

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04038

研究課題名(和文) 自己免疫疾患発症を抑制する胸腺上皮細胞の機能を制御する新規転写因子の解析

研究課題名(英文) Identification of the transcriptional regulator that controls functions of thymic epithelial cells required for immune tolerance

研究代表者

秋山 泰身 (Akiyama, Taishin)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50327665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,590,000円

研究成果の概要(和文)：髄質上皮細胞は、多種類の組織特異的タンパク質を異所的に発現して抗原提示し、それら自己抗原に応答するT細胞を胸腺内で除去することで、自己免疫疾患の発症を抑制する。転写因子AireとFezf2は、髄質上皮細胞における組織特異的タンパク質の遺伝子発現を制御するが、両者では発現制御を受けない組織特異的遺伝子が多数存在する。本研究では、組織特異的遺伝子の発現を制御する因子としてAscl1を同定した。Ascl1は髄質上皮細胞のクロマチン構造を変換することで、組織特異的遺伝子の発現を制御する。さらにその破綻は全身性の自己免疫を惹起した。すなわち、本課題により自己免疫を抑制する新たな制御因子が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患の発症を抑制している機構を理解することは、その治療のみならず予防の面でも重要である。本研究では、リンパ組織である胸腺による自己免疫疾患発症抑制に着目した。免疫応答に重要なTリンパ球が胸腺で分化するが、その一部は、自己組織で機能するタンパク質に応答するTリンパ球となる。これら自己応答性Tリンパ球の除去に胸腺上皮細胞が重要である。胸腺上皮細胞は、自己応答性Tリンパ球を除去するために、自己組織のタンパク質を異所的に発現する特殊な性質を持つ。本研究により、胸腺上皮細胞の特殊な性質を担う、新たな因子が明らかになった。今後、この知見を利用して自己免疫疾患の発症機構の理解が進展すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Thymus generates self-tolerant T cells in the body, for which thymic epithelial cells in the medullary region (mTECs) play essential roles, thereby preventing the onset of autoimmune diseases. mTECs act as antigen presenting cells for several thousand promiscuously expressed tissue-specific antigens (TSAs), which are regulated by transcriptional regulator Aire and Fezf2. In this study, we sought to identify regulators of TSA expression in mTECs that operate independently of Aire and Fezf2. We describe that transcriptional regulator Ascl1 controls expressions of Aire- and Fezf2-independent TSAs. Ascl1 is preferentially expressed in mTECs expressing lower level of CD80, which exhibit minimum Aire expression. Ascl1 deletion provokes autoimmunity in several organs. Mechanistically, expression of Ascl1 results in opening chromatin structure of TSA genes. Overall, our data suggests a novel Ascl1-dependent mechanism of TSA expression critical for suppressing onset of autoimmunity.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫 胸腺 Tリンパ球 上皮細胞 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の発症抑制に胸腺における T 細胞の選択機構が重要である。胸腺で T 細胞が分化する際、自己組織抗原を認識する T 細胞 (自己応答性 T 細胞) が一定頻度で生じるが、それらの多くは胸腺内で除去され、自己免疫疾患の発症は抑制される。胸腺内の自己応答性 T 細胞の除去に、胸腺髄質領域に局在する上皮細胞 (以下、髄質上皮細胞) が必要である。髄質上皮細胞は、(インシュリンのような) 組織特異的に発現する遺伝子 (以下、組織特異的遺伝子) を多種類、異所的に発現し、そこから翻訳されたタンパク質は、自己抗原として提示される。胸腺で分化途中の T 細胞が提示された自己抗原を認識した場合、アポトーシスを起こし (あるいは制御性 T 細胞に変換され) 結果として、自己応答性 T 細胞は胸腺外に流出する前に除去される。

髄質上皮細胞は、極めて多種類の組織特異的遺伝子を発現する。これまで、その制御に転写因子 Aire と Fezf2 の重要性が報告されている。Aire と Fezf2 は、髄質上皮細胞の組織特異的遺伝子の約 70% を発現制御するが、残り約 30% の組織特異的遺伝子の発現は、Aire あるいは Fezf2 を全く必要としない。

2. 研究の目的

本研究は、髄質上皮細胞の組織特異的遺伝子発現を制御し、自己免疫疾患の発症を抑制する、新たな転写因子の同定と、その機能解析を目的とした。具体的には、胎仔胸腺器官を *in vitro* で培養し、髄質上皮細胞の分化を誘導する実験系を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、髄質上皮細胞の分化に必須な RANK シグナルにより誘導される転写因子を同定した。それら転写因子群の中で、髄質上皮細胞で高発現する転写因子 *Ascl1* を候補とした。

- (1) 髄質上皮細胞の組織特異的遺伝子発現における *Ascl1* の役割解明
- (2) 自己免疫疾患の発症抑制における *Ascl1* の役割解明
- (3) *Ascl1* による組織特異的遺伝子発現の制御機構の解明

3. 研究の方法

(1) 胸腺構成細胞のフローサイトメーター解析

欠損マウス由来の胸腺を、常法に従いコラゲナーゼ処理で分散して単細胞とした。胸腺上皮細胞 (髄質上皮細胞と皮質上皮細胞) 画分については、蛍光ラベルされた EpCAM 抗体、UEA-1 レクチン、Ly51 抗体、CD80 抗体などにより、胸腺 T 細胞 (未熟な T 細胞、Foxp3 陽性制御性 T 細胞など) 画分については CD4、CD8、CD25、Foxp3 抗体などを指標にフローサイトメーターで解析した。

(2) 胸腺の組織学的構造解析

胸腺組織を OCT コンパウンドに包埋し、クリオスタットにより組織切片を調製した。組織切片に対して、ケラチン抗体や Aire 抗体などを用いて蛍光免疫組織染色を行なった。蛍光染色像は共焦点顕微鏡で観察、画像を取得した。

(3) 胸腺上皮細胞遺伝子発現の RNA-seq 解析

欠損マウス由来の胸腺を、常法に従い単細胞とし、CD80 が高発現する CD80^{hi} 髄質上皮細胞と低発現である CD80^{lo} 髄質上皮細胞および皮質上皮細胞をセルソーターで分離した。これらから RNA を調製し、cDNA ライブラリーを合成、次世代シーケンサーにより得られたリード数を解析することで発現量を決定した。

(4) 自己免疫の検討

欠損マウスから様々な臓器 (肝臓、膵臓、腎臓、顎下腺など) を採取、パラフィン組織切片を作成し、自己免疫に起因する炎症性細胞浸潤の有無を検討した。また血清を採取し 1 次抗体として *Rag1* 欠損マウスの様々な組織切片を蛍光免疫染色することで自己抗体価を評価した。

(5) ATAC-seq

方法 4 と同様に細胞を準備し、界面活性剤により細胞核を調製した。細胞核にトランスポダーゼを処理し、抽出されてくるゲノム DNA を分取した。分取した DNA を次世代シーケンス解析して、ゲノム DNA 配列を決定し、シーケンスリードのマッピングからアクセシビリティを評価した。

4. 研究成果

(1) 髄質上皮細胞の分化と維持における機能

髄質上皮細胞特異的に *Ascl1* を欠損するマウス (以下、欠損マウスと略) の胸腺を解析した。胸腺切片をヘマトキシリン染色や、免疫組織染色により解析したが、構造に大きな違いは見られなかった。さらに胸腺上皮細胞の分化をフローサイトメーターにより確認した。胸腺上皮細胞 (EpCAM⁺CD45⁻TER119⁻) の割合、胸腺上皮細胞内の髄質上皮細胞の割合は優位な差がなかったが、細胞数では、胸腺上皮細胞および髄質上皮細胞で減少していた。髄質上皮細胞をさらに CD80 の発現量で分画したところ、CD80 の発現が低い細胞画分 (CD80^{lo}) の割合が減少し、それに伴い、CD80 発現が高い画分 (CD80^{hi}) の割合が増加した。細胞数では、CD80^{hi} の髄質上皮細胞は有意に減少せず、CD80^{lo} 髄質上皮細胞が減少していた。さらに、欠損マウスの CD80^{lo} 髄質上皮細胞の Ki67 発現を比較したが、有意な差はなかった。

以上の結果から、Ascl1 は Aire および CD80 発現の低い細胞の分化あるいは維持に寄与すると結論した。

一方、胸腺で分化する T 細胞への影響もフローサイトメーターで検討した。CD4 および CD8 で分画したが、欠損マウスとコントロールで有意な差はなかった。また胸腺内制御性 T 細胞の分化を調べたところ、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺CD8⁻の割合、細胞数に変化はなかったが、CD25⁺GITR⁺CD4⁺CD8⁻の制御性 T 細胞前駆細胞の割合が若干減少した。これらの結果は、Ascl1 は T 細胞の分化には大きく影響しないことを示唆している。

(2) 髄質上皮細胞の組織特異的遺伝子発現における役割

欠損マウスの胸腺上皮細胞を CD80^{hi} 髄質上皮細胞と CD80^{lo} 髄質上皮細胞および皮質上皮細胞に分けてソーティングし、遺伝子発現を RNA-seq 法で調べた。その結果、CD80^{hi} 髄質上皮細胞と CD80^{lo} 髄質上皮細胞の画分において、欠損マウスで遺伝子発現が大きく変動した。さらに、CD80^{lo} 髄質上皮細胞では、CD80^{hi} 髄質上皮細胞に比べて、より多くの遺伝子が発現していた。一方、皮質上皮細胞の遺伝子発現は、ほとんど変動がなかった。さらに、CD80^{hi} 髄質上皮細胞と CD80^{lo} 髄質上皮細胞で減少する遺伝子を調べたところ、組織特異的遺伝子として分類される遺伝子が多く含まれていた (Figure 1)。

欠損マウスの遺伝子発現をさらに解析したところ、Aire や Fezf2 の発現にほとんど変化がなかった。すなわち、欠損マウスにおける組織特異的遺伝子の発現減少は、Aire や Fezf2 を介することに起因しないと結論した。さらに Aire 欠損マウスや Fezf2 欠損マウスから胸腺上皮細胞を採取し、組織特異的遺伝子の発現を欠損マウスと比較した。その結果、欠損マウスで減少する組織特異的遺伝子は Aire や Fezf2 欠損で減少する組織特異的遺伝子と大きく異なっていた。

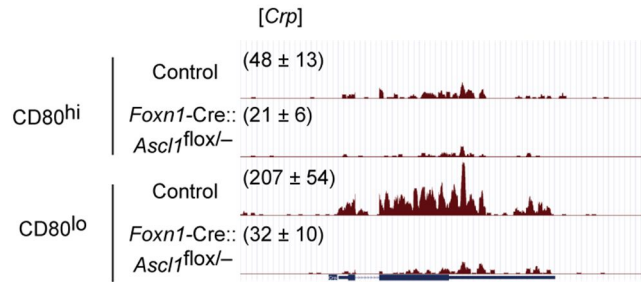


Figure 1. Ascl1 は髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御する

以上の結果から、Ascl1 は Aire や Fezf2 による制御とは異なる組織特異的遺伝子の発現を制御すると結論した。

(3) 自己免疫疾患の発症抑制における役割

ついで、欠損マウスからさまざまな臓器を採取し、自己免疫性の細胞浸潤の有無を検討した。その結果、肝臓、肺、腎臓などの臓器に炎症性細胞浸潤が見られた。また転写因子を全身で欠損する胎仔マウスより胸腺を採取し、胸腺ストローマへと培養したのち、ヌードマウスに移植した (欠損胸腺移植マウス) と、移植先のヌードマウスで同様な炎症性細胞浸潤が観察された。

また自己免疫の惹起を検討するため、欠損マウスや欠損胸腺移植マウスより血清を採取し、血液中の自己抗体化を、Rag1 欠損マウスの組織切片を用いた免疫組織染色法により検討した。その結果、欠損マウスと欠損胸腺移植マウスの血清のいずれにおいても、炎症性細胞浸潤が観察された臓器に対する自己抗体の存在が確認できた。これらの結果は、Ascl1 が胸腺上皮細胞で欠損すると、全身性の自己免疫が惹起すると結論した。

(4) 髄質上皮細胞のクロマチン構造への影響

Ascl1 による遺伝子発現制御の分子機構を調べるために、ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing) を行い、 オープンクロマチン領域の分布を網羅的に解析した。欠損マウスより CD80^{hi} および CD80^{lo} 髄質上皮細胞を採取し、細胞核としたのち、トランスポダーゼ処理することでオープンクロマチン領域の DNA を抽出し、次世代シーケンシングにより確認した。その結果、欠損マウスでは、コントロールに比べ、より多くの遺伝子領域のアクセシビリティが減少していた。欠損マウスでアクセシビリティが低下する領域は CD80^{lo} 髄質上皮細胞の方が、CD80^{hi} 髄質上皮細胞に比べて多かった。さらに欠損マウスでアクセシビリティが減少する遺伝子開始点と、欠損マウスで減少する遺伝子が相関していた。これらの結果は、Ascl1 の発現がクロマチン構造の変化を引き起こすことで、遺伝子の発現を制御することを示唆する。

以上の結果を踏まえ、Ascl1 は、クロマチン構造の変換を誘導することで、Aire や Fezf2 とは異なる組織特異的遺伝子の発現を制御、その制御により自己免疫の惹起を抑制していると考えられる。今後は、Ascl1 を介する機構のより詳細なメカニズム、さらに Aire や Fezf2 による遺伝子発現制御との役割分担について検討する必要がある。得られた成果は、自己免疫疾患の発症機構解明や、予防法あるいは治療法の開発へと発展が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Horie K, Kudo T, Yoshinaga R, Akiyama N, Sasanuma H, Kobayashi TJ, Shimbo M, Jeon H, Miyao T, Miyauchi M, Shirakawa M, Shiba D, Yoshida N, Muratani M, Takahashi S, and Akiyama T	4. 巻 501
2. 論文標題 Long-term hindlimb unloading causes a preferential reduction of medullary thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator (Aire)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 745-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.060.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanaya T, Sakakibara S, Jinnohara T, Hachisuka M, Tachibana N, Hidano S, Kobayashi T, Kimura S, Iwanaga T, Nakagawa T, Katsuno T, Kato N, Akiyama T, Sato T, Williams IR, Ohno H	4. 巻 215
2. 論文標題 Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- B signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Exp. Med	6. 最初と最後の頁 501-519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20160659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inuki S, Aiba T, Kawakami S, Akiyama T, Inoue JI, Fujimoto Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Chemical Synthesis of d-glycero-d-manno-Heptose 1,7-Bisphosphate and Evaluation of Its Ability to Modulate NF- B Activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 3079 ~ 3082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.7b01158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 秋山泰身、良永理子、秋山伸子	4. 巻 30
2. 論文標題 重力依存的な胸腺組織微小環境の機能制御	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 腎と骨代謝	6. 最初と最後の頁 169-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 秋山泰身、良永理子、秋山伸子	4. 巻 67
2. 論文標題 Aireを発現する髄質上皮細胞の分化機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 99-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horie Kenta, Sasanuma Hiroki, Kudo Takashi, Fujita Shin-ichiro, Miyauchi Maki, Miyao Takahisa, Seki Takao, Akiyama Nobuko, Takakura Yuki, Shimbo Miki, Jeon Hyojung, Shirakawa Masaki, Shiba Dai, Yoshida Nobuaki, Muratani Masafumi, Takahashi Satoru, Akiyama Taishin	4. 巻 9
2. 論文標題 Down-regulation of GATA1-dependent erythrocyte-related genes in the spleens of mice exposed to a space travel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44067-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Mizuki, Abe Chiho, Wakinaga Sakura, Sakane Kota, Yumiketa Yo, Taguchi Yuu, Matsumura Takayuki, Ishikawa Kosuke, Fujimoto Jiro, Semba Kentaro, Miyauchi Maki, Akiyama Taishin, Inoue Jun-ichiro	4. 巻 2
2. 論文標題 TRAF6 maintains mammary stem cells and promotes pregnancy-induced mammary epithelial cell expansion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0547-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Kazumasa B., Tateishi Ryosuke, Miyao Takahisa, Takakura Yuki, Akiyama Nobuko, Yokota Ryo, Akiyama Taishin, Kobayashi Tetsuya J.	4. 巻 2
2. 論文標題 Quantitative analysis reveals reciprocal regulations underlying recovery dynamics of thymocytes and thymic environment in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0688-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horie Kenta, Kato Tamotsu, Kudo Takashi, Sasanuma Hiroki, Miyauchi Maki, Akiyama Nobuko, Miyao Takahisa, Seki Takao, Ishikawa Tatsuya, Takakura Yuki, Shirakawa Masaki, Shiba Dai, Hamada Michito, Jeon Hyojung, Yoshida Nobuaki, Inoue Jun-ichiro, Muratani Masafumi, Takahashi Satoru, Ohno Hiroshi, Akiyama Taishin	4. 巻 9
2. 論文標題 Impact of spaceflight on the murine thymus and mitigation by exposure to artificial gravity during spaceflight	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56432-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀江 健太
2. 発表標題 Impacts of space flight and its ground models on the thymus
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀江 健太、良永 理子、秋山 伸子、秋山 泰身
2. 発表標題 重力変動によるリンパ組織胸腺の擾乱
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第31回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------