

9543 イオンチャネル(カルシウム依存性カリウムチャネル)によるリンパ球活性化の調節に関する研究

助成研究者：石田 康生 (帝京大学附属市原病院 病院病理)

目的及び方法

T細胞は活性化時にカルシウム応答と共に細胞膜電位の変化が知られている。細胞内カルシウムの上昇によって活性化されるカルシウム依存性カリウムチャネル(BK Kca チャネル)の作用による細胞膜の過分極が中心となる現象である。我々は長年これらの活性とT細胞機能の関連を解析してきた。今回、以下の項目の検索をおこなった。

1) フローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの細胞膜電位の動態の検討；細胞内カルシウムイオン濃度は indo-1, 細胞膜電位は oxonol dye により検出し、細胞表面抗原は PE 及び Tri-color 標識抗体を用いて T細胞サブセットを同定した。マウス脾臓、胸腺、リンパ節の未分画細胞を前述の indicator でラベルし EPICS ELITE フローサイトメトリーでマルチカラー解析を行った。細胞の刺激は主に ER の Ca-ATPase の阻害剤である Thapsigargin (TG) あるいは抗 CD3 抗体で行った。

2) マウス胸腺 BK Kca チャネル遺伝子のクローニング；分子レベルの解析を目的としマウスリンパ球の BK チャネルの遺伝子クローニングを試みた。ランダムプライマーによるマウス胸腺遺伝子ライブラリーを作製しマウス神経細胞よりクローニングされた同チャネル遺伝子配列から PCR を利用しリンパ系細胞に特異的遺伝子をクローニングした。

結果及び考察

1) リンパ球サブセットと細胞膜電位の動態；i) マウス Tリンパ球では通常細胞活性化時のカルシウム応答に応じて細胞膜の過分極が起こるが、一部に強く脱分極するものがマイナーサブセットとして含まれた (hyperpol T 及び depol T)。ii) CD4 細胞では depol T 細胞の殆どは memory あるいは anergic T 細胞のマーカーを持ち活性化された細胞群と考えられる。iii) 従って活性化マーカーを持つ depol T 細胞の一部 (CD44/CD4 T 細胞) は、細胞活性化時の脱分極がカルシウム応答を低下させることで memory cell の過剰な活性の抑制を不応細胞 (anergic cell) では不応の機序自体を担うと考えられる。iv) 一方、CD8 T 細胞では活性化マーカーを有するサブセットは depol CD8 T 細胞に凝集しない。v) 胸腺細胞の多くはカルシウム応答の呼応して過分極する hyperpol Thy 細胞であるが、活性化マーカーを伴わないにも拘らず SP 細胞にはマイナーサブセットとして depol Thy 細胞が含まれる。vi) depol T 細胞で活性化マーカーを持たない細胞群 (SP thymocyte の一部)、hyperpol T で活性化マーカーを持つもの (CD44 bright CD8 T 細胞など) では細胞の膜電位変化を前述の機能のみで説明できず、従って T細胞系で活性化時に見られる細胞膜電位の変化はこれまでに想像されていた以上の多様な機能に関連していると考えられる。

2) BK Kca 遺伝子クローニング；i) マウス胸腺から、非興奮性細胞を中心として広い分布を示す BK Kca チャネルを遺伝子クローニングされた。ii) メッセージの発現は PCR で検索した細胞の全てに認められ機能発現との間に著しい差異があった。機能発現は翻訳後の種々の調節機構によって行なわれると考えられた。

9543 イオンチャンネル(カルシウム依存性カリウムチャネル)によるリンパ球活性化の調節に関する研究

助成研究者：石田 康生（帝京大学附属市原病院 病院病理）

T細胞は活性化時にカルシウム応答と共に細胞膜電位の変化が知られている。細胞内カルシウムの上昇によって活性化されるカルシウム依存性カリウムチャネルの作用によっている。我々は長年これらの活性とT細胞機能の関連を解析してきた。今回、以下の項目の検索をおこなった。

- 1) フローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの細胞膜電位の動態の検討；細胞内カルシウムイオン濃度は indo-1, 細胞膜電位は oxonol dye により検出し、細胞表面抗原は PE 及び Tri-color 標識抗体を用いてT細胞サブセットを同定した。マウス脾臓、胸腺、リンパ節の未分画細胞を前述の indicator でラベルし EPICS ELITE フローサイトメトリーでマルチカラー解析を行った。細胞の刺激は主に ER の Ca-ATPase の阻害剤である Thapsogergin (TG) あるいは抗 CD3 抗体で行った。
- 2) マウス胸腺カルシウム依存性カリウムチャネル遺伝子のクローニング；ランダムプライマーによるマウス胸腺遺伝子ライブラリーを作製しマウス神経細胞よりクローニングされた同チャンネル遺伝子配列から PCR で得たプローブでリンパ系細胞に特異的遺伝子のクローニングを試みた。

結果；

- 1) 細胞膜電位と T細胞活性化；
 - i) 細胞内カルシウムイオン濃度の上昇はT細胞ハイブリドーマ (2B4) を強く過分極させ、細胞外カルシウムイオンの除去は細胞を脱分極させる。T細胞ハイブリドーマを TG で処理すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と共に強く過分極する。さらに EGTA により細胞外カルシウムイオンを除去すると細胞内濃度の減弱と共に強く脱分極する。このことはリンパ球の活性化に細胞膜電位が強く関与することを示唆する。
 - ii) T細胞ハイブリドーマの TG による細胞活性化と細胞膜電位。T細胞ハイブリドーマ (2B4) Kca（カルシウム依存性カリウムチャネル）を有するため活性化と共に過分極する。この過分極を Kca チャネルの阻害剤である CTX (Charybdotoxin) でブロックするとカルシウムイオン濃度の上昇は抑制され、またカルシウム応答反応は減弱し継続時間は短縮する。従って、Kca チャネルは細胞のカルシウム応答のレギュレーターとしての役割を果たしていると考えられる。
 - iii) マウスリンパ球に於ける Kca の機能的発現は多彩である。マウスリンパ節細胞あるいは脾細胞を細胞表面抗原抗体で標識し TG で刺激したものの細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と細胞膜電位を測定する。大半の T細胞は過分極し、B細胞は全て脱分極する。

- a) リンパ節、脾 T 細胞；CD4/CD8 T 細胞とも多くの細胞は細胞内カルシウムイオン濃度上昇と共に過分極するが 10 - 30 % の細胞は逆に脱分極する。脱分極する細胞は CD8 T 細胞により多く認められ、加齢と共に増加する傾向を示す。CD44 CD4 T 細胞をさらに解析すると CD44 bright サブセットが主に脱分極する。同サブセットは抗 CD3 抗体刺激に対しても低応答性である。一方、CD44 bright CD8 T 細胞サブセットは CD4 T 細胞のような反応性を示さない。
- b) 胸腺細胞；大半の細胞は末梢 T 細胞同様細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と共に過分極するが、その程度はやや弱い。CD4, CD8 single positive (SP) サブセットは末梢 T 細胞に類する反応をしめす。CD4/CD8 double positive (DP) サブセットでは強く脱分極するグループは含まれない。CD4/CD8 double negative (DN) サブセットのうち Heat Stable Antigen (HSA) 陽性未成熟胸腺細胞サブセットでは殆どが過分極し DP サブセットと同様の反応性を示したのに対して、HSA 陰性サブセットはその多くが脱分極する。
- 2) カルシウム依存性カリウムチャネル遺伝子クローニング；
- i) マウス胸腺 cDNA ライブラリーの作製。チャネル遺伝子の多くは 3' に長い non-coding region を持つため、ランダムプライマーを用い cDNA ライブラリーを作製した。マウス脳よりクローニングされた同チャネルの塩基配列より PCR プライマー (S4 領域を含む) を合成し胸腺 cDNA より得た産物をシーケンスの後プローブとして先のライブラリーをスクリーニングしクローンを得た。全長の塩基配列を決定し解析した。
- ii) 5' 4 個所の Met region 認められ 1114 アミノ酸よりなっている。3 個所のオルタナティブスプライシングサイトを認め、3' 末端部には神経筋組織より先に決定されたクローンには含まれていない配列を含んでいる。5' 側の non-coding region は神経系筋組織系と変異が大きいヒト脳と同チャネル遺伝子配列とほぼ同様である。
- iii) 胸腺に於ける Kca チャネルメッセンジャーの発現は弱く、脳組織の 1000 分の 1 程度である。多数のオルタナティブスプライシングによる種々のチャネルが作られるとされている。5' end にプライマーを設定して各臓器のメッセイジ量を比較した。骨格筋では半分以下、脳で 3/4 が骨格筋、脳組織を除き肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、では今回のクローンと同じタイプのチャネルが使用されていると考えられた。一方、脳では 1/4、骨格筋では 50% 以上が異なるタイプであると推定される。
- iv) 機能的発現のない細胞群でも Kca チャネルのメッセイジは発現のある細胞と同等である。細胞の過分極、脱分極は蛋白合成、チャネル分子の磷酸化などによる調節、あるいはカルシウム依存性クロライドチャネルなどの拮抗するチャネルなどによって決定されるものと考えられる。

考察

1) リンパ球サブセットの膜電位

カルシウム依存性カリウムチャネル (Kca チャネル) はリンパ球の活性に伴って細胞を過分極させ、なんらかの細胞機能の調節を行っているものと推定されている。最も直

接的な説明は過分極によりカルシウムイオンの細胞内外の電氣的勾配を高めカルシウムイオンの流入を増強するというものである。今回の結果でも過分極を押さえることでTGによるカルシウム応答は明らかに抑制される。同様の結果はこれまでも多く報告されている。しかし、1) 強く脱分極するB細胞は持続性の十分なカルシウム応答を示すこと、2) TGで脱分極するマイナーサブセットには高いカルシウムレベルを保つものが含まれていること、3) 抗CD3抗体刺激では条件によっては脱分極状態であっても強いカルシウム応答を持続し細胞増殖し得ること、などから脱分極が細胞活性にどって全てがネガティブに作用するとは考えにくい。カルシウム応答に限ればむしろ過分極した細胞は脱分極するものに比べ高い予備能をもつ状態であると解釈するのが妥当と考えられる。

末梢リンパ球マイナーサブセットのカルシウム応答時の細胞膜電位；この可能性の検討のためにまずカルシウム応答に伴って過分極あるいは脱分極するTリンパ球が生体内でどのようなサブセットを形成しているかを調べた。未分画のT細胞をTGで刺激すると多くは過分極する (hyperpolarized T cell; hyperpol. T) が 10 - 20% のマイナーグループはB細胞類似の脱分極を示す (depolarized T cell; depol. T)。in vitro で活性化したT細胞 (リンパ芽球) は Kca チャネル活性を失うことから depol. T細胞はこれら密接に関連した機能を持つものと考えられた。多くの報告では CD44 bright T細胞サブセットは CD4/CD8細胞いずれも memory サブセットとされる。しかし一方で TCR トランスジェニックマウスなどの特種な環境では anergic T細胞サブセットのマーカーになる。memory cell であれ anergic cell であれ活性化された細胞のマーカーに相当すると考えられる。depol. CD4 T細胞は CD44 bright CD4細胞を包括しこの可能性を支持するが depol. CD8 T細胞は CD44 bright/low サブセットをいずれも含み、CD44 bright CD8細胞の一部は hyperpol T細胞である。従って depol T細胞をある限られた機能集団とするのは必ずしも妥当とは言えない。

胸腺細胞マイナーサブセットのカルシウム応答時の細胞膜電位；胸腺細胞では末梢T細胞型の成熟 CD4/CD8 single positive (SP) サブセットは末梢同様の depol 胸腺細胞サブセットを伴う。未熟な CD4/8 double positive (DP) サブセットは大半が hyperpol 胸腺細胞で depol 細胞は殆ど含まない。最も未熟な HSA(-) CD48 double negative (DN) 胸腺細胞も DP 胸腺細胞に類似する。それに対し TCR(+) HSA(-) DN 胸腺細胞は強く depol T細胞の性質を示す。

T細胞サブセットと細胞膜電位 (まとめ)；細胞膜電位の特性からT細胞のサブセットを分類すると 1) 未分化胸腺細胞は hyperpol. Thy であり SP 胸腺細胞のマイナーサブセットとして depol. Thy が出現する。2) HSA(-) DN 胸腺細胞は depol. Thy である。3) 末梢T細胞の主体は hyperpol. T細胞である。4) CD44 bright CD4 T細胞は depol. T細胞である。5) CD8 T細胞にも depol T細胞が含まれるが包括的する細胞群はまだ明らかではない。

リンパ球細胞膜電位脱分極の生理的意義 (可能性として)； depol T細胞が CD44 bright T細胞を包括すること、hyperpol T細胞を in vitro で活性化すると depol T細胞となることから脾臓あるいはリンパ節よりの新鮮なT細胞が脱分極する性質は細胞が in

vivo で活性化されているか活性化されたことがあるかを示す。胸腺では HSA(+)DN/DP 細胞には明らかな depol 細胞が含まれず胸腺細胞のポジティブセレクションはここで言う活性化ではない。一方 SP 胸腺細胞は CD4/CD8 細胞いずれもマイナーグループとして depol 細胞を含む。これらは CD44 マーカー (-) で末梢 CD4 T 細胞群のそれとは明らかに異なる。CD8 T 細胞には CD44 low の depol 細胞を多く含み CD4 SP 胸腺細胞の depol 細胞と共通点がある。さらに特種な細胞群として HSA(-)DN 細胞には depol 細胞を多く含んでいる。以上の点で depol T 細胞は単に活性化された細胞だけではないと示唆される。機能的にどのような細胞群を形成するか現在はまだ明らかでない。HSA(-)DN 胸腺細胞には NK1.1 細胞が濃縮されている。これらの機能との関連性も可能性の一つである。いずれにしても depol T 細胞は複数の機能的サブセットを含んでいる。

脱分極をカルシウム応答のネガティブコントロールと考えれば memory cell には過剰反応を抑制する意味、anergic cell には抑制機構そのものの一つとして生理的意義を持つ。胸腺細胞 depol サブセットでの意義はそのいずれでもないと考えられる。今後の研究課題である。

2) マウス胸腺カルシウム依存性カリウムチャネル

BK チャネルの遺伝子クローニング；第二のアプローチは T 細胞のカルシウム応答に伴った過分極、脱分極を規定する分子は Kca チャネルでありその分子解析から膜電位変化の生理的意義を検討する為に、我々は BK チャネルのクローニングを行った。T 細胞には Kca チャネルの発現が知られているが、このチャネルは BK 及び SK チャネルがある。CTX によるブロック特性から、BK チャネルの発現が中心と考えられている。BK チャネルは既にマウス、ヒトの興奮性細胞から遺伝子クローニングされていたがオルタナティブスプライシングによって多数のアイソフォームが作られ臓器特異的なフォーム (T 細胞特異的など) の存在が想定されていた。我々が胸腺よりクローニングした遺伝子もコーディング領域の大半がマウス興奮性細胞のものと同じであったものの、3' に新たなスプライシングフォームを伴っていた。しかしこのアイソタイプは興奮性細胞に存在する物を除けば最も広く種々の臓器に分布するコモンフォームであった。従って BK チャネルの多様性は興奮性細胞に限られると考えられる。しかし最近同定された BK チャネルのベータ鎖の存在は示唆的である。これらのコンプレックスの形成によりチャネル特性はモディファイされチャネルの多様性が生まれると考えられリンパ球にも特異的なチャネル活性が起こりうる。この可能性は今後の詳細な検討により明らかになるはずである。

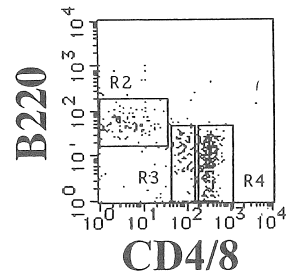
遺伝子発現とチャネルの機能的発現；リンパ球では Kca チャネルは多様に機能発現するが、メッセージはいずれの細胞にあっても同様に認められた。このことはリンパ球での Kca チャネル活性の多様な変動は翻訳以後のものであることを意味している。最近になりチャネル活性の調節がチャネル分子のチロシンあるいはセリン/スレオニンのリン酸化によっていることが明らかになりつつある。リンパ球系でも同様の機構による細胞膜電位の調節も行なわれているものと推定される。しかしリンパ球マイナーサブセットでの Kca チャネルメッセージ発現の細部に至る検討はまだ済んでおらずメッセージの多様性も含め今後の課題である。

BK チャネルは全ての過分極機構を調節しているか；リンパ球のBK チャネルの発現はCTXによる阻害および電気生理学的手法により確かめられている。しかし、最近の報告では、CTXに感受性のありBK とSK チャネルの中間に位置する電位非依存性Kcaチャネルの存在がリンパ系細胞で確かめられている。このチャネルの hyperpol T, depol T細胞における役割は明らかではない、さらに中心的な役割は果たしていないと思われるSK チャネルについても解析は余り進んでおらず、Jurkat T cell lymphoma の様な細胞がマイナーサブセットに存在する可能性も残されている。

まとめ

- 1) マウスリンパ球では Kca チャネルの作用により細胞活性時のカルシウム応答に応じて細胞膜の過分極が起こるが、T細胞のサブセットでは強く脱分極するものがマイナーサブセットとして含まれる。(hyperpol T 及び depol T)
- 2) CD4 細胞では depol T 細胞の殆どはmemory あるいは anergic T細胞のマーカーを持ち活性化された細胞群と考えられる。
- 3) CD8 T 細胞では depol T サブセットは必ずしも 2) の細胞群に当てはまらない。活性化マーカーを有するサブセットは depol CD8 T細胞に凝縮しない。
- 4) 胸腺細胞の多くはカルシウム応答の呼応して過分極する hyperpol Thy 細胞であるが、活性化マーカーを伴わないにも拘らず胸腺 SP 細胞にはマイナーサブセットとして depol Thy 細胞が含まれている。
- 5) 従って、depol T 細胞の一部 (CD44/CD4 T 細胞) は活性化マーカーを持ち、細胞活性時の脱分極はカルシウム応答を低下させることで memory cell は過剰な活性化の抑制を不応細胞 (anergic cell) の不応の機序自体を担うと考えられる。
- 6) depol T 細胞で活性化マーカーを持たない細胞群 (SP thymocyte の一部)、hyperpol T で活性化マーカーを持つもの (CD44 bright CD8 T細胞など) では細胞の膜電位変化を 5) の機能のみで説明できず、従って T細胞系で活性時に見られる細胞膜電位の変化はこれまでに想像されていた以上の多様な機能に関連していると考えられる。
- 8) T細胞の過分極はカルシウム依存性カリウムチャネルのよって引き起こされ、脱分極はその機能の欠落あるいは抑制のよると推定されてきた。今回マウス胸腺から、非興奮性細胞を中心として広い分布を示す BK Kca チャネルを遺伝子クローニングした。
- 9) メッセージの発現は PCR で検索した細胞の全てに認められ機能発現との間に著しい差異があった。機能発現は翻訳後の種々の調節機構によって行なわれると考えられる。

Cell population

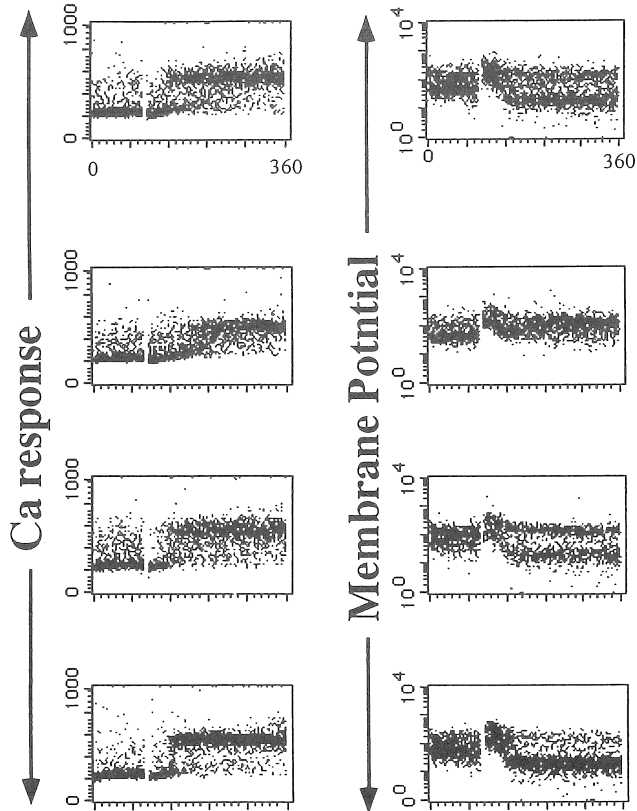


Unseparated

B cells

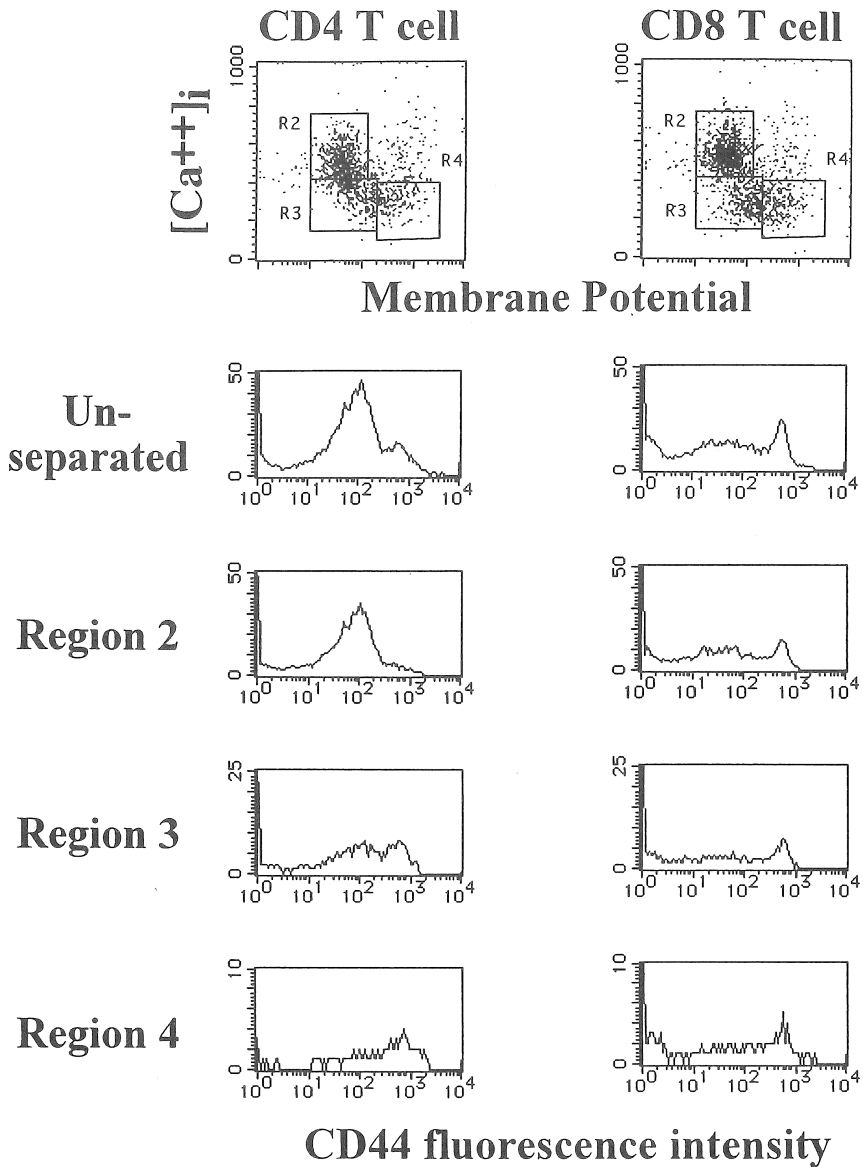
CD8
T cells

CD4
T cells



Time (sec)

TGにより誘導される細胞内カルシウムの上昇と細胞膜電位の変化。マウスリンパ節細胞を FITC 抗 CD4, FITC 抗 CD8, PE 抗 B220 抗体でラベルし 100 秒の時点で 100 pmol の TG を加え細胞内カルシウムの上昇と細胞膜電位の変化を測定した。CD4/8 細胞は FITC の蛍光強度の差により区別し、各グループをゲートした後それぞれの細胞内カルシウムと細胞膜電位を現した。細胞内カルシウムと細胞膜電位はそれぞれ indo-1, oxonol dye を指標色素に用いた。細胞内カルシウムは Y 軸方向で上昇を示し、細胞膜電位は蛍光強度の減少が過分極を示す。CD4, CD8 T 細胞のマイナーサブセットが細胞内カルシウムの上昇と共に脱分極している。



TGにより誘導されるCD4,44 T細胞の細胞内カルシウムの上昇と細胞膜電位の変化。
 TG処理後細胞内カルシウムの上昇、細胞膜電位の変化をa) 強く過分極し高い細胞内カルシウム上昇を示すグループ、b) 脱分極し細胞内カルシウム上昇が弱いグループ、c) それらの中間のグループにそれぞれゲートし、CD44の発現を検討した。c) グループにCD44の高発現するCD4 T細胞が濃縮されている。

Expression of potassium channel functions in normal T-cell

Cells	Ca-dependent	voltage gated
I] Thymocytes		
DN (immature)	+ (major population)	++
	- (minor population)	
DP	+ (intermediate)	++
	- (minor population)	
SP	+ (intermediate)	+/-
	- (minor population)	
DN (mature)	-/+	+/-
II] Peripheral T cells		
resting	++ (major population)	+/-
	- to + (minor population)	
activated (blasts)	++ or -	++
memory (clone)	-	++
memory (vivo)	- to +/- (CD4CD44 ^{bright})	+
	+/- to ++ (CD8CD44 ^{bright})	

T-cell activation and membrane potential

Ishida Yasuo (Teikyo Univ. School of Medicine, Ichihara Hospital)

Initial calcium response in the T-cell activation is an essential for following signal cascade. Major T-cells, as reported, also change their plasma membrane potential (Ψ) by activating calcium dependent potassium channels. Its physiological role, however, has not yet been fully clarified. We have approached the question by two different methodologies. First was to analyze T-cell populations which indicate variety characteristics of Ψ change during activation. By studying it, we are able to understand how the Ψ would work for those specific T-cell populations and speculate its physiological role. Second approach is genetic cloning of the channel which plays key role for Ψ behavior.

We used multi-color flow cytometry for the first study that can analyze cytoplasmic calcium ion concentration, membrane potential, and upto three different surface markers, simultaneously of whole thymocytes, lymph nodes and splenocytes. Minor T-cell populations indicated completely opposite behavior, marked depolarization during activation (depol T-cell), while major populations specifically hyperpolarize. One of those cells was CD4/CD44 bright population of spleen or lymph node cells that have been known as a major memory T-cell subset. Since activated T-cells in vitro also behave like a depol T-cell, the finding suggested that T-cell population which depolarize during activation could be previously activated cells in vivo. Since depolarization significantly decreases the driving force of fluxing outside calcium ions into cytoplasm, it could be advantageous for suppressing excessive responses of those concentrated preactivated cells. This regulation could avoid hyperactivation of the cells such in the hypersensitive disorders. However, CD8/CD44 bright cell population did not exclusively concentrate in depolarized T-cells. Depolarization of the Ψ must possess other role(s) besides negative regulator in the T-cells.

Hyperpolarization is derived by the activation of calcium dependent potassium channel. At least three different channels have been identified. In the lymphocytes, one channel, maxi calcium dependent potassium channel (BK channel) predominantly regulate hyperpolarization. We have cloned the channels gene from random primed mouse thymus cDNA library. The clone (mthyslo) was a common type BK channel gene and distributed wide variety of non-excitabile or excitabile cells, though thymus specific alternative form had been expected. The message was evident even in the cells that possess depolarized characteristics, that is, indication of functionally unexpressed channel activity. Functional expression of the channel, therefore, is suggested to be under the post transcriptional regulation.