

令和元年6月14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：17K15740

研究課題名(和文) マウス胸腺微小環境を構成するWntシグナル活性化細胞の動態と機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of cellular dynamics and function of Wnt-responding cells which constitute the thymic microenvironment in mice

研究代表者

藤森 さゆ美 (FUJIMORI, Sayumi)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・助教

研究者番号：20589717

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)：分泌シグナル因子であるWntは、胸腺内でT細胞分化の制御に働くことが知られるものの、胸腺微小環境を構築する胸腺上皮細胞の分化をどのように制御するかについては分かっていない。本研究では、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析や遺伝子機能解析により、胸腺の初期発生段階からの胸腺上皮細胞におけるWnt/ β -cateninシグナル伝達系の緻密な制御が、胸腺微小環境の初期構築や生後のT細胞産生に関わる胸腺上皮細胞の安定的供給に重要な役割を担うことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺におけるT細胞の増殖・分化・成熟は、胸腺微小環境を構築する胸腺上皮細胞との連続的な細胞間相互作用により、多段階を経て執り行われるが、この過程では、各段階で機能する特定の胸腺上皮細胞群の存在が不可欠である。本研究では、胸腺上皮細胞の垂集団として新たに見出された、Wnt/ β -cateninシグナル伝達系を活性化する胸腺上皮細胞の機能的役割を特定することにより、胸腺の初期構築および生後の胸腺の恒常性維持機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previous findings have shown that the Wnt signaling is involved in T-cell development in thymus. However, how Wnt signaling pathway controls the differentiation of thymic epithelial cells (TECs), which constitute the thymic microenvironment, is poorly understood. By analysis of cell lineage of Wnt-responding cells and TEC-specific β -catenin mutant mice, we identify that the fine-tuning of Wnt/ β -catenin signaling activity in TECs is responsible for establishment of thymic microenvironment essential for promoting the production of the proper number of T cells during mouse development.

研究分野：免疫

キーワード：Wnt 胸腺 胸腺上皮細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

胸腺はT細胞の増殖・分化・成熟を司る重要な器官である。骨髄から移入した血球系の前駆細胞が、T細胞へと分化・成熟を遂げて最終的に末梢へと出ていくまでの過程においては、胸腺組織を構築する胸腺上皮細胞との相互作用が不可欠である。胸腺上皮細胞には、中枢性の自己寛容の確立に重要な役割を担う胸腺髄質上皮細胞と、T細胞のレパトア形成を担う胸腺皮質上皮細胞が知られている。これら胸腺上皮細胞は、各細胞が特定の分子集団を発現し、各々胸腺の髄質又は皮質部分において、連続的なT細胞との細胞間相互作用が可能な胸腺微小環境を形成している。近年、これら胸腺上皮細胞を供給する前駆細胞あるいは幹細胞として、胸腺髄質上皮幹細胞 (Sekai et al, Immunity 2014) や、胸腺プロテアソームサブユニット 5t を発現する胸腺上皮共通前駆細胞 (Ohigashi et al, Cell Rep 2015) の存在が明らかになったが、これらが実際に胸腺組織内でいつどのように分化し、最終的にT細胞分化に適した胸腺微小環境を構築するののかについてはいまだ不明な点が多い。本研究では、様々な組織・器官の形成過程に重要な分泌シグナル分子 Wnt を介するシグナル伝達が、胸腺上皮細胞の初期分化制御に関与する可能性を調べるため、特に Wnt/ β -catenin シグナル伝達系に注目して検討を行った。

胸腺においては、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系で働く TCF ファミリー転写因子がT細胞の分化を制御することや、胸腺上皮細胞において胸腺形成に必須である Foxn1 の発現を制御することなどが知られている。しかし、Wnt が胸腺内でどのように拡散し、空間的にT細胞や胸腺上皮細胞の分化を制御しているかについては不明である。私たちは、近年開発された、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の活性化状態を可視化できる Wnt レポーターマウス (Takemoto et al, Gene to Cell 2016) を用いて行った解析から、胸腺内で特徴的な空間分布を示す新規の Wnt 活性化胸腺上皮細胞群の存在を見出している。そこで、これらの Wnt 活性化細胞群が、発生初期および生後の胸腺において、胸腺微小環境の恒常性維持や胸腺皮質上皮細胞の安定的供給に果たす役割を明確にするため、本研究に着手した。

2. 研究の目的

これまでの解析で新たに見出した Wnt 活性化胸腺上皮細胞の亜集団に着目し、トランスクリプトーム解析により、(1)新規 Wnt 活性化細胞群の細胞特性の決定と関連遺伝子群の同定を行い、Wnt 活性化細胞の特性を明らかにすると共に、細胞系譜追跡法による(2)Wnt 活性化細胞の分化経路および胸腺微小環境構築過程の解明を試みることににより、Wnt 活性化細胞の時空間的な動態から胸腺微小環境構築のプロセスを探る。また、Wnt シグナル関連因子の遺伝子改変マウスを作出し、(3)Wnt シグナル活性の制御による胸腺微小環境の恒常性維持に対する影響の検討を行うことにより、マウスの胸腺発生過程やその後の成長、退縮過程、また生後の胸腺の恒常性維持に果たす Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の機能的意義の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新規 Wnt 活性化細胞群の細胞特性の決定と関連遺伝子群の同定

Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の活性化状態を可視化できる Wnt レポーターマウス (R26-WntVis) を用いた解析により、胸腺発生初期から生後にかけて Wnt 活性化細胞の胸腺組織内分布を明らかにする。また、フローサイトメトリー解析により、Wnt 活性化胸腺上皮細胞を分画し、トランスクリプトーム解析により細胞の特性を調べることにより、胸腺微小環境を構成する Wnt 活性化胸腺上皮細胞の細胞特性を明らかにする。

(2) Wnt 活性化細胞の分化経路および胸腺微小環境構築過程の解明

胸腺の特定の領域に分布する Wnt 活性化胸腺上皮細胞が、どの系譜の細胞に由来するか、また Wnt 活性化細胞は Wnt シグナル入力後にどのような細胞運命をたどるかについて細胞系譜追跡法により解析する。5t-rtTA マウス、tetO-Cre マウス、赤色蛍光レポーターマウス (R26R-tdTomato) および Wnt レポーターマウスを掛け合わせて、Doxycycline の投与により 5t 発現細胞の追跡と Wnt 活性化状態の確認が同時に可能なマウスを作出し、マウス胸腺内において、時期特異的に標識した細胞の追跡実験を行う。胸腺皮質上皮細胞は、そのほとんどが胎児期の 5t 発現細胞に由来することが報告されているので (Ohigashi et al, Cell Rep 2015)、胎児期の Doxycycline 投与で標識した 5t 発現細胞由来の細胞が、一定期間経過後の胸腺において Wnt 活性化細胞に分化し得るかを確認する。また同時に、胸腺皮質上皮細胞の異なる分化段階で発現する分子の免疫組織化学的解析を行い、胸腺のどの領域で、どの分化段階の胸腺上皮細胞において Wnt シグナル伝達系の活性化が開始されるのかを調べることににより、Wnt シグナルの入力が必要な時期や胸腺内領域を特定する。

Wnt 活性化細胞は、5t を発現する胸腺上皮共通前駆細胞より未分化な細胞である可能性も考えられるため、Wnt 活性化細胞の細胞系譜について追跡実験を行う。ここでは、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の活性化により発現が誘導される Axin2 のプロモーター下で CreERT2 が発現するマウス (Axin2-CreERT2) (van Amerongen et al, Cell Stem Cell 2012) を、赤色蛍光レポーターマウスおよび Wnt レポーターマウスと掛け合わせ、Tamoxifen 投与により特定の時期に Wnt シグナルを活性化した細胞と、解析の時点で Wnt 活性化状態にある細胞を同時に検出可能なマウスを作出し、マウス胸腺内において、時期特異的に標識した Wnt 活性化細胞の追跡実験を行

う。時期特異的に Tamoxifen を投与し、特定の時期に Wnt シグナル伝達系を活性化させた細胞が、どのような運命をたどり胸腺皮質上皮細胞に分化・成熟するのかについて、時空間的な解析を試みる。ここで標識される Wnt 活性化細胞は、胸腺皮質上皮細胞以外の細胞も含むため、胸腺皮質上皮細胞の各分化段階特異的な分子の発現を免疫組織化学法等により確認しながら細胞系譜実験を行い、Wnt 活性化細胞が胸腺皮質の空間をどのように移動し、どのように性質を変化させながら胸腺微小環境を構築していくのかを明らかにする。

(3) Wnt シグナル活性の制御による胸腺微小環境の恒常性維持に対する影響の検討

これまでの研究から、胸腺上皮細胞における Wnt/ β -catenin シグナル伝達系は、生後の胸腺の恒常性維持において機能的な役割を果たしていると考えられるが、作用時期や詳細なメカニズムは分かっていない。そこで本研究では、胸腺上皮細胞特異的な 5t-Cre を用いて、 β -catenin exon 3 floxed マウス(Harada et al., EMBO J 1999)、または β -catenin floxed マウス(Braut et al., Development 2001)とそれぞれ掛け合わせるにより、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の主要なメディエーターである β -catenin の機能を、胸腺上皮細胞特異的に亢進したマウス、及び胸腺上皮細胞特異的に β -catenin を欠損したマウスを作成する。これら遺伝子改変マウスについて、免疫組織学的解析やフローサイトメトリー解析を行い、T 細胞や胸腺皮質上皮細胞の分化および機能に与える影響を調べることにより、胸腺微小環境の恒常性維持に対する胸腺上皮細胞における Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の機能的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 新規 Wnt 活性化細胞群の細胞特性の決定と関連遺伝子群の同定

Wnt レポーターマウスを用いて、胸腺内における Wnt 活性化細胞の組織内分布を調べたところ、胸腺の発生初期から成体期にかけて、胸腺髄質および皮質領域において特徴的な空間分布を示す Wnt 活性化細胞の存在が認められた。また、Wnt レポーターマウスを用いた免疫組織化学的解析やフローサイトメトリー解析により、生後 2 週齢のマウス胸腺では、Wnt レポーターの活性化は胸腺細胞ではほとんど認められないが、胸腺上皮細胞において高い活性が認められた。特に胸腺皮質上皮細胞は、Wnt 活性化の有無により大きく 2 つの細胞集団に分かれることが明らかになった。ここで当初は、Wnt 活性化の有無で胸腺皮質上皮細胞を大別し、トランスクリプトーム解析を行うことを予定していたが、(2)で行った細胞系譜追跡による組織学的解析の結果から、胸腺皮膜下領域に存在する Wnt 活性化胸腺上皮細胞には、分化が進んだ網状の胸腺皮質上皮細胞とは異なる、細胞突起が少ない立方体状の形状をした比較的未熟な胸腺上皮細胞が多く含まれる可能性が考えられたため、胸腺皮質上皮細胞を分布領域に応じてさらに分画する必要性が生じた。そこで、通常の胸腺上皮細胞調整法を改変し、胸腺上皮細胞を胸腺皮膜側から順に回収可能な方法の確立に取り組んだ。最終的に、胸腺皮質の皮膜下領域からより深部の領域にかけて存在する Wnt 活性化細胞をいくつかの分画に分けて回収することに成功した。これにより、Wnt 活性化細胞のトランスクリプトーム解析については、本研究開始時に予定したよりも実施が遅れ、現在も解析を継続中であるが、胸腺皮質の領域特異的な Wnt 活性化胸腺上皮細胞で特徴的な発現を示す遺伝子の網羅的解析が可能になった。

(2) Wnt 活性化細胞の分化経路および胸腺微小環境構築過程の解明

マウス胸腺の特定領域に分布する Wnt 活性化細胞がどの系譜の細胞に由来するかを調べるため、まず既知の胸腺上皮前駆細胞の細胞系譜追跡を行った。胸腺上皮共通前駆細胞である 5t 発現細胞の追跡と Wnt 活性化状態の確認が同時に可能なマウス (5t-rtTA/+; tetO-Cre/+; R26R-tdTomato/+; R26-WntVis/+) の作出を行い、胎仔期の Doxycycline 投与で標識した 5t 発現細胞由来の細胞が、一定期間経過後の胸腺において Wnt 活性化細胞に分化し得るかを確認した。胎仔期に Doxycycline 投与後、4 週齢及び 8 週齢マウスの胸腺について免疫組織化学解析を行ったところ、胸腺皮質領域で認められる Wnt 活性化細胞の約 8 割が、胎生期の 5t 発現細胞に由来することが確認された。そのうち、皮膜下に存在する 5t 発現細胞由来の Wnt 活性化細胞の一部は、成熟胸腺上皮マーカーを発現しておらず、細胞突起が少ない立方体状の形状をしていたことから、比較的未熟な胸腺上皮細胞である可能性が考えられ、Wnt/ β -catenin シグナルは胸腺上皮細胞分化の比較的早い段階から活性化されることが示唆された。

続いて、Wnt 活性化細胞の細胞系譜について追跡実験を行った。Tamoxifen 投与により特定の時期に Wnt シグナルを活性化させた細胞と、解析の時点で Wnt 活性化状態にある細胞を同時に検出可能なマウス (Axin2-CreERT2/+; R26R-tdTomato/+; R26-WntVis/+) を作出し、2 週齢のマウスに Tamoxifen を腹腔内に単回投与したのち、2 日後及び 2 週間後に胸腺の免疫組織化学解析を行った。その結果、追跡 2 週間後の胸腺皮質領域では、追跡 2 日後では認められなかった網状の胸腺皮質上皮細胞が多数観察され、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系を活性化させた細胞の一部は、網状の胸腺皮質上皮細胞に分化することが確認された。

これらの結果から、胸腺上皮細胞の分化過程において、Wnt/ β -catenin シグナルは胸腺上皮細胞分化の比較的早い段階から活性化し、その後、胸腺微小環境を構築する成熟胸腺皮質上皮細胞へと経時的に分化することが明らかになった。

(3) Wnt シグナル活性の制御による胸腺微小環境の恒常性維持に対する影響の検討

(1)と(2)の解析結果から、マウス胸腺において、Wnt/ β -catenin シグナル活性の高い細胞は、胸腺上皮細胞であること、また、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系が胸腺上皮細胞分化の早い段階から活性化されていることから、胸腺上皮細胞において Wnt シグナルの入力を制御した場合において、胸腺上皮細胞分化や T 細胞の分化・成熟を担う胸腺微小環境がどのように変化するかを調べるため、胸腺上皮細胞で Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の活性制御が可能な遺伝子改変マウスの作出、およびその表現型の解析を行った。胸腺上皮細胞における β -catenin を介する Wnt シグナル活性制御については、Foxn1-Cre マウスを使用して行った解析結果が報告されているが、Foxn1-Cre を用いた β -catenin 機能亢進マウス(Zuklys et al., J Immunol 2009)では胸腺発生初期に胸腺原基の胸腔への下降障害が認められる一方で、 β -catenin 欠損マウス(Swann et al., Sci Rep 2017)は生後間もなく死亡することから、胸腺上皮細胞における Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の役割は未だ特定されていない。今回、胸腺上皮細胞特異的な 5t-Cre を用いて、 β -catenin exon 3 floxed マウス(Harada et al., EMBO J 1999)、または β -catenin floxed マウス(Brautl et al., Development 2001)とそれぞれ掛け合わせることで、胸腺の胸腔下降障害が認められない β -catenin 機能亢進マウス (5t-Cre/+; β -catenin ex3fl/+) および、生後生存可能な β -catenin 欠損マウス (5t-Cre/+; β -catenin fl/fl) が得られたので、これら遺伝子改変マウスの胸腺微小環境の変化について、免疫組織化学的解析やフローサイトメトリー解析により評価した。

胸腺上皮細胞特異的な β -catenin 機能亢進マウスでは、胸腺発生の早い段階から胸腺上皮細胞の分化異常を伴う胸腺の形成異常が認められた【図1】。フローサイトメトリー解析により、胎生 15 日齢の胸腺では、T 細胞分化が DN 1 の早い段階で障害されていることが、明らかになった。このマウスは、外見上の異常はなく生後も生存可能であるが、8 週齢のマウスでは、生後も継続する著しい胸腺形成異常により、脾臓やリンパ節などの末梢組織において T 細胞はほとんど認められなかった。

一方で、胸腺上皮細胞特異的な β -catenin 欠損マウスでは、生後 2 週齢の胸腺髄質上皮細胞および胸腺皮質上皮細胞で β -catenin の発現がほとんど認められないことが確認され、胸腺上皮細胞特異的な β -catenin 欠損マウスは、生後も生存可能であることが明らかになった。このマウスについて新生仔から成体期にかけて解析を行ったところ、胸腺サイズ及び胸腺重量の低下が認められるが、免疫組織化学解析においては、胸腺構造に大きな変化は認められず、Foxn1 や Aire の発現も対照群と同様に観察された。また、新生仔から成体期にかけて胸腺内で産生される T 細胞の総数は低下するものの、8 週齢マウスでは、胸腺における DN サブセット、DP、CD4SP 及び CD8SP の割合は対照群と比べてほとんど変わらず、現時点までの解析において、T 細胞の分化に大きな変化は認められなかった。

胸腺上皮細胞特異的な β -catenin 欠損マウスについては、胸腺上皮細胞分化やその他のリンパ球分化に関して詳細な解析を行う必要があるが、これまでに得られた結果から、胸腺上皮細胞では、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の微調整により、胸腺上皮細胞の正常な分化や胸腺内での T 細胞の産生量が制御されていることが明らかになった。既報の Foxn1-Cre を用いた β -catenin 変異マウスの表現型には、胸腺上皮細胞以外の Foxn1 発現細胞に対する影響も含まれる可能性があることもわかり、胸腺上皮細胞特異的な 5t-Cre を用いて行った今回の解析により、胸腺上皮細胞により特化した Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の役割が解明され、胸腺上皮細胞においては、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系の緻密な制御が、胸腺微小環境の初期構築および生後の T 細胞産生に関わる胸腺上皮細胞の安定的供給に必須であることが示された。

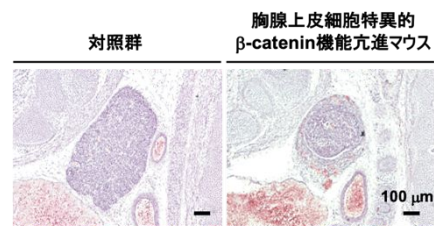
< 引用文献 >

Sekai M, Hamazaki Y, Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance. *Immunity*. 41(5), 2014, 753-61.

Ohigashi I, Zuklys S, Sakata M, Mayer CE, Hamazaki Y, Minato N, Hollander GA, Takahama Y. Adult Thymic Medullary Epithelium Is Maintained and Regenerated by Lineage-Restricted Cells Rather Than Bipotent Progenitors. *Cell Rep*. 13(7), 2015, 1432-1443.

Takemoto T, Abe T, Kiyonari H, Nakao K, Furuta Y, Suzuki H, Takada S, Fujimori T, Kondoh H. R26-WntVis reporter mice showing graded response to Wnt signal levels. *Genes Cells*. 21(6), 2016, 661-9.

胎生15.5日齢マウス胸腺原基



【図1】 胸腺上皮細胞特異的に β -cateninの機能を亢進したマウスの胸腺原基のHE染色

van Amerongen R, Bowman AN, Nusse R. Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ β -catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell*. 11(3),2012,387-400.

Zuklys S, Gill J, Keller MP, Hauri-Hohl M, Zhanybekova S, Balciunaite G, Na KJ, Jeker LT, Hafen K, Tsukamoto N, Amagai T, Taketo MM, Krenger W, Holländer GA. Stabilized β -catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J Immunol*. 182(5),2009,2997-3007.

Swann JB, Happe C, Boehm T. Elevated levels of Wnt signaling disrupt thymus morphogenesis and function. *Sci Rep*. 7(1),2017,785.

Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the β -catenin gene. *EMBO J*. 18(21),1999,5931-42.

Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O, Kemler R. Inactivation of the β -catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*. 128(8),2001,1253-64.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

Sayumi Fujimori, Izumi Ohigashi, Yousuke Takahama, Shinji Takada. Role of β -catenin in thymic epithelial progenies of β 5t positive progenitors. *EMBO Workshop, ThymE: T cell and thymus biology*, 2019

藤森 さゆ美、大東 いずみ、高田 慎治、高濱 洋介、マウス胸腺上皮細胞特異的な Wnt/ β -catenin シグナル経路活性化による胸腺形成異常、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

藤森 さゆ美、大東 いずみ、竹本 龍也、高濱 洋介、高田 慎治、マウス胸腺皮質上皮細胞亜集団における Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大東 いずみ

ローマ字氏名：(OHIGASHI, Izumi)

研究協力者氏名：高濱 洋介

ローマ字氏名：(TAKAHAMA, Yousuke)

研究協力者氏名：高田 慎治

ローマ字氏名：(TAKADA, Shinji)

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。