

東北医科薬科大学  
審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	トシマ カル 豊島 かおる（宮城県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博薬科第 14 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	T 細胞の分化におけるスフィンゴミエリンの発現と その機能的役割
論文審査委員	主査 教授 高橋 知子
	副査 教授 顧 建国
	副査 教授 井ノ口 仁一

T細胞の分化における  
スフィンゴミエリンの発現とその機能的役割

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

機能病態分子学教室

豊島 かおる



## 目次

略語 .....	1
緒言 .....	2
第 1 章 マウス胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴミエリン発現 .....	4
第 1 節 序論 .....	4
第 1 項 胸腺細胞分化の概略 .....	4
第 2 項 スフィンゴミエリンの生合成 .....	4
第 3 項 スフィンゴミエリンを認識する 2 種類のタンパク毒素 .....	5
第 2 節 実験材料ならびに実験方法 .....	5
第 1 項 実験材料 .....	5
第 2 項 実験装置 .....	6
第 3 項 試薬 .....	6
第 4 項 実験動物 .....	8
第 5 項 実験動物からの胸腺細胞の採取 .....	8
第 6 項 薄層クロマトグラフィーによる胸腺細胞の脂質解析 .....	8
6-1 総脂質抽出 .....	8
6-2 陰イオン交換クロマトグラフィーによる脂質の分画 .....	9
6-3 アルカリメタノリシス .....	9
6-4 脱塩 .....	9
6-5 タンパク質の定量 .....	9
6-6 スフィンゴ脂質解析 .....	10
第 7 項 スフィンゴミエリン結合性タンパクの精製 .....	10
7-1 コンストラクト .....	10
7-2 pQE30/His6-EGFP-NT-Lys の大腸菌 JM109 への形質転換および培養 .....	11
7-3 pET28/EqtII (8-69) -EGFP-His6 の大腸菌 BL-21 (DE3)への形質転換および培養 ..	11
7-4 大腸菌による EGFP-NT-Lys および EqtII-EGFP の前培養 .....	11
7-5 カラムを用いた EGFP-NT-Lys および EqtII-EGFP の精製 .....	12
第 8 項 FACS 解析による胸腺細胞の分化段階の分類 .....	13
第 9 項 FACS 解析による細胞膜脂質の検出 .....	13
第 10 項 胸腺の組織染色 .....	14
10-1 胸腺組織切片の作製 .....	14
10-2 組織切片の HE 染色 .....	14

10-3 胸腺組織切片のライセニン染色.....	14
第 11 項 半定量 PCR 解析.....	15
第 12 項 定量 PCR 解析.....	16
12-1 胸腺細胞のソーティング.....	16
12-2 定量 PCR 解析.....	17
第 13 項 DNA マイクロアレイ解析.....	17
第 14 項 統計処理.....	18
第 3 節 実験結果.....	18
第 1 項 マウスの胸腺細胞におけるスフィンゴミエリン発現.....	18
第 2 項 胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴミエリン以外のマイクロドメイン構成脂質発現の解析.....	20
第 3 項 SMS 遺伝子の発現解析.....	21
考察.....	23
第 2 章 SMSI 欠損マウスの胸腺細胞分化におけるスフィンゴミエリン発現の解析.....	38
第 1 節 序論.....	38
第 2 節 実験材料ならびに実験方法.....	39
第 1 項 実験材料.....	39
第 2 項 実験装置.....	39
第 3 項 試薬.....	39
第 4 項 実験動物.....	39
第 5 項 PCR 法を用いた遺伝子型分析.....	39
第 6 項 実験動物からの胸腺細胞の採取.....	40
第 7 項 細胞表面スフィンゴミエリンの検出.....	41
第 8 項 胸腺細胞, 血清の脂質解析.....	41
第 9 項 FACS による細胞表面脂質の検出.....	41
第 10 項 統計処理.....	42
第 3 節 実験結果.....	42
第 1 項 SMSI 欠損マウスの胸腺細胞のスフィンゴミエリン発現.....	42
第 2 項 SMSI 欠損による胸腺細胞の脂質発現変化の解析.....	42
考察.....	43
第 3 章 胸腺細胞分化におけるスフィンゴミエリン発現の機能的意義の解析.....	46
第 1 節 序論.....	47
第 1 項 胸腺細胞分化の生理学的意義.....	47
第 2 項 正負の選択.....	47
第 3 項 正負の選択の免疫学的解析方法.....	48

第2節 実験材料ならびに実験方法.....	49
第1項 実験材料.....	49
第2項 実験装置.....	49
第3項 試薬.....	49
第4項 実験動物.....	50
第5項 PCR法を用いた遺伝子型分析.....	50
第6項 FACS解析を用いたトランスジェニックマウスの遺伝子導入率の確認.....	50
6-1 HY TCRトランスジェニックマウス.....	50
6-2 OT-I TCRトランスジェニックマウス.....	50
第7項 実験動物からの胸腺細胞の採取.....	51
第8項 胸腺細胞表面マーカーの染色.....	51
第9項 統計処理.....	51
第3節 実験結果.....	51
第1項 SMSI欠損マウスの胸腺細胞分化の解析.....	51
第2項 SMSI欠損による正の選択への影響.....	52
第3項 SMSI欠損による負の選択への影響.....	53
考察.....	54
第4章 SMSI欠損によるTCRシグナル強度の変化.....	63
第1節 序論.....	63
第2節 実験材料ならびに実験方法.....	63
第1項 実験材料.....	63
第2項 実験装置.....	64
第3項 試薬.....	64
第4項 実験動物.....	64
第5項 胸腺細胞のアポトーシス誘導およびアポトーシスの検出.....	65
5-1 抗CD3抗体の腹腔内投与による胸腺細胞のアポトーシスの誘導.....	65
5-2 <i>in vitro</i> での胸腺細胞のアポトーシスの誘導.....	65
5-3 アポトーシスの検出.....	65
第6項 TCR刺激後のZAP-70リン酸化.....	66
第7項 ウェスタンブロッティングによる細胞内シグナル伝達分子の検出.....	66
7-1 胸腺細胞のTCR刺激および可溶化.....	66
7-2 SDS-PAGE.....	67
7-3 ウェスタンブロッティング.....	67
第8項 TCR刺激後のNur77発現.....	67
第9項 TCR刺激後のCD5発現.....	68
第10項 統計処理.....	68

第3節 実験結果.....	68
第1項 抗 CD3 抗体の腹腔内投与による胸腺細胞のアポトーシスの誘導.....	68
第2項 <i>in vitro</i> での胸腺細胞のアポトーシス誘導.....	69
第3項 負の選択に関わるシグナル伝達分子の検出.....	70
第3項 スフィンゴミエリン添加条件下におけるコントロール胸腺細胞の TCR 刺激に対するアポトーシスの解析.....	71
考察.....	72
第5章 Jurkat 細胞を用いたスフィンゴミエリンマイクロドメインの機能解析.....	83
第1節 序論.....	83
第2節 実験材料ならびに実験方法.....	84
第1項 実験材料.....	84
第2項 実験装置.....	84
第3項 試薬.....	84
第4項 細胞.....	84
第5項 細胞培養.....	85
第6項 CRISPR/Cas9 システムを用いた <i>SMS1</i> 遺伝子変異 Jurkat 細胞の樹立.....	85
6-1 ガイドオリゴの設計.....	85
6-2 <i>SMS1</i> 変異 Jurkat 細胞の樹立.....	85
第7項 大腸菌の形質転換および培養.....	86
第8項 アルカリミニプレップ法によるプラスミド DNA の抽出.....	86
第9項 ヒト <i>SMS1</i> 遺伝子のクローニングおよび <i>SMS1</i> 遺伝子再構成細胞の樹立.....	87
9-1 pGEM-T Easy vector へのクローニング.....	87
9-2 pENTR-D-TOPO vector へのクローニング.....	87
9-3 CSII-CMV-RfA vector へのクローニング.....	88
9-4 レンチウイルス調製法.....	88
9-5 レンチウイルス感染による遺伝子導入.....	89
第10項 TLC による脂質解析.....	89
第11項 FACS による細胞表面脂質の検出.....	89
第12項 TCR 刺激後の ZAP-70 リン酸化.....	90
第13項 TCR 刺激後の細胞内 $Ca^{2+}$ 応答の測定.....	90
第14項 TCR 刺激後の T 細胞活性化マーカー CD69 発現量.....	90
第15項 統計処理.....	91
第3節 実験結果.....	91
第1項 <i>SMS1</i> 変異および <i>GlcCerS</i> 変異導入 Jurkat 細胞におけるスフィンゴ脂質の発現.....	91
第2項 <i>SMS1</i> 変異および <i>GlcCerS</i> 変異導入 Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達.....	93
第3項 <i>SMS1</i> 遺伝子再構成 <i>SMS1</i> 変異 Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達.....	95

考察.....	96
結論・総括.....	108
謝辞.....	112
引用文献.....	113

## 略語

BCA	bicinchoninic-acid
BCP	1-bromo-3-chloropropane
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CTx-B	cholera toxin B subunit
DN	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> double negative
DP	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> double positive
D-PDMP	D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholio-1-propanol
D609	tricyclodecan-9-yl-xanthogenate
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EqtII	equinatoxin II
ERK5	extracellular signal-regulated kinase 5
FBS	fetal bovine serum
HBSS	hanks' balanced salt solution
HE	hematoxylin and eosin
Ig	immunoglobulin
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside
Lys	lysenin
MβCD	methyl-β-cyclodextrin
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PI	propidium Iodide
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SMS	sphingomyelin synthase
SP	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> single positive
TCR	T cell antigen receptor
TLC	thin-layer chromatography
2ME	2-mercaptoethanol
7-AAD	7-amino-actinomycinD

## 緒言

T 細胞は細胞性免疫の中心的役割を担うリンパ球の一群である。T 細胞は胸腺において多段階の生存・増殖・分化イベントを経て、末梢組織へ移出して免疫反応を担う<sup>1,2</sup>。なかでも“正負の選択”は T 細胞が自己寛容性を獲得する上で最も重要な分化イベントである<sup>3</sup>。正負の選択をはじめとする様々な分化段階は、T 細胞抗原受容体(T cell antigen receptor: TCR)などの膜受容体によって誘導されるシグナル伝達の強度によって制御される。これまでの研究で、TCR が形質膜上の“脂質ラフト”と呼ばれる特異的な脂質マイクロドメイン領域に移行することが T 細胞の活性化の開始に関与することが示されている<sup>4</sup>。脂質マイクロドメイン構造は未熟 T 細胞(胸腺細胞)、末梢 T 細胞いずれにおいても TCR の下流のシグナル伝達物質が局在し、適切な TCR シグナル伝達を行う上で重要な役割を果たす<sup>5,6</sup>。

K. Simons と E. Ikonen によって提唱された“脂質ラフト”という用語は、コレステロールとスフィンゴ脂質(スフィンゴ糖脂質(glycosphingolipids, GSL)とスフィンゴミエリンを含む)で構成された脂質マイクロドメインにシグナル伝達分子が局在した、界面活性剤不溶性膜画分として定義された<sup>7,8</sup>。それから 20 年以上にわたって、脂質マイクロドメインの研究はガングリオシド(シアル酸を構成糖にもつ GSL の一群)が形成するマイクロドメインを中心に進められてきた。なぜならガングリオシド GM1 と extended-GM1b を含む脂質マイクロドメインは、これらに特異的に結合するコレラトキシン B サブユニット(cholera toxin B subunit, CTx-B)を用いることによって高感度かつ簡便に検出可能であったからである。胸腺細胞および末梢 T 細胞における CTx-B 結合性ガングリオシドのマイクロドメインの機能は古くからよく研究されてきた<sup>9,10</sup>。しかしながら、胸腺細胞は末梢 CD4, CD8T 細胞に比べて GSL の発現が非常に少ないことや GM1 と extended-GM1b は胸腺細胞におけるガングリオシド分子種の中でも少量であることから、胸腺細胞における脂質マイクロドメインの生理的意義はいまだ未解明である<sup>11</sup>。

また近年では個々のスフィンゴ脂質分子種は GM1-マイクロドメイン, GM3-マイクロドメイン, スフィンゴミエリンマイクロドメインのように別々にマイクロドメインを形成し, それらは形質膜上でオーバーラップしないと考えられている<sup>12</sup>. GSL の一種であるラクトシルセラミドが形成するマイクロドメインはインテグリン CD11b/CD18 を介した好中球の貪食作用や *Candida albicans* 由来の  $\beta$ -グルカンによって誘導される走化作用に直接関与するとの報告もある<sup>13,14</sup>. スフィンゴミエリンは哺乳類細胞の形質膜上に最も多く存在するスフィンゴ脂質であり, これまでにヘルパーT細胞の TCR 依存性の活性化に重要であることが報告されているが<sup>15</sup>, 複雑な胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴミエリン発現およびその機能的意義はほとんど解明されていない.

そこで本研究では T 細胞の分化におけるスフィンゴミエリンマイクロドメインの機能解明を試みた. はじめにマウスの胸腺細胞の一連の分化段階においてスフィンゴミエリン発現量がどのように調節されているかを理解するため, 第 1 章では 2 種類のスフィンゴミエリン結合性タンパク毒素を用いて野生型マウスの胸腺細胞の一連の分化過程におけるスフィンゴミエリン発現を解析した. 胸腺細胞の分化に伴い, スフィンゴミエリンマイクロドメインの発現量が大きく変動することを見出したため, スフィンゴミエリン合成酵素 1 (sphingomyelin synthase 1, SMS1) の欠損マウスを用いて次にその機能的意義を解析した. 第 2 章では SMS1 欠損マウスにおける胸腺細胞のスフィンゴミエリン発現および SMS1 の欠損によるスフィンゴ脂質発現パターンの変化を解析した. 第 3 章では正負の選択のモデルとなる TCR トランスジェニックマウスを用いて, SMS1 欠損による正負の選択への影響を解析し, 第 4 章では SMS1 欠損による胸腺細胞における TCR シグナル伝達強度の変化を解析した. さらに第 5 章において, ヒト白血病由来 T 細胞株の Jurkat 細胞に対し, SMS1 の変異を導入した細胞と GSL 合成の初発分子であるグルコシルセラミド合成酵素 (glucosylceramide synthase, GlcCerS) の変異導入細胞を作製し, TCR シグナル伝達における個々のスフィンゴ脂質分子種が形成するマイ

クロドメインの機能を比較検討した。

## 第 1 章 マウス胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴミエリン発現

### 第 1 節 序論

#### 第 1 項 胸腺細胞分化の概略

胸腺細胞の分化は、細胞膜表面分子である CD4 と CD8 の発現パターンを介して大きく 4 つの段階に分けられる (Fig. 1)<sup>1,16,17</sup>。初期分化段階は CD4 と CD8 をどちらも発現していないダブルネガティブ (DN) 段階と呼ばれ、さらに CD25 と c-Kit の発現パターンにより DN1 から DN4 の 4 段階に細分化される。DN3 段階では TCR を構成する  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のうち、 $\beta$  鎖の再構成が行われる。 $\beta$  鎖の再構成に成功した細胞は、次に CD4 と CD8 の両方を発現するダブルポジティブ (DP) 段階へ分化し、この段階で TCR の  $\alpha$  鎖の再構成が行われることで、初めて機能的な TCR が発現する。DP 段階で生じる正負の選択 (第 3 章第 1 節第 2 項参照) を経て、最終的にどちらか一方のみを発現する CD4 シングルポジティブ (CD4SP) 段階および CD8 シングルポジティブ (CD8SP) 段階へと成熟する。CD4SP 細胞、CD8SP 細胞は末梢組織において、それぞれヘルパー T 細胞、キラー T 細胞として様々な機能を果たす。

#### 第 2 項 スフィンゴミエリンの生合成

スフィンゴミエリンは 2 種類のスフィンゴミエリン合成酵素 (sphingomyelin synthase, SMS), SMS1 と SMS2 によってセラミドから合成される (Fig. 2)<sup>18</sup>。SMS1 はゴルジ体で *de novo* のスフィンゴミエリン合成を主に担うのに対し、SMS2 はゴルジ体の他に形質膜にも偏在しており、形質膜におけるスフィンゴミエリンとセラミドの交換反応に関与するとされる<sup>19,20</sup>。

### 第3項 スフィンゴリエリンを認識する2種類のタンパク毒素

スフィンゴリエリンは、哺乳細胞の形質膜に最も多く存在するスフィンゴ脂質である。スフィンゴリエリンは形質膜上でコレステロールとともにマイクロドメインを形成し、細胞膜上での受容体を介したシグナル伝達や脂質、タンパク質の相互作用の場として働くと考えられている。本研究では細胞膜上でマイクロドメインを形成したスフィンゴリエリンと分散したスフィンゴリエリンを区別して標識するため、存在形態によって結合性の異なる2種類のスフィンゴリエリン結合性タンパク毒素を用いた<sup>21</sup>。1つは *Eisenia fetida* (シマミズ) 由来のライセニン (lysenin, Lys), もう1つは *Actinia equita* (ウメボシイソギンチャク) 由来のエキナトキシン (equinatoxin II, EqtII) である。これら2つのタンパクは細胞膜上のスフィンゴリエリンを特異的に認識し、孔を形成することで溶血毒性を示すが、両者は認識するスフィンゴリエリンの存在形態が異なることが知られている。Lys は 5-6 分子でクラスター化したスフィンゴリエリン (スフィンゴリエリンマイクロドメイン) のみを認識するが、EqtII は分散したスフィンゴリエリンに結合する (Fig. 3A)<sup>22,23</sup>。

胸腺細胞の一連の分化過程におけるスフィンゴリエリン発現とその機能的意義を解析するため、第1章では野生型マウスの胸腺細胞を用いて、胸腺細胞の一連の分化過程におけるスフィンゴリエリン発現を解析した。スフィンゴリエリン発現の解析には Lys と EqtII をプローブに用いることで、スフィンゴリエリンの存在形態も含めた胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴリエリン発現を解析した。さらに野生型マウスの胸腺細胞におけるスフィンゴリエリン発現が SMS 遺伝子の発現の調節によって制御されているか否かを検討するため、胸腺細胞における SMS 遺伝子の発現解析を行った。

## 第2節 実験材料ならびに実験方法

### 第1項 実験材料

Ni Sepharose

(GE Healthcare)

Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device	(UFC803024, Millipore)
凍結組織切片作成用包埋剤	(O.C.T Compound, SAKURA)
TRI Reagent	(セパゾール RNA I Super G, nacalai tesque)
High Salt Precipitation Solution	(PS161, Molecular Research Center)
PrimeScript RT reagent Kit	(RR037A/B, TaKaRa)
SYBR Premix Ex Taq II	(RR081A, TaKaRa)
RNase free dH <sub>2</sub> O	(06442-95, nacalai tesque)
BCP	(BP151, Molecular Research Center)
Protease Inhibitor Cocktail	(03969-21, nacalai tesque)

## 第2項 実験装置

小型微量遠心機	(LC-100, トミー精工)
ボルテックスミキサー	(Vortex-Genie 2, Scientific Industries)
微量高速冷却遠心機	(MX-301, トミー精工)
重量測定器具	(DRAGON602, メトラー・トレド)
紫外・可視分光光度計	(GeneQuant pro, Biochrom)
超音波ホモジナイザー	(Sonifier, BRANSON)
pH METER	(F-52, HORIBA)
クライオスタット	(HM560-MV, MICRO EDGE)
フローサイトメーター	(FACS AriaII, BD Biosciences)
蛍光顕微鏡	(Axioskop 2, ZEISS)
吸光度計	(NANO DROP 2000, Thermo)

## 第3項 試薬

PBS : 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
RBC lysis buffer : 17 mM Tris-HCl (pH 7.2), 140 mM NH <sub>4</sub> Cl
LB 培地 : 1% (v/v) Trypton, 0.5% (v/v) Yeast Extract, 1% (v/v) NaCl
FACS buffer : PBS, 5% FBS, 0.05% NaN <sub>3</sub>
4% PFA-PBS (pH7.4)
8 x phosphate buffer : 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O, 80 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 4 M NaCl (pH7.4)
Buffer A : phosphate buffer, 500 mM NaCl, 20% グリセロール
Wash Buffer : phosphate buffer, 500 mM NaCl, 20 mM イミダゾール
Elute Buffer : phosphate buffer, 500 mM NaCl, 500 mM イミダゾール
5 mM 1,10-phenantroline
1 mM CuSO <sub>4</sub>

FBS	(Biosera)
RPMI1640 medium	(30264-56, nacalai tesque)
HBSS	(1665752, gibco)
MOWIOL 4-88 Reagent	(D00058930, CALBIOCHEM)
Penicillin-Streptomycin	(P4333, SIGMA)
Protease Inhibitor Cocktail	(03969-21, nacalai tesque)
Lysenin	(4802-v, ペプチド研究所)
Rabbit anti-Lysenin serum	(14802-v, ペプチド研究所)
goat anti-Rabbit-IgG-Alexa Fluor 488	(1423009, life technologies)
goat anti-Rabbit-IgG-Alexa Fluor 594	(627239, invitrogen)
anti-Mouse CD8a magnetic Particles	(53-6.7, BD Biosciences)
anti-Mouse CD4 magnetic Particles	(GK1.5, BD Biosciences)
ceramide monoclonal antibody	(MID 15B4, Enzo Life Sciences)
CD4-APC/Cy7	(GK1.5, Bio Legend)
CD4-PerCP/Cy5.5	(GK1.5, Bio Legend)
CD8 $\alpha$ -Alexa700	(53-6.7, Bio Legend)
CD11b-PE	(M1/70, Bio Legend)
CD24-PE	(M1/69, Bio Legend)
CD25-APC/Cy7	(PC61, Bio Legend)
CD25-PE	(PC61, Bio Legend)
CD28-PE/Cy7	(E18, Bio Legend)
CD44-PerCP/Cy5.5	(IM7, Bio Legend)
CD62L-PE/Cy7	(MEL-14, Bio Legend)
CD69-PerCP/Cy5.5	(H1.2F3, Bio Legend)
CTx-B-FITC	(C1655, SIGMA)
cKit-APC	(2B8, Bio Legend)
Fc block (CD16/32)	(93, Bio Legend)
filipin III	(480-49-9, Cayman Chemical)
Gr-1-PE	(RB6-8C5, Bio Legend)
NK1.1-PE	(PK136, Bio Legend)
TCR $\beta$ -PE	(H57-597, Bio Legend)
TCR $\gamma\delta$ -PE	(GL3, Bio Legend)
TER119-PE	(TER-119, Bio Legend)

#### 第 4 項 実験動物

オスおよびメスの C57BL/6J Jcl マウス(日本クレア株式会社)を用いた。マウスはプラスチックケージ(20 x 30 x 15cm)の中に収容し、室温  $23 \pm 2$  °C、湿度  $60 \pm 2\%$  および 12 時間の明暗サイクル(7:00 AM 点灯)の SPF 室で飼育した。水および餌(CE-2 : 日本クレア株式会社)は自由に摂取できるようにした。実験動物の取り扱いについては、「東北医科薬科大学実験動物センター利用規程」にもとづく承認の下、学内規則に従って実施した。

#### 第 5 項 実験動物からの胸腺細胞の採取

ジエチルエーテルの大量吸入によりマウスを安楽死させた後、胸腺を採取した。スライドガラスの擦りガラス面を用いて採取した組織をすり潰した。95  $\mu\text{m}$  メッシュを通すことによって、組織片を除去し、胸腺細胞を得た。遠心(450 g, 4 °C, 3 分間)後、RBC lysis buffer 1 mL に懸濁して、室温で約 2 分間静置することによって赤血球を溶血させて除去した。10% FBS-RPMI 10 mL にて 2 回洗浄した。

#### 第 6 項 薄層クロマトグラフィーによる胸腺細胞の脂質解析

##### 6-1 総脂質抽出

胸腺細胞は第 1 章第 2 節第 5 項と同様で採取した。クロロホルム / メタノール = 1 : 1 を加え、水浴超音波装置でソニケーションし、沈殿物を攪拌後、40 °C で 1 時間加温した。加温後、遠心(715 g, 室温, 5 分間)し、上清を回収後、残りの沈殿物にクロロホルム / メタノール = 1 : 2 を加え、水浴超音波装置でソニケーションし、同条件で加温後、遠心分離を行った。この上清を上述に記載した 1 回目の上清と全て合わせ、エバポレーターを用いて溶媒を蒸発乾固させ、総脂質抽出物とした。

## 6-2 陰イオン交換クロマトグラフィーによる脂質の分画

総脂質抽出物を酸性脂質及び中性脂質に分離するため、DEAE-Sephadex A-25 を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。総脂質溶出物をクロロホルム / メタノール / 水 = 30 : 60 : 8 溶液に溶解し、カラムに加え溶出した。その後、カラムの 5 倍量のクロロホルム / メタノール / 水 = 30 : 60 : 8 溶液で中性脂質を溶出し、回収した。続けてカラムにクロロホルム / メタノール / 1 M 酢酸ナトリウム水溶液 = 30 : 60 : 8 溶液を樹脂の 5 倍量加え、酸性脂質を溶出した。それぞれの画分の溶液を窒素乾固した。

## 6-3 アルカリメタノリシス

グリセロリン脂質分解のため、窒素乾固した各脂質画分に 0.1 N 水酸化ナトリウムメタノール溶液を加え、水浴超音波装置でソニケーションし、40 °C で 2 時間加温した。その際、1 時間毎に水浴超音波装置を用いて攪拌を行った。その後、1 N 塩酸メタノール溶液で中和した。

## 6-4 脱塩

アルカリメタノリシス後、中和したサンプルに等量の 50 mM 塩化ナトリウム水溶液を加え 2 倍希釈し、SEP-Pak C-18 カートリッジに流した。その後、精製水を流し脱塩した。メタノール、クロロホルム / メタノール = 1 : 1 をそれぞれ用いて脂質を溶出し、溶出液を合わせてエバポレーターを用いて蒸発乾固した。乾固させたサンプルを少量のクロロホルム / メタノール = 1 : 1 で再溶解し、マイクロチューブに完全に移し窒素乾固して、TLC 用のサンプルとした。

## 6-5 タンパク質の定量

総脂質抽出後の沈殿物を窒素乾固し、完全に有機溶媒を除いた後、1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、沈殿物が完全に溶解するまで 40 °C で加温した。その後、BCA 法

で、サンプルのタンパク質濃度の測定を行った。タンパク質量は、サンプルを溶かした 1 N 水酸化ナトリウム水溶液の体積と測定したサンプルのタンパク質濃度を用いて計算した。胸腺細胞のサンプルは、このタンパク質量を基準に TLC を行った。

## 6-6 スフィンゴ脂質解析

薄層クロマトグラフィーは、吸着クロマトグラフィーの一つで物質を単離・精製する方法である。まず、クロロホルム / メタノール = 1 : 1 に溶解させた中性脂質を TLC 用シリカゲルプレートにスポットし、デシケーターで 15 分間乾燥させた後に展開した。クロロホルム / メタノール / 水 = 60 : 25 : 4 の溶媒でプレートの半分程度まで展開した後、デシケーターで 15 分間乾燥させた。乾燥後、1-ブタノール/ 酢酸/ 水 = 3:1:1 の溶媒で再度展開した。展開後、再度デシケーターで 15 分間乾燥させ、Dittmer 試薬を TLC 用シリカゲルプレート全体に噴霧し、約 100 °C で加熱してスフィンゴミエリンを検出した。シリカゲルプレートには、極性の高いシリカゲルがコーティングされており、極性の高い水溶性の試料はシリカゲルとよく相互作用するが、反対に極性が低い脂溶性の試料はシリカゲルとの相互作用が弱いため、極性の高い試料に比べて遅く移動し、TLC の上部に分離される。Dittmer 試薬はスフィンゴミエリンのようなリン酸基を持つ脂質と反応し、青色を呈する<sup>24</sup>。

## 第 7 項 スフィンゴミエリン結合性タンパクの精製

### 7-1 コンストラクト

N 末端のアミノ酸 161-297 残基のみの無毒性型 Lys (NT-Lys) に EGFP を融合した EGFP-NT-Lys のコンストラクトである pQE30/His6-EGFP-NT-Lys は小林秀俊教授から供与された<sup>25</sup>。EqII の C 末端に EGFP を融合したコンストラクト (EqII-EGFP) である pET28/ EqII (8-69) -EGFP-His6 は RIKEN BRC より購入した。

#### 7-2 pQE30/His6-EGFP-NT-Lys の大腸菌 JM109 への形質転換および培養

-80 °C 保存の大腸菌 (JM109) コンピテントセルを氷上にて融解し, これに pQE30/His6-EGFP-NT-Lys を加え, 氷上で 5 分間静置した. その後 42 °C で 55 秒間加温し, 直ちに氷冷した. 2 分間氷冷した後, SOC を大腸菌液の 10 倍量加え, 37 °C の水浴で 30 分間加温した. その後, 遠心(9100 g, 室温, 1 分間)し, 残りが 100  $\mu$ L になるように上清を除去して再懸濁し, アンピシリンを含む LB 寒天培地に播種し, 37 °C で 18 時間培養した. 得られたシングルコロニーをピックアップし, アンピシリンを含む LB 培地 1 mL に添加し, 37 °C で 18 時間培養した. 18 時間後, 培養液にグリセロールを加え, グリセロールストックとして-80 °C で保存した.

#### 7-3 pET28/EqtII (8-69) -EGFP-His6 の大腸菌 BL-21 (DE3)への形質転換および培養

-80 °C 保存の大腸菌[BL-21 (DE3)]コンピテントセルを氷上にて融解し, これに pET28/EqtII (8-69) -EGFP-His6 を加え, 氷上で 5 分間静置した. その後 42 °C で 55 秒間加温し, 直ちに氷冷した. 2 分間氷冷した後, SOC を大腸菌液の 10 倍量加え, 37 °C の水浴で 1 時間加温した. その後, 遠心(9100 g, 室温, 1 分間)し, 残りが 100  $\mu$ L になるように上清を除去して再懸濁し, カナマイシンを含む LB 寒天培地に播種し, 37 °C で 18 時間培養した. 得られたシングルコロニーをピックアップし, カナマイシンを含む LB 培地 1 mL に添加し, 37 °C で 18 時間培養した. 18 時間後, 培養液にグリセロールを加え, グリセロールストックとして-80 °C で保存した.

#### 7-4 大腸菌による EGFP-NT-Lys および EqtII-EGFP の前培養

第 7 項 7-2 および 7-3 で作製したグリセロールストックから抗生物質を含む LB 寒天培地に大腸菌を播種し, 37 °C で 18 時間培養した. 得られたシングルコロニーをピックアップし, 抗生物質を含む LB 培地 5 mL に添加し, 37 °C で 18 時間培養した. 吸光度

計を用いて OD<sub>600</sub> を測定し、抗生物質を含む LB 培地 125 mL に 0.1 OD となるよう植菌し、OD<sub>600</sub> = 0.2 になるまで攪拌しながら 37 °C で培養した。その後、2 M ソルビトール、5 mM betaine hydrochloride を含む LB 培地 125 mL と 1 M isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) 250 μL を添加し、攪拌しながら 30 °C で 16~20 時間培養した。

#### 7-5 カラムを用いた EGFP-NT-Lys および EqtII-EGFP の精製

第 7 項 7-4 の操作で合成が誘導されたタンパクにはいずれもヒスチジンタグが付いているため、Ni Sepharose が充填されたカラムに目的タンパクを含む大腸菌液を通すことで目的タンパクがニッケルと結合する。その後、カラムにトラップされなかった目的タンパク以外のタンパクを洗い流し、ヒスチジンよりもニッケルとの親和性が高いイミダゾールを加えることで、目的タンパクがカラムから解離し、目的タンパクを精製することができる。

前培養した大腸菌液を 50 mL チューブに回収し、遠心 (5000 g, 4 °C, 10 分間) した。上清を除いた後、protease inhibitor (100 倍希釈) を添加した Buffer A 20 mL を大腸菌ペレットに加え、大腸菌を再懸濁した。超音波ホモジナイザーでソニケーションを 10 秒間行い、インターバルを 30 秒間置いた後、再度ソニケーションを 10 秒間行った。この操作を繰り返して、ソニケーションを計 7 回繰り返して細胞を破碎した。遠心 (9000 g, 4 °C, 20 分間) 後、上清を Ni-NTA Agarose 3 mL 分が充填されたカラムに通した。カラムを通過した液を回収し、再度カラムに通した。液を全て通過させたのち、Wash Buffer 10 mL をカラムに通過させた。その後、Elute Buffer 4 mL で溶出し、15 mL チューブに回収した。溶出した液を Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices に入れ、遠心 (2600 g, 4 °C, 10 分間) 後、遠心によりカラムを通過した量と等量の PBS を加え、再度遠心することで透析を行った。この操作を 5 回繰り返して、精製したタンパクを含む液が 300

μL になるまで遠心した後, 100%グリセロールを加え, 30%グリセロール溶液を調製した.

#### 第 8 項 FACS 解析による胸腺細胞の分化段階の分類

胸腺細胞を FACS buffer にて  $3 \times 10^7/0.5$  mL に調製し, 1.5 mL tube に 0.5 mL ずつ分けた. 遠心 (800 g, 4 °C, 3 分間) 後, 細胞表面マーカーに対する抗体 (CD11b-PE, Gr-1-PE (以上, 100 倍希釈), CD4-APC/Cy7, CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-Alexa700, CD24-PE/Cy7, CD25-APC/Cy7, CD25-PE, CD28-PE/Cy7, CD44-PerCP/Cy5.5, CD62L-PE/Cy7, CD69-PerCP/Cy5.5, cKit-APC, TCRβ-PE, TCRγδ-PE, NK1.1-PE, TER119-PE (以上, 50 倍希釈)) を加え, 遮光し 4 °C で 25 分間インキュベートした. FACS buffer 400 μL で 2 回洗浄した. FACS にて細胞を取り込み, 解析ソフト FlowJo (TOMY DIGITAL BIOLOGY) を用いて解析した. 胸腺細胞の分化段階は Fig. 4 に示した細胞表面マーカーの発現パターンに基づき区別した.

#### 第 9 項 FACS 解析による細胞膜脂質の検出

細胞表面スフィンゴミエリンの検出のため第 2 節第 7 項で精製した EGFP-NT-Lys または EqtII-EGFP を用いた. 細胞表面の GSL を簡易的に検出するため, GSL のうち, ガングリオシド GM1 と extended-GM1b に特異的に結合する FITC 標識のコレラトキシン B サブユニット (cholera toxin-B subunit, CTx-B) を用いた. CTx-B は膜上での GM1 と extended-GM1b の存在状態に依存せずに結合すると考えられている<sup>26</sup>. 胸腺細胞を PBS で洗浄した後, EGFP-NT-Lys, EqtII-EGFP および FITC 標識 CTx-B を用いて細胞を染色した. 染色した細胞は FACS (FACS AriaII) にてデータを採取し, FlowJo ソフトウェアを用いて解析した.

## 第 10 項 胸腺の組織染色

### 10-1 胸腺組織切片の作製

マウスから第 1 章第 2 節第 5 項と同様の方法で胸腺を採取し, 4% PFA-PBS にて 4 °C で 5 時間固定した. その後組織を 20%スクロース-PBS にて 4 °C で一晩脱水した. 脱水後, 包埋剤に組織を浸漬し, 30 分間定着させた. その後液体窒素中で冷却したイソペンタンに浸漬し, 凍結させた. クライオスタットを用いて凍結した組織を厚さ 8  $\mu\text{m}$  にスライスし, 切片を作製した.

### 10-2 組織切片の HE 染色

作製した切片を精製水と水道水で水洗し, スライドガラスに付着した包埋剤を除去した. その後 hematoxylin 液に 15 分間浸漬し, 流水で 5 分間水洗した. 次に 1% HCl エタノールで分別し, 2 分間水洗した. 鏡検を行い, 色出しのため流水に 15 分間浸漬した. その後 1% eosin 液に 5 分間浸漬し, 2 分間水洗した後, スライドガラスを 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%エタノールの順に浸漬して脱水し, キシレンで透徹後, 封入剤 (permount) とカバーガラスを載せ, 蛍光顕微鏡で観察した.

### 10-3 胸腺組織切片のライセニン染色

作製した切片に PBS 100  $\mu\text{L}$  を載せ, 5 分間静置し, 包埋剤を除去した. これを 2 回行い, ブロッキング剤として 3% BSA-PBS 80  $\mu\text{L}$  を載せ, 10 分間静置した. ブロッキング剤を払拭し, Lys (100 倍希釈) を載せ, 45 分間インキュベートした. PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った後, Control rabbit IgG, Rabbit anti-Lysenin serum (100 倍希釈) をそれぞれ加え, 45 分間, 室温でインキュベートした. PBS で 2 回洗浄後, anti-Rabbit-IgG-Alexa594 (200 倍希釈) を加え, 30 分間, 室温でインキュベートした. PBS で 3 回洗浄した後, 封入剤 (MOWIOL) とカバーガラスを載せ, 蛍光顕微鏡で観察した.

## 第 11 項 半定量 PCR 解析

第 1 章第 2 節第 5 項と同様の方法で採取した胸腺細胞と胸腺細胞を採取した際に分離された胸腺上皮細胞, 肝臓の一部を採取し, TRI Reagent 500  $\mu$ L を加え, 5 分間攪拌した. TRI Reagent 500  $\mu$ L を追加して室温でさらに 5 分間静置した. 遠心(12000 g, 4  $^{\circ}$ C, 10 分間)後, 上清を回収し, そこへ BCP 100  $\mu$ L を加え 15 秒間激しく攪拌して室温で 5 分間静置した. 遠心(12000 g, 4  $^{\circ}$ C, 15 分間)し, 上層を回収した. そこへイソプロパノール 250  $\mu$ L と High Salt Precipitation Solution 250  $\mu$ L を加え転倒混和し, 室温で 10 分間静置した後, 遠心(12000 g, 4  $^{\circ}$ C, 8 分間)し, 75%エタノールを 1 mL 加え, 転倒混和した. 遠心(7500 g, 4  $^{\circ}$ C, 5 分間)後に風乾し, RNase free dH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L を加え完全に溶かした. 抽出した RNA は NANO DROP 2000 を用いて定量した.

逆転写反応と半定量 PCR 反応はそれぞれ PrimeScript RT Master Mix と SYBR Premix Ex Taq II を用い, 実験方法は製品の添付書に従った. 逆転写反応には 400 ng の総 RNA を用いた. PCR 条件は以下の通り.

初期変性 95  $^{\circ}$ C, 10 秒間

PCR 反応(GAPDH:27 サイクル, SMS2:30 サイクル, SMS1:40 サイクル)

変性 95  $^{\circ}$ C, 5 秒間

アニーリングおよび伸長反応 60  $^{\circ}$ C, 34 秒間

目的遺伝子は *SMS1* 遺伝子 (*SMS1*, forward primer : TCAACTGTTCTCCGAAGCTC, reverse primer : ATAAGCCACCTCCAGCAATG) および *SMS2* 遺伝子 (*sgms2*, forward primer : AACGGGATGGTATTGGTTGG , reverse primer : GAAGAGGAAGTCTCCGCACAG) であり, *GAPDH* 遺伝子 (*GAPDH*, forward primer : AAATGGTGAAGGTCGGTGTG , reverse primer :

TGAAGGGGTCGTTGATGG)を内部標準遺伝子とした。PCRにより得られた反応生成物はエチジウムブロマイド(1.5 mg/mL)を添加した3%アガロースゲルとMupid-EXを用いてアガロース電気泳動を行った。この時のマーカーとして100 bp DNA ラダーマーカーを、緩衝液として1 x TAE bufferを用いた。100 V, 30 分の条件で電気泳動した後、PrintgraphでUV照射した状態でVIDEO GRAPHIC PRINTERを用いて撮影し、DNAを確認した。SMS1, SMS2, GAPDHのバンドはそれぞれ81, 279, 108 bpに検出される。

## 第12項 定量PCR解析

### 12-1 胸腺細胞のソーティング

第1章第2節第5項と同様の方法で胸腺細胞を採取した後、遠心(800 g, 4 °C, 3 分間)し、10% FBS-HBSS 125 µL に懸濁した。そのうち25 µL 分 DP 細胞および SP 細胞のソート用とし、残りの100 µL 分は DN 細胞のソート用とした。DP 細胞および SP 細胞のソート用には CD4-APC/Cy7, CD8-APC(いずれも 50 倍希釈)を加え、遮光して4 °C で25 分間インキュベートした。その後10% FBS-HBSS 400 µL で2 回洗浄し、10% FBS-HBSS 300 µL に再懸濁した。DN 細胞のソート用の細胞を洗浄した Anti-Mouse CD4 magnetic Particles, Anti-Mouse CD8a magnetic Particles 各200 µL ずつ入った1.5 mL tube に移し、4 °C で30 分間インキュベートした。その後10% FBS-HBSS を1 mL 加え、磁石に立てかけて4 °C で10 分間静置した。磁石に立てかけた状態で tube 内の液を新たな1.5 mL tube に移し、再度10% FBS-HBSS を1 mL 加え、磁石に立てかけて4 °C で10 分間静置した。最終的に得られた細胞懸濁液を遠心(800 g, 4 °C, 3 分間)後、細胞表面マーカーに対する抗体(CD11b-PE, Gr-1-PE(以上, 100 倍希釈), CD4-APC/Cy7, CD8-Alexa700, TCRγδ-PE, NK1.1-PE, TER119-PE(以上, 50 倍希釈))で染色し、遮光して4 °C で25 分間インキュベートした。その後10% FBS-

HBSS 400  $\mu$ L で 2 回洗浄し, 10% FBS-HBSS 200  $\mu$ L に再懸濁した. FACS を用いて DN, DP, CD4SP, CD8SP にソートした.

## 12-2 定量 PCR 解析

ソートした細胞の mRNA を抽出し, 逆転写反応を行った. SYBR Premix Ex Taq II と Step One Plus real-time PCR System を用いて定量 PCR 反応を行った. PCR 条件は以下の通り.

初期変性	95 °C, 10 秒間
PCR 反応(40 サイクル)	
変性	95 °C, 5 秒間
アニーリングおよび伸長反応	60 °C, 34 秒間
融解曲線分析	95 °C, 15 秒間
	60 °C, 1 分間
	95 °C, 15 秒間

*SMS1* 遺伝子(プライマーの配列は第 11 項と同様)を目的遺伝子とし, *GAPDH* 遺伝子(プライマーの配列は第 11 項と同様)を内部標準遺伝子とした. 融解曲線分析により目的遺伝子が増幅されたことを確認し, 検量線を作成して相対定量を行った. 細胞ごとに *GAPDH* 遺伝子で補正し, 数値化して比較した.

## 第 13 項 DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイのデータは The Immunological Genome Project Consortium が公開しているデータベースの使用許諾を得て使用した<sup>27,28</sup>. データの詳細な算出方法は

<https://www.immgen.org/>を参照。The Immunological Genome Project Consortium は多施設との共同研究により得たマウスの免疫細胞における様々な遺伝子発現プロファイルを管理している。簡潔な方法は、フローサイトメーターを用いて主要な免疫細胞画分をソートし、マイクロアレイ分析により遺伝子発現を解析している。供与されたデータの中から、胸腺細胞の各分化段階における *SMS1*, *SMS2* の発現量をグラフ化した。

#### 第 14 項 統計処理

多群間の比較には、はじめに正規性の検定およびバートレット検定による等分散の検定を行った。その後一元配置分散分析により多群の差を検定し、Tuker-Kramer 法で多重比較検定を行った。各群間で危険率 5%以下 ( $p < 0.05$ ) の場合を統計学的に有意差があるものとした。なお、危険率に関しては、 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  で示した。

### 第 3 節 実験結果

#### 第 1 項 マウスの胸腺細胞におけるスフィンゴミエリン発現

マウスの胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴミエリンの役割を調べるために、はじめに胸腺細胞の分化段階におけるスフィンゴミエリン発現を調べた。TLC 解析により細胞全体のスフィンゴミエリン量を調べたところ、DN 細胞から DP 細胞に分化するに従いスフィンゴミエリン量は減少し、SP 細胞に分化する際に再度増加することが明らかとなった (Fig. 5)。CD4SP 細胞は CD8SP 細胞よりもスフィンゴミエリン発現量が多かった。

Lys はドメイン化したスフィンゴミエリン (スフィンゴミエリンマイクロドメイン) を認識する一方、EqII は一分子で分散したスフィンゴミエリンを認識する (Fig. 3A)。コレステロールのキレート剤であり、マクロドメインを破壊するために汎用されている methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) を胸腺細胞に処理したのち、形質膜を Lys と EqII で標識すると、

EqII の結合能はほとんど変わらないのに対し, Lys の結合能は M $\beta$ CD の濃度依存的に低下した (Fig. 3B). このことから両タンパクが異なる存在形態のスフィンゴリエリンを認識することが分かる. この 2 つのタンパクをプローブに用いて, 分化段階ごとの胸腺細胞の形質膜におけるスフィンゴリエリンの存在状態を考慮した発現量を解析した. Lys によって認識されるスフィンゴリエリンマイクロドメインも EqII によって認識される分散したスフィンゴリエリンも発現パターンは TLC 解析の結果と類似していた (Fig. 6). 胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴリエリン発現をより詳細に解析するため, 胸腺細胞を DN 段階から SP 段階に細分化するための表面分子マーカーの多重染色と Lys 染色を行い, FACS にて解析し, Lys の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) をグラフ化した (Fig. 7A, B). 細胞表面マーカーの発現パターンに基づく胸腺細胞の分化段階の分類は Fig. 3 に示した. スフィンゴリエリンマイクロドメイン発現量は DN と SP 段階に比べて DP 段階で低く, 特に正負の選択が生じる前の段階である small-DP 段階 (TCR $\alpha$  鎖の再構成が始まり, TCR 複合体が形成し始める段階) で最も低値を示した. small-DP 段階以降で正負の選択が生じる CD69<sup>+</sup>DP 段階から CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup> 段階にかけてスフィンゴリエリンマイクロドメイン発現量は徐々に増加した. 正負の選択の前後で形質膜上のスフィンゴリエリンマイクロドメインは 10 倍以上増加していた. 分散したスフィンゴリエリンも small-DP 段階で最も低値を示したが, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup> 段階での発現量の増加は約 2 倍に留まっていた (Fig. 7C). DP 段階の分化過程におけるスフィンゴリエリンマイクロドメインと分散したスフィンゴリエリン発現量には明確な違いがあることが明らかとなった. これらの結果より, *de novo* 合成により生成されたスフィンゴリエリンは形質膜上ではほとんどマイクロドメインの形成に関わることが示唆された.

胸腺組織は周囲の皮質部分と, 中心部の髄質部分から成る (Fig. 8A). 胸腺組織に移入した T 細胞前駆細胞は, 皮質側で DP 細胞まで分化する<sup>29,30</sup>. 正の選択を受け

て生存および分化のシグナルを受け取った DP 細胞はさらに SP 細胞に分化する。このシグナルが胸腺細胞を皮質から髄質に移行させるため、髄質に存在する胸腺細胞のほとんどは SP 細胞である<sup>31</sup>。胸腺組織切片の Lys 染色を行ったところ、皮質部分は Lys の染色が薄く、反対に髄質部分は濃く染色されたことから DP 細胞から SP 細胞への分化にかけてスフィンゴミエリンマイクロドメインの発現量が増加することを示している (Fig. 8B)。DP 細胞から SP 細胞への分化におけるスフィンゴミエリンマイクロドメインの増加をより詳細に解析するため、胸腺細胞に早期活性マーカーの CD69 とケモカイン受容体 CCR7 の標識および Lys と EqII の多重染色を行った。CD69 と CCR7 はその発現パターンによって胸腺細胞を正負の選択や分化に伴う遊走、成熟過程によって 5 段階に分類するマーカーとして用いられている<sup>32,33</sup>。CD69<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>胸腺細胞は皮質に局在し、正負の選択の TCR シグナルを受け取っていない状態の細胞を指す (stage I)。CD69<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>胸腺細胞は TCR シグナルを受け取り、CD69 の発現を増加させた段階である (stage II)。CD69<sup>+</sup>細胞は TCR シグナルを連続的に受けながら CCR7 を発現させ (stage III)、髄質へと移行する。髄質に移行した CD69<sup>+</sup>CCR7<sup>hi</sup> 胸腺細胞 (stage IV) は CD69 の発現を低下させ、成熟した胸腺細胞は胸腺から移出する (stage V)<sup>33</sup>。Lys で強く染まるスフィンゴミエリンマイクロドメインを高発現した細胞は stage III から増え始め、stage IV までの間に増加する (Fig. 9)。正の選択のシグナルを受けた DP 細胞は TCR の発現を増加させ、SP 細胞へと分化する<sup>34</sup>。分化に伴う TCR 高発現細胞の増加タイミングはスフィンゴミエリンマイクロドメインの発現増加のタイミングと同等か少し早期であった。このことからスフィンゴミエリンのマイクロドメインは正の選択の後期にまさに DP から SP へ分化する段階で増加すると考えられる。

## 第2項 胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴミエリン以外のマイクロドメイン構成脂

## 質発現の解析

GSL やスフィンゴミエリンは形質膜上で様々なマイクロドメインを形成し、なかでもスフィンゴミエリンはコレステロールと物理的相互作用によってコレステロールとマイクロドメインを形成する<sup>35-37</sup>. GSL のうち、ガングリオシド GM1 と extended-GM1b に特異的に結合するコレラトキシン B サブユニット(cholera toxin-B subunit, CTx-B)とコレステロールに結合する filipin III を用いて GSL やコレステロールがスフィンゴミエリンのように胸腺細胞の分化過程において発現レベルが変動するか否かを調べた. CTx-B 結合性ガングリオシドは胸腺細胞の分化過程において発現レベルが変動するものの、スフィンゴミエリンマイクロドメインと比較して small-DP 段階から CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup> 段階での増加量は少なかった(Fig. 10A). small-DP 段階から CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup> 段階におけるコレステロール発現レベルの増加はスフィンゴミエリンマイクロドメインと関連していた(Fig. 10B). これらの結果より、スフィンゴミエリンマイクロドメインはコレステロールと共に正負の選択以降で特異的に増加することが明らかとなった.

## 第 3 項 SMS 遺伝子の発現解析

哺乳細胞におけるスフィンゴミエリンの生合成は 2 種類のスフィンゴミエリン合成酵素, SMS1 と SMS2 によって制御されている. 胸腺細胞におけるスフィンゴミエリン発現が SMS 発現の調節によって変動しているか否かを検討するため, SMS1 遺伝子および SMS2 遺伝子の発現を半定量 PCR により解析した. 胸腺細胞と胸腺上皮細胞では SMS1 mRNA が検出されたが, SMS2 mRNA は検出されなかった(Fig. 11A). 一方で肝細胞では SMS1 mRNA に比べて SMS2 mRNA の方が高い発現レベルを示した. さらに胸腺細胞について, DN 細胞, DP 細胞, CD4SP 細胞, CD8SP 細胞の 4 段階で SMS1 の発現を比較したところ, DP 細胞が最も少なく, DN 細胞は DP 細胞の 1.9 倍, CD8SP 細胞は約 2.2 倍, CD4SP 細胞は約 9 倍発現量が多かった(Fig. 11B). この結

果は胸腺細胞の各分画におけるスフィンゴリエリンの発現量と相関しており、マウスの胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴリエリンの生合成には *SMS1* が主に関与していることが明らかとなった。

DN 細胞から SP 細胞までの分化過程における *SMS1* 遺伝子とスフィンゴリエリンマイクロドメイン発現量の相関性をより詳細に解析するため、Immunological Genome Project による DNA マイクロアレイのデータをもとに、胸腺細胞の一連の分化過程における *SMS1* の発現量をグラフ化した (Fig. 12)。 *SMS1* は DP small 段階で最も発現量が低くなった。 CD69 陽性の DP 段階から SP 段階に分化する際に再度増加し、CD4SP では CD8SP と比較して特に大きく増加した。 一方、 *SMS2* は検出感度以下であった。 この結果から、胸腺細胞の分化過程において、形質膜上のスフィンゴリエリンマイクロドメイン発現量は *SMS1* によって厳密に制御されていることが明らかとなった。

## 考察

胸腺細胞の一連の分化過程におけるスフィンゴリエリン発現とその機能的意義を解析するため、本章では野生型マウスの胸腺細胞のスフィンゴリエリン発現解析を行った。その結果、胸腺細胞においてスフィンゴリエリン発現量は厳密に制御されており、一連の分化過程で大きく変動することが明らかとなった。すなわち、分化の初期段階である DN では分化に伴い発現量を減少させ、DP 段階で最も発現量が低くなり、その後 SP 段階へ分化するに従って再度発現を増加させることが判明した (Fig. 5-7)。Lys と EqtII を用いてスフィンゴリエリンの存在形態も含めた発現量を詳細に解析したところ、ドメイン化したスフィンゴリエリンが正負の選択の後期に顕著に増加することが明らかとなった (Fig. 7)。さらに CD4SP 細胞では CD8SP 細胞と比較して顕著にスフィンゴリエリンの発現が上昇することが判明した。

本章の結果において特筆すべき点は、DP 細胞で正負の選択が生じる前後で特にドメイン化したスフィンゴリエリン発現が増加する点と、CD4SP および CD8SP ではスフィンゴリエリンの発現量が異なる点である。前者については、正負の選択におけるスフィンゴリエリンマイクロドメインの機能について、本論文の第 3 章以降で詳しく解析した。後者についてはこれまでに、もう一つのスフィンゴ脂質である GSL の中でもガングリオシドと呼ばれる糖脂質群において、CD8 陽性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞と比較してガングリオシドの発現が高いという報告がある<sup>9</sup>。スフィンゴリエリン発現は CD4 陽性 T 細胞の方が高く発現していることから、ガングリオシドとスフィンゴリエリンは T 細胞サブpopulationにおいて大きく異なる発現パターンを示すことが明らかとなった。T 細胞の分化や活性化、機能の維持に必要な脂質は、各サブセットによって異なり、それらが適切に発現することによって T 細胞の恒常性が保たれている可能性がある。

次に、*SMS1* および *SMS2* の発現量を定量 PCR と DNA マイクロアレイにより検討した。胸腺細胞、胸腺上皮細胞、肝細胞の *SMS1*, *SMS2* の定量 PCR を行った結果、

*SMS1* はいずれの細胞でも発現が認められたが (Fig. 11A), *SMS2* は肝細胞のみで発現が認められ, 残りの細胞では検出されなかった (Fig. 11B). 胸腺細胞を 4 つの分化段階にソートし, *SMS1* の定量 PCR を行ったところ, DN 段階から DP 段階へ分化するに従い *SMS1* の発現は低下し, その後 SP 段階に分化する際に再度増加していた (Fig. 11B). DNA マイクロアレイの結果を解析し, より細かい分化段階に分類して *SMS1* の発現を解析すると, *SMS1* の発現パターンはとスフィンゴミエリンの発現パターンと相関がみられることが判明した (Fig. 12). その一方で *SMS2* は今回の定量 PCR 条件では検出感度以下であった. 従って胸腺細胞における *SMS2* の発現は極めて微量であることが示唆される. これらの結果より, 胸腺細胞におけるスフィンゴミエリン発現は, 主に *SMS1* の発現レベルの調節により変動していると考えられる.

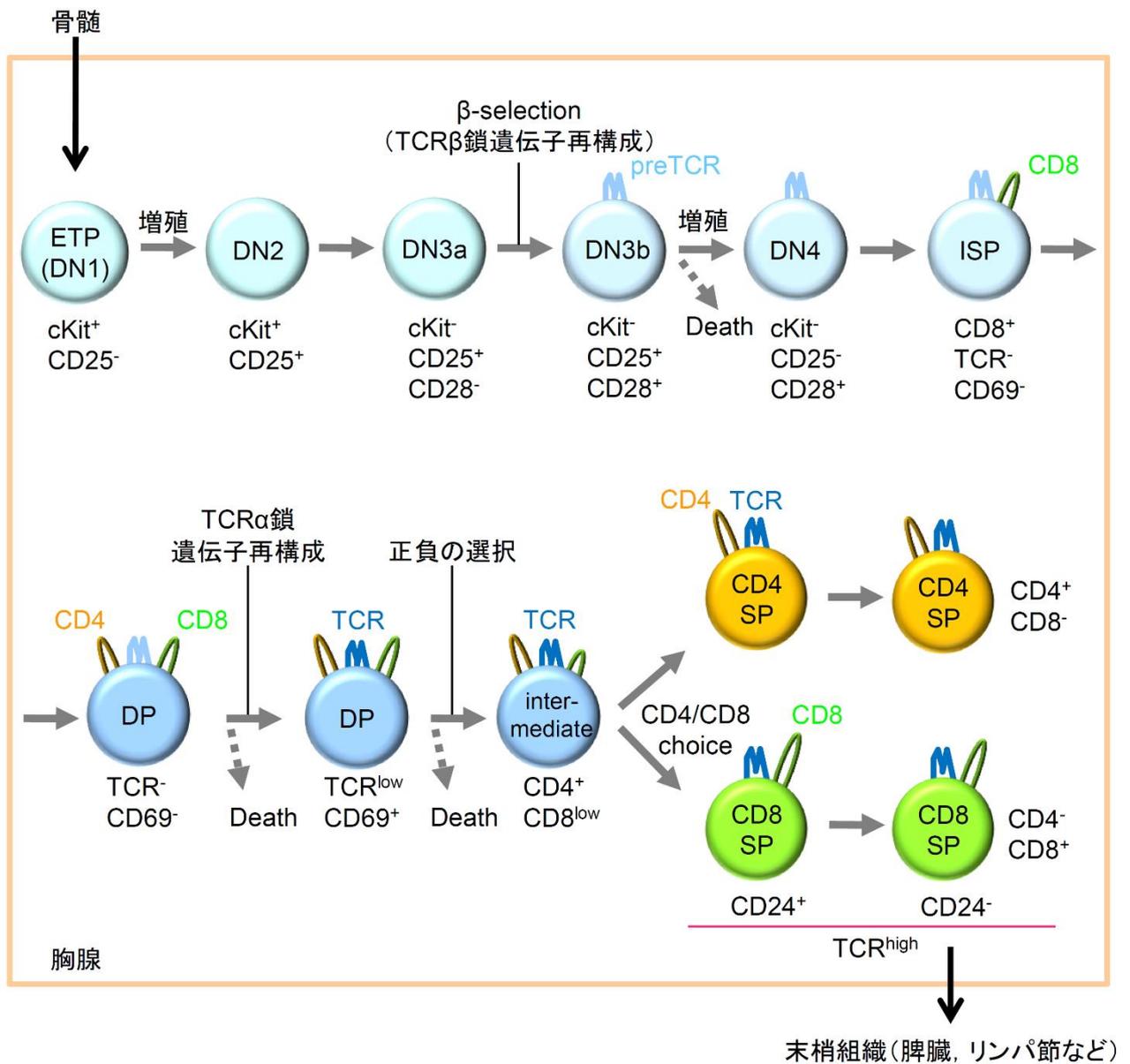


Fig. 1. 胸腺細胞分化の概略

骨髄から胸腺に移入した前駆細胞は、多くの分化段階を経て成熟し、末梢組織へ移出する。○の中には分化段階の名称を、下には各分化段階の定義に用いられる細胞表面分化マーカーを示した。DN3a 段階では TCR $\beta$  鎖の遺伝子再構成が行われ、再構成に成功した細胞は DN3b 段階へ分化し、preTCR が発現する。その後 DP 細胞で TCR $\alpha$  鎖の再構成が行われ、TCR が発現する。正負の選択により自己反応性 T 細胞が除去され、CD4SP 細胞もしくは CD8SP 細胞に分化し、成熟 SP 細胞となった後、脾臓やリンパ節などの末梢組織へ移出する。

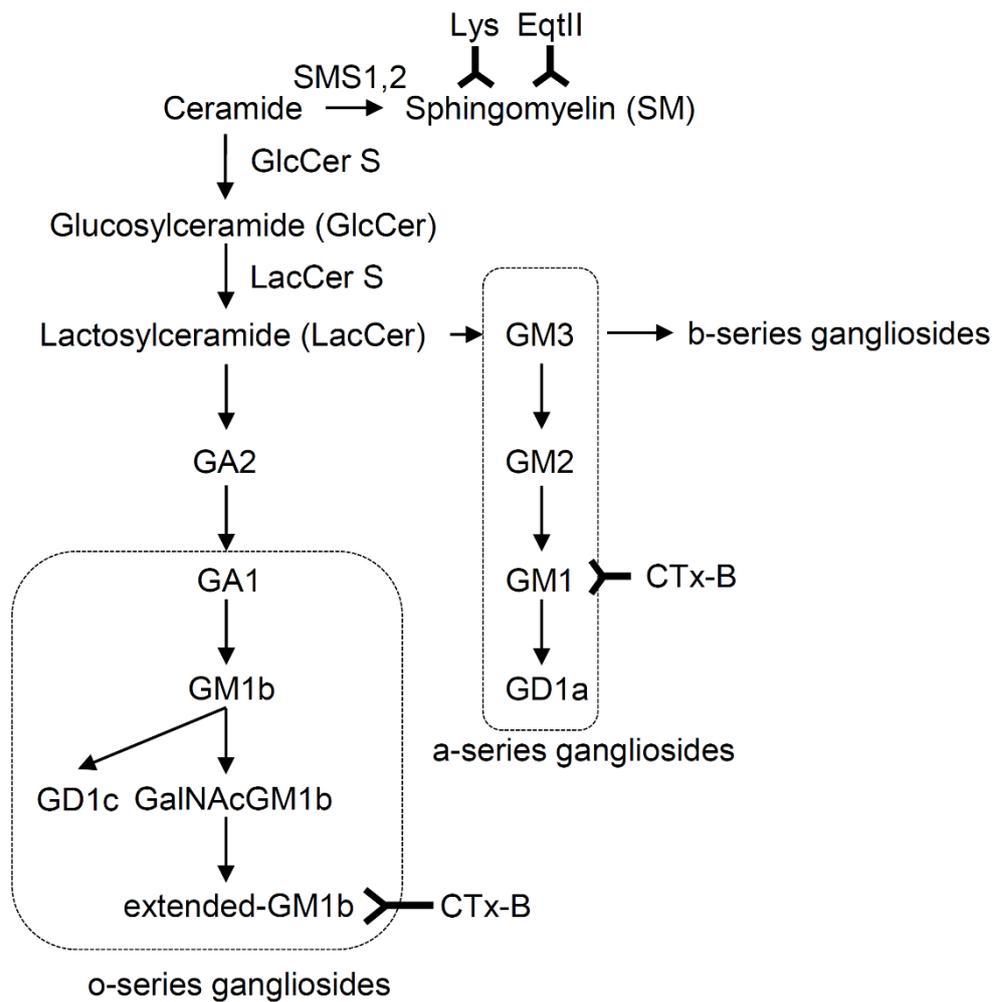


Fig. 2. スフィンゴミエリンおよびその他セラミド誘導体の生合成経路

スフィンゴミエリンはスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS1, SMS2) によってセラミドにホスホコリンが付加されることで生合成される。 ganglioside を含む GSL もまた、セラミドから生成される。 ganglioside はさらに o-, a-, b-series に細分化される。 GlcCerS: グルコシルセラミド合成酵素。 LacCerS: ラクトシルセラミド合成酵素。 lysenin (Lys) と equinatoxin II (EqII) はいずれもスフィンゴミエリンを認識するが、両者は認識するスフィンゴミエリンの存在形態が異なる (第 1 章第 1 節第 3 項および Fig. 1 参照)。コレラトキシン (Cholera toxin B subunit, CTx-B) は a-series GM1 および o-series extended-GM1b を認識する。

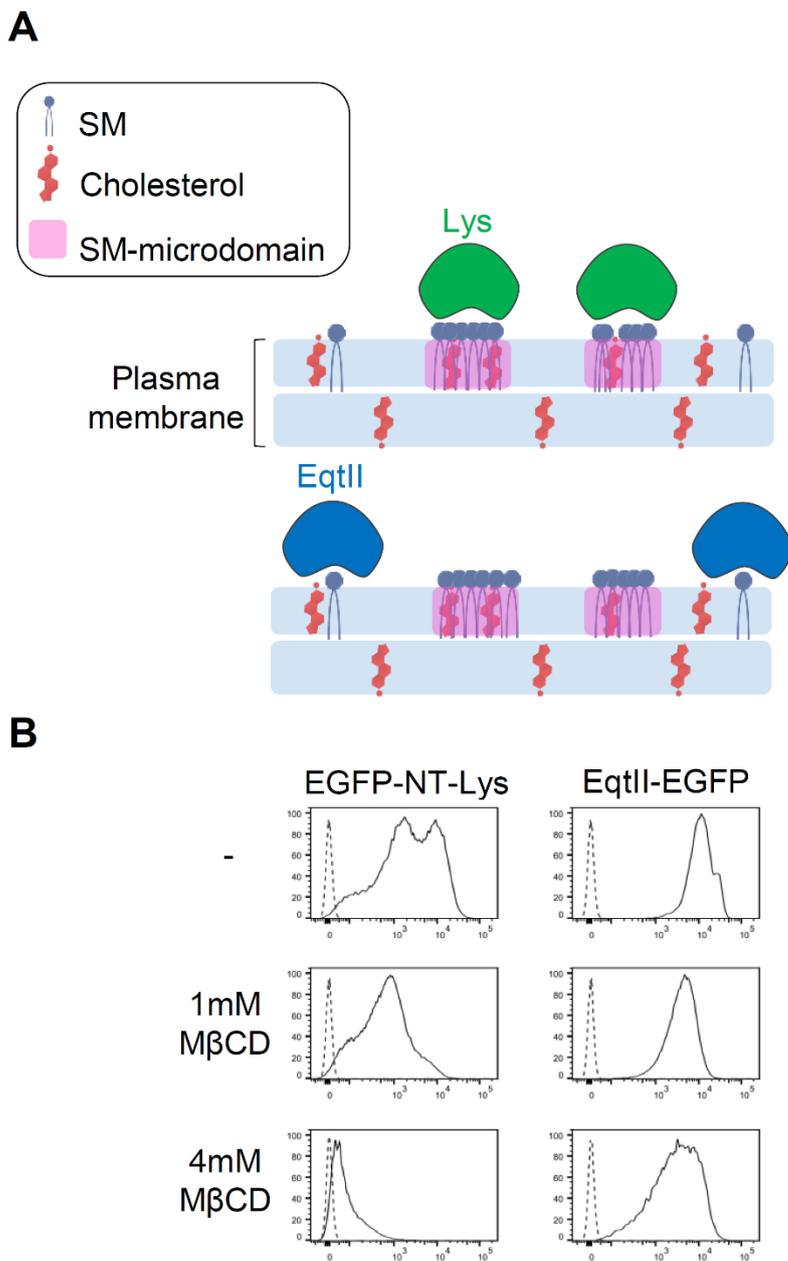
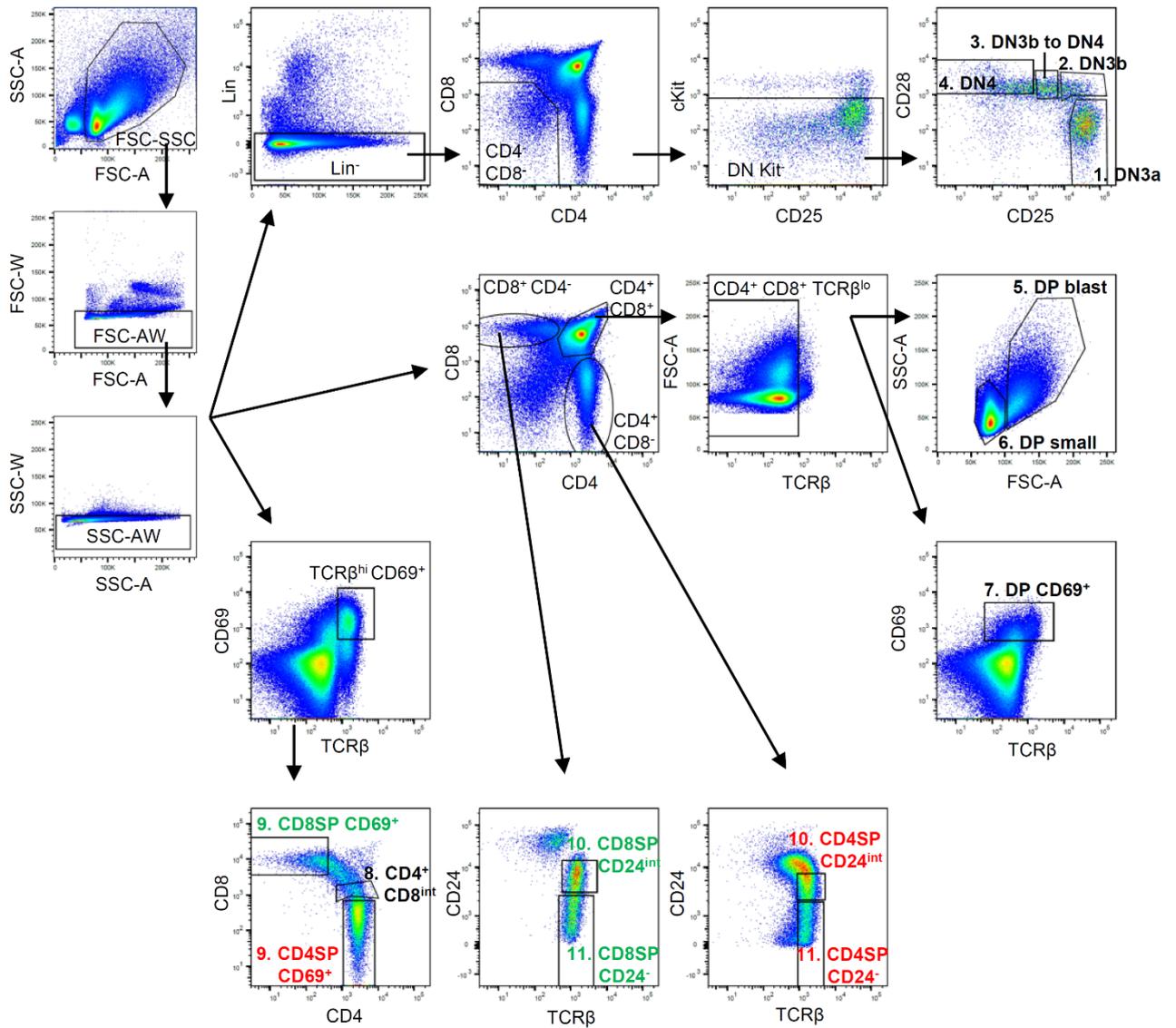


Fig. 3. 異なる存在形態のスフィンゴミエリンを認識する2種類のタンパク

(A) Lys および EqtII がスフィンゴミエリンを認識する模式図. Lys はスフィンゴミエリンが 5-6 分子集合しクラスター化したスフィンゴミエリンマイクロドメインを特異的に認識する. 一方で EqtII は一分子に分散したスフィンゴミエリンに優先的に結合する. (B) マイクロドメイン構造を破壊した際の Lys および EqtII の結合能の変化. 胸腺細胞を MβCD 未処理または上記の濃度で処理後, EGFP-NT-Lys (左) または EqtII-EGFP (右) で標識した. 実線: 染色あり. 点線: 無染色



Population	Markers used for determining developmental stage
1. DN3a	Lin <sup>-</sup> cKit <sup>-</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD28 <sup>-</sup>
2. DN3b	Lin <sup>-</sup> cKit <sup>-</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD28 <sup>+</sup>
3. DN3b to DN4	Lin <sup>-</sup> cKit <sup>-</sup> CD25 <sup>int</sup> CD28 <sup>+</sup>
4. DN4	Lin <sup>-</sup> cKit <sup>-</sup> CD25 <sup>-</sup> CD28 <sup>+</sup>
5. DP blast	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> TCR <sup>-/lo</sup> FSC <sup>hi</sup>
6. DP small	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> TCR <sup>-/lo</sup> FSC <sup>lo</sup>
7. DP CD69 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> TCR <sup>lo/int</sup> CD69 <sup>+</sup>
8. CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>int</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>int</sup> TCR <sup>hi</sup> CD69 <sup>+</sup>
9. CD4SP CD69 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR <sup>hi</sup> CD69 <sup>+</sup>
10. CD4SP CD24 <sup>int</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR <sup>hi</sup> CD24 <sup>int</sup>
11. CD4SP CD24 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR <sup>hi</sup> CD24 <sup>-/lo</sup>
9. CD8SP CD69 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR <sup>hi</sup> CD69 <sup>+</sup>
10. CD8SP CD24 <sup>int</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR <sup>hi</sup> CD24 <sup>int</sup>
11. CD8SP CD24 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR <sup>hi</sup> CD24 <sup>-/lo</sup>

Fig. 4. 細胞表面マーカーの発現パターンに基づく胸腺細胞の分化段階の分類

forward scatter/side scatter (FSC/SSC) plot により FSC 低値に表れる死細胞や細胞の破片などを除外した。二重に重なった細胞を除くため、FSC-area/FSC-width (FSC-A/FSC-W) および SSC-area/SSC-width (SSC-A/SSC-W) で高値を示す範囲を除外した。胸腺細胞の分化段階は表に示した細胞表面マーカーの発現に基づき区別した。B220 (B 細胞系列), CD11b (単球/マクロファージ系列), Gr-1 (顆粒球系列), NK1.1 (NK 細胞および NKT 細胞), TCR $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$ T 細胞系列), Ter119 (赤血球系列)陰性を胸腺細胞系列とした。

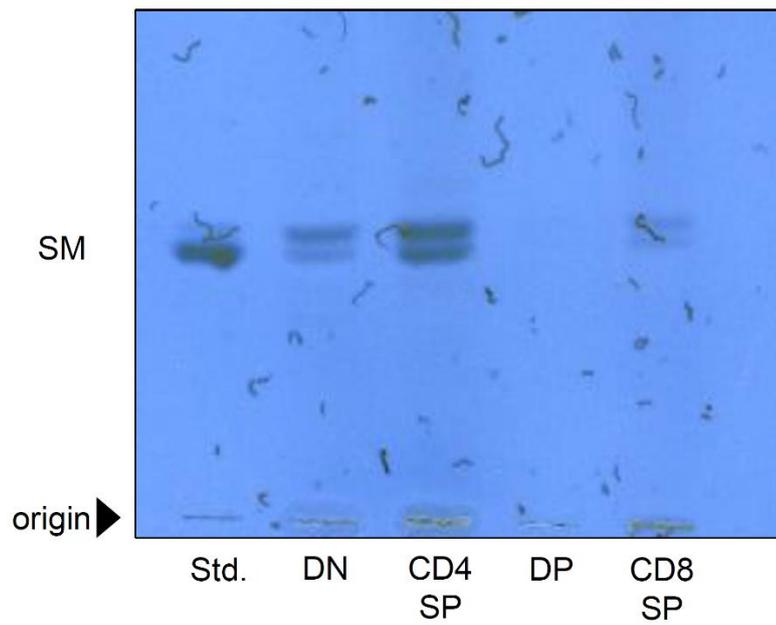


Fig. 5. TLC 解析による胸腺細胞の各分化段階におけるスフィンゴミエリン発現解析  
 $1 \times 10^7$  個ずつソートした胸腺細胞の各分化段階 (DN, DP, CD4SP, CD8SP) から脂質を抽出し, 中性脂質を TLC プレートにスポットして展開した. 展開後, Dittmer 試薬を噴霧してスフィンゴミエリンを検出した. Std.: standard lipid. SM: スフィンゴミエリン.

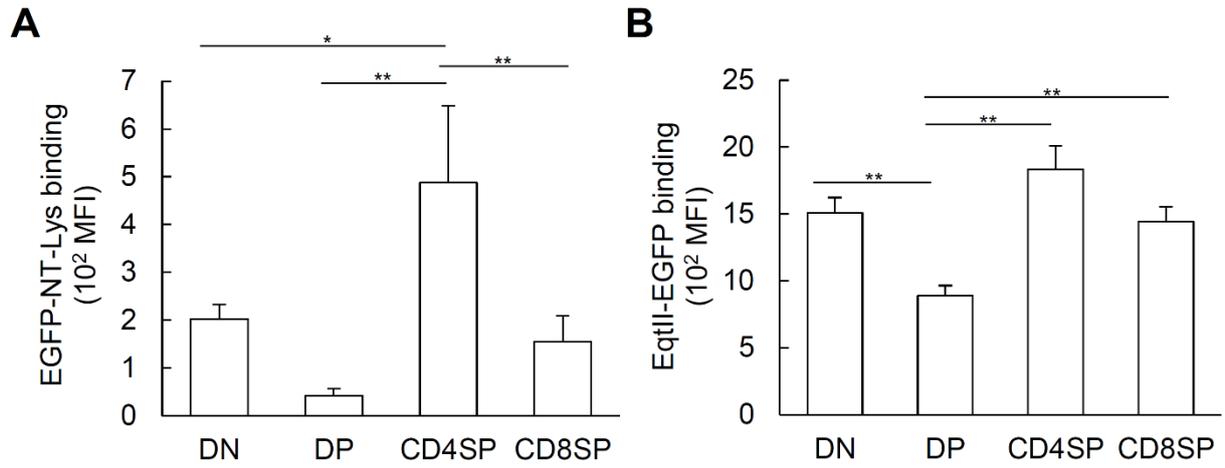


Fig. 6. 胸腺細胞の各分化段階におけるスフィンゴミエリンマイクロドメインおよび

分散したスフィンゴミエリン発現量

(A) EGFP-NT-Lys により標識された胸腺細胞の各分化段階の形質膜上のスフィンゴミエリンマイクロドメイン発現量. n = 4. (B) EqtII-EGFP により標識された胸腺細胞の各分化段階の形質膜上の分散したスフィンゴミエリン発現量. n = 3. グラフはいずれも平均値±標準偏差で表した. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

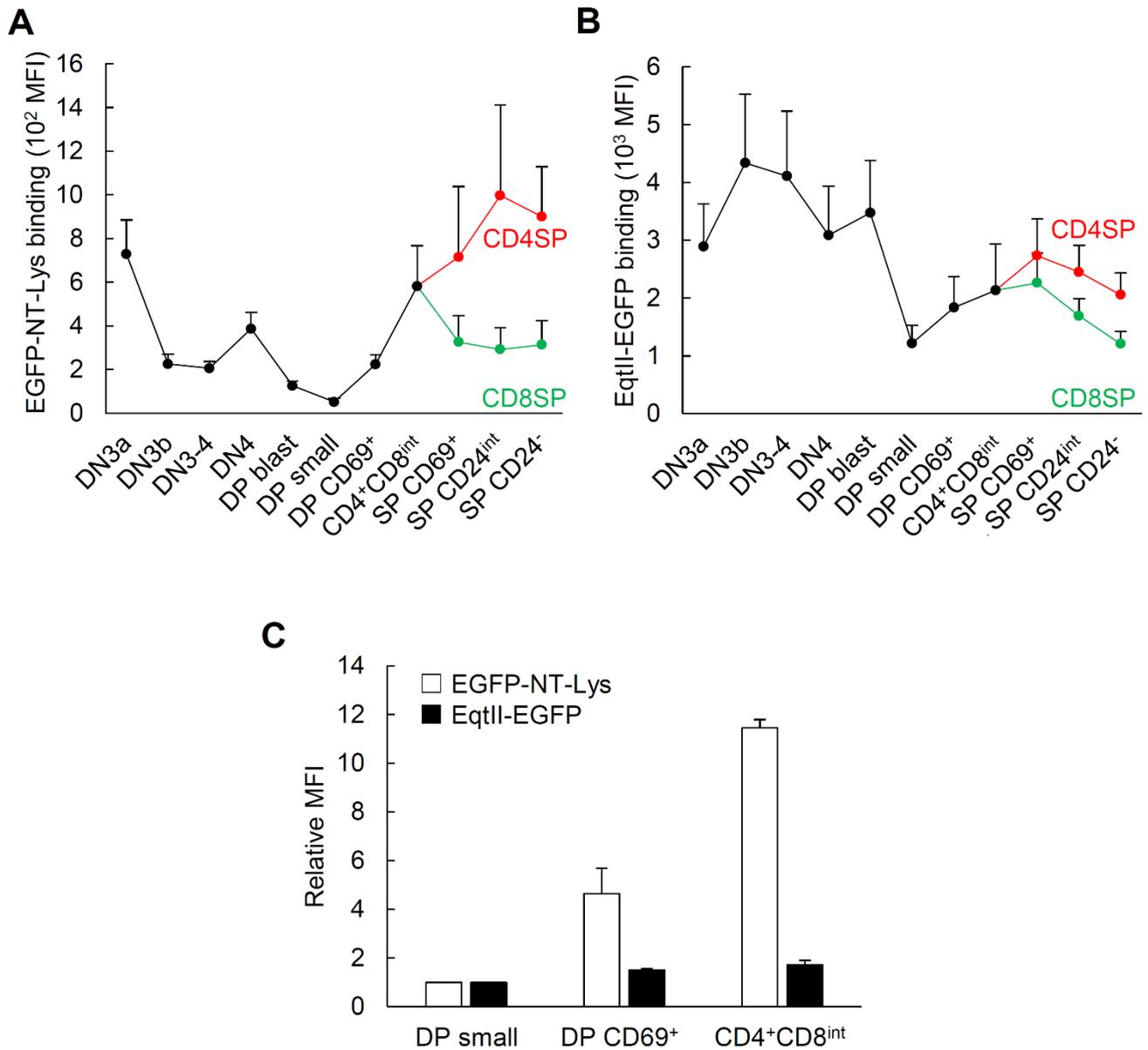


Fig. 7. 胸腺細胞の各分化段階におけるスフィンゴミエリンマイクロドメインおよび分散したスフィンゴミエリン発現量

胸腺細胞に Fig.3 で示した分化マーカーの表面染色および EGFP-NT-Lys 染色(A)または EqtII-EGFP 染色(B)を行い, FACS で解析した. (A) n = 4. (B) n = 3. (C) small-DP 細胞から CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup> 細胞までの EGFP-NT-Lys および EqtII-EGFP の相対 MFI 値の比較. データは EGFP-NT-Lys および EqtII-EGFP 染色の small-DP 細胞の各 MFI 値を 1.0 とし, グラフ化した.

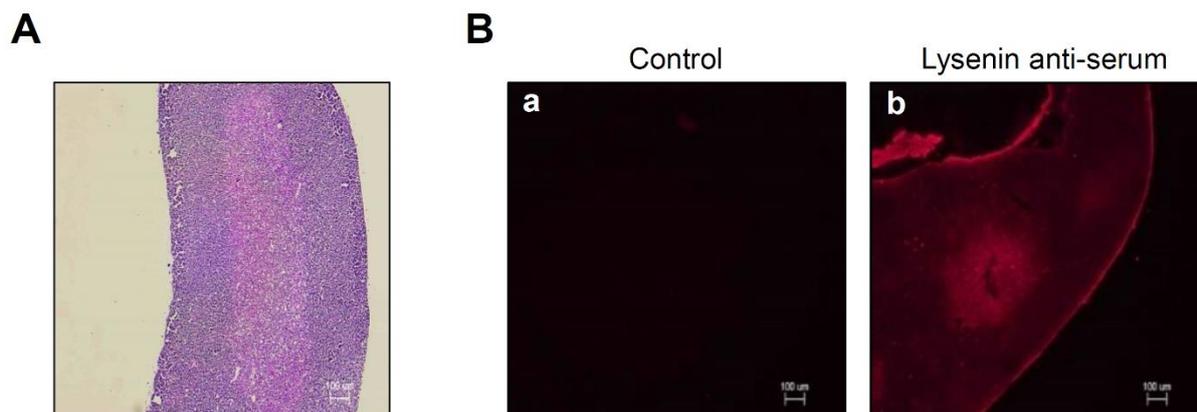


Fig. 8. 野生型マウスの胸腺の組織染色

(A). 胸腺組織の HE 染色. (B). 胸腺組織の Lys 染色. Control 染色(B-a). Lys 染色(B-b).

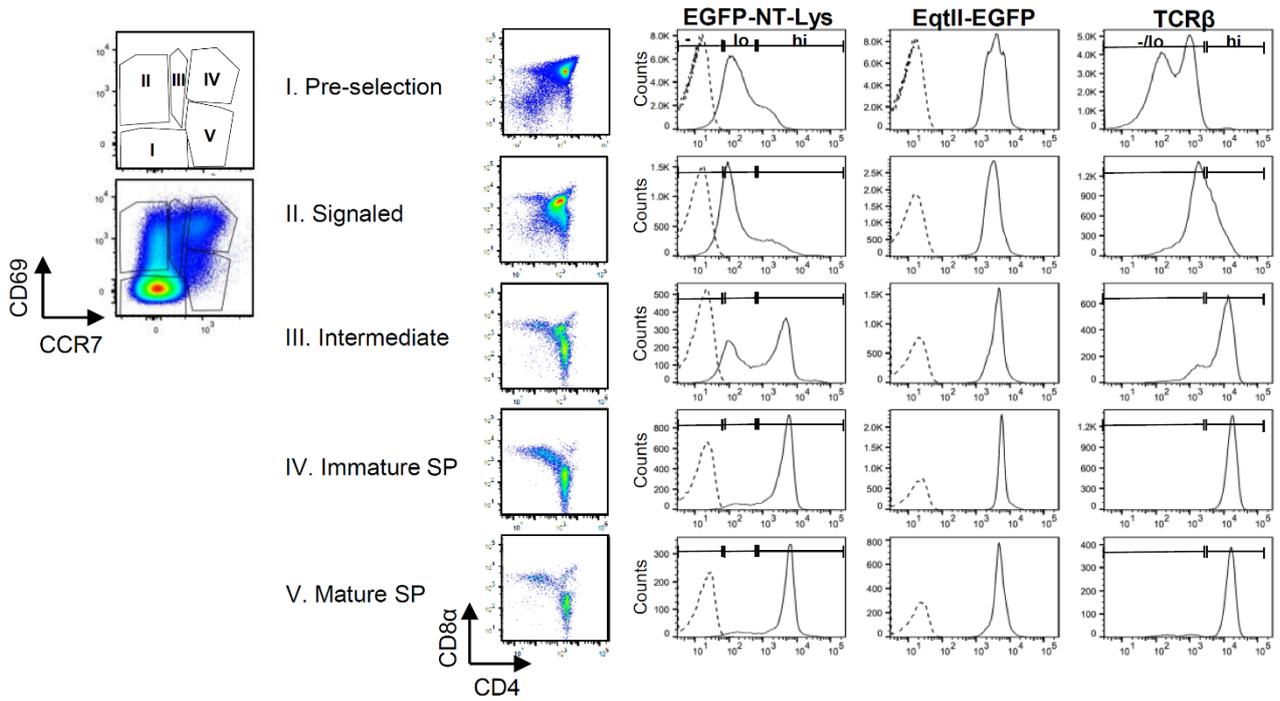


Fig. 9. CD69 と CCR7 の発現パターンに基づく分類におけるスフィンゴミエリン発現  
 胸腺細胞を CD69 と CCR7 の発現パターンにより 5 段階に分類し, 各段階の EGFP-NT-Lys(左),  
 EqtII-EGFP(中央), TCRβ(右)の発現レベルを FACS にて解析した. 実線:染色あり. 点線:無染色.  
 同様の実験を 3 回行ったうち, 代表的な一例.

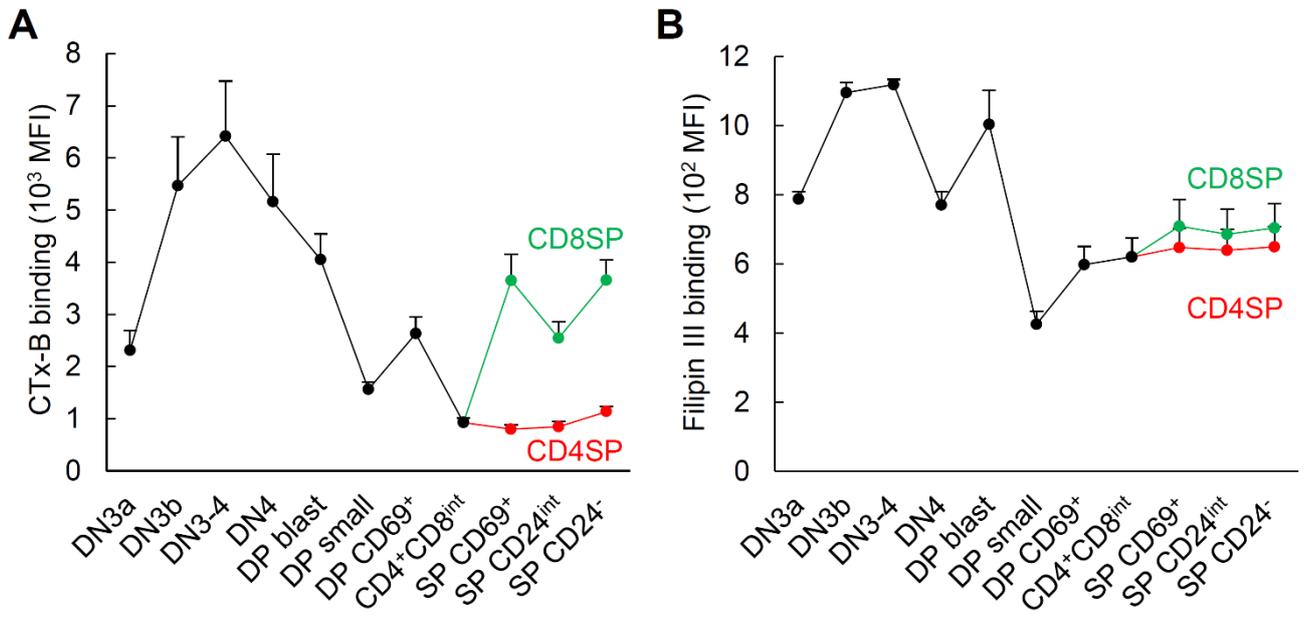


Fig. 10. 野生型マウスの胸腺細胞の一連の分化過程における

CTx-B 結合性ガングリオシドおよびコレステロール発現

胸腺細胞に表面染色および CTx-B 染色 (A) または Filipin III 染色 (B) を行い, FACS で解析した.

データは平均値±標準偏差で表した. n = 3.

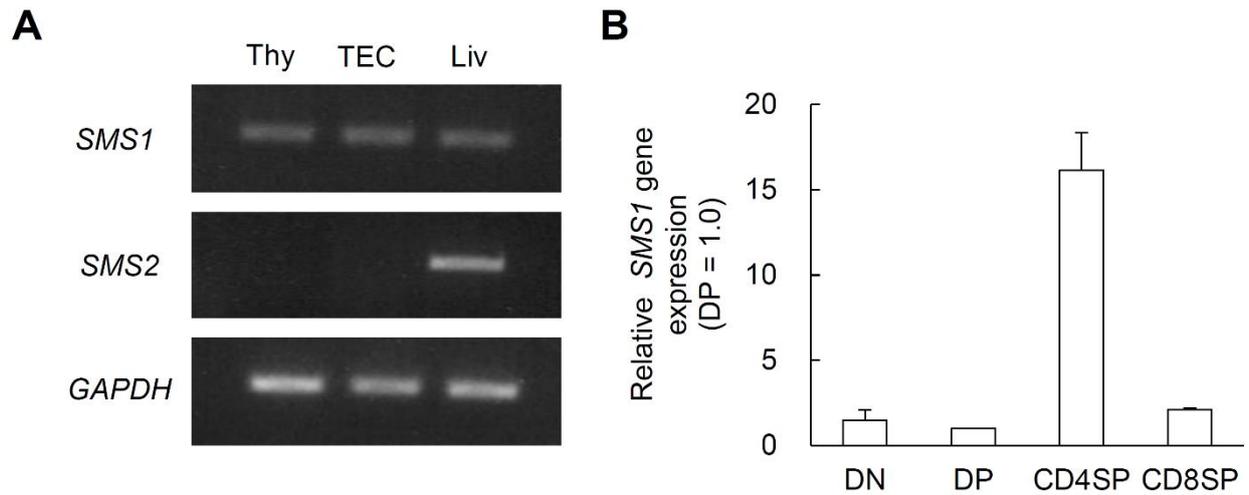


Fig. 11. 胸腺細胞における *SMS* 遺伝子 (*SMS1*, *SMS2*) 発現

(A). 胸腺細胞 (thymocyte, Thy), 胸腺上皮細胞 (thymic epithelial cell, TEC), 肝細胞 (liver cell, Liv) の *SMS1*, *SMS2* の半定量 PCR 解析. 同様の実験を 3 回行ったうち, 代表的な一例. (B). ソートした DN, DP, CD4SP, CD8SP 細胞を用いた *SMS1* の定量 PCR 解析. 細胞ごとに *GAPDH* で補正し, DP 細胞の *SMS1* の発現量を 1.0 として 4 種類の細胞の発現量を比較した. n = 3.

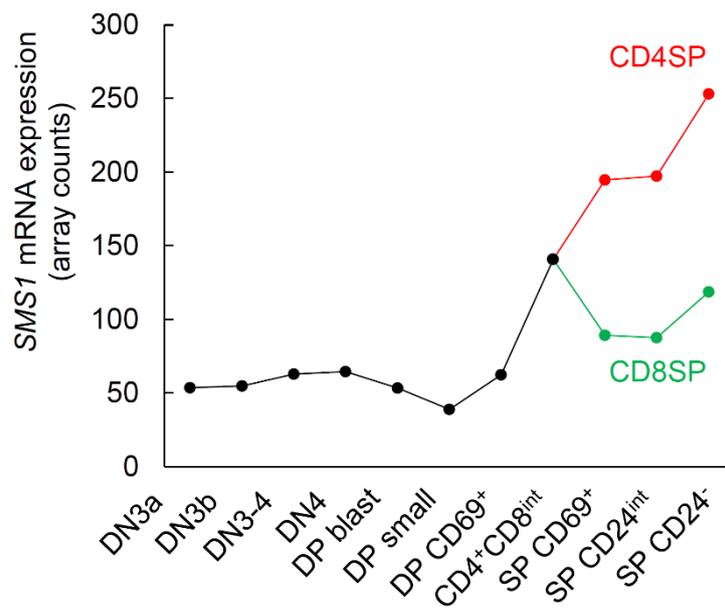


Fig. 12. 胸腺細胞の *SMS1* の DNA マイクロアレイ解析

The Immunological Genome Project のデータをもとに、胸腺細胞の一連の分化過程における *SMS1* の発現量をグラフ化した。

## 第2章 *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞分化におけるスフィンゴリエリン発現の解析

### 第1節 序論

スフィンゴリエリンの機能を解明するために、スフィンゴリエリン発現を制御する方法として、従来から SMS の阻害剤である D609 (tricyclodecan-9-yl-xanthogenate) が用いられてきた。当研究室でも D609 を用いた胸腺細胞の分化におけるスフィンゴリエリン発現の解析を行ってきた。胸腺細胞に TCR 刺激を行い、細胞死を誘導する実験系において、D609 処理では未処理と比較して細胞死が亢進していた(データ非表示)。しかし D609 と同時にスフィンゴリエリンを添加した場合、細胞の生存率は D609 単独処理と比較して少し回復したものの、未処理と同等までは回復しなかった。この実験からは D609 処理による胸腺細胞死の亢進が SMS の阻害作用によるものか否かの証明は困難であった。

第1章において、胸腺細胞の一連の分化過程におけるスフィンゴリエリン発現量の変化が *SMS1* の発現と相関することから、2種類の SMS のうち、胸腺細胞のスフィンゴリエリン発現の増減に大きく寄与しているのは *SMS1* だと考えられる。そこで、胸腺細胞の分化におけるスフィンゴリエリン発現の機能的意義を解析するために、*SMS1* の欠損マウスを用意し、実験に用いた。本章では *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞のスフィンゴリエリン発現を解析した。

スフィンゴリエリンはセラミドから生合成されるが、セラミドはスフィンゴリエリンの他にも様々な GSL の前駆体である (Fig. 2)。代表的な GSL の1つにガングリオシドがある。*SMS1* を欠損させることによって胸腺細胞のスフィンゴリエリン発現が減少するならば、前駆体であるセラミドや他のセラミド誘導体が代償的に増加することも考えられる。そこで本章では *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞の脂質解析および CTx-B をプローブに用い

た FACS 解析を行い, *SMS1* 欠損による脂質発現パターンの変化の有無を検討した.

## 第 2 節 実験材料ならびに実験方法

### 第 1 項 実験材料

これまでより追加したもののみ記載する

Micro PCR Tube (NIPPON Genetics)

### 第 2 項 実験装置

これまでより追加したもののみ記載する

Program Temp.control system PC-320 (ASTECC)

Mupid-EX (株式会社アドバンス)

Printgraph (ATTO)

VIDEO GRAPHIC PRINTER (SONY)

### 第 3 項 試薬

これまでより追加したもののみ記載する

KAPA Taq Extra PCR Kit with dNTPs (kapabiosystems)

DNA ラダーマーカー (WATSON)

proteinase K (WAKO)

Lysis buffer : 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20

CD4-FITC (GK1.5, Bio Legend)

### 第 4 項 実験動物

*SMS1* 欠損マウスは金沢医科大学 岡崎俊郎教授から供与された<sup>15</sup>. *SMS1* 欠損マウスと性別と週齢の等しい同腹仔の野生型およびヘテロ接合型のマウスをコントロールとして実験に用いた. 飼育方法は第 1 章第 2 節第 4 項と同様である. 遺伝子組み換え実験に関しては, 「東北医科薬科大学遺伝子組換え生物等の使用規定」にもとづく承認の下, 学内規則に従って実施した (承認番号 27-5).

### 第 5 項 PCR 法を用いた遺伝子型分析

実験動物の耳片を採取し, 耳片に proteinase K (10 mg/mL) 2  $\mu$ L, Lysis buffer 50  $\mu$ L

を混入し、時々攪拌しながら 55 °C で 1 時間インキュベートした。攪拌後 10 分間沸騰させ、遠心(20400 g, 4 °C, 1 分間)した。その上清を DNA 溶解液とした。実験動物の SMS1 の遺伝子型を確認するため、DNA 溶解液と KAPA Taq Extra PCR Kit with dNTPs を用いた。実験方法は製品の添付書に従った。PCR 条件と用いた primer は以下の通り。

初期変性 95 °C, 2 分間

PCR 反応(35 サイクル)

熱変性 95 °C, 20 秒間

アニーリング 60 °C, 40 秒間

伸長反応 72 °C, 1 分間

最終的な伸長反応 72 °C, 5 分間

冷却 4 °C, 継続

GOR<sub>2</sub>Sap3 (*SMS1* forward primer : TTTGAGGAGAGAGGCCTTGAGTCTC), GOR<sub>2</sub>-R1 (*SMS1* reverse primer : AGGCAGCCACTTCCAGCAGCCAG), PGKneoS (*Neo* reverse primer : TCGCCTTCTATCGCCTTCTTGAC)

PCR により得られた反応生成物は第 1 章第 2 節第 11 項と同様の方法で確認した。野生型のアレルは 0.4 kbp, SMS1 欠損のアレルは 0.6 kbp に検出される。

第 6 項 実験動物からの胸腺細胞の採取

実験動物からの胸腺細胞の採取方法は第 1 章第 2 節第 5 項と同様。

#### 第 7 項 細胞表面スフィンゴミエリンの検出

胸腺細胞の細胞表面スフィンゴミエリンの検出方法は第 1 章第 2 節第 9 項と同様。

#### 第 8 項 胸腺細胞, 血清の脂質解析

胸腺細胞の脂質解析用サンプルの調製は第 1 章第 2 節第 6 項と同様に行った。血漿は尾静脈から採取した後に遠心分離し上清を回収後、凍結乾燥を行った。その後の操作は第 1 章第 2 節第 6 項と同様に行った。TLC による中性スフィンゴ脂質の解析は、中性脂質を TLC 用シリカゲルプレートにスポットした後、クロロホルム / メタノール / 水 = 60 : 25 : 4 の溶媒でプレートの半分程度まで展開した後、デシケーターで 15 分間乾燥させ、ヘキサン / ジエチルエーテル / 酢酸 = 50 : 50 : 1 の溶媒で再度展開した。展開後、デシケーターで 15 分間乾燥させ、銅リン酸試薬を TLC 用シリカゲルプレート全体に噴霧し、約 180 °C で加熱してスフィンゴ脂質を検出した。

#### 第 9 項 FACS による細胞表面脂質の検出

細胞表面スフィンゴミエリンの検出および CTx-B 結合性ガングリオシドの検出方法は第 1 章第 2 節第 9 項と同様。細胞表面セラミド発現は、胸腺細胞を 4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) にて室温で 15 分間固定し、0.1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 含 PBS にて室温で 15 分間ブロッキングをし、10%正常ヤギ血清を含む PBS に抗セラミド抗体 (マウス IgM) あるいはコントロールマウス IgM を加えた染色液にて 37 °C で 1 時間インキュベートし、10%正常ヤギ血清を含む PBS に PE 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体にて室温で 1 時間インキュベートした後、FACS (FACS AriaII) にてデータを採取し、FlowJo ソフトウェアを用いて解析した。

## 第 10 項 統計処理

統計処理方法は第 1 章第 2 節第 14 項と同様である。

## 第 3 節 実験結果

### 第 1 項 *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞のスフィンゴミエリン発現

*SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞のスフィンゴミエリン発現を解析するため、*SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞の TLC による脂質解析を行った。これまでに *SMS1* 欠損マウスの血清ではスフィンゴミエリン量が 50%程度に減少することが報告されている<sup>38</sup>。我々の解析でも同様に *SMS1* 欠損マウスの血漿中のスフィンゴミエリン量は 46%残存していた (Fig. 13A)。一方で *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞ではコントロールマウスの胸腺細胞と比べてスフィンゴミエリン量が 10%以下に低下していた (Fig. 13A, B)。 *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞のスフィンゴミエリン発現をより詳細に解析するため、FACS 解析を行った。DN, DP, SP 細胞の分化段階ごとの Lys 染色と EqtII 染色を行ったところ、*SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞におけるスフィンゴミエリンマイクロドメイン発現はほぼ消失し、分散したスフィンゴミエリン発現はやや残存が認められた (Fig. 14)。

### 第 2 項 *SMS1* 欠損による胸腺細胞の脂質発現変化の解析

セラミドはスフィンゴミエリンや GSL の前駆体であるため、*SMS1* の欠損によるセラミド発現レベルの変化を調べた。形質膜のセラミド発現は *SMS1* 欠損胸腺細胞において変化は認められず、*SMS1* の欠損による代償的なセラミドの増加は認められなかった (Fig. 15A)。また CTx-B 結合性ガングリオシドは *SMS1* 欠損マウスの CD4SP 細胞でのみ増加が認められたが、他の細胞では変化がなかった (Fig. 15B)。胸腺細胞では *SMS1* の欠損によるスフィンゴ脂質の代償的な増加はほとんど認められなかった。

## 考察

本章では胸腺細胞におけるスフィンゴリエリン発現の機能的意義を解析するため、*SMS1* 欠損マウスを用意し、胸腺細胞のスフィンゴリエリン発現を解析した。胸腺細胞の脂質解析の結果 (Fig. 13) から、*SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞ではスフィンゴリエリン発現量がコントロールマウスと比べて著しく低下していることが判明した。さらに FACS による胸腺細胞の Lys 染色と EqtII 染色の結果から (Fig. 14), *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞ではコントロールマウスで見られていた分化に伴うスフィンゴリエリン発現量の増減が認められず、分化の各段階で著しく低下していることが明らかとなった。以上から、胸腺細胞におけるスフィンゴリエリン発現の増減には *SMS1* が大きく寄与していると考えられる。*SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞でスフィンゴリエリン発現が完全に無くならない理由は主に2点が挙げられる。1つ目は、*SMS* のもう1つのアイソタイプである *SMS2* が微量に存在しており、それによって微量のスフィンゴリエリンが合成されていることが考えられる。2つ目の理由としては、血清中に含まれるスフィンゴリエリンが胸腺へ運ばれて胸腺細胞に取り込まれている可能性が挙げられる。*SMS1* 欠損マウスの血清の脂質解析では、スフィンゴリエリン量は低下し、グルコシルセラミドは増加傾向にあった (Fig. 13A)。この結果は、*SMS1* 欠損マウスでは血清のスフィンゴリエリン量が約 3 分の 1 に低下し、グルコシルセラミドは約 7 倍増加するという過去の報告と一致している<sup>38</sup>。他にも *SMS1* 欠損マウスの血清ではガングリオシドの一種である GM3 も増加するという報告がある<sup>38</sup>。一方で *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞では、脂質解析およびコレラ染色の結果から、セラミドおよびセラミド誘導体の発現量に大きな変化は見られなかった (Fig. 13, 15)。今後さらなる詳細な定量は必要だが、胸腺細胞の分化においては、各々の脂質が必要量発現するように厳密に制御されており、他の因子によって発現が左右されない可能性もある。

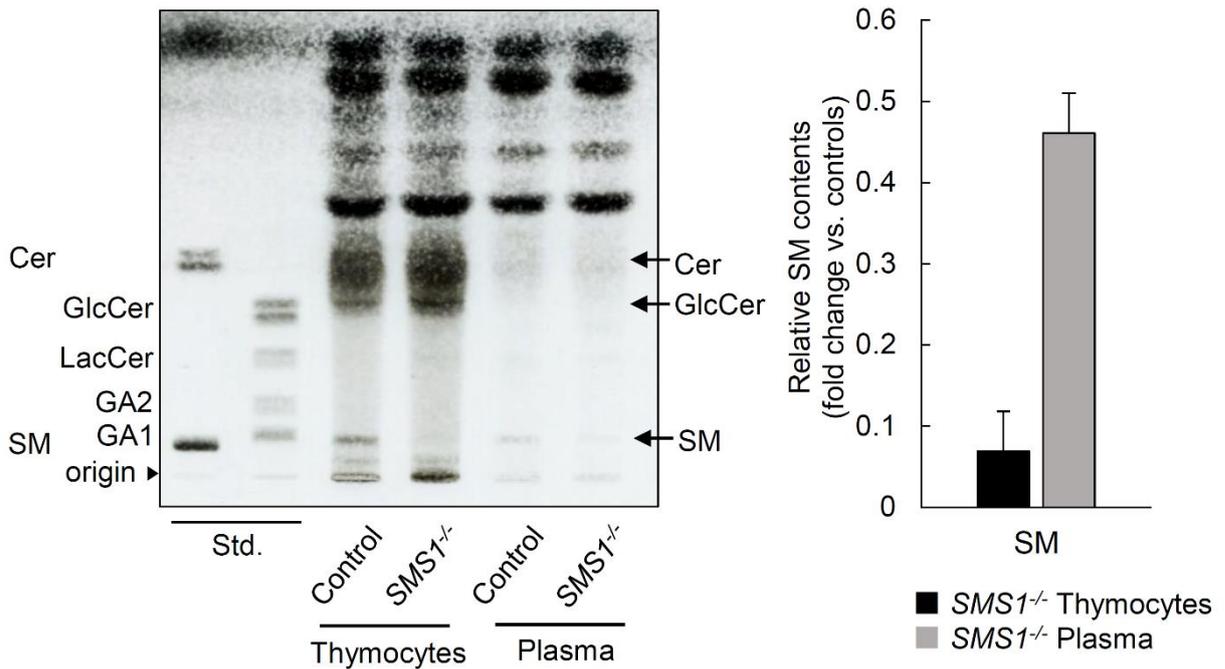
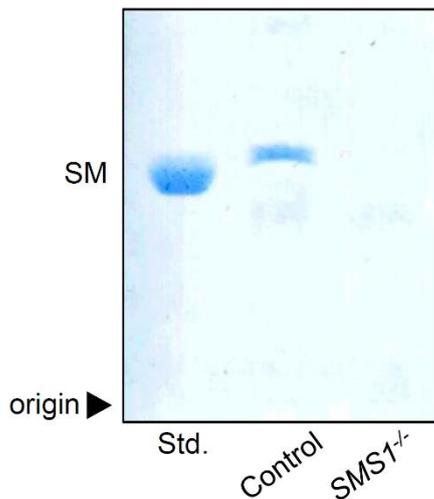
**A****B**

Fig. 13. コントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞および血清の脂質解析

(A) コントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞 (1 mg protein 相当) と血清 (20  $\mu$ L) の中性脂質を TLC により展開し、銅リン酸により脂質を検出した。コントロールマウスに対する *SMS1* 欠損マウスのスフィンゴミエリン量の相対変化量を ImageJ ソフトウェアを用いて解析し、グラフ化した。Std.: standard lipid. Cer: セラミド. SM: スフィンゴミエリン. GlcCer: グルコシルセラミド. LacCer: ラクトシルセラミド. n = 3. (B) コントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞 (1 mg protein 相当) の中性脂質を TLC により展開し、Dittmer 試薬によりスフィンゴミエリンを検出した。同様の実験を 3 回行ったうち、代表的な一例。

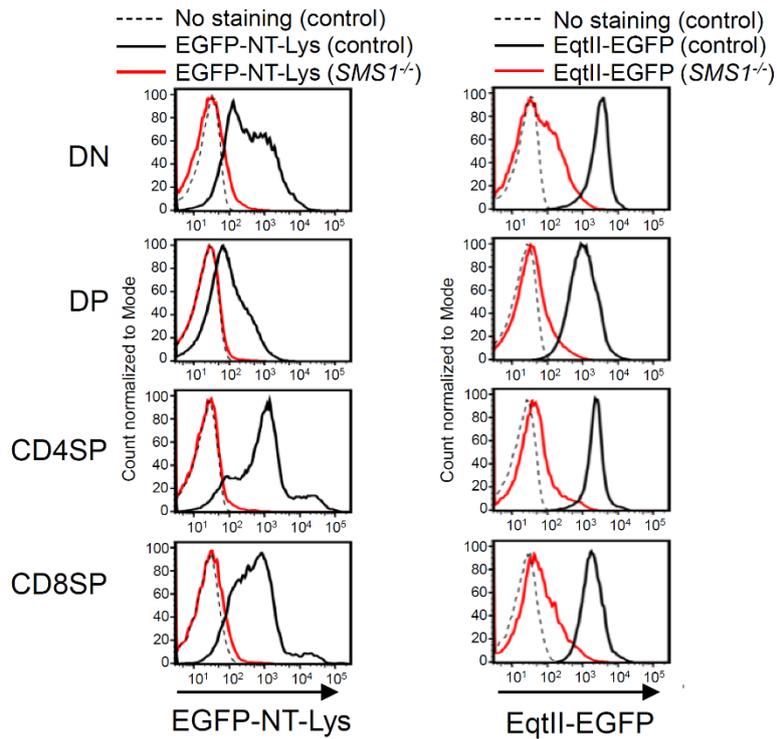


Fig. 14. *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞の

スフィンゴミエリンマイクロドメインおよび分散したスフィンゴミエリン発現量

コントロールマウスおよび *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞に表面染色および Lys 染色 (左) または EqtlII 染色 (右) を行い, 分化段階ごとのヒストグラムを示した. 点線: コントロールマウスの無染色. 実線 (黒): コントロールマウスの Lys 染色. 実線 (赤): *SMS1* 欠損マウスの Lys 染色. 左: n=4. 右: n=3.

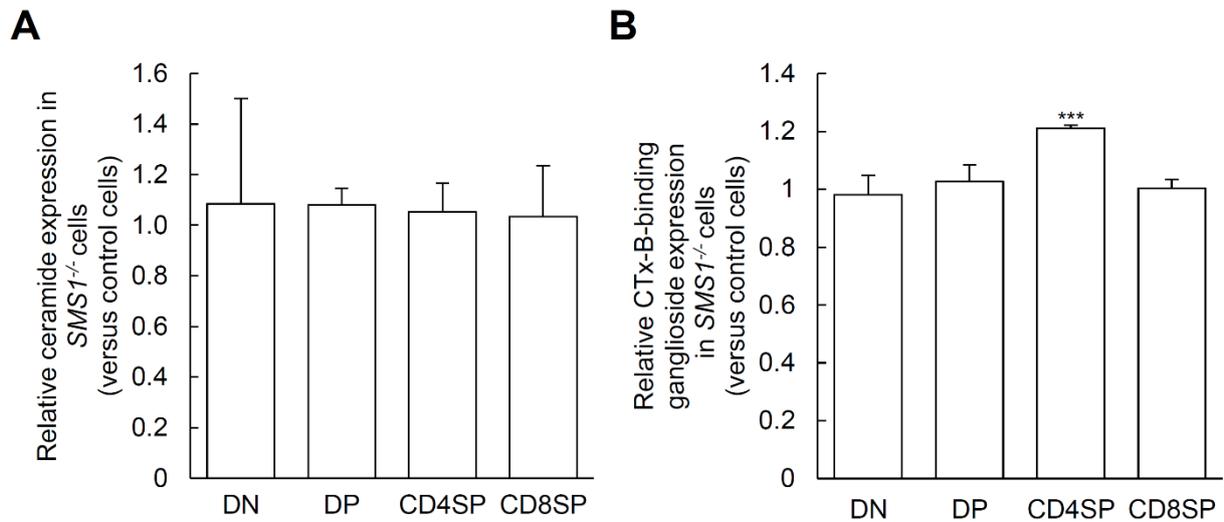


Fig. 15. *SMS1* 欠損による胸腺細胞のスフィンゴ脂質発現変化の解析

コントロールマウスおよび *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞に表面染色およびセラミド染色(A)または CTx-B 染色(B)を行い, FACS 解析にて分化段階ごとの MFI 値を求めた. データはコントロールマウスの MFI 値を 1.0 とした際の *SMS1* 欠損マウスの相対発現量を示した. n = 3. \*\*\* $p < 0.001$ .

## 第3章 胸腺細胞分化におけるスフィンゴミエリン発現の機能的意義の解析

### 第1節 序論

#### 第1項 胸腺細胞分化の生理学的意義

胸腺細胞の分化機構が複雑で多段階の過程を経るのは、免疫応答に適切な機能を持った T 細胞のみを末梢組織へ移出させるためである。T 細胞が胸腺内で分化する上で獲得する機能は抗原多様性、抗原特異性、自己寛容性が挙げられる。一つの T 細胞は一種類の抗原しか認識することができない(抗原特異性)。TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の遺伝子再構成を行うことで様々な抗原に反応する T 細胞が産生される(抗原多様性)。そのため、T 細胞の中には自己抗原を認識してしまうものも産生されてしまい、そのような自己反応性 T 細胞が末梢組織へ出ると自己免疫疾患の原因の一つとなる。胸腺において自己反応性 T 細胞を除去する機構が必要であり(自己寛容性)、その機構は正負の選択と呼ばれる(次項参照)。分化段階ごとにチェックポイントを設けることで、分化に失敗した胸腺細胞を排除していき、機能的に成熟した T 細胞のみが末梢組織で働くことができる。

#### 第2項 正負の選択

胸腺細胞の分化において最も重要なイベントが「正負の選択」と呼ばれる自己反応性 T 細胞の除去である(Fig. 16)<sup>39</sup>。正負の選択は DP 段階で生じ、DP 細胞に発現する TCR と胸腺上皮細胞が発現する MHC-自己抗原ペプチド複合体との結合力の強さに依存する<sup>40</sup>。自己抗原を認識する DP 細胞は、強い結合力により、TCR から強いシグナルが入ることでアポトーシスにより除去される(負の選択)。一方で異物を認識する DP 細胞は弱い結合力により、TCR から適度なシグナルが入り、SP 細胞に分化する

(正の選択). また, MHC-自己抗原ペプチド複合体と全く結合せず, TCR からシグナルが入らない DP 細胞もアポトーシスにより除去される (death by neglect). 最終的に適度な刺激の入った DP 細胞のみが SP 細胞へと分化し, 自己反応性の T 細胞は除去される (中枢性寛容). 正負の選択の異常が自己免疫疾患の発症に関与することが報告されており<sup>41</sup>, 自己免疫疾患の発症メカニズムの解明においても重要なイベントであると考えられる.

### 第 3 項 正負の選択の免疫学的解析方法

第 2 章より, *SMS1* 欠損マウスでは胸腺細胞の一連の分化過程において, スフィンゴミエリン発現量が著しく低下していることを確認した. そこで本章では, 胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴミエリン発現の機能的意義を解析するため, *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞の分化を解析した. 第 1 章にて, 正負の選択が生じる前後でスフィンゴミエリンマイクロドメインの発現量が顕著に増加することを見出したので, 正負の選択のモデルである TCR トランスジェニックマウスを用いた. 通常, TCR は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖がそれぞれ遺伝子再構成を行うことで多様性を獲得し, 様々な抗原に反応する TCR を有した T 細胞が産生されるために, マウス間で TCR の機能を比較検討することは困難である. したがって, 認識する抗原が明らかとなっている TCR の遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いることで, 正の選択および負の選択いずれかにおけるスフィンゴミエリン発現の機能的意義を解析することができる.

#### • OT-I TCR トランスジェニックマウス

卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) の 257-264 残基を認識する TCR の遺伝子 ( $V\alpha_2$ ,  $V\beta_5$ ) を過剰発現させたマウス. この TCR をもつ未熟 T 細胞は MHC I 拘束性であり, 正の選択を受け CD8SP へ分化する. このマウスは雌雄に関わらず正の選択のモデル

マウスとなる。

・HY TCRトランスジェニックマウス

HY 抗原 (Histocompatibility Y antigen) を認識する TCR を過剰発現させたマウス。HY 抗原は、Y 染色体の SRY 遺伝子上に存在する遺伝子によって作られるオスにのみ発現するタンパク質であり、このタンパク質はオスの生殖腺原基を精巣に分化させる作用をもつ。したがってオスの HY TCR トランスジェニックマウスは自己抗原を認識する T 細胞として負の選択のモデルマウスとなるが、一方メスの場合は異物を認識する T 細胞として正の選択のモデルマウスとなる。この TCR をもつ未熟 T 細胞は MHC I 拘束性であり、正の選択を受け CD8SP へ分化する。

第 2 節 実験材料ならびに実験方法

第 1 項 実験材料

第 1 章, 第 2 章から追加したもののみ記載する。

第 2 項 実験装置

第 1 章, 第 2 章から追加したもののみ記載する。

実体顕微鏡 (SZX7, OLYMPUS)  
フローサイトメーター (FACS Calibur, BD Biosciences)

第 3 項 試薬

第 1 章, 第 2 章から追加したもののみ記載する。

CD24-PE/Cy7 (M1/69, Bio Legend)  
Qa2-Alexa647 (695H1-9-9, Bio Legend)  
CD69-PE/Cy7 (H1.2F3, Bio Legend)  
CCR7-Alexa647 (4B12, Bio Legend)  
TCRV $\alpha_2$ -FITC (B20.1, Bio Legend)  
TCRV $\beta_{5.1,5.2}$ -PE (MR9-4, Bio Legend)  
HY-PE (MR14-1, Bio Legend)

#### 第 4 項 実験動物

実験動物は第 2 章第 2 節第 4 項と同様. 飼育方法は第 1 章第 2 節第 4 項と同様. HY TCR トランスジェニックマウスと OT-I TCR トランスジェニックマウスは京都大学ウイルス研究所 生田宏一教授より供与された<sup>42,43</sup>. 各トランスジェニックマウスと *SMS1* 欠損マウスを掛け合わせることにより, HY *SMS1* 欠損マウスおよび OT-I *SMS1* 欠損マウスを得た.

#### 第 5 項 PCR 法を用いた遺伝子型分析

実験動物からの DNA の抽出, PCR 法は第 2 章第 2 節第 5 項と同様.

#### 第 6 項 FACS 解析を用いたトランスジェニックマウスの遺伝子導入率の確認

##### 6-1 HY TCR トランスジェニックマウス

0.5 mL tube に FACS buffer を 20  $\mu$ L ずつ入れ, そこへマウスの尻尾より血液を 2, 3 滴採取した. 各 tube に CD3-FITC (200 倍希釈), HY-TCR-PE (300 倍希釈)を加え, 遮光し 4 °C で 25 分間インキュベートした. その後 FACS buffer 300  $\mu$ L を加え, フローサイトメーターを用いて細胞を取り込んだ. 全細胞中 CD3<sup>hi</sup> の細胞を T 細胞と見なし, CD3<sup>hi</sup> の細胞中 HY-TCR<sup>hi</sup> の割合を遺伝子導入率とした.

##### 6-2 OT-I TCR トランスジェニックマウス

上記と同様の方法で血液を採取し, 各サンプルに CD4-PE, CD8-APC (いずれも 300 倍希釈)を加え, 遮光し 4 °C で 25 分間インキュベートした. その後 FACS buffer 300  $\mu$ L を加え, フローサイトメーターを用いて細胞を取り込んだ. 取り込んだ細胞の中から CD4<sup>hi</sup> または CD8<sup>hi</sup> の細胞を T 細胞と見なし, T 細胞における CD8<sup>hi</sup> 細胞の割合を遺伝子導入率とした.

## 第 7 項 実験動物からの胸腺細胞の採取

実験動物からの T 細胞の採取方法は第 1 章第 2 節第 5 項と同様.

## 第 8 項 胸腺細胞表面マーカーの染色

胸腺細胞, 脾臓細胞ともに, FACS buffer にて  $5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$  に調製し, 1.5 mL tube に  $100 \mu\text{L}$  ずつ取った. 遠心 (800 g, 4 °C, 3 分間), 上清除去後, 各細胞表面マーカーに対する抗体 (100 倍希釈) を加え, 遮光し, 4 °C で 25 分間インキュベートした. FACS buffer  $400 \mu\text{L}$  で 2 度洗浄, 遠心 (800 g, 4 °C, 3 分間), 上清除去後 FACS buffer  $200 \mu\text{L}$  に再懸濁し, フローサイトメーターを用いて細胞を取り込んで解析した.

## 第 9 項 統計処理

2 群間の比較には, はじめに F 検定を行い, 等分散か否かを検定した. 等分散の場合には Student's t-test を, 不等分散の場合には Welch's t-test を用いて, コントロールマウスに対して危険率 5%以下 ( $p < 0.05$ ) の場合を統計学的に有意差があるものとした. なお, 危険率に関しては,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  で示した.

## 第 3 節 実験結果

### 第 1 項 SMSI 欠損マウスの胸腺細胞分化の解析

SMSI の欠損による胸腺細胞分化の影響を解析するため, コントロールマウスおよび SMSI 欠損マウスから胸腺細胞と脾臓細胞を採取し, 細胞数を比較したところ, 胸腺細胞と脾臓細胞いずれにおいても差は認められなかった (Fig. 17). 次に胸腺細胞について各分化段階の割合を比較した. SMSI 欠損マウスでは DP 細胞の割合が有意に低下していた (Fig. 18B). DN 細胞をさらに DN1 から DN4 に細分化し, 各割合を比較したところ, いずれも SMSI の欠損による変化は認められなかった (Fig. 18A). 胸腺細

胞から分化・成熟する T 細胞には、最終的にヘルパーT 細胞やキラーT 細胞に分化する以外にも様々な細胞系列が存在する。そのようなサブポピュレーションの割合が *SMS1* 欠損によって変化するか否かを調べるため、 $\gamma\delta$ T 細胞と制御性 T 細胞の割合を比較したところ、いずれもコントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスで変化はみられなかった (Fig. 19)。

## 第 2 項 *SMS1* 欠損による正の選択への影響

通常のマウスには抗原多様性があり、個々の TCR の機能を比較することが困難である。TCR からのシグナル伝達を介して生じる正負の選択の反応を見る際に多様な TCR レパートリーが結果をマスクしてしまう可能性がある。そこで我々は単一の TCR のみを発現した OT-I TCR トランスジェニックマウスと HY TCR トランスジェニックマウスに *SMS1* 欠損を掛け合わせ、それぞれのマウスにおける *SMS1* 欠損の影響を調べた。正の選択のモデルとして用いた OT-I TCR トランスジェニックマウスとメスの HY TCR トランスジェニックマウスの多くの DP 細胞は、正の選択を受け CD8SP 細胞に分化する。これらのマウスに *SMS1* 欠損を掛け合わせると、コントロールマウスに比べて胸腺細胞数が有意に減少しており (Fig. 20A, B), さらに DN, DP, CD8SP に分けてそれぞれの細胞数をコントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスで比較すると、DP 細胞と CD8SP 細胞数が顕著に減少していた (Fig. 20C, D)。また、正負の選択における *SMS1* 欠損の影響を検討するため、OT-I TCR トランスジェニックマウスの胸腺細胞において、CD69 と CCR7 の発現パターンによる分類を行った。*SMS1* 欠損 OT-I TCR トランスジェニックマウスでは stage II CD69<sup>hi</sup>CCR7<sup>lo</sup>細胞から stage IV CD69<sup>hi</sup>CCR7<sup>hi</sup>細胞が減少していた (Fig. 21)。これらの結果より、*SMS1* の欠損によって正の選択が低下すると考えられる。

### 第3項 *SMS1* 欠損による負の選択への影響

オスの HY TCR トランスジェニックマウスは自己抗原を認識する TCR を過剰発現しているため, DP 細胞の多くはメスとは対照的に負の選択により除去され, 負の選択を免れた一部は CD8SP に分化する特性をもつ. オスの HY TCR トランスジェニックマウスを用いて負の選択における *SMS1* 欠損の影響を調べた. オスの HY TCR トランスジェニックマウスでは *SMS1* 欠損により, 全体の胸腺細胞数には変化がなかったものの, CD8SP 細胞の数が極めて有意に減少していた (Fig. 22). つまり, *SMS1* の欠損によって負の選択が亢進していると考えられる.

## 考察

本章では胸腺細胞の分化過程におけるスフィンゴリエリン発現の機能的意義を解析するため、*SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞の分化を解析した。*SMS1* 欠損マウスではコントロールマウスと比べてわずかではあるが有意に DP 細胞の割合が減少していた (Fig. 18). DN 細胞を細分化し解析すると両者に違いは見られなかった (Fig. 18). 第 1 章より、胸腺細胞分化の初期段階ではスフィンゴリエリン発現が高く、DP 段階へ分化するに従って発現量が低下する (Fig. 5). 初期分化ではスフィンゴリエリン発現量が低下する必要がある可能性があり、*SMS1* 欠損マウスでは初期段階から発現量が低いため、*SMS1* 欠損による影響があまり見られなかったことが考えられる。胸腺細胞の初期分化におけるスフィンゴリエリン発現の意義については、今後詳細な検討が必要である。

TCR トランスジェニックマウスを用いた解析により、*SMS1* 欠損胸腺細胞では正の選択後の胸腺細胞数が減少していた (Fig. 20C, D). なかでも正負の選択の後期である CD69<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>細胞の減少が顕著であった (Fig. 21). 細胞割合が減少するタイミングと、スフィンゴリエリン発現が増加するタイミングは一致する (Fig. 9, 21). すなわち分化後期段階の細胞割合が減少しているのは、*SMS1* 欠損によって第 III 段階から増加すべきスフィンゴリエリンの発現が増加しないためではないかと考えられる。オスの HY TCR トランスジェニックマウスは、*SMS1* の欠損により CD8SP の割合が減少していた (Fig. 22). これは *SMS1* 欠損によって負の選択が亢進したことにより、DP から CD8SP に分化できた細胞が減少したためと考えられる。一般的に正の選択は負の選択に先立って生じる。*SMS1* 欠損マウスでは正の選択の後期に障害が生じ、一方で負の選択は亢進していると考えられる。

正負の選択では DP 細胞上に発現する TCR と胸腺上皮細胞に発現する MHC-自己抗原ペプチド複合体との結合力の強さが考慮される。結合力の強さとは個々の TCR の結合力 (affinity) と全体の結合力 (avidity) の総和を示している<sup>39</sup>。結合力の強

さが閾値を超えると負の選択により細胞死が起こる。SMSI 欠損マウスの場合には形質膜上にスフィンゴミエリンマイクロドメインが形成しないことによって、シグナルの閾値が低下し、コントロールでは正の選択により SP 細胞に分化できた DP 細胞も細胞死が起こり除去されているのではないかと考えられる。この仮説が正しいとするならば、胸腺細胞分化の解析で SMSI 欠損マウスでは DP 細胞の割合が野生型マウスと比べて有意に減少していたのは (Fig. 18B), コントロールマウスと TCR の質は変化がなかったとしても、シグナルの閾値が低下したために負の選択が亢進していた可能性がある。他の分画が有意に増加していたのは、DP 細胞の割合が減少したために相対的に増加していたと考えられる。

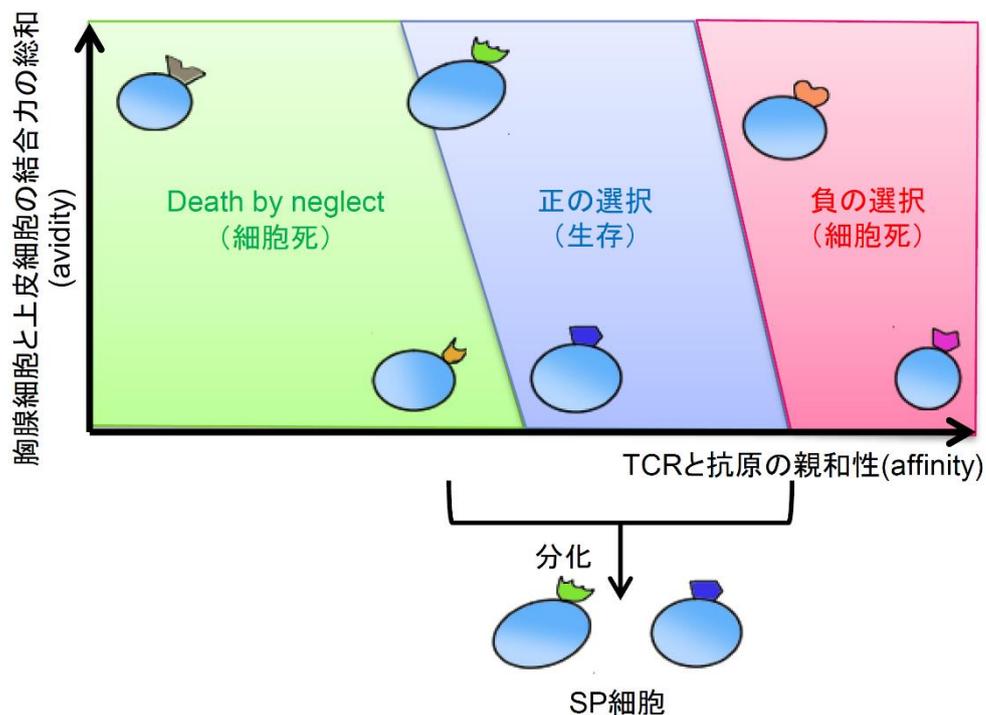


Fig. 16. 正負の選択における TCR affinity と avidity

胸腺細胞が自己寛容性を獲得するためのイベントが正負の選択は、DP 細胞に発現する TCR と胸腺上皮細胞が提示する自己抗原との結合親和性の強さによって生じる。結合親和性は個々の TCR の抗原に対する親和性と DP 細胞上の TCR 全体の結合力が考慮され、閾値を超えた、結合親和性の強い DP 細胞は自己抗原を認識する自己反応性 T 細胞として負の選択により除去され、適度な結合親和性をもつ DP 細胞のみが正の選択を経て成熟 T 細胞に分化することができる。一方、結合親和性の弱い DP 細胞も Death by neglect により除去される。

(*Advances in Immunology*, 2015, 125:87-110 改変, Ref 39)

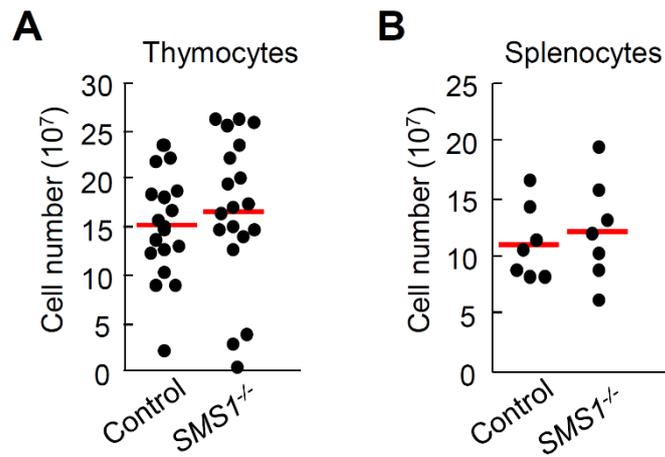


Fig. 17. コントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞数および脾臓細胞数の比較  
 コントロールマウスおよび *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞数(左)および脾臓細胞数(右). コントロール  
 マウス:n = 17, *SMS1* 欠損マウス n = 19(左), コントロールマウス:n = 7, *SMS1* 欠損マウス n = 7  
 (右).

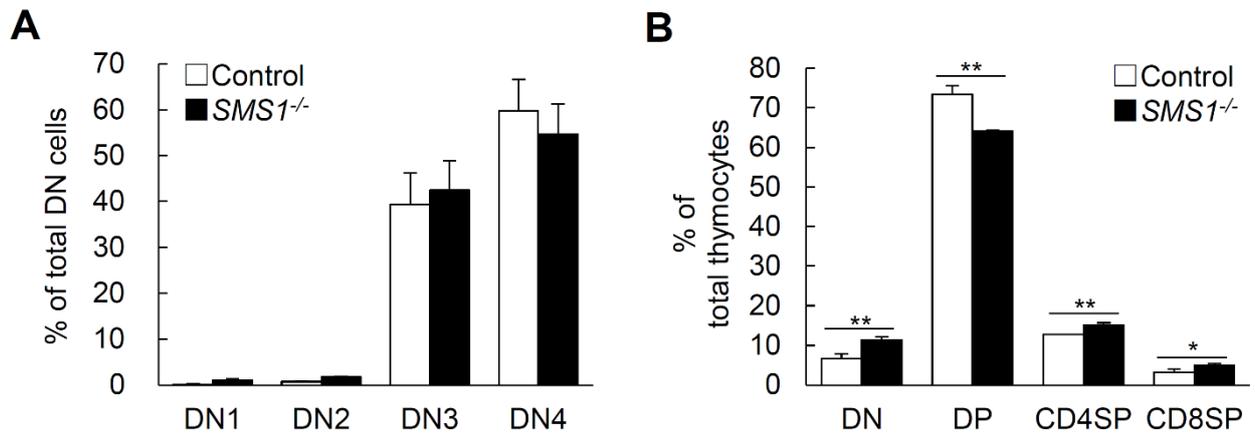


Fig. 18. 胸腺細胞の細胞分画の割合比較

(A)コントロールマウスおよび *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞を DN1 から DN4 に分類し、各分画の割合をグラフ化した。(B)コントロールマウスおよび *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞を DN, DP, CD4SP,CD8SP に分類し、各分画の割合をグラフ化した。データは平均値±標準偏差で表した。いずれも n = 3. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

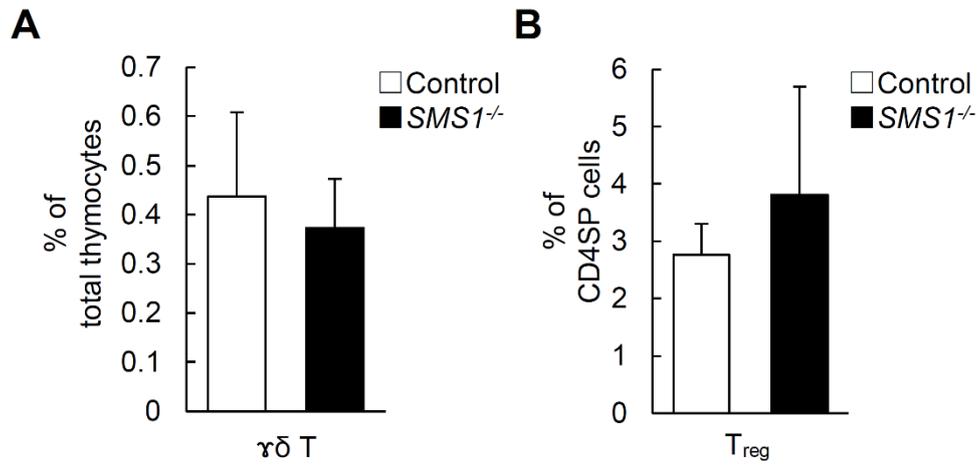


Fig. 19. ̢̳T 細胞および制御性 T 細胞の割合比較

コントロールマウスと SMS1 欠損マウスの胸腺細胞中における ̢̳T 細胞の割合 (A) および CD4SP 細胞における制御性 T 細胞 (T<sub>reg</sub>) の割合 (B). データは平均値±標準偏差で表した. いずれも n = 3.

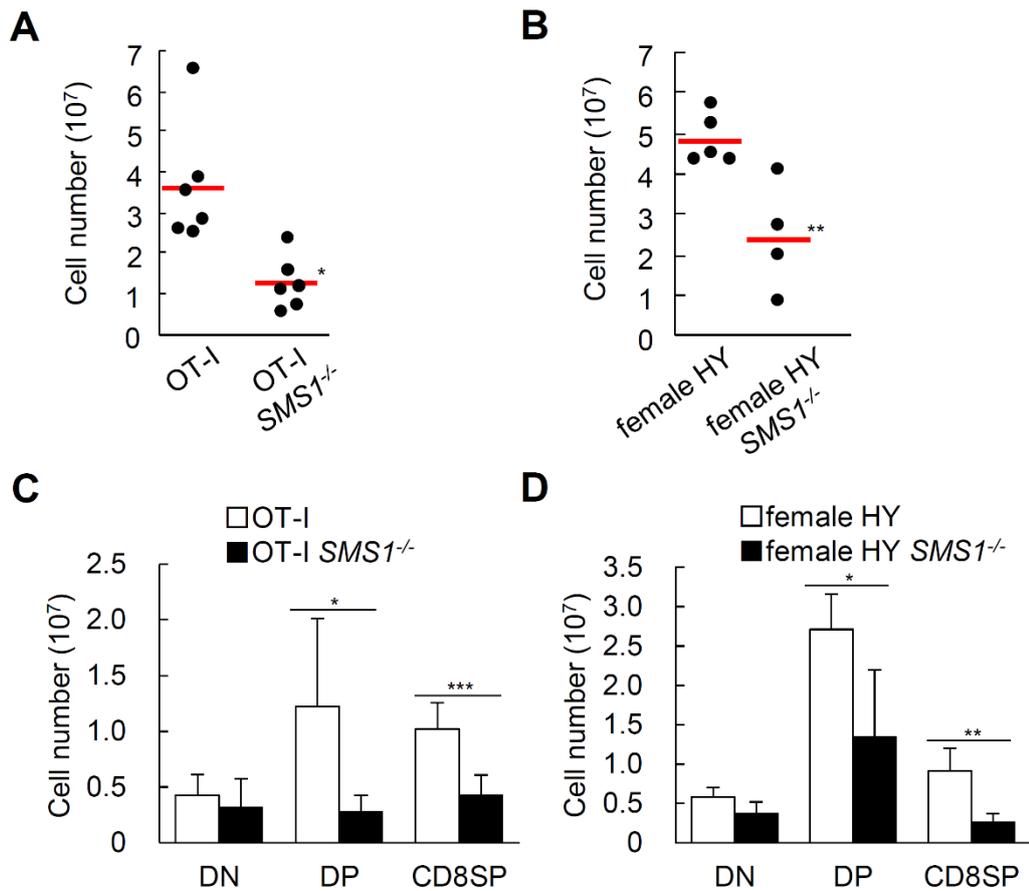


Fig. 20. 正の選択のモデルマウスを用いた *SMS1* 欠損による影響

(A, B) 各マウスの胸腺細胞数に OT-I TCR ( $V\alpha_2^+V\beta_5^+$ ) 陽性率を掛けた数 (A) および HY TCR 陽性率を掛けた数 (B) をグラフ化した. 点は個々のマウスの値を表し, 赤いバーは平均値を表す. いずれも  $n=6$  (A). メス HY マウス,  $n=5$ ; メス HY *SMS1* 欠損マウス,  $n=4$  (B). (C, D) CD4 と CD8 の発現パターンによって分類した各分画の割合に (A) の OT-I TCR 陽性胸腺細胞数を掛けたもの (C) および (B) の HY TCR 陽性胸腺細胞数を掛けたもの (D) をグラフ化した. いずれも  $n=6$  (C). メス HY マウス,  $n=5$ ; メス HY *SMS1* 欠損マウス,  $n=4$  (D). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

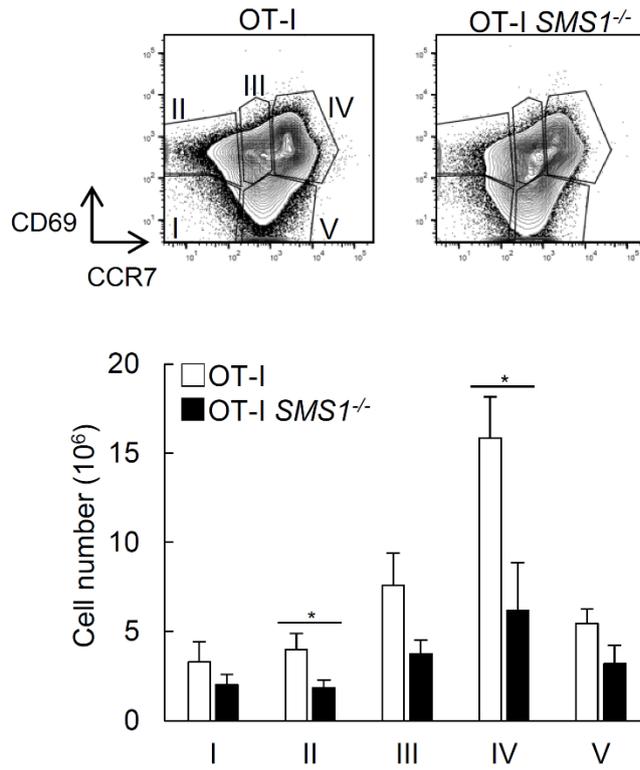


Fig. 21. OT-I TCR トランスジェニックマウスにおける *SMS1* 欠損の影響

CD69 と CCR7 の発現パターンを介して胸腺細胞を 5 段階(stage I から V)に分類した各分画の割合に Fig. 20A の OT-I TCR 陽性胸腺細胞数を掛けたもの. いずれも  $n = 3$ .  $*p < 0.05$ .

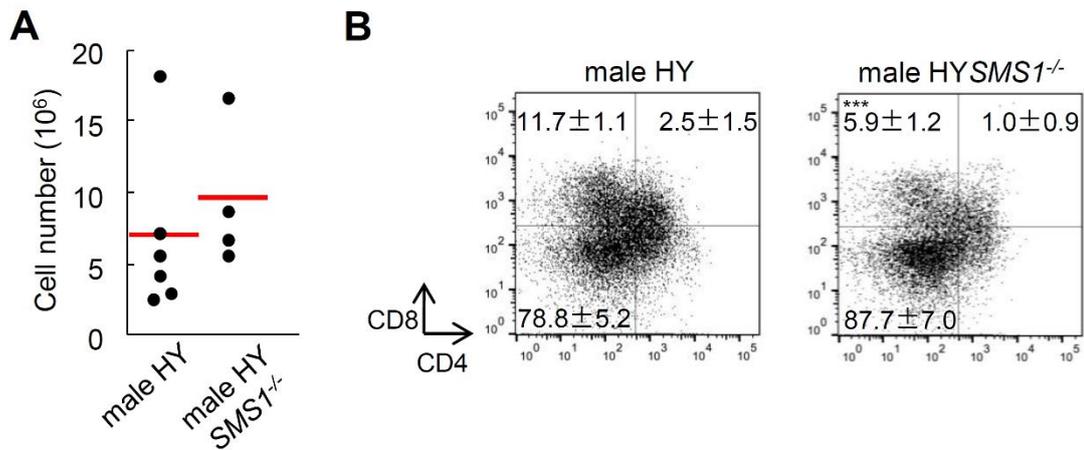


Fig. 22. オスの HY TCR トランスジェニックマウスにおける *SMS1* 欠損の影響

(A) オス HY およびオス HY *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞数に HY TCR 陽性率を掛けた数をグラフ化した。点は個々のマウスの値を表し、赤いバーは平均値を表す。オス HY マウス, n = 6; オス HY *SMS1* 欠損マウス, n = 4. (B) CD4 と CD8 の発現パターンによって分類した各分画の割合に (A) の HY TCR 陽性胸腺細胞数を掛けたものをグラフ化した。オス HY マウス, n = 5; オス HY *SMS1* 欠損マウス, n = 3. \*\*\* $p < 0.001$ .

## 第4章 SMSI 欠損による TCR シグナル強度の変化

### 第1節 序論

SMSI 欠損マウスではこれまでに、活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)の過剰産生による膵臓  $\beta$  細胞の障害によって生じるインスリンの分泌障害, 脂肪組織の減少, 難聴やヘルパーT細胞の機能低下などが報告されている<sup>15,44,45</sup>. 特に SMSI 欠損マウスのヘルパーT細胞では TCR 刺激に伴う細胞増殖や IL-2, IFN- $\gamma$  の産生低下が報告されている. このことから胸腺細胞においてもスフィンゴミエリンマイクロドメインが TCR シグナル伝達に影響を与えることが示唆されるが, 末梢 T 細胞と胸腺細胞では TCR の発現量や TCR シグナル伝達経路が大きく異なるため, 胸腺細胞におけるスフィンゴミエリンマイクロドメインの機能は不明である.

第3章におけるトランスジェニックマウスを用いた解析により, SMSI 欠損マウスの胸腺細胞では正の選択が低下し, 負の選択が亢進していると考えられ, これらはいずれも細胞死の亢進によるものと考えられる. すなわちスフィンゴミエリンマイクロドメインの欠損によって正負の選択の閾値が低下し, 細胞死が亢進している可能性がある. そこで第4章では, SMSI 欠損マウスの胸腺細胞における細胞死の亢進が TCR シグナル伝達の異常によるものか否かを明らかにするとともに, TCR 刺激後の負の選択に関与する TCR シグナル伝達分子の解析を行った.

### 第2節 実験材料ならびに実験方法

#### 第1項 実験材料

これまでより追加したもののみ記載する

Prestained XL-Ladder	(Broad range SP-2120, APRO)
ECL Western Botting Detection Reagents	(9622301, GE Healthcare)
Chemi-Lumi One Super	(L5K5148, nacalai tesque)
Micro BCA Protein Assay Kit	(PG201890, Thermo scientific)

96 well plate (Corning Incorporated)  
PVDF membrane (Immunobilon-P Transfer Membrane, Millipore)

## 第2項 実験装置

これまでより追加したもののみ記載する

ゲル電気泳動装置 (BE-210, BIO CRAFT)  
ウエット型転写用装置 (Mini Trans-Blot Cell, BIO RAD)

## 第3項 試薬

これまでより追加したもののみ記載する

Component C : 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>

PBS-PI : PBS, 5 mM EDTA, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

T cell Lysis buffer : 25 mM Tris-HCl (pH7.6), 120 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH8.0), 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 1% TX-100, 1% Deoxycholate-Na, 1 mM PMSF, x 25dil Complete

5 x NR SDS sample buffer : 5% SDS, 50% Glycerol, 0.1% BPB, 250 mM Tris-HCl (pH6.8)

5 x R SDS sample buffer : 5x NR SDS sample buffer 1mL, 50 mM 2ME 150 μL

running buffer : 25 mM Tris, 191 mM glycine, 0.1% SDS

TS-T<sub>20</sub> : 33.3 mM Tris, 60 mM NaCl, 0.1% Tween20

転写バッファー : 50 mM Tris, 400 mM Glycine, 20% MeOH, 0.01% SDS

CD8-PE (53-6.7, Bio Legend)

CD5-Alexa647 (53-7.3, Bio Legend)

抗 CD3 抗体 (2C11, B133074, Bio Legend)

抗 CD28 抗体 (PV-1, Southern Biotechnology)

Annexin-V-FITC (11011035, ENZO)

7-AAD Viability Staining Solution (B154962, Bio Legend)

PI (B153728, Bio Legend)

Erk5 antibody (#3372, Cell Signaling)

Phospho-Erk5 (Thr218/Tyr220) antibody (#3371, Cell Signaling)

Bim (C34C5) Rabbit mAb (#2933, Cell Signaling)

monoclonal anti β-actin (AC-15, SIGMA)

## 第4項 実験動物

実験動物は第2章第2節第4項と同様。飼育方法は第1章第2節第4項と同様。

## 第 5 項 胸腺細胞のアポトーシス誘導およびアポトーシスの検出

### 5-1 抗 CD3 抗体の腹腔内投与による胸腺細胞のアポトーシスの誘導

TCR 刺激による胸腺細胞のアポトーシスを誘導するため, TCR 複合体の構成分子である CD3 $\epsilon$  に対する刺激抗体(クローン 2C11)を用いた. 野生型および *SMS1* 欠損マウスに抗 CD3 抗体 (3  $\mu$ g) を腹腔内投与し, 24 時間後同量の 3  $\mu$ g を再度腹腔内投与した. 同量の 0.9%生理食塩水のみを腹腔内投与したマウスをコントロールとして用いた. さらに 24 時間後, 吸入麻酔によりマウスを安楽死させ, 胸腺細胞を第 1 章第 2 節第 5 項と同様の方法で採取した. 胸腺細胞の表面染色方法は第 3 章第 2 節第 8 項と同様である.

### 5-2 *in vitro* での胸腺細胞のアポトーシスの誘導

第 1 章第 2 節第 5 項と同様の方法でマウスより胸腺細胞を採取した. 96 well plate に胸腺細胞を  $5 \times 10^5$ /well 入れ, 下記の条件で刺激を行い, 37 °C CO<sub>2</sub> 濃度 5%のインキュベーターで 18 時間培養した. 培養開始から 18 時間後, ピペッティングで細胞を plate から剥離し, 0.5 mL tube へ移した. 第 3 章第 2 節第 7 項と同様の方法で回収した胸腺細胞の表面染色を行った.

培養条件は以下の通り.

1. 固相化した抗 CD3 抗体/ 抗 CD28 抗体 (1  $\mu$ g/mL / 5  $\mu$ g/mL) による TCR 刺激
2. PMA/ionomycin (50 ng/mL / 1  $\mu$ M)
3. 3 nM dexamethasone

### 5-3 アポトーシスの検出

アポトーシスの検出として, 室温の 1 x annexin-binding buffer (Component C を精製水にて 5 倍に希釈) を 50  $\mu$ L 入れ, Annexin-V-FITC (1000 倍希釈), 7-AAD (50  $\mu$ g/mL)

を 2.5  $\mu\text{L}$  入れ, 遮光し, 室温で 15 分間インキュベートした. その後各サンプルに 4  $^{\circ}\text{C}$  の 1 x annexin-binding buffer を 100  $\mu\text{L}$  加え, 氷上に置いた. FACS にて細胞を取り込んだ.

## 第 6 項 TCR 刺激後の ZAP-70 リン酸化

第 1 章第 2 節第 5 項と同様の方法でマウスより胸腺細胞を採取し, 抗 CD3 抗体と抗 CD4 抗体で 37  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間細胞を刺激した. 第 3 章第 2 節第 7 項と同様の方法で表面染色を行ったのち, 4% PFA による固定, 90%メタノールによる膜透過処理, および 0.1% BSA によるブロッキングを行い, APC 標識抗リン酸化 ZAP-70 (Y319) および FITC 標識抗 ZAP-70 抗体を用いて細胞内染色を行った. 蛍光標識アインタイプコントロール抗体をネガティブコントロールとして用いた. 標識した細胞を FACS 解析した. DP 細胞におけるリン酸化 ZAP-70 と総 ZAP-70 タンパクの MFI 値を算出し, 総 ZAP-70 タンパクに対するリン酸化 ZAP-70 の相対変化を求めた. 得られた MFI から以下の式を用いて, 細胞間における ZAP-70 のリン酸化の比較を行った.

$$\frac{(\text{“APC 標識抗リン酸化 ZAP-70 抗体の MFI”} - \text{“APC 標識コントロール抗体の MFI”})}{(\text{“FITC 標識抗 ZAP-70 抗体の MFI”} - \text{“FITC 標識コントロール抗体の MFI”})}$$

## 第 7 項 ウェスタンブロッティングによる細胞内シグナル伝達分子の検出

### 7-1 胸腺細胞の TCR 刺激および可溶化

12 well plate に抗 CD3 抗体 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と抗 CD28 抗体 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を固相化しておき, そこへ採取した胸腺細胞を 10% FBS-RPMI にて  $1 \times 10^7$  cell/well になるように播種した. コントロールとして無刺激の条件でも同様の実験を行った. 37  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  濃度 5% のインキュベーターでインキュベートし, 2 時間後と 6 時間後にそれぞれ細胞を回収した. 各刺激時間後, well の上清を取り, PBS-PI を 1 mL 加えてピペッティングにより細胞を

plate から剥離し, 1.5 mL tube に回収した. 遠心 (800 g, 4 °C, 3 分間) 後, T cell Lysis buffer を 50 µL 添加し, 混和した. 氷上で 30 分間静置し, その間 10 分ごとに混和した. その後遠心 (20400 g, 4 °C, 10 分間) し, 上清 40 µL を 5 x R SDS sample buffer が 10 µL 入った 0.5 mL tube へ入れ, 混和し, 100 °C で 5 分間沸騰させた.

## 7-2 SDS-PAGE

濃縮ゲルには 4%, 泳動ゲルには 12, 14% のポリアクリルアミドゲルを用い, SDS-PAGE を行った. BCA 法に基づきタンパク定量したサンプルを 10 µg/lane になるよう添加し, ゲル電気泳動装置を用いて濃縮ゲルは 20 mA, 泳動ゲルは 30 mA の電流で泳動を行った.

## 7-3 ウェスタンブロッティング

PVDF 膜をメタノールに約 30 秒間漬けたのち, 転写バッファーで約 1 時間振とうして平衡化させた. ウェット型転写用装置を用いて 50 V, 2 時間の条件でゲル中のタンパク質を PVDF 膜上に転写させた. PVDF 膜をブロッキングバッファーで, 室温, 1 時間のブロッキング操作を行った. その後, PVDF 膜を 1 次抗体 (ブロッキングバッファーで希釈) で, 室温で 1 時あるいは 4 °C, 一晩振とうした後, TS-T<sub>20</sub> で洗い (5 分間を 3 回), 2 次抗体 (ブロッキングバッファーで希釈) で室温, 45 分間振とうした. 最後に TS-T<sub>20</sub> で洗い (5 分間を 1 回, 8 分間を 1 回, 15 分間を 2 回) を行った後, ECL または Chemi-Lumi One Super で発光させ, X 線フィルムを用いて検出した.

## 第 8 項 TCR 刺激後の Nur77 発現

12 well plate に抗 CD3 抗体 1 µg/mL と抗 CD28 抗体 5 µg/mL を固相化しておき, そこへ採取した胸腺細胞を 10% FBS-RPMI にて  $1 \times 10^7$  cell/well になるように播いた. コ

ントロールとして無刺激の条件でも同様の実験を行った。37 °C CO<sub>2</sub> 濃度 5%のインキュベーターでインキュベートし、2 時間後に細胞を回収し、第 3 章第 2 節第 8 項と同様の方法で細胞に表面染色を行った。True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set を用いて、細胞の固定、膜透過処理を行い、PE 標識の抗 Nur77 抗体または control mouse IgG<sub>1</sub> で標識し、標識した細胞を FACS 解析した。

#### 第 9 項 TCR 刺激後の CD5 発現

96 well plate に抗 CD3 抗体 1 µg/mL および 10 µg/mL と抗 CD28 抗体 5 µg/mL および 50 µg/mL を固相化しておき、そこへ採取した胸腺細胞を 10% FBS-RPMI にて 5 x 10<sup>5</sup> cell/well になるように播いた。コントロールとして無刺激の条件でも同様の実験を行った。37 °C CO<sub>2</sub> 濃度 5%のインキュベーターで 18 時間インキュベートした。18 時間後に細胞を回収し、第 3 章第 2 節第 8 項と同様の方法で胸腺細胞に CD4, CD8, CD5 の表面染色を行い、FACS 解析した。

#### 第 10 項 統計処理

2 群間の統計処理方法は第 3 章第 2 節第 9 項と同様。多群間の統計処理方法は第 1 章第 2 節第 14 項と同様。

### 第 3 節 実験結果

#### 第 1 項 抗 CD3 抗体の腹腔内投与による胸腺細胞のアポトーシスの誘導

胸腺細胞における正負の選択は TCR を介したシグナル伝達により行われる。第 3 章の結果より得られた SMSI の欠損による正負の選択の異常が TCR シグナル伝達の異常によるものか調べるため、コントロールマウスおよび SMSI 欠損マウスに TCR 刺激と

して抗 CD3 抗体を腹腔内投与し、胸腺細胞のアポトーシスを誘導し、7-AAD と Annexin-V の染色によりアポトーシス細胞を検出した。7-AAD は DNA 鎖に結合して蛍光を発することから死細胞の評価に用いられる。Annexin-V はアポトーシス時に外層に露出したホスファチジルセリンに特異的に結合するため、ネクローシスとアポトーシスの分別に用いられる。7-AAD<sup>low</sup>/Annexin-V<sup>low</sup> の分画を生細胞、Annexin-V<sup>+</sup> の分画をアポトーシス細胞とし、コントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスの DP 細胞におけるアポトーシス細胞の割合を解析した (Fig. 23)。その結果、*SMS1* 欠損マウスの DP 細胞では TCR 刺激に伴うアポトーシス細胞の割合がコントロールと比較して優位に増加していた。

## 第 2 項 *in vitro* での胸腺細胞のアポトーシス誘導

次に *SMS1* 欠損マウスの細胞死の増加が TCR 刺激依存的であるか否かを調べるため、*in vitro* にてコントロールマウスと *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞に TCR 刺激の他に、細胞膜を通過してプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) を直接刺激するホルボールエステル (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) と細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を介して細胞を活性化させるイオノマイシン (ionomycin) による刺激 (PMA/ionomycin)、胸腺細胞に TCR 非依存的にアポトーシスを誘導する dexamethasone (合成グルココルチコイド) による刺激を行った (Fig. 24)。*SMS1* 欠損マウスの DP 細胞では TCR 刺激によってアポトーシス細胞の割合が有意に増加するのに対し、PMA/ionomycin や dexamethasone による刺激ではアポトーシス細胞の割合に変化は見られなかった。これらの結果から *SMS1* の欠損によるアポトーシスの増加は TCR シグナル伝達の異常によって生じていることが明らかとなった。

### 第3項 負の選択に関わるシグナル伝達分子の検出

*SMS1* 欠損胸腺細胞では TCR シグナル伝達の異常によりアポトーシスが増加していることが明らかとなったため、負の選択に関わる TCR シグナル伝達分子の解析を行った。胸腺細胞の正負の選択における TCR シグナル伝達経路の概略図を Fig. 25 に示した<sup>46</sup>。Syk ファミリーのチロシンキナーゼである ZAP-70 は正の選択と負の選択いずれにおいても重要なシグナル伝達分子である<sup>47</sup>。TCR 複合体のリン酸化によって生じる ZAP-70 のリン酸化の程度によって DP 細胞が SP 細胞へ分化するか、アポトーシスによって除去されるかどうかの運命決定に影響を与える<sup>48</sup>。抗 CD3 抗体および抗 CD4 抗体によって誘導された ZAP-70 のリン酸化は *SMS1* 欠損 DP 細胞においてコントロール細胞と比較して亢進していた (Fig. 26)。TCR の下流のシグナル伝達は負の選択において大きく 2 つの経路 (ERK5 経路と Bim 経路) に分かれる<sup>49</sup>。ERK5 の活性化はアポトーシス促進分子である Nur77 ファミリーの発現を制御する。同じくアポトーシス促進分子である Bim は ERK5-Nur77 経路とは非依存的に負の選択において重要な役割を持つ<sup>50,51</sup>。抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を固相化した 6 well プレートに胸腺細胞を播種し、2 時間および 6 時間後に細胞を回収して、ERK5 のリン酸化および Bim をウエスタンブロッティングにより検出した (Fig. 27)。コントロールの胸腺細胞では ERK5 のリン酸化は TCR 刺激 2 時間後に最も強く検出され、TCR 刺激 6 時間後にはその活性は低下した。一方 *SMS1* 欠損胸腺細胞では ERK5 タンパク自体もコントロールの胸腺細胞と比べ増加しており、TCR 刺激 2 時間後、6 時間後いずれもコントロールの胸腺細胞より強いリン酸化が観察された。コントロールの胸腺細胞では TCR 刺激に伴い Bim の発現が増加したが、*SMS1* 欠損胸腺細胞ではその増加がより強く観察された。FACS 解析により *SMS1* 欠損胸腺細胞では ERK5 の下流分子である Nur77 の発現増加も認められた (Fig. 28)。

CD5 の発現レベルは TCR シグナル伝達により制御されており、胸腺細胞における

TCR シグナル強度の指標として用いられている<sup>52</sup>. TCR 刺激によって *SMS1* 欠損 DP 細胞では CD5 の発現が増加していた (Fig. 29). *SMS1* の欠損による TCR シグナル強度の増強が TCR を介したアポトーシスに対する反応性を増加させていることが明らかとなった.

### 第 3 項 スフィンゴリエリン添加条件下におけるコントロール胸腺細胞の TCR 刺激に対するアポトーシスの解析

これまでの結果からスフィンゴリエリンマイクロドメインは胸腺細胞の正負の選択において TCR シグナル強度を負に制御していることが示唆される. 通常のマウスの胸腺細胞において正負の選択以前の DP 細胞ではスフィンゴリエリンマイクロドメインの発現量が非常に低く, 正の選択後に発現量は増加する (Fig. 7A, 9). そこでコントロールマウスの DP 細胞にスフィンゴリエリンを添加した状態で TCR 刺激を与えた場合に TCR シグナル伝達や TCR 刺激に伴うアポトーシスが低下するか否かを調べた. TCR 刺激を与えた胸腺細胞では添加したスフィンゴリエリンの濃度依存的にスフィンゴリエリンマイクロドメイン発現量が増加した (Fig. 30A). このときスフィンゴリエリンの添加によって CD5 の発現量は低下し, DP 細胞の生存率は増加していた (Fig. 30B, C). このことから DP 細胞においてスフィンゴリエリンマイクロドメインは TCR シグナル強度を低下させることが示された.

## 考察

本章では第 3 章で見られた *SMS1* 欠損マウスの細胞死の亢進が TCR 依存性か否かを検討した。CD3 は TCR 複合体を形成する分子の一つであり、抗 CD3 抗体で TCR 刺激を行うことで、負の選択が誘導される。CD28 は補助刺激レセプターであり、TCR 刺激を正に補助する。抗 CD3 抗体の腹腔内投与により *in vivo* で胸腺細胞のアポトーシスを誘導すると、*SMS1* 欠損 DP 細胞では野生型の DP 細胞よりもアポトーシス細胞の割合が増加していた (Fig. 23)。 *in vivo* では抗体の腹腔内投与における全身作用の影響も考え得るため、*in vitro* でも DP 細胞に TCR 刺激を行い、アポトーシス細胞を検出した (Fig. 24)。その結果 TCR 刺激では *SMS1* 欠損 DP 細胞ではアポトーシス細胞が増加している一方で、PMA/Iono や Dex による TCR 非依存的な刺激ではアポトーシス細胞の割合に変化が見られないことから、*SMS1* 欠損でみられるアポトーシスの増加は TCR 依存的であると考えられる。

正負の選択という細胞の”生存”と”アポトーシス”を左右する対照的な分化イベントは TCR から開始されるシグナル伝達に依存している。負の選択を誘導するリガンドは TCR を介して TCR 下流のシグナル分子を強く活性化させ、ERK5 のリン酸化、Nur77 ファミリー分子の誘導、アポトーシス促進分子である Bim タンパクを誘導する。ERK5-Nur77 経路と Bim 経路は共同的にミトコンドリアの障害を引き起こし、アポトーシスを生じさせる。TCR 下流のシグナル分子として ZAP-70 は正負の選択いずれにおいても重要なキナーゼである。ZAP-70 キナーゼのリン酸化には脂質マイクロドメインの存在が重要であることが知られている<sup>53</sup>。TCR 刺激 5 分後の ZAP-70 の Y319 のリン酸化は *SMS1* 欠損によって亢進していた (Fig. 26)。ほとんどの胸腺細胞が負の選択を受けるような OVA ペプチドで胸腺細胞を刺激すると Y319 がリン酸化された ZAP-70 は刺激後 2 分以内に形質膜に移行するが、正の選択を生じさせるほどの弱い刺激を与える OVA ペプチドではこのような移行は低下する<sup>54</sup>。このことからスフィンゴミエリンマイク

ロドメインは胸腺細胞の正負の選択において TCR 下流のシグナル伝達を負に制御する機能を持つと考えられる。

アポトーシス促進分子である Nur77 の発現は TCR シグナルの強度に依存し、なかでも ERK5 の活性化と関連する<sup>49,55,56</sup>。Bim は Bax や Bak などのアポトーシス促進分子を阻害することで細胞の生存を促進する Bcl-2 に拮抗し、ミトコンドリアの障害を誘導しアポトーシスを促進する。負の選択におけるこれら 2 つの主要な経路はいずれも *SMS1* 欠損によって亢進していた (Fig. 27, 28)。 *SMS1* 欠損による TCR シグナルの亢進は DP 細胞における CD5 の発現を増加させた (Fig. 29)。細胞表面糖タンパク質である CD5 は、その発現量は細胞が受けとった TCR シグナルの強さと相関するため、胸腺細胞の分化において TCR シグナル強度の指標に用いられている<sup>52,57</sup>。これらの結果よりスフィンゴミエリンマイクロドメインは胸腺細胞の正負の選択において TCR シグナル伝達を調節するプラットフォームとして働き、正負の選択の閾値の微調整に関与することが示唆される。

*SMS1* 欠損胸腺細胞では正負の選択時にスフィンゴミエリン発現量が増加しないために、TCR 刺激の閾値が下がり TCR シグナル強度が増強されて負の選択が亢進したと考えられる。このことは TCR シグナル強度の調節にスフィンゴミエリンに富んだ脂質マイクロドメインが寄与することを示唆している。胸腺細胞分化においてスフィンゴミエリン発現量の増減は厳密に制御されており、それが微調整されることでシグナル伝達強度が調節され、正負の選択を決定する TCR 刺激の閾値を適正化しているものと考えられる。

序論でも述べたように *SMS1* 欠損マウスのヘルパー T 細胞では TCR シグナル伝達の低下が認められている<sup>15</sup>。このことは本研究において得られた *SMS1* 欠損胸腺細胞における TCR シグナル伝達の亢進と矛盾するが、これに対する考察として胸腺細胞において正負の選択の閾値が低下したことにより、通常であれば正の選択により成熟

T 細胞に分化する DP 細胞が負の選択により除去されてしまったことで、野生型の末梢 T 細胞よりも活性化能が低い T 細胞しか末梢組織へ移出できない可能性が挙げられる。SMSI 欠損マウスは野生型マウスと比べて胸腺細胞数や脾臓細胞数、TCR の発現量に違いは見られなかったが (Fig. 17 および TCR 発現量の比較はデータ非表示), TCR レパトアの変化が起こっている可能性があり、今後さらなる解析が必要である。

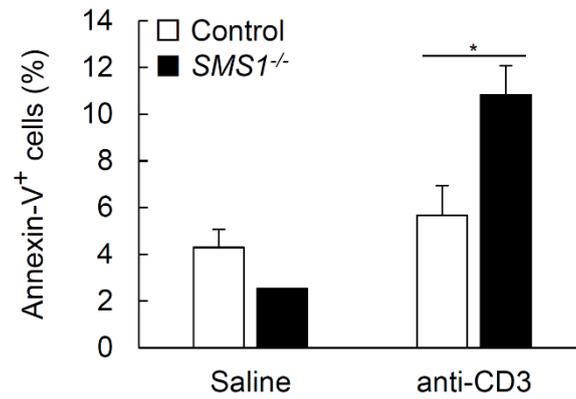


Fig. 23. 抗 CD3 抗体の投与による胸腺細胞のアポトーシスの誘導

コントロールマウスおよび *SMS1* 欠損マウスに生理食塩水または抗 CD3 抗体 3  $\mu$ g を 24 時間おきに 2 日間腹腔内投与し, さらに 24 時間後, 胸腺細胞を採取し CD4 と CD8, Annexin-V で標識し FACS 解析を行った. グラフは Annexin-V<sup>+</sup> DP 細胞の割合 (%) を表した. コントロールマウス: n = 3, *SMS1* 欠損マウス: Saline n = 2, anti-CD3 n = 3. \* $p$  < 0.05

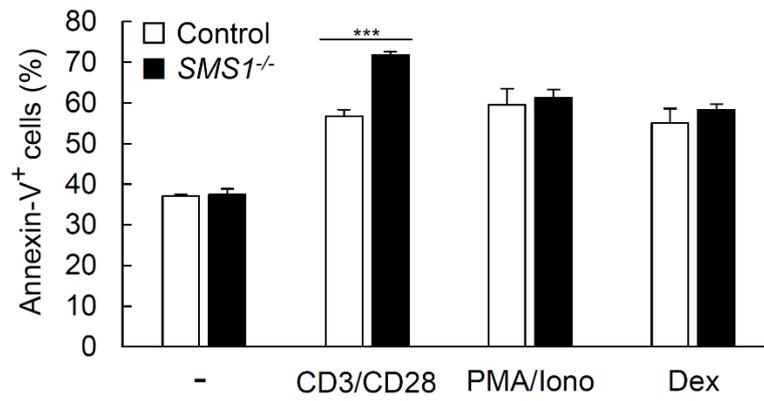


Fig. 24. 胸腺細胞のアポトーシス誘導

胸腺細胞を無刺激(-)または抗 CD3 抗体(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 抗 CD28 抗体(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (CD3/CD28), 50  $\text{ng}/\text{mL}$  PMA + 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ionomycin (PMA/Iono), 3 nM dexamethasone (Dex)で刺激した. 18 時間後に細胞を回収し(Fig. 23)と同様に解析した. データは独立した 3 回の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. \*\*\* $p < 0.001$ .

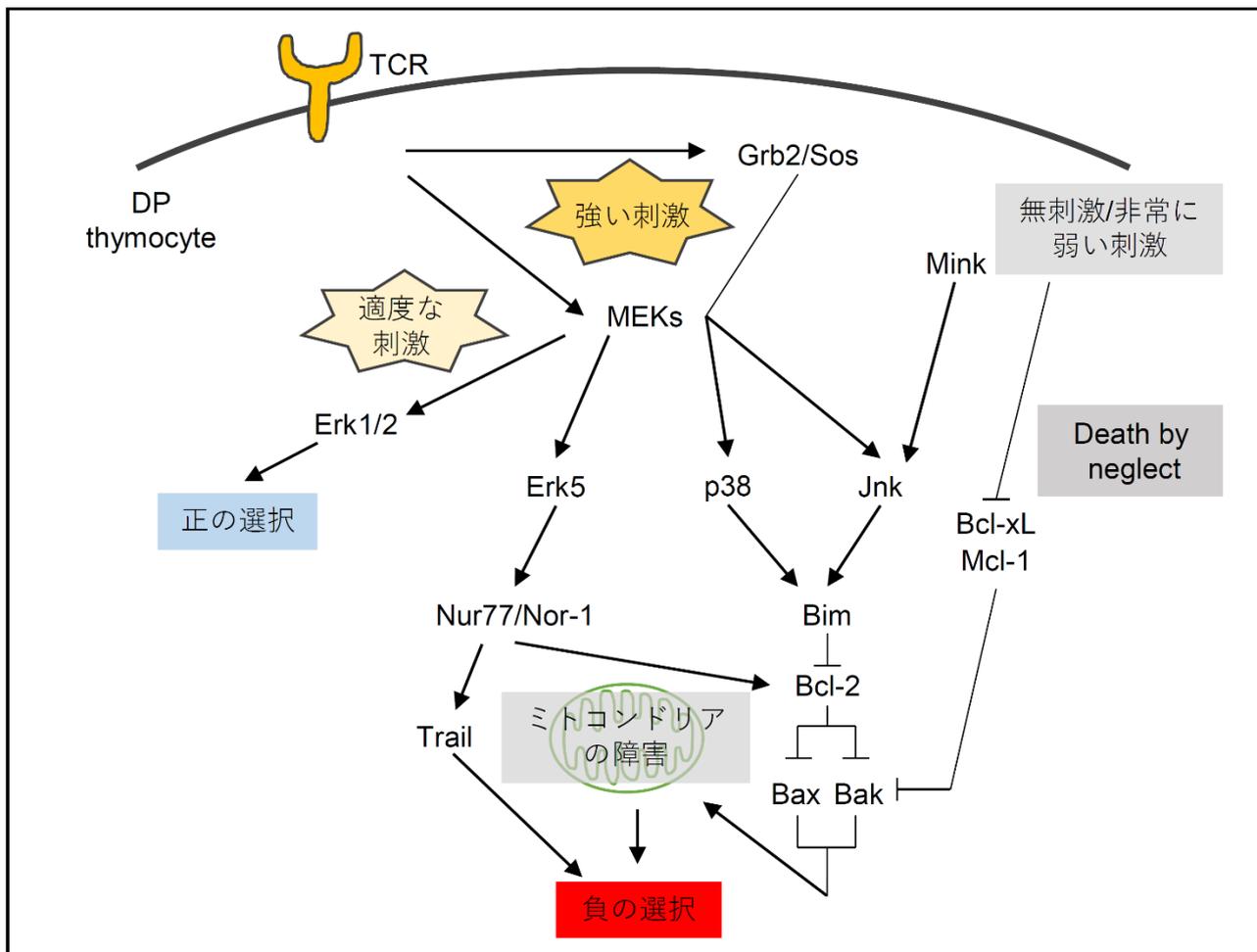


Fig. 25. 正負の選択に関わる TCR シグナル伝達経路

MHC-自己抗原との結合力が弱い TCR は, Erk1/2 が活性化し, 正の選択が生じる. 結合力の強い TCR は, Grb2/Sos の動員や p38, JNK の活性化を引き起こし, 負の選択が生じる. さらに, ERK5 や MINK も活性化し, それらが合わさり Nur77 ファミリーや Bim death effector の活性化を導く. Bim は Bcl-2 に拮抗し, Bax と Bak のミトコンドリア障害を誘導する. Nur77 ファミリーはミトコンドリアにおいて Bcl-2 をアポトーシス促進分子へと変換する. Bcl-xL と Mcl-1 は Bax/Bak の機能に拮抗するが, TCR シグナルが入らない場合はその制御が外れ, アポトーシスが引き起こされる.

(*Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22:865-871 改変, Ref 46)

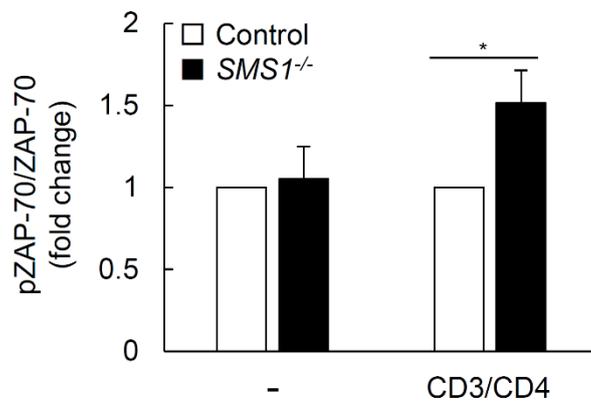


Fig. 26. TCR 刺激後の ZAP-70 のリン酸化

胸腺細胞を無刺激(-)または抗 CD3 抗体と抗 CD4 抗体(CD3/CD4)で 5 分間刺激し, 実験方法で述べた方法で解析した. DP 細胞におけるリン酸化 ZAP-70 (pZAP-70)と総 ZAP-70 発現量の MFI 値を算出し, 総 ZAP-70 発現量に対する pZAP-70 の相対変化を求めた. グラフにはコントロール DP 細胞の増加量を 1.0 と見なした際の相対変化量を示した. n = 4. \* $p < 0.05$ .

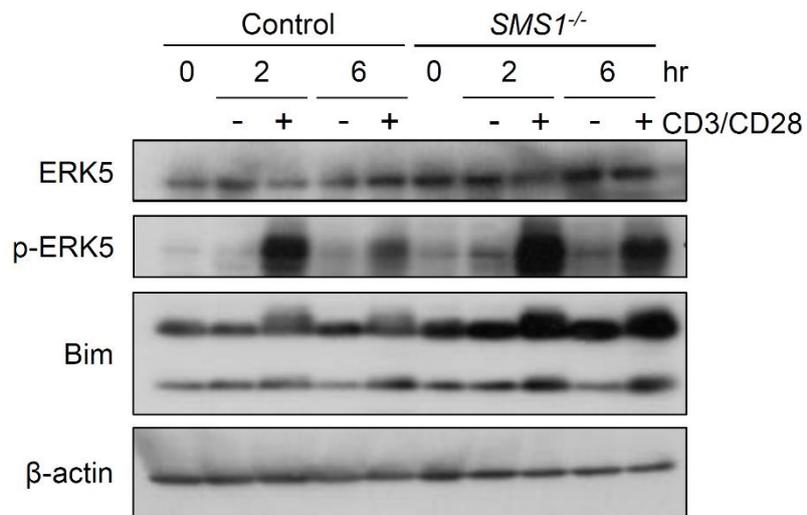


Fig. 27. TCR 刺激後の ERK5 リン酸化と Bim の発現

抗 CD3 抗体 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および抗 CD28 抗体 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を固相化した plate 上で各マウスの胸腺細胞を培養した. 2 時間および 6 時間後, 細胞を回収し, ERK5, p-ERK5, Bim,  $\beta$ -actin をウエスタンブロットティングにより検出した. 同様の実験を 5 回行ったうち, 代表的な一例.

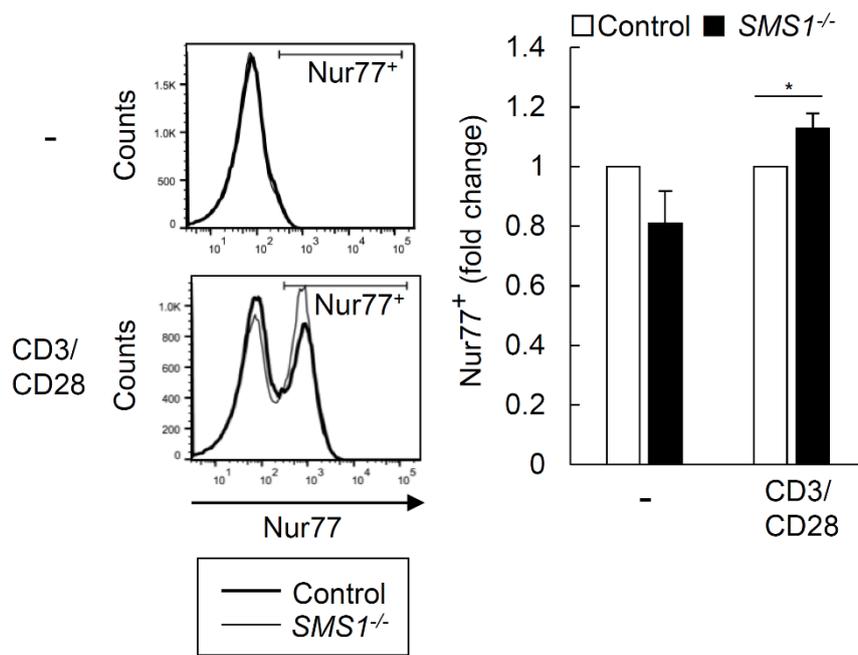


Fig. 28. TCR 刺激後の Nur77 の発現

抗 CD3 抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および抗 CD28 抗体 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を固相化した plate 上で各マウスの胸腺細胞を培養した. 2 時間後, 細胞を回収し, Nur77 を FACS により検出した. グラフにはコントロール DP 細胞の Nur77 陽性率を 1.0 と見なした際の相対変化量を示した.  $n = 3$ . \* $p < 0.05$ .

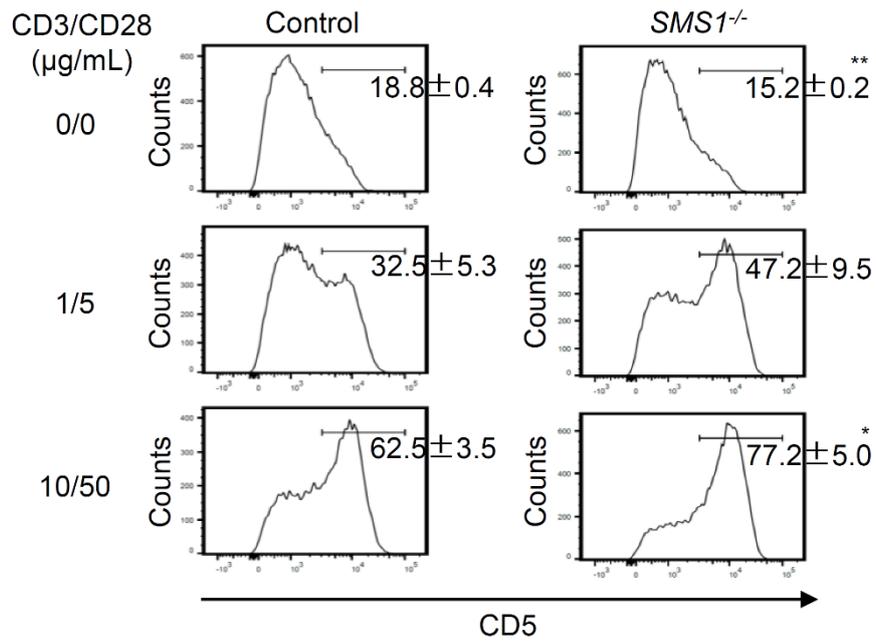


Fig. 29. TCR 刺激後の CD5 の発現

抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を上記の濃度で固相化した plate 上で各マウスの胸腺細胞を培養した。18 時間後、細胞を回収し、CD4, CD8, CD5 で標識し FACS により解析した。ヒストグラム中の数値は DP 細胞における CD5 陽性細胞の割合を平均値±標準偏差表した。同様の実験を 3 回行ったうち、代表的な一例。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

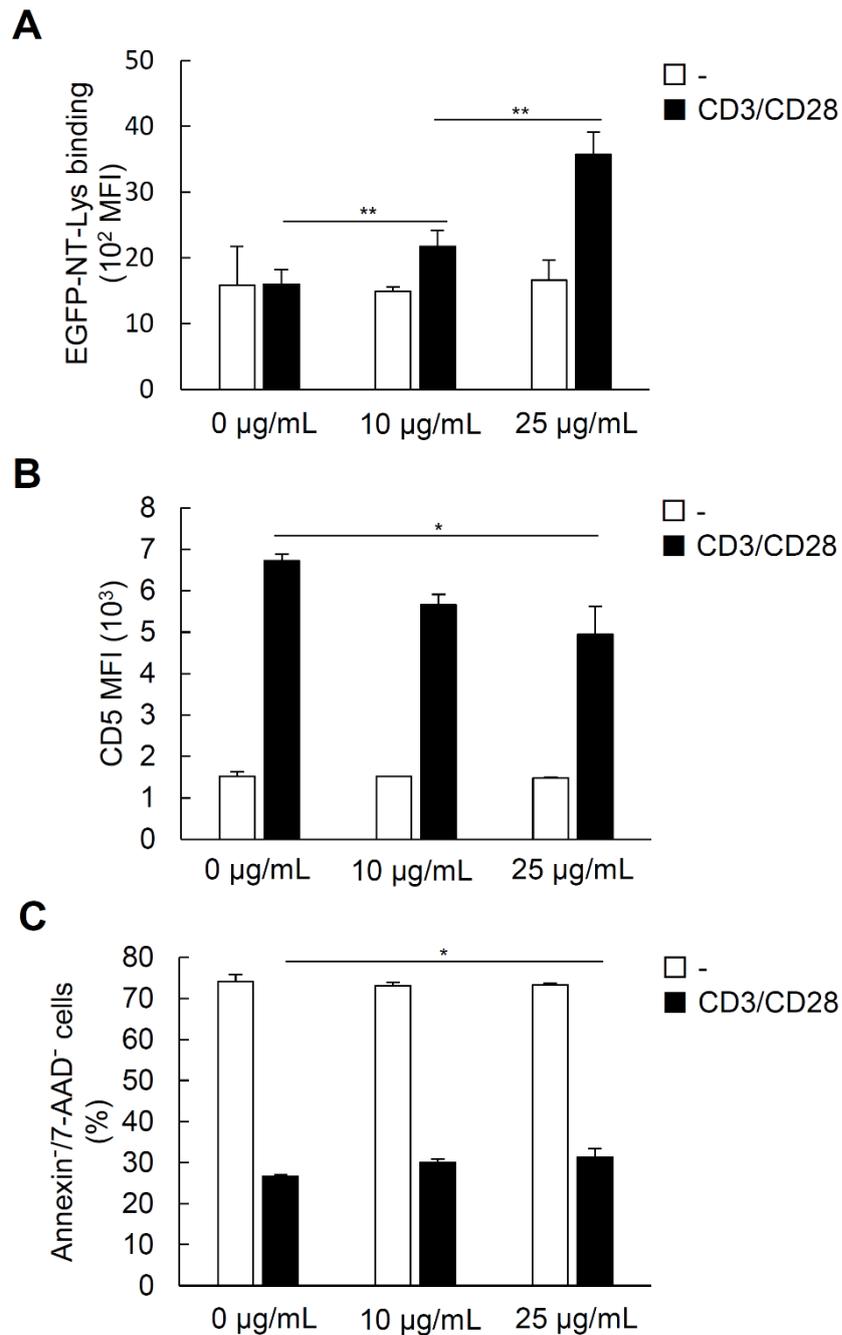


Fig. 30. スフィンゴミエリン添加に伴う TCR シグナル伝達

野生型マウスの胸腺細胞を上記の濃度のスフィンゴミエリンを添加した培地中で無刺激(-)または固相化した抗 CD3 抗体(10 µg/mL)および抗 CD28 抗体(20 µg/mL) (CD3/CD28) で 16 時間刺激した. 細胞を回収し, EGFP-NT-Lys (A), CD5 (B), annexin-V と 7-AAD (C) で標識し, FACS にて解析した. (A, B) DP 細胞における Lys または CD5 の平均値±標準偏差を示した. (C) annexin-V/7-AAD<sup>+</sup>細胞の割合の平均値±標準偏差を示した. n = 3. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

## 第 5 章 Jurkat 細胞を用いたスフィンゴミエリンマイクロドメインの機能解析

### 第 1 節 序論

第 4 章までに、マウスの胸腺細胞の分化過程においてスフィンゴミエリン発現量は大きく変動し、なかでも正負の選択後にドメイン化したスフィンゴミエリン発現量が顕著に増加することを示した。さらに *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞では TCR 刺激に伴う細胞内シグナル伝達が増強しており、強い刺激依存的な細胞死である負の選択が亢進していた。しかし、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞の *SMS1* 遺伝子のノックダウン細胞株では、細胞のスフィンゴミエリン量が 2 割減少しただけでスフィンゴミエリンマイクロドメインが消失し、TCR シグナル伝達が減弱することが報告されている<sup>58</sup>。一方で、*GlcCerS* の T 細胞特異的欠損マウスでは、通常の T 細胞分化には影響がないことが示されている<sup>59</sup>。また、*GlcCerS* 阻害剤 D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholio-1-propanol (D-PDMP) 処理によって Jurkat 細胞の GSL 量を 90%低下させた場合でも TCR シグナル伝達に影響はなかった<sup>60</sup>。これらのことから、マイクロドメイン構成脂質の中でスフィンゴミエリンが T 細胞の分化・活性化および TCR シグナル伝達に関与すると考えられるが、TCR シグナル伝達における脂質マイクロドメインの機能には議論の余地がある。

そこで第 5 章では、スフィンゴミエリンマイクロドメインが TCR シグナル伝達および T 細胞の活性化に対して抑制的と促進的のどちらに寄与するかを再検証するとともに、GSL マイクロドメインとの比較を行った。そのために、Jurkat 細胞の *SMS1* 変異細胞を CRISPR/Cas9 システムにより作製し、この細胞と当研究室で既に樹立した *GlcCerS* 変異細胞を用いて TCR 刺激に伴う活性化を解析した。

## 第2節 実験材料ならびに実験方法

### 第1項 実験材料

これまでより追加したもののみ記載する

MagExtractor PCR & Gel Clean up	(NPK-601, TOYOBO)
TOPO-Cloning pENTR/D-TOPO Cloning Kit	(K240020, Thermo Fisher Scientific)
MightyAmp DNA Polymerase Ver.3	(タカラバイオ)
pGEM-T Easy vector	(Promega)
pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458)	(#48138, addgene)
Amaya Human T Cell Nucleofector Kit	(Lonza)
FastGene Plasmid Mini Kit	(NIPPON Genetics)
Fluo-4 Calcium Assay Kit	(Molecular Probes)

### 第2項 実験装置

これまでより追加したもののみ記載する

遺伝子導入装置	(Nucleofector I Device, Lonza)
フローサイトメーター	(Attune NxT, Thermo Fisher Scientific)

### 第3項 試薬

これまでより追加したもののみ記載する

KOD FX	(東洋紡)
high-glucose DMEM medium	(nacalai tesque)
AIM-V	(Invitrogen)
TCR $\alpha$ / $\beta$ -PE/Cy7	(IP26, BioLegend)
CD69-APC	(FN50, BioLegend)
抗 CD3 $\epsilon$ 抗体	(OKT3, BioLegend)
CF640R-CTx-B	(Invitrogen)

### 第4項 細胞

・Jurkat 細胞(クローン E6.1)

・HEK293T 細胞

*SMS1* 変異 Jurkat 細胞は下記に記載する方法で作製した。*GlcCerS* 変異 Jurkat 細胞は当研究室卒業生山本博之修士より供与された。

## 第5項 細胞培養

Jurkat 細胞は最終濃度 10%(v/v)FBS, 2-メルカプトエタノール (50  $\mu$ M), ペニシリン (100 U/mL), ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/mL)を添加した RPMI-1640 培地を用いて培養した. FBS にはスフィンゴミエリンが含まれているため, 遺伝子変異導入 Jurkat 細胞樹立後, 親株 Jurkat 細胞も含めてすべての細胞をスフィンゴミエリン不含有の無血清培地 AIM-V を用いて培養した. HEK293T 細胞は最終濃度 10%(v/v)FBS, ペニシリン (100 U/mL), ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/mL)を添加した high-glucose DMEM 培地を用いて培養した. いずれの細胞も 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した.

## 第6項 CRISPR/Cas9 システムを用いた *SMS1* 遺伝子変異 Jurkat 細胞の樹立

### 6-1 ガイドオリゴの設計

CRISPR/Cas9 システムを用いた *SMS1* 変異 Jurkat 細胞の作製は既報に従った<sup>61</sup>. CRISPR デザインツールを用いて, オフターゲット効果の可能性が低いガイドオリゴを設計した<sup>62</sup>. ガイドオリゴの配列は以下の通り.

	5' to 3'
センス鎖	CACCGCTTCATTATTCTTCGCAGT
アンチセンス鎖	AAACACTGCGAAGAATAATGAAGC

ガイドオリゴを pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458)プラスミドに導入した. Amaxa Human T Cell Nucleofactor Kit と Nucleofactor I Device を用いて, Jurkat 細胞にプラスミドを導入した. 本プラスミドには GFP が含まれているため, 遺伝子導入の 2 日後, GFP 陽性 Jurkat 細胞を遺伝子導入に成功した細胞として FACS Aria II を用いてソートした.

### 6-2 *SMS1* 変異 Jurkat 細胞の樹立

一過性の GFP 発現が消失するまでソートした細胞を数日間培養した後, 変異細胞の

樹立を行った。SMS1 変異細胞の樹立のため、溶血活性を有する全長の Lys (400 ng/mL) にて細胞を処理することにより、スフィンゴミエリンマイクロドメインを発現する細胞を除去した。Lys 処理後、生き残った細胞を SMS1 変異細胞とした。このとき、Jurkat 細胞に Lys 処理を行うと全て死滅することを確認した(データ非表示)。Jurkat 細胞および各変異細胞の TCR 発現レベルが均一であることを、PE/Cy7 標識抗 TCR $\alpha/\beta$  抗体にて細胞を染色して FACS 解析にて確認した。

#### 第 7 項 大腸菌の形質転換および培養

-80 °C 保存の大腸菌 (DH5 $\alpha$ ) コンピテントセルを氷上にて融解し、これにプラスミド DNA を加え、氷上で 5 分間静置した。その後 42 °C で 55 秒間加温し、直ちに氷冷した。2 分間氷冷した後、SOC を大腸菌液の 10 倍量加え、37 °C の水浴でプラスミド DNA がアンピシリン耐性の場合は 30 分間、カナマイシン耐性の場合は 1 時間加温した。その後、遠心 (9100 g, 室温, 1 分間) し、残りが 100  $\mu$ L になるように上清を除去して再懸濁し、抗生物質を含む LB 寒天培地に播種し、37 °C で 18 時間培養した。得られたシングルコロニーをピックアップし、抗生物質を含む LB 培地 3 mL に添加し、37 °C で 18 時間培養した。

#### 第 8 項 アルカリミニプレップ法によるプラスミド DNA の抽出

プラスミド DNA の抽出は FastGene Plasmid Mini Kit を使用した。培養した大腸菌を遠心 (9100 g, 室温, 1 分間) し、集菌した大腸菌沈査を mP1 200  $\mu$ L で懸濁し、これに mP2 200  $\mu$ L を加え、転倒混和後 2 分間静置して大腸菌を溶解した。その後 mP3 300  $\mu$ L を加え、転倒混和後、遠心 (20400 g, 室温, 5 分間) し、この上清を FastGene mP カラムに添加し、遠心 (15300 g, 室温, 1 分間) した。これに mP4 400  $\mu$ L を加え、遠心 (15300 g, 室温, 1 分間) し、さらに mP5 を 600  $\mu$ L 加え再度遠心 (15300 g, 室温, 1 分

間)した. カラムを新しいチューブに移し, mP6 を 30  $\mu$ L 加え, 室温で 2 分間静置した後, 遠心(15300 g, 室温, 2 分間)することにより, プラスミド DNA を溶出した.

## 第 9 項 ヒト *SMS1* 遺伝子のクローニングおよび *SMS1* 遺伝子再構成細胞の樹立

下記のクローニング操作はそれぞれ標準的なプロトコルに準じて行った.

### 9-1 pGEM-T Easy vector へのクローニング

Jurkat 細胞由来の cDNA を鋳型とし, PCR で *SMS1* 配列を増幅した. PCR は KOD FX(1.0 U/ $\mu$ L)で行った.

	5' to 3'
Forward プライマー	ATGAAGGAAGTGGTTTATTGGTCACCCAAGAAGG
Reverse プライマー	TTATGTGTCATTCACCAGCCGGCTGTATTTAAC

増幅産物を 1%アガロースゲル電気泳動で分離し, Mag Extractor PCR & Gel Clean up で精製した. MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 (1.25 U/ $\mu$ L)を用いて A 付加を行い, 精製後, T/A cloning で組み込むため, pGEM-T Easy vector に 16 °C で 1 時間反応させた. 得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した.

### 配列決定用プライマー

	5' to 3'
Forward プライマー	GTTTTCCCAGTCACGACGTT
Reverse プライマー	GGAAACAGCTATGACCATGA

### 9-2 pENTR-D-TOPO vector へのクローニング

pGEM-T Easy vector にクローニングしたプラスミドを鋳型とし, PCR で目的配列を増幅

した. pENTR-D-TOPO vector へ組み込むため, Forwardプライマーには 5'-CACC-3' を付けた配列を設計した. PCR は KOD FX (1.0 U/ $\mu$ L) で行った.

	5' to 3'
Forward プライマー	CACCATGAAGGAAGTGGTTTATTGGTCACC
Reverse プライマー	TTATGTGTCATTCACCAGCCGGCTG

増幅産物を 1%アガロースゲル電気泳動で分離し, MagExtractor PCR & Gel Clean up で精製後, TOPO-Cloning pENTR/D-TOPO Cloning Kit を使用して 25 °C , 15 分間 反応させた. 得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した.

配列決定用プライマー

	5' to 3'
Forward プライマー	AAACGACGGCCAGTCTTAAG
Reverse プライマー	GGATATCAGCTGGATGGCAA

### 9-3 CSII-CMV-RfA vector へのクローニング

pENTR-D-TOPO vector にクローニングしたプラスミドと CSII-CMV-RfA vector を混合し, LR clonase enzyme mix II を添加して, LR 反応による組換えを行った. 得られたクローンは制限酵素処理を行い, 1%アガロースゲル電気泳動でバンドサイズを確認した. 得られたプラスミドを pKT4-1 (hSMS1/CSII-CMV-RfA) とした.

### 9-4 レンチウイルス調製法

poly-L-lysine コートした 60 mm dish に HEK293T 細胞を  $0.5 \times 10^6$  cell 播種し, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後に以下のプラスミドを Lipofectamine 2000 reagent 10  $\mu$ L でトランスフェクションした.

•pKT4-1 (hSMS1/CSII-CMV-RfA), 又は CSII-CMV-RfA: 3 µg

•pCMV-VSV-G-RSV-ReV: 1.5 µg

•pCAG-HIVgp: 1.5 µg

37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で 16 時間培養後, 最終濃度 10 µM で forskolin を添加した high-glucose DMEM 基本培地に培地交換し, さらに 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後, 32 °C, 5% CO<sub>2</sub> に移し 24 時間培養し, 上清を 0.45 µm シリンジフィルターに通し細胞残渣を取り除いた.

#### 9-5 レンチウイルス感染による遺伝子導入

第 5 章第 2 節第 6 項で樹立した SMS1 変異 Jurkat 細胞を 60 mm dish に  $2 \times 10^5$  cell 播種し, DMEM/RPMI 1640 = 1/1 の割合の培地中で 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後, 培地を除去してレンチウイルス溶液を添加した. 32 °C, 5% CO<sub>2</sub> で 1 日培養した後, RPIM 1640 に培地を交換し, さらに 1 日 32 °C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した後, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> に移し RPIM 1640 で 1 週間培養した細胞を安定発現株とした.

#### 第 10 項 TLC による脂質解析

Jurkat 細胞および各遺伝子変異導入細胞の TLC による脂質解析方法は第 1 章第 2 節第 6 項と同様である.

#### 第 11 項 FACS による細胞表面脂質の検出

FACS による細胞表面スフィンゴミエリンの検出方法は第 1 章第 2 節第 9 項と同様. FACS による細胞表面ガングリオシド GM1 の検出のため, FITC 標識あるいは CF640R 標識の CTx-B を用いた. Jurkat 細胞を PBS で洗浄した後, FITC 標識あるいは CF640R 標識の CTx-B を用いて細胞を染色した. 細胞表面セラミドの検出方法は第 2

章第 2 節第 9 項と同様. 蛍光標識した細胞は FACS (FACS AriaII あるいは Attune NxT Flow Cytometer) にてデータを採取し, FlowJo ソフトウェアを用いて解析した.

#### 第 12 項 TCR 刺激後の ZAP-70 リン酸化

TCR 刺激には TCR 複合体の構成分子である CD3 $\epsilon$  に対する刺激抗体(クローン OKT3)を用いた. 細胞を抗 CD3 $\epsilon$  抗体(3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )にて 37  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間刺激した. その後, 第 4 章第 2 節第 6 項と同様の方法でリン酸化 ZAP-70 量および総 ZAP-70 タンパクを標識し, FACS にてデータを採取した.

#### 第 13 項 TCR 刺激後の細胞内 Ca<sup>2+</sup>応答の測定

Fluo-4 Calcium Assay Kit を用い, 製品に添付のプロトコルに従って行った. 細胞に Ca<sup>2+</sup>インジケータ-Fluo-4 を含む溶液にて 37  $^{\circ}\text{C}$  で 40 分間インキュベートした. FACS AriaII を用いて定常状態の Ca<sup>2+</sup>レベルを 15 秒間測定し, それを蛍光のベースラインとして設定した後, 抗 CD3 抗体(3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を加え, 引き続き 360 秒間測定を継続した. FlowJo ソフトウェアを用いて, 刺激後における細胞内 Ca<sup>2+</sup>のピークの蛍光値(Peak)および AUC (area under the curve, 毎秒のカルシウム応答の平均値を結んでカーブを描いたときのカーブより下の部分の面積)を算出した.

#### 第 14 項 TCR 刺激後の T 細胞活性化マーカー CD69 発現量

抗 CD3 抗体(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を固相化した培養プレートに細胞を播種した. また, PMA(100  $\text{ng}/\text{mL}$ )による刺激も行った. いずれも 37  $^{\circ}\text{C}$  で 18 時間培養した. 細胞を回収し, APC 標識抗 CD69 抗体にて標識して FACS 解析を行った.

## 第 15 項 統計処理

実験結果はいずれも平均値と標準偏差で示した. 2 群間の比較には Student's t-test を, 多群間の比較には Tukey-Kramer 法を用いた. 危険率 5%以下 ( $p < 0.05$ ) の場合を統計学的に有意差があるものとした. なお, 危険率に関しては,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  で示した.

## 第 3 節 実験結果

### 第 1 項 SMS1 変異および *GlcCerS* 変異導入 Jurkat 細胞におけるスフィンゴ脂質の発現

形質膜において, スフィンゴミエリンや GSL はコレステロールの存在下でその物理化学的性質により自発的に脂質マイクロドメインを形成するが, ドメインは安定的ではなく可逆的に形成と分散とを繰り返している. 第 1 章第 1 節第 3 項でも述べたように, Lys と EqtII を用いることでドメイン化したスフィンゴミエリンと分散したスフィンゴミエリンを識別できる (Fig. 3A)<sup>21</sup>. このことを Jurkat 細胞において確認するため, M $\beta$ CD 処理によりマイクロドメインを破壊したときの Lys および EqtII の結合能を解析した (Fig. 31). Jurkat 細胞を 4 mM M $\beta$ CD にて処理すると EGFP-NT-Lys の結合は未処理の約 10% にまで低下していたが, EqtII-EGFP および CTx-B の結合は半分程度が維持されていた. マイクロドメインの破壊により Lys の結合が 90% 近く抑制されたことは, Jurkat 細胞においても Lys を用いることでスフィンゴミエリンマイクロドメインを選択的に検出できることを示している. コレステロールはマイクロドメイン以外の細胞膜にも存在し, M $\beta$ CD によってコレステロールがキレートされる際には近傍の分子も引き抜かれる非特異的な作用が報告されていることから, EqtII が認識する分散したスフィンゴミエリンや CTx-B 結合性ガングリオシドにも多少影響が及んだものと考えられる.

T 細胞の活性化における脂質マイクロドメイン構成脂質の役割を解析するために, スフィンゴミエリンが欠損した Jurkat 細胞の作製を試みた. 今回, Jurkat においてスフィ

ンゴミエリン生合成を担う SMS1 を標的とした。当研究室では GSL 合成の初発分子である GlcCer の生合成を担う GlcCerS に変異を導入した Jurkat 細胞 (*GlcCerS* 変異導入細胞) を既に樹立しており, 今回作製した SMS1 変異細胞と *GlcCerS* 変異細胞を用いて種々の脂質マイクロドメインの機能を解析した。

はじめに SMS1 変異 Jurkat 細胞のスフィンゴミエリン発現を調べた。細胞全体のスフィンゴミエリン量を TLC 解析により調べたところ, SMS1 変異細胞では Jurkat 細胞の約半分に低下していた (Fig. 32A)。EGFP-NT-Lys と EqtII-EGFP を用いた FACS 解析により形質膜上のスフィンゴミエリンマイクロドメインと分散したスフィンゴミエリンの発現量を調べた (Fig. 32B)。親株の Jurkat 細胞と比較して SMS1 変異細胞では, 形質膜上のスフィンゴミエリンマイクロドメインの発現量 (EGFP-NT-Lys による検出) は親株の Jurkat 細胞の約 12% にまで低下しており, これは M $\beta$ CD 処理によるマイクロドメイン破壊のときと同程度の著しい低下であった (Fig. 31, Fig. 32B)。一方, 分散したスフィンゴミエリンの発現量 (EqtII-EGFP による検出) 低下は約半分程度であった。このことから, SMS1 変異細胞ではスフィンゴミエリンは発現するものの, マイクロドメインを形成するには不十分なレベルであることが明らかとなった。*GlcCerS* 変異導入 Jurkat 細胞では形質膜上のスフィンゴミエリンマイクロドメインおよび分散したスフィンゴミエリンのどちらの発現量もほとんど変化は認められなかった。

次にスフィンゴミエリンや GSL の前駆体であるセラミドの発現量を解析した。FACS 解析により形質膜上のセラミド発現量を解析したところ, いずれの変異導入細胞でも Jurkat 細胞に比べて有意に増加していた (Fig. 33A)。Jurkat 細胞では GSL の中で GlcCer および a-series ガングリオシド (GM3, GM2, GD1a) の発現量が優位であることが知られている<sup>60</sup>。TLC を用いた脂質解析より, SMS1 変異細胞では GlcCer, GM3, GM2 の増加が認められたが, GD1a 量には変化がなかった (Fig. 33B)。さらに, CTx-B を用いた FACS 解析により GM1 の発現には変化が認められなかった (Fig. 33C)。

*GlcCerS* 変異細胞では, *GlcCer* 以下すべての *GSL* の発現が欠損していた (Fig. 33B, C).

以上より, *SMS1* 変異細胞では, スフィンゴミエリン量の半減により, 代償的に前駆物質であるセラミドおよび *GSL* の増加が起こっていることが明らかとなった. 一方で *GlcCerS* 変異細胞ではセラミドが増加するが, スフィンゴミエリン量に変化はないことが判明した.

## 第 2 項 *SMS1* 変異および *GlcCerS* 変異導入 Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達

第 4 章では胸腺細胞の正負の選択が TCR を介した細胞内シグナル伝達の強弱によって制御されていることを述べた. 末梢 T 細胞の活性化もまた TCR を介した種々の細胞内シグナル伝達により生じる. TCR 刺激に伴い TCR は脂質マイクロドメインに局在化し, そこに種々のシグナル伝達分子が動員されて, 十分な活性化が惹起される<sup>63</sup>. しかし TCR の下流のシグナル伝達分子は胸腺細胞とすべて同じではなく, 胸腺細胞から成熟する過程でシグナル伝達分子の発現パターンも変化する<sup>64</sup>. *SMS1* 変異細胞と *GlcCerS* 変異細胞を用いて, TCR シグナル伝達における脂質マイクロドメインの機能を解析した. はじめに, いずれの変異細胞でも形質膜上の TCR 発現量にほとんど変化がないことを確認した (Fig. 33C).

ZAP-70 は胸腺細胞と同様に TCR 刺激に伴いリン酸化を受けて TCR 複合体に会合して活性化し, アダプタータンパク質 LAT のリン酸化を起こすことで下流のシグナル伝達分子を TCR 直下に動員する<sup>64</sup>. 抗 CD3 抗体による TCR 刺激を行った細胞におけるリン酸化 ZAP-70 (pZAP-70) 量および総 ZAP-70 発現量を FACS 解析し, そこで得られた MFI を用いて, 第 5 章第 2 節第 13 項に示した方法で ZAP-70 のリン酸化の程度を比較した. *SMS1* 変異細胞では Jurkat 細胞と比べて ZAP-70 のリン酸化が有意に増加していたが, *GlcCerS* 変異細胞ではリン酸化の程度に有意な変化は認められな

かった (Fig. 34).

ZAP-70 による LAT のリン酸化によってホスホリパーゼ PLC $\gamma$ 1 が動員され、この活性により小胞体プールからの Ca<sup>2+</sup>放出が誘導され細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する。Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は、カルシニューリンの活性化、転写因子 NF-AT の核内移行を介して T 細胞活性化に重要なサイトカインなどの転写に関与する<sup>63</sup>。Fig.35A のように、TCR 刺激に伴う細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は刺激後数秒で認められ、数分間持続することがわかっている<sup>60</sup>。この Ca<sup>2+</sup>濃度の時間変化データを解析したところ、*SMS1* 変異細胞では Ca<sup>2+</sup>応答のピーク値 (Fig. 35B) および Ca<sup>2+</sup>上昇量 (Fig. 35C) の増強が認められた。一方、*GlcCerS* 変異 Jurkat 細胞では Ca<sup>2+</sup>上昇量は有意に増加していたが、ピーク値に有意な差は認められなかった (Fig. 35B, C)。

ZAP-70 活性化の下流では Ca<sup>2+</sup>シグナルとは別の経路として、MAP キナーゼ系の活性化も起こり、その結果として T 細胞の早期活性化マーカー分子である CD69 の発現が誘導される。TCR 依存的な CD69 発現上昇において Jurkat 細胞と各変異細胞との間に違いがあるか否かを解析した。Jurkat 細胞と変異細胞を 1 対 1 で混和してプレートに播種することにより両細胞に同一の条件で TCR 刺激を行った。刺激後の細胞に CD69 と Lys あるいは CD69 と CTx-B の共染色を行って FACS によって解析した。Jurkat 細胞と *SMS1* 変異細胞の混合細胞の解析にあたっては、Lys の染色強度に基づいて強陽性と陰性～弱陽性へとゲーティングし、それぞれを Jurkat 細胞と変異細胞とみなして CD69 の発現量を調べた。また、Jurkat 細胞と *GlcCerS* 変異細胞の混合細胞では、CTx-B の染色強度に基づいて強陽性と陰性へとゲーティングして同様に解析した。その結果、*SMS1* 変異細胞では TCR 刺激に伴う CD69 発現の有意な上昇が認められた一方で、*GlcCerS* 変異細胞では有意な低下が認められた (Fig. 36)。このとき、TCR をバイパスして PKC-MAP キナーゼ経路を直接活性化する薬剤である PMA 刺激では、いずれの変異細胞も CD69 の発現量は Jurkat 細胞と同程度であった。

以上の TCR シグナル伝達の解析結果より, Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達にはスフィンゴリエリンマイクロドメインが強く関与しており, GSL が形成するマイクロドメインの寄与は小さいと考えられる. また, *SMS1* 変異細胞では TCR シグナル伝達が亢進することから, スフィンゴリエリンマイクロドメインには TCR シグナルを負に調節する役割があることが示唆される.

### 第 3 項 *SMS1* 遺伝子再構成 *SMS1* 変異 Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達

CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子変異導入にはオフターゲット効果が知られている<sup>65</sup>. *SMS1* 変異細胞の表現型の原因として, TCR シグナルに関与する他の分子の遺伝子に変異が導入されたということも考えうる. そこで, その可能性を検討するために, TCR シグナルにおける *SMS1* 変異細胞の変化が *SMS1* 遺伝子の再導入によって回復するか否か解析したところ, *SMS1* 遺伝子導入 *SMS1* 変異細胞では Lys および EqII 結合能が完全に回復した (Fig. 37). そこで, TCR 刺激に伴う  $Ca^{2+}$  応答を解析したところ, mock 導入 *SMS1* 変異細胞では, Fig. 35 同様,  $Ca^{2+}$  応答が増強したのに対し, *SMS1* 遺伝子導入 *SMS1* 変異細胞では mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで低下した (Fig. 38A, B). 次に, TCR 刺激後の CD69 発現上昇を解析したところ, mock 導入 *SMS1* 変異細胞では, Fig. 36 同様, CD69 発現上昇が著明に増強しているのに対し, *SMS1* 遺伝子導入 *SMS1* 変異細胞では mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで低下した (Fig. 38C). 以上の結果より, *SMS1* 変異細胞におけるスフィンゴリエリンマイクロドメインの喪失と TCR シグナルの増強は *SMS1* の変異によって生じていることが明らかとなった.

## 考察

本章ではスフィンゴミエリンマイクロドメインまたは GSL マイクロドメインを欠損した変異 Jurkat 細胞を用いて、TCR 依存性の T 細胞活性化における種々のマイクロドメイン構成脂質の役割を検討した。CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した Jurkat 細胞の *GlcCerS* 変異導入細胞と *SMS1* 変異導入細胞の脂質発現の変化を解析したところ、*GlcCerS* 変異細胞では *GlcCer* 以下の全ての GSL の発現が欠損していた (Fig. 33B, C)。一方、*SMS1* 変異細胞ではスフィンゴミエリン発現量は親株の約 5 割の低下であったにもかかわらず、形質膜のスフィンゴミエリンマイクロドメインの発現は著しく減少していた (Fig. 32)。*SMS1* ノックダウン細胞においても、スフィンゴミエリンの 2 割の低下で形質膜上のスフィンゴミエリンマイクロドメインは消失することが報告されている<sup>58</sup>。形質膜におけるスフィンゴミエリン密度の低下は形質膜の流動性および脂質の側方拡散速度を高めるので、効率的なスフィンゴミエリンマイクロドメインの形成あるいはその維持にとって不都合であるのかもしれない<sup>66,67</sup>。形質膜中のコレステロール量が 20%程度減るだけでマイクロドメインは存在しなくなり、受容体シグナル伝達が抑制されることが報告されていることから、形質膜の脂質濃度はマイクロドメイン形成に重要な要素であることが窺える<sup>68,69</sup>。また、今回我々は、*SMS1* の酵素活性部位付近を標的として変異細胞の樹立を試みたが、スフィンゴミエリンそのものが完全に欠損した細胞を樹立できなかった。CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来繊維芽細胞) の *Lys* 耐性変異株も *Lys* 結合性は喪失しているがスフィンゴミエリン発現は完全に欠損しないことが報告されている<sup>70</sup>。また、2 種類の SMS 生合成酵素 (*SMS1* と *SMS2*) を同時に欠損させたマウス胎児由来繊維芽細胞ではスフィンゴミエリン合成能がほぼ欠損しており、ダブル欠損マウスは胎生致死のようである<sup>71,72</sup>。スフィンゴミエリンは哺乳類細胞におけるスフィンゴ脂質の約 85%を占めていることも含めて考えると、スフィンゴミエリンが完全に欠損した Jurkat 細胞は細胞死を起こすか増殖能が極めて低いため、結果として *SMS1*

酵素活性が低下した変異細胞が選択されてきたのかもしれない。SMS1 欠損マウスの胸腺細胞ではスフィンゴリエリン発現がほとんど消失するにも関わらず、胸腺細胞数はコントロールマウスと同程度であった (Fig. 17A)。SMS1 の過剰発現により細胞増殖が亢進することが報告されていることから<sup>73</sup>、Jurkat 細胞のように癌化した細胞では増殖が激しいためにスフィンゴリエリン発現が完全に消失すると生存が難しい可能性がある。さらに SMS1 変異細胞でスフィンゴリエリンが完全に欠損しないもう一つの理由として、SMS2 は Jurkat 細胞では発現していないとされているが<sup>58</sup>、この特殊な条件において SMS2 が代償的に発現している可能性が挙げられる。

また、どちらの変異細胞もセラミドの代償的な蓄積が認められた (Fig. 33A)。SMS1 遺伝子変異または欠損によるセラミド量への影響は細胞株やマウスを用いて検討されているが、セラミドが増加するケースや不変なケースなどさまざまである<sup>74</sup>。現に我々が用いた SMS1 欠損マウスの胸腺細胞ではセラミドの増加は見られなかった (Fig. 15A)。スフィンゴリエリン分解酵素を介したセラミドの増加はアポトーシスの誘導に関与することが知られているが<sup>75</sup>、我々の変異細胞では細胞死が亢進することはなかった。

胸腺細胞と同様に、Jurkat 細胞においても TCR 刺激に伴い、TCR は脂質マイクロドメインに局在化し、そこに種々のシグナル伝達分子がリクルートされる。SMS1 変異細胞では ZAP-70 のリン酸化の亢進が認められたが、GlcCerS 変異細胞では有意な変化はなかった (Fig. 34)。スフィンゴ脂質の分子種ごとに多様な脂質マイクロドメインが存在するが<sup>12</sup>、Jurkat 細胞においては GSL が形成するマイクロドメインよりもスフィンゴリエリンマイクロドメインの方が TCR 近傍シグナルにとって重要であることが示された。ZAP-70 の活性化はその下流の TCR シグナル伝達に大きな影響を及ぼす。活性亢進型の変異 ZAP-70 遺伝子を Jurkat 細胞に導入すると、TCR 刺激依存的に Ca<sup>2+</sup>応答や MAPキナーゼの ERK 活性化などが亢進するという報告がある<sup>76</sup>。SMS1 変異 Jurkat 細胞では TCR 刺激に伴い、Ca<sup>2+</sup>応答が増強するとともに、ERK 経路依存的に誘導さ

れる活性化マーカーCD69の発現も亢進した(Fig. 35, Fig. 36). スフィンゴミエリンマイクロドメイン欠損における初期の TCR シグナル伝達(ZAP-70 のリン酸化)の亢進は、下流のシグナル伝達および T 細胞の活性化にまで影響していることが判明した.

既報の *SMS1* 遺伝子ノックダウンを利用した Jurkat 細胞のスフィンゴミエリン発現抑制では、今回の我々の結果と反対に、TCR 刺激に伴う TCR シグナル伝達の低下が示されている<sup>58</sup>. ただ、その実験では細胞培養の培地に FBS を添加したものが使用されているが、一般的に血清中にはリポタンパク質などに多量のスフィンゴミエリンが含まれている。そのためノックダウン細胞に培地由来のスフィンゴミエリンが取り込まれた可能性が高いと考えられる。今回作製した *SMS1* 変異 Jurkat 細胞は、樹立後、無血清培地で継代および実験を行った。また、クローン化を行わず、親株の Jurkat 細胞と TCR 発現量が変わらないことを確認して使用したため、Jurkat 細胞の平均的な TCR の反応性をみていると考えられる。さらに、既報のノックダウン Jurkat 細胞では、我々が実施したような *SMS1* 遺伝子の再導入の実験が行われていない。既報のノックダウン Jurkat 細胞と今回作製した *SMS1* 変異 Jurkat 細胞における TCR 刺激時のシグナル伝達強度の相反する結果は、特に培地由来のスフィンゴミエリンの存在によってもたらされた可能性が高い。

*SMS1* 変異細胞に *SMS1* 遺伝子を再導入すると、スフィンゴミエリンマイクロドメイン発現量は完全に回復し、このとき  $\text{Ca}^{2+}$  応答と CD69 発現が Jurkat 細胞レベルに低下した(Fig. 37, Fig. 38). *SMS1* 変異細胞では代償的にセラミドや GSL の増加が確認されたことから、この細胞の表現型がスフィンゴミエリンマイクロドメイン欠損に起因するのか、代償的なセラミドや GSL の増加に起因するのかを考察する必要がある。*GlcCerS* 変異細胞でもセラミドの有意な増加が起こるが、*SMS1* 変異細胞のような全般的な TCR シグナルの亢進は認められなかった。したがって、TCR シグナルの場として機能するマイクロドメインはセラミドによって構成されていないことが示唆される。

*SMS1* 変異細胞において, *GSL* の増加による *TCR* シグナル伝達の亢進の可能性に対する考察として, 全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, *SLE*)患者の末梢 *T* 細胞における脂質発現変化の報告を挙げる. *SLE* 患者の末梢 *T* 細胞では, 形質膜の *GSL* (特に, *LacCer*, *GM1*, グロボ系 *GSL* の *Gb3*) の発現量が増加することが報告されている. *SLE* 患者由来の *T* 細胞に *GlcCerS* 阻害剤である *N*-butyldeoxy-nojirimycin (*NB-DNJ*) を処理することで, *CTx-B* 結合性ガングリオシドと *LacCer* の発現量を健常人由来 *T* 細胞と同程度に戻すと, *TCR* シグナル伝達が回復するとともに炎症性サイトカインの産生が抑制される<sup>77</sup>. これは過剰な *GSL* の発現が *TCR* シグナルに対して抑制的な効果があることを示している. 以上より, スフィンゴミエリンマイクロドメインが形質膜上で特異的に *TCR* シグナルを抑制的に制御しているものと考えられる.

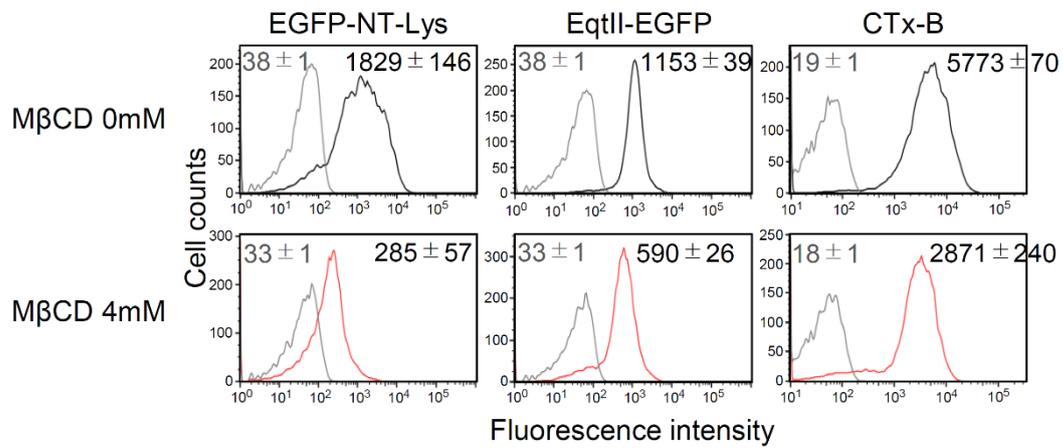


Fig. 31. Jurkat 細胞の MβCD 処理による Jurkat 細胞の脂質マイクロドメイン構造破壊の影響  
 Jurkat 細胞を未処理 (MβCD 0 mM) または MβCD 4 mM 処理後に, EGFP-NT-Lys (左), EqII-EGFP (中央), CF640R-CTx-B (右) で標識した. 各数値は同様の実験を 3 回行った際の平均の MFI ± 標準偏差を表す. 黒および赤線: 染色あり. グレーの線: 無染色.

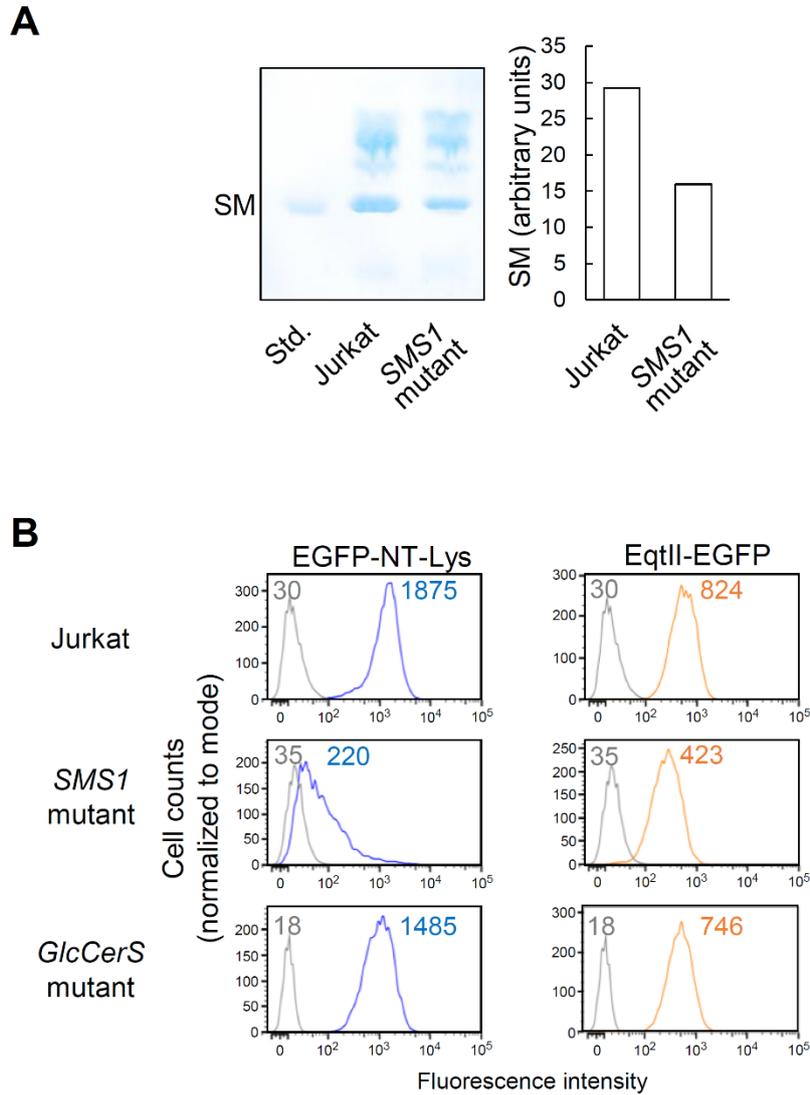


Fig. 32. *SMS1* 変異導入 Jurkat 細胞のスフィンゴミエリン発現変化

(A) Jurkat 細胞および *SMS1* 変異導入 Jurkat 細胞 (1 mg protein 相当) の中性脂質を TLC により展開し, Dittmer 試薬によりスフィンゴミエリンを検出した. TLC プレートを読み取り, ImageJ ソフトウェアを用いて各レーンのスフィンゴミエリンのバンドの濃さを測定した. Std.: standard lipid. SM: スフィンゴミエリン. (B) 細胞表面の EGFP-NT-Lys (左) および EqII-EGFP (右) 染色. 各数値は MFI を表す. 青およびオレンジ色の線: 染色あり. グレーの線: 無染色.

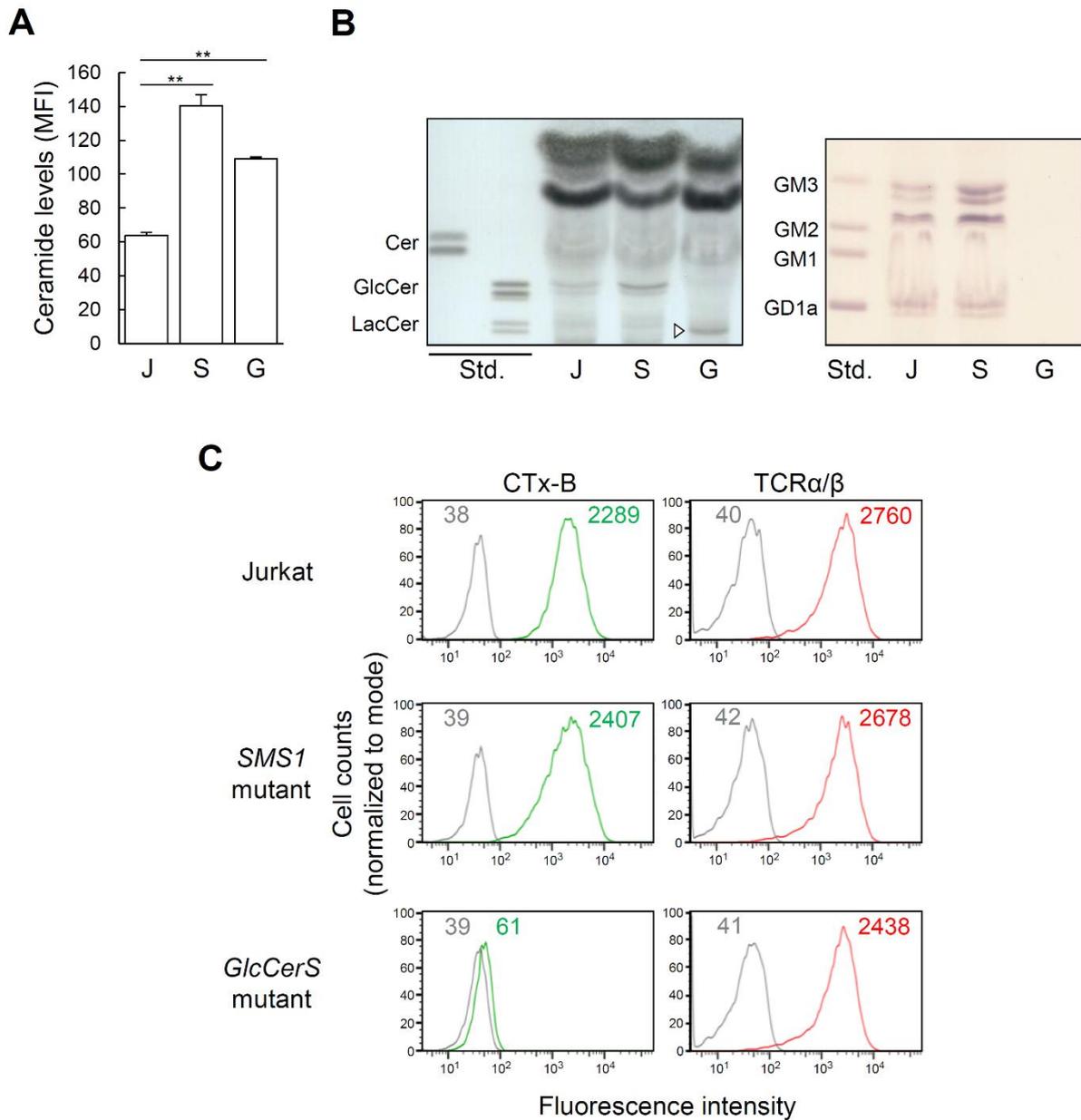


Fig. 33. *SMS1* および *GlcCerS* 遺伝子変異導入による Jurkat 細胞のスフィンゴ脂質発現変化

(A) Jurkat 細胞 (J), *SMS1* 変異導入細胞 (S) および *GlcCerS* 変異導入細胞 (G) の細胞表面のセラミド発現レベルを FACS にて解析した. 数値は 3 回同様の実験を行った際の平均値±標準偏差で表した. (B) Jurkat 細胞と各遺伝子変異導入細胞の中性スフィンゴ脂質 (左, 1 mg protein 相当) と酸性 GSL (右, 2 mg protein 相当) を TLC で解析した. 脂質全体を銅リン酸試薬 (左) で, 酸性 GSL をオルシノール硫酸試薬 (右) により検出した. 図中の印 (▷) は未知のバンド. Cer: セラミド. GlcCer: グルコシルセラミド. LacCer: ラクトシルセラミド. (C) 細胞表面 FITC-CTx-B 染色 (左) および PE-TCRα/β 染色 (右). 各数値は MFI を表す. 緑色および赤色の線: 染色あり. グレーの線: 無染色. \*\* $p < 0.01$ .

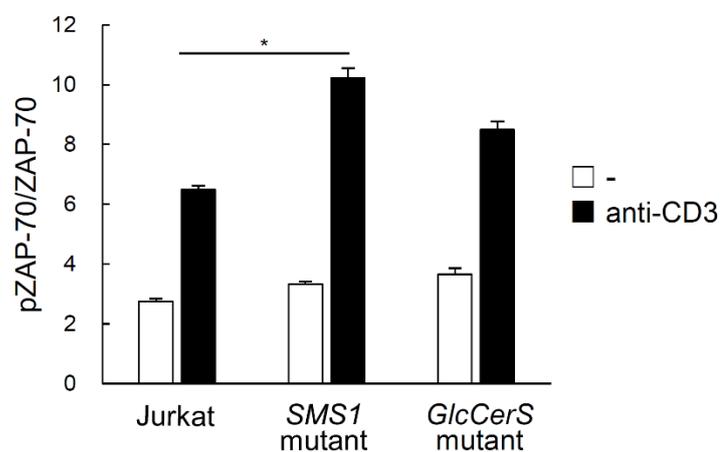


Fig. 34. TCR 刺激後の ZAP-70 のリン酸化

細胞を無刺激または抗 CD3 抗体で 5 分間刺激し, 実験方法に記載した通りに解析した. グラフには各細胞における, 総 ZAP-70 タンパクに対する pZAP-70 の相対値を表した. 結果は 3 回同様の実験を行ったうち, 平均値±標準偏差で示した. \* $p < 0.05$ .

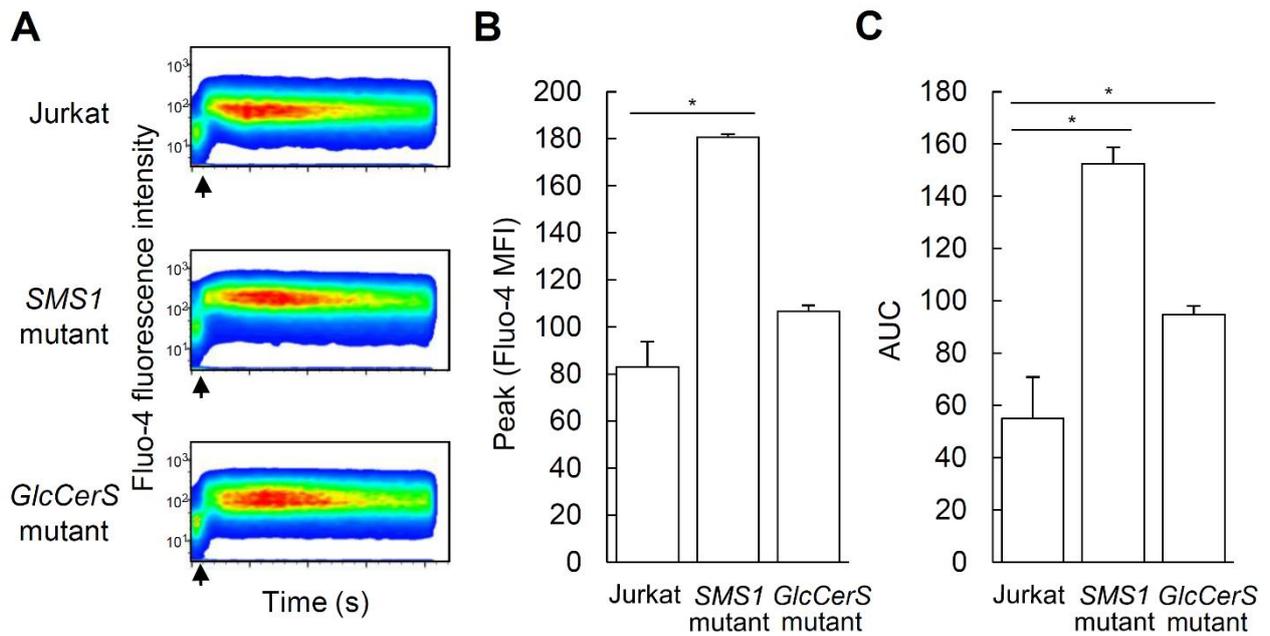


Fig. 35. TCR 刺激後の  $\text{Ca}^{2+}$  応答

細胞に  $\text{Ca}^{2+}$ インジケーターFluo-4 を取り込ませ、FACS にて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を解析した。(A)Fluo-4 の蛍光強度で示される  $\text{Ca}^{2+}$  流入。定常状態の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルを 15 秒間測定し、蛍光のベースラインを設定したのち、抗 CD3 抗体で細胞を刺激した(矢印部分)。3 回同様の実験を行ったうちの代表的な一例。(B, C) 抗 CD3 抗体処理により誘導された、 $\text{Ca}^{2+}$  応答の要約として、ベースラインから増加した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルのピーク値(B)および area under the curve(AUC) (C)。結果は 3 回同様の実験を行ったうち、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。\* $p < 0.05$ 。

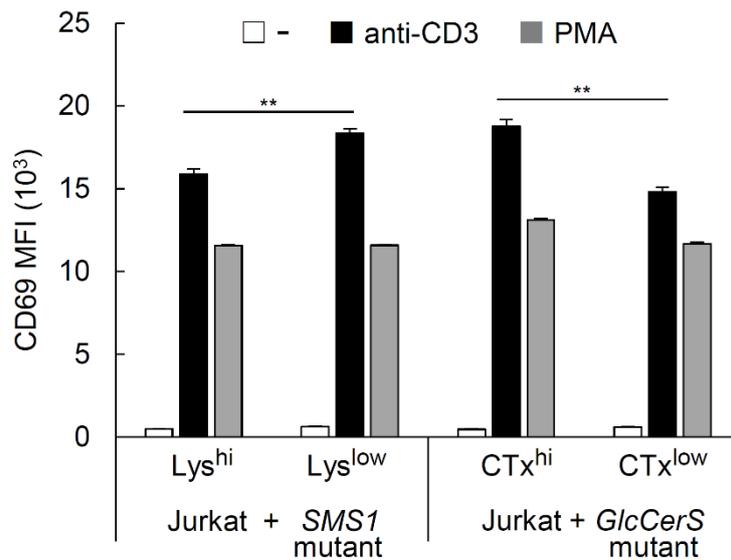


Fig. 36. TCR 刺激に伴う CD69 発現

Jurkat 細胞を *SMS1* 変異導入細胞または *GlcCerS* 変異導入細胞と 1:1 で混合し、無刺激(-)または抗 CD3 抗体 (1  $\mu$ g/mL) (anti-CD3) または PMA (100 ng/mL) で 18 時間刺激した。細胞を回収し、APC-CD69 と脂質プローブ (EGFP-NT-Lys と CF640R-CTx-B) で標識し、FACS を用いて解析した。Jurkat 細胞と遺伝子変異導入細胞の CD69 発現を区別するため、脂質プローブの蛍光強度により細胞を分画した: Lys<sup>hi</sup> および CTx<sup>hi</sup> 細胞はそれぞれ Lys および CTx で強く染色されるため Jurkat 細胞とした。Lys 染色強度の低い Lys<sup>low</sup> 細胞は *SMS1* 変異導入細胞として区別し、CTx 染色強度の低い CTx<sup>low</sup> 細胞を *GlcCerS* 変異導入細胞とした。結果は 3 回同様の実験を行ったうち、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。\*\* $p < 0.01$ 。

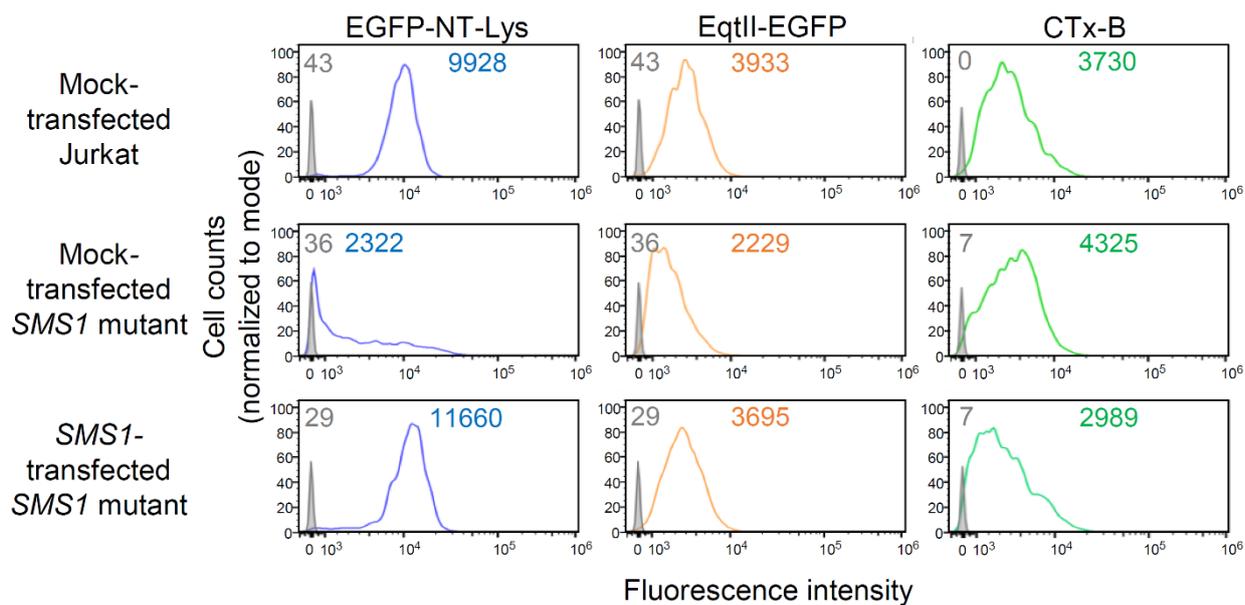


Fig. 37. *SMS1* 遺伝子導入 *SMS1* 変異細胞のスフィンゴミエリン発現

Mock 導入 Jurkat 細胞と mock または *SMS1* 導入 *SMS1* 変異細胞を EGFP-NT-Lys(左), EqII-EGFP (中央), CF640R-CTx-B(右)で標識し, FACS により解析した. 各数値は MFI を表す. 青, オレンジ, 緑色の線: 染色あり. グレーの線: 無染色.

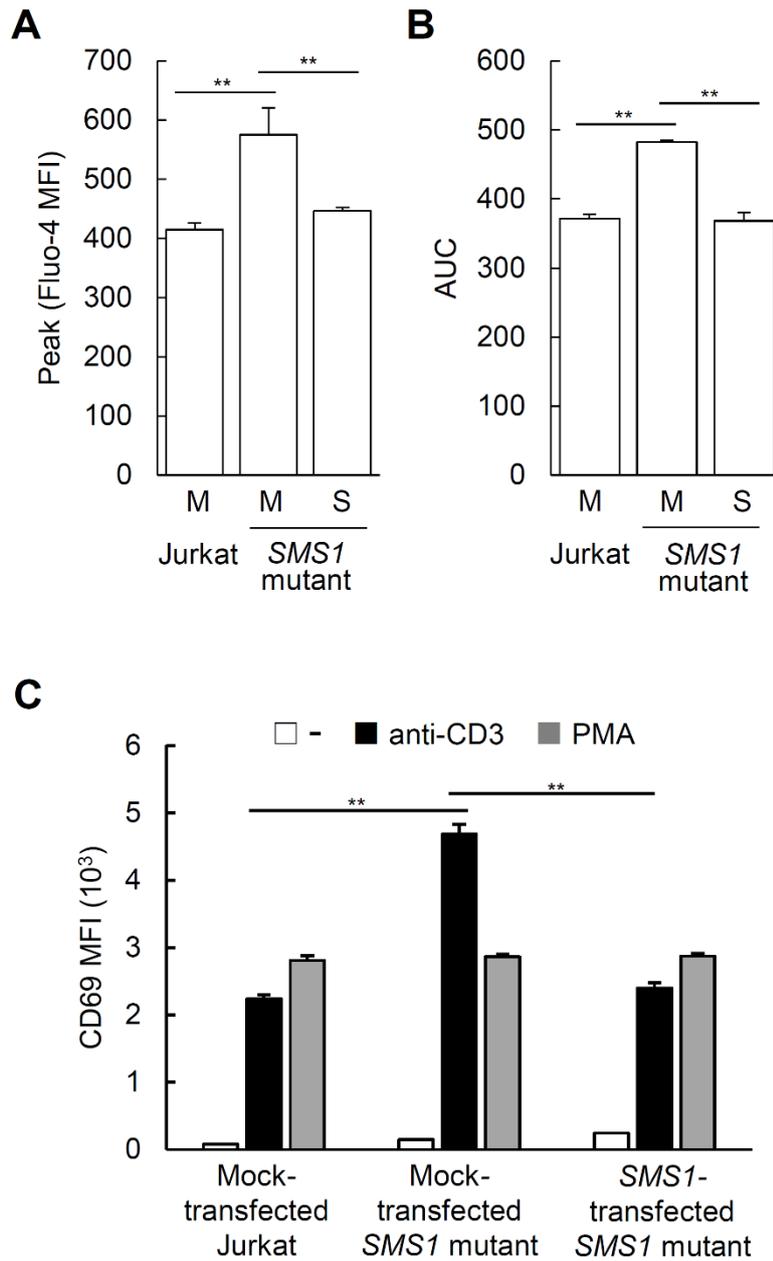


Fig. 38. *SMS1* 遺伝子導入 *SMS1* 変異細胞の TCR シグナル伝達

(A, B) Fig.36 と同条件下で行った  $\text{Ca}^{2+}$  流入測定. 抗 CD3 抗体処理によるベースラインからの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルのピークの増加 (A) および  $\text{Ca}^{2+}$  応答の AUC (B). M: mock 導入細胞. S: *SMS1* 導入細胞. (C) 細胞を無刺激(-)または抗 CD3 抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) または PMA (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) で 18 時間刺激し, APC-CD69 で標識して FACS にて解析した. 結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. \*\* $p < 0.01$ .

## 結論・総括

本研究では胸腺細胞におけるスフィンゴリエリンマイクロドメイン発現とその機能的意義の解析および Jurkat 細胞におけるスフィンゴリエリンマイクロドメインの機能を解析し、以下のことを明らかにした。

1. 胸腺細胞におけるスフィンゴリエリン発現は、一連の分化過程に伴い大きく変動する。特に正負の選択の前後でドメイン化したスフィンゴリエリン(スフィンゴリエリンマイクロドメイン)発現量が大きく増加することを見出した。
2. *SMS1* 欠損マウスの胸腺細胞では野生型で見られたスフィンゴリエリン発現の増減は認められなかった。また、*SMS1* の欠損によるスフィンゴリエリンの前駆体(セラミド)や GSL の代償的な増加は認められなかった。
3. 正負の選択のモデルとなる TCRトランスジェニックマウスを用いた解析により、*SMS1* 欠損によって正の選択が低下し、負の選択は亢進していることを見出した。また、これらの細胞死の亢進は TCR 依存的であった。*SMS1* 欠損胸腺細胞に TCR 刺激を行うと、負の選択につながる TCR シグナルの亢進が認められた。
4. 野生型マウスの胸腺細胞にスフィンゴリエリンを添加し TCR 刺激を行うと、スフィンゴリエリンの濃度依存的に TCR シグナルの抑制と生存率の増加が認められた。
5. ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞に *SMS1* の変異を導入すると、スフィンゴリエリンマイクロドメインが欠損した。この細胞では TCR 刺激に伴う TCR シグナル伝達の亢進が認められた。さらに *SMS1* 変異細胞に正常な *SMS1* 遺伝子を再導入すると、ス

フィンゴミエリンマイクロドメインの発現は正常になり, TCR シグナル伝達も mock 導入 Jurkat 細胞と同レベルにまで低下した. 一方, *GlcCerS* 変異細胞では GlcCer 以降の GSL 発現が消失したが, TCR シグナル伝達の異常は認められなかった.

胸腺細胞の分化における脂質ラフトの役割はこれまでに多くのグループによって解析されている. 正の選択のシグナル伝達は TCR シグナル伝達分子のラフト画分への移行によって生じる<sup>4,6</sup>. DP 細胞から CD4SP 細胞への系列決定には MHC クラス II 分子がラフトに会合して抗原提示をすることが必要である<sup>78</sup>. 脂質ラフトや免疫シナプス構造の可視化には標識された CTx-B が頻用されるが, CTx-B はガングリオシドの一部のみに結合し, さらに DP 細胞膜で形成されるラフト構成スフィンゴ脂質のなかでもマイナーな成分である<sup>11</sup>. 様々なラフト構成脂質は個々にラフトを構成し, それらは形質膜上でオーバーラップしないと言われている. TCR シグナルでは DP 細胞膜上の CTx-B で標識された脂質ラフトは細胞膜上で分極しない<sup>79</sup>. そのため胸腺細胞における脂質ラフトの機能には疑問が残っていた. 本研究はスフィンゴミエリンマイクロドメインの低下や増加によって, 胸腺細胞における TCR シグナル伝達がそれぞれ増強, 減弱することを示した. 以上のことからスフィンゴミエリンマイクロドメインは TCR シグナル伝達のプラットフォームとして働き, 正負の選択において TCR を抑制的に制御する働きを持つことが示された. Jurkat 細胞では抗 CD3 抗体による TCR 刺激に伴い形成された TCR 活性ドメインにスフィンゴミエリンやコレステロール, 飽和ホスファチジルコリンが集積することが報告されている<sup>80</sup>. 我々が用いたマイクロドメイン構成脂質の欠損細胞によって, Jurkat 細胞においても TCR シグナル伝達に関わるのは GSL マイクロドメインではなく, スフィンゴミエリンマイクロドメインであることが示された.

胸腺細胞においても末梢 T 細胞と同じように TCR シグナル伝達に関連するタンパクがスフィンゴミエリンマイクロドメインに局在するのか, もしそうだとするならば正負の選

損が生じている胸腺細胞の表面で免疫シナプスの形成によってスフィンゴミエリンマイクロドメインの形成が促されるのか、未解決な点はまだいくつかある。後者の問題は、免疫シナプス構造の多様性を考慮すると非常に興味深い<sup>81,82</sup>。成熟した CD4 陽性 T 細胞や B 細胞では TCR や CD28 が集積した免疫シナプスの中心的なエリアである TCR クラスタ (central supramolecular activation cluster; cSMAC) が観察されるが、胸腺ストローマ細胞と相互作用する DP 細胞は中心を形成しない<sup>83</sup>。かわりに正の選択が行われている DP 細胞では細胞 - 細胞界面における複数の部位に集積した小さな蓄積 TCR を有する「多焦点」免疫学的シナプス (multiple synapses) を形成する<sup>84</sup>。このように DP 細胞において multiple synapse が形成されるのは末梢 T 細胞と比べて TCR の発現が低いためである<sup>85</sup>。スフィンゴミエリンマイクロドメインと TCR 近位のシグナル伝達分子の相互作用を明らかにするために、脂質マイクロドメインや免疫シナプス構造の顕微鏡を用いた視覚化が必要である。

自己免疫疾患患者の T 細胞では、マイクロドメイン構成脂質の質的・量的な変化が起こることが報告されている<sup>86</sup>。SLE 患者の T 細胞では、形質膜のコレステロールや GSL が増加している<sup>77,86,87</sup>。SLE 患者由来 T 細胞では TCR 複合体を形成する CD3ζ 鎖の発現低下により TCR シグナル伝達が低下しているが、これはコレステロール生合成阻害剤 (アトルバスタチン) を添加することによって回復する<sup>88-90</sup>。T 細胞膜上のコレステロールが増加すると、TCR の膜上での流動性が低下した結果、TCR の持続的な活性化が抑制される<sup>91-93</sup>。Jurkat 細胞ではスフィンゴミエリンはコレステロールと共に TCR を含むマイクロドメインを形成することから<sup>80</sup>、コレステロールが増加している病態ではスフィンゴミエリンマイクロドメイン発現量も増加し、TCR シグナル伝達の抑制に寄与している可能性がある。自己免疫疾患患者の T 細胞におけるスフィンゴミエリン発現量は未だ報告されていないが、炎症が関与するような肥満病態では血清中のスフィンゴミエリンの質的变化 (脂肪酸のアシル鎖長の変化) が起きることが知られている<sup>93</sup>。今

後, 健常人と自己免疫疾患患者のヒト T 細胞におけるスフィンゴリエリンマイクロドメインの質的・量的関係の解明が望まれる. T 細胞膜上のスフィンゴリエリン発現を微調整することで TCR シグナル伝達を制御することができれば, T 細胞の機能異常に起因する自己免疫疾患の発症メカニズムの解明や新たな治療法の開発につながることを期待される.

## 謝辞

本論文を終わるにあたり、終始御懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました東北医科薬科大学薬学部 機能病態分子学教室 井ノ口仁一教授に深く感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、御校閲と御助言を賜りました東北医科薬科大学薬学部 病態生理学教室 高橋知子教授ならびに細胞制御学教室 顧建国教授に深く感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり多大な御助言と御協力を頂いた東北医科薬科大学薬学部 機能病態分子学教室 稲森啓一郎准教授、永福正和講師、狩野裕考助手に深く感謝致します。

共同研究において実験動物を供与してくださった金沢医科大学 岡崎俊郎教授、京都大学 ウイルス研究所 生田宏一教授、DNA コンストラクトを供与してくださった Strasbourg university 小林俊秀教授に深く感謝申し上げます。

公私共に多大な御助言と御協力をいただきました東北医科薬科大学薬学部 機能病態分子学教室 影山達夫博士、穴戸史女史、豊澤祐美女史、東北医科薬科大学医学部 医化学教室 上村聡志講師に心より感謝申し上げます。

本研究の機会を与您といただき、多大なる御支援を賜りました東北医科薬科大学理事長・学長 高柳元明先生に深く感謝の意を表します。

本研究は日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の支援を受けて行われました。ここに感謝の意を表します。

大学院での生活を共に過ごさせていただいた東北医科薬科大学薬学部 機能病態分子学教室 大学院生 二瓶 渉氏、新田 昂大氏ならびに学部生の皆様に感謝申し上げます。

大学院での生活を送るにあたり、終始経済的、精神的支援を賜りました家族、多くの友人や先輩、後輩に心から感謝申し上げます。

最後に本研究のために尊い生命をいただきましたマウス、マウス胎子に深く感謝いたします。

2019年3月  
豊島 かおる

## 引用文献

1. Zúñiga-Pflücker, J. C., Lenardo, M. J. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Current Opinion in Immunology* **8**, 215–224 (1996).
2. Killeen, N., Irving, B. A., Pippig, S., Zingier, K. Signaling checkpoints during the development of T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 360–367 (1998).
3. Marrack, P., Kappler, J. Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 250–255 (1997).
4. Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., Kabouridis, P. S. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 23–34 (2000).
5. Werlen, G., Hausmann, B., Palmer, E. A motif in the alpha beta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* **406**, 422–426 (2000).
6. Delgado, P., Fernández, E., Dave, V., Kappes, D., Alarcón, B. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* **406**, 426–30 (2000).
7. Simons, K., Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–72 (1997).
8. Simons, K., Vaz, W. L. C. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 269–295 (2004).
9. Nagafuku, M., Okuyama, K., Onimaru, Y., Suzuki, A., *et al.* CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 336–342 (2012).
10. Nakamura, K., Suzuki, M., Inagaki, F., Yamakawa, T., Suzuki, A. A new ganglioside showing cholera toxin-binding activity in mouse spleen. *J. Biochem.* **101**, 825–835 (1987).
11. Inokuchi, J., Nagafuku, M., Ohno, I., Suzuki, A. Heterogeneity of gangliosides among T cell subsets. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3067–3075 (2013).
12. Gómez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., *et al.* Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9642–7 (2001).
13. Sato, T., Iwabuchi, K., Nagaoka, I., Adachi, Y., *et al.* Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived  $\beta$ -1,6-long glycoside side-chain-branched  $\beta$ -glucan. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 204–211 (2006).
14. Nakayama, H., Yoshizaki, F., Prinetti, A., Sonnino, S., *et al.* Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 728–741 (2008).
15. Dong, L., Watanabe, K., Itoh, M., Huan, C. R., *et al.* CD4+ T-cell dysfunctions through

- the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. *Int. Immunol.* **24**, 327–337 (2012).
16. Fowlkes, B. J., Pardoll, D. M. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv Immunol* **44**, 207–264 (1989).
  17. Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., Ohashi, P. S. Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 829–74 (1999).
  18. Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J. F. H. M., Holthuis, J. C. M. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* **23**, 33–44 (2004).
  19. Yamaoka, S., Miyaji, M., Kitano, T., Umehara, H., Okazaki, T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 18688–18693 (2004).
  20. Tafesse, F. G., Huitema, K., Hermansson, M., Van Der Poel, S., *et al.* Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 17537–17547 (2007).
  21. Makino, A., Abe, M., Murate, M., Inaba, T., *et al.* Visualization of the heterogeneous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity, and sphingolipidosis. *FASEB J.* **29**, 477–493 (2014).
  22. Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., *et al.* Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 5300–5306 (1998).
  23. Ishitsuka, R., Yamaji-Hasegawa, A., Makino, A., Hirabayashi, Y., Kobayashi, T. A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes. *Biophys. J.* **86**, 296–307 (2004).
  24. Dittmer, J. C., Lester, R. L. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.* **5**, 126–127 (1964).
  25. Abe, M., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kamijo, K., *et al.* A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1396–407 (2012).
  26. Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., Makino, A., Ohno, S., Kobayashi, T. Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 24072–24084 (2005).
  27. Heng, T. S. P., Painter, M. W. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1091–4 (2008).
  28. Shay, T., Kang, J. Immunological Genome Project and systems immunology. *Trends Immunol.* **34**, 602–609 (2013).
  29. Gill, J., Malin, M., Sutherland, J., Gray, D., Hollander, G., Boyd, R. Thymic generation

- and regeneration. *Immunol. Rev.* **195**, 28–50 (2003).
30. Petrie, H. T. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 859–866 (2003).
  31. Kurd, N., Robey, E. A. T-cell selection in the thymus: A spatial and temporal perspective. *Immunol. Rev.* **271**, 114–126 (2016).
  32. Van Laethem, F., Tikhonova, A. N., Pobeziński, L. A., Tai, X., *et al.* Lck availability during thymic selection determines the recognition specificity of the T cell repertoire. *Cell* **154**, 1326–41 (2013).
  33. Takada, K., Van Laethem, F., Xing, Y., Akane, K., *et al.* TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 1069–1076 (2015).
  34. Suzuki, H., Punt, J. A., Granger, L. G., Singer, A. Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: A new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* **2**, 413–425 (1995).
  35. Simons, K., Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39 (2000).
  36. Brown, D. A., London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 17221–17224 (2000).
  37. Van Erpecum, K. J., Carey, M. C. Influence of bile salts on molecular interactions between sphingomyelin and cholesterol: Relevance to bile formation and stability. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1345**, 269–282 (1997).
  38. Li, Z., Fan, Y., Liu, J., Li, Y., *et al.* Impact of sphingomyelin synthase 1 deficiency on sphingolipid metabolism and atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1577–1584 (2012).
  39. Takada, K., Takahama, Y. *Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells. Advances in Immunology* **125**, (Elsevier Inc., 2015).
  40. Gascoigne, N. R. J., Rybakina, V., Acuto, O., Brzostek, J. TCR signal strength and T cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **32**, 327–348 (2016).
  41. Burger, M. L., Leung, K. K., Bennett, M. J., Winoto, A. T cell-specific inhibition of multiple apoptotic pathways blocks negative selection and causes autoimmunity. *Elife* **3**, 1–22 (2014).
  42. Hogquist, K. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27 (1994).
  43. Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M., von Boehmer, H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* **333**, 742–746 (1988).

44. Yano, M., Watanabe, K., Yamamoto, T., Ikeda, K., *et al.* Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *J. Biol. Chem.* **286**, 3992–4002 (2011).
45. Lu, M.-H., Takemoto, M., Watanabe, K., Luo, H., *et al.* Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. *J. Physiol.* **590**, 4029–44 (2012).
46. Hernandez, J. B., Newton, R. H., Walsh, C. M. Life and death in the thymus-cell death signaling during T cell development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 865–71 (2010).
47. Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K., *et al.* Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* **376**, 435–438 (1995).
48. Mallaun, M., Zenke, G., Palmer, E. A discrete affinity-driven elevation of ZAP-70 kinase activity initiates negative selection. *Recept. Signal Transduct.* **30**, 430–443 (2010).
49. Sohn, S. J., Lewis, G. M., Winoto, A. Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **27**, 1896–1906 (2008).
50. Suen, A. Y. W., Baldwin, T. A. Proapoptotic protein Bim is differentially required during thymic clonal deletion to ubiquitous versus tissue-restricted antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 893–898 (2012).
51. Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., *et al.* BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**, 922–926 (2002).
52. Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W., Love, P. E. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301–2311 (1998).
53. Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S.-J., Pierce, S. K. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 457–481 (2003).
54. Daniels, M. A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., *et al.* Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* **444**, 724–729 (2006).
55. Moran, A. E., Holzappel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., *et al.* T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–1289 (2011).
56. Zikherman, J., Parameswaran, R., Weiss, A. Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature* **489**, 160–164 (2012).
57. Tarakhovsky, A., Kanner, S. B., Hombach, J., Ledbetter, J. A., *et al.* A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* **269**, 535–537

- (1995).
58. Jin, Z. X., Huang, C. R., Dong, L., Goda, S., *et al.* Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int. Immunol.* **20**, 1427–1437 (2008).
  59. Popovic, Z. V., Rabionet, M., Jennemann, R., Kronic, D., *et al.* Glucosylceramide synthase is involved in development of invariant natural killer T cells. *Front. Immunol.* **8**, 1–16 (2017).
  60. Nagafuku, M., Kabayama, K., Oka, D., Kato, A., *et al.* Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via the T cell receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 51920–51927 (2003).
  61. Inamori, K., Ito, H., Tamura, Y., Nitta, T., *et al.* Deficient ganglioside synthesis restores responsiveness to leptin and melanocortin signaling in obese KKAY mice. *J. Lipid Res.* **59**, 1472–1481 (2018).
  62. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
  63. Horejsi, V., Hrdinka, M. Membrane microdomains in immunoreceptor signaling. *FEBS Lett.* **588**, 2392–2397 (2014).
  64. Gaud, G., Lesourne, R., Love, P. E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 485–497 (2018).
  65. Fu, Y., Foden, J. a, Khayter, C., Maeder, M. L., *et al.* High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol* **31**, 822–826 (2013).
  66. London, E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1746**, 203–220 (2005).
  67. Sengupta, P., Baird, B., Holowka, D. Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 583–590 (2007).
  68. Kusumi, A., Fujiwara, T. K., Morone, N., Yoshida, K. J., *et al.* Membrane mechanisms for signal transduction: The coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 126–144 (2012).
  69. Kusumi, A., Suzuki, K. G. N., Kasai, R. S., Ritchie, K., Fujiwara, T. K. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 604–615 (2011).

70. Hanada, K., Hara, T., Fukasawa, M., Yamaji, A., Umeda, M., Nishijima, M. Mammalian Cell Mutants Resistant to a Sphingomyelin-directed. **273**, 33787–33794 (1998).
71. Mitsutake, S., Zama, K., Yokota, H., Yoshida, T., *et al.* Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* **286**, 28544–28555 (2011).
72. Hussain, M. M., Jin, W., Jiang, X. C. Mechanisms involved in cellular ceramide homeostasis. *Nutr. Metab.* **9**, 71–77 (2012).
73. Hannun, Y. A., Obeid, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 175–191 (2018).
74. Taniguchi, M., Okazaki, T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration—from cell and animal models to human disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 692–703 (2014).
75. Hannun, Y. A., Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150 (2008).
76. Deindl, S., Kadlecsek, T. A., Cao, X., Kuriyan, J., Weiss, A. Stability of an autoinhibitory interface in the structure of the tyrosine kinase ZAP-70 impacts T cell receptor response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20699–20704 (2009).
77. McDonald, G., Deepak, S., Miguel, L., Hall, C. J., *et al.* Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4<sup>+</sup> T cells from lupus patients. *J. Clin. Invest.* **124**, 712–724 (2014).
78. Komaniwa, S., Hayashi, H., Kawamoto, H., Sato, S. B., *et al.* Lipid-mediated presentation of MHC class II molecules guides thymocytes to the CD4 lineage. *Eur. J. Immunol.* **39**, 96–112 (2009).
79. Ebert, P. J. R., Baker, J. F., Punt, J. A. Immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes do not polarize lipid rafts in response to TCR-mediated signals. *J. Immunol.* **165**, 5435–5442 (2000).
80. Zech, T., Ejsing, C. S., Gaus, K., de Wet, B., *et al.* Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *EMBO J.* **28**, 466–476 (2009).
81. Thauland, T. J., Parker, D. C. Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* **131**, 466–472 (2010).
82. Yokosuka, T., Takashi, S. The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Immunol. Synap.* **340**, 81–107 (2010).
83. Richie, L. I., Ebert, P. J. R., Wu, L. C., Krummel, M. F., Owen, J. J. T., Davis, M. M. Imaging synapse formation during thymocyte selection: Inability of CD3 $\zeta$  to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* **16**, 595–606 (2002).
84. Hailman, E., Burack, W. R., Shaw, A. S., Dustin, M. L., Allen, P. M. Immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained

- tyrosine phosphorylation. *Immunity* **16**, 839–848 (2002).
85. Lee, S. J., Hori, Y., Chakraborty, A. K. Low T cell receptor expression and thermal fluctuations contribute to formation of dynamic multifocal synapses in thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4383–4388 (2003).
  86. Jury, E. C., Flores-Borja, F., Kabouridis, P. S. Lipid rafts in T cell signalling and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 608–615 (2007).
  87. Dong, L., Hu, S., Chen, F., Lei, X., *et al.* Increased Expression of Ganglioside GM1 in Peripheral CD4 + T Cells Correlates Soluble Form of CD30 in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 931018 (2010).
  88. Baniyash, M. TCR  $\zeta$ -chain downregulation: Curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 675–687 (2004).
  89. Liossis, S. N., Ding, X. Z., Dennis, G. J., Tsokos, G. C. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J. Clin. Invest.* **101**, 1448–1457 (1998).
  90. Jury, E. C., Isenberg, D. a, Mauri, C., Ehrenstein, M. R. Atorvastatin restores Lck expression and lipid raft-associated signaling in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **177**, 7416–22 (2006).
  91. Swamy, M., Beck-Garcia, K., Beck-Garcia, E., Hartl, F. A., *et al.* A cholesterol-based allosteric model of T cell receptor phosphorylation. *Immunity* **44**, 1091–1101 (2016).
  92. Molnár, E., Swamy, M., Holzer, M., Beck-García, K., *et al.* Cholesterol and sphingomyelin drive ligand-independent T-cell antigen receptor nanoclustering. *J. Biol. Chem.* **287**, 42664–42674 (2012).
  93. Hanamatsu, H., Ohnishi, S., Sakai, S., Yuyama, K., *et al.* Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults. *Nutr. Diabetes* **4**, e141-7 (2014).

本論文は以下の原著論文を基に作成した.

1. Kaoru Toshima, Masakazu Nagafuku, Toshiro Okazaki, Toshihide Kobayashi, Jin-ichi Inokuchi  
Plasma membrane sphingomyelin modulates thymocyte development by inhibiting TCR-  
induced apoptosis  
*International Immunology*, 2018, DOI: 10.1093/intimm/dxy082.

2. 永福 正和, 豊島 かおる, 堀内 隼, 井ノ口 仁一  
スフィンゴミエリンマイクロドメインは Jurkat 細胞の T 細胞抗原受容体依存性の活性化を  
負に制御する  
*東北医科薬科大学研究誌*, **65**, 印刷中