



Title	炎症回路とT細胞の活性制御機構に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	勝沼, 功吉
Description	配架番号 : 1693
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7030号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67446
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kokichi_Katsunuma_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 勝沼 功吉

学 位 論 文 題 名

炎症回路と T 細胞の活性制御機構に関する研究
(Studies on regulatory mechanisms of inflammation amplifier and T cells)

【背景と目的】

適切に免疫系が機能することは生体の恒常性維持に不可欠である。我々の研究室では免疫系細胞と非免疫系細胞の協調的な炎症性サイトカイン産生のフィードフォワード機構である「炎症回路」の解明を進めてきた。炎症回路関連遺伝子の機能的な変化は、関節リウマチや多発性硬化症等の自己免疫疾患に関わるだけでなく、同種移植時の拒絶応答にも関与していること等を証明してきた。生体内には多様な免疫担当細胞が存在するが、中でも炎症回路で中心的な役割を担う T 細胞の適切な細胞数の維持や活性の制御は免疫系の恒常性維持に欠かすことはできない。これまでに T 細胞の生存を正に制御する分子機構として、TCR-MHC の相互作用や IL-7 等のサイトカインの存在が知られていたものの、T 細胞の生存に対して負の作用をもたらすシグナルについてはほとんど知られておらず、T 細胞の機能の制御を理解するためには更なる研究が必要と考えられた。

【材料と方法】

炎症回路を活性化する生体内の制御機構の中で特に T 細胞の生存と細胞死の調整メカニズムの解明を目的とし、探索的な実験的アプローチ方法として変異誘導化合物 N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU) 処置によりランダムに遺伝子変異が導入されたマウスを得た。フェノタイプスクリーニングにより、末梢血中のナイーブ T 細胞の数が野生型マウスよりも大幅に少ない T-Red (naïve T cell reduced) マウスを発見し、系統として確立した。T-Red マウスの詳細解析により、ナイーブ T 細胞の細胞数の制御メカニズムの解明を目指した。

【結果】

連鎖解析と遺伝子読解により、T-Red マウスには KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 1 (*Kdelr1*) 遺伝子に点突然変異が存在し、アミノ酸レベルで S123P の変異が生じていることが分かった。また、T-Red マウスの骨髓幹細胞に野生型 *Kdelr1* を強制発現させるレスキュー実験で T-Red マウスの表現型が改善され、KDELRL1 KO マウスや CD4 陽性細胞特異的に KDELRL1 を欠損させたマウスでは T-Red マウスと同様にナイーブ T 細胞の減少が確認されたことから、KDELRL1 が T-Red マウスで見られる表現型の責任遺伝子であることが判明した。野生型マウスと比較し、T-Red マウスの DP 細胞では活性化 Casp3 及び Annexin V 陽性細胞の比率が高く、ナイーブ T 細胞では *Bim*、*Chop*、*Trib3* 等のアポトーシス関連遺伝子の発現が高かったことから、アポトーシス誘導の亢進が示唆された。さらに、T-Red マウスの DP 細胞、ナイーブ T 細胞において全般的なタンパク質の翻訳活性の低下を認め、ナイーブ T 細胞では翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor 2A (eIF2 α) のリン酸化が亢進していたことから、T-Red マウスのこれらの細胞では過剰な integrated stress responses (ISR) が発生している可能性が考えられた。そこで eIF2 α のリン酸化レベルを直接制御する酵素の活性を評価した結果、T-Red マウスのナイーブ T 細胞では既知の 4 種のキナーゼ (HRI、PKR、PERK、GCN2) の活性には変化がないものの、protein phosphatase 1 (PP1) の活性が低下していることが判明した。PP1 は複数のタンパク質と相互作用することが報告されていることから、強制発現系での共沈実験及び proximity ligation assay (PLA) を実施した結果、野生型の KDELRL1 と PP1 が直接相互作用することが明らかとなった。さらに興味深いことに、T-Red 型の KDELRL1 では PP1 α との相互作用が大幅に減弱することが分かった。また、T-Red マウスの末梢血で特徴的な表現型は OT-I マウス等の TCR トランスジェニックマウスとの交雑により認められなくなり、T-Red/OT-1 マウスのナイーブ CD8 陽性 T 細胞では T-Red マウスの細胞で見られるアポトーシス関連遺伝子群の発現亢進も抑制された。さらに、T-Red マウスではコラーゲン誘導関節炎モデルや OVA に対

する応答、異性間の移植による拒絶応答、リステリア菌感染等の T 細胞が関連する様々な免疫応答が減弱することが明らかとなった。

【考察】

ISR は ER ストレスやアミノ酸欠乏、二本鎖 RNA ウイルス感染等の複数の原因により惹起されるストレス応答で、細胞内では eIF2 α のリン酸化を介して情報が伝達され全般的なタンパク質の翻訳を制御することで、細胞への負荷を減らし恒常性維持に機能すると考えられている。また、eIF2 α のリン酸化が細胞のアポトーシス誘導を促進することや ISR により *Bim*、*Chop*、*Trib3* 等のアポトーシス関連遺伝子の発現が亢進することが知られていた。今回、我々は KDELR1 と PP1 α が相互作用することと T-Red 型の KDELR1 の変異により PP1 α との相互作用が減弱することを見出した。さらに、T-Red マウスの DP 細胞やナイーブ T 細胞では、KDELR1 と PP1 の相互作用が減弱することで、PP1 活性の低下とリン酸化 eIF2 α の上昇を招き、アポトーシス関連遺伝子の発現と細胞死が亢進したと考えている。一方で、通常、KDELR1-PP1 の相互作用がどのように PP1 活性を制御しているかは明確ではない。従来、KDELR1 は C 末端側に KDEL 配列を持つタンパク質をゴルジ体から小胞体へと逆行輸送する分子として報告されており、KDELR1 の 123 番目のセリン残基は KDEL 配列を持つ分子との相互作用に特に重要と考えられている。したがって、S123P の変異がある T-Red 型 KDELR1 には逆行輸送の機能に異常が生じていることが予想され、T-Red マウスの細胞では PP1 の立体構造の維持に必要なある種の分子シャペロンの供給が不全となっている可能性があり、PP1 の活性低下のひとつの要因として推測している。

また、興味深いことに、T-Red マウスのナイーブ T 細胞で見られた表現型は TCR トランスジェニックマウスとの交雑により認められなくなったことから、トランスジェニック TCR により何らかの正の生存シグナルが入力されることで、KDELR1 の機能異常によるアポトーシスが回避されたものと考えられた。以上のことから、野生型のナイーブ T 細胞では、ISR による負の生存シグナルが恒常的に発生しているものの、KDELR1-PP1 及び TCR の正の生存シグナルが協調して作用することで、適切な細胞数が保たれ、恒常性が維持されている可能性が示唆された。一方で、ISR が発生している原因は現時点で不明であり、明確にすることは今後の課題である。

また、T-Red マウスの *in vivo* 試験によりナイーブ T 細胞の細胞数の減少が全身性の免疫応答を低下させることも明らかとなった。この成果は、ナイーブ T 細胞数を制御するような化合物がヒトの免疫関連疾患をコントロールできる可能性を示唆するものと考えられ、今後、新たな作用機序を持つ医薬品の開発に繋がる可能性を秘めた結果と言える。

【結論】

T-Red マウスの一連の解析を通じ、KDELR1 と PP1 が直接相互作用し ISR 応答による過剰な eIF2 α のリン酸化を抑制することでナイーブ T 細胞の細胞死を制御していることを見出した。今回の成果は炎症回路の中心的な役割を担う T 細胞のホメオスタシス維持に KDELR1 が深く関与していることを明らかにした成果であり、炎症回路の全容を理解するうえでも重要な成果と考えられる。