぼ正常であるが、二重欠損マウスではT細胞分化はDN3(double negative 3)ステージで大いに停止することを見出してきたので、本研究ではこの再現データを得るとともにそのメカニズムに切り込んだ。その方法としては、DN3はTCR遺伝子の再構成のステージであるため、FACS AriaIIを用いてDN3細胞をソートし、TCRの発現(FACS解析にて)を解析した。

T細胞膜のgangliosideマイクロドメインの役割の解析

特定のganglioside分子種の欠如により影響を受けるTCRシグナル伝達経路を解明するために、ソートしたT細胞サブセットを抗CD3抗体にてTCR刺激を行ったときのタンパクチロシンリン酸化、細胞内カルシウム動員、転写因子の活性化(NFAT、NF B、AP-1)を検討した。

(2) ヒトT細胞におけるganglioside発現プロファイルの解明

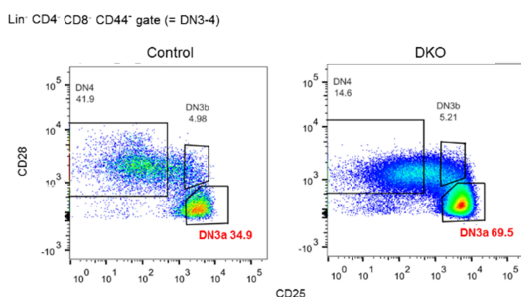
ヒト末梢血T細胞のganglioside発現プロファイリング
健常人の末梢血よりMACSビーズを用いてT

細胞サブセットを精製し、発現するガングリオシド分子種の詳細なプロファイルを検討した。また、抗 CD3 抗体により活性化を誘導した T 細胞サブセットのガングリオシド発現も検討することにより、休止期と活性化での発現プロファイルの相違を検討した。

4. 研究成果

(1) GM3S と GM2/GD2S の二重欠損マウス (DKO) は、コントロール型マウスに比して身体が小さく短命であった。胸腺細胞数はコントロールに比して 200 分の 1、骨髄細胞数は 3 分の 1 であったが、体重に換算してみると骨髄細胞数は有意差が認められないのに対して胸腺細胞数は有意な差であった。胸腺の組織像 (凍結切片の HE 染色) では、DKO マウスは胸腺皮質組織の形成不全が認められたが、これは後述するより未分化な T 細胞の分化抑制が一因と考えられる。胸腺における T 細胞の分化は DN3 ステージの中で DN3a ステージで強く抑制されていることが判明した (図 2)。この DN3a-DN3b 間のステージではガングリオシド発現が顕著に上昇し、それは TCR の発現上昇と完全に一致した。すなわち、TCR が発現する DN3a-3b ステージにおいてガングリオシド発現が上昇することが T 細胞の分化にとって重要であることがわか

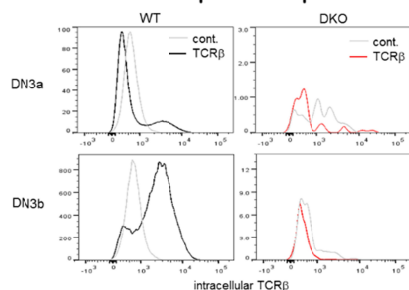
Fig.2 T cell development in DKO mice is arrested at the DN3a stage where TCR β chain gene arrangement occurs



った。

ガングリオシドの欠損により T 細胞分化は DN3a ステージで停止した。DN3a ステージでは TCR 鎖の遺伝子再構成が起こることが知

Fig.3 TCR β chain rearrangement and pT α induction lead to preTCR expression



られている。TCR 鎖は遺伝子再構成を起こすことで抗原認識の多様性を獲得しており、遺伝子再構成を起こすことが TCR 鎖の発現に不可欠である。DKO マウスにおける TCR 鎖の発現を確認したところ、コントロールに比べて顕著に発現の抑制が認められた (図 3)。したがって、DKO マウスでは、TCR 鎖の遺伝子再構成イベントに障害があることが示唆される。今後、実際に遺伝子再構成イベントの有無を確認したい。

(2) ヒトとマウスとでは T 細胞に発現するガングリオシド分子種が異なる。マウスでは、高級なガングリオシド (特に図 1 の o-series) が主に発現しているが、ヒトでは単純なガングリオシド (GM3 が主要で、GD3 も少し発現) を発現していることが知られている。また、刺激依存的にガングリオシドの発現が増加することも我々はこれまでに報告してきた。しかし、T 細胞サブセットごとにどのようなガングリオシド分子種を発現しているかはよくわかっていない。今回、ヘルパー T 細胞およびキラー T 細胞におけるガングリオシドの発現を LC-MS を用いて微量に測定したところ、両細胞サブセットとも GM3 が主要であることに違いはないことが判明した。また、その発現量は刺激依存的に増加することも確認した。このようにヘルパー T 細胞とキラー T 細胞におけるガングリオシド分子種の発現パターンを確認できた意義は大きい。

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)

Nagafuku, M., Sato, T., Sato, S., Shimizu, K., Taira, T., Inokuchi, J. Control of Homeostatic and Pathogenic Balance in Adipose Tissue by Ganglioside GM3. *Glycobiology* 査読有 25(3), 2015, 303-318

doi: 10.1093/glycob/cwu112

Inokuchi, J., Nagafuku, M., Ohno, I., Suzuki, A. Distinct selectivity of gangliosides required for CD4+ T and CD8+ T cell activation. *Biochim Biophys Acta*. 査読有 1851(1), 2015, 98-106

doi: 10.1016/j.bbali.2014.07.013

Nagafuku, M., Inokuchi, J. The physiological significance of ganglioside species selectively expressed on individual T cell subsets. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 査読有 25, 2013, 159-169

http://doi.org/10.4052/tigg.25.159

Inokuchi, J., Nagafuku, M., Ohno, I.,

Suzuki, A. Heterogeneity of gangliosides among T cell subsets. Cell Mol Life Sci. 査読有 70(17), 2013, 3067-3075
doi: 10.1007/s00018-012-1208-x

〔学会発表〕(計 8 件)

永福 正和、井ノ口 仁一、T 細胞分化におけるスフィンゴ脂質の発現制御、第 8 回スフィンゴテラピー研究会、平成 25 年 7 月 12-13 日、山中温泉河鹿荘ロイヤルホテル(石川県加賀市)

井ノ口 仁一、永福 正和、マクロファージは内臓脂肪細胞のガングリオシド発現を時間的・空間的に支配することにより分化成熟とインスリンシグナルを制御している、第 32 回日本糖質学会、平成 25 年 8 月 5-7 日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

井ノ口 仁一、永福 正和、マクロファージによる内臓脂肪細胞のガングリオシド発現の病態生理学的意義、第 34 回日本肥満学会、平成 25 年 10 月 11-12 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

永福 正和、大野 勲、鈴木 明身、井ノ口 仁一、T 細胞分化制御機構および免疫疾患におけるスフィンゴ糖脂質発現の意義、第 11 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、平成 25 年 10 月 25-26 日、東北薬科大学(宮城県仙台市)

Masakazu Nagafuku, Jin-ichi Inokuchi, Distinct expression profiles of sphingolipid species during T cell development、第 42 回日本免疫学会、平成 25 年 12 月 11-13 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

井ノ口 仁一、永福 正和、マクロファージは内臓脂肪細胞のスフィンゴ糖脂質発現を制御し、脂肪細胞の生理的分化成熟と肥満によるインスリン抵抗性を制御している、第 56 回日本脂質生化学会、平成 26 年 6 月 6-7 日、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市)

二瓶 渉、永福 正和、菊地 唯、井ノ口 仁一、ガングリオシドは腸管における NPC1L1 を介したコレステロール吸収を制御する、第 37 回日本分子生物学会、平成 26 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Masakazu Nagafuku, Kaoru Toshima, Jin-ichi Inokuchi, Rearrangements of lipid raft constituents during thymocyte development、第 43 回日本免疫学会、平成 26 年 12 月 10-12 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計 2 件)

Nagafuku, M., Inokuchi, J. Springer, Sugar Chains (Gangliosides and T cell immunity), 2014, 35-54

Nagafuku, M., Inokuchi, J. Springer, Glycoscience: Biology and Medicine (Gangliosides in T cell immunity), 2014, 667-673

〔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

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/homepages/kinoubyoutai/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永福 正和(Nagafuku, Masakazu)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20399976