

平成24年5月29日現在

研究	%' \$%
	&\$\$, &\$%\$
	'&\$&\$\$\$* -
	cf[Ubc]X A<7 H
	Human MHC restricted T cell generation using thymic organoid
研究代表者	
	濱崎 洋子 (HAMAZAKI YOKO)
	京都大学・医学研究科・准教授
	研究者番号：10362477

研究成果の概要（和文）：

T細胞分化を支持する胸腺上皮細胞に類似したヒト皮膚の細胞を用い、試験管内で機能的なヒトT細胞を分化させる試みを行った。その結果、胸腺様オルガノイドの形成には成功したもの、様々なサイトカインや細胞外基質の組み合わせを試すもT細胞の産生には至らなかった。ヒト化マウスにおけるヒトT細胞産生過程の解析では、負の選択を担う胸腺髄質構造に異常があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to generate MHC-restricted human T cells *in vitro* by co-culturing human pre-T cells and human keratinocytes. We succeeded in forming thymic organoid; however, failed to induce functional T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
年度			
年度			
総計	24,500,000	7,350,000	31,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：T細胞分化 胸腺 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫機能の増強、自己応答性の制御、さらには免疫系の再生に向けて、近年多様な新技術開発が国内外で進められている。例えば、免疫不全マウスへのヒト造血幹細胞移植により、マウスの体内でヒトの免疫血液細胞系を高い効率で再構築することがすでに可能となっているし、試験管内で造血幹細胞や ES/iPS 細胞から免疫担当細胞を分化誘導・増殖させる試みも世界中で精力的に進められている。さらに、最近では比較的シンプルな方法によって、正常リンパ節と同等の組織構築を有するマウス人工リンパ節を形成させることに成功し、体内で強い特異的免疫応答を起こしうることが示されている。しかし、これら多くの試みにもかかわらず、ヒトの機能的な T リンパ球の生成・再生はいまだに達成されていない。これまで試験管内で造血幹細胞や ES 細胞からごく初期の T 細胞分化を誘導しうることが示されているものの、完全な機能的 T 細胞の生成にはほど遠い状況であり、いわゆるヒト化マウスでマウス胸腺から発生するヒト T 細胞は、ヒト主要組織適合抗原 (MHC) に拘束された認識特性を示さず正常な免疫機能発現には至らない。ヒト免疫系機能の完全な再生・再構築と制御のための必須の要件は、元来自己の胸腺組織で起こる正常な認識レパートリーを有する機能的 T 細胞の生成であり、これを人工的に再現しうる技術開発である。本課題は、これを可能にするための「人工」胸腺組織の開発をめざすものである。

2. 研究の目的

本研究では、多くの点で胸腺に類似した性質を有する皮膚由来の細胞を用いて *in vitro* で胸腺様組織体 (organoid) を構築し、これを基礎に自己 MHC に拘束され且つ自己反応性を持たない機能的なヒト T 細胞の再生を目指す。皮膚と胸腺とは初期発生様式が類似している (重層上皮) のみならず、上皮細胞がリンパ球と相互作用するための様々な分子を共通して発現している。また近年、胸腺細胞が胸腺上皮細胞に働きかけて機能分化を促す inducer 機能が分子レベルで明らかに

なってきた。こうした知見を利用し、まず皮膚細胞と正常造血系幹細胞あるいは ES/iPS 細胞との 3 次元培養系により機能的 T 細胞の生成を可能にするシステム (organoid) を構築し、さらにこれをすでに確立されたヒト造血系再構築 (ヒト化) マウスに移植することにより、体内での機能的 T 細胞再生能を検証する。ヒト免疫系再生の最も大きな障壁である機能的 T 細胞生成のための基礎技術の確立は、老化に伴う免疫機能低下、各種免疫不全、骨髄移植などにおいて機能的 T 細胞を供給しうる道を開くのみならず、多くの免疫難病における異常な免疫応答性の解消をめざす新しい方法論開発の可能性につながるであろう。こうした方法論は他の臓器にも応用しうる可能性があり、多能性細胞による臨床応用を目指す際に予想される困難や危惧を補い回避出来る方途を提示しうるものと期待する。

3. 研究の方法

- 1) 皮膚組織由来の上皮および間葉細胞と未熟胸腺内 T 細胞との混合培養によって、両細胞成分からなる胸腺様器官 (organoid) を構築し、そこから成熟した機能的 T 細胞が分化発生しうる条件を確立する。
- 2) ヒト皮膚由来胸腺 organoid とヒト臍帯血由来造血幹細胞を用いて、MHC に拘束されかつ自己反応性を持たない T 細胞を *in vitro* にて生成させ、必要な認識レパートアを有する機能的ヒト T 細胞を試験管内で生成供給しうるシステムを確立する。
- 3) 試験管内で構築されたヒト皮膚由来胸腺 organoid をヒト化マウスに移植することによって、体内のヒト造血系幹細胞からこの organoid を介してヒトの MHC 拘束性を獲得した機能的 T 細胞の生成が構成的に起こりうる「完全な」ヒト免疫系の再構築をはかる。

4. 研究成果

まず、既知の論文報告 (J. Clin. Invest 2005 vol15, p3239) の再現性の確認を兼ねて、市販の支持体 (3次元マトリックス) とヒト表皮細胞との共培養条件 (サイトカインの組み合わせ・量、細胞数等) を検討した。その結果、様々なパラメーター・細胞の入手先等を変えたものの、少なくとも同様の条件によるorganoidでT細胞の産生は認められなかった。海外で同様のトライアルを行っているグループも類似した結果を発表しており、この方法では再現性よくin vitroでT細胞を分化させることは不可能であると判断した。そこで一度、マテリアルを得やすいマウスの表皮細胞を用いた系に戻り、また支持体を改めて検討することとした。いくつかの条件でマウスリンパ球と表皮細胞によるorganoid様の形成が認められたが、この中で完全にT細胞を分化させるには至らず、安定したorganoid構築が可能な培養系に対してさらに別の因子を添加することでT細胞の分化を促進させることができないか、さらに条件検討を行っている。今後in vitroにおいてヒトT細胞を産生させる試みのための基礎的情報を得るために、並行してhumanCd34+細胞を免疫不全マウスに移植してヒトT細胞を生成させる実験系 (humanizedマウス作成) を立ち上げ、マウス胸腺組織からT細胞が出来る過程を観察するとともに、現在問題となっているヒト化マウスにおけるT細胞の機能不全の原因を検討することとした。その結果、既知の報告のとおりマウス胸腺には実際にヒト胸腺細胞が認められ、末梢にT細胞を供給する能力があるものの、胸腺の構築、特に髄質領域に異常があることが明らかになった。ヒト化マウスで産生されたT細胞は機能的に不完全である点が指摘されているが、本知見は、原因の一端であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Kawai Y*, Hamazaki Y*, Fujita H, Fujita A, Sato T, Furuse M, Fujimoto T, Jetten AM, Agata Y and Minato N. *Both authors contributed equally to this work.

Claudin-4 induction by E protein activity in later stages of CD4/8 double-positive thymocytes to increase positive selection efficiency.

Proc Natl Acad Sci USA 2011 Mar 8; 108(10):4075-80 (査読有)

DOI: 10.1073/pnas.1014178108

2. Shimizu Y, Hamazaki Y, Hattori M, Doi K, Terada N, Kobayashi T, Toda Y, Yamasaki T, Inoue TA, Kajita Y, Maeno A, Kamba T, Mikami Y, Kamoto T, Yamada T, Kanno T, Yoshikawa K, Ogawa O, Minato N, Nakamura E.

SPA-1 controls the invasion and metastasis of human prostate cancer.

Cancer Sci. 2011 Apr;102(4):828-36. (査読有)

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01876.x

3. Tanaka H, Tamura A, Sekai M, Hamazaki Y, Minato N.

Increased c-Myc activity and DNA damage in hematopoietic progenitors precede myeloproliferative disease in Spa-1-deficiency.

Cancer Sci. 2011 Apr;102(4):784-91. (査読有)

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01850.x

4. Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, Hamazaki Y, Minato N.

PD-1⁺ memory phenotype CD4⁺ T cells expressing C/EBP α underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia

Proc Natl Acad Sci USA 2009 Sep 15; 06:15807-12 (査読有)

DOI: 10.1073/pnas.0908805106

5. Katayama Y, Sekai M, Hattori M, Miyoshi I, Hamazaki Y, Minato N.

Rap signaling is crucial for the competence of IL-7 response and the development of B-lineage cells.

Blood. 2009 Aug 27;114(9):1768-75 (査読有)

DOI: 10.1182/blood-2009-03-213371

6. Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S.

Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins.

Mol Cell Biol. 2009 May;29(9):2372-89. (査読有)

DOI: 10.1128/MCB.01505-08

[学会発表] (計 18 件)

1. 2012.2.23

Identification of claudin-expressing medullary thymic epithelial stem cells that maintain the functional medulla during life

RCAI Seminar Series 2011

理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター (RCAI) 横浜 招待講演

2. 2012.1.27

Identification of claudin-expressing medullary thymic epithelial stem cells that maintain the functional medulla during life

特定領域研究 (免疫系自己) 国際シンポジウム The 4th Symposium of Immunological Self 京都 招待講演

3. 2011.11.29

A novel CD4+T cell population preferentially producing osteopontin steers altered immune function in senescence and malignancy

Kyosuke Sato, Suhail Tahir, Yuji Fukushima, Yasuhiro Nakashima, Yoko Hamazaki and Nagahiro Minato

第 40 回日本免疫学会総会 幕張メッセ 口頭発表

4. 2011.11.28

Fetal claudin-3,4 positive mTEC progenitors have the long-term reconstitution capacity of functional thymic medulla

Miho Sekai, Yoko Hamazaki and Nagahiro Minato

第 40 回日本免疫学会総会 幕張メッセ 口頭発表

5. 2011.10.19

加齢に伴い増加する新規 CD4 T 細胞サブセット (T-sen) の同定とその意義

日本食品免疫学会 第 7 回学術総会
東京大学安田講堂 東京 招待講演

6. 2011.7.12

自己と非自己を見分ける免疫のしくみ

京大サロントーク 京都大学百周年記念館
京大サロン 京都 招待講演

7. 2011.6.29

Claudin-4 induction by E-protein activity in thymic lymphocytes and its role in the TCR-mediated signaling.

Harumi Fujita, Yohei Kawai, Akikazu Fujita, Toyoshi Fujimoto, Mikio Furuse, Yasutoshi Agata, Nagahiro Minato and Yoko Hamazaki

第 63 回日本細胞生物学会大会 北海道大学 札幌 口頭発表

8. 2011.6.19

A novel CD4+T cell population preferentially producing osteopontin steers altered immune function in senescence and malignancy

Suhail Tahir, Kyosuke Sato, Yasuhiro Nakashima, Yoko Hamazaki and Nagahiro Minato

第 10 回オステオポンチン研究会 北海道大学 札幌 口頭発表

9. 2011.3.23
Claudin expression in the thymus and its implication in T-cell development
華中科技大学同済医学院 武漢 中華人民共和国 招待講演
10. 2011.3.21
Claudin expression in the thymus and its implication in T-cell development
華中科技大学 武漢 中華人民共和国 招待講演
11. 2011.3.3
胸腺組織上皮細胞の発生・分化と自己免疫寛容成立機構の解明
京都大学優秀女性研究者賞（たちばな賞）受賞講演
京都大学医学研究科 紫蘭会館 京都 招待講演
12. 2011.6.10
クローディン4はEタンパク質の活性によって後期DP細胞で発現誘導され、ポジティブセレクションの効率化に寄与する
河合洋平、濱崎洋子、藤田春美、縣保年、湊長博
Kyoto T cell conference 京都 口頭発表
13. 2010. 12. 6-10
The claudin-3,4 positive mTEC progenitors maintain the potential to generate Aire expressing mTECs over fetal stage
Miho Sekai, Yoko Hamazaki, Nagahiro Minato
European Congress of Immunology Liverpool, UK ポスター発表
14. 2010.5.18
Tight junction-independent expression of claudin-4 in thymic lymphocytes and its role in TCR-signaling
Yoko Hamazaki1, Yohei Kawai, Harumi Fujita, Akikazu Fujita, Toyoshi Fujimoto and Nagahiro Minato
第62回日本細胞生物学会総会 大阪国際会議場 口頭発表
15. 2010.3.20
Claudin-4 expression in thymocytes and its role in T-cell development
Yoko Hamazaki, Harumi Fujita, Yohei Kawai and Nagahiro Minato
An International workshop on T lymphocytes hymOZ オーストラリア 口頭発表
16. 2009年12月2日
Claudin expression in Thymocytes: Implication in T cell Development
Yohei Kawai, Yoko Hamazaki, Harumi Fujita and Nagahiro Minato
日本免疫学会 大阪国際会議場 口頭発表
17. 2009. 6. 1-4
Claudin expression in thymocytes; Implication in T cell development
Yoko Hamazaki, Yohei Kawai, Harumi Fujita, Miho Sekai, and Nagahiro Minato
The International Workshop on Kyoto T cell Conference 京都 ポスター発表
18. 2008 .4.18-20
Claudin expression in the thymus: implications in immune function
Annual International Workshop on mucosal Immunity for young investigators
Kiyosato, Japan 招待講演
- 〔図書〕（計5件）
1. 濱崎 洋子、湊 長博
胸腺の発生（皮質・髄質上皮細胞の起源と分化）
メディカルバイオ, 5(1), 24-31 (2008)
オーム社
 2. 濱崎 洋子、湊 長博
胸腺上皮細胞に発現するクローディン感染・炎症、免疫, 38(1), 32-40 (2008)
医薬の門社

3. 濱崎 洋子、湊 長博
胸腺上皮細胞の分化とクローディング
医学のあゆみ, 224(10), 797-798 (2008)
医歯薬出版株式会社

4. エッセンシャル免疫学 (第2版)
監修 笹月健彦
メディカルサイエンス・インターナショナル
2010

5. 免疫生物学 監修 笹月健彦
南江堂 2010

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1205/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱崎 洋子 (HAMAZAKI YOKO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：10362477