

課題番号6

加齢に伴う免疫不全のメカニズム解析 ～サイトカイン分泌異常マウスをモデルとして～

[1] 組織

代表者：竹馬 俊介
(京都大学大学院医学系研究科)
対応者：小笠原 康悦
(東北大学加齢医学研究所)

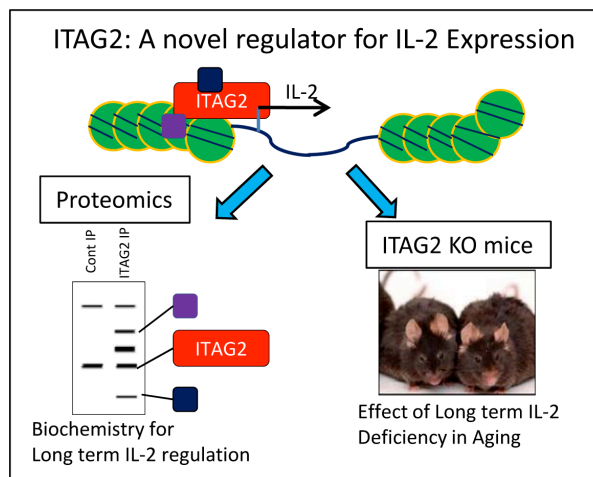
研究費：物件費 74 万 1 千円，旅費 5 万 9 千円

[2] 研究経過

加齢にともない、自己、非自己の認識の緩みによる自己反応性T細胞の出現や、免疫応答性の低下など種々の免疫異常が起こることが知られている。慢性関節リウマチに代表される自己免疫疾患は、高齢者に多発し、胸腺でのT細胞選択能の低下による自己反応性T細胞の出現、および、**抹消でのT細胞異常**、と密接に関係している。

申請者はこれまで、加齢にともなって自己免疫疾患を自然発症するPD-1遺伝子欠損マウスの解析から、**抹消T細胞のIL-2産生が自己免疫疾患に深くかかわっている**ことを明らかにしてきた。生体内で、IL-2が過剰に発現すると、自己反応性T細胞の不応答性が解かれ、自己免疫疾患の原因となり得る。逆に、IL-2の分泌不全は制御性T細胞の機能不全を起し、同じく自己免疫疾患の発症につながることを示されている。そこで、加齢による自己免疫疾患にもIL-2の調節不全が関わっていると考えた。

一過性のIL-2発現には、T細胞レセプターによって活性化される生化学的カスケードが詳細に解析されているが、核内でIL-2の転写を長期にわたって調節する因子はよく分かっていない。代表者はこの点に着目し、今までのスクリーニング実験により、IL-2の発現制御因子として、核内タンパク質であるITAG2分子を新規に同定した。当研究では、申請者が独自に作成した、**ITAG2遺伝子欠損マウス**を用いて、加齢変化に伴う**T細胞異常をIL-2産生機構の観点から追究**することを目的とする。



以下、研究活動状況の概要を記す。

本研究を遂行する上で研究打ち合わせを、平成 22 年 6 月 1 日に、加齢研にて行った。In vivo での解析を主に行う代表者が加齢研へ外向し、対応者である小笠原 康悦博士との間で、これまでの研究経過、およびプロジェクトの方向性について討論した。また、生化学的解析を委託する、加齢研、菅野 新一郎博士と、タンパク質相互作用の解析方法などについて討論した。タンパク質相互作用研究の専門家である菅野博士からは、当初予定していたプロテオミクス解析の打ち合わせのみならず、当研究に関して、最新の方法論の応用などの提案を受けることができ、たいへん有意義な会合を持つことができた。

[3] 成果 (以下10.5ポイント)

(3-1) 研究成果

- 1) T細胞におけるITAG-2の機能を解析するため、ITAG-2の機能エクソンを、大腸菌由来Lox配列で挟み込んだマウス(ITAG-2 Lox)を、リンパ球キナーゼプロモーターCREトランスジェニックマウス(Lck-CRE)に交配し、コンディショナルノックアウトマウスを作製した。コンディショナルノックアウトマウスでは、胸腺でのT細胞成熟には異常がなかったが、末梢T細胞数の減少がみられた。これらのT細胞は、試験管内での刺激で、初期のIL-2産生は正常

に起こるものの、刺激18時間以降の IL-2 産生が大幅に阻害されていた。よって、ITAG2 が、予想通り IL-2 の調節を行うことがわかった。また、クロマチン免疫沈降法によって、ITAG2 が IL-2 遺伝子と核内で相互作用することがわかった。

- 2) ITAG-2 コンディショナルノックアウトマウスを、6か月程度飼育することにより、半数程度のマウスが、リンパ球数の増加にともなうリンパ組織の肥大を起こし、さらに一割程度のマウスが、炎症性腸炎様の症状を示すことがわかった。この表現形が、当初考えていた IL-2 不全のみで説明できるのか、または別の異常によるものなのか興味深く、引き続き個体数を増やして解析中である。
- 3) ITAG-2 の会合分子を探索する目的で、プロテオミクス解析を行った。具体的には野生型、および ITAG2KO マウスの T 細胞より、核抽出液を調整し、ITAG2 抗血清にて免疫沈降を行った。これを2次元電気泳動に供し、銀染色を行った。KO マウス由来のサンプルを **negative control** とし、野生型にのみ現れる **spot** を複数同定した。これらのスポットを、マススペクトロメトリー解析に供し、会合分子を同定した。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、新規の IL-2 制御因子である ITAG2 の機能を、免疫学的、および生化学的に明らかにしようとするものである。IL-2 は、MHC 遺伝子と並ん

で、老化に伴う自己免疫疾患発症の原因として重要視されているが、長期にわたって、IL-2 遺伝子の発現がどのように制御されているかは明らかでない。ITAG2 は、当研究での解析から IL-2 遺伝子と直接相互作用する **epigenetic** 因子であることが予想され、この会合分子を同定できたことで、IL-2 の制御機構がより一層明らかにできることが期待される。ITAG2 会合因子については、引き続き探索し、すでにわかったものについては ITAG2 との会合様式を決定する予定である。

ITAG2KO マウスは IL-2 のみならず、末梢 T 細胞数の維持にも重要である可能性があり、これらを調節する他の免疫遺伝子の発現もコントロールすると考えている。当該マウスの表現形をさらに詳しく解析することで、老化に伴う免疫不全や自己免疫疾患の発症機構をさらに明らかにすることができると考えている。

[4] 成果資料 (以下10.5ポイント)

該当なし