

令和元年6月18日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15727

研究課題名(和文) 正の選択の機能チューニングによる負の選択の制御

研究課題名(英文) Regulation of negative selection by fine-tuning TCR responsiveness through positive selection

研究代表者

近藤 健太 (KONDO, Kenta)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・専門研究員

研究者番号：60779974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺プロテアソームは、正の選択を司る胸腺皮質上皮細胞で特異的に発現し、ユニークな自己ペプチドを産生することでCD8+ T細胞産生を促すことが知られている。本研究は、胸腺プロテアソーム依存性の正の選択が胸腺髄質で実施される負の選択およびTCRレパートリア形成に及ぼす影響を検討した。その結果、胸腺プロテアソーム依存性の正の選択はユニークなTCR産生に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD8+ T細胞は、様々な抗原を認識可能なTCRレパートリーを形成することで生体防御に寄与する。正の選択を司る胸腺皮質上皮細胞で特異的に発現する胸腺プロテアソームを欠損するマウスでは著しくCD8+ T細胞が減少することから、胸腺プロテアソームはCD8+ T細胞のTCRレパートリー形成に寄与すると考えられている。しかし、胸腺プロテアソームがどのようにTCRレパートリー形成するのかについては明らかではない。

本研究により、胸腺プロテアソームが形成するTCRレパートリーを明らかにすることで、感染症や悪性腫瘍に対する免疫応答の更なる理解に繋がることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Cortical thymic epithelial cells (cTECs) present self-peptide-MHC complexes to DP thymocytes for positive selection. cTECs specifically express thymoproteasomes which produce unique self-peptides for promoting generation of CD8+ T cells. it is unclear how thymoproteasome-dependent positive selection affects negative selection in thymic medulla and TCR repertoire formation. We found that thymoproteasome-dependent positive selection produces unique TCRs in CD8+ T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：胸腺 T細胞 正の選択 負の選択

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体防御に有用な CD8+ T 細胞レパトリーは、胸腺へ移入した T 前駆細胞が胸腺皮質で正の選択を受けた後、胸腺髄質で負の選択を受けることで形成される。CD8+ T 細胞レパトリーを形成する正 / 負の選択はいずれも抗原提示細胞が提示する自己ペプチド-MHC 複合体 (self-peptide-MHC complexes: spMHC) と T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) の相互作用によりもたらされるが、時空間的に異なる様式で実施される。胸腺へ移入した T 前駆細胞は胸腺皮質で遺伝子再編成により TCR を発現した CD4 + CD8+ (DP) 胸腺細胞へ分化した後、正の選択を受ける。胸腺皮質で実施される正の選択は、胸腺皮質上皮細胞 (cortical thymic epithelial cells: cTECs) が担う。cTECs が提示する spMHC と弱く相互作用する DP 胸腺細胞は生存シグナルを受け取り選択される (正の選択)。これにより自己 MHC と会合できる有用な T 細胞が選別される。正の選択を受けた胸腺細胞は CCR7 を発現しケモカイン依存的に胸腺髄質へ遊走し負の選択を受ける。負の選択は、胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cells: mTECs) や樹状細胞 (dendritic cells: DCs) が MHC 上に提示する組織特異抗原と強く相互作用する自己抗原特異的 T 細胞をアポトーシスにより除去することや制御性 T 細胞へ分化させることで中枢性免疫寛容を成立させる。上記のように、正/負の選択が時空間的に独立して実施されることで、自己免疫寛容が確立し多種多様な病原体や腫瘍に反応できる T 細胞レパトリーが形成されると考えられている。

正の選択を司る cTECs は、5t サブユニットを含有した胸腺プロテアソームを特異的に発現する (Murata et al., 2007 Science)。胸腺プロテアソームは、構成型プロテアソームや免疫プロテアソームとは異なる基質特異性を有している。そのため、cTECs は胸腺プロテアソームにより産生されたユニークな自己ペプチドが抗原提示する (Murata et al., 2007 Science; Sakaki et al., 2015 Nature Commun)。5t 欠損マウスでは、cTECs で免疫プロテアソームが代償的に発現し、抗原提示する自己ペプチドが変容することにより、CD8+ T 細胞数の減少、TCR レパトリアの変容が生じると考えられている (Murata et al., 2007 Science; Nitta et al., 2010 Immunity; Kincaid et al. Nat Immunol 2016)。しかし、胸腺プロテアソーム依存性のせいの選択がどのような TCR レパトリアを形成しているのかについては明らかになっていない。また、興味深いことに 5t 欠損マウスでは、DP 胸腺細胞が異なる強さで TCR と spMHC の相互作用により正の選択を受けることで CD8+ T 細胞の抗原応答性が低下する (Takada et al., 2015 Nature Immunol)。5t 欠損マウスで認められる抗原応答性の低下は、正の選択を受けた直後の CD8 single positive cells (CD8SP) 胸腺細胞で既に生じている (Takada et al., 2015 Nature Immunol)。そのため、胸腺プロテアソーム非依存性の正の選択を受けた自己抗原特異的 CD8+ T 細胞は抗原応答性が低下する結果、胸腺髄質で mTEC や DCs が提示する組織特異抗原を認識したとしても強い TCR シグナルが誘導されず、負の選択を受けることなく末梢へ放出される可能性が考えられた。このように、胸腺プロテアソーム依存性の正の選択は CD8+ T 細胞に様々な影響を及ぼすことが考えられ、これらを明らかにすることは CD8+ T 細胞による生体防御機構の更なる理解に繋がると考えられる。

### 2. 研究の目的

胸腺プロテアソーム依存性の正の選択はユニークな自己ペプチドを DP 胸腺細胞に抗原提示することで、CD8+ T 細胞の TCR レパトリア形成、抗原応答性の至適化を担う。さらに上記の理由で胸腺プロテアソーム依存性の正の選択は胸腺髄質で実施される負の選択も制御している可能性が考えられる。5t 欠損マウスでは胸腺プロテアソーム非依存性の正の選択により抗原応答性が低下し、自己抗原特異的 CD8+ T 細胞が負の選択から逸脱しやすいことが考えられた。そのため、本研究では、(1) 「胸腺プロテアソームによる正の選択がどのような TCR レパトリア形成を形成するのか」、(2) 「胸腺プロテアソーム依存性の正の選択による負の選択の制御」について検証した。

### 3. 研究の方法

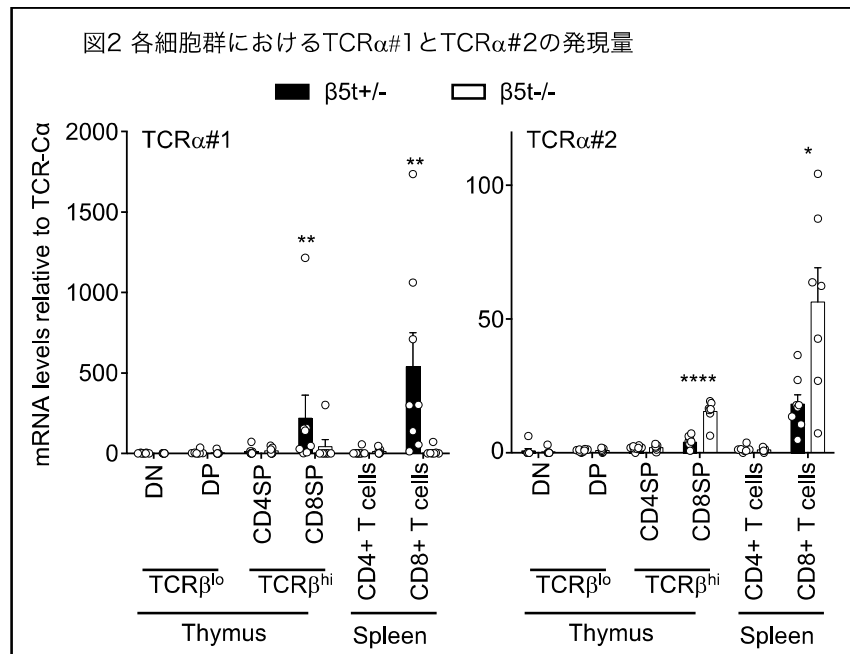
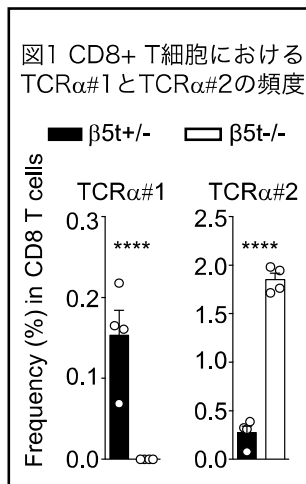
(1) 「胸腺プロテアソームによる正の選択がどのような TCR レパトリア形成を形成するのか」は、5t (+/-) マウスおよび 5t (-/-) マウスの CD8+ T 細胞の TCR レパトリアを次世代シーケンサーにより解析し、5t (-/-) CD8+ T 細胞でどのような TCR の頻度が増減しているのかを検証した。(2) 「胸腺プロテアソーム依存性の正の選択による負の選択も制御の可能性」では、OVA を特異的に認識する OT-I TCR トランスジェニックマウス (OT-I Tg マウス) と mTECs と膵細胞で mOVA を発現する RIP-mOVA マウスを用いて胸腺プロテアソーム依存性の正の選択による抗原応答性の至適化が負の選択に影響するかどうかを検証した。

### 4. 研究成果

(1) 「胸腺プロテアソームによる正の選択がどのような TCR レパトリア形成を形成するのか」  
胸腺プロテアソームによる正の選択がどのような TCR レパトリア形成するのかを検証するため、5t (+/-) マウスおよび 5t (-/-) マウスから末梢 CD8+ T 細胞を単離し、次世代シーケンサーにより TCR を網羅的に解析した。5t (-/-) マウスでは CD8+ T 細胞数が著しく減少するにも関わらず TCR の種類数は 5t (-/-) マウスと同程度であった。また、従来の TCR-V 領域特異的抗体を用いた解析と同様に各 TCR-V 領域の使用頻度が部分的に変化しており、MHC 上のペプ

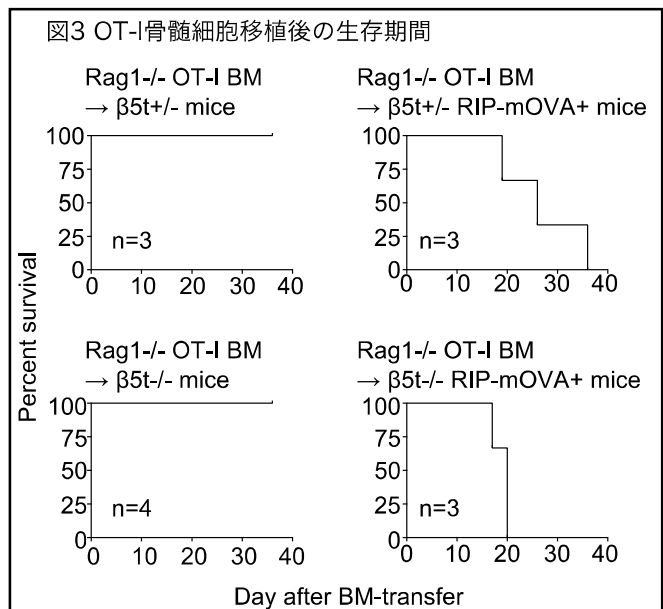
チド認識に重要な CDR3 (complementarity determining region 3) のアミノ酸配列の長さが異なっていた。次に 5t (-/-) マウスの CD8+ T 細胞で頻度が増減している TCR を探索した結果、

5t (-/-) マウスで頻度が減少する TCR $\alpha$ #1 と頻度が増加する TCR $\alpha$ #2 を同定した (図 1)。5t (-/-) マウスにおける TCR $\alpha$ #1 および TCR $\alpha$ #2 の頻度変容が CD8+ T 細胞系列のみで認められるのかを調べるため、DN、DP、CD4SP、CD8SP 胸腺細胞、末梢 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞を単離し、Nested real-time PCR により発現量を確認した。TCR $\alpha$ #1 と TCR $\alpha$ #2 の発現量は正の選択を受ける前の DN、DP、CD4SP 胸腺細胞や CD4+ T 細胞では低く、CD8SP 胸腺細胞と CD8+ T 細胞で高かった (図 2)。さらに次世代シーケンサーの結果と同様に、5t (-/-) マウスにおける TCR $\alpha$ #1 の発現量は CD8SP 胸腺細胞と CD8+ T 細胞で減少し、TCR $\alpha$ #2 の発現量は CD8SP 胸腺細胞と CD8+ T 細胞で増加していた (図 2)。これらの結果から、TCR $\alpha$ #1 は胸腺プロテアソーム存在下で優先的に選択され、TCR $\alpha$ #1 は胸腺プロテアソーム非存在下で優先的に選択されることが示唆された。現在、TCR $\alpha$ #1 もしくは TCR $\alpha$ #2 を発現する TCR $\alpha$ -Tg マウスを作製中である。TCR $\alpha$ -Tg マウスの樹立後、交配を進め TCR $\alpha$  (-/-) 5t (-/-) TCR $\alpha$ -Tg マウスを作製した後に、TCR $\alpha$ #1 および TCR $\alpha$ #2 発現胸腺細胞の解析、会合する TCR $\beta$ 鎖の同定を予定している。



## (2) 「胸腺プロテアソーム依存性の正の選択による負の選択の制御」

RIP-mOVA マウスの胸腺で分化する OT- 胸腺細胞は、cTECs による正の選択を受けた後、mOVA 発現 mTECs による抗原提示により負の選択を受けることが知られている。胸腺プロテアソーム非依存性の正の選択を受けた OT- 胸腺細胞は抗原応答性が低下し (Takada et al., 2015)、胸腺髄質における負の選択を受け難いことが予想される。この仮説を検証するため、放射線照射したマウスに OT- 骨髄細胞を移植し骨髄キメラマウスを作製した。5t (+/-) マウスと 5t (-/-) マウスに骨髄細胞を移植した場合、全てのマウスが生存した。一方、5t (+/-) PIR-mOVA マウスと 5t (-/-) PIR-mOVA マウスでは全てのマウスが死亡した。興味深いことに、5t (-/-) PIR-mOVA マウスの生存期間は 5t (+/-) PIR-mOVA マウスよりも短い傾向にあった (図 3)。現在、5t (-/-) PIR-mOVA マウスの胸腺細胞、末梢 T 細胞と脾臓に浸潤した T 細胞の解析を予定している。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kondo K, Ohigashi I, Takahama Y.

Thymus machinery for T-cell selection.

Int Immunol. 2018 31 (3):119-125. doi: 10.1093/intimm/dxy081. 査読有.

Morimoto S, Fujiki F, Kondo K, Nakajima H, Kobayashi Y, Inatome M, Aoyama N, Nishida Y, Tsuboi A, Oka Y, Nishida S, Nakata J, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H.

Establishment of a novel platform cell line for efficient and precise evaluation of T cell receptor functional avidity.

Oncotarget. 2018 Sep 25;9(75):34132-34141. doi: 10.18632/oncotarget.26139. 査読有.

Kondo K, Takada K, Takahama Y.

Antigen processing and presentation in the thymus: Implications for T cell repertoire selection.

Current Opinion in Immunology. 2017 46:53-67. doi: 10.1016/j.coi.2017.03.014. 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

Shahina K, Kondo K, Takada K, Ohigashi I, and Takahama Y

Peptide-induced positive selection of CD8+ T cells *in vivo*

第 14 回四国免疫フォーラム、徳島大学、2018 年 6 月 30 日

Kondo K, Takada K, Takahama Y.

Thymoproteasome-dependent positive selection conditions in vivo immune responses in CD8+ T cells

第 46 回日本免疫学会学術集会、2-F-W22-7-O/P、仙台国際センター、仙台、2017 年 12 月 12-14 日

〔図書〕(計 1 件)

近藤健太 他, 南江堂, 免疫生物学 (原書第 9 版), 885(295-340), 2019 年.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。