

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08622

研究課題名（和文）自己免疫寛容に必須な胸腺髄質上皮細胞へ分化決定する転写因子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification of a novel transcription factor required for differentiation of medullary thymic epithelial cells

研究代表者

秋山 伸子 (Akiyama, Nobuko)

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・上級研究員

研究者番号：60342739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：胸腺の髄質に局在する上皮細胞（髄質上皮細胞）は、胸腺で分化した自己応答性T細胞を除去し、自己免疫疾患の発症を抑制する。本研究課題は、髄質上皮の前駆細胞への分化を決定する新たなマスター制御転写因子の同定を目指した。

これまで行った髄質上皮前駆細胞の遺伝子発現解析により、前駆細胞を含めて髄質上皮細胞で特異的に発現する転写因子Xを得た。そこで髄質上皮細胞の分化決定における転写因子Xの役割を解明するために、世界に先駆けて転写因子X欠損マウスを作製・解析し、髄質上皮細胞の分化における必要性を検証した。その結果、転写因子Xは髄質上皮細胞の分化に必須ではないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子Xを欠損するマウスを世界に先駆けて作成した。髄質上皮細胞への分化を決定する機構の解明には至らなかったが、転写因子Xの発現が胸腺髄質上皮細胞のうち機能不明の新規細胞集団に限定していることを発見した。また転写因子Xの欠損により、新規細胞集団のmRNA発現が大きく変動していた。それらの多くは組織特異的遺伝子に分類されており、転写因子Xが胸腺における免疫寛容誘導機構に寄与している可能性が示された。組織特異的な自己抗原を異所的に発現・提示するという髄質上皮細胞の特性は、“自己”を規定する機構と言える。したがって基礎免疫学の根本概念の一つ自己・非自己識別の成立機構を理解する上で重要な知見と言える。

研究成果の概要（英文）：Medullary thymic epithelial cells (mTECs) expressing autoimmune regulator (Aire) are critical for preventing the onset of autoimmunity. However, transcription factors required for differentiation of Aire-expressing mTECs (Aire+ mTECs) is unclear. Here, we found a candidate of the transcription factor required for Aire+ mTEC differentiation. We made knockout mice of the candidate transcription factor X and analyzed about mTEC markers, UEA-1 ligand and maturation marker CD80. We found that the transcription factor X is not essential for differentiating into Aire+ mTECs.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫担当細胞が自己を異物と認識して自己抗体の産生や自己応答性リンパ球の増殖が起こり、自己組織に炎症や損傷をきたした疾病の総称が自己免疫疾患である。自己免疫疾患に共通するのは、自己応答性 T 細胞が生体内で活性化している点である。そのため自己免疫疾患を治療あるいは発症予防するためには、健常時の自己応答性 T 細胞の除去機構と、その破綻による発症機構を理解する必要がある。

自己応答性 T 細胞の除去に胸腺の機能が重要である。T 細胞は主に胸腺内で分化する。その際、自己応答性 T 細胞が一定頻度で生じるが、その多くは分化途中に胸腺内で除去される。この除去機構に、胸腺髄質に局在する上皮細胞（髄質上皮細胞）が必須である。

髄質上皮細胞は、様々な組織で特異的に発現するタンパク質（組織特異的抗原；インシュリンやカゼインなど）を、多種類にわたり異所的に発現し、抗原提示する。提示された抗原を高い親和性で認識する T 細胞は、アポトーシスで除去されるか、あるいは制御性 T 細胞へ変換される。その結果、自己組織抗原に対する T 細胞の免疫寛容が誘導される。一部の組織特異的抗原の遺伝子発現は、髄質上皮細胞にほぼ特異的に発現する核内因子 Aire に依存する (*Immunol. Rev.*, 271, 127, 2016)。Aire の遺伝子変異は、遺伝性の自己免疫疾患 APECED (自己免疫性多内分泌腺症-カンジタ症-外胚葉ジストロフィー) の原因となることから、髄質上皮細胞の機能は自己応答性 T 細胞の除去に重要であり、その機能破綻は自己免疫疾患の発症を引き起こすと考えられている。Aire や組織特異的抗原を発現する機能的な髄質上皮細胞は、内胚葉由来の前駆細胞から分化する。まず胸腺発生初期に Foxn1 が発現し、胸腺上皮細胞への分化を決定する。Foxn1 は分化後の胸腺上皮細胞にも発現し、分化・維持のマスター制御因子と考えられている (*Nat. Rev. Immunol.*, 4, 278, 2004)。ついで胸腺上皮前駆細胞は、2 つの胸腺上皮細胞、髄質上皮細胞と皮質上皮細胞に分化する。髄質上皮細胞と皮質上皮細胞は、その機能が全く異なる。したがって、各々の上皮細胞への分化決定機構が、各細胞の機能を規定する上で重要であると予想されるが、その分子機構は未解明である。

2. 研究の目的

申請者は、Foxn1 が胸腺上皮共通前駆細胞の分化を誘導し、胸腺上皮細胞へ運命決定するのに続いて、これまで未同定の転写因子が発現し、RANK 発現髄質上皮前駆細胞へ分化誘導することで髄質上皮細胞へ運命決定する、との仮説を立てた。そこで、本研究課題は、髄質上皮細胞への分化決定に必要なかつ十分な制御転写因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 候補転写因子 X の欠損マウスを作成・解析し、髄質上皮細胞分化における必要性を検証する。
- (2) 候補転写因子 X と同じ転写因子ファミリーに属する Y との二重欠損マウスを作成・解析し、髄質上皮細胞分化における必要性を検証する。
- (3) 候補因子 X および Y の標的遺伝子を同定する目的で、胸腺胸腺上皮細胞の RNAseq 解析を行う。

これらの知見から、候補転写因子 X および Y による髄質上皮細胞への運命決定およびその分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

髄質上皮細胞の分化決定における転写因子 X の役割を解明するために、世界に先駆けて転写因

因子 X 欠損マウスを作製・解析し、髄質上皮細胞の分化における必要性を検証した。その結果、転写因子 X は髄質上皮細胞の分化に必須ではないことが明らかとなった。

一方、転写因子 X は類似した DNA 結合ドメイン構造を持つ転写因子ファミリーに属する。この転写因子ファミリーに属するいくつかの分子が胸腺上皮細胞の分化時に発現上昇することを確認した。これら同一ファミリーに属する複数の転写因子が、胸腺髄質上皮細胞の分化にリダンダントに働く可能性がある。そこで、転写因子 X と同じ転写因子ファミリーに属する転写因子 Y の Flox マウスを導入した。転写因子 X の Flox マウスも作成し、胸腺上皮特異的に転写因子 X と Y を二重欠損するマウスの系統樹立を行った。その胸腺を解析した結果、胸腺重量および細胞の組成には大きな変化が見られなかった。この結果は転写因子 X および Y は髄質上皮細胞の分化に必須ではないことを示している。

一方、近年シングルセル発現解析の手法に進展が見られ、髄質胸腺上皮細胞は発現の違いから大きく四つのサブポピュレーションに分けられることが明らかになった (Bornstein C., 2018)。そのうち、これまでに同定されていなかった機能不明の新しい細胞集団 (mTECIV) が見つかった。我々は髄質胸腺上皮細胞を四つの細胞集団に分けて採取し、RNAseq 発現解析を行った。その結果、驚くべきことに、転写因子 X および Y はこの新規細胞集団で特異的に発現が高いことが明らかになった。さらに、転写因子 X および Y の二重欠損マウスにおいて、新規細胞集団 mTECIV の mRNA 発現が大きく変動していることが明らかになった。それらの多くは、組織特異的遺伝子に分類されていた。mTEC は組織特異的抗原を異所的に発現することにより、免疫寛容を誘導している。この結果により、X および Y の転写因子ファミリーが胸腺における免疫寛容誘導機構に寄与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

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 -

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, 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 444
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 関崇生、堀江健太、秋山伸子、秋山泰身	4. 巻 71(5)
2. 論文標題 胸腺抗原提示細胞の成熟におけるTNFレセプターファミリーシグナルの役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 482-489
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 堀江健太、秋山伸子、関崇生、高倉勇氣、石川龍也、秋山泰身	4. 巻 72(6)
2. 論文標題 胸腺内制御性T細胞分化におけるTRAF6の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 596-601
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、堀江健太、良永理子、秋山伸子	4. 巻 69(2)
2. 論文標題 免疫機能に対する宇宙滞在の影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 147-151
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, Kudo Takashi, Yoshinaga Riko, Akiyama Nobuko, Sasanuma Hiroki, Kobayashi Tetsuya J., Shimbo Miki, Jeon Hyojung, Miyao Takahisa, Miyauchi Maki, Shirakawa Masaki, Shiba Dai, Yoshida Nobuaki, Muratani Masafumi, Takahashi Satoru, Akiyama Taishin	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 Biochemical and Biophysical Research Communications	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、堀江健太、関崇生、秋山伸子	4. 巻 50(12)
2. 論文標題 宇宙環境ストレスがリンパ組織胸腺に与える影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 630-633
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 Ito-Kureha Taku, Miyao Takahisa, Nishijima Saori, Suzuki Toru, Koizumi Shin-ichi, Villar-Briones Alejandro, Takahashi Akinori, Akiyama Nobuko, Morita Masahiro, Naguro Isao, Ishikawa Hiroki, Ichijo Hidenori, Akiyama Taishin, Yamamoto Tadashi	4. 巻 11
2. 論文標題 The CCR4-NOT deadenylase complex safeguards thymic positive selection by down-regulating aberrant pro-apoptotic gene expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19975-4	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 Ishikawa Tatsuya, Akiyama Nobuko, Akiyama Taishin	4. 巻 12
2. 論文標題 In Pursuit of Adult Progenitors of Thymic Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 621824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.621824	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nobuko Akiyama, Takao Seki, Kenta Horie, Taishin Akiyama
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequencing analysis of murine thymic epithelial cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horie K, Seki T, Akiyama N, Kato T, Ohno H, Takahashi S, Akiyama T
2. 発表標題 Impacts of space flight and its ground models on the thymus
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seki T, Horie K, Akiyama N, Akiyama T
2. 発表標題 Dependency of thymic dendritic cell maturation on RANK and CD40 signaling
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society fo Immunology
4. 発表年 2018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