

研究課題別研究評価

1. 研究課題: Tリンパ球の分化と選択を決定づける細胞内信号

2. 研究者名: 高浜洋介

3. 研究のねらい

免疫応答において中心的役割を担うTリンパ球は胸腺にて分化する。このとき胸腺内では、外来抗原反応性の有用なTリンパ球は分化促進される(正の選択)一方、自己反応性の有害なTリンパ球は除去される(負の選択)。本研究では、任意の信号伝達分子を発現させた幼若Tリンパ球の分化と移動を解析する技術を開発することによって、Tリンパ球の分化と選択が胸腺内のどのような場所でどのようなシグナルによって決定されるのか解明することを目的とした。

4. 研究成果と自己評価

Tリンパ球の正と負の選択を特徴づける細胞内シグナル伝達機構を解析するために、まずクラゲ蛍光タンパク green fluorescence protein (GFP)を発現する組換えレトロウイルスを用いて、胸腺細胞への遺伝子導入法を検討した。その結果、胸腺から幼若Tリンパ球を一旦遊離して、ウイルス産生細胞およびリンパ球生存因子 interleukin-7 とともに1日培養し、蛍光励起セルソーターにて精製した後に器官培養に戻すことによって、30-50%の胸腺細胞に GFP 発現を認める遺伝子導入法を確立することができた。一方、阻害剤を用いた実験の結果から、MKK1 を介した信号が正の選択に、p38 キナーゼを介した信号が負の選択に、それぞれ特異的に関与することが示唆されたので、MAP キナーゼ分子群を GFP とともに発現する組換えウイルスを作製して幼若Tリンパ球へ導入した。その結果、幼若Tリンパ球に活性化型 MKK1 を発現させると正の選択誘導信号が代替されて成熟Tリンパ球様細胞が出現し、p38 活性化酵素 MKK6 を過剰発現させると負の選択誘導信号が代替されて幼若Tリンパ球が著しく減少した。

これらの結果より、MKK1→ERK キナーゼ経路の活性化は正の選択誘導をもたらし、一方、MKK6→p38 キナーゼ経路の活性化は負の選択誘導をもたらすことが明らかになり、正と負の選択には異なる MAP キナーゼ経路による信号が介在することが示された。最近更に、MKK1 および MKK6 をそれぞれ活性化するキナーゼ Raf-1 および ASK1 の選択的活性化が正と負の選択誘導に部分的に関与することを明らかにした。これらの成果は、正と負の選択を担う信号伝達経路の違いを初めて明らかにしたものであり、Tリンパ球の「自己・非自己の識別」を支える分子機構の理解、その破綻による病態の理解、そしてそれら免疫病の修復に向けた治療法の開発に有用と考えられる。また、開発した幼若Tリンパ球への遺伝子導入法は、治療用ベクターへの後天的免疫寛容を誘導することによってベクター排除応答を抑制することを可能にし、遺伝子治療の持続性改善に役立つと考えられる。

ところでTリンパ球分化の際には、幼若Tリンパ球の胸腺移住、正の選択に伴う皮質から髄質への胸腺内移動、成熟Tリンパ球の胸腺移出と、ダイナミックな細胞移動を伴う。しかしこれら細胞移動がどのように制御され、どのようにTリンパ球の分化・選択に寄与しているのか不明である。そこで本研究では、幼若Tリンパ球の胸腺での細胞移動を直接顕微鏡下の映像として追跡するため、低倍率倒立顕微鏡ステージ上での高酸素分圧液層コラーゲン埋包器官培養法を開発した。これにデジタルCCDカメラを介した映像の自動経時的記録技

術を組み合わせ、既に成熟Tリンパ球の胸腺移出に細胞遊走因子 CC ケモカインのひとつ ELC (Epstein Barr virus-induced molecule 1-ligand chemokine) が関与することを明らかにした。現在さらに、幼若Tリンパ球の位置識別と移動の分子機構、特に移動の正負選択への関与について解析を進めている。これらの成果は、Tリンパ球の生体内制御を目指す医療応用に重要な知見を提供すると考えられる。

このように本研究では、従来困難とされてきた幼若Tリンパ球への体細胞遺伝子導入法や細胞移動可視化胸腺器官培養法の開発に成功し、胸腺内でのTリンパ球の生死運命選択や移動を担う分子機構の解明に大きな一歩を踏み出すことができた。今後これら新技術を用いた解析を更に推進することによって、胸腺Tリンパ球の生死分岐と位置移動において細胞運命の分岐を支配する分子シグナルの解明をめざしたい。今後の成果は、自己免疫疾患や免疫不全症さらにはアレルギー疾患を含めた免疫病に対して根本的な治療法を提供すると考えられる。

5. 領域総括の見解

本研究は、胸腺内における有用/有害リンパ球の分化選択機構の解明が目的である。この間、胸腺内へのDNA導入技術を研究し、上記のTリンパ球の分化選択には異なるMAPキナーゼ信号伝達系が関与することを見出している。また培養中の胸腺細胞の顕微鏡下での追跡観察技術の研究により、幼若リンパ球の胸腺への移住、胸腺内移動、あるいはTリンパ球の胸腺移出機構の解析にも進んでいる。これらの成果は、後天的免疫寛容の獲得法など、生体内Tリンパ球制御に重要な糸口を見出し、新しい医療技術の開発に大きく貢献することが期待される。

6. 主な論文

- Sugawara, T., Di Bartolo, V., Miyazaki, T., Nakauchi, H., Acuto, O. and Takahama, Y. An improved retroviral gene transfer technique demonstrates inhibition of CD4-CD8⁺ thymocyte development by kinase-inactive ZAP-70. *J. Immunol.* 161, 2888-2894, 1998.
- Tokoro, Y., Sugawara, T., Yaginuma, H., Nakauchi, H., Terhorst, C., Wang, B. and Takahama, Y. A mouse carrying genetic defect in the choice between T and B lymphocytes. *J. Immunol.* 161, 4591-4598, 1998.
- Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., and Takahama, Y. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9, 565-574, 1998.
- Apostolou, I., Takahama, Y., Belmont, C., Kawano, T., Huerre, M., Marchal, G., Cui, J., Taniguchi, M., Nakauchi, H., Fournie, J. J., Kourilsky, P. and Gachelin, G. Murine natural killer T cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5141-5146, 1999.
- Kaneta, M., Osawa, M., Osawa, M., Sudo, K., Nakauchi, H., Farr, A. and Takahama, Y. A role for Pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J. Immunol.* 164, 256-264, 2000.

7. その他

- ・招待講演8件、うち 国内5件 海外3件
- ・受賞1件 『Tリンパ球の分化機構の研究』平成12年度 日本免疫学会賞
- ・特許2件
 - ①『Composition pharmaceutique comprenant des cellules NKT actives par des PIM et son utilisation en therapie』1999年 国外(フランス)
 - ②『後天的免疫寛容の獲得方法』1999年 国内および国外(米国、カナダ、EP)