

免疫系発生研究チーム

Laboratory for Immune-system Development

チームリーダー 高 浜 洋 介

TAKAHAMA, Yousuke

免疫系の発生過程には、自己攻撃性細胞の排除を含む認識レパトリア形成や、複数器官間の血球細胞移動など、精緻でダイナミックな細胞分化制御が内包されている。当研究チームは、免疫担当細胞とその分化支持器官の形成と維持の機構解明を目指している。現在、免疫応答の制御に中心的役割を果たす T リンパ球の胸腺分化過程を対象に、主に下記のプログラムについて研究を進めている。

1. 胸腺分化に必要な幼若 T リンパ球移動機構の解析 (高浜, 上野, 戸村, 斉藤, 榎本*)

T リンパ球分化には、前駆細胞の胸腺への移住、レパトリア選択と連動した皮質から髄質への胸腺内移動、そして成熟 T リンパ球の胸腺外循環への移動といった細胞移動制御が必須である。しかしそれら細胞移動を制御する分子機構は殆ど不明である。そこで我々は、マウス胎仔胸腺器官をリアルタイムで観察する技術を開発することで、胸腺からの T リンパ球移出を制御する分子機構を解析している。これまでの解析の結果、ケモカインの 1 つ CCL19 が成熟 T リンパ球の胸腺移出を著明に引き起こすことを見いだした。一方、CCL19 受容体 CCR7 のノックアウトマウスを用いて、新生仔期における胸腺および脾臓の T リンパ球数を調べたところ、ノックアウトマウスでは同日齢のコントロールマウスに比べて脾臓 T 細胞数の著明な減少と胸腺 T 細胞数の有意な増加が観察された。脾臓 T 細胞数の減少は白色髄ばかりでなく、開放循環系に属すると考えられている赤色髄でも観察されたことから、胸腺から血流循環への T リンパ球放出に不全があると考えられた。しかしながら、成体 CCR7 ノックアウトマウスでは脾臓 T 細胞の減少はみられず、新生仔期に優位の CCR7 依存性の胸腺外移出機構の他に、CCR7 非依存性の胸腺外移出機構の存在も示された。また、正常マウス胸腺内での CCL19 の発現を *in situ* hybridization 法および免疫染色共焦点法にて解析した結果、CCL19 は主に髄質の上皮細胞によって産生され、CCL19 タンパクは皮質よりも主に髄質に存在し、髄質内では上皮細胞のみならず血管内皮細胞や血管周囲間充細胞に多く存在していることが明らかになった。また、ヒト胸腺においても髄質および血管内皮での CCL19 の発現が観察された。以上の結果から、CCR7 およびそのリガンドは新生仔胸腺にて成熟した T リンパ球が胸腺外へと移出するために主要な機能分子であることが示された。また、CCR7 リガンドは髄質の血管内皮や血管周囲間充細胞に成熟 T リンパ球を誘引することで胸腺移出に関与する可能性が示唆された。加えて、CCR7 に依存しない成熟 T リンパ球の胸腺外移出機構の存在も示された。現在更に、生きた胸腺器官内での T リンパ球の動態を直接可視化する方法を開発して器官内での分化に伴う T リンパ球移動機構の解析を進めている。

2. 胸腺分化を制御する分子シグナルの解析 (高浜, 富田, 中瀬, 中川, 大東, 北濱, Gunawardane*, Talukder*, 清家*)

正の選択を引き起こすシグナル伝達機構を網羅的に解明するために、HY-TCR や AND-TCR といった TCR トランスジェニックマウスシステムにて、正の選択・負の選択・無の選択のそれぞれがみられる遺伝的背景のマウスを作製し、 $CD^{4+}CD^{8+}$ 胸腺細胞を単離して RNA を調製し、マイクローレイ法によって遺伝子発現解析を行った。得られた結果より、特に正の選択が引き起こされる $CD^{4+}CD^{8+}$ 胸腺細胞のみで再現よく高い発現がみられるいくつかの遺伝子を抽出した。それらの遺伝子を対象に改めて RT-PCR 法により発現解析を行ったところ、少なくとも 3 つの新規遺伝子について、T リンパ球系列に特異的に発現される遺伝子であるとともに、正の選択プロセスに特異的に発現される遺伝子であることが分かった。現在、遺伝子の強制発現系、ノックアウトマウスの作製、予測される遺伝子産物に対する抗体の作製を進めることによって、これら T リンパ球特異的遺伝子の機能解析を進めている。

3. 胸腺器官形成変異体の作製 (高浜, 岩波, 武井, 李*)

T リンパ球分化を支持する胸腺器官の構築に必須な遺伝子群を同定するため、エチルニトロソウレアによりランダムに誘発した突然変異を持つメダカ胚を作成し、rag1 プロンプを用いた whole-mount *in situ* hybridization により胸腺形成変異体の系統的スクリーニングを行った (ERATO 近藤誘導分化プロジェクトとの共同研究)。538 の F2 ファミリーをスクリーニングすることにより、胸腺形成に異常を示す 26 変異体を系統化した。これまでに、鰓弓形成に異常がある 11 の変異体とともに、鰓弓構造はほぼ正常ながら胸腺形成に異常を示す 11 の変異体を同定した。現在、作製した胸腺形成変異メダカの同定作業と相補性試験によるグループ化を進めるとともに、胸腺形成に特異性の高い変異体を対象に、異なる系統との間での F2 作製と DNA 多型解析によるポジショナルクローニング法を用いて、原因ゲノム領域の同定作業を開始している。

* 非常勤研究員

This laboratory aims to unveil mechanisms that are essential for establishing the immune system. We are interested in understanding molecular programs that control development of T lymphocytes and that form and maintain a functionally competent thymus organ.

(1) To this goal, we have established an experimental method that allows us to directly visualize the move-

ments of developing lymphocytes in the thymus. By using this method, we have found that CCR7-ligand chemokine CCL19 attracted mature T cells out of a fetal thymus organ culture, and that neonatal appearance of circulating T cells was defective in CCR7-deficient mice, indicating that the CCR7-dependent pathway of thymic emigration represents a major pathway for neonatal T cell export.

(2) In order to identify molecules that critically regulate T cell development and selection, a microarray analysis has been carried out comparing immature CD⁴⁺CD⁸⁺ thymocytes derived from positive selectors and null-selectors of TCR-transgenic mice. We have identified at least three genes that encode new classes of signaling molecules showing selectively increased expression upon positive selection. In vivo functions of these genes are currently analyzed using enforced expression and gene targeting as well as antibody preparation for gene products.

(3) A genome-wide mutagenesis cohort of the Medaka fish has been screened for athymic mutants, employing a rag1 gene probe in order to examine molecular signals that specify the development of the thymus. In a screen of 538 F2 families, 26 mutations with no or low rag1 expression were identified. 11 out of these 26 mutations affect the development of pharyngeal arches. Another 11 mutations show almost normal development of pharyngeal arches in spite of the defect in rag1 expression, suggesting abnormality in later stages of thymus development. Further analysis of these mutations will help to genetically dissect the regulatory steps of thymus organogenesis.

A better understanding of T cell development and thymus organogenesis will assist in developing strategies to control immune diseases including autoimmune diseases and allergies.

Research Subjects and Members of Laboratory for Immune-system Development

1. Molecular mechanisms that regulate the movements of developing T lymphocytes
2. Molecular mechanisms that regulate the development of T lymphocytes
3. Preparation and analysis of Medaka fish mutants of the thymus organogenesis

Laboratory Head

Dr. Yousuke TAKAHAMA

Research Scientist

Dr. Norimasa IWANAMI
Dr. Ryusuke NAKAGAWA
Dr. Hiroshi NAKASE
Dr. Shuhei TOMITA
Dr. Michio TOMURA
Dr. Tomoo UENO

Technical Staff

Ms. Yuki KITAHAMA
Ms. Izumi OHIGASHI
Ms. Fumi SAITO
Ms. Rie TAKEI

Visiting Members

Mr. Lalith GUNAWARDANE (Univ. Tokushima)
Ms. Jie LI (Univ. Tokushima)
Ms. Naoko MASUMOTO (Univ. Tokushima)
Mr. Takashi SEIKE (Univ. Tokushima)
Mr. Sadiqur TALUKDER (Univ. Tokushima)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文

Akamatsu Y., Monroe R., Dudley D. D., Elkin S. K., Gartner F., Talukder M. R., Takahama Y., Alt F. W., Bassing C. H., and Oettinger M. A.: "Deletion of the RAG2 C terminus leads to impaired lymphoid development in mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1209–1214 (2003). *

(総 説)

上野智雄, 高浜洋介: "T 細胞胸腺分化の可視化", *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 2172–2175 (2002).

高浜洋介: "中枢性トレランスのメカニズム", *別冊・医学のあゆみ 免疫疾患* Ver. 2, pp. 213–214 (2002).

高浜洋介: "リンパ球の正の選択とアポトーシス回避: T 細胞", *臨床免疫* **38**, Suppl. 20, pp. 182–187 (2002).

上野智雄, 高浜洋介: "胸腺リンパ球の移動とケモカイン", *臨床免疫* **38**, 341–346 (2002).

戸村道夫, 高浜洋介: "胸腺内 T 細胞分化に伴う細胞移動の分子メカニズム", *炎症と免疫* **11**, 183–191 (2003).

新田剛, 高浜洋介: "中枢性免疫寛容の分子機序: 自己寛容の成立に関する分子機序", *分子細胞治療* **2**, 99–103 (2003).

新田剛, 高浜洋介: "T 細胞選択を制御する分子シグナル", *臨床免疫* **39**, 201–208 (2003).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nakase H., Takahama Y., and Akamatsu Y.: "Direct and indirect effects of RSS methylation onto RAG1/2 activities", 2002 FASEB Summer Research Conf., Snowmass, USA, June (2002).

Furutani-Saiki M., Suwa H., Niwa K., Sasado T., Morinaga C., Yasuoka A., Deguchi T., Hirose Y., Yoda H., Iwanami N., Kunimatsu S., Takahama Y., Abe K., Tanaka M., Wittbrodt J., and Kondoh H.: "A genome-wide screen for mutations affecting embryo patterning in medaka, *oryzias latipes*", 5th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, June (2002).

Iwanami N., Kunimatsu S., Takahama Y., Suwa H., Niwa K., Sasado T., Morinaga C., Yasuoka A., Deguchi T., Hirose Y., Yoda H., Kondoh H., and Furutani-Seiki M.: "Thymus organogenesis mutants of medaka, *oryzias latipes*", 5th Int. Conf. on Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, June (2002).

Takahama Y., Tomura M., and Ueno T.: "Visualizing developing T cells in the thymus", *Int. Symp. on Regulation of Immune Response in Health and Disease*, (MEXT

- and RIKEN), Osaka, Feb. (2003).
(国内会議)
- 高浜洋介: “免疫学の最近の動向”, 文科学技術政策研究所講演会, 東京, 6 月 (2002).
- 岩波礼将, 国松早苗, 武井里絵, 高浜洋介, 諏訪寛, 丹羽勝利, 笹土隆雄, 森永千佳子, 安岡顕人, 出口友則, 広瀬行洋, 依田宏樹, 近藤寿人, 古谷-清木誠: “胸腺の発生異常を示すメダカ変異体”, 第 8 回小型魚類研究会, 三島, 8 月 (2002).
- 新田剛, Nasreen M., 菅野雅元, 上野智雄, 高浜洋介: “胸腺 T 細胞分化における IAN-4 の役割”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- Talukder M. R., Dudley D. D., Alt F. W., Ottinger M. A., 高浜洋介, 赤松謙子: “Abnormal junctions of V(D) rearrangement in RAG2 core knock-in mice”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 中瀬博, 高浜洋介, 赤松謙子: “組み換えシグナル配列のメチル化が RAG1/2 複合体の反応性に与える影響”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 富田修平, 上野正樹, 阪本昌美, 植木正明, 影山龍一郎, 上田夏生, Frank G. J., 高浜洋介: “神経系特異的 Hypoxia Inducible Factor-1 α 遺伝子欠損による脳組織構築異常”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 岩波礼将, 高浜洋介, 国松早苗, 武井里絵, 諏訪寛, 丹羽勝利, 笹土隆雄, 森永千佳子, 安岡顕人, 出口友則, 広瀬行洋, 依田宏樹, 近藤寿人, 古谷-清木誠: “胸腺の発生異常を示すメダカ変異体”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).
- 国松早苗, 岩波礼将, 高浜洋介, 大橋眞, 近藤寿人, 古谷-清木誠: “胸腺の形成異常を示すメダカ変異体の解析”, 第 109 回徳島生物学会, 鳴門, 12 月 (2002).
- 上野智雄, 斉藤ふみ, 久瀬幸代, Hopken U., Lipp M., 中野英樹, 垣内史堂, 高浜洋介: “胸腺内 T リンパ球の皮質から髄質への移動における CCR7 の関与”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- Mariam N., 高浜洋介: “Anti-TCR antibody restores the generation of CD4 single positive T cells and the medullary environment in classII MHC-deficient mice *in vivo*”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 高浜洋介, 上野智雄, 戸村道夫: “Cell migration during t lymphocyte development”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 劉村蘭, Sheard M. A., 高浜洋介: “Differential apoptosis sensitivity in CD4 $\alpha^2 + \beta^2$ - and CD4 α^2 - CD8 $\alpha^2 + \beta^2$ thymocyte subsets correlates with maturity”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 国松早苗, 岩波礼将, 武井里絵, 高浜洋介, 古谷-清木誠: “胸腺の形成異常を示すメダカ変異体の解体”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 戸村道夫, 臼井健司, 上野智雄, 高浜洋介: “胸腺内 T 細胞移動の real time 可視化評価”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 中瀬博, 高浜洋介, 赤松謙子: “組み換えシグナル配列のメチル化による RAG1/2 活性制御”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 久瀬幸代, 劉村蘭, 上野智雄, 高浜洋介: “胸腺器官移入能を示す T 前駆細胞の可視化同定”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 前川真一, 中瀬博, 土肥圭子, 富田修平, 伊永隆史, 高浜洋介: “ディーゼル排気微粒子による免疫系攪乱作用の胸腺退縮による評価”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).
- 新田剛, 山岡昇司, 高浜洋介: “レトロウイルスベクターを用いた胸腺 DP 細胞への遺伝子導入法”, 第 32 回日本免疫学会, 東京, 12 月 (2002).